



Aprovechamiento de semillas de uva
sobremaduras para la mejora del color de
vinos tintos elaborados en clima cálido

Francisco José Rivero Granados

La tesis titulada “*Aprovechamiento de semillas de uvas sobremaduras para la mejora del color de vinos tintos elaborados en clima cálido*”, presentada por el Ldo. **D. Francisco José Rivero Granados** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal (Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla), bajo la dirección de los Doctores D. Francisco José Heredia Mira, Catedrático de la Universidad de Sevilla, D^a M^a Lourdes González Miret-Martín, Profesora Titular de la Universidad de Sevilla y D^a Belén Gordillo Arrobas, Profesora Ayudante Doctor de la Universidad de Sevilla. Considerando que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos, y que el trabajo reúne los requisitos necesarios, autorizan su presentación

En Sevilla, a 18 de julio de 2019.



Fdo.: Francisco José Heredia Mira



Fdo.: M^a Lourdes González Miret-Martín



Fdo.: Belén Gordillo Arrobas

Los Directores de la Tesis



Fdo. Francisco José Rivero Granados

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi enorme agradecimiento a mis Directores de esta Tesis Doctoral, al Dr. Francisco José Heredia Mira por la oportunidad que me brindó gracias a su confianza, a la Dra. M. Lourdes González Miret-Martín y a la Dra. Belén Gordillo Arrobas. Sin su dedicación, paciencia y saber hubiera sido imposible llevar a cabo este trabajo, y más en las condiciones que han tenido lugar. A través de esta Tesis Doctoral me habéis transmitido vuestra pasión por la ciencia y a luchar por retos complicados, siempre a través de sabios consejos y desde la humildad del talento. Muchísimas gracias por todo.

Agradecer a la Dra. Anna Mignani por admitirme en su laboratorio en el CNR-IFAC de Florencia para la realización de mi estancia doctoral, así como al Dr. Leonardo Ciaccheri y al Dr. Andrea Mencaglia por acogerme con una gran hospitalidad y ayudarme a lograr los objetivos marcados gracias a su profesionalidad y sapiencia.

Agradecimientos a mi maestro y amigo D. Santiago Alonso, su conocimiento en el campo de la enología que me ha transmitido con tanta pasión, siempre me marcará y guiará profesional y personalmente.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos José Miguel, Julio, Paco, María José, Berta, María Jesús, Félix, Emi, Pau, Carla...a todos muchas gracias por vuestra ayuda durante todo este tiempo. Siempre pensaré que soy un afortunado por teneros, ya que más que un grupo de compañeros de trabajo sois un gran grupo de amigos.

A mis amigas Ana Benítez y Rocío Álvarez, grandes profesionales y mejores personas. Sin tu constante ayuda, Ana, aunque pienses lo contrario y no lo creas, ha sido clave en este largo camino. Mil gracias

A todo el personal técnico del Servicio de Biología de los Servicios Generales de la Universidad de Sevilla, a la Cooperativa Ntra. Señora del Socorro y muy especialmente a D. Diego Bort por permitirnos realizar las vinificaciones en sus instalaciones, y, a D. Francisco Espinosa y Bodega La Aurora por proporcionarnos de forma altruista las muestras de semillas necesarias para realizar estos estudios.

Gracias a mis queridos padres y hermana por sus constantes consejos y ánimos, a mis suegros, cuñados y amigos por su apoyo moral y humano.

Gracias enormemente a Cristina por su paciencia, por su apoyo y sobre todo por solidarizarse en tantos y tantos momentos. Sin tu ayuda, este momento jamás habría llegado, gracias Cris.

Pero sobre todo gracias a ti, Julia. A ti te he robado muchísimo tiempo durante estos últimos meses y por ello, no hemos podido disfrutar de muchas cosas juntos. Espero que a través de esta tesis, al menos te pueda enseñar una gran lección de vida para dentro de unos años cuando tengas momentos difíciles a lo largo de tu camino, recuerda que *luchando, trabajando y perseverando se pueden lograr casi todos los retos y sueños, así que levántate siempre y continua hasta conseguirlo.*

Este trabajo ha sido realizado con el apoyo institucional de la Universidad de Sevilla a través de la acción II.3 del V Plan Propio de Investigación y del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España con el proyecto *“Evaluación de estrategias tecnológicas adaptativas para vinificación en condiciones de cambio climático”* (AGL2014-58486-C2-2-R), del que el Dr. Francisco José Heredia Mira es el investigador principal.

A mi hija, Julia

ÍNDICE

• RESUMEN / ABSTRACT	1
• INTRODUCCIÓN	5
1. LA UVA Y EL CAMBIO CLIMÁTICO	5
1.1. Composición química de la uva y su evolución durante la maduración	6
1.2. Consecuencias del cambio climático en la calidad de la uva madura	26
2. EL COLOR DEL VINO TINTO	31
2.1. Importancia del color del vino	31
2.2. Transferencia de color al vino: Extracción de los compuestos fenólicos durante la maceración	33
2.3. Equilibrio de los antocianos en el vino.....	35
2.4. Evolución y estabilización del color durante la vinificación.....	40
3. TÉCNICAS DE VINIFICACIÓN ADAPTATIVAS AL CAMBIO CLIMÁTICO	42
3.1. Elaboración de vino tinto mediante vinificación tradicional	42
3.2. Técnicas alternativas de vinificación	45
4. APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE LA UVA. LAS SEMILLAS	49
• OBJETIVOS	59
• MATERIAL Y MÉTODOS	63
1. MUESTRAS	63
1.1. Semillas sobremaduras	63
1.2. Extractos fenólicos de las semillas sobremaduras.....	64
1.3. Vinos.....	65
1.4. Disoluciones modelo	67
2. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	68
2.1. Parámetros físico-químicos.....	68
2.1.1. Densidad relativa	68
2.1.2. Azúcares reductores.....	69
2.1.3. Acidez Total.....	70
2.1.4. pH	71

2.1.5.	Anhídrido sulfuroso libre y total	71
2.1.6.	Acidez volátil	72
2.1.7.	Fenoles Totales. Método de Folin-Ciocalteu	73
2.2.	Análisis cromatográficos	74
2.2.1.	Determinación de pigmentos antociánicos mayoritarios y flavonoles por HPLC-DAD.....	74
2.2.2.	Determinación de pigmentos antociánicos y derivados mediante HPLC-DAD-MS.....	76
2.2.3.	Determinación de flavan-3-oles y ácidos fenólicos mediante RRLC-DAD-MS.....	77
2.3.	Medida del color por Colorimetría Triestímulo. Espacio CIELAB.	79
2.4.	Medida de la copigmentación.....	80
2.4.1.	Medida por espectrofotometría	80
2.4.2.	Medida por colorimetría diferencial.....	82
2.5.	Espectroscopía Raman	82
2.6.	Métodos estadísticos	84
2.6.1.	Análisis de la Varianza (ANOVA)	84
2.6.2.	Análisis de componentes principales (PCA)	84
•	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
	Capítulo 1. MACERACIÓN FERMENTATIVA DE VINOS TINTOS CON SEMILLAS SOBREMADURAS. EFECTO SOBRE EL COLOR Y LA COMPOSICIÓN FENÓLICA	87
	<i>Publicación: Effect of addition of overripe seeds from white grape by-products during red wine fermentation on wine colour and phenolic composition. LWT-Food Science and Technology. 2017. Vol. 84. Pag. 544-550</i>	
	Capítulo 2. IMPACTO EN EL COLOR Y LA ESTABILIDAD DE VINOS TINTOS DE LA MACERACIÓN POST-FERMENTATIVA CON SEMILLAS DE UVA SOBREMADURAS.....	93
	<i>Publicación: Impact of a post-fermentative maceration with overripe seeds on the color stability of red wines. Food Chemistry. 2019. Vol. 272. Pag. 329-336.</i>	

Capítulo 3. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE COPIGMENTACIÓN DE SEMILLAS SOBREMADURAS POR COLORIMETRÍA DIFERENCIAL.....99

Publicación: Copigmentation potential of overripe seeds from sun-dried white grapes on anthocyanins colour and stability by Differential Colorimetry. International Journal of Food Science & Technology (Aceptado, Pruebas de imprenta).

Capítulo 4. APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN CON EXCITACIÓN A 1064 nm PARA LA VALORIZACIÓN DE SEMILLAS SOBREMADURAS COMO SUBPRODUCTO ENOLÓGICO.....105

Publicación: Dispersive Raman spectroscopy excited at 1064 nm for the nondestructive and rapid valorization of overripe seed byproducts from sundried grapes and phenolic quantification (Enviado a Talanta).

- CONCLUSIONES / CONCLUSIONS 111
- REFERENCIAS..... 115

RESUMEN

Por su gran impacto medioambiental, la gestión y reutilización de residuos agrícolas es uno de los grandes retos de la sociedad actual. En el caso de la vid, uno de los cultivos más extendidos, se producen millones de toneladas de residuos cada año y la industria enológica está en permanente búsqueda de vías de aprovechamiento de los subproductos ya que, además, son residuos ricos en compuestos fenólicos de interés bioactivo.

En Andalucía se elaboran *vinos generosos*, de alta graduación alcohólica, procedentes de uvas blancas sometidas a concentración de azúcares por exposición directa al sol en *paseras*, lo que conduce a características fisicoquímicas y sensoriales especiales, tanto en las uvas como en los vinos obtenidos, y cuya elaboración genera un gran volumen de orujos.

Más recientemente, adaptándose a las tendencias del mercado, las bodegas de esta región de clima cálido comenzaron a elaborar vinos tintos, lo que supuso un gran reto por las altas temperaturas que se alcanzan, agravadas por los efectos del cambio climático. Se dificulta la correcta maduración de la uva tinta y se produce un desfase entre las maduraciones tecnológica (azúcares/ácidos) y fenólica, lo que pone en riesgo la obtención de vinos tintos de calidad sensorial, en especial gustativa (astringencia) y visual (intensidad y estabilidad del color). Es conocido que los vinos tintos de clima cálido frecuentemente son desequilibrados, de color inestable y, por lo tanto, poco aceptados por el consumidor.

El principal objetivo de esta Memoria es integrar ambas circunstancias, por un lado, el aprovechamiento de las semillas sobremaduras procedentes de la elaboración de vinos generosos y, por otro, la mejora del color de vinos tintos de clima cálido. Se plantea establecer el valor de las semillas sobremaduras como fuente de fenoles, optimizando su aplicación en la vinificación en tinto (momento, tiempo, dosis), y evaluar su efecto en la calidad y estabilización del color a través del fenómeno de copigmentación.

Mediante cromatografía líquida de alta eficacia, se ha analizado el perfil fenólico de semillas de tres variedades de uvas blancas comúnmente usadas para la elaboración de vinos generosos (Pedro Ximénez, Moscatel y Zalema), con diferentes niveles de sobremaduración. Se destaca la riqueza fenólica de estas semillas sobremaduras, principalmente en flavanoles, ácidos benzoicos y procianidinas, siendo las de la variedad Moscatel las que presentaron un mayor contenido en fenoles.

Se han elaborado vinos tintos de variedad Syrah, y se han añadido semillas sobremaduras de variedad Pedro Ximénez, como fuente alternativa de copigmentos, en diferentes condiciones en cuanto a la cantidad de semillas añadidas (dosis de 3 g/L y 12 g/L), el tiempo de maceración (7, 30 y 60 días) y la etapa de maceración (fermentativa y postfermentativa). Se determinó el perfil fenólico de los vinos y se aplicó la Colorimetría Triestímulo para evaluar el efecto sobre la copigmentación con antocianos y el color de los vinos, así como su evolución en el tiempo.

Los vinos con adición fermentativa de semillas sobremaduras, es decir, coincidiendo con el encubado de los orujos, presentaron un mayor contenido en antocianos y procianidinas que los vinos testigo (sin adición de semillas), lo que condujo a una mayor estabilización de los antocianos en las últimas etapas de vinificación, con un efecto cromático positivo, obteniendo vinos tintos de color más estable, más oscuros y cuyos tonos permanecieron rojos hacia los azulados.

Para poder controlar la duración de la maceración con las semillas, se planteó la adición de semillas sobremaduras tras el descube de los orujos, con diferentes tiempos de contacto. Con maceraciones postfermentativas de 60 días se obtuvieron vinos tintos con mayor calidad y estabilidad cromática.

A partir de los extractos fenólicos en sistemas modelo, se han establecido diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición de las semillas sobremaduras de diferentes variedades de uva blanca. Se estudió la influencia en la evolución de los antocianos monoméricos de hollejos de uvas tintas y la formación de nuevos pigmentos derivados. Aplicando la Colorimetría Triestímulo Diferencial, se ha evaluado la eficacia copigmentante y el efecto sobre la calidad y estabilización del color. Se comprobó que los efectos colorimétricos más positivos (colores más intensos y más estables en el tiempo) se produjeron con los extractos de semillas de Moscatel, seguidos de los de Pedro Ximénez.

Por último, se ha aplicado la Espectroscopía Raman como método rápido y no destructivo, en comparación con el análisis cromatográfico, que implica la destrucción de la muestra, el gasto de tiempo en su preparación y el coste económico por el uso de reactivos. Por Espectroscopía Raman con excitación a 1064 nm, se han caracterizado espectroscópicamente semillas sobremaduras de uvas blancas de distinto perfil fenólico, obteniendo una buena discriminación entre variedades y diferentes estados de sobremaduración.

ABSTRACT

Due to the environmental impact, the management and reuse of agricultural waste is one of the great challenges of today's society. In the case of vine, one of the most widespread crops, millions of tons of waste are produced each year and the oenological industry is constantly searching for ways to take advantage of byproducts since, in addition, they are rich in phenolic compounds, having bioactive interest.

In Andalusia, generous wines of high alcohol content are produced from white grapes subjected to concentration of sugars by direct exposure to the sun in *paseras*, which leads to special physicochemical and sensory characteristics, both in the grapes and in the wines obtained, and whose elaboration generates a large volume of residues.

More recently, adapting to the market trends, the wineries of this warm climate region began to elaborate red wines. This was a great challenge due to the high temperatures that are reached, aggravated by the effects of the climate change. The ripening of the red grape is inadequate being a gap between the technological (sugar/acid) and the phenolic maturation, which puts at risk the obtaining high-sensory quality red wines, mainly taste (astringency) and visual quality (intensity and color stability). Thus, it is known that warm-climate red wines are frequently unbalanced, unstable in color and, therefore, little accepted by the consumer.

The main objective of this Thesis is to integrate both circumstances, on the one hand, the use of overripe seeds originated in the production of generous wines and, on the other hand, the improvement of the color of warm-climate red wines. Thus, the goal is to valorize the overripe seeds as a source of phenols, optimizing their application in red wine (moment, time, dose), and evaluate the effect on the quality and stabilization of color through the copigmentation phenomenon.

By means of high efficiency liquid chromatography, the phenolic profile of seeds of three white grapes varieties commonly used for the production of generous wines (Pedro Ximénez, Moscatel and Zalema), with different levels of over-ripening, has been determined. The phenolic richness of these overripe seeds is highlighted, mainly in flavanols, benzoic acids and procyanidins, having the highest phenolic content in Moscatel variety.

Red wines from Syrah variety have been produced, and Pedro Ximénez variety overripe seeds have been added, as external natural source of copigments, at different conditions regarding the amount of seeds added (doses of 3 g/L and 12 g/L), the

maceration time (7, 30 and 60 days) and the maceration stage (fermentative and post-fermentative). The phenolic profile of wines was determined and Tristimulus Colorimetry was applied to evaluate the effect on copigmentation with anthocyanins and the color of the wines, as well as their evolution over time.

The wines obtained with fermentative addition of overripe seeds, that is to say, coinciding with the vatting period, showed higher content in anthocyanins and procyanidins than the control wines (without seeds addition), which led to a greater stabilization of the anthocyanins in the last stages of vinification, with a positive chromatic effect, obtaining red wines of more stable color, darker and red towards bluish hues.

Another assay consisted on adding the he overripe seeds after drawing-off (post-fermentative addition), in order to manage the time of contact (maceration) between wine and seeds. Also, different contact times were studied. 60-day post-fermentative macerations lead to red wines with higher quality and chromatic stability.

Using the phenolic extracts of seeds in model systems, qualitative and quantitative differences have been established in the phenolic composition of overripe seeds from different white grape varieties. The influence on the evolution of monomeric anthocyanins from red grape skins and the formation of new derived pigments was studied. The copigmentation efficiency and the effect on the quality and stabilization of the color have been evaluated by applying Differential Tristimulus Colorimetry. It was found that the most positive colorimetric effects (colors more intense and more stable over time) were produced with Moscatel seed extracts, followed by those of Pedro Ximénez.

Finally, Raman spectroscopy has been applied as a rapid and non-destructive method, in comparison with the chromatographic analysis, which involves sample destruction, time spent in preparing it and economic cost due to the use of reagents. By Raman spectroscopy with excitation at 1064 nm, we have characterized spectroscopically overripe seed of white grapes having different phenolic profile, obtaining a good discrimination between varieties and between different overripening states.



Introducción

1. LA UVA Y EL CAMBIO CLIMÁTICO

Los estudios de fósiles datan la presencia de *Vitis silvestris* L. por todo el hemisferio norte desde hace más de 3 millones de años. Debido a las glaciaciones que se produjeron en la era cuaternaria, esta planta sólo sobrevivió en las regiones más cálidas como sucedió en la cuenca mediterránea y en los valles de las zonas más septentrionales. Sin embargo, también se extendió por los continentes americano y asiático debido a la unión que existía entre ellos.

La especie original, que presentaba cepas masculinas y cepas femeninas, sufrió una mutación originada en la región del mar Caspio hace 6000-8000 años dando lugar a una nueva especie, *Vitis vinifera*, con flores hermafroditas, hecho que ayudó en gran medida a su propagación a lo largo de toda la cuenca mediterránea. Durante las épocas griega y romana, el cultivo de *Vitis vinifera* se extendió por sus colonias, adquiriendo una gran importancia el desarrollo de la viticultura durante este periodo. En el siglo XVI, la planta llegó a América llevada allí por los españoles para su propio suministro de uvas y vino. Estas “vides del Nuevo Mundo”, en siglos posteriores, serían las salvadoras de la viticultura, ya que durante el siglo XIX las vides europeas sufrieron el ataque de la filoxera (*Daktylosphaera vitifoliae*), un insecto que ataca directamente y destruye las raíces de la planta. Esta plaga, prácticamente, acabó con las vides europeas (Figura 1). Los injertos realizados de vides europeas sobre pies de origen americano, que habían mostrado mayor resistencia, ayudaron a paliar esta plaga (Hidalgo-Togores, 2011).

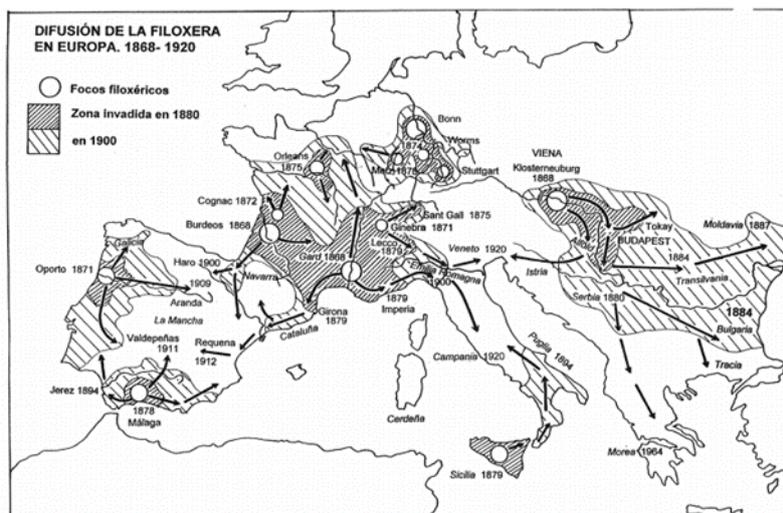


Figura 1: Difusión de la Filoxera en Europa. 1868-1920 (Juan Piqueras Haba)

El género *Vitis* cuenta con un gran número de especies, y dentro de cada una de ellas existen diferentes variedades. Si nos centramos en *V. vinifera* L., se citan 10.000 variedades diferentes, llegándose a hablar de hasta 20.000 teniendo en cuenta las hibridaciones (Martínez de Toda, 1991). Sin embargo, no todas tienen un valor comercial en la producción de vino y como uva de mesa, restringiéndose este enorme número sólo a una fracción

Según la definición dada por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2016), la uva fresca es el fruto maduro procedente de la vid. Estos frutos están compuestos por la piel u hollejo, las semillas o pepitas, la pulpa y el pedicelo, que lo une al raspón o parte del racimo destinado a unirlo con la planta (Figura 2).

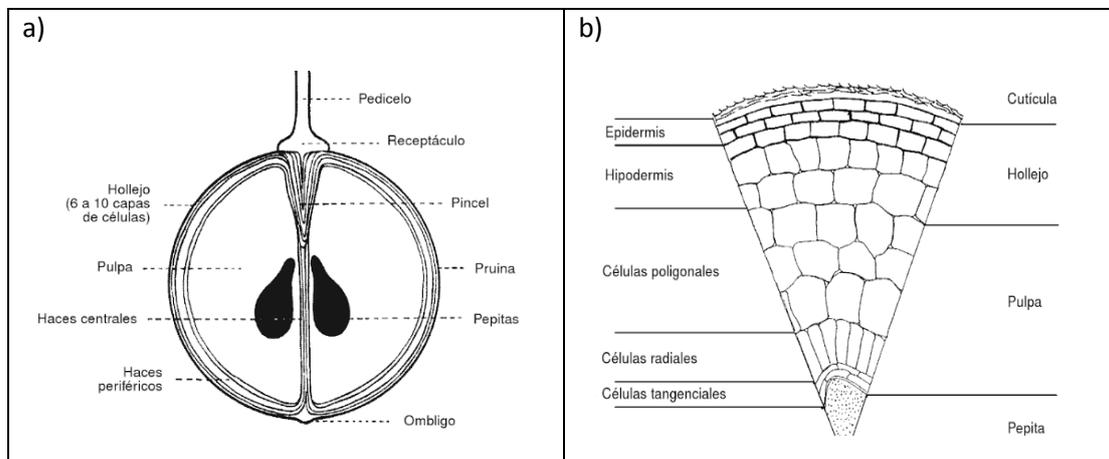


Figura 2. a) Corte esquemático de un grano de uva, b) Morfología esquemática de los tejidos de un grano de uva madura. (Fuente: Hidalgo-Togores, 2011).

En concreto, *uva de vinificación* es la uva fresca que, por sus características, se destina esencialmente a vinificación. En ocasiones, puede estar sobremadura, ligeramente pasificada o afectada de podredumbre noble, a condición de que pueda ser estrujada o prensada usando los procedimientos ordinarios de cada bodega y produzca espontáneamente una fermentación alcohólica (OIV, 2016).

1.1. Composición química de la uva y su evolución durante la maduración.

Las características físicas y químicas de la uva están relacionadas, en primer lugar, con la variedad. Además, la composición de la uva puede variar apreciablemente dependiendo de las condiciones medioambientales y agronómicas en las que se desarrolla la vid.

De manera general, los ácidos orgánicos y azúcares sencillos, junto con el agua, se encuentran sobre todo en la pulpa, mientras que los compuestos fenólicos lo hacen fundamentalmente en las semillas y los hollejos. La composición de las distintas partes de la uva tiene una gran importancia en la elaboración de los vinos y su calidad, ya que una buena parte de los compuestos serán transferidos al mosto durante la vinificación. Esta composición se muestra en la Figura 3.

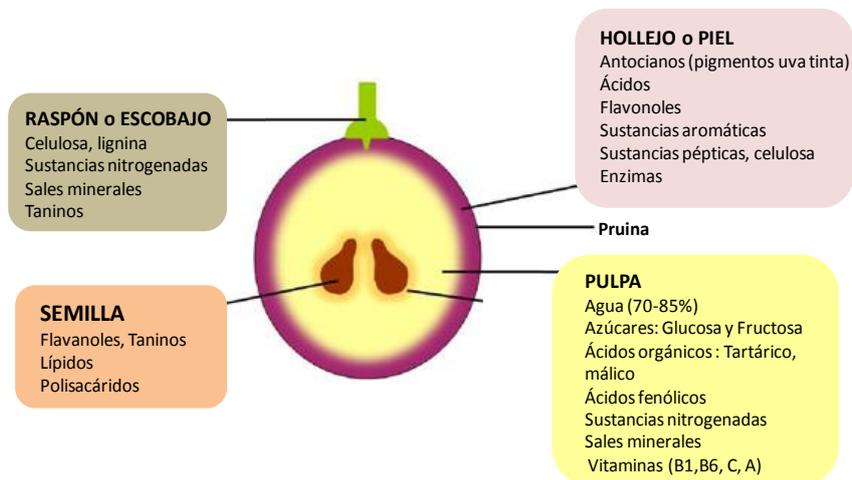


Figura 3. Composición de las distintas partes de la uva.

Pulpa: La pulpa supone entre el 75 y el 85% del peso total de la uva debido a que sus vacuolas contienen el mosto, un líquido de base acuosa que, fundamentalmente, contiene azúcares (glucosa y fructosa como mayoritarios), ácidos orgánicos (tartárico, málico y cítrico como prioritarios), minerales (calcio, magnesio y sodio), compuestos nitrogenados (aminoácidos y proteínas solubles) y otros compuestos como aldehídos y ésteres en forma de compuestos aromáticos, y fenoles. Por otro lado, los ésteres de ácidos hidroxicinámicos son los compuestos fenólicos que predominantemente se encuentran en la pulpa de la uva (Guchu et al., 2015).

Hollejo: La piel de la uva corresponde al 5-10% del peso total seco de la uva. Actúa como una barrera natural contra factores climáticos o enfermedades fúngicas. En los hollejos se pueden diferenciar 3 partes: cutícula, epidermis e hipodermis. La cutícula es una capa fina que constituye la parte más externa de la piel y es donde se encuentra la pruina que protege las células interiores de la lluvia y la humedad, y retiene en su superficie los microorganismos transportados por el aire, como las levaduras. Más internamente se encuentran la epidermis y la hipodermis. La composición de esta última capa es muy importante para la vinificación ya que en ella se encuentran compuestos responsables de atributos sensoriales del vino como el sabor, el aroma y el color (pigmentos antocianicos, ácidos cinámicos, flavonoles y sustancias aromáticas).

Semillas: Dependiendo de la variedad de uva, cada grano puede tener de 1 a 4 semillas, aunque también se puede dar que no contengan ninguna (Shi et al., 2003). Las semillas constituyen el 0-6% del peso de la uva y es la parte que alberga el embrión. Están compuestas, fundamentalmente, por agua (25-45%), fibra (40%), aceites esenciales (16%), proteínas (11%), polifenoles (7%) y otros compuestos minoritarios como azúcares o minerales (García-Jares et al., 2015). La semilla es una de las principales fuentes fenólicas de la uva, contribuyendo entre el 20-55% del total de los polifenoles de la baya. Entre los polifenoles más abundantes se encuentran las formas oligoméricas y poliméricas de los flavanoles (prociandinas y taninos, respectivamente). Estos compuestos fenólicos, al igual que los de los hollejos, tienen una gran importancia en las propiedades sensoriales del vino y se transfieren al mosto durante la maceración. Las semillas se dividen en 3 partes: envoltura externa, albumen y embrión. La envoltura externa, rica en compuestos fenólicos, está compuesta de subcapas como la epidermis o la cutícula, además de los tegumentos externos, medio e interno (Figura 4). El albumen es un tejido interno de la semilla donde se encuentra una importante cantidad de aceites con ácidos grasos como el oleico y el linoleico, además de otros compuestos orgánicos como proteínas (Gazzola et al., 2014).

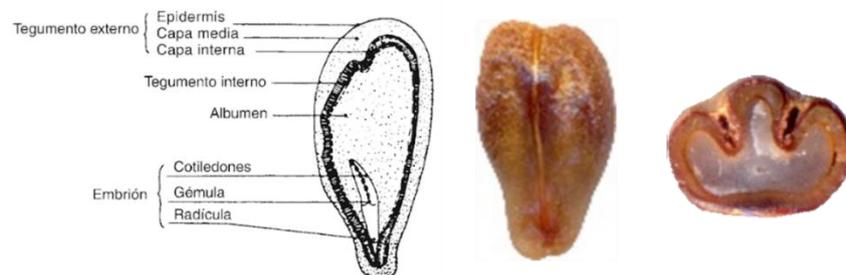


Figura 4. Sección longitudinal de la semilla de uva (Fuente: Hidalgo-Togores, 2011), junto con imágenes gráficas y corte transversal.

Raspón: El raspón o escobajo es el elemento del racimo que sirve de soporte a las bayas, y conduce los nutrientes a través de los vasos situados en su interior (Hidalgo-Togores, 2011). En cuanto a su composición, es pobre en azúcares, contiene sales minerales destacando el potasio, y es rico en compuestos fenólicos como flavanoles, ácidos fenólicos y flavonoles (Souquet et al., 2000). Su riqueza fenólica lo hace interesante en la elaboración de vinos pobres en estos compuestos, pero generalmente se elimina del racimo previamente a la maceración, ya que su composición puede aportar al vino aromas y sabores herbáceos indeseables.

Composición fenólica de la uva

Los fenoles son compuestos químicos sintetizados por las plantas a través de mecanismos secundarios, en respuesta a situaciones o factores de estrés abióticos y/o bióticos, como pueden ser la intensa luz solar, las altas temperaturas, el ataque de animales o patógenos, o la propia actividad humana (Hernandez et al., 2006; Oliveira et al., 2013).

En el caso de los fenoles de la uva, la mayor parte se transfiere al vino durante el proceso de vinificación, especialmente en el caso del vino tinto (aproximadamente el 60%). Estos compuestos tienen gran importancia en la calidad del vino debido a que están implicados en propiedades sensoriales como el cuerpo, el aroma, el sabor, la astringencia o el color (Cassassa, 2017). Además de su importancia sensorial, los fenoles de la uva presentan diversas propiedades bioactivas entre las que destaca el efecto antioxidante (Arvanitoyannis et al., 2006; Anastasiadi et al., 2010, Jara-Palacios et al., 2016). Muchos de estos compuestos han demostrado tener capacidad para prevenir ciertas enfermedades como algunos tipos de cáncer, diabetes tipo 2 o anomalías cardiovasculares (He & Giusti, 2010). Por ello, sectores como el alimentario, el farmacéutico o el cosmético muestran gran interés en el estudio y desarrollo de nuevas aplicaciones de los compuestos fenólicos de la uva y el vino (Jayaprakasha et al., 2001; Yilmaz & Toledo, 2004; Feringa et al., 2011; Li et al., 2017; Tomi et al., 2017).

Desde el punto de vista químico, en la uva existe una gran diversidad de compuestos fenólicos, con una estructura común cuya unidad principal es el fenol: un anillo aromático que aporta una gran reactividad, con al menos un grupo hidroxilo en su estructura (Monagas et al., 2005). Además, en la uva existen otras estructuras más complejas denominadas polifenoles, los cuales pueden tener en su composición más de un anillo fenólico, y con uno o más grupos hidroxilos. Estos grupos funcionales se pueden encontrar libres o unidos a moléculas de diferente naturaleza, generando así una amplia diversidad química (Cheynier et al., 2010).

La clasificación de los compuestos fenólicos se puede realizar en función de diferentes criterios. Teniendo en cuenta la estructura de su esqueleto carbonado, los fenoles se clasifican en flavonoides y no flavonoides. En las uvas tintas de la especie *V. vinifera* L., los principales grupos de flavonoides son los antocianos, los flavan-3-oles y los flavonoles; y en menor medida los flavanonoles y las flavonas. Entre los compuestos no flavonoides, se encuentran los ácidos fenólicos (benzoicos e hidroxicinámicos) y los estilbenos. La uva contiene esencialmente compuestos no flavonoides en la pulpa y los flavonoides en los hollejos, semillas y raspones.

- **No flavonoides:** Los compuestos fenólicos no flavonoides se caracterizan por tener un único anillo de 6 átomos de carbonos (C6). En este grupo se encuentran los ácidos benzoicos, los ácidos hidroxicinámicos y los estilbenos.
 - **Ácidos Benzoicos.** Poseen una estructura general basada en una disposición de C6-C1 (Figura 5). La diferencia de estos compuestos radica en las hidroxilaciones y metilaciones del anillo aromático. Entre los diferentes ácidos benzoicos, el ácido gálico se ha descrito como uno de los fenoles más importantes en la uva por ser precursor de todos los taninos hidrolizables y participar en la composición de taninos condensados (Naumann et al., 2013; Garrido & Borges, 2013). La uva también contiene otros derivados benzoicos como el ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido protocatéquico, siríngico, o eláxico.

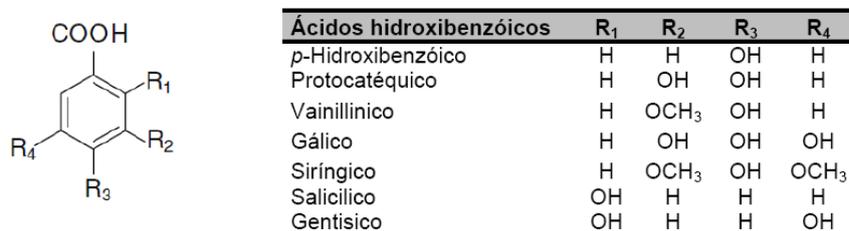


Figura 5. Estructura básica de los ácidos benzoicos (adaptado de Monagas et al., 2005).

- **Ácidos hidroxicinámicos.** Son los ácidos fenólicos mayoritarios en la uva y en el vino (Baderschneider & Winterhalter, 2001; Chamkha et al., 2003). Son compuestos que estabilizan eficientemente el color del vino tinto y que poseen importantes propiedades antioxidantes (Teixeira, J. et al. 2013; Trouillas et al. 2016). La estructura general consiste en un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo (C6-C3) (Figura 6). En el anillo aromático pueden existir uno o varios grupos hidroxilos, lo que produce una gran variabilidad de ácidos dentro de esta familia. En este grupo se engloban ácidos como el cafeico, *p*-cumárico, sinápico o ferúlico. Estos ácidos se encuentran en forma *cis* o *trans*, siendo esta última la más abundante en la naturaleza. Estos isómeros son convertibles en una forma o en otra a través de la acción de la luz solar o la acción enzimática.

Usualmente, los ácidos hidroxicinámicos se encuentran en forma de ésteres unidos al ácido tartárico, dando lugar a derivados como los ácidos *trans*-caferoiltartárico (ác. caftárico), ácidos *trans-p*-cumaroiltartárico (ác. coutárico) y ácidos *trans*-feruloiltartárico (ác. fertárico). Estos ésteres, junto a sus ácidos hidroxicinámicos, son los compuestos fenólicos más abundantes en vinos blancos, y los no flavonoides en vinos tintos (Vanzo et al., 2007).

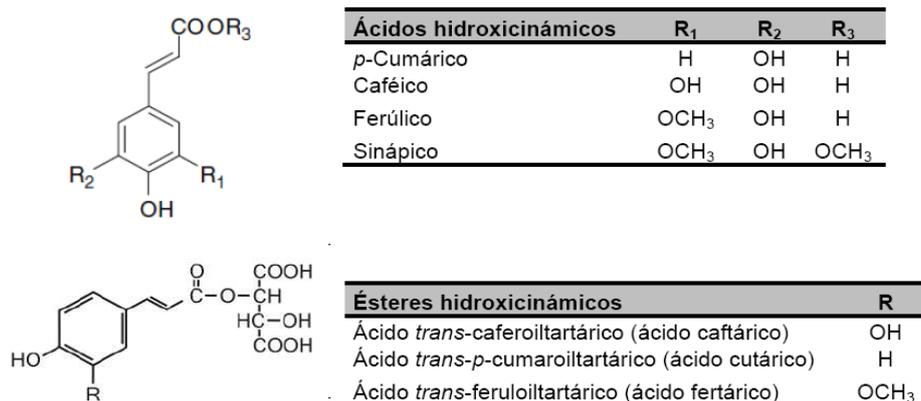


Figura 6. Estructura básica de los ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres derivados
(Adaptado de Monagas et al., 2005)

- **Estilbenos.** La estructura de estos compuestos se basa en 2 anillos fenólicos unidos por un enlace etileno (C6-C2-C6). Los estilbenos pueden encontrarse libres o formando heterósidos, a veces poliméricos. El resveratrol (Figura 7) es el compuesto más destacado dentro de esta familia, y se encuentra en la hoja de la vid y los hollejos de las uvas, por lo que las maceraciones prolongadas en las vinificaciones de uvas tintas producen una gran concentración de este compuesto en el vino (Pussa et al., 2006; Garrido & Borges, 2013).

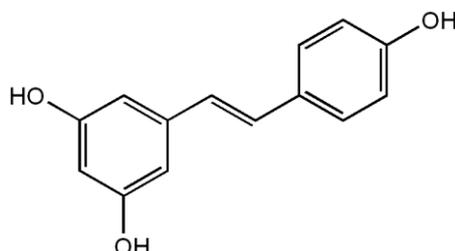


Figura 7. Estructura del resveratrol, principal representante de los estilbenos.

Algunos autores consideran el resveratrol como una fitoalexina, es decir, una toxina o compuesto antimicrobiano producido por las uvas en respuesta a una infección fúngica o a un estrés abiótico. Entre los fenoles, este compuesto en particular ha gozado de gran importancia en los últimos tiempos debido a los estudios sobre sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Chang et al. 2011; Jian et al., 2016).

- **Flavonoides:** Los flavonoides son los compuestos mayoritarios dentro de los polifenoles de la uva. De hecho, hasta el momento se han descrito alrededor de 5000 flavonoides (Tanwar & Modgil., 2012), con un origen biosintético común. La estructura general de los flavonoides (Figura 8) está formada por 15 átomos de carbono, que se encuentran constituyendo dos anillos aromáticos, unidos entre sí

mediante una cadena carbonada de 3 átomos, que a su vez puede formar parte de un tercer anillo aromático (C6-C3-C6) .

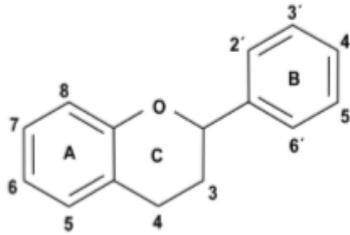


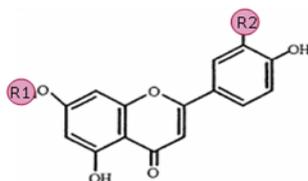
Figura 8. Estructura básica de los flavonoides

Existen diferentes familias dentro de los flavonoides, dónde la diferencia principal radica en el grado de oxidación y los tipos de sustituyentes del anillo C.

Los diferentes compuestos dentro de cada familia difieren en el patrón de sustitución en los anillos A y B (Middleton et al., 1998). En el grupo de flavonoides se engloban las flavonas, flavanonas/flavanonoles, flavanos/flavanoles, flavonoles, antocianos (Garrido & Borges, 2013).

Generalmente, los flavonoides existen en la naturaleza como agliconas o derivados esterificados a través de sus grupos hidroxilos con moléculas de azúcar (O-glicosilación) o con grupos metilos (O-metilación) (Kumar & Pandey, 2013). Sin embargo, estas esterificaciones no se producen de manera uniforme en todos los flavonoides, participando diversos grupos hidroxilos situados en diferentes carbonos según el tipo de flavonoide esterificado (Mattivi et al., 2006; Jing et al., 2008).

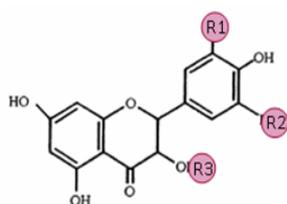
- **Flavonas.** Se caracterizan por tener un doble enlace entre los carbonos C2 y C3 por la ausencia de un grupo hidroxilo en el C3 (Figura 9). Estos compuestos, a pesar de existir en gran cantidad en el reino vegetal, no son muy abundantes en los frutos, se han identificado en hojas de *Vitis vinifera* luteolina o apigenina y sus derivados 7-glucósidos (Fang et al., 2008). Además, son compuestos con importantes propiedades farmacológicas (Singh et al., 2014).



Flavonas	R1	R2
Luteolina	OH	H
Apigenina	H	H

Figura 9. Estructura química de flavonas del vino (Adaptado de Monagas et al., 2005).

- **Flavanonas / Flavanonoles.** También llamadas dihidroflavonas, muestran un carbono saturado entre los carbonos C2 y C3. Algunas flavanonas como el eriodictol, la naringenina y la hespertina se han identificado en uvas y en muestras de vinos (Jandera et al.; 2005; Perestrelo et al., 2012). La estructura de los flavononoles es similar a las de las flavanonas (Figura 10). La diferencia radica en que en el caso de los flavononoles la ausencia del doble enlace se debe a la presencia de un grupo hidroxilo, mientras que las flavanonas no presentan este grupo hidroxilo. Entre los flavononoles identificados se encuentran diversos dihidroflavonoles, algunos de ellos glucosilados en posición 3 con glucosa, ramnosa o xilosa, siendo los más destacados la astilbina (dihidroquercetina 3-O-ramnósido), y la engeletina (dihidrokaempferol 3-O-ramnósido) (Monagas et al., 2005)



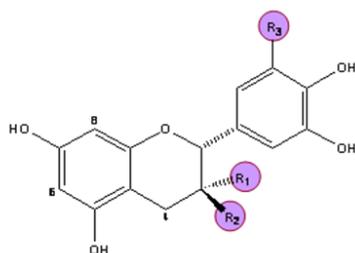
Flavanonoles	R1	R2	R3
Astilbina	OH	H	ramnosa
Engeletina	H	H	ramnosa

Figura 10. Estructura química de las principales flavononoles en uva. (Adaptado de Monagas et al., 2005)

- **Flavanos / Flavanoles.** Los flavanos poseen un enlace saturado entre los carbonos C2 y C3, sin grupo carbonílico en C4. Estos compuestos, muy abundantes en frutas inmaduras, son los precursores de los flavanoles (Swanson, 2003).

Los flavanoles presentan un grupo hidroxilo en el carbono C3. En la naturaleza se pueden encontrar dos tipos: *flavan-3-oles*, generalmente en los frutos, y *flavan-3,4-dioles* o leucoantocianidinas, frecuentemente en las maderas.

Los flavan-3-oles monoméricos más abundantes en uva y vino son catequina y su enantiómero epicatequina, aunque también se pueden encontrar otros compuestos como galocatequina o epigalocatequina (Figura 11). Aunque los flavan-3-oles, a diferencia de otros flavonoides, se encuentran usualmente en forma libre y no en forma glicosilada en los frutos, también se presentan esterificados con el ácido gálico como es el caso de la epicatequina-3-O-galato, compuesto identificado en uvas (Bonetti et al., 2017).



Flavanoles	R1	R2	R3
(+)- Catequina	H	OH	H
(+)- Galocatequina	H	OH	OH
(-)- Epicatequina	OH	H	H
(-)- Epigallocatequina	OH	H	OH

Figura 11. Estructura de los flavan-3-oles monoméricos de la uva.

Los flavan-3-oles se pueden encontrar en los hollejos de las uvas pero, sobre todo, en sus semillas (Miljić et. al, 2014). Son responsables de sensaciones organolépticas como el amargor o la astringencia debido a la formación de complejos con las proteínas de la saliva (McRae & Kennedy., 2011).

Además, en uvas y vinos es característico encontrar proantocianidinas y taninos condensados, que son oligómeros y polímeros de los flavan-3-oles monoméricos, respectivamente. Su diferencia radica en el grado medio de polimerización, siendo de 2 a 5 unidades para las proantocianidinas y de más de 5 unidades para los taninos condensados.

Los monómeros más usuales en la formación de las proantocianidinas son la catequina, epicatequina o epicatequina-3-O-galato (Souquet et al., 2000), formándose estos compuestos a través de la condensación de los diferentes monómeros mediante enlaces C4→C6 o C4→C8.

Las proantocianidinas tienen la propiedad de liberar en su hidrólisis antocianidinas a través de catálisis ácidas (Lorrain et al., 2013). Por ello, según la antocianidina liberada se pueden distinguir procianidinas y prodelfinidinas que liberan cianidinas y delfinidinas respectivamente. Las semillas sólo contienen procianidinas mientras que los hollejos tanto procianidinas como prodelfinidinas (Monagas et al., 2005).

Dependiendo del tipo de unión interflavánica, las procianidinas se clasifican como tipo A y B. En las de tipo A, las unidades de flavanol poseen un enlace tipo éter entre C2-C5 o C2-C7 y las de tipo B están formadas por monómeros unidos por enlaces C4-C6 o C4-C8, siendo este último más abundante (Terrier et al., 2009). La mayoría de las procianidinas identificadas en la uva son tipo B, como la procianidina B1 que se muestra en la Figura 12. La estructura de otros oligómeros identificados en uvas y vinos se presenta en la Tabla 1.

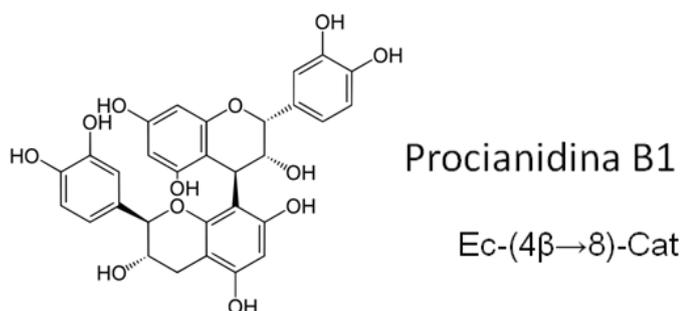


Figura 12. Estructura química de la procianidina B1.

Tabla 1. Dímeros y trímeros de proantocianidinas identificadas en la uva (Adaptado de Monagas et al., 2005)

Dímeros de procianidinas	
B1	Ec-(4 β →8)-Cat ^a
B2	Ec-(4 β →8)-Ec ^b
B3	Cat-(4 α →8)-Cat
B4	Cat-(4 α →8)-Ec
B5	Ec-(4 β →6)-Ec
B6	Cat-(4 α →6)-Cat
B7	Ec-(4 β →6)-Cat
B8	Cat-(4 α →6)-Ec
Dímeros esterificados con ácido gálico	
B1-3- <i>O</i> -gallato	Ec-3- <i>O</i> -gallate-(4 β →8)-Cat
B2-3- <i>O</i> -gallato	Ec-3- <i>O</i> -gallate-(4 β →8)-Ec
B2-3'- <i>O</i> -gallato	Ec-(4 β →8)-Ec-3- <i>O</i> -gallato
B3-3- <i>O</i> -gallato	Cat-3- <i>O</i> -gallate-(4 α →8)-Cat
B4-3'- <i>O</i> -gallato	Cat-(4 β →8)-Ec-3- <i>O</i> -gallate
B5-3- <i>O</i> -gallato	Ec-3- <i>O</i> -gallate-(4 β →6)-Ec
B6-3- <i>O</i> -gallato	Cat-3- <i>O</i> -gallate-(4 β →6)-Cat
B7-3- <i>O</i> -gallateo	Ec-3- <i>O</i> -gallate-(4 β →6)-Cat
B1-3,3'-di- <i>O</i> -gallato	Ec-3- <i>O</i> -gallate-(4 β →8)-Cat-3- <i>O</i> -gallato
B2-3,3'-di- <i>O</i> -gallato	Ec-3- <i>O</i> -gallate-(4 β →8)-Ec-3- <i>O</i> -gallato
B3-3,3'-di- <i>O</i> -gallato	Cat-3- <i>O</i> -gallate-(4 α →8)-Cat-3- <i>O</i> -gallato
B7-3,3'-di- <i>O</i> -gallato	Ec-3- <i>O</i> -gallate-(4 α →6)-Cat-3- <i>O</i> -gallato
Trímeros de procianidinas	
C1	Ec-(4 β →8)-Ec-(4 β →8)-Ec
C2	Cat-(4 α →8)-Cat-(4 α →8)-Cat
T2	Ec-(4 β →8)-Ec-(4 β →8)-Cat
T3	Ec-(4 β →8)-Ec-(4 β →6)-Cat

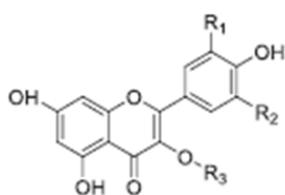
^a Cat = (+)-catequina; ^b Ec = (-)-epicatequina

A lo largo de procesos de envejecimiento, los taninos condensados van formando cadenas mayores lo que produce precipitaciones debido a la disminución de solubilidad en el vino (Yildirim & Altindişli, 2015). Es posible diferenciar los taninos de semillas y del hollejo ya que los primeros son ricos en procianidinas

altamente galoiladas y poseen un grado medio de polimerización alrededor de 10 unidades. En cambio, los taninos del hollejo no presentan tanta galoilación, están compuestos de procianidinas y prodelfinidinas y poseen cerca de 30 unidades (Busse-Valverde et al., 2011).

- **Flavonoles.** Se caracterizan por tener un doble enlace entre los carbonos C2 y C3 y un grupo hidroxilo en el C3. La mayoría de los flavonoles tienen además grupos hidroxilos en los carbonos C5 y C7 por lo que son llamados derivados 3,5,7-trihidroxilatos.

Los flavonoles de uva se encuentran principalmente en los hollejos. Esta familia comprende glucósidos, galactósidos y glucurónidos de seis agliconas: quercetina, miricetina, isoramnetina, kaempferol, laricitrina y siringetina; junto con la quercetina 3-rutinósido. Recientemente, derivados acetilados y *p*-coumaroilados de la isoramnetina, laricitrina y siringetina (3-*O*-glucosidos) han sido identificados por primera vez en los hollejos de uvas *Vitis vinífera* de las variedades Tannat, Marselan y Syrah, así como en sus vinos (Favre et al., 2018). Sus estructuras químicas se presentan en la Figura 13.



Aglicona flavonol	R1	R2	R3
Miricetina	OH	OH	H/acetyl/ <i>p</i> -coumaroyl
Quercetina	OH	H	H
Kaempferol	H	H	H
Isoramnetina	OCH ₃	H	H/acetyl/ <i>p</i> -coumaroyl
laricitrina	OCH ₃	OH	H/acetyl/ <i>p</i> -coumaroyl
siringetina	OCH ₃	OCH ₃	H/acetyl/ <i>p</i> -coumaroyl

Figura 13. Estructura química de los principales flavonoles de la uva y sus respectivas agliconas. (Adaptado de Favre et al., 2018)

En las uvas, los flavonoles están presentes como 3-*O*-glicósidos, mientras que sus correspondientes agliconas libres también se pueden encontrar en vinos debido a la hidrólisis ácida que se produce durante la vinificación y el envejecimiento. En general, los derivados glicosilados más abundantes son los glucósidos, mientras que los galactósidos y glucurónidos son minoritarios, exceptuando a la quercetina 3-*O*-glucurónido, que se encuentra en cantidad similar a la quercetina 3-*O*-glucósido (Mattivi et al., 2006). En cuanto a las agliconas, las mayoritarias son la quercetina y miricetina (Castillo-Muñoz et al., 2007).

- **Antocianos.** Los antocianos son pigmentos fenólicos que se encuentran en la piel de las uvas tintas. Su estructura consta de un esqueleto con dos anillos bencénicos unidos por una cadena de tres átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado, insaturado y catiónico, denominado catión flavilio o antocianidina (Figura 14).

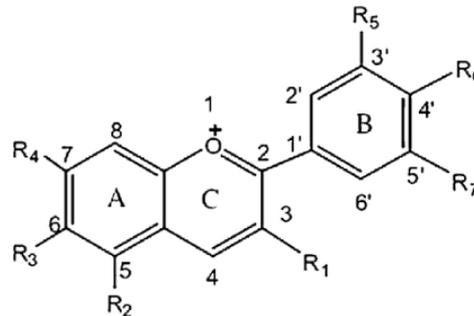


Figura 14. Estructura básica del catión flavilio.

Las distintas antocianidinas se diferencian entre sí según el número de grupos hidroxilos y grupos metilos que presentan como sustituyentes en el anillo bencénico B. En las variedades tintas de *Vitis vinifera*, se han encontrado 5 antocianidinas diferentes: cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina y petunidina (Figura 15).

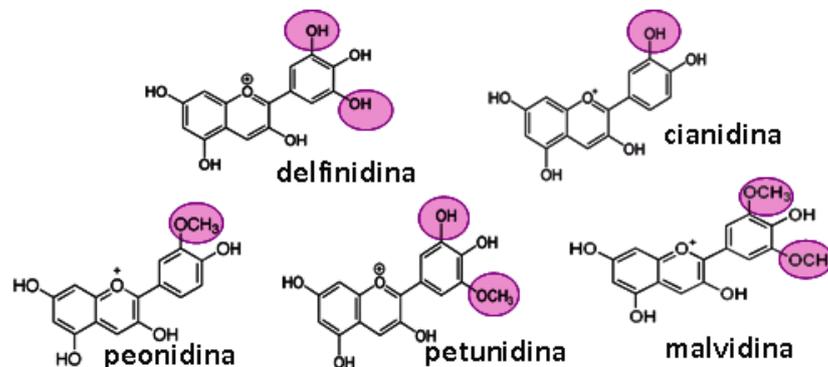


Figura 15. Estructura química de las principales antocianidinas de uvas y vinos

Una de las características de *Vitis vinifera* es la glucosilación en posición 3 de las antocianidinas formando las antocianinas o monoglucósidos no acilados. Los azúcares más comunes son los 3-monoglucósidos, siendo la malvidina 3-*O*-glucósido el compuesto mayoritario. En los últimos años, se ha confirmado la presencia de 3,5 o 3,7-diglucósidos en uvas y vinos tintos mediante técnicas de espectrometría de masas (Alcalde-Eón et al., 2006; García-Marino et al., 2010). Además, las antocianinas pueden encontrarse unidas a través de la posición 6 del azúcar a ácidos orgánicos, en mayor medida al ácido acético, cumárico o cafeico formando los derivados antociánicos acilados. Entre los distintos antocianos

acilados identificados en vinos, los derivados acetilados y cumaroilados de la malvidina 3-*O*-glucósido son los mayoritarios, cuyas estructuras químicas se presentan en la Figura 16.

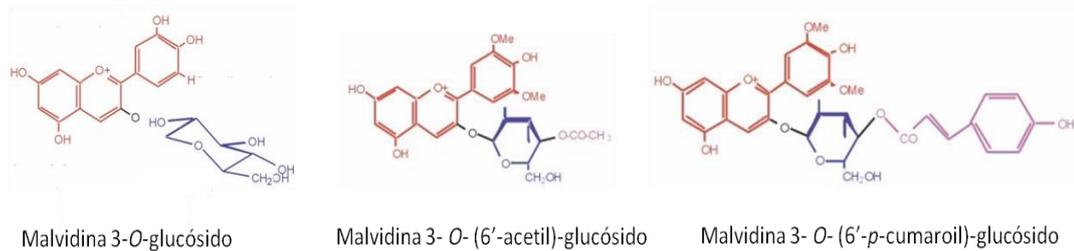


Figura 16. Estructura de los antocianos monoglucósidos y los que presentan acilación.

El color exhibido por los antocianos, debido a la estructura resonante del catión flavilio, fue explicado por Pauling (1940). Los flavonoides muestran una absorción intensa en el intervalo espectral UV de 250-270 nm. Particularmente, los antocianos absorben, además, en el intervalo espectral visible de 520-560 nm ($\lambda_{\text{máx}}=520$ nm) (Figura 17).

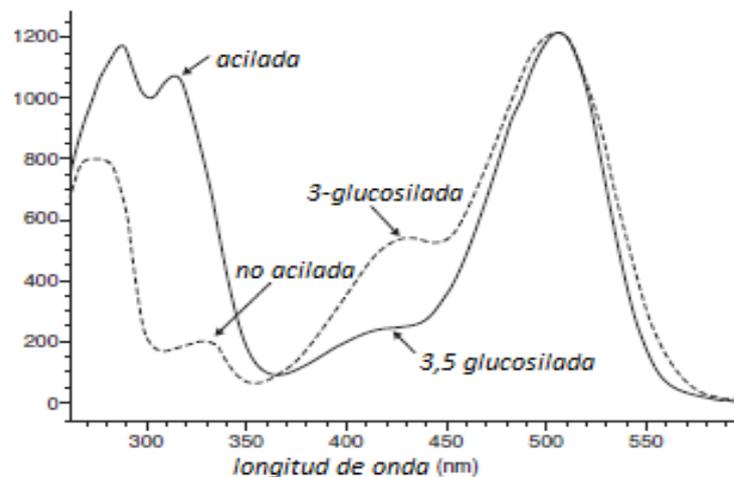


Figura 17. Espectro de absorción de antocianos y sus variaciones según presenten glucosilaciones y acilaciones.

Con la espectroscopía visible es posible diferenciar los distintos antocianos, ya que su color y su forma espectral varían según las metilaciones, glucosilaciones o acilaciones. Estas combinaciones químicas son responsables de la gran variedad de tonalidades que exhiben, y a los ligeros desplazamientos hipsocrómicos o batocrómicos en torno a la $\lambda_{\text{máx}}$ (Heredia et al., 1998). Así, la peonidina y cianidina exhiben tonos rojo-anaranjados (dos sustituyentes en el anillo B); mientras que la delfinidina, petunidina y malvidina exhiben tonos rojo-azulados (tres sustituyentes en el anillo B).

Evolución de la composición de la uva durante la maduración

El proceso de desarrollo de la baya de uva se suele dividir en tres etapas (Figuras 18 y 19): fase inicial de crecimiento rápido (fase I), fase de latencia, sin crecimiento o con un crecimiento muy lento (fase II), y fase final (fase III), de crecimiento lento, que se inicia con el final del envero y finaliza con la completa maduración de la uva (Stafne, 2011).

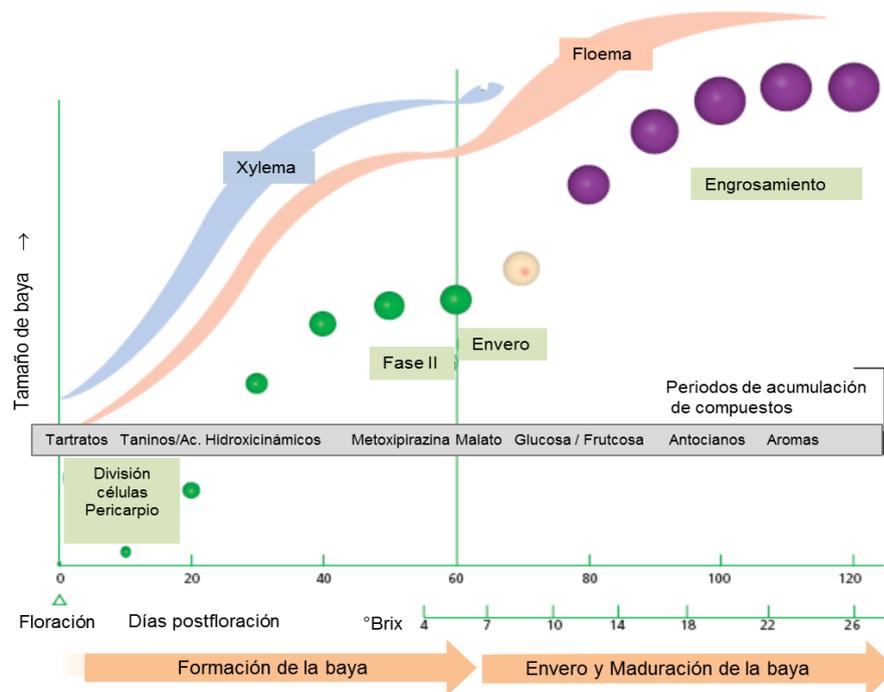


Figura 18. Etapas en el desarrollo y maduración de la uva (Adaptado de Stafne, 2011).



Figura 19. Cambio de tamaño y color en la uva tinta desde la etapa de crecimiento hasta la completa maduración.

La fase inicial de crecimiento rápido (fase I) está relacionada a la formación del fruto. Esta fase inicia en la floración y dura aproximadamente 50-60 días durante la cual se produce una importante acumulación de solutos, como los ácidos tartárico y málico, pero con baja concentración de azúcar. Al inicio de esta etapa, se forman las semillas,

donde comienzan a acumularse los taninos. En esta etapa las bayas alcanzan al menos la mitad de su volumen y su peso final.

La fase de latencia (fase II) se corresponde con el final del crecimiento herbáceo de la uva. No hay un tiempo específico ya que la duración depende de la variedad de la uva y de los factores agronómicos y de cultivo. Al inicio de la fase II, los frutos han alcanzado al menos la mitad del tamaño que tendrán al final de su crecimiento y continúan acumulando ácidos y taninos, los cuales alcanzarán su máximo nivel en el envero. En esta etapa, las semillas alcanzan la madurez y su tamaño final, aproximadamente, 10 días antes del envero, comenzando entonces su lignificación. El final de la fase II coincide con el comienzo del envero, etapa en la que se produce un cambio en la coloración de las bayas debido a que se reduce o se anula la fotosíntesis (disminución de la clorofila) y a la síntesis de nuevos pigmentos (Figura 20). En particular, las variedades tintas desarrollan tonalidades rojas azuladas debido a la acumulación de antocianos en las células de la hipodermis (y también en la pulpa en variedades tintóreas), mientras que en las variedades blancas se sintetizan otros pigmentos fenólicos (flavonoles, flavononoles, etc.) dando tonalidades amarillas (Hidalgo-Togores, 2011). El envero representa una transición entre el crecimiento de la uva y su maduración.



Figura 20. Cambio de coloración de la uva tinta durante el envero.

La fase de post-envero y maduración del fruto (fase III) comienza con el final del envero, el cual marca el comienzo de la maduración de la uva, y a partir de aquí, prácticamente, se detiene su crecimiento herbáceo. La maduración puede durar entre 5 y 10 semanas dependiendo, en gran parte, de factores agronómicos, de la variedad de uva y de las condiciones climatológicas. La maduración de la uva es el resultado de múltiples cambios fisiológicos y bioquímicos de cada uno de sus componentes (pulpa, semilla y hollejo), que no son necesariamente correlativos entre sí. Desde un punto de vista biológico, la madurez de la baya se alcanza en el momento en que las semillas adquieren capacidad de viabilidad para formar un nuevo individuo al germinar, denominándose *madurez fisiológica* (Hidalgo-Togores, 2011). Este proceso comienza los días posteriores al envero, momento en el cual, el aporte de nutrientes en la baya se desvía desde la semilla, al completarse su formación, y comienzan a acumularse en la pulpa y el hollejo. En términos generales, la baya aumenta de peso y tamaño hasta

alcanzar un tamaño estable, pero no por multiplicación celular sino por acumulación en la pulpa de nutrientes, principalmente azúcares libres y agua, pero también cationes, ácidos aminados y compuestos fenólicos, mientras que las concentraciones de ácidos tartárico y málico disminuyen. En el hollejo continúa la acumulación de pigmentos antociánicos, así como fenoles, aromas, aminoácidos, etc. Al mismo tiempo, a partir de la fase de envero, se produce una modificación de las paredes celulares de los tejidos vegetales de la uva. En la pulpa, las paredes celulares se debilitan porque el crecimiento celular y de su tamaño no está acompañado del engrosamiento de éstas. El hollejo crece en menor medida que la pulpa, por lo que se produce un aumento progresivo de la tensión de la piel.

El aprovechamiento de la uva para la vinificación determina que su estado de maduración sea el factor principal y uno de los más determinantes de la calidad global del vino. Desde un punto de vista enológico, el momento óptimo de madurez se alcanza cuando se produce una evolución armoniosa de las transformaciones que ocurren en las distintas partes de la baya. A pesar de los numerosos cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración, de forma simplificada, se establece que la madurez óptima está condicionada por la concentración de azúcar y ácidos alcanzada en la pulpa en el momento de cosecha, así como el contenido y tipo de compuestos fenólicos y aromáticos acumulados en las semillas y los hollejos (Ozcan et al., 2017). Sin embargo, la síntesis y acumulación de todos estos compuestos en las distintas partes de la uva no ocurren simultáneamente durante la maduración, y además están influidos por factores genéticos, edáficos, climáticos y agronómicos. Como consecuencia, en enología se define el concepto de madurez según diferentes criterios (Ribereau-Gayon et al., 2006): Madurez tecnológica (la relación entre azúcares y ácidos), fenólica (contenido y extractabilidad de fenoles), y aromática (mayor potencial en aromas).

La madurez tecnológica o madurez de la pulpa se refiere a la concentración de azúcares, la acidez total y el pH, y a la relación azúcares/acidez (Nogales-Bueno et al., 2014). La acumulación de azúcares en la pulpa ocurre lentamente desde las primeras etapas del desarrollo hasta el envero, con niveles de 10 a 15 g/kg de uva, y posteriormente se incrementa rápidamente hasta la completa maduración, donde se alcanzan niveles de 150-200 g/L de mosto. En casos excepcionales de vendimias sobremaduras el contenido en azúcares puede llegar a los 300 g/L. Este importante incremento a partir del envero es debido a que el exceso de glúcidos no utilizados por las semillas se almacena en la pulpa por su proximidad y por los aportes diarios realizados por la fotosíntesis de las hojas (Hidalgo-Togores, 2011). Por ello, en climas

cálidos, donde hay una mayor actividad fotosintética, las uvas alcanzan una mayor acumulación de azúcares. En la uva, los azúcares mayoritarios son la glucosa y la fructosa, dándose en la maduración contenidos prácticamente iguales.

Los ácidos orgánicos se encuentran en todas las partes verdes de la planta y en la pulpa tienden a disminuir a medida que avanza la maduración por la combustión o respiración e incluso pueden transformarse en azúcares, especialmente en la última etapa de la maduración. Los ácidos más importantes son el tartárico, el málico y, en menor medida, el cítrico. La evolución de los ácidos tartárico y málico en la maduración es distinta, debido a que su síntesis, origen y degradación también lo son, estando a su vez influidos por condiciones edafoclimáticas. En particular, el ácido málico desaparece más rápidamente que el tartárico, que es más estable y en gran parte el responsable de la acidez del vino (Figura 21). La acidez de un mosto puede estar entre 3 y 7 g/L expresados en ácido tartárico (pH entre 2.8 y 3.8.).

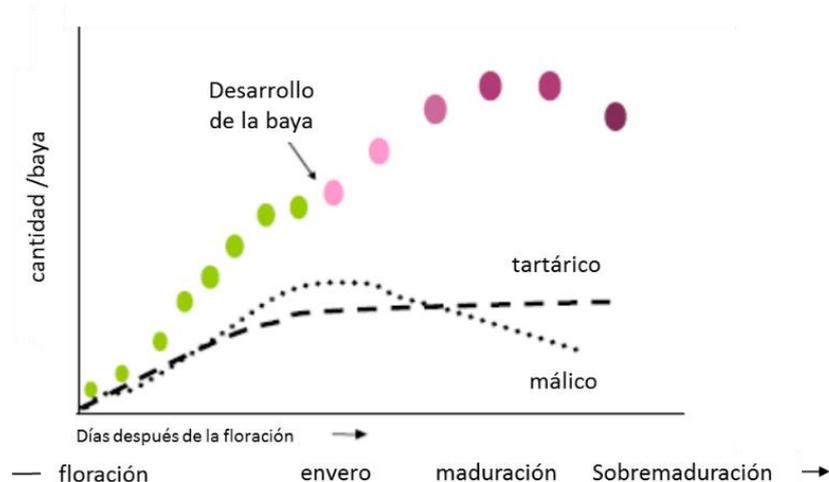


Figura 21. Representación gráfica de la evolución de los ácidos tartárico y málico durante el desarrollo de la baya de uva y su maduración. (Adaptado de Deloire, 2010).

De forma global, la uva adquiere la madurez tecnológica óptima cuando la relación azúcar/acidez alcanza su valor máximo. La evolución de los azúcares, los ácidos y el peso de baya durante la maduración se muestran en la Figura 22.

Cuando se habla de madurez fenólica, se hace referencia al potencial de compuestos fenólicos presentes en las uvas en el momento de cosecha y su extractabilidad durante la vinificación (Zamora, 2003; Ribereau-Gayón et al., 2006). Fundamentalmente, está condicionada por la cantidad y tipo de antocianos y flavonoles en el hollejo, así como taninos en las semillas y el hollejo.

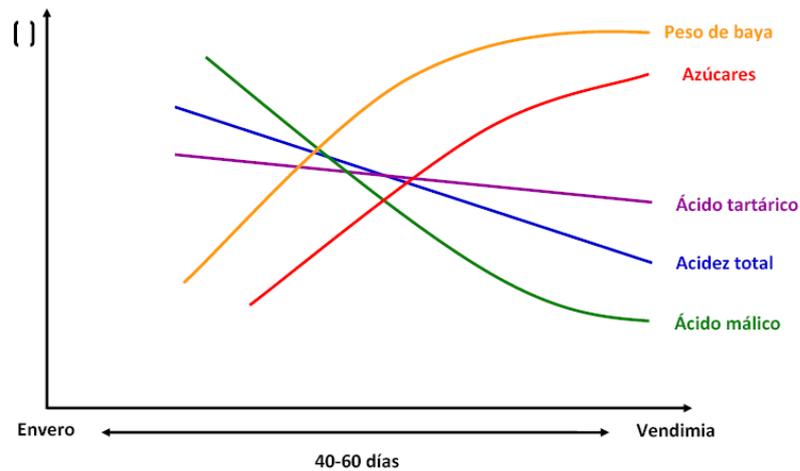


Figura 22. Evolución del peso de la baya, azúcares, ácido tartárico, ácido málico y acidez total a lo largo del proceso de maduración (Fuente: Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, JUNTA DE ANDALUCÍA, 2012).

En el hollejo, la síntesis de los pigmentos antociánicos se produce a partir del envero, donde su concentración aumenta durante la fase de maduración alcanzando un máximo que generalmente coincide con la madurez tecnológica. Posteriormente, la cantidad de antocianos disminuye hasta las fechas de la vendimia y en etapas de sobremaduración (Kennedy et al., 2002; Obreque-Slier et al., 2010). Este patrón de comportamiento es similar al mostrado por los flavonoles en los hollejos. En cuanto a los taninos de la piel, se sintetizan rápidamente durante el periodo herbáceo, acumulándose estos compuestos hasta el envero. A partir del envero y durante la maduración, su síntesis se va ralentizando y, aunque se produce una estabilización durante las últimas fases de la maduración, su máximo se alcanza ligeramente después que el de los antocianos. El patrón de síntesis de procianidinas afecta activamente a la síntesis de los compuestos que forman parte de su estructura, los flavanoles monoméricos. La concentración de estos compuestos aumenta radicalmente durante la fase herbácea hasta el envero, a partir de dicho momento estos compuestos decrecen debido a la síntesis de las procianidinas.

En relación a los taninos de la semilla, su concentración disminuye tras el envero hasta la maduración. Simultáneamente las semillas cambian de coloración de verde a amarillo y finalmente a tonalidades marrón grisáceo (Figura 23), lo cual puede ser usado como indicador de la madurez de la uva (Braidot et al., 2008; Rodríguez-Pulido 2012; Quijada-Morín et al., 2016). Se ha podido comprobar que no se producen diferencias en la composición de las procianidinas durante la maduración, aunque sí se producen variaciones en su grado medio de polimerización, el cual aumenta

progresivamente hasta el momento de la recolección de la uva (Kontoudakis et al., 2011a; Gil et al., 2012).



Figura 23. Evolución de semillas de uva y cambios de color asociados a la maduración.

La evolución de antocianos y flavanoles en las distintas partes de la uva se muestra en la Figura 24.

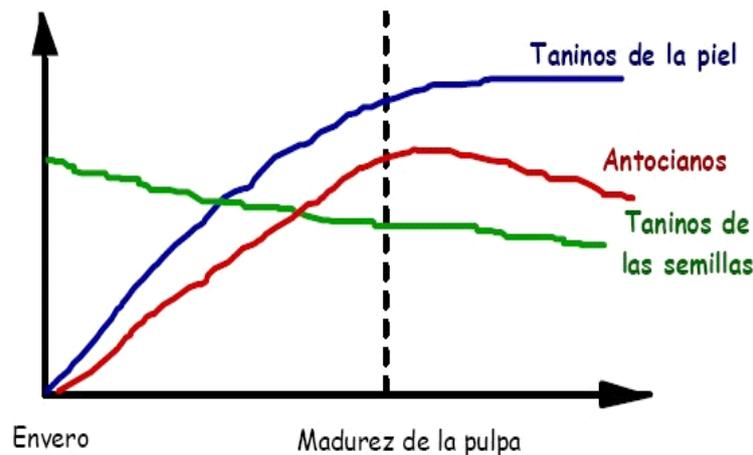


Figura 24. Evolución de los compuestos fenólicos durante la maduración de la uva (Adaptado de R. Gayón, 2006).

Por otra parte, la concentración de ácidos hidroxicinámicos se incrementa rápidamente en la baya durante el periodo herbáceo hasta el envero, decreciendo en etapas posteriores y manteniéndose constante hasta la vendimia. La concentración de los ácidos benzoicos y concretamente el mayoritario, el ácido gálico, aumenta de una manera constante hasta el envero, momento en el que se produce una disminución progresiva hasta la vendimia (Obrique-Slier et al., 2010).

Durante el proceso de maduración se producen también cambios en la estructura de la pared celular de los polisacáridos y lignificaciones, lo que afecta la extractabilidad de los compuestos según su procedencia de la semilla, pulpa u hollejo (Bautista-Ortin et al., 2012). Conforme la uva madura, la capa interna de la piel se vuelve más fina y, en presencia de etanol, la capa externa se solubiliza, lo que facilita una mayor extracción de compuestos del hollejo. Por el contrario, las semillas endurecen su superficie con una cutícula lignificada que dificultará la extracción.

Recientemente, la combinación de técnicas ópticas basadas en imágenes hiperespectrales en el infrarrojo cercano y espectroscopía Raman, junto con técnicas

quimiométricas, se ha aplicado para estimar el contenido fenólico extraíble en semillas y hollejos de uva (Quijada-Morín et al., 2015; Nogales-Bueno et al., 2017a, 2017b; Baca-Bocanegra et al., 2018a; 2018b, 2019). Estos estudios aportan una información muy útil para predecir el potencial fenólico extraíble de las partes sólidas de la uva según su estado de madurez y por tanto optimizar las condiciones de maceración durante la vinificación. En particular, se ha confirmado que semillas con un mayor grado de madurez presentaron una menor cantidad de fenoles extraíbles (Baca-Bocanegra et al., 2018a).

Por otro lado, en términos generales, la uva menos madura posee una baja concentración de antocianos que, además, son de difícil extracción. Asimismo, presenta una mayor extractabilidad de taninos procedentes de las semillas que además son más astringentes. Por el contrario, la uva más madura tiene una alta concentración de antocianos fácilmente extraíbles y taninos menos astringentes (Zamora, 2003; Kontoudakis et al., 2011b).

Sobremaduración. Una vez finalizada la maduración completa de la uva, comienza un periodo de sobremaduración que no puede considerarse una etapa más de su ciclo vegetativo ya que la baya resulta prácticamente aislada del racimo debido a la lignificación del raspón o escobajo y al agostamiento de los sarmientos (Hidalgo-Togores, 2011). Durante esta fase, las bayas evaporan agua con lo que se produce la pérdida de peso del fruto y la concentración de alguno de los componentes del mosto, como los azúcares (Figura 25).



Figura 25. Uvas en estado de sobremaduración

En procesos de sobremaduración, la concentración de algunos compuestos fenólicos continúa disminuyendo en la baya, mientras que otros se mantienen estables o incluso se incrementan (Mencarelli et al., 2010). Se ha comprobado que, generalmente, estos descensos en la concentración se producen en los ácidos benzoicos (ácido gálico) y en

algunos flavanoles monoméricos y procianidinas de determinadas variedades de uva (Obreque-Slier et al., 2010). Por otro lado, sin embargo, la mayor parte de las procianidinas y los flavanoles monoméricos de otras variedades como Cabernet Sauvignon o Tempranillo incrementan su concentración durante la sobremaduración (Obreque-Slier et al. 2010, Talaverano et al., 2016). A su vez, se ha descrito que en periodos de sobremaduración también se producen procesos enzimáticos que favorecerían la extracción de compuestos fenólicos (Pinelo et al., 2006, Casassa & Harbertson, 2016).

En regiones donde el clima lo permite (otoños soleados, secos, cálidos y casi sin lluvia), como es el sur de España y zonas similares del Mediterráneo, se provoca la sobremaduración de las uvas mediante un proceso tradicional de secado natural por exposición directa al sol que se conoce como “soleo” (Peinado et al., 2009). Este proceso produce la pasificación parcial de la uva y la concentración de azúcares en la pulpa hasta 300 g/L, usándose para la elaboración de vinos blancos dulces de alta graduación alcohólica (Ruiz et al., 2014). Los orujos obtenidos de estos vinos constituyen un subproducto agrícola abundante con interesantes aplicaciones enológicas como su uso alternativo para modular las pérdidas de color durante las vinificaciones de vinos tintos en climas cálidos. Esto es debido a un contenido y composición fenólica particular propiciado por el proceso de sobremaduración al que es sometida la uva. El proceso de soleo y los cambios fisicoquímicos producidos en la uva asociados a éste se describen en mayor detalle en el apartado 4 de esta memoria.

1.2. Consecuencias del cambio climático en la calidad de la uva madura

El cultivo de la vid presenta unas exigencias climáticas bien determinadas y definidas, cultivándose tradicionalmente en climas no extremos, de tipo mediterráneo, en continentes de ambos hemisferios (Europa, América del Norte y del Sur, Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica). Su área general de cultivo corresponde a las dos zonas terrestres comprendidas entre los paralelos 30° y 50° latitud Norte, y los 30° y 40° de latitud Sur, límites que en la viticultura actual se amplían suprimiendo la zona intermedia, con la aparición de la viticultura tropical (Jones, 2018). Es una planta exigente en calor y sensible a las heladas en invierno y primavera, no sólo para su desarrollo vegetativo, sino también para la maduración de sus frutos, que precisan de iluminación y temperaturas adecuadamente altas (13-21 °C durante su crecimiento vegetativo).

Dentro de los factores determinantes de la producción vitícola, el clima de una determinada zona geográfica es posiblemente el que más influye en el tipo de vino que se produce (Tabla 2), ya que condiciona las variedades y la calidad de las uvas que pueden ser cultivadas.

Tabla 2. Influencia del tipo de clima (frío, templado y cálido) en el estilo de vino según la zona geográfica (Fuente: Jones, 2018).

Wine Characteristic	Cool Climate	Intermediate to Warm Climate	Warm to Hot Climate
Fruit Style	Lean, Tart	Ripe, Juicy	Overripe, Lush
White Flavors	Apple, Pear	Peach, Melon	Mango, Pineapple
Red Flavors	Cranberry, Cherry	Berry, Plum	Fig, Prune
Body	Light	Medium	Full
Acidity	Crisp, Tangy	Integrated	Soft, Smooth
Alcohol	Low to Moderate	Moderate to High	High to Very High
Overall Style	Subtle, Elegant	Medium Intensity	Bold

Los efectos del cambio climático son cada vez más evidentes. Desde el comienzo de la era industrial en el siglo XIX se ha producido un constante crecimiento en el consumo de los combustibles fósiles como el carbón y el petróleo. Este hecho junto a otros factores como la eliminación generalizada de los bosques y conlleva a un aumento lento, pero constante, de la temperatura promedio del planeta. Este fenómeno denominado *calentamiento global* ha producido en los últimos años un aumento en la temperatura de la Tierra de más de 1 °C desde la época preindustrial (Hawkins et al., 2017; Schurer et al., 2017), junto a un importante descenso en las precipitaciones en algunas regiones (Dore, 2005).

Atendiendo a los datos de temperatura y precipitaciones previstos, se puede inferir que la vitivinicultura del sur de Europa será especialmente sensible a estos efectos (Leolini et al., 2018). Estudios realizados en diferentes países europeos han puesto de manifiesto que las fechas de las vendimias cada vez son más tempranas (Figura 26). Así, en el sur de Francia, a través de estudios se comprobó que la vendimia se adelantó entre 18 y 21 días en el periodo comprendido entre 1940 y 2001, mientras que en Alsacia (este de Francia) a través de otro estudio comprendido entre los años 1972 y 2002, se comprobó que en este periodo se recolectaron las uvas dos semanas antes debido a un aumento de la temperatura de 1.8 °C (Ganichot, 2002; Duchêne & Schneider, 2005). Por otro lado, se ha comprobado que la península ibérica, junto al

sur de Francia, fue la región europea que más sufrió los efectos del calentamiento global, aumentando la temperatura en los últimos 50 años en aproximadamente 2.5 °C (Jones, 2007).

Como se ha explicado anteriormente, el estado de maduración de la uva en el momento de vendimia influye de forma importante en la calidad del vino. Idealmente, el momento óptimo de vendimia debe ser aquel en el que las uvas alcanzan la madurez tecnológica, fenólica y aromática simultáneamente, pero las condiciones climáticas ambientales y sus variaciones pueden provocar importantes desfases entre ellas, aspecto que se hace aún más evidente y frecuente a medida que progresa el calentamiento global (Jones, 2018).

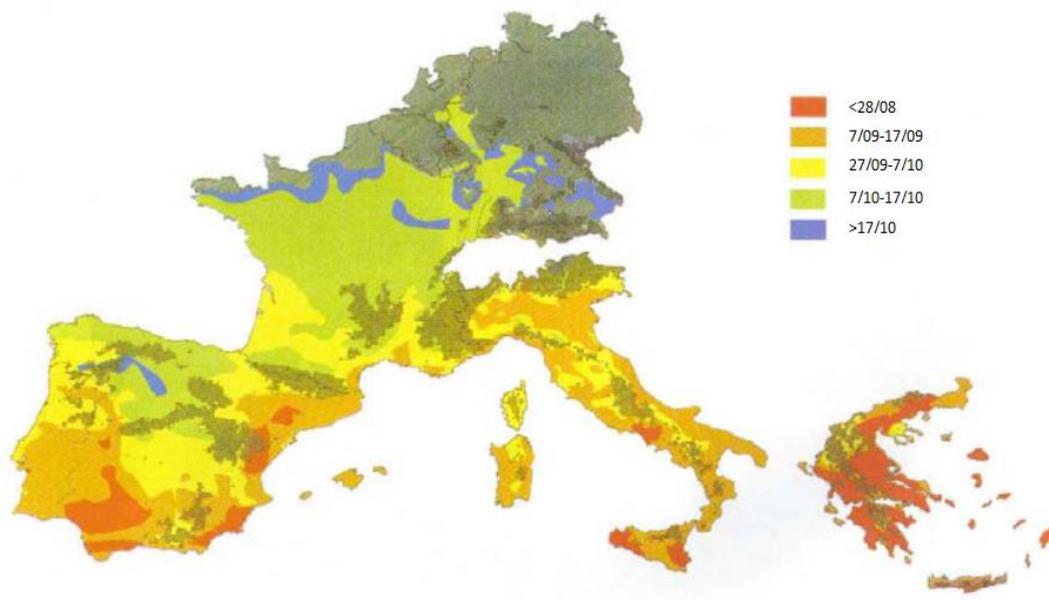


Figura 26. Fecha de vendimia de zonas vitícolas europeas (Fuente: Comisión Europea, 1994).

La Figura 27 muestra las curvas de evolución en la relación entre la madurez fenólica del hollejo y la madurez tecnológica de la pulpa. Se observa la situación ideal de acumulación de los antocianos en el hollejo coincidente con la máxima relación azúcar/acidez de la pulpa (curva 1), frente a otras situaciones de desfase, con retrasos (curva 2 y 3) o adelantos (curva 4) de la maduración fenólica con respecto a la tecnológica

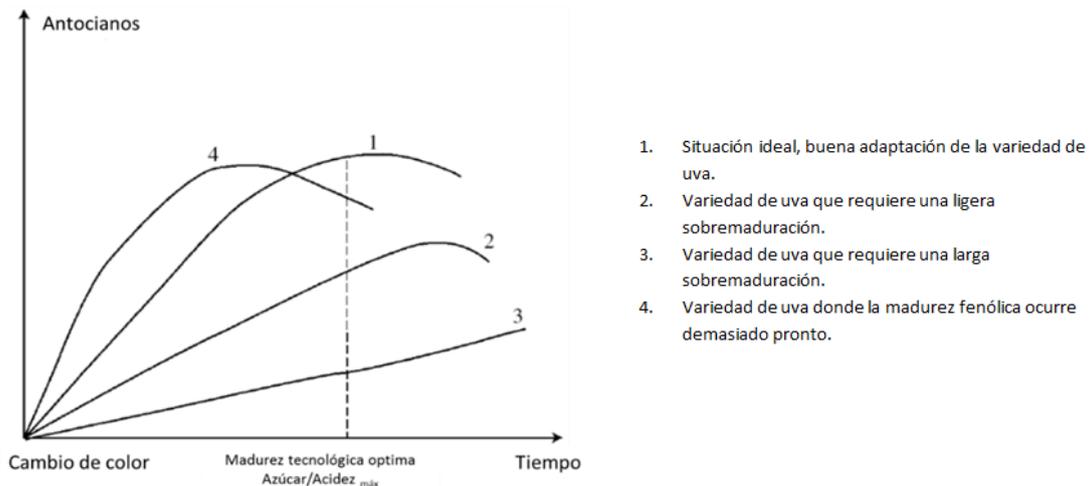


Figura 27. Situaciones de desfase entre la madurez fenólica del hollejo y la madurez tecnológica de la pulpa (Adaptado de Ribereau-Gayón, 2006).

Así, las altas temperaturas producen una mayor aceleración de la madurez de la uva, disminuyendo la concentración de ácidos y aumentando el contenido de azúcares, con los correspondientes problemas sensoriales y operacionales que esto puede ocasionar (Villangó et al., 2015).

La temperatura también juega un importante papel en la síntesis de los flavanoides debido a que, tal como sucede con otros factores como la radiación solar, producen un estrés en la uva que puede afectar a su metabolismo (Huglin & Schneider, 1998; Teixeira, A. et al., 2013). Así, bajas temperaturas durante el día y la noche (14/9 °C) pueden impedir la correcta síntesis de antocianos, al igual que sucede con temperaturas elevadas, superiores a 30 °C (Cheng et al., 2015). Esta influencia parece no afectar a los distintos tipos de antocianos de igual manera. En ese sentido, Tarara et al. (2008) observaron mayores descensos en delfinidinas, petunidinas, cianidinas y peonidinas, mientras que la concentración en malvidina permaneció estable. Por otro lado, también se ha descrito que la diferencia de temperatura entre el día y la noche es favorable para la síntesis de antocianos (Yamane & Shibayama, 2006; Giaotti et al., 2018), comprobándose que temperaturas nocturnas más frías (17 o 18 °C) aumentan la concentración de estos pigmentos, mientras que si no son suficientemente bajas tienden a disminuirla.

En relación a otros flavonoides, el efecto de las altas temperaturas y la radiación solar ocasionadas por el cambio climático es más variable. Así, se ha descrito que la concentración de procianidinas en semillas está directamente influenciada por la

temperatura en la vendimia, y no tanto por la exposición a la luz solar (Del Rio & Kennedy, 2006; Mira de Orduña, 2010). Por el contrario, el efecto de la luz solar junto con la temperatura afecta la síntesis de las procianidinas y flavanoles monoméricos de los hollejos, incrementando su cantidad al igual que su grado de polimerización (Texeira, A. et al., 2013). Con respecto a los flavonoles, su síntesis parece depender en mayor medida de variaciones en la radiación solar que de la temperatura (Cohen et al., 2012). Estos compuestos se sintetizan en la planta como respuesta frente a la radiación UV, protegiéndola de ésta. Por tanto, el calentamiento global, al generar mayor cantidad de radiación (entre el 1 y el 2% por década, o hasta un 8% en zonas de mayor altitud), fomenta la síntesis de flavonoles (Van Leeuwen & Darriet, 2016).

Ante estas circunstancias, con primaveras cada vez más secas y veranos más calurosos, en regiones de clima cálido las uvas suelen sufrir una sobreexposición solar, lo cual deriva en periodos de maduración cada vez más cortos. Particularmente en las uvas tintas, la pulpa madura con rapidez, alcanzando altas concentraciones de azúcar, bajas concentraciones de ácidos y un pH elevado. Por el contrario, la acumulación de compuestos fenólicos en las semillas y los hollejos se ve afectada negativamente. Como consecuencia, es frecuente que se produzca un desfase entre la madurez de la pulpa con respecto a la madurez aromática y fenólica de las semillas y el hollejo en el momento de vendimia. Así, uvas glucídicamente maduras suelen presentar una composición fenólica inadecuada que conduce a vinos tintos de baja acidez, demasiado amargos y/o astringentes y con colores pobres o inestables.

Como resumen de lo anteriormente expuesto, el calentamiento global, además de tener consecuencias directas sobre la calidad de la uva y dificultar la determinación del momento óptimo de vendimia, obliga a estas regiones a replantear sus estrategias de cultivo y vinificación con el fin de mantener la calidad de sus vinos. Estos problemas llevan a considerar la aplicación de técnicas enológicas más o menos avanzadas para promover la extracción de pigmentos y otros compuestos fenólicos durante la maceración o su estabilización durante la vinificación, las cuales se describen en mayor detalle en el apartado 3 de esta Introducción.

2. EL COLOR DEL VINO TINTO

2.1. Importancia del color del vino

España es el país con la mayor área de viñedos en el mundo y el mayor exportador de vino, tal y como se muestra en la Tabla 3 (Parga-Dans & Alonso-González, 2017). Además, tras Italia y Francia, es el tercer productor mundial de vino, con 37.8 millones de hectolitros producidos en 2016, un incremento del 2% respecto a la producción del año anterior.

Tabla 3. Principales indicadores de producción, exportación y precio de los principales países productores de vino (tomada de Parga-Dans & Alonso-González, 2017).

	Vineyard Surface (thousands of hectares)	Export volume (millions of hectoliters)	Price per liter (€/L)
Spain	1021	24	1.1
France	786	14	5.37
Italy	682	20	2.5
USA	419	4.2	2.37
Argentina	225	2.7	2.38
Portugal	217	2.8	2.55
Chile	211	8.8	1.74
Australia	149	7.4	1.73
South Africa	130	4.2	1.21
Germany	102	3.6	2.1

Según datos de la Organización Internacional de la Viña y el Vino, el consumo mundial de vino en 2017 aumentó ligeramente con respecto al año anterior, encadenando 3 años de crecimiento. Sin embargo, a pesar de este incremento, la tendencia global de consumo en los últimos 50 años es decreciente (Bernabeu et al., 2016).

En cuanto al tipo de vino consumido, estudios realizados por el Observatorio Español del Mercado del Vino en 2018 ponen de manifiesto la preferencia de los consumidores españoles por vinos amparados por Denominaciones de Origen (D.O.) y fundamentalmente tintos, a pesar de que estos vinos presentar generalmente precios más elevados. De forma similar, las preferencias descritas en los mercados estadounidense y europeo (p.e. Reino Unido) sobre el consumo vinos tintos de España, indican que los consumidores dan mucha mejor puntuación de calidad a los vinos tintos y acogidos a D.O., respecto a los blancos o rosados (Steiner, 2009; Areta et al., 2017). Estas preferencias denotan que los consumidores actuales se encuentran

mucho más preocupados e informados sobre los vinos que desean tomar, demandando aquellos de una mayor calidad. De hecho, se ha confirmado que el descenso global en el consumo de vinos no afecta de igual manera a todos los vinos según su calidad. Mientras que la demanda de vinos de mesa o corrientes ha disminuido significativamente en los últimos 50 años (superior al 50%), la tendencia de consumo para los vinos de calidad es en aumento (García, 2010).

Entre las características que definen la calidad de los vinos, el color es el primer atributo apreciado en la evaluación sensorial o cata (Zamora, 2003). Según diferentes estudios de mercado, es una de las características más relevantes considerada por los consumidores para valorar la calidad de los vinos, junto con el sabor, aroma-bouquet, la denominación de origen, añada, zona de origen, marca, precio, o variedad de uva (Ikerfel-MAPA, 2000; Bernabéu et al.; 2005; Nielsen, 2009).

El color del vino tinto y su estabilidad están determinados por su composición química, especialmente por su composición fenólica. En particular, son los pigmentos antocianicos presentes en los hollejos de las uvas los compuestos fenólicos directamente responsables del color (Fernandes et al., 2017). A su vez, otros fenoles como los flavanoles y taninos procedentes de las semillas, los flavonoles procedentes del hollejo, y ácidos fenólicos de la pulpa, intervienen indirectamente en el color del vino mediante interacciones con los antocianos, en las denominadas reacciones de copigmentación (Boulton, 2001; Alexandre-Tudo & Du Toit, 2018)

En ese sentido, el color proporciona información de la estructura química del vino, la edad y su estado de evolución en el tiempo. Además, es el reflejo de posibles alteraciones que el consumidor detecta, influyendo significativamente en la aceptación o rechazo del producto (Martínez et al., 2001). Igualmente, se ha demostrado que el color puede influenciar otras cualidades sensoriales como el aroma o el gusto (Valentín 2016). En particular, y en cuanto a su apariencia, los vinos más apreciados en el mercado son aquellos con colores más intensos y estables (Zamora, 2003; Loureiro et al., 2016).

Por ello, la estabilización química de los pigmentos del vino, y por tanto del color, constituye una de las líneas de investigación más importantes en el campo de la enología. El estudio y control de los factores, tanto agronómicos como enológicos, que determinan su contenido y evolución durante la vinificación ha sido y continúa siendo uno de los principales objetivos en los controles de calidad del vino.

2.2. Transferencia de color al vino: Extracción de compuestos fenólicos durante la maceración.

Durante la vinificación pueden diferenciarse dos fases que claramente determinan la transferencia de color de la uva al vino (fase de maceración) y su posterior evolución (fase de estabilización). Durante la maceración, se extraen los compuestos responsables del color desde las partes sólidas de la uva. En la etapa de conservación y/o envejecimiento, los compuestos extraídos se ven implicados en numerosas reacciones enzimáticas y/o químicas que tienen como resultado la degradación parcial de éstos, así como la formación de nuevos pigmentos (De Freitas & Mateus, 2011).

En los vinos tintos, la extracción/difusión de los antocianos y otros compuestos fenólicos desde la uva hacia el mosto comienza con el estrujado de los racimos, y se prolonga hasta el prensado durante el encubado, en el que se mantiene en contacto el mosto con las partes sólidas de la uva (hollejos y semillas). Este periodo puede durar desde pocos días hasta varias semanas dependiendo del tipo de vino que se quiera elaborar. Durante este periodo, se pueden distinguir tres fases: prefermentativa, fermentativa y posfermentativa. La maceración prefermentativa, desde el estrujado de la uva hasta el inicio de la fermentación alcohólica (de unas horas a pocos días), en la que la extracción ocurre en ausencia de etanol. La maceración fermentativa, simultánea a la fermentación alcohólica (entre 2 y 7 días), en la que la extracción ocurre en presencia de etanol. La maceración posfermentativa, en la que la extracción continúa una vez finalizada la fermentación (desde días a semanas), especialmente en vinos en los que desea un mayor potencial de envejecimiento.

Los compuestos fenólicos, localizados en diferentes partes de la uva, presentan distinta solubilidad y capacidad de difusión, en función de la proporción agua/alcohol presente en el medio, así como de la mayor o menor disgregación de las paredes celulares del hollejo y de las semillas (Busse-Valverde et al., 2011; Nogales-Bueno et al., 2017b).

La extracción de antocianos se inicia ya en la fase prefermentativa, obteniéndose la máxima concentración de estos pigmentos en pocos días. Posteriormente, se observa una tendencia a la disminución en la concentración de antocianos debido a que, desde las fases iniciales de la vinificación, se ven implicados en diferentes reacciones químicas como oxidación, copigmentación, polimerización, precipitación, adsorción, etc. (Ribereau-Gayón et al., 2006).

Los taninos, al ser más solubles en medio alcohólico, se solubilizan más lentamente. Durante la maceración prefermentativa, sin etanol en el medio y a temperaturas moderadas, su extracción es muy limitada. Posteriormente, la aparición de etanol y el aumento de la temperatura, suponen un aumento del poder extractante del líquido, y una mayor degradación celular. De esta forma se favorece una mayor difusión de compuestos menos accesibles como los taninos más polimerizados, los unidos a las proteínas de las membranas vacuolares y a los polisacáridos de las paredes celulares (González-San José, 2005). Es necesario distinguir entre los taninos de la piel y los de las semillas, ya que su cinética de extracción es también diferente. Los taninos de la piel comienzan a solubilizarse conjuntamente con los antocianos, si bien su extracción se prolonga más tiempo. Por el contrario, los taninos de las semillas no se solubilizarán hasta la mitad de la fermentación, cuando el alcohol haya disuelto la cutícula.

La evolución de la intensidad cromática del vino durante el encubado es acorde a la extracción de los distintos compuestos fenólicos anteriormente descrita. Desde el estrujado de la uva, se produce un aumento notable del color del vino debido a la extracción de los antocianos, alcanzándose un máximo al final de la fase prefermentativa. Durante este periodo, el incremento de intensidad está además favorecido por las interacciones no covalentes que se establecen entre los antocianos de la uva con otros compuestos cedidos al mosto (fundamentalmente fenoles simples) mediante reacciones de copigmentación. Por el contrario, durante la fermentación alcohólica puede producirse una ligera disminución en el color del vino, ya que la presencia de alcohol produce la ruptura de los complejos de copigmentación (Casassa, 2017). Posteriormente, en la fase posfermentativa, la intensidad colorante puede volver a incrementar, debido a que los antocianos reaccionan con los taninos extraídos en la fase fermentativa, formando complejos más estables y dando inicio a las reacciones de polimerización.

La Figura 28 muestra la cinética de extracción de los distintos compuestos fenólicos durante el encubado, distinguiendo la maceración prefermentativa, fermentativa y postfermentativa, junto con los cambios en la intensidad colorante.

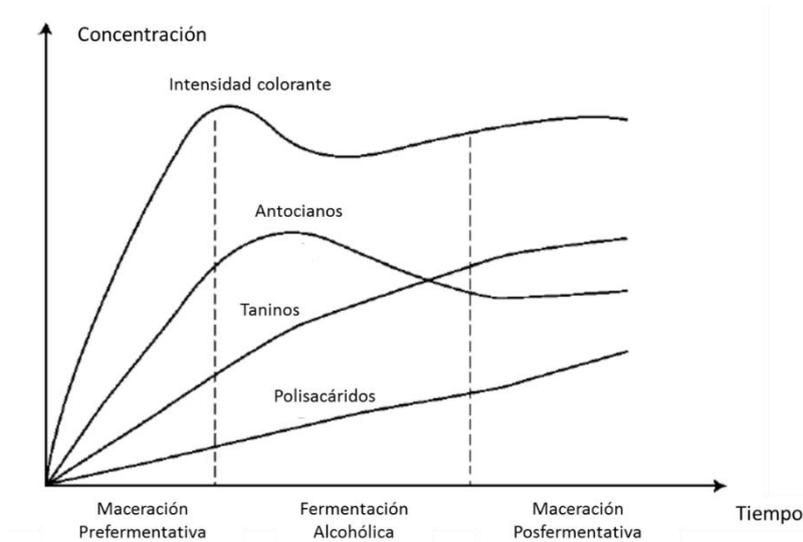


Figura 28. Evolución de la extracción de los distintos compuestos fenólicos de la uva durante las distintas fases del encubado (Adaptado de Ribereau-Gayón et al., 2006).

2.3. Equilibrio de los antocianos en el vino

Los antocianos del vino, debido a su carácter resonante, son compuestos químicos muy reactivos y, por tanto, muy sensibles a reacciones de modificación de su color. Entre los factores de la vinificación que afectan en mayor medida su estabilidad se encuentran las variaciones de pH, presencia de SO_2 y O_2 , incrementos de temperatura y la asociación con otras moléculas mediante reacciones de copigmentación. Todas estas reacciones son reversibles con la única excepción de la reacción de oxidación que comportaría la pérdida irreversible del color del vino (Zamora, 2003).

- **Efecto del pH**

En disoluciones acuosas como el vino (hidroalcohólica, 12% etanol), los antocianos se encuentran en formas químicas con distintas propiedades cromáticas cuyo equilibrio depende directamente del pH, tal y como se muestra en la Figura 29 (Basilio & Pina, 2016). A pH muy ácido (≤ 1) predomina el catión flavilio (AH^+), de color rojo y estable. Entre pH 2 y 4, la transferencia de protón, convierte la forma flavilio en la anhidrobase quinónica (A), de color azul. Entre pH 5 y 6, en una reacción más lenta, predominan dos especies, la forma hemiacetal (B2; formada por el ataque nucleofílico del agua al catión flavilio en posición 2), la cual se encuentra a su vez en equilibrio con las formas chalcona *cis* y *trans* (Cc y Ct), todas ellas incoloras. A valores de pH superiores a 7, las chalconas sufren oxidación, transformándose de manera irreversible hacia ácidos fenoles incoloros o de color pardo-amarillo, produciéndose por tanto la degradación del color rojo original.

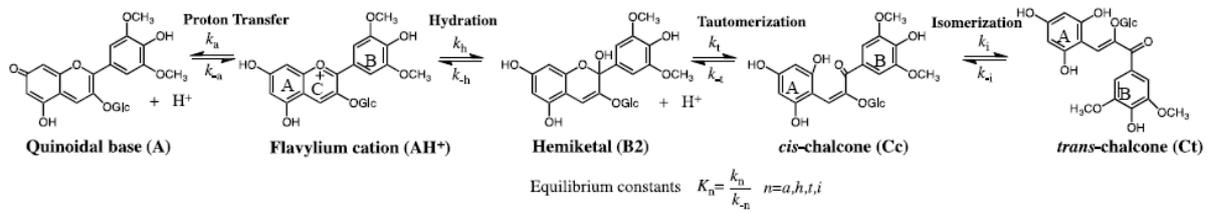


Figura 29. Equilibrio de las formas antocianicas en disoluciones acuosas en función del pH
(Fuente: Basilio & Pina, 2016)

Debido a este efecto, en el vino tinto, con valores medios de pH comprendidos entre 3 y 4, aproximadamente el 80% de los antocianos se encuentran en las formas hidratadas incoloras (Figura 30). Sin embargo, a esos valores de pH, el vino presenta una intensidad colorante mayor de la que le correspondería, debido al mecanismo de estabilización del catión flavilio en el equilibrio mediante interacciones no covalentes con otros componentes del vino (copigmentación), y a la formación de nuevos pigmentos (Zamora, 2003).

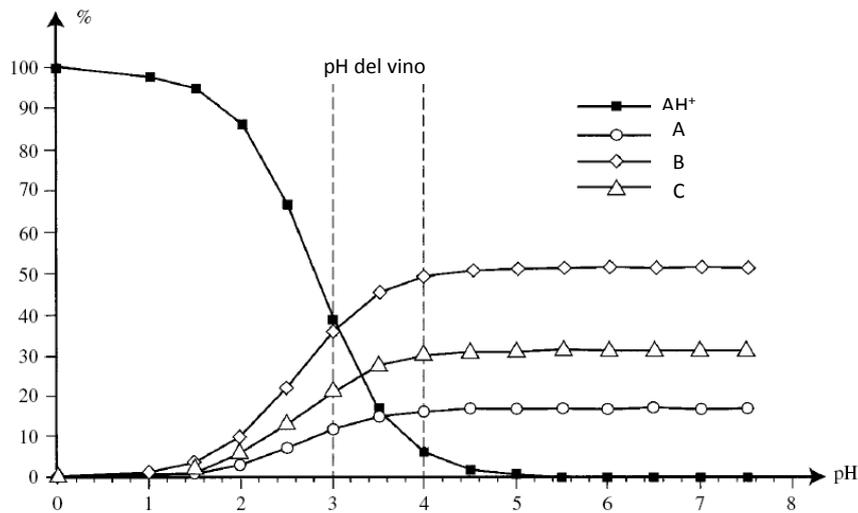


Figura 30. Cambios en la proporción de las diferentes especies antocianicas de acuerdo al pH
(Adaptado de Ribereau-Gayón, 2006).

• Efecto del ion bisulfito

De forma parecida, la presencia del anión bisulfito (HSO_3^-), procedente del dióxido de azufre utilizado como antioxidante y antiséptico durante la vinificación, también comporta una decoloración del catión flavilio por un mecanismo semejante, produciendo un complejo incoloro (Figura 31). Esta reacción explica la decoloración de

los vinos tintos tras el sulfitado, aunque debido a la reversibilidad de la combinación, el color reaparece al ir disminuyendo los iones bisulfitos de forma natural en el vino.

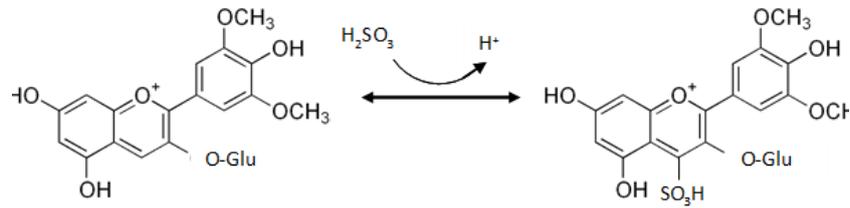


Figura 31. Formación de aductos incoloros antociano-iones bisulfito.

- **Efecto de la oxidación y la temperatura**

Los compuestos fenólicos son los principales componentes de los mostos y vinos capaces de oxidarse dando lugar a modificaciones de color (pardeamiento). Esta oxidación puede ocurrir por la acción de enzimas endógenas (destaca la polifenoloxidasas, PPO), exógenas de la uva (proviene de microorganismos o preparaciones enzimáticas enológicas), o bien por un proceso químico de autooxidación. Los antocianos son compuestos bastante inestables a la oxidación cuando se encuentran en forma libre, y su estabilidad parece aumentar con el número de grupos metoxilo del anillo B y disminuye al incrementar los grupos hidroxilo.

La oxidación enzimática predomina más en los mostos, en los que existe una intensa actividad polifenoloxidásica puesto que la enzima PPO es liberada con el estrujado y prensado de las uvas. En cambio, en vinos las enzimas quedan prácticamente inactivas por lo que el proceso de oxidación química adquiere más importancia.

Esta degradación se ve muy favorecida cuando se eleva la temperatura. Evidentemente la degradación de los antocianos comporta una pérdida irreparable de color del vino y por tanto es una de las reacciones que deben limitarse para favorecer la estabilización de la materia colorante del vino. Por estas razones, los vinos se deben conservar protegidos de luz, de la exposición al oxígeno, y a temperaturas moderadas.

- **Copigmentación**

En el vino tinto, la copigmentación es un proceso natural basado fundamentalmente en uniones no covalentes entre compuestos fenólicos. Generalmente, el fenómeno se produce en medio acuoso y entre los antocianos en su forma catión flavilio y otros compuestos fenólicos, usualmente no pigmentados, que actúan como copigmentos

(Boulton, 2001; Trouillas et al., 2016). Estas uniones se producen a través de puentes de hidrógeno π - π entre los anillos aromáticos de los antocianos y de los copigmentos gracias a la estructura plana que tienen ambos, formándose una estructura tipo “sándwich” (Figura 32). Esta conformación impide que las moléculas de agua accedan a la estructura del catión flavilio y, en consecuencia, queda protegido ya que se imposibilita la hidratación hacia la forma incolora.

La copigmentación es un fenómeno que ocurre naturalmente en vinos tintos debido a la coexistencia de antocianos de la uva y una gran cantidad y diversidad de otros fenoles procedentes del hollejo y semillas (flavonoles y flavanoles), así como de la pulpa (ácidos fenólicos como el caftárico). Estas reacciones estabilizan la forma coloreada de los antocianos a valores de pH en los que deberían predominar las formas incoloras, y por tanto contribuyen al color del vino de forma importante (hasta el 30-50% del color total), sobre todo en etapas iniciales de la vinificación (Trouillas et al., 2016).

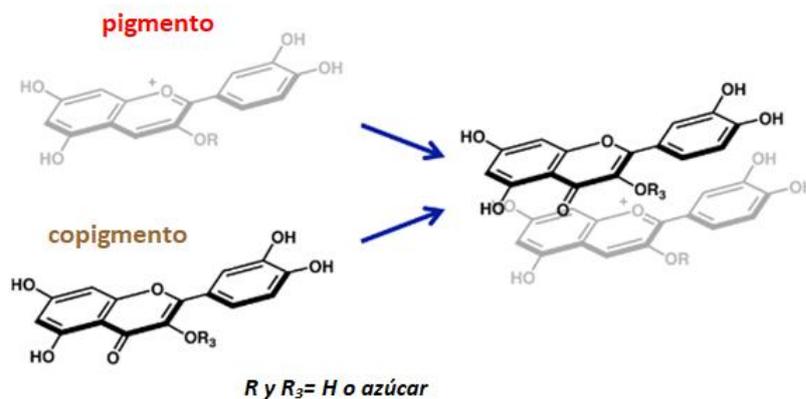


Figura 32. Mecanismo de copigmentación (Trouillas, 2016)

La copigmentación produce además modificaciones en las propiedades espectrales del catión flavilio. Habitualmente lleva asociado un efecto hiperacrómico y batocrómico, con un aumento de la intensidad de color y un cambio hacia tonos más azulados (Boulton, 2001). Estos efectos suelen caracterizar el color de vinos tintos jóvenes, que exhiben típicamente tonalidades rojo-azuladas de gran intensidad (Versari et al., 2007).

La efectividad de estos efectos radica en factores externos como la temperatura y el pH, y también factores internos como la concentración y la naturaleza del pigmento y copigmento implicados en esta reacción (Gordillo et al., 2012; Trouillas et al., 2016). Así, como se ha podido comprobar en trabajos previos (Eiro & Heinonen, 2002), el efecto de copigmentación aumenta con el grado de metoxilación y glicosilación por lo

que la malvidina 3-glucósido, antociano mayoritario en el vino, experimenta un importante efecto de copigmentación. Por otro lado, algunos flavonoles (miricetina y quercetina) y ácidos hidroxicinámicos (cumárico o cafeico) son compuestos que presentan una gran efectividad en la estabilización de los antocianos del vino (Gómez-Míguez et al., 2006). Esta efectividad se debe a la conformación más plana que poseen estos compuestos fenólicos y por ello, la proximidad y el apilamiento pimento/copigmento es mayor.

Por otra parte, otros compuestos fenólicos como los flavanoles (epicatequina y catequina) generalmente no son tan eficaces como los flavonoles debido a su conformación menos planar (Gordillo et al., 2012). Sin embargo, dentro de esta familia, se ha podido comprobar que determinados flavan-3-oles monoméricos pueden tener un mayor contacto con los antocianos debido a factores como la presencia de un grupo hidroxilo adicional en el anillo B, tal y como sucede con la (-)-epigallocatequina. Igual que ocurre con la presencia con otros sustituyentes en el anillo B como el pirogalol (Teixeira, N. et al., 2013).

La copigmentación en el vino tinto, además de establecerse entre antocianos y otros compuestos incoloros de distinta naturaleza (copigmentación intermolecular), también se puede producir entre distintas moléculas de antocianos entre sí (autoasociación) o entre el grupo acilado y el grupo cromóforo del mismo antociano (copigmentación intramolecular) (Figura 33). A su vez, se ha descrito que pigmentos derivados antociánicos como las oaklinas, propios de procesos de envejecimiento, también pueden participar en este tipo de reacciones favoreciendo la estabilidad del color del vino en etapas avanzadas de la vinificación (Sousa et al., 2014).

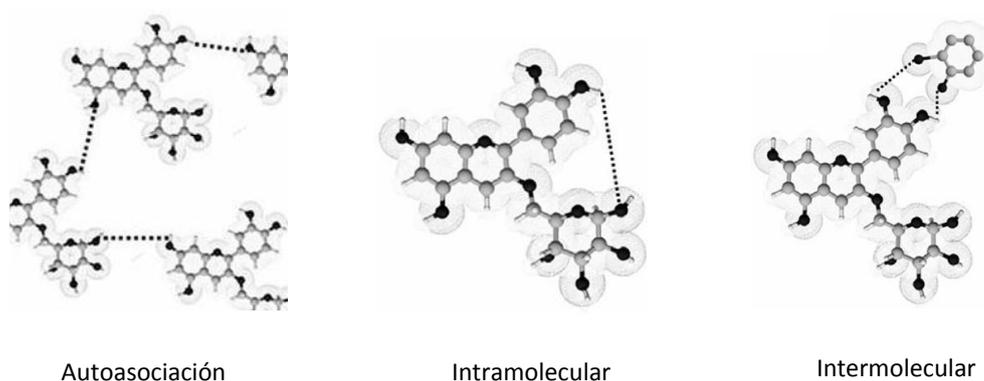


Figura 33. Tipos de copigmentación, según las moléculas implicadas.

2.4. Evolución y estabilización del color durante la vinificación.

Coincidiendo con el final de los procesos fermentativos y tras el descube, junto con las reacciones descritas en el apartado anterior (decoloración por sulfitado, oxidaciones enzimáticas y copigmentación), la polimerización de los compuestos fenólicos es uno de los procesos predominantes en las fases de estabilización y/o envejecimiento del vino (Ribereau-Gayón et al., 2006). La polimerización engloba un conjunto de reacciones muy complejas que pueden establecerse entre distintos tipos de fenoles. Así, los flavanoles monoméricos y sus formas oligoméricas y poliméricas (procianidinas y taninos condensados), presentan una clara tendencia a condensar entre ellos o con los antocianos, de forma directa o bien con mediación de etanal.

Como resultado de la polimerización, comienzan a formarse en el vino los denominados pigmentos antociánicos derivados (De Freitas & Mateus, 2011). Estos pigmentos de nueva formación se generan cuando se establecen enlaces covalentes en los complejos de copigmentación iniciales entre los pigmentos antociánicos monoméricos (originales de la uva) y los copigmentos.

Los distintos tipos de pigmentos antociánicos derivados descritos en vinos incluyen los piranoantocianos (vitisinas y sus productos derivados, metilpiranoantocianinas, aductos antociano-vinilfenol, aductos antociano-vinilcatequina, portisinas, etc.), derivados antociano-flavanol por condensación directa, y derivados antociano-flavanol mediados por acetaldehído. Algunas de estas estructuras se muestran en la Figura 34.

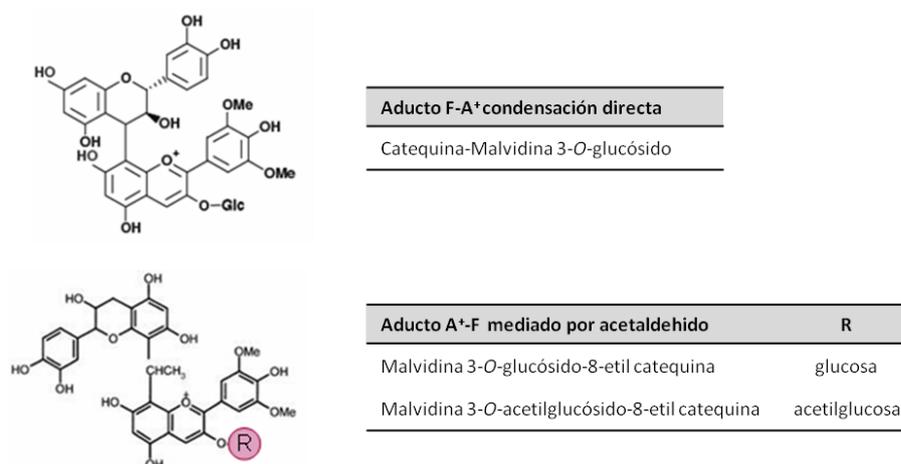


Figura 34. Estructura química de algunos pigmentos antociánicos derivados.

Se estima que aproximadamente el 50% del color de vinos de más de un año de edad puede deberse a estos compuestos poliméricos, aumentando este porcentaje en vinos con mayor envejecimiento. Una característica común de los pigmentos derivados es su

mayor grado de polimerización y resistencia a reacciones de degradación que los antocianos libres. Sus propiedades cromáticas también son distintas, mostrando la mayoría de ellos tonalidades rojo-anaranjadas y menor intensidad cromática. De esta forma, se explica la evolución del color desde etapas iniciales de la vinificación desde tonalidades rojo-azuladas (propias de antocianos libres y copigmentados) hacia colores rojo-anaranjados y más apagados o pardos, propios de la polimerización y oxidación de taninos, pero a su vez más estables (Khoo et al., 2017).

La condensación de taninos y antocianos se puede producir a través de 3 mecanismos: condensación A-T, condensación T-A y condensación A-T con un puente etilado (He et al., 2008; Li & Sun, 2017).

La condensación A-T está basada en la reacción en la que los antocianos se comportan como agentes electrófilos a través de la carga positiva del catión flavilio y los taninos presentan un carácter nucleofílico debido al exceso de electrones en los C6 y C8, posiciones en las que el antociano reacciona, generando un xantilio amarillo. Posteriormente, este compuesto evoluciona a un flaveno incoloro (A+-T) el cual puede presentar tonos rojos en presencia de oxígeno (AO-T), estableciéndose un estado de equilibrio entre ambas formas: $A^{+}-T \leftrightarrow AO-T$

Por otro lado, la condensación T-A se basa en que a pH ácido los taninos se pueden hidrolizar formando un carbocatión, el cual puede reaccionar con antocianos bajo la forma carbinol (AOH). Esta reacción produce un complejo incoloro que se colorea seguidamente de rojo anaranjado después de su deshidratación. Esta reacción se produce en ambientes reductores y se ve favorecida por la temperatura y por la concentración de los antocianos en el vino.

La condensación Antociano-Tanino con un puente etilado se produce gracias a la presencia de etanal o acetaldehído en el medio, producido a través de varios mecanismos como la oxidación de etanol, la actividad microbiana o por la descarboxilación del ácido pirúvico. Este aldehído puede reaccionar de manera irreversible con los taninos en las posiciones 4 y 8, igual que con los antocianos en la forma de carbinol neutra. El compuesto formado presenta un color carmesí estable evitando la oxidación, limitando la oxidación y por ello tonos amarillentos (Canuti et al., 2012).

Esta unión entre antocianos y taninos puede producirse de manera similar a través del ácido glioxálico, el cual procede de la oxidación del ácido tartárico. A través de este mecanismo se pueden formar compuestos incoloros, que rápidamente evolucionan hacia compuestos que presentan color amarillo (Fulcrand et al., 1997; He et al., 2012).

La polimerización dará lugar a moléculas cada vez más grandes, lo que se traducirá inicialmente en una disminución del sabor amargo y en un incremento de tonos pardos del vino, como se ha explicado anteriormente. No obstante, si se alcanza cierto grado de polimerización, las moléculas se vuelven insolubles y tienden a precipitar. Por ello, en fases avanzadas de la vinificación, y especialmente en vinos sometidos a crianza, parte de la materia colorante del vino se pierde de manera natural por la precipitación de compuestos coloreados de elevado peso molecular.

3. TÉCNICAS DE VINIFICACIÓN ADAPTATIVAS AL CAMBIO CLIMÁTICO.

3.1. Elaboración de vino tinto mediante vinificación tradicional

Desde la antigüedad, los vinos tintos se han elaborado con vinificaciones tradicionales, basadas en la maceración, contacto de los hollejos con el mosto, y posteriormente con el vino, que permite la extracción de los compuestos químicos procedentes de las partes sólidas de la uva (aromas, polisacáridos, proteínas o polifenoles), todos ellos involucrados en sensaciones organolépticas. El conjunto de etapas de la vinificación en tinto tradicional se esquematiza en la Figura 35.

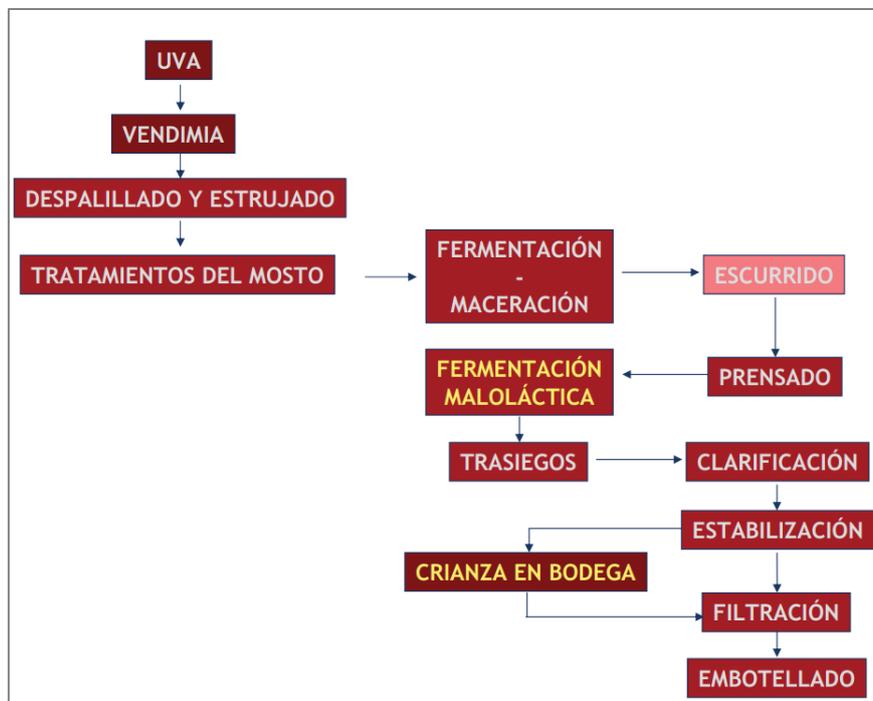


Figura 35. Esquema de vinificación de vino tinto

Despalillado-Estrujado: El despalillado se produce a la entrada de la uva en el lagar y tiene como objetivo separar la uva de los raspones y las hojas que pueden estar presentes en los racimos, los cuales aportan aromas y sabores amargos al mosto

durante la posterior maceración. Además, el despalillado reduce el potasio aportado por los raspones al mosto, lo que conlleva a una mayor acidez beneficiosa a la hora de elaborar vinos tintos. Usualmente, junto al despalillado se realiza el estrujado que es el proceso que conlleva la rotura de los hollejos, extrayéndose el mosto del interior de la baya, con lo que se posibilita la posterior maceración. Tradicionalmente se considera que el estrujado no debe ser demasiado exhaustivo, para evitar que se rompan las semillas de las uvas, que pueden aportar sabores desagradables al mosto y posteriormente al vino.

Encubado: consiste en el trasiego de la masa de vendimia estrujada a depósitos para la maceración y fermentación. La forma y el material del depósito tendrán una gran importancia en la elaboración del vino, ya sea por la superficie de contacto entre el mosto y las partes sólidas de la uva y también por las temperaturas de fermentación. Durante este periodo se realizan operaciones para una correcta fermentación del mosto y su posterior vinificación. Entre las correcciones más comunes cabe destacar el sulfitado y la adición de ácido tartárico como corrector de la acidez.

Fermentación alcohólica-Maceración: La maceración es un proceso de difusión sólido-líquido de compuestos químicos desde las partes sólidas de la uva hacia el mosto. Usualmente, de manera simultánea a la maceración, se produce la fermentación alcohólica, en la que el azúcar del mosto se transforma en el alcohol etílico del vino gracias a la acción de las levaduras (presentes en las pieles de las uvas). La duración de la fermentación alcohólica depende de factores como el contenido inicial de azúcares reductores del mosto, la temperatura y los nutrientes disponibles para las levaduras encargadas de realizar este proceso.

Cuando la fermentación alcohólica va completándose, el líquido hidroalcohólico se va enriqueciendo progresivamente de compuestos fenólicos y aromáticos procedentes de los hollejos y las semillas de la uva, debido a que el incremento de temperatura, la presencia de alcohol y el CO₂ desprendido, favorecen la ruptura de las partes sólidas de las uvas. El proceso de fermentación alcohólica se finaliza naturalmente cuando el azúcar se reduce tanto que las levaduras no cuentan con nutrientes para su supervivencia y el contenido en alcohol evita su desarrollo. Este proceso también se puede detener modificando factores como la temperatura.

Descube y prensado: Una vez acabada la fermentación alcohólica y la maceración, se produce el descube o escurrido de los vinos, que consiste en separar las partes sólidas de la masa de vendimia del mosto fermentado. El mosto fermentado obtenido por escurrido se trasiega a depósitos nuevos para continuar con el proceso de vinificación.

Tras el descube, el producto sólido de la fermentación aún tiene cantidades de vino considerables, por lo que puede ser sometido a un prensado para extraer todo el líquido, obteniéndose los denominados *vinos de prensa*, ricos en aromas y taninos, pero con características gustativas menos deseables, por lo que no se mezclan con los obtenidos directamente en el descube. Los restos sólidos que resultan del prensado (hollejos y semillas parcialmente agotados) se emplean como subproducto en la elaboración de destilados de orujo y otros productos.

Fermentación maloláctica: Esta fase es esencial en los vinos tintos y se produce tras la fermentación alcohólica a través de la acción de bacterias lácticas en el vino escurrido. Su misión es transformar el ácido málico en ácido láctico con la finalidad de modular la acidez en el vino. El ácido láctico resulta más suave que el málico, por lo que tiene lugar un redondeo y un aumento de la untuosidad y los aromas en el vino. Además, la transformación del ácido málico en láctico lleva a una mayor estabilidad microbiana a los vinos tintos.

Clarificación-Estabilización: Tras la fermentación maloláctica, el vino antes de su comercialización o crianza se somete a un proceso de limpieza de sustancias coloidales en suspensión. Estas operaciones se realizan usualmente a través de agentes clarificantes como proteínas, alginatos, geles de sílice o bentonitas. Además, la estabilización del vino conlleva también el tratamiento por frío o la aplicación de otras sustancias químicas como el ácido metatartárico y la carboximetilcelulosa (CMC) que se usan con el fin de eliminar cristales de bitartrato que se pueden producir en el vino o la polivinilpolipirrolidona (PVPP) para eliminar los polifenoles oxidados y oxidables. Habitualmente, tras la clarificación y estabilización, el vino se suele someter a filtrado para una eliminación más eficaz de las impurezas.

Crianza en barrica. En el caso que se considere un vino adecuado para su crianza o envejecimiento, se trasiega a barricas de roble, siendo este proceso uno de los de mayor importancia en la elaboración de un vino. La barrica de roble es un continente tradicionalmente seleccionado para la crianza del vino debido a sus propiedades de dureza, permeabilidad y porosidad, además del aporte de compuestos fenólicos y aromáticos propios de la madera. Se encuentran diferencias en la composición y el color de vinos envejecidos en barricas de madera de diferentes orígenes geográficos y/o especies de roble, así como con diferentes grados de tostado, o sometidos a distintos periodos de envejecimiento (Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2006).

Durante el envejecimiento en barrica, se producen importantes cambios físico-químicos en el vino, favorecidos por un progresivo proceso de microoxigenación que,

en términos generales, incrementa las reacciones de polimerización, así como la estabilidad cromática, la clarificación espontánea y proporciona una mejor estructura del vino (Cano-López et al., 2010).

Embotellado. Es la última fase de la elaboración del vino, previa a su comercialización. Además, también puede constituir una última fase de envejecimiento por lo que puede tener una gran importancia en el aporte de determinadas cualidades sensoriales al vino. Se ha podido comprobar que la microoxigenación producida a través del corcho de la botella favorece la estabilización el color del vino (Wirth et al., 2012). Otros fenómenos que se han descrito durante el envejecimiento en botella son la evolución de aromas o la reducción de la astringencia (Chira et al., 2012).

3.2. Técnicas alternativas de vinificación

Las uvas tintas con madurez fenólica incompleta o inadecuada pueden aportar al vino sabores herbáceos y astringentes provocando sensaciones organolépticas poco aceptadas por el consumidor (De Llaudy et al., 2008). Además, estos desequilibrios pueden producir pérdidas de color durante la vinificación, debidas a la falta de estabilización de los antocianos. Por ello, para elaborar vinos tintos con colores atractivos y estables, así como con sabores y aromas equilibrados, es fundamental que las uvas se encuentren en un óptimo estado de madurez fenólica.

Sin embargo, cuando no es posible contar con uvas con estas características, la aplicación de determinadas técnicas de vinificación alternativas a la vinificación tradicional puede ser fundamental para modular el contenido fenólico en el vino (Sacchi et al., 2005; Gonzalez-Neves et al., 2010; Clodoveo et al., 2016; Setford et al., 2017). El objetivo común de estas técnicas es la elaboración de vinos de calidad cuando las características de la uva no son las idóneas, lo que puede ocurrir de manera muy común en las zonas vitivinícolas de clima cálido (Gómez-Míguez & Heredia., 2004; Gómez-Míguez, M. et al., 2007; Heredia et al., 2010; Gordillo et al., 2010; 2012; 2013; 2014; 2016; Jara-Palacios et al., 2016; Cejudo-Bastante et al., 2014; 2017).

Entre estas técnicas se encuentra el délestage (Figura 36), cuyo fin es eliminar semillas cuando éstas tienen un bajo grado de madurez y puedan provocar la aparición de sabores “verdes” en el vino.

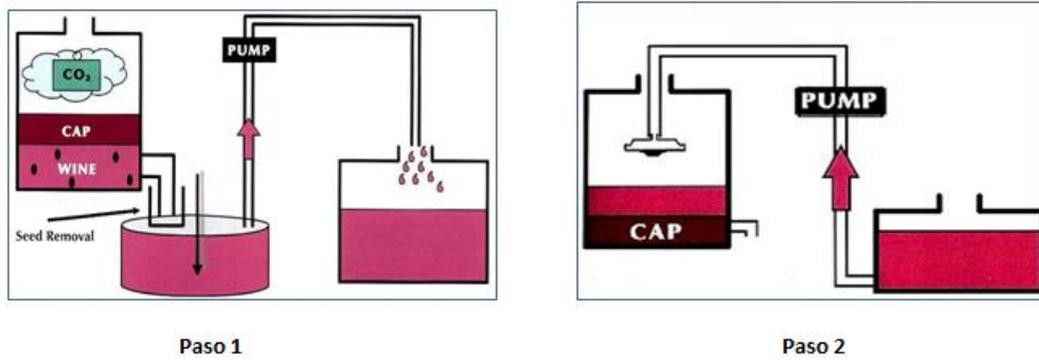


Figura 36. Esquema del proceso de délestage (Fuente: Zoecklein et al., 2009).

Esta técnica, que se emplea desde hace décadas, consiste en trasegar el mosto durante la fermentación alcohólica a un depósito intermedio, permaneciendo las partes sólidas menos densas (el denominado “sombbrero”) en el depósito de fermentación. El vaciado de líquido ayuda a la descompactación del sombrero. El trasiego favorece que las partes sólidas más densas (sobre todo las semillas) se depositen en el fondo del depósito auxiliar, de manera que, en pocas repeticiones de esta operación, puede eliminarse hasta el 40% de las semillas (Canals et al., 2008).

Otras técnicas están basadas en la modificación de las condiciones en las que se produce la extracción de los compuestos fenólicos durante el proceso maceración. Tal y como se ha explicado en el apartado 2 de esta Memoria, no todos los compuestos fenólicos se extraen de igual forma durante las fases de maceración prefermentativa y fermentativa. Así, los antocianos y los flavonoles de los hollejos se extraen fácilmente en las primeras fases de la maceración debido a su localización en la piel y a su mayor solubilidad en medio acuoso (Bautista-Ortín et al., 2016). Por otro lado, la extracción de procianidinas de las semillas es mucho más lenta (González-Manzano et al., 2004; Canals et al., 2005; De Llaudy et al., 2008). Por ello, modificar parámetros durante la maceración como el tiempo de contacto del mosto con la masa de vendimia, la temperatura (criomaceración y/o termovinificación), o fermentar los racimos enteros sin despalillar ni prensar previamente (maceración carbónica), suelen ser procedimientos eficaces para favorecer la extracción selectiva de los compuestos fenólicos. Como consecuencia, los vinos elaborados con estas técnicas presentan atributos sensoriales como sabor, aroma o color particulares.

Maceraciones prolongadas: Aumentar el tiempo de contacto en fermentación entre la masa de vendimia y el líquido hidroalcohólico ha demostrado ser una técnica efectiva para una mayor difusión de compuestos fenólicos al vino, principalmente los procedentes de las semillas (Koyama et al., 2007). Otros estudios han confirmado

además que las maceraciones largas no sólo aportan un mayor contenido fenólico al vino en las etapas iniciales de la vinificación, sino una mayor intensidad colorante que se mantiene incluso durante el envejecimiento en botella (Gómez-Plaza et al. 2001; Kudo & Sodeyama, 2002; Kocabey et al., 2016).

Termovinificación o maceración prefermentativa en caliente. Esta técnica se fundamenta en el calentamiento de la masa de vendimia a 60-70 °C durante un corto periodo de tiempo antes de la fermentación alcohólica. Posteriormente se produce un rápido enfriado para favorecer el comienzo de la fermentación alcohólica.

El aumento de temperatura durante la maceración también ha demostrado ser eficaz en la mejora de la extracción de antocianos y taninos en el vino debido al incremento de la permeabilidad de las células hipodérmicas de los hollejos y semillas (Sacchi et al., 2005; Kennedy, 2008; Lukic et al., 2017). Este calentamiento además desnaturaliza la polifenol-oxidasa previniendo el pardeamiento del vino desde las etapas iniciales (De Andrade-Neves et al., 2014). Aun así, el efecto sobre la extracción de fenoles puede ser variable en función de la temperatura aplicada. Girard et al. (1997), demostraron que mientras el contenido en antocianos monoméricos disminuye durante la fermentación alcohólica, los pigmentos poliméricos aumentan de una manera significativa cuando la temperatura de fermentación se sitúa entre 20 y 30 °C.

Criomaceración o “cold soaking”. Esta técnica consiste en disminuir la temperatura del mosto entre 5 y 10 °C durante un tiempo variable (desde horas hasta días) antes de que comience la fermentación (Aleixandre-Tudo & Du Toit, 2018). La baja temperatura impide que comience la actividad de las levaduras, por lo que la extracción de compuestos fenólicos y aromáticos durante su aplicación se produce en un medio acuoso sin etanol. Además, estos compuestos quedan mejor protegidos frente a procesos de oxidación ya que se inhibe también el desarrollo de microorganismos y de enzimas como la polifenoloxidasa.

Esta técnica se ha utilizado con éxito a escala piloto e industrial en la elaboración de vinos blancos y rosados para favorecer una mayor extracción de aromas y proteger el color (Gómez-Míguez, J. et al., 2007; Hernanz et al., 2007). Además, su aplicación en vinificaciones en tinto ha permitido la elaboración de vinos con una mayor extracción de antocianos, flavan-3-oles monoméricos o ácidos benzoicos, resultando en colores más intensos y estables (Gómez-Plaza et al., 2001; Álvarez et al., 2006; Koyama et al., 2007; Heredia et al., 2010; Panprivech et al., 2015).

Maceración carbónica: Esta técnica consiste en fermentar los racimos de uva enteros sin despallillar ni prensar previamente. El mosto liberado de los racimos rotos por el

peso de la masa de vendimia comienza a fermentar produciendo CO₂, que desplaza al O₂ que hay en el depósito. Esta operación provoca que las levaduras pasen de una respiración aeróbica a anaeróbica, propiciando la atmósfera idónea para que cada grano inicie su propia fermentación intracelular (Gómez-Míguez & Heredia, 2004). El proceso produce una rotura de los hollejos, produciendo un vino con escasa graduación inicial. Una vez finalizada la fermentación intracelular, las partes sólidas son estrujadas para extraer el mosto restante y realizar una segunda fermentación, que puede durar entre 7 y 9 días, dando como resultado vinos más ligeros y afrutados.

Con respecto a la composición fenólica, se ha confirmado que el contenido en antocianos en vinos elaborados por maceración carbónica es menor al de los elaborados por vinificación tradicional, siendo vinos con colores más claros (Sun et al., 2001, Gómez-Míguez & Heredia, 2004). Con respecto al contenido fenólico total, se han descrito resultados variables según la variedad de uva con la que se aplicó la maceración carbónica (Pellegrini et al., 2000). En algunos casos, se ha observado que el contenido total de fenoles, así como de catequinas y procianidinas aumenta (Lorincz et al. 1998; Sun et al., 2001).

Aparte de las técnicas basadas en la modificación de las condiciones de maceración, otros procedimientos para modular la extracción de fenoles se basan en el uso de enzimas pectolíticas. Estos enzimas han demostrado eficazmente aumentar el color de los vinos tintos gracias a su efecto de ruptura de las células de los hollejos, facilitando por tanto la liberación de los pigmentos. La pureza de estos enzimas es de gran importancia en los efectos conseguidos en el vino, ya que la presencia de B-glucosidasas puede provocar la hidrólisis de los antocianos en sus agliconas, las cuales son mucho menos estables. El uso de estos enzimas durante la maceración ha demostrado ser una técnica eficaz para el aumento de la concentración de antocianos en los vinos tintos, al igual que sucede con otros compuestos polifenólicos (Watson et al., 2000). El tipo de enzima, el momento de la adición y el tipo de uva son factores que determinan la efectividad de esta técnica (Guerrand & Gervais, 2002; Sacchi et al., 2005; González-Neves et al., 2016).

Tecnologías no térmicas de procesado: Recientemente, se han probado el uso de tecnologías emergentes como los ultrasonidos, las altas presiones y el campo eléctrico pulsado, para desarrollar nuevas prácticas de vinificación en tinto, con el objetivo de aumentar el rendimiento mediante la reducción del tiempo de producción, que permite a la bodega optimizar recursos y espacios (Clodoveo et al., 2016)

Adición de chips: Desde su aprobación por la UE (CE 1507/2006), los chips de roble (trozos o virutas procedentes de las barricas) se han usado en los últimos años como alternativa a la crianza tradicional en barrica en etapas avanzadas de la vinificación, como se ha podido comprobar en numerosos trabajos, obteniendo interesantes resultados en la estabilización del color (Cejudo et al., 2011; Baiano et al., 2016; Dumitriu et al., 2016). Con esta práctica se aportan al vino compuestos fenólicos como ácidos fenólicos (gálicos, elálgico, vainílico, entre otros) y fundamentalmente taninos hidrolizables; además, compuestos aromáticos como furfural, guaiacol y otros. Los taninos hidrolizables no se encuentran de forma natural en la uva, por lo que el único origen de su presencia en el vino es el contacto con la madera.

Por otro lado, más recientemente, en otros trabajos se han utilizado chips de roble durante las etapas pre y postfermentativas para mejorar la posterior estabilización del color del vino en etapas más avanzadas. Este aporte suplementario de chips produjo vinos más oscuros y con tonos más azulados debido a la mejora de los procesos de copigmentación. Sin embargo, este efecto depende de la dosis y del momento de aplicación (Gordillo et al., 2013; Gordillo et al., 2016; Kyrleou et al., 2016).

4. APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE LA UVA. LAS SEMILLAS

La elaboración de vino produce diferentes subproductos que se generan en distintas etapas de la vinificación, como el despalillado (raspones), prensado y estrujado (orujos), decantación y clarificación (lías) y procesos de limpieza de los equipos y maquinaria que están en contacto con la materia prima (aguas residuales o lodos) (Figura 37).



Figura 37. Principales subproductos generados por la industria vitivinícola.

La industria enológica genera en Europa aproximadamente 14.5 millones de toneladas de residuos al año, y sólo en España entre 2 y 3 millones de toneladas (Ruggeri et al., 2009; Teixeira et al., 2014). Los orujos constituyen el 62% de los subproductos producidos, seguidos de las lías (14%), raspones (12%) y lodos (12%). Estos

subproductos son ricos en compuestos orgánicos como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales, fibra, así como compuestos fenólicos (Mendes et al., 2013; Dwyer et al., 2014), cuyo contenido puede variar en función del tipo de subproducto, variedad de uva y proceso de vinificación (Bustamante et al., 2008).

- Los orujos son el subproducto sólido mayoritario de la vinificación, y representa del 20 al 25% (p/p) de la masa de vendimia. Está constituido por la mezcla de hollejos, semillas, raspones y restos de pulpa, en proporciones variables, que se obtiene tras el estrujado y prensado de la uva (1 kg de orujo por 6 L de vino producido) (Mendes et al., 2013). Su composición se caracteriza por altos contenidos en agua (50-70%) y lignina (17-24%), y bajos en proteínas (4%), sustancias pécticas y celulosas como los polisacáridos mayoritarios (Teixeira et al., 2014). A su vez, destaca por ser rico en compuestos fenólicos, entre los que destacan flavonoles, flavanoles, ácidos fenólicos y resveratrol (Casas et al., 2010; Jara-Palacios et al., 2015; 2016). La composición del orujo de uva puede variar notablemente en función del tipo de vino, tinto o blanco, ya que se encuentran fermentados y no fermentados, respectivamente (Figura 38). El mosto de uva blanca no suele fermentar con las partes sólidas de la uva, por lo que su orujo es más rico en compuestos fenólicos (Jara-Palacios et al., 2014a). Sin embargo, el mosto de uva tinta fermenta junto con las partes sólidas de la uva, por lo que la composición fenólica de sus orujos dependerá de las condiciones de maceración (tiempo, temperatura, etc.), siendo, en general, menos rica que la de los orujos de uva blanca excepto, como es lógico, en contenido en antocianos. Estas diferencias son determinantes para su aprovechamiento y uso industrial (Pedroza et al., 2013).

a) Orujo de uva tinta



b) Orujo de uva blanca



Figura 38. Orujo de uva procedente de uva tinta (a) y uva blanca (b).

A su vez, cada uno de los componentes en que se puede fraccionar el orujo (restos de raspón, hollejos y semillas), constituyen, en sí mismos, subproductos de interés industrial.

- El raspón representa sobre el 14% del total de los residuos sólidos y el 3-5% de la uva procesada (Figura 39). Es una materia prima fundamentalmente lignocelulósica (lignina, celulosa, hemicelulosa) y rica en taninos de grado medio de polimerización (16%). Como se explicó anteriormente, suele eliminarse antes del estrujado de la uva para evitar los sabores astringentes y aromas herbáceos no deseables. Aun así, algunos restos permanecen en la masa de vendimia, siendo por tanto un componente más del orujo. Actualmente, su valor comercial como subproducto es relativamente bajo, aprovechándose principalmente como alimento para animales o para tratamientos agronómicos de mejora del suelo, aunque puede ser una fuente interesante de fibra dietética y antioxidantes.



Figura 39. Raspones de uva

- El hollejo representa aproximadamente el 50% del orujo, aunque la proporción hollejo/semilla puede variar según diferentes factores como la variedad. En su composición destaca su contenido en proteínas (5-12%), cenizas (2-8%), azúcares reductores (1-70% dependiendo del proceso de estrujado y prensado), y su contenido en fibra (60% en extracto seco). Además, es rico en fenoles como flavonoles, taninos de mayor grado de polimerización, pero menor de galoilación y, en uva tinta, distintos tipos de antocianos. Esta composición lo hace especialmente interesante como materia prima para obtener ingredientes bioactivos de origen natural, aunque tradicionalmente se han usado para elaborar compost o incluso eran desechados como residuos en áreas. Por tanto, el desarrollo de nuevas estrategias industriales para optimizar la extracción de estos compuestos es fundamental para un mejor aprovechamiento del hollejo de orujo de uva.

- Las semillas representan una proporción variable del orujo, desde el 15% hasta el 50%. Son ricas en fibra (hasta un 40%), grasas y aceites esenciales (16%), proteínas (12%), y compuestos fenólicos (7%), y otros compuestos minoritarios como carbohidratos o minerales (García-Jares et al., 2015). La grasa de la semilla es un aceite de alto valor comercial, rica en ácidos grasos poliinsaturados, de gran interés nutricional, aunque también fácilmente enranciable.

Es de especial interés su contenido fenólico, ya que contiene entre el 60 y el 70% del total de fenoles extraíbles de la uva, aunque durante la maceración solo se extrae una pequeña proporción. Así, las semillas se consideran una fuente rentable de antioxidantes naturales para diversas industrias como la farmacéutica, cosmética y alimentaria, que actualmente comercializan extractos de semilla ricos en fenoles.

El aprovechamiento por separado de las semillas como subproducto enológico hace necesario el diseño de sistemas industriales de procesamiento y separación a partir del orujo, que garanticen un adecuado rendimiento económico y de tiempo de procesado. Ricas en compuestos antioxidantes naturales, las semillas secadas adecuadamente pueden almacenarse durante largos periodos de tiempo sin que se degraden significativamente (Harrington, 1972).



Figura 40. Sistema industrial para la separación de semillas a partir de orujo de uva (Fuente: *The GRAPEVINETM Magazine*).

Tradicionalmente, la valorización de los subproductos descritos se ha focalizado principalmente en usos directos sin prácticamente tratamiento previo, como la elaboración de fertilizantes para el suelo, la producción de biomasa o la producción de alimentos para el ganado. Sin embargo, se ha podido comprobar en relación a la alimentación animal que algunos taninos dificultan la digestibilidad de estos subproductos de uva (Frutos et al., 2004; Foiklang et al., 2016). En cuanto a la

producción de fertilizantes, se ha demostrado que algunos polifenoles procedentes de las uvas presentan efectos antimicrobianos que dificultan el compostaje (Bustamante et al., 2007).

A su vez, debido a las altas cantidades de residuos producidas durante los últimos años, su estacionalidad y a los problemas medioambientales que producen (contaminación de suelo, malos olores, desarrollo de plagas de insectos, etc.) se han buscado alternativas medioambientales más sostenibles. Existe una mayor concienciación por parte del sector público y privado por la sostenibilidad medioambiental junto a la búsqueda de la eficiencia operacional y, por lo tanto, económica en la eliminación de estos residuos. Así, una alternativa ha sido la utilización de los orujos de uva como materia prima para la extracción de diferentes compuestos como el aceite de las semillas, o los ácidos tartárico y cítrico, además para la producción de alcoholes para la generación de energía o la elaboración de bebidas espirituosas (Teixeira et al., 2014).

Por su parte, los compuestos fenólicos obtenidos a partir de los orujos de uva poseen múltiples propiedades biofuncionales como su alto poder antioxidante, por lo que son aprovechados por la industria alimentaria y farmacéutica ya que su consumo prolongado disminuye el riesgo de enfermedades degenerativas (González-Paramás 2004).

La extracción y la estabilidad de los compuestos responsables del color del vino puede modularse con determinadas prácticas enológicas como la adición suplementaria de copigmentos fenólicos en distintas fases de la vinificación (Parker et al., 2007; Harbertson et al., 2012), tanto en forma de extractos comerciales o mediante el uso de fuentes naturales que los contengan, como es el caso de las semillas.

Las semillas y los extractos obtenidos de ellas son ricos en fenoles que, cedidos al vino, contribuyen de manera importante a las propiedades sensoriales de astringencia y amargor y, por su capacidad de estabilización de la materia colorante, al color (Lorrain et al., 2013; García-Estévez et al., 2017).

El objetivo de la adición exógena de semillas o de sus extractos en las etapas iniciales de la vinificación es mejorar la proporción copigmentos/pigmentos en el vino e incrementar el tiempo de contacto entre ellos para, así, favorecer niveles iniciales de copigmentación más elevados, evitar pérdidas de pigmentos por oxidación y asegurar la formación de pigmentos más estables (Darías-Martín 2001; Álvarez et al., 2009).

En algunas ocasiones, se utiliza la adición de taninos enológicos comerciales, procedentes de **extractos de semilla**. El Codex Alimentarius clasifica los taninos enológicos comerciales como aditivos, con el código E-181 (Codex Alimentarius Commission, 2009). Por otro lado, el Codex Enológico Internacional, donde se recopilan las descripciones de los principales productos químicos utilizados en la elaboración y conservación de vinos, los incluye con el código Oeno 12/2002 (OIV, 2006), y los clasifica para su uso en enología como coadyuvante de clarificación de vinos y mostos, y particularmente, en vinificación en tinto, como coadyuvante de afinado, buscando la estabilización de la materia colorante y la estructuración armónica de los vinos.

Los taninos enológicos comerciales son extractos que pueden proceder de diferentes especies vegetales, como la agalla de nuez, de maderas ricas en taninos o de la piel o semillas de las uvas. Para que los taninos procedentes de hollejos y semillas de uva puedan tener el reconocimiento de tanino comercial, su contenido en catequina debe ser superior a 50 mg/g o poseer un contenido en taninos proantocianínicos superior a 0.5 mg/g. La concentración de estos taninos depende de su origen botánico, de su proceso de obtención (atomización, liofilización, evaporación, etc.), del tipo de disolvente empleado (etanol, agua, etc.) y del tiempo de extracción aplicado. Estos compuestos están permitidos en un gran número de países y su uso está legalmente controlado por la normativa específica de cada uno (Galpin, 2006). En España, el uso de taninos enológicos se ajusta a la normativa de la Unión Europea, están permitidos como coadyuvante en la clarificación y afinamiento de mostos y vinos (OIV, 2006). Los taninos comerciales tienen una amplia aplicabilidad en la mejora de sensaciones gustativas y aromáticas, en la inhibición de enzimas con poder oxidante o en la mejora en la estabilidad del color a través de interacciones con los pigmentos antocianínicos (Bautista-Ortín et al., 2005; Obradovic et al., 2005).

El efecto sobre la estabilidad del color de los taninos comerciales depende en gran medida de su origen. Así, se pudo comprobar que los taninos provenientes de semillas de uva muestran mejores resultados en la estabilización e incremento del color del vino durante su envejecimiento que los procedentes de otras fuentes como el hollejo de la uva (Álvarez et al., 2009; Canuti et al. 2012). A su vez, la efectividad de los taninos de semillas sobre el color del vino depende de otros factores como la naturaleza del tanino, la dosis aplicada y el momento de adición, dando lugar a diferentes resultados, en muchos casos contradictorios. Neves et al. (2010) estudiaron el efecto de dos tipos de taninos comerciales procedentes de semillas: GSE100 y GSE300, este último con mayor concentración en flavanoles monoméricos y procianidinas. Ambos productos se

adicionaron antes y justo después de la fermentación, en dos proporciones (200 y 600 mg por litro de vino), obteniéndose resultados completamente diferentes sobre el color. El aumento de la intensidad de color fue más eficaz en adiciones de los taninos GSE300 posteriores a la fermentación y a concentraciones mayores (600 mg por litro de vino). Sin embargo, trabajos posteriores mostraron resultados no concordantes con este estudio, encontrándose que adiciones prefermentativas de taninos procedentes de semillas tuvieron un efecto más eficaz en la estabilización del color del vino durante procesos de envejecimiento que adiciones postfermentativas, principalmente en adiciones a alta concentración (Bautista-Ortín et al., 2007; Canuti et al., 2012; Liu et al., 2013).

No obstante, la adición de taninos comerciales no siempre ha mostrado tener un efecto positivo en la estabilidad de los antocianos y el color del vino. Según Chen et al., (2016), la adición de taninos, principalmente a altas concentraciones, afectó negativamente a la concentración de pigmentos estables como vitisina A, vitisina A-Ac y vitisina B. De forma similar, Parker et al. (2007) mostraron cómo la adición pre y postfermentativa de taninos comerciales de semillas no produjo diferencias en las propiedades colorimétricas de vinos tras un proceso de envejecimiento de dos años. Por otro lado, Harbeston et al. (2012) encontraron que la adición en altas dosis de taninos comerciales de semillas produjo sensaciones gustativas negativas en vinos.

La adición de **semillas frescas**, es decir, procedentes de orujos de uvas no agotados durante la vinificación, constituye otra posibilidad para enriquecer el vino con compuestos fenólicos.

A pesar de que estas prácticas han sido poco estudiadas hasta el momento, parecen mostrar una considerable efectividad en la mejora de las características cromáticas de los vinos tintos. Tienen la ventaja de no necesitar tratamientos previos de extracción como ocurre con el uso de taninos comerciales, lo cual supone un ahorro económico y una mayor facilidad operacional en su aplicación (Versari et al., 2013). A su vez, en comparación con la adición del orujo de uva completo, la adición de semillas frescas podría disminuir las adsorciones de la materia colorante cuando la cantidad adicionada es elevada (Revilla et al. 1998; Gordillo et al, 2014) debido a su menor volumen, pero con el beneficio de aportar una importante riqueza fenólica (Nogales-Bueno et al., 2017c). En particular, con la adición de semillas se aporta al vino, fundamentalmente, flavan-3-oles monoméricos (catequina, epicatequina, galocatequina, y epigaloca-

tequina), y poliméricos (proantocianidinas y taninos condensados) (Monagas et al., 2003; Shi et al., 2003; Jackson, 2008).

Un estudio realizado por Kovac et al. (1995) puso de manifiesto que la adición de semillas de uva mejoró la estabilización del color y aumentó la intensidad, mientras que, por el contrario, otros autores no encontraron una relación positiva entre la adición de mayores cantidades de semillas en la maceración y la posterior estabilización del color del vino (Canals et al., 2008). Sin embargo, estudios más recientes han confirmado la efectividad de la adición suplementaria de semillas en la mejora del color del vino en comparación con la adición de otras partes de la uva como los raspones, que producen una disminución de la intensidad de color y la cantidad de antocianos (Puskas & Miljić, 2012 ; VenuGopal et al., 2018).

No obstante, factores como el estado de madurez de la uva o la variedad necesitan ser estudiados en mayor profundidad ya que determinan diferencias importantes en la concentración polifenólica total en las semillas, en la proporción de las formas monoméricas y poliméricas de los flavanoles, así como en su extractabilidad.

Semillas sobremaduras

En regiones de clima cálido como el sur de España, determinadas variedades de uva blanca (Pedro Ximénez, Moscatel o Palomino) son sometidas a un proceso de sobremaduración y/o deshidratación parcial o total, para la elaboración principalmente de vinos dulces tradicionales, que se caracterizan por presentar un contenido en azúcar superior a 50 g/L y contenidos en alcohol elevados.

Tradicionalmente, el proceso de sobremaduración se realiza por exposición directa al sol de las uvas (“asoleo”) cuando estas alcanzan en la planta un grado de maduración de aproximadamente 16 °Bé. Estos racimos se vendimian y se extienden sobre el suelo en lugares adaptados para la pasificación denominados “paseras” (Figura 41), durante un tiempo variable entre 7 y 20 días, según las condiciones climáticas, la variedad de uva y el tipo de vino dulce que se desee elaborar. Durante el secado en las paseras, las temperaturas diurnas pueden superar los 40 °C y los valores nocturnos en pocas ocasiones están por debajo de 18 °C (Serratosa et al., 2008).



Figura 41. Paseras de uva y proceso de pasificación.

La pasificación de las uvas es un proceso complejo de deshidratación que induce numerosos cambios físicoquímicos en las bayas. Debido a la exposición a las altas temperaturas, se produce una pérdida de agua que conlleva una concentración de los componentes de la pulpa, alcanzando, en el caso del azúcar, los 20 a 24 °Bé. Durante el proceso, las uvas se voltean diariamente con el fin de obtener una concentración de los componentes uniforme en toda la baya. Es importante que la deshidratación sea moderada, con el fin de evitar una evaporación excesiva de la humedad de la pulpa, que dificultaría posteriormente el prensado de los granos.

Paralelamente a este aumento en azúcares, se van produciendo cambios estructurales y sensoriales de la uva pasificada. Así, la pérdida progresiva de agua produce en la baya una reducción del volumen y un aumento de la fragilidad de los hollejos, acompañado de una modificación hacia colores más pardos y oscuros. Se generan aromas a café y caramelizados debidos a compuestos como la acetoína, 2-feniletanol, 4-butirolactona y isobutil e isoamil alcoholes (Moreno-Vigara & García-Mauricio, 2013).

El producto final del proceso de pasificación son uvas pasas de las que se obtienen mostos muy oscuros con un elevado contenido en azúcar, mayor de 400 g/L (Ruiz et al., 2010).

En relación a los metabolitos secundarios, se ha comprobado que, debido al estrés hídrico, las altas temperaturas y la radiación solar, durante el proceso de pasificación se activan en la planta enzimas involucrados en la síntesis de nuevos compuestos fenólicos y su polimerización, especialmente en algunos órganos como las semillas (Díaz et al., 2001; Muir et al., 2011; Dumitriu et al., 2015; Bontpart et al., 2016).

La generación de estos nuevos compuestos depende de la intensidad con la que ocurre el proceso de pasificación, como el nivel de deshidratación de la uva y el grado de sobremaduración alcanzado (Bellincontro et al., 2004; López de Lerma et al., 2013; Peinado et al., 2013). Además de estos factores exógenos, también existen otros factores propios de la uva como puede ser la variedad

Los compuestos fenólicos más importantes que se sintetizan durante el proceso de pasificación son los ácidos benzoicos (gálico, protocateico y p-hidroxibenzoico), ácidos hidroxicinámicos (caftárico y cutárico), flavonoles (fundamentalmente los glucósidos como quercetina-3-glucosido y kaempherol-3-glucosido), procianidinas (procianidina B1) y flavan-3-oles (epicatequinas y catequinas) (Peinado et al., 2009; Moreno-Vigara & García-Mauricio, 2013; Dumitriu et al. 2015).

Debido al potencial fenólico de los subproductos de las uvas sobremaduras, en la actualidad se están desarrollando aplicaciones industriales para su aprovechamiento. Se ha confirmado que la adición de subproductos de orujos o de semillas, o extractos obtenidos de ellos, incrementan las propiedades antioxidantes del vino (Dumitriu et al., 2015, Jara-Palacios et al., 2016).

Sin embargo, también pueden utilizarse como fuentes naturales de copigmentos fenólicos de interés enológico, para proteger el color de vinos, especialmente en regiones de clima cálido. En ese sentido, el desarrollo de nuevos estudios basados en el aprovechamiento de estos subproductos caracterizados por su riqueza fenólica y por ello, con un importante valor sensorial y biofuncional añadido, puede ser uno de los grandes desafíos para la industria enológica andaluza en los próximos años, la cual se puede ver beneficiada enormemente por su aplicabilidad, rendimiento económico y ventajas medioambientales (Resco et al., 2016).



Objetivos

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar el aprovechamiento de semillas sobremaduras de uva procedentes de la elaboración de vinos generosos, como fuente de compuestos fenólicos para la estabilización y mejora del color de vinos tintos de clima cálido.

Para lograr este fin, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el efecto de agregar semillas sobremaduras de Pedro Ximénez durante la fermentación de vinos tintos, y evaluar su potencial como fuente de copigmentos para mejorar el color y la estructura fenólica de vinos de climas cálidos.
- Evaluar la adición de semillas sobremaduras, como subproductos ricos en compuestos fenólicos, en maceraciones postfermentativas que permitan optimizar los tiempos de contacto, y modular las proporciones copigmento/pigmento.
- Comparar el potencial como fuentes alternativas de copigmentos de extractos de semillas de uvas sobremaduras, de las variedades blancas Pedro Ximénez y Moscatel.
- Evaluar la viabilidad de la Espectroscopía Raman con excitación a 1064 nm para valorizar subproductos de uvas secadas al sol (semillas sobremaduras de Moscatel, Pedro Ximénez y Zalema), en función de su perfil fenólico.

OBJECTIVES

The main objective of this Doctoral Thesis has been to study the use of overripe grape seeds obtained from the elaboration of fortified wines, as a source of phenolic compounds to be used in the improvement and stabilization of the color of red wines produced in warm-climate.

With this purpose, the following specific objectives have been stated:

- To study the effect of adding quantities of Pedro Ximénez overripe seeds during red wine fermentation and assessing whether they could be a powerful source of copigments to improve the color of the red wines made in warm climates zones.
- To assess the overripe seeds by-products as a source of phenolics when adding in a subsequent post-fermentative seed-maceration. In this way, it is possible to strengthen an eventual low copigment/pigment ratio, and thus, to avoid the anthocyanin degradation.
- To compare the potential of using overripe seeds extracts from two white grape varieties submitted to postharvest sun drying, Pedro Ximénez and Moscatel, as alternative copigments sources to stabilize grape anthocyanins
- To assess the feasibility of Dispersive Raman Spectroscopy with excitation at 1064 nm to valorize the overripe seeds byproducts obtained from sun-dried grapes, by knowing their phenolic composition according to the grape variety (Moscatel, Pedro Ximénez and Zalema).



Materialles y Métodos

1. MUESTRAS

Para realizar los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral se emplearon muestras de diferentes tipos. A modo de resumen, destacar que se elaboraron 15 vinos, de los que se analizaron un total de 69 muestras. Como fuente de fenoles para las vinificaciones se emplearon semillas sobremaduras de una variedad de uva blanca, lo que supuso un total de 3 muestras de semillas analizadas.

Asimismo, se realizaron ensayos en disoluciones modelo, para lo cual se utilizaron disoluciones de antocianos y extractos fenólicos de dos variedades de semillas, por lo que, en total fueron 6 extractos preparados y analizados y 21 disoluciones analizadas. Estas muestras se analizaron por diferentes técnicas.

Los detalles de estas muestras se describen en este apartado.

1.1. Semillas sobremaduras

Las semillas de uva blanca utilizadas en los diferentes ensayos que componen esta Tesis Doctoral se obtuvieron, principalmente, a partir de subproductos de vinificación proporcionados por diversas bodegas localizadas en zonas vitivinícolas de Andalucía. Las características de estas semillas fueron las siguientes:

- **semillas** de variedad **Pedro Ximénez**, obtenidas a partir de **orujos de uvas sobremaduras (24 °Bé)** proporcionados por la Bodega La Aurora S.C.A (Montilla, Córdoba), perteneciente a la DOC Montilla-Moriles, generados en la elaboración del vino dulce típico de esta región, en las campañas 2014 y 2016.
- **semillas** de variedad **Moscatel**, obtenidas a partir de **orujos de uvas sobremaduras (24 °Bé)**, proporcionados por la Bodega Málaga Virgen S.L (Fuente de Piedra, Málaga), perteneciente a la DOC Málaga, generados en la elaboración de los vinos naturalmente dulces de esta DOC, en la campaña 2016.
- **semillas** de variedad **Zalema**, obtenidas a partir de **orujos de vinificación en blanco (10 °Bé)**, proporcionadas por la Cooperativa Vitivinícola Nuestra Señora del Socorro (Rociana del Condado, Huelva), perteneciente a la DOC Condado de Huelva, en la campaña 2016.

En el caso de las variedades Moscatel y Pedro Ximénez, las semillas se separaron del resto de partes sólidas del orujo (hollejos y raspón) utilizando, consecutivamente, dos tamices de plástico de tamaño de luz de 4.5 x 4.5 mm y 2 x 2 mm, se limpiaron con agua sulfitada (1000 mg metabisulfito sódico/L) y se secaron cuidadosamente. Las

semillas de Zalema se obtuvieron directamente de las uvas maduras, previo a ser sometidas a la acción del sol durante 16 días, en un proceso de exposición directa en pasera. Paralelamente, se tomaron racimos de uva y se sometieron a la misma acción directa del sol, comprobándose que alcanzaban una graduación de 27 °Bé.

Posteriormente, y en función de su destino, en unos casos las semillas se utilizaron en fresco en vinificaciones de la misma campaña de recolección, y en otros se congelaron para ser utilizadas en vinificaciones u otros ensayos en campañas posteriores.

1.2. Extractos fenólicos de las semillas sobremaduras

Las semillas de uva que constituyeron las muestras se sometieron a la extracción de su contenido fenólico para ser caracterizadas químicamente en función de la variedad o del grado de maduración, así como para su uso en ensayos modelo. Para ello, se liofilizaron, previa congelación a -80 °C y, posteriormente, se sometieron a molienda mediante sucesivas molturaciones (5x10 segundos) en un molino de pulverizado hasta obtener un polvo fino y homogéneo. A partir de este triturado de semilla, utilizando diferentes condiciones de extracción (tipo de disolvente, peso de muestra liofilizada, proporción de disolvente), se prepararon los extractos fenólicos utilizados en los ensayos. En concreto, se aplicaron los siguientes protocolos de extracción:

- Jara-Palacios et al. (2014b) (método usado en los Capítulos 1 y 4 de esta Memoria): 5 g de polvo de semillas liofilizadas se maceran con 25 mL de metanol al 75% (v/v) durante 1 hora en agitación. La mezcla se centrifuga 15 minutos a 4190 g y se recoge el sobrenadante. Para asegurar la completa extracción, esta operación se repite 2 veces más, se unifican los sobrenadantes y se elimina el metanol a vacío en concentrador. El concentrado se disuelve hasta un volumen fijo (50 mL) con agua y finalmente se pasa a través de un filtro de Nylon de 0.45 µm antes de su análisis.
- Jara-Palacios et al. (2014c) (método usado para los ensayos de copigmentación del Capítulo 3 de esta Memoria): 2 g de polvo de semilla liofilizada se maceran con 30 mL de vino sintético durante 12 horas en agitación. La mezcla se centrifuga 10 minutos a 4190 g. Se recoge el sobrenadante, se disuelve hasta un volumen fijo (50 mL) con vino sintético y se pasa a través de un filtro de Nylon de 0.45 µm.

Material

Instrumentos y equipos de laboratorio:

- Balanza analítica de precisión Mettler Toledo AE-260 (Barcelona, España)
- Liofilizador Cryodos-80, Telstar Varian DS 102 (Telstar Industrial, S.L., Barcelona, España)
- Molino IKA A11-B (IKA®, Staufen, Alemania)
- Centrífuga Allegra X-12R Centrifuge (Beckman Coulter, Barcelona, España)

- Concentrador Plus/Vacufuge Plus (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España)
- Agitador Vortex IKA Genios 3 (IKA®, Staufen, Alemania)
- Agitador orbital (VWR, Barcelona, España)
- pH-metro CRISON GLP 21 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España)
- Micropipetas (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España)
- Tubos Falcon
- Matraces aforados de 1 y 5 mL

Reactivos:

- Metanol 99.8% (v/v) (Panreac, Barcelona, España)
- Etanol 96% (v/v) (Panreac, Barcelona, España)
- Ácido tartárico (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de sodio (Panreac, Barcelona, España)
- Ácido clorhídrico 37% (v/v) (Panreac, Barcelona, España)
- Hidróxido de sodio (Panreac, Barcelona, España)

Preparación de vino sintético (12% de etanol, pH 3.60):

Disolver 5 g de ácido tartárico en 120 mL de etanol (96 %) en matraz de 1 L y enrasar con agua destilada. Ajustar el pH a 3.60 añadiendo ácido clorhídrico 0.5 M o hidróxido sódico 0.1 M. Ajustar la fuerza iónica con 11.68 g de cloruro sódico (0.2 mol/L, PM= 58.44). Confirmar el pH.

1.3. Vinos

Los ensayos se realizaron sobre vinos monovarietales, para cuya elaboración se utilizaron uvas de la variedad tinta Syrah, vendimiadas en su estado óptimo de madurez glucoacídica (tecnológica). Todas las vinificaciones (campañas 2015 y 2016) se realizaron a escala semi-industrial, en la bodega experimental que el grupo de investigación Color y Calidad de Alimentos de la Universidad de Sevilla, tiene ubicada en las instalaciones de la Cooperativa Nuestra Señora del Socorro, en Rociana del Condado (Huelva).

Tanto la uva Syrah utilizada como la bodega donde se elaboraron los vinos para los ensayos pertenecen a la Denominación de Origen Condado de Huelva. El grupo de investigación "Color y Calidad de Alimentos" mantiene una relación contractual (arts. 68 y 83 L.O.U.) desde 1993 con este Consejo Regulador, con el que también colabora en diversos trabajos de investigación sobre la mejora de la calidad de los vinos de esta denominación de origen, cubriendo, hasta la fecha, una buena parte de las etapas de la producción y elaboración de vinos que ha tenido una importante repercusión en la zona, como la implantación de nuevas técnicas o modificación sustancial de las actuales, y avances en la metodología de control enológico por medidas rápidas, objetivas y no destructivas.

En la elaboración de los vinos para los diferentes estudios se siguieron pautas enológicas comunes, con las diferencias específicas que definieron cada uno de los

ensayos. Así, de manera general, una vez despalilladas y estrujadas, las uvas se encubaron en depósitos de PVC, de 220 litros para realizar la fermentación, en todos los casos, los vinos se elaboraron por triplicado. La fermentación alcohólica se produjo, en unos casos espontáneamente con levaduras autóctonas y en otros por adición de levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae*, realizándose un remontado diario durante esta etapa (entre 6 y 7 días). Tras la fermentación, se realizó el descubado del vino, con separación de las partes sólidas de la uva. El vino se trasegó a depósitos de acero inoxidable de 50 L, procurando un contenido homogéneo, posteriormente se realizó la fermentación maloláctica inoculando bacterias lácticas *Oenococcus oeni* en una concentración de 14 mL/hL. Al finalizar esta etapa, se realizó un segundo trasiego de los vinos a depósitos de acero inoxidable de 50 litros, ajustando los niveles de SO₂ libre y total a 60 y 100 mg/L, respectivamente, donde se mantuvieron durante el correspondiente periodo de estabilización.

- En la elaboración de los vinos tintos para el estudio **de adición prefermentativa de semillas sobremaduras Pedro Ximénez** (Capítulo 1 de esta Memoria) se utilizaron, aproximadamente, 900 kg de uvas tintas de la variedad Syrah, con las que se obtuvieron 2 tipos de vinos, por triplicado: un vino control y un vino con adición de semillas sobremaduras (3 g/L). Para este ensayo se utilizaron semillas obtenidas en la vendimia anterior, que se conservaron en congelación a -20°C hasta su uso.

La fermentación se realizó espontáneamente y, una vez acabada, el vino se descubó a 9 depósitos de acero inoxidable más pequeños. Los vinos permanecieron en estos depósitos durante un periodo de 5 meses de estabilización, tras el cual se embotellaron y se pasaron otros 5 meses de estabilización en botella. Durante todo el proceso se tomaron muestras (100 mL) para el seguimiento analítico: al inicio de la maceración fermentativa (día 1 desde el encubado), a mitad de la fermentación alcohólica (día 4 desde el encubado), en el momento después del descube (día 7 desde el encubado) y muestras durante el periodo de estabilización y envejecimiento en botella (días 20, 135, 225 y 315 desde el encubado). En total se midieron 42 muestras.

- Para el ensayo de **adición postfermentativa de semillas sobremaduras Pedro Ximénez** (Capítulo 2 de esta Memoria) se utilizaron 900 kg de uva con las que se elaboraron 6 vinos monovarietales Syrah.

La fermentación se realizó con levaduras seleccionadas (25 g/L *Saccharomyces cerevisiae*), tras lo cual, el vino limpio pasó a 9 depósitos de acero inoxidable más pequeños para obtener 3 tipos de vinos, por triplicado: un vino control, un vino con

adición de semillas sobremaduras (12 g/L) durante 30 días y un vino con adición de semillas sobremaduras (12 g/L) durante 30 días más una segunda adición de semillas sobremaduras (12 g/L) durante 30 días. Para este ensayo se utilizaron semillas frescas, obtenidas en la misma vendimia.

Tras este proceso, los vinos sufrieron un nuevo trasiego a depósitos de acero inoxidable de 50 L, donde se mantuvieron durante 150 días de estabilización, contados desde la primera adición postfermentativa de las semillas sobremaduras. Se tomaron muestras (50 mL) en 4 puntos del proceso: inicial (día 0, adición de semillas), al retirar las semillas (día 30 para SW y 60 para DW) y al final del periodo de estabilización (día 150). En total se analizaron 27 muestras.

Material y productos

- Depósitos de PVC de 220 litros (In Vía, Barcelona, España) para fermentación.
- Depósitos de acero inoxidable 50 L (In Vía, Barcelona, España) para estabilización.
- Bomba Novax 30M (Rover Pompe SNC, Polverara, Italia)
- Levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Viniferm BY, Agrovin, Ciudad Real, España)
- Bacterias lácticas *Oenococcus oeni* (VINIFERM Oe 104, Agrovin, Ciudad Real, España)

1.4. Disoluciones modelo

Los ensayos de copigmentación se llevaron a cabo en sistemas modelo, mediante mezclas de una disolución antociánica con diferentes extractos fenólicos procedentes de 2 variedades de semillas sobremaduras: Pedro Ximénez y Moscatel. Para este ensayo se utilizaron semillas obtenidas en la vendimia anterior, que se conservaron en congelación a -20°C hasta su uso.

La disolución de antocianos se preparó a partir de hollejos de uva tinta comerciales liofilizados y molidos, que se disolvieron en vino sintético (12% de etanol, pH 3.60). A esta disolución antociánica se añadieron los extractos procedentes de las semillas para obtener diferentes concentraciones de compuestos fenólicos (100, 200 y 400 mg/L). En todos los casos, la concentración final de antocianos en la disolución modelo fue la misma (50 mg/L). Todas las disoluciones se prepararon por triplicado en viales de vidrio de 5 mL, y se almacenaron en oscuridad a 25 °C durante 2 horas para asegurar que se alcanzara el equilibrio antes de tomar la primera medida espectrofotométrica.

Las disoluciones preparadas se guardaron en ausencia de luz durante 90 días, realizándose 8 muestreos a lo largo de este periodo: a las 2 horas y en los días 1, 6, 13, 20, 34, 56, y 90 desde el comienzo de la reacción.

MaterialInstrumentos y equipos de laboratorio:

- Viales vidrio de 5 mL
- pH-metro CRISON GLP 21 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España)
- Micropipetas (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España)

Reactivos:

- Etanol 96% (v/v) (Panreac, Barcelona, España)
- Acido tartárico (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de sodio (Panreac, Barcelona, España)
- Ácido clorhídrico 37% (v/v) (Panreac, Barcelona, España)
- Hidróxido de sodio (Panreac, Barcelona, España)
- Antocianos de uva tinta (IFC Solutions, New Jersey, USA)

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS**2.1. Parámetros físico-químicos**

En el seguimiento y control enológico de las muestras de mosto y vino se aplicaron técnicas de análisis fisicoquímico general (densidad, azúcares reductores, acidez total, pH, anhídrido sulfuroso total y libre, acidez volátil y fenoles totales). Todos los análisis se realizaron por triplicado, expresando el resultado como la media aritmética y desviación estándar.

2.1.1. Densidad relativa (CEE, 1990; OIV, 1990)

La densidad relativa de un mosto o un vino a 20 °C ($d_{20}^{\circ C}$) es la relación entre su masa volúmica y la del agua a esa misma temperatura. La medida directa de la densidad relativa se realizó por el método aerométrico, basado en la flotabilidad que presenta un cuerpo de peso constante. Para ello, se utilizó un densímetro o aerómetro (el usado en enología se denomina mostómetro) formado por un cuerpo cilíndrico central hueco, de vidrio, con un bulbo en su extremo inferior que contiene un material pesado (generalmente plomo) que le permite flotar en posición vertical, y una escala en el extremo superior, graduada en unidades de masa volúmica a 20 °C.

Mediante la correspondiente conversión del valor de la densidad relativa, empleando tablas específicas, se pudo conocer la cantidad de azúcares totales existentes en el mosto o el vino, expresada en grados Baumé (°Bé) o g/L.

MaterialInstrumentos y equipos de laboratorio:

- Probeta 250 mL
- Mostómetro PROTON 10119, GAB SISTEMATICA ANALITICA SL (Barcelona, España), calibrado a 20 °C, escala densidad: 0.999-1.130

- Termómetro OPAL -10+35 °C, con apreciación de 0.5 °C, GAB Sistemática Analítica SL (Barcelona, España)

Procedimiento analítico

Llenar una probeta de 250 mL con mosto o vino. Introducir el termómetro en la probeta y realizar la lectura al cabo de 1 minuto. Retirar el termómetro e introducir el mostómetro en la probeta, con un movimiento giratorio y dejar reposar. Una vez en reposo, leer en la escala la densidad.

En caso de que la muestra contenga cantidades importantes de CO₂, se debe eliminar por agitación o ultrasonidos, antes de realizar la medida de la densidad.

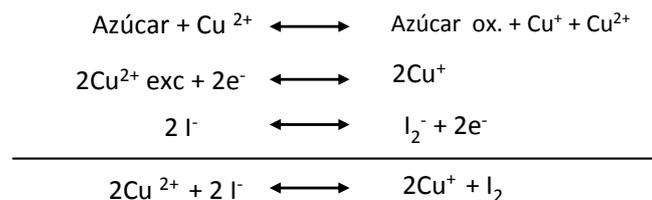
Cálculos

Realizar la medida por triplicado para considerar la media aritmética como resultado. Utilizar las tablas específicas de conversión para la transformación del dato de densidad en grados Baumé o g/L de azúcares totales.

2.1.2. Azúcares reductores (Rebelein, 1973; CEE, 1990; OIV, 1990)

Este análisis se realizó con el objetivo de conocer la concentración residual de azúcares que presentaron los vinos para determinar el final de la fermentación alcohólica. En términos generales, se considera que un contenido en azúcares reductores ≤ 2 g/L es indicativo de que la fermentación alcohólica ha finalizado.

El fundamento del método de Rebelein (1973) se basa en las propiedades reductoras de glucosa y fructosa sobre las sales cúpricas. Estos azúcares, a la temperatura de ebullición, son oxidados por un exceso de solución alcalina de Cu²⁺ que contiene tartrato para mantener el metal en solución, al tiempo que el Cu²⁺ se reduce a Cu⁺. El exceso de Cu²⁺ se valora por yodometría, con adición de un exceso de KI en medio ácido. Las reacciones que tiene lugar son las siguientes:



Material

Instrumentos y equipos de laboratorio:

- Balanza analítica de precisión METTLER TOLEDO AE-260 (Barcelona, España)
- Placa calefactora Agimatic (Selecta, Barcelona, España)
- Matraz aforado 100 mL
- Erlenmeyer de 50, 100, y 250 mL
- Bureta graduada de 50 mL
- Pipetas graduadas de 0.5, 2, 5, 10 mL

Reactivos:

- Acetato neutro de plomo (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Carbonato de sodio (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Hidróxido sódico 0.1M (Panreac, Barcelona, España)

- Carbonato de calcio (Panreac, Barcelona, España)
- Kit de REBELEIN VINIKIT (Panreac, Barcelona, España) (Disolución cupro-alkalina, 0.168 M y Disolución alcalina de potasio sodio tartrato, 0.886 M)
- Piedra pómez en gránulos QP
- Disolución de yoduro de potasio al 30% (p/v)
- Disolución de ácido sulfúrico al 16% (v/v)
- Disolución de almidón al 2% (v/v)
- Tiosulfato de sodio, solución 0.0551 M

Procedimiento analítico

Eliminación de polifenoles

Los polifenoles son compuestos reductores, y pueden alterar los resultados, por lo que se deben eliminar mediante defecación de la muestra: mezclar 50 mL de vino con 2.5 mL de una disolución al 50% de acetato de plomo (125 mg en 250 mL de agua destilada en caliente) y 0.5 g de carbonato sódico anhidro. Enrasar a 100 mL cuando enfríe y filtrar.

Análisis

Poner 10 mL de disolución cúprica en un Erlenmeyer, junto con 5 mL de disolución alcalina (potasio sodio tartrato) y 2 mL de la muestra a analizar. Añadir unos granos de piedra pómez para evitar salpicaduras, tapar con un vidrio de reloj y calentar en placa calefactora. Cuando haya hervido un minuto y medio exacto, apartar y esperar a que se enfríe. Añadir 10 mL de disolución de yoduro de potasio, 10 mL de almidón al 2% y 10 mL de ácido sulfúrico. Valorar la muestra con tiosulfato sódico, hasta coloración crema. Anotar el volumen de tiosulfato gastado (V'). Realizar el mismo procedimiento con 2 mL de agua destilada como un blanco de referencia (V).

Cálculos

Se calcula el contenido en azúcares reductores, expresados en g/L, según la siguiente expresión:

$$\text{Azúcares reductores (g/L)} = V - V'$$

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

La acidez total es la suma de los ácidos valorables cuando se lleva el pH a 7.00 añadiendo una disolución alcalina valorada. Se determinó, por tanto, mediante una volumetría ácido-base con detección potenciométrica del punto final.

Los ácidos más frecuentes del vino son el tartárico, el málico y el láctico. Otros ácidos presentes, aunque de forma minoritaria, son el cítrico, acético, glucónico ascórbico y succínico. Debido a que, mayoritariamente, la acidez de los vinos se debe a este ácido orgánico y a sus sales ácidas, los resultados se expresan en g/L de ácido tartárico.

Material

Instrumentos y equipos de laboratorio:

- Bureta graduada de 50 mL
- Pipeta graduada de 10 mL
- Vaso de precipitado 50 mL
- pH-metro CRISON GLP 21 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España)
- Electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl

Reactivos:

- Disolución tampón de pH 4.00 (Merck, Darmstadt, Alemania)

- Disolución tampón de pH 7.00 (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Disolución para mantener el electrodo del pH-metro (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Disolución de hidróxido sódico 0.1 M (Panreac, Barcelona, España)

Procedimiento analítico

Calibrar el pH-metro con las disoluciones tampón de pH 4.00 y 7.00. Una vez estandarizado, introducir el electrodo en un vaso de precipitado que contiene 10 mL (V') de mosto o vino al que previamente, bajo agitación, se le habrá eliminado el dióxido de carbono. Desde la bureta, previamente enrasada, se van añadiendo gotas de la disolución de hidróxido sódico 0.1 M, agitando constantemente la muestra, hasta que el pH-metro marque el valor de 7.00. Anotar el volumen de hidróxido sódico 0.1 M gastado en la valoración (V). (Ácido tartárico: Peso molecular Pm=150.09, valencia=2)

Cálculos

Se calcula la acidez total, expresada en g/L de ácido tartárico según la siguiente expresión:

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

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

El pH de los vinos se determinó mediante pH-metro. El fundamento de esta medida se basa en la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en la muestra. Uno de los electrodos posee un potencial definido en función de la actividad del ion hidrógeno de la muestra. El otro constituye el electrodo de referencia, por lo que su potencial es fijo y conocido. El error del método es inferior a 0.05 u.

Material

Instrumentos y equipos de laboratorio:

- pH-metro CRISON GLP 21 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España)
- Electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl

Reactivos:

- Disolución tampón de pH 4.00 (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Disolución tampón de pH 7.00 (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Disolución para mantener el electrodo del pH-metro (Merck, Darmstadt, Alemania)

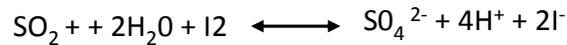
Procedimiento analítico

Calibrar el pH-metro con las disoluciones tampón de pH 7.0 y 4.0. Una vez calibrado, realizar la medida del pH sumergiendo el electrodo en el vino durante unos 15 segundos a una temperatura lo más cercana a 20 °C, ya que el pH está influenciado por la temperatura. La lectura del pH es directa y se expresa con dos decimales. Efectuar 3 determinaciones de cada muestra, tomando como resultado la media aritmética.

2.1.5. Anhídrido sulfuroso libre y total (CEE, 1990; OIV, 1990)

La medida del SO₂ libre y total se realizó mediante un analizador automático SO₂-Matic 23 (Crison, Barcelona, España). Este instrumento se basa en el método Ripper con determinación del punto de equivalencia mediante un electrodo de platino. El

fundamento del método Ripper es una volumetría de óxido-reducción con yodo (I_2) como reactivo valorante, en medio ácido, según la siguiente reacción:



En la determinación del anhídrido sulfuroso libre se acidula el vino para minimizar la oxidación de los fenoles por el yodo, y después se valora con yodo hasta el punto final. Para determinar el anhídrido sulfuroso total es necesario hidrolizar el sulfuroso de sus uniones mediante la adición de una base fuerte y después acidular y valorar directamente con yodo (Amerine y Ough, 1976).

Material

Instrumentos y equipos de laboratorio:

- Pipetas graduadas de 10 y 20 mL
- Analizador automático SO₂-Matic 23 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España)

Reactivos:

- Disolución acuosa de ácido sulfúrico 1/3 (v/v)
- Disolución de hidróxido sódico 1 M (Panreac, Barcelona, España)
- Disolución de yodo 0.02 M (Panreac, Barcelona, España)
- Yoduro de potasio (Panreac, Barcelona, España)

Procedimiento analítico

Determinación de dióxido de azufre libre y total

Encender el analizador automático SO₂-Matic 23, colocar 10 mL de muestra en los tubos del instrumento. Adicionar una pequeña cantidad de KI.

Mediante el uso del software, elegir el análisis a realizar y proceder a la valoración. La lectura del dióxido de azufre libre y total se realiza de forma directa. Efectuar 3 determinaciones de cada muestra, tomando como resultado la media aritmética.

2.1.6. Acidez volátil. Método García Tena (García, 1990; CEE, 1990; OIV, 1990)

La acidez volátil es el conjunto de ácidos orgánicos de la serie acética que se hallan en el vino, libres o combinados formando sales, siendo el mayoritario el ácido acético.

Para determinar la acidez volátil de los vinos se aplicó el método García Tena (1990), basado en la destilación fraccionada del vino y la posterior valoración ácido-base de la segunda fracción del destilado. Previamente, si lo hubiera, se debe eliminar el dióxido de carbono para evitar interferencias (Amerine y Ough, 1980).

La exactitud de los métodos basados en destilación directa no es absoluta, ya que es muy difícil conseguir destilar el 100% del contenido, en este caso, ácidos volátiles, y, además, no considera las posibles interferencias otras sustancias que pueden hallarse en el destilado como los ácidos láctico y sulfuroso. Sin embargo, esta metodología presenta como ventajas su sencillez y rapidez.

MaterialInstrumentos y equipos de laboratorio:

- Matraz de fondo redondo 50 mL
- Cuerpo refrigerante 120 mL
- Pipeta aforada de 11 mL
- Probetas aforadas de 5.1 y 3.2 mL
- Bureta graduada de 10 mL
- Matraz Erlenmeyer de 100 mL

Reactivos:

- Disolución de hidróxido sódico 0.02 M (Panreac, Barcelona, España)
- Disolución etanólica de fenolftaleína al 1% (Panreac, Barcelona, España)

Procedimiento analítico

Colocar en el matraz de destilación 11 mL de vino desprovisto de dióxido de carbono y conectar al aparato de destilación. A la salida del refrigerante, colocar una probeta de 5.1 mL y proceder a la destilación. Cuando el destilado alcanza el trazo superior de la probeta, sustituir por una de 3.2 mL, dándose por terminada la destilación cuando se alcanza ese volumen. Verter el destilado recogido en la probeta de 3.2 mL en un Erlenmeyer de 50 mL y valorar con la disolución de hidróxido sódico 0.02 M, en presencia de unas gotas de fenolftaleína 1%, hasta obtener un color ligeramente rosado (V mL de hidróxido sódico 0.02 M consumidos en la valoración).

Cálculos

La acidez volátil se expresa en g/L de ácido acético:

$$\text{Acidez volátil (g/L)} = 0.366 \times V$$

2.1.7. Fenoles Totales. Método de Folin-Ciocalteu (Amerine y Ough, 1976; AOAC, 1990)

El método de Folin y Ciocalteu (1927) es el recomendado en la actualidad (Amerine y Ough, 1976; AOAC, 1990) para la determinación de fenoles totales. Se basa en la reducción de los fenoles por una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, que conduce a una mezcla de óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y de óxido de molibdeno (Mo_8O_{23}), de color azul, que presenta un espectro con un máximo de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) a 765 nm, que es proporcional al contenido de compuestos fenólicos. A partir de la ecuación de la recta de calibrado se calcula la cantidad de fenoles totales presentes en la muestra, que se expresa en equivalentes de ácido gálico por litro (mg GAE/L).

MaterialInstrumentos y equipos de laboratorio:

- Espectrofotómetro UV-vis HP 8453 (Palo Alto, CA, USA)
- Cubeta de vidrio de 10 mm
- Micropipetas (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España)
- Matraces aforados de 25 y 100 mL
- Balanza analítica de precisión Mettler Toledo AE-260 (Barcelona, España)

Reactivos:

- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemania)

- Carbonato de sodio (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Ácido gálico (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Procedimiento analítico

Recta de calibrado

Patrón de ácido gálico (5 g/L): Pesar con exactitud 0.5 g de ác. gálico desecado, llevarlo a un matraz aforado de 100 mL y enrasar con agua destilada. A partir de esta disolución, preparar seis disoluciones patrón de 0, 50, 100, 150, 250 y 500 mg/L, respectivamente. Para ello, se vierten 0.25 mL de la disolución en matraz aforado de 25 mL, se añaden unos 15 mL de agua destilada a cada uno y se agita, se añaden 1.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se mezcla bien, se añaden 3.75 mL de carbonato sódico al 20%, se mezcla todo, se enrasa con agua destilada y se dejan reposar durante 2 horas a 24 °C. Posteriormente, para cada disolución patrón, se mide la absorbancia a 765 nm y en cubetas de vidrio de 10 mm, frente al blanco (agua destilada). La recta de calibrado se obtiene representando la absorbancia frente a la concentración.

Análisis de la muestra

Realizar el mismo procedimiento anterior, tomando 0.25 mL de la muestra de mosto o vino, y medir la absorbancia a 765 nm.

Cálculos

Llevar el valor de A_{765} obtenido a la recta de calibrado y calcular la concentración de fenoles totales, expresada en mg de ácido gálico por litro a partir de la ecuación de la recta.

2.2. Análisis cromatográfico

2.2.1. Determinación de pigmentos antociánicos mayoritarios y flavonoles por HPLC-DAD

La separación, identificación y cuantificación de los pigmentos antociánicos mayoritarios y flavonoles en las muestras (Capítulos 1 y 2 de esta Memoria) se llevó a cabo según el método descrito por Cejudo-Bastante et al. (2016). Se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), 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 (250 x 4.6 mm de diámetro interno, 5 μ m de tamaño partícula). Las fases móviles utilizadas y las condiciones cromatográficas empleadas para conseguir la separación de los distintos compuestos se muestra en la Tabla 4.

La identificación de los antocianos y flavonoles se realizaron por comparación de los tiempos de retención y espectros de absorción UV-visible, así como por comparación con datos de la bibliografía obtenidos a través de técnicas cromatográficas con detección por espectrometría de masas (Cejudo-Bastante et al., 2016).

Los espectros se registraron entre 200 y 800 nm, y 2 nm de ancho de banda. Las longitudes de onda para la cuantificación fueron 525 nm para antocianos y 360 nm para flavonoles. La falta de disponibilidad de patrones puros comerciales y la dificultad

para aislarlos y purificarlos en el laboratorio, hizo que el procedimiento más extendido para los compuestos antociánicos en vinos tintos fuera cuantificarlos como malvidina-3-O-glucósido, antociano mayoritario en los tintos, usado como patrón externo. Asimismo, los flavonoles se cuantificaron como quercetina. La concentración de los compuestos fenólicos se expresó en mg/L.

Tabla 4. Condiciones del análisis cromatográfico

Fase móvil A	Acetonitrilo/ácido fórmico/agua (3:10:87 v:v:v)	
Fase móvil B	Acetonitrilo/ácido fórmico /agua (50:10:40 v:v:v)	
Temperatura	40 °C	
Flujo	0.63 mL/min	
Volumen inj.	50 µL	
Gradiente	Fase móvil A	Fase móvil B
0-10 min	94%	6%
10-15 min	89%	11%
15-20 min	80%	20%
20-25 min	77%	23%
25-30 min	74%	26%
30-35 min	60%	40%
35-38 min	50%	50%
38-46 min	40%	60%
46-47 min	94%	6%

Material

Instrumentos y equipos de laboratorio:

- Cromatógrafo líquido HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA): bomba cuaternaria (G1311A), desgasificador de vacío (G1322A), compartimento termostatzado para la columna (G1330B), inyector automático (G1329A), detector de diodos (G1315D) y Software ChemStation
- Columna Zorbax SB-C18 (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)
- Balanza analítica de precisión Mettler Toledo AE-260 (Barcelona, España)
- Equipo de filtración para fases móviles Millipore (Billerica, MA, USA)
- Filtros para fases móviles HN-0.45 µm Millipore (Billerica, MA, USA)
- Filtros de jeringa de nylon 13 mm x 0.45 µm Millipore (Billerica, MA, USA)
- Microviales 2 mL de Agilent Technologies
- Micropipetas (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España)

Reactivos:

- Acetonitrilo calidad HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido fórmico 98% (v/v) (Panreac, Barcelona, España)
- Malvidina-3-O-glucósido (Extrasynthese, Lyon, Francia)
- Quercetina (Sigma-Aldrich, Madrid, España)

Procedimiento analíticoRectas de calibrado

Antocianos: Disolución patrón de malvidina-3-*O*-glucósido (500 mg/L): Pesar con exactitud 0.05 g de malvidina-3-*O*-glucósido, llevarlo a un matraz aforado de 100 mL y enrasar con agua ácida (ajustando el pH a 1.5 con HCl). A partir de esta disolución, preparar disoluciones patrón de 10, 25, 50, 100, 200, 350 y 500 mg/L, y analizar mediante HPLC, por triplicado. Obtener la recta de calibrado representando el área de cada disolución patrón frente a su concentración.

Flavonoles: Disolución patrón de quercetina (1 g/L): Pesar con exactitud 0.1 g de patrón de quercetina, llevarlo a un matraz aforado de 100 mL y enrasar con la fase móvil A. A partir de esta disolución, preparar disoluciones patrón de 0, 20, 30, 40, 50, 60, y 70 mg/L, y analizar mediante HPLC, por triplicado. Obtener la recta de calibrado representando el área de cada disolución patrón frente a su concentración.

Análisis de la muestra

Filtrar la muestra de vino por filtros de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro y analizar mediante HPLC.

Cálculos

Llevar el valor de área obtenido en el análisis cromatográfico a la recta de calibrado y calcular la concentración de los pigmentos antociánicos y flavonoles, expresada en mg/L

2.2.2. Determinación de pigmentos antociánicos y derivados por HPLC-DAD-MS

La determinación de la composición de antocianos y pigmentos derivados en el ensayo con disoluciones modelo (Capítulo 3) se llevó a cabo en colaboración con el Grupo de Investigación en Polifenoles de la Universidad de Salamanca.

La separación e identificación de los antocianos y pigmentos antociánicos derivados se llevó a cabo según el método descrito por Alcalde-Eon et al. (2014). Se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado a espectrómetro de Masas API 3200 Qtrap (Applied Biosystems Sciex, Darmstadt, Alemania), equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI), un analizador de masas triple cuádruplo, y un software Analyst 5.1 para el tratamiento de datos. Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa AQUA C18 de 150 x 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 μm (Phenomenex®, Torrance, CA, USA). Las fases móviles utilizadas y las condiciones cromatográficas empleadas para conseguir la separación de los distintos compuestos se muestra en la Tabla 5.

Las muestras se diluyeron (1/5) en agua ácida (ajustando el pH a 1 con HCl, y se pasaron a través de filtros de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro.

Los espectros se registraron entre 220 y 600 nm, con detección de antocianos a 520 nm. Se adquirieron los espectros en modo de ion positivo entre 150 y 1100 m/z. El espectrómetro de masas fue programado para hacer una serie de barridos

consecutivos: uno del espectro total de masas (*full mass*), otro correspondiente al espectro total de masas generado tras la ruptura del ion mayoritario del primer barrido (MS^2), y el tercero correspondiente al espectro de masas generado tras la ruptura del fragmento mayoritario obtenido en el MS^2 (MS^3).

Tabla 5. Condiciones del análisis cromatográfico

Fase móvil A	Agua / ácido trifluoroacético (99.9: 0.1 v:v)
Fase móvil B	Acetonitrilo
Temperatura	35 °C
Flujo	0.5 mL/min

Material

Instrumentos y equipos de laboratorio:

- Cromatógrafo líquido HPLC Agilent Technologies HP 1100 (Palo Alto, CA, USA)
- API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania)
- Columna AQUA C18 (5µm, 150 mm×4.6mm) Phenomenex (Torrance, CA, USA)
- Software Analyst 5.1
- Filtros de jeringa de nylon 13 mm x 0.45 µm Millipore (Billerica, MA, USA)
- Microviales 2 mL de Agilent Technologies
- Micropipetas (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España)

Reactivos:

- Acetonitrilo calidad HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido tricloroacético (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Agua Milli-Q

2.2.3. Determinación de flavan-3-oles y ácidos fenólicos mediante RRLC-DAD

La separación, identificación y cuantificación de flavanoles (monoméricos, procianidinas y oligoméricos) y ácidos fenólicos (benzoicos e hidroxicinámicos) en las muestras (Capítulos 1, 2, 3 y 4 de esta Memoria) se llevó a cabo según el método descrito por Jara Palacios et al. (2014b).

Para ello se utilizó un cromatógrafo líquido de resolución rápida (RRLC) Agilent 1290 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), 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 Poroshell C18 (2.7 µm, 5 cm x 4.6 mm). Las fases móviles y las condiciones cromatográficas empleadas se muestra en la Tabla 6.

Previo al análisis cromatográfico, las muestras se pasaron a través de filtros de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro.

La identificación de los compuestos individuales se realizó por comparación con los tiempos de retención y los espectros de absorción UV-visible de patrones comerciales, así como por comparación con datos bibliográficos obtenidos a través de técnicas cromatográficas con detección por espectrometría de masas (Jara-Palacios et al., 2014b).

La cuantificación de los ácidos benzoicos, flavanoles monoméricos, procianidinas, y flavanoles oligoméricos se realizó a 280 nm, y la de ácidos cinámicos y sus derivados a 320 nm, mediante el método de calibración externa, usando diferentes patrones fenólicos (catequina, procianidinas B1 y B2, ácidos gálico y *p*-cumárico), y expresando los resultados en mg/L para vinos y en mg/100 gramos de materia seca en semillas.

La catequina se utilizó como patrón para cuantificar los flavanoles monoméricos y procianidinas de los vinos y semillas del ensayo desarrollado en el Capítulo 1 de esta Memoria.

Por otra parte, patrones de catequina y de procianidinas B1 y B2 se utilizaron respectivamente para cuantificar los flavanoles monoméricos y las procianidinas presentes en los vinos y semillas de los ensayos desarrollados en los Capítulos 2, 3 y 4 de esta Memoria.

Tabla 6. Condiciones del análisis cromatográfico

Fase móvil A	Agua / ácido fórmico (99.9: 0.1 v:v)	
Fase móvil B	Acetonitrilo	
Temperatura	25 °C	
Flujo	1.5 mL/min	
Volumen inj.	0.5 µL	
Gradiente	Fase móvil A	Fase móvil B
0-5 min	95%	5%
5-20 min	50%	50%
20-25 min	100%	0%

Material

Instrumentos y equipos de laboratorio:

- Cromatógrafo líquido UPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA): bomba cuaternaria (G4204A), desgasificador de vacío (G1316C), compartimento termostatzado para columna (G1330B), inyector automático (G4226A), detector de diodos (G4212A), ChemStation
- Columna C18 Poroshell 120 (2.7µm, 5cm×4.6mm) Agilent (Palo Alto, CA, USA)
- Balanza analítica de precisión METTLER TOLEDO AE-260 (Barcelona, España)
- Equipo de filtración para fases móviles Millipore (Billerica, MA, USA)

- Filtros HN-0.45 μm Millipore (Billerica, MA, USA)
- Filtros de jeringa de nylon 13 mm x 0.45 μm Millipore (Billerica, MA, USA)
- Microviales 2 mL Agilent Technologies
- Micropipetas (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España)

Reactivos:

- Acetonitrilo calidad HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido fórmico 98% (v7v) (Panreac, Barcelona, España)
- Patrones fenólicos individuales (Extrasynese, SIGMA y Fluka)
- Agua Milli-Q

Procedimiento analítico

Recta de calibrado

Como ejemplo representativo de la recta de calibrado de los distintos patrones fenólicos, se muestra el procedimiento correspondiente a la catequina.

Disolución madre de catequina (1 g/L): Pesar con exactitud 0.1 g de patrón de catequina, llevarlo a un matraz aforado de 100 mL y enrasar con la fase móvil A.

A partir de la disolución madre, preparar 5 disoluciones patrón de 0, 5, 10, 20, y 100 mg/L, y analizar mediante UPLC, por triplicado.

Análisis de la muestra

Filtrar la muestra de extracto de semilla/ vino mediante filtros de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro y analizar mediante UPLC.

Cálculos

Llevar el valor de área obtenido en el análisis cromatográfico a la recta de calibrado y calcular la concentración de los fenoles, expresada en mg/L.

2.3. Medida del color por Colorimetría Triestímulo. Espacio CIELAB.

La medida del color se realizó por aplicación de la Colorimetría Triestímulo, a partir del espectro de transmisión en el rango visible (380-770 nm). Para registrar los espectros se utilizó un espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), con detector de fotodiodos.

Material

Instrumentos y equipos de laboratorio:

- Espectrofotómetro UV-vis Agilent 8453 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).
- Conjunto filtración Millipore (Billerica, MA, USA): jeringa, portafiltro y filtros AP20 13 mm.
- Cubetas de vidrio de 2 y 10 mm de paso de luz.
- Centrífuga Orto Alresa (Madrid, España).
- Tubos de centrífuga.
- Micropipetas (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España)

Procedimiento analítico

Antes de realizar la medida de color en vino es necesario centrifugarlo durante 5 minutos en centrífuga a 3500 rpm, y filtrar el sobrenadante a través de un filtro Millipore AP20. Para muestras con carbónico es necesario desgasificar en baño de ultrasonido para eliminar burbujas que interfieren en la medida.

Medida espectrofotométrica: llenar una cubeta de vidrio de 2 mm de paso de luz para vino o 10 mm de paso de luz para soluciones modelo con la muestra filtrada. Registrar el espectro de

absorción en la región visible (380-780 nm), a intervalos constantes de 2 nm, utilizando agua destilada como blanco de referencia.

Cálculos

Se ha considerado el espacio uniforme CIE 1976-(L*a*b*) (CIELAB). Para su cálculo, los espectros se integran utilizando el programa de cálculo original CromaLab® (Heredia et al., 2004), que tiene en cuenta las recomendaciones de la Comisión Internacional de Iluminación (CIE, 2004). Aplicando el método de ordenadas ponderadas, el espectro de transmisión visible de la muestra se pondera en intervalos constantes de 2 nm, según los factores característicos de las condiciones visuales de referencia elegidas (Wyszecki y Stiles, 1982): Observador patrón de 10° e Iluminante estándar D65, que se corresponde con la luz de día natural.

Mediante las ecuaciones propuestas por la CIE, se obtienen los valores triestímulo X, Y, Z, que definen el color de la muestra y que son el punto de partida para calcular el resto de las variables cromáticas del espacio de color CIELAB (L*, a*, b*, C*_{ab}, y h_{ab}) y el parámetro colorimétrico diferencia de color ΔE*_{ab}.

La coordenada L* recibe el nombre de *claridad* y puede tomar valores entre 0, correspondiente al negro, y 100, para el blanco. Las coordenadas colorimétricas a* y b* forman un plano perpendicular a la claridad. La *coordenada a** define la desviación del punto acromático correspondiente a la claridad, hacia el rojo si a* > 0, hacia el verde si a* < 0. Análogamente la *coordenada b** define la desviación hacia el amarillo si b* > 0, hacia el azul si b* < 0. A partir de ellas se definen dos magnitudes colorimétricas nuevas mediante las expresiones siguientes:

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad h_{ab} = \arctg(b^*/a^*)$$

El *croma*, C*_{ab}, es el atributo de la percepción visual conforme al que un área parece saturada respecto a un determinado color o tonalidad. Tiene valor 0 para estímulos acromáticos y, por lo general, no pasa de 150 aunque puede superar ese valor para estímulos monocromáticos. El *tono*, h_{ab}, es el color básico de un objeto (azul, amarillo, etc.) definido por su posición angular en un espacio de color cilíndrico. Los valores, por tanto, varían entre 0° y 360°, y para estímulos no cromáticos (a*=0, b*=0) es una magnitud no definida.

El parámetro colorimétrico *diferencia de color* (ΔE*_{ab}), se calcula como la distancia Euclídea entre dos puntos en el espacio tridimensional definido por L*, a*, y b*: ΔE*_{ab} = ((a*)² + (b*)²)^{1/2}.

2.4. Medida de la copigmentación

2.4.1. Medida por espectrofotometría

El método espectrofotométrico para la evaluación del efecto de la copigmentación considera las diferencias de absorbancia que se producen a 520 nm.

Material

Instrumentos y equipos de laboratorio:

- Espectrofotómetro UV-vis Agilent 8453 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).
- Cubetas de vidrio de 2 mm y 10 mm de paso de luz.
- Conjunto filtración Millipore (Billerica, MA, USA): jeringa, portafiltro y filtros AP20 13 mm
- pH-metro CRISON GLP 21 con electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España)
- Balanza analítica ST-510 (Gram Precision, Barcelona, España)
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
- Vaso precipitado 50 mL
- Matraz aforado de 1 L

- Micropipetas (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España)
- Viales de 5 mL

Reactivos:

- Disolución hidróxido sódico 0.1 M (Panreac, Barcelona, España)
- Disolución ácido clorhídrico 0.5N (Panreac, Barcelona, España)
- Disolución tampón de pH 4.00 (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Disolución tampón de pH 7.00 (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Disolución de mantenimiento del electrodo del pH-metro (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Metabisulfito de sodio (Panreac, Barcelona, España)
- Acetaldehído puro (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Disolución acuosa de acetaldehído al 10% (v/v)
- Acido tartárico (L+) PRS (Panreac, Barcelona, España)
- Etanol 96% (v/v) (Panreac, Barcelona, España)
- Cloruro Sódico (Merck, Darmstadt, Alemania)

Vinos: se determinó la contribución de antocianos libres, copigmentados y pigmentos poliméricos al color total (Boulton, 1996).

Procedimiento analítico

Ajuste del pH del vino

Calibrar el pH-metro con las disoluciones tampón de pH 7.0 y 4.0. Una vez calibrado, tomar un volumen aproximado de 20 mL de vino y ajustar el pH a 3.6 unidades, añadiendo gota a gota ácido clorhídrico 0.5 M o hidróxido sódico 0.1 M.

Preparación de reactivos:

Metabisulfito sódico al 20% (m/v): Disolver 2 g de metabisulfito sódico (también puede utilizarse metabisulfito potásico) en 100 mL de agua destilada.

Acetaldehído al 10% (v/v): Disolver 2.55 mL de acetaldehído puro en 18 mL de agua destilada.

Tratamiento con metabisulfito sódico al 20%

Llenar una cubeta de vidrio de 2 mm con la muestra de vino (pH 3.60), aproximadamente 0.5 mL, y añadir 10 µL de metabisulfito sódico al 20%. Agitar la cubeta, esperar 1 minuto y medir la absorbancia a 520 nm (A_{520-S}) por espectrofotometría.

Tratamiento con acetaldehído al 10%

Tomar 2 mL de muestra de vino (pH 3.60) y añadir 20 µL de acetaldehído al 10%. Mantener 45 minutos a 25 °C en un vial cerrado, filtrar la muestra y medir la absorbancia a 520 nm (A_{520-A}) por espectrofotometría.

Tratamiento de dilución con vino sintético

Tomar 100 µL de vino (pH 3.60) y diluir con 1900 µL de vino sintético. Mantener a 25 °C durante 45 minutos en un vial cerrado y medir la absorbancia a 520 nm (A_{520-D}).

Cálculos

A partir de los valores de absorbancia a 520 nm medidos (A_{520-A} , A_{520-D} , y A_{520-S}) se calculan los siguientes índices: contribución de los antocianos copigmentados (%AC), pigmentos poliméricos (%PP), y antocianos libres (%AL) al color total del vino, según las siguientes expresiones:

$$\% AC = ((A_{520-A} - (A_{520-D} \times 20)) / A_{520-A}) \times 100$$

$$\% PP = (A_{520-S} / A_{520-A}) \times 100$$

$$\% AL = (A_{520-A} - (A_{520-S} + (A_{520-D} \times 20))) / A_{520-A} \times 100$$

Disoluciones modelo: se determinó la contribución de la copigmentación al color total en disoluciones de antocianos en vino sintético.

Procedimiento analítico

Medir la absorbancia a 520 nm (A_{520-nm}) de las disoluciones de antocianos con y sin copigmentos añadidos, usando cubeta de vidrio de 10 mm, frente a agua destilada como blanco de referencia.

Cálculos

La contribución de la copigmentación al color de la disolución de antociano (% copigmentación) se calculó por comparación de la absorbancia a 520 nm de la disolución del pigmento puro (A_0) y de sus correspondientes que contenían distintos copigmentos (A), según la siguiente expresión:

$$\% \text{ copigmentación} = (A - A_0 / A_0) \times 100$$

2.4.2. Medida por Colorimetría Diferencial

La evaluación por Colorimetría Diferencial considera los cambios espectrales en el intervalo completo de longitudes de onda visibles y, por tanto, describe la variación de color completa de manera correcta. La técnica permite medir con exactitud la diferencia de color (ΔE^*_{ab}) debida al fenómeno de la copigmentación y, además, interpretar el sentido de esta modificación en términos de variaciones de los atributos psicofísicos del color (tono, claridad y saturación).

Procedimiento analítico

Registrar el espectro visible completo (380-770 nm) de las muestras (vinos y disoluciones modelo), usando cubeta de vidrio de 2 o 10 mm, frente a agua destilada como blanco de referencia.

Cálculos colorimétricos

Según la metodología descrita por Gordillo et al. (2012), se aplica la Colorimetría Diferencial y se proponen distintas variables para la evaluación del efecto de la copigmentación.

Se define Color Total (E) como la diferencia ΔE^*_{ab} entre un color (L^* , a^* , b^*) y el blanco de referencia ($L^*=100$, $a^*=0$, $b^*=0$):

$$\text{Color Total: } E = ((L^* - 100)^2 + (a^* - 0)^2 + (b^* - 0)^2)^{1/2}$$

A partir de los espectros, se obtienen los valores de color total de las muestras con copigmentación (E_c) y sin ella (E_0). La comparación de la variación entre pares de muestras, expresada como porcentaje, permite cuantificar la magnitud en que ocurre el fenómeno de copigmentación desde un punto de vista colorimétrico:

$$\text{Magnitud de copigmentación colorimétrica} = ((E_c - E_0) / E_0) \times 100$$

2.5. Espectroscopia Raman

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona información química y estructural de prácticamente cualquier compuesto orgánico o inorgánico, de manera rápida y no destructiva, permitiendo su identificación. Se realiza directamente sobre la muestra a analizar, sin necesidad de tratamiento previo. Los

análisis Raman fueron realizados en colaboración con el Laboratorio de Sensores Fóticos del Instituto de Física Aplicada Nello Carrara (CNR), en Florencia (Italia).

La técnica consiste en un examen de la luz que dispersa un compuesto químico cuando sobre él incide un haz de luz monocromática. La luz sufre una dispersión inelástica y experimenta ligeros cambios de frecuencia característicos del compuesto analizado, e independientes de la frecuencia de la luz incidente.

Se utilizó un espectrómetro Raman BaySpec modelo BRAM-HR-1064 (San José, CA, USA), con una excitación de 1064 nm, cuyo esquema de configuración se muestra en la Figura 42. La potencia del láser se limitó a 300 mW para evitar el daño de la muestra, y fue ligeramente desenfocado sobre la superficie del vial para minimizar la influencia de la heterogeneidad de las semillas trituradas. El tiempo de integración se estableció a 20 segundos y se realizaron 3 lecturas por cada punto para el promedio de cada medida. En este caso, se utilizó un detector con esquema dispersivo que proporciona mayor compactación que las configuraciones de transformada de Fourier, normalmente utilizadas en otros instrumentos Raman. Se empleó un detector InGaAs a $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ con resolución espectral de 4 cm^{-1} . Además, se utilizaron simultáneamente tres espectrofotómetros, lo que permitió escanear el rango completo del Raman desde $300\text{ a }3200\text{ cm}^{-1}$ cada 2 cm^{-1} .

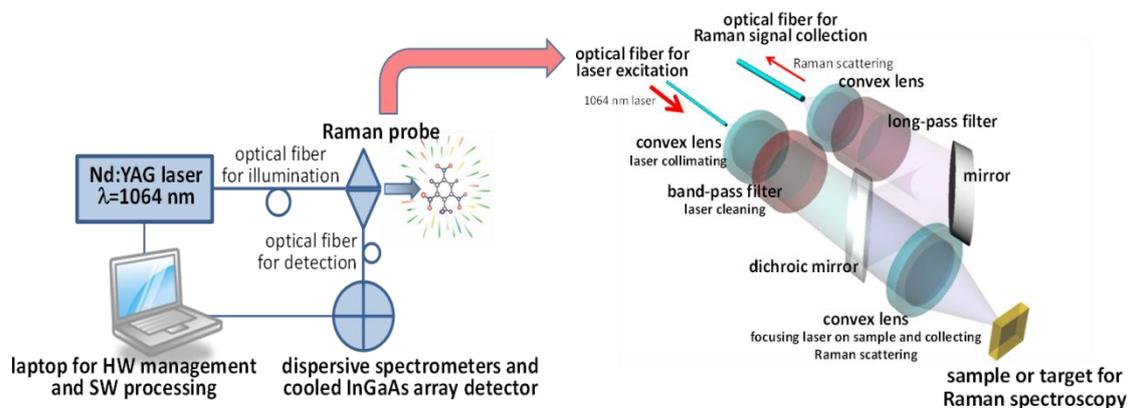


Figura 42. Configuración del *equipo Raman*. Detalles de la iluminación y la detección de la señal retrodispersada.

Material

Instrumentos y equipos de laboratorio:

- Espectrómetro Raman BaySpec modelo BRAM-HR-1064 (San José, CA, USA)
- Viales de vidrio de 5 mL

Preparación de la muestra

- Molino automático IKA A11-B (IKA®, Staufen, Alemania)
- Mortero

Procedimiento analítico**Análisis de la muestra**

Se trituran las muestras (10 grupos de semillas sobremaduras de uvas de PX, MO y ZA) usando un molino automático, y un posterior molido en mortero para homogeneizar al máximo el triturado. Para este ensayo se utilizaron semillas obtenidas en la vendimia anterior, conservadas en congelación a -20 °C hasta su uso.

El resultado de cada grupo se introduce en un vial para su análisis mediante espectroscopía Raman. La medida de cada muestra se realiza en ocho puntos diferentes para contemplar en las medidas la heterogeneidad, y posteriormente, se obtiene el promedio.

2.6. Métodos estadísticos

En el tratamiento de los datos químicos, espectroscópicos y colorimétricos se aplicaron técnicas estadísticas univariantes y multivariantes para la obtención de resultados.

2.6.1. Análisis de la Varianza (ANOVA)

En general, el propósito del Análisis de la Varianza (ANOVA) es encontrar diferencias significativas entre los valores medios de un conjunto de datos mediante la comparación de las varianzas. El porcentaje de variabilidad explicada por un efecto nos da una medida adecuada de la influencia de dicho efecto en la respuesta. ANOVA es un análisis univariante (para una sola variable) y MANOVA es multivariante (tiene en cuenta el efecto de más de una variable dependiente, simultáneamente).

El valor del nivel de *significación estadística p* representa un índice de descenso de la fiabilidad del resultado, de manera que cuanto mayor es su valor menos se puede confiar que la relación observada entre las variables en la muestra es un indicador fiable de la relación entre las respectivas variables en la población. El valor *p* representa la probabilidad de error que implica aceptar como válido el resultado observado, es decir, representativo de la población.

En la aplicación del ANOVA se asume que las variables incluidas en la comparación presentan una distribución normal. Cuando los datos de la variable no se ajustan a una distribución normal, existen alternativas al ANOVA, como el test de *Kruskal-Wallis* para comparar diferencias entre grupos de muestras independientes, y el *test de Friedman* cuando se quiere comparar variables medidas en la misma muestra

Para la prueba ANOVA se ha empleado el programa Statistica® vs. 8.0. (StatSoft Inc.: Tulsa, OK, 2007).

2.6.2. Análisis de componentes principales (PCA)

Habitualmente, al recoger datos de una muestra se toma un elevado número de variables para conseguir la mayor cantidad de información posible. Sin embargo, demasiadas variables obligan a considerar numerosos coeficientes de correlación en el tratamiento estadístico, lo que hace difícil visualizar las relaciones entre las variables, incluso, puede que midan lo mismo bajo distintos puntos de vista. Se hace necesario, entonces, reducir el número de variables.

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una técnica estadística multivariante que genera nuevas variables como resultado de la combinación lineal de las variables originales. Consiste en agrupar la mayor parte de la variación observada posible para reducir el número de variables (normalmente a 2 o 3). Las nuevas variables originadas reciben el nombre *componentes principales*. Están relacionadas entre sí y pueden ordenarse de acuerdo con la información que representan. La primera componente agrupa la mayor parte de variación, la segunda algo menos, y así sucesivamente.

Gracias a la reducción de la dimensionalidad de la información, esta herramienta estadística también es adecuada para la visualización de datos.

Los tratamientos multivariantes de PCA se llevaron a cabo mediante el software MATLAB (The MathWorks, Natick, MA, USA).



Resultados

CAPÍTULO 1. MACERACIÓN FERMENTATIVA DE VINOS TINTOS CON SEMILLAS SOBREMADURAS. EFECTO SOBRE EL COLOR Y LA COMPOSICIÓN FENÓLICA

En: Effect of addition of overripe seeds from white grape by-products during red wine fermentation on wine colour and phenolic composition. LWT-Food Science and Technology. 2017. Vol. 84. Pag. 544-550

An overview of the colorimetric effects of adding overripe seeds from white grape by-products to the fermentative maceration of red wine. Poster en Congreso. 10th In Vino Analytica Scientia Symposium. Salamanca (España). 2017

En determinadas zonas de España, especialmente en el sur, durante el verano se alcanzan temperaturas elevadas que impiden la correcta maduración de la uva, y provocan un desfase entre la maduración tecnológica y fenólica en las bayas (Webb et al., 2011). El cambio climático está acentuando este efecto, lo que conlleva importantes inconvenientes a la hora de elaborar vinos tintos de calidad. En concreto, el aumento excesivo de temperatura durante los meses de la maduración genera desequilibrios en las cantidades de fenoles en las semillas y los hollejos de uvas tintas, lo que altera las interacciones por copigmentación de antocianos y la consecuente estabilización del color.

En los vinos tintos, el proceso de copigmentación ocurre, fundamentalmente, durante las primeras etapas de vinificación, a través de enlaces no covalentes que se establecen entre los pigmentos antociánicos y otros compuestos fenólicos no coloreados denominados copigmentos. Con ello se protegen las formas coloreadas y se asegura una correcta estabilización posterior del color durante las etapas de crianza o envejecimiento del vino (Trouillas et al., 2016). Por lo tanto, los procedimientos encaminados al incremento de la disponibilidad de copigmentos o la modulación de la proporción óptima pigmento/copigmento pueden resultar prácticas tecnológicas interesantes en el campo de la enología para favorecer la estabilización del color de vinos tintos, fundamentalmente, los elaborados en climas cálidos.

En vinificaciones de uvas blancas, en las que no se produce maceración, los orujos resultantes (hollejos y semillas) retienen importantes cantidades de compuestos fenólicos, susceptibles de ser aprovechados como copigmentos. Así, el uso de subproductos de uva blanca como fuente de copigmentos en la elaboración de vinos

tintos se presenta como una estrategia prometedora para proteger el color de estos vinos y conseguir que sea más estable a lo largo del tiempo.

Cabe destacar que, en regiones de clima cálido, los periodos de maduración de las variedades de uva blanca y tinta están muy próximos en el tiempo, por lo que los subproductos de la vinificación en blanco podrían estar disponibles para su aplicación en tintos, lo que evitaría un almacenamiento prolongado.

En trabajos previos se ha mostrado que, en la elaboración de tintos, prácticas como la maceración de la uva tinta con orujos de uva blanca (Gordillo et al., 2014) o la adición de hidrolizados de semillas (Cejudo Bastante et al., 2016), mejoran el potencial fenólico y el color de los vinos. En este sentido, el uso de otros subproductos como los procedentes de la elaboración de los vinos dulces de alta graduación alcohólica a partir de variedades blancas sobremaduras y/o pasificadas puede resultar de gran interés.

En la sobremaduración de la uva, el estrés hídrico y la luz solar provocan cambios fisicoquímicos en el metabolismo de la planta y, como consecuencia, la composición de la baya se ve fuertemente afectada, incrementándose la concentración de azúcares en la pulpa (>20° Bé) y favoreciéndose la biosíntesis y polimerización de compuestos fenólicos en órganos como las semillas (Dumitriu et al., 2015). La sobremaduración se puede realizar con uvas vendimiadas, sometiéndolas a un proceso de pasificación postcosecha, por exposición directa de los racimos al sol durante 7 a 10 días, en superficies denominadas *paseras*, que conduce a la deshidratación parcial de la uva.

En este estudio se ha planteado el uso de semillas de la variedad blanca Pedro Ximénez (PX), sometida a sobremaduración en pasera (10 días), como fuente alternativa de copigmentos, para mejorar el color de vinos tintos elaborados en climas cálidos. El objetivo ha sido caracterizar el perfil fenólico de las semillas sobremaduras añadidas y de los vinos a lo largo del proceso de elaboración, así como la aplicación de la Colorimetría Triestímulo para evaluar el efecto de la adición prefermentativa de las semillas sobre la copigmentación y el color de los vinos, y su evolución en el tiempo.

PARTE EXPERIMENTAL

Se elaboraron 6 vinos tintos de la variedad Syrah, cultivadas en la D.O. “Condado de Huelva” en la campaña 2015, 3 de ellos con vinificación tradicional (vinos control) y otros 3 se vinificaron con adición de 3 g/L de semillas PX sobremaduras durante la fermentación.

Se desarrolló una fermentación espontánea con levaduras autóctonas, a temperatura controlada (20-25 °C), durante 7 días con remontados diarios del vino. Tras la fermentación, el vino se descubó y se trasegó a depósitos de menor volumen donde se indujo la fermentación maloláctica con bacterias lácticas seleccionadas (14 mL/hL *Oenococcus oeni*). Los vinos se analizaron periódicamente, tanto en la fermentación como a lo largo de las fases de estabilización en depósito (5 meses) y posterior crianza en botella (5 meses).

La determinación de compuestos fenólicos individuales se realizó por técnicas cromatográficas. Los pigmentos antociánicos y flavonoles se determinaron mediante HPLC-DAD según Cejudo-Bastante et al. (2016), y los ácidos fenólicos (benzoicos e hidroxicinámicos) y flavanoles (monoméricos, procianidinas, y oligoméricos) mediante RRLC-DAD, según Jara-Palacios et al. (2014b). La determinación de Fenoles Totales se realizó según el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). El porcentaje de copigmentación (%AC) en los vinos se determinó según el método de Boulton (1996).

El efecto de la adición prefermentativa de las semillas sobremaduras sobre el color del vino se analizó mediante técnicas espectrofotométricas, obteniéndose las coordenadas de color CIELAB a través del software CromaLab® (Heredia et al., 2004). La evaluación del color se llevó a cabo mediante la aplicación de la Colorimetría Triestímulo.

Las posibles diferencias significativas entre los vinos con y sin adición de semillas, en relación a la composición fenólica, la copigmentación y el color, se establecieron a través de tratamiento estadístico de los datos (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$).

En las **semillas sobremaduras** se identificaron 20 compuestos fenólicos pertenecientes a diferentes familias (flavonoles monoméricos, procianidinas, ácidos hidroxicinámicos y ácidos benzoicos), con un contenido fenólico total de 5534.67 mg/100 g de extracto seco.

Considerando las familias fenólicas, los flavanoles monoméricos fueron los mayoritarios (40%, incluyendo catequina, epicatequina y EC-Galato) seguidos de procianidinas (38%, incluyendo B2, B3, B4 y B7, dímeros galoilados, trímeros y tetrámeros), y ácidos benzoicos (20%, incluyendo los ácidos gálicos y protocatéquico).

Individualmente, los compuestos con mayor riqueza en las semillas sobremaduras fueron la catequina (96.6 mg/100 g), ácido gálico (52.12 mg/100 g), epicatequina (45.8 mg/100 g), procianidina B2-3-O-galato (39.6 mg/100 g), procianidina B2 (29.4 mg/100

g), y EC-galato (20.4 mg/100 g). Se comprobó que la concentración de algunos de estos fenoles fue superior a la de semillas no sobremaduras cultivadas en clima cálido, como es el caso de las procianidinas B2, B7 y el tetrámero 1. Cabe destacar que estos compuestos se consideran importantes copigmentos debido a su complejidad estructural y, por ello, notables para proteger los pigmentos del vino tinto.

Con respecto a los **vinos**, los resultados ponen de manifiesto que aquéllos elaborados con adición de semillas sobremaduras presentaron un mayor contenido de antocianos y procianidinas al final de la etapa de maceración, que los elaborados de manera tradicional (12% y 50% más, respectivamente).

Durante las fases de estabilización en depósito y crianza en botella, la degradación de los antocianos fue ligeramente mayor en los vinos control. Aunque la diferencia en el contenido antociánico tendió a disminuir entre los vinos durante la crianza en botella, aquellos elaborados con semillas sobremaduras adicionadas presentaron una mayor cantidad de pigmentos al final del proceso de vinificación (tras 5 meses de crianza). Este comportamiento está en concordancia con la concentración de procianidinas, que evitan la degradación de los pigmentos al actuar como copigmentos. Durante la estabilización, se observó que esta concentración fue mayor en los vinos con semillas añadidas. A su vez, se observó la disminución de procianidinas al final de la crianza en botella, debido posiblemente, a reacciones de condensación tanino-tanino y tanino-antociano.

Con el objetivo de evaluar si las diferencias observadas en la composición fenólica entre los vinos elaborados con y sin adición de semillas sobremaduras fueron significativas a nivel global, se compararon los valores medios de todos los compuestos considerando de forma conjunta los periodos de estabilización y crianza en botella (media \pm DS, n=12 para cada vino). Estos parámetros se estudiaron junto al porcentaje de copigmentación (%) y a los fenoles totales (mg GAE/L). Se detectaron diferencias significativas globales para los antocianos y procianidinas totales, con contenidos mayores en los vinos de los ensayos con semillas. También se observaron en éstos mayores cantidades de flavanoles totales, aunque en este caso las diferencias no fueron significativas con respecto al vino control.

Respecto a compuestos fenólicos individuales, se encontraron diferencias significativas para los pigmentos malvidina-3 glucósido, malvidina-3 acetil glucósido, y los derivados cumarilados, así como para los copigmentos epicatequina y procianidina B2 3-O-galato. Todos estos compuestos presentaron mayores valores en los vinos con adición de semillas. Otros copigmentos como la catequina y las procianidinas B2 y B7, también

fueron mayoritarias en los vinos elaborados con semillas sobremaduras, aunque estas diferencias no fueron significativas respecto al control.

En el caso de los ácidos fenólicos, las cantidades fueron similares en los diferentes vinos debido, posiblemente, a la cinética de extracción, ya que estos compuestos necesitan largos periodos para ser extraídos (Zou et al., 2002).

Respecto a la evolución del color durante las fases de maceración fermentativa y estabilización, la tendencia de la claridad L^* y el croma C^*_{ab} fue similar en ambos vinos. Sin embargo, el comportamiento del tono h_{ab} difirió entre ellos. Durante la maceración, el tono de los vinos con semillas adicionadas mantuvo valores más estables, mientras que en los vinos control incrementó. Tras la maceración, se observó que los valores aumentaron progresivamente en ambos vinos, indicando una pérdida de los matices azulados. Este efecto en el tono puede ser debido, en parte, a la transformación progresiva de los antocianos monoméricos de la uva en pigmentos poliméricos en etapas más avanzadas de la vinificación (Gutiérrez et al., 2005), lo que también podría explicar la disminución observada en los valores de C^*_{ab} en el tiempo.

En términos globales, durante el periodo de estabilización y crianza en botella, los vinos con semillas añadidas mostraron mayores valores de C^*_{ab} y menores de h_{ab} que los vinos control. Este comportamiento indica que los vinos mantuvieron durante más tiempo una mayor intensidad de color y los matices azulados propios de etapas iniciales de la vinificación, lo que se pudo deber al mayor efecto de la copigmentación en los vinos elaborados con adición de semillas sobremaduras. La copigmentación también podría explicar el diferente comportamiento de la claridad durante las últimas etapas de envejecimiento en botella, ya que los valores de L^* se mantuvieron más estables en los vinos con semillas sobremaduras. Con el objetivo de evaluar si las diferencias observadas en los atributos de color individuales eran visualmente apreciables, se calculó la diferencia de color (ΔE^*_{ab}) entre los vinos al final de la crianza en botella. El valor obtenido fue de 3.5 u. CIELAB, pudiéndose considerar visualmente apreciable según Martínez et al. (2001).

Por otro lado, con el fin de evaluar la estabilidad de color en el tiempo, se calcularon las diferencias de color global (ΔE^*_{ab}) para cada vino entre el descube (día 7) y el final de la crianza en botella (día 315). A su vez, también se calcularon las diferencias de claridad, croma y tono (ΔL^* , ΔC^*_{ab} , y Δh_{ab}) para evaluar el sentido de las modificaciones del color en el tiempo. Se comprobó que las diferencias de color globales fueron menores para los vinos elaborados con semillas sobremaduras ($\Delta E^*_{ab} = 10$ vs. 11 en vinos control) indicando una menor modificación del color y por tanto una

mayor estabilidad. La modificación global del color en ambos vinos fue debida a mayores cambios en el tono que en el croma y claridad (mayores valores de Δh_{ab} respecto a ΔC^*_{ab} y ΔL^*). En particular, la magnitud de estos cambios fue menor en los vinos elaborados con semillas, lo cual indica mayor estabilidad de los atributos de color cuantitativo y cualitativo. Estos valores confirmaron el efecto positivo de las mayores cantidades de pigmentos y copigmentos en los vinos tras ser adicionados con semillas sobremaduras.

Como principales conclusiones de estos resultados se puede decir:

- que las semillas sobremaduras de Pedro Ximénez tienen una gran riqueza en compuestos fenólicos, con importantes cantidades de ácido gálico, epicatequina y procianidina B2 3-O-galato.
- que la adición de las semillas sobremaduras en la fase fermentativa de la elaboración de vinos tintos produce un aumento del contenido en compuestos fenólicos en los vinos, que actúan como copigmentos y producen una estabilización química de los antocianos durante las últimas etapas de vinificación.
- que esta mayor estabilidad de los pigmentos provocan un efecto cromático positivo, obteniendo vinos tintos con un color más estable, más oscuros y con tonos más azulados durante el proceso de vinificación.

CAPÍTULO 2. IMPACTO EN EL COLOR Y LA ESTABILIDAD DE VINOS TINTOS DE LA MACERACIÓN POST-FERMENTATIVA CON SEMILLAS DE UVA SOBREMADURAS.

En: Impact of a post-fermentative maceration with overripe seeds on the color stability of red wines. Food Chemistry. 2019. Vol. 272. Pag. 329-336.

Posfermentative second maceration with overripe seeds from white grape by products. Differential colorimetric assessment of the impact on the colour stability of red wine. Poster en Congreso. 10th In Vino Analytica Scientia Symposium. Salamanca (España). 2017

La etapa de maceración es una de las más importantes en la elaboración de vinos tintos. Es la fase en la que el mosto se mantiene en contacto con las materias sólidas de la uva (semillas y hollejos) y, por lo tanto, cuando se extraen compuestos relevantes para el proceso de vinificación. Es el caso de los fenoles, compuestos determinantes de la calidad del vino tinto al estar implicados en su estructura organoléptica (Santos-Buelga & de Freitas, 2009).

Sin embargo, la extractabilidad no es igual para los diferentes compuestos fenólicos. Por ejemplo, los antocianos y los flavanoles de bajo peso molecular se extraen en medio acuoso, en las primeras etapas de la maceración, mientras que los flavanoles de mayor peso molecular, los flavonoles y los ácidos fenólicos, son más solubles en soluciones alcohólicas, por lo que se extraen con posterioridad, cuando ya se ha iniciado la fermentación. En algunos casos, además, estos compuestos necesitan largas maceraciones para lograr una correcta extracción, dependiendo su extracción, por tanto, no sólo del medio extractante sino también del tiempo de extracción. No obstante, las maceraciones prolongadas pueden conducir a problemas organolépticos debido al aporte de compuestos responsables de sensaciones amargas y astringencia, fundamentalmente flavanoles monoméricos y procianidinas, aunque estas sensaciones se pueden suavizar a lo largo del tiempo.

Por otro lado, estos compuestos fenólicos son fundamentales en la estabilización de las antocianidinas a través de las reacciones de copigmentación. Por lo tanto, es fundamental conseguir los copigmentos apropiados, además de las adecuadas proporciones pigmento/copigmento en el medio para la protección del antociano (Berké & de Freitas, 2007).

Estudios previos han puesto de manifiesto que el porcentaje de copigmentación decrece aproximadamente en un 20% en los primeros 6 meses de vinificación, que cerca del 15% de los antocianos monoméricos desaparecen en los 3 primeros meses y que este porcentaje de degradación aumenta en etapas posteriores (Bimpilas et al., 2016; Rivero et al., 2017).

Por otro lado, como se ha podido comprobar en el capítulo anterior la adición de semillas sobremaduras en una etapa temprana de la vinificación como la fermentación aporta copigmentos como epicatequina, ácido gálico y procianidina B2-3-O-galato que protegen los antocianos monoméricos y previenen su degradación durante las etapas posteriores al favorecer el fenómeno de copigmentación, y originan vinos de color más intenso y azulado.

No obstante, esta técnica presenta ciertas limitaciones operacionales como obtener semillas de uva blanca en fresco para la vinificación de los vinos tintos. A pesar de estar muy próximas en el tiempo, existe una diferencia temporal de las vendimias de uvas blancas y tintas, lo que obliga a conservar en congelación las semillas de la cosecha anterior. Otro factor es que el tiempo que se mantienen en contacto las semillas durante la fermentación está condicionado por la duración de la propia fermentación, tras la cual se efectúa el descube y eliminación de las partes sólidas, incluidas las semillas que se adicionan, sin que se haya llevado a cabo la extracción completa de algunos fenoles.

En este estudio, se ha planteado la evaluación de semillas sobremaduras de Pedro Ximénez (PX) como fuente de compuestos fenólicos en la elaboración de vinos tintos cuando se adicionan en etapas postfermentativas. El propósito es tener la posibilidad de usar las semillas sobremaduras en fresco y de prolongar el tiempo de contacto de las semillas con el vino para mejorar la extracción de fenoles y la proporción copigmento/pigmento en el vino

Los objetivos del estudio han sido determinar las condiciones óptimas de la maceración postfermentativa (tiempo de contacto de las semillas y cantidad de semillas), identificar y cuantificar la composición fenólica de los diferentes vinos durante la elaboración por técnicas cromatográficas y espectrofotométricas, así como aplicar la Colorimetría Diferencial Triestímulo para evaluar el efecto de la maceración postfermentativa de las semillas sobremaduras PX sobre el color y la copigmentación de los vinos tintos a lo largo del tiempo.

PARTE EXPERIMENTAL

Para el estudio, se elaboraron 6 vinos tintos de variedad Syrah, cultivadas en la D.O.C “Condado de Huelva”, en la campaña 2016. La fermentación se realizó con inoculación de levaduras seleccionadas *Saccharomyces cerevisiae*, durante 6 días, a temperatura controlada (20-25 °C) y con remontados diarios. Tras la fermentación alcohólica, el vino se descubó y trasegó a 9 depósitos de menor volumen, en los que se inocularon bacterias lácticas para inducir la fermentación maloláctica. En ese mismo momento, a de los 6 depósitos se adicionaron 12 g/L de semillas sobremadras Pedro Ximénez, dejando otros 3 depósitos sin adicionar, que servirían como vino control (**CW**) de vinificación tradicional.

Los 6 depósitos con semillas se dividieron en dos triplicado de sendos tipos de vinos: 3 depósitos con adición simple postfermentativa de semillas (maceración de semillas durante 30 días, 12 g/L) (**SW**) y 3 depósitos con adición doble postfermentativa (maceración de semillas durante 30 días, 12 g/L y una segunda maceración posterior de semillas (renovación) durante otros 30 días, 12 g/L) (**DW**).

El control analítico de los vinos se realizó en el momento de la adición de las semillas (día 0), al final de la maceración simple (30 días), al final de la maceración doble (60 días) y al final del proceso de estabilización (150 días desde la primera adición de las semillas).

La composición fenólica de los vinos se determinó por técnicas cromatográficas: pigmentos antociánicos y flavonoles mediante HPLC-DAD según Cejudo-Bastante et al. (2016); ácidos fenólicos (benzóicos e hidroxicinámicos) y flavanoles (monoméricos, procianidinas, y oligoméricos) mediante RRLC-DAD, según Jara-Palacios et al. (2014b). El contenido en fenoles totales se determinó mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1965). El porcentaje de copigmentación (%AC) en los vinos se determinó según el método de Boulton (1996).

El efecto de la maceración postfermentativa con semillas sobremaduras sobre el color del vino se analizó mediante técnicas espectrofotométricas, obteniéndose las coordenadas de color CIELAB a través del software CromaLab® (Heredia et al., 2004). La evaluación del color se llevó a cabo mediante la aplicación de la Colorimetría Triestímulo.

Las posibles diferencias significativas entre los vinos con y sin adición de semillas, en relación a la composición fenólica, la copigmentación y el color, se establecieron a través de tratamiento estadístico de los datos (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$).

En los diferentes vinos se identificaron y cuantificaron distintos compuestos fenólicos, en concreto 10 antocianidinas, 6 ácidos fenólicos, 2 flavan-3-oles monoméricos, 4 procianidinas y 7 flavonoles.

El efecto sobre el contenido en fenoles en el proceso de maceración se evaluó en el momento del descube de las semillas: 30 días para SW y 60 días para DW. Los vinos macerados con semillas sobremaduras presentaron mayor riqueza en flavanoles, ácidos benzoicos y procianidinas que los vinos elaborados de manera tradicional, CW.

Considerando las diferentes familias fenólicas, las que presentaron un mayor incremento de su concentración en los vinos macerados con semillas (% respecto a los vinos control) en el momento del descube fueron: flavanoles (22% en DW y 8% en SW), procianidinas (10% en DW y 8% en SW) y ácidos benzoicos (5% en DW y 2% en SW).

También se encontraron diferencias en compuestos individuales como epicatequina, catequina y ácido gálico, siendo mayores sus concentraciones en los vinos DW y SW que en CW. Con respecto a las procianidinas, los vinos DW y SW mostraron una mayor concentración en las procianidinas B1 y B2, y también en la procianidina B2 3-*O*-galato, pero este último compuesto sólo en los vinos con doble adición de semillas, DW. Estas diferencias en la composición fenólica pudieron ser debidas a la cinética de extracción específica de cada compuesto.

Los flavanoles y los ácidos benzoicos necesitan largas maceraciones para su completa extracción en el vino (más extensas en el caso de los ácidos benzoicos). Por esta razón, la técnica de maceración postfermentativa de semillas resultó adecuada para lograr una correcta extracción de flavanoles y, aunque la extracción de ácidos benzoicos fue más limitada, también se lograron incrementos en su concentración.

Al final de las maceraciones postfermentativas, los vinos SW y DW mostraron menores cantidades de antocianos monoméricos que los vinos control, CW. Posiblemente, esto se debió a la formación de antocianos poliméricos en reacciones de condensación con otros compuestos que se extraen de las semillas sobremaduras (Gordillo et al., 2014), así como a otros efectos como la adsorción de los antocianos por las semillas sobremaduras adicionadas (Gordillo et al., 2014; 2016).

Posteriormente, durante la estabilización, los antocianos monoméricos disminuyeron en todos los vinos debido a reacciones de oxidación, hidratación, adsorción y polimerización (Cejudo-Bastante et al., 2017). Así, al final del periodo de estabilización, los vinos macerados con semillas (SW y DW) presentaron mayor grado de polimerización, lo que significa una mayor concentración de antocianidinas más estables. Flavanoles monoméricos, flavonoles y procianidinas fueron los compuestos

fenólicos no coloreados cuyos contenidos se vieron más afectados en el periodo de estabilización, posiblemente debido a la mayor implicación de estos fenoles en las reacciones de polimerización tanto con las antocianidinas, como con compuestos de su misma naturaleza, como en el caso de flavanoles y procianidinas.

Los diferentes tratamientos de maceración con semillas condujeron a diferencias en las características del color del vino, así como su evolución y estabilidad. En este sentido, durante la maceración con semillas sobremaduras, en los vinos SW y DW se produjo un aumento de la claridad (L^*) y una disminución del croma (C^*_{ab}), de manera que estos vinos en el momento de la eliminación de las semillas (30 y 60 días, respetivamente) presentaron mayores valores de L^* y menores de C^*_{ab} con respecto a los vinos control, CW. Estos datos están en concordancia con las concentraciones cuantificadas de antocianos monoméricos.

Sin embargo, durante la fase de estabilización se produjo el efecto contrario en los vinos con semillas adicionadas, de manera que, al final del proceso de vinificación, los vinos con doble adición de semillas sobremaduras presentaron un color ligeramente más oscuro y más vivo que los vinos control ($L^*=72.31$ vs 74.55 u.; $C^*_{ab}=25.66$ vs 24.23 u., respectivamente), mientras que en los vinos con adición simple de semillas presentaron unos valores intermedios.

En cuanto al tono (h_{ab}), aunque todos los vinos presentaron valores correspondientes a rojos netos (cerca de 0°) al final de la vinificación, fueron algo más altos en los vinos elaborados de manera tradicional, siendo significativa ($p<0.05$) la diferencia con respecto a los vinos de doble maceración. Esto podría ser debido a que la mayor proporción copigmento/pigmento conseguida en los vinos elaborados con adición de semillas sobremaduras conduce a un mayor efecto de copigmentación y, por tanto, protección de los antocianos.

Teniendo en cuenta la evolución de todos los parámetros colorimétricos, se calcularon las diferencias de color CIELAB (ΔE^*_{ab}) entre los vinos. Tras el periodo de maceración postfermentativa (30 y 60 días para los vinos SW y DW, respectivamente), se produjeron diferencias visualmente apreciables entre los vinos elaborados con semillas añadidas y los vinos control, considerablemente mayores en el caso de los vinos de doble adición (4.1 y 14.9 unidades CIELAB para los pares CW30-SW30 y CW60-DW60, respectivamente).

La comparación de los vinos al final de proceso de vinificación (150 días) permitió evaluar el efecto de la adición de semillas sobremaduras sobre el color. Los vinos elaborados mediante maceración postfermentativa con semillas sobremaduras

(SW150 y DW150) presentaron diferencias de color respecto al vino control (CW150), que además fueron visualmente perceptibles ($\Delta E^*_{ab}=3.25$ u.) en el caso de DW. Considerando la contribución de cada variable colorimétrica individual a este cambio de color, se comprobó que el tratamiento de doble adición de semillas (DW) produjo, principalmente, cambios en la claridad ($\% \Delta L=77\%$), seguidos de modificaciones del croma ($\% \Delta C=20\%$) y del tono ($\% \Delta H=3\%$).

Por otro lado, se evaluó la evolución del color de cada vino en el proceso global de vinificación, desde el momento de la adición de las semillas (día 0) hasta el final de la etapa de estabilización (día 150). El croma disminuyó en todos los vinos (ΔC^*_{ab}), con menor modificación en DW. La claridad (ΔL^*) aumentó ligeramente en CW y SW y disminuyó en DW (vinos más oscuros). El tono (Δh_{ab}) mostró una tendencia ascendente para todos los ensayos, algo menor en SW. En general, las menores diferencias, por tanto la mayor estabilidad, se dio en los vinos con doble maceración.

Como principales conclusiones extraídas de los ensayos de la adición postfermentativa de semillas sobremaduras se puede decir:

- que permite llevar a cabo periodos más prolongados del contacto entre el vino tinto y las semillas, para mejorar la extracción de los compuestos fenólicos, lo que se pone de manifiesto en los mejores resultados obtenidos en los vinos con doble adición de semillas (DW) que los de adición simple (SW).
- que los fenoles extraídos durante la maceración postfermentativa actúan como copigmentos, y evitan la degradación de los antocianos a través de reacciones de copigmentación y polimerización, siendo catequina, epicatequina, ácido gálico y las procianidinas B1 y B2, los principales compuestos extraídos mediante esta técnica.
- que la adición postfermentativa de semillas sobremaduras tiene efectos positivos sobre el color, produciendo vinos más oscuros, más vivos y rojos más netos, con respecto a los que se elaboran de manera tradicional sin adición de semillas.
- que, fundamentalmente en el caso de la doble adición, debido a la acción de los copigmentos extraídos de las semillas sobremaduras se promueve la estabilización del color del vino a lo largo del tiempo y, por lo tanto, se favorece la aptitud para la crianza.

CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE COPIGMENTACIÓN DE SEMILLAS SOBREMADURAS POR COLORIMETRÍA DIFERENCIAL

En: Copigmentation potential of overripe seeds from sun-dried white grapes on anthocyanins colour and stability by Differential Colorimetry. International Journal of Food Science & Technology

Evaluación Colorimétrica Diferencial de la copigmentación entre flavanoles de semilla de uva sobremaduras y antocianos del vino. Poster en Congreso. XII Congreso Nacional de Color. Linares, Jaén (España), 25-27 Sep., 2019

La copigmentación es un fenómeno típico en los vinos tintos que produce, principalmente, dos efectos positivos sobre el color de los antocianos: 1) un aumento de la absorptividad del grupo cromóforo, generalmente acoplado aun efecto batocrómico en la λ_{\max} visible, y 2) la estabilización de éstos en su forma coloreada catión flavilio (Trouillas et al., 2016). Además, la copigmentación se considera el primer paso en la formación de pigmentos poliméricos más estables (pigmentos antociánicos derivados) a través de enlaces covalentes.

Entre otros constituyentes del vino, los compuestos fenólicos se consideran buenos copigmentos debido a que poseen una estructura plana, por lo que pueden acoplarse de manera más eficaz a la molécula de antociano, también plana, produciéndose la reacción de copigmentación intermolecular.

Por lo tanto, la búsqueda de fuentes alternativas de copigmentos fenólicos destinados a mejorar la estabilidad química y colorimétrica de los antocianos del vino es una de las principales áreas de investigación en enología.

Como se ha comentado en capítulos anteriores, los procesos de deshidratación postcosecha mediante exposición directa de los racimos al sol a los que se someten algunas variedades de uva blanca, activan mecanismos que favorecen la biosíntesis fenólica y la polimerización de estos compuestos químicos, y, en consecuencia, su concentración progresiva en distintas partes de la uva, como las semillas (Dumitriu et al., 2015).

Sin embargo, hasta la fecha, pocos estudios han evaluado el uso de las semillas sobremaduras en la estabilización del color de los antocianos. El potencial de copigmentación de las semillas sobremaduras, relacionado con su composición fenólica, depende de la intensidad y duración del proceso de deshidratación, ya que

este fenómeno puede afectar de manera diferente al metabolismo de cada variedad de uva y, por lo tanto, a su composición aplicaciones posteriores (Serratosa et al., 2014; Río-Segade et al., 2016).

En este estudio se ha planteado la comparación del potencial fenólico y las propiedades de copigmentación de semillas de uvas sobremaduras de las variedades blancas Pedro Ximénez (PX) y Moscatel (MO). Los objetivos fueron establecer diferencias, cualitativas y cuantitativas, en la composición de los diferentes extractos de las semillas (PX y MO) y, utilizando disoluciones modelo, evaluar el efecto sobre el color de antocianos del vino y su estabilidad mediante Colorimetría Diferencial, así como determinar la influencia en la evolución de los antocianos monoméricos y la formación de nuevos pigmentos derivados.

PARTE EXPERIMENTAL

Para el estudio se prepararon 7 disoluciones modelo de antocianos en vino sintético y por triplicado: 1 disolución de antocianos sin copigmentos añadidos (control) y 6 disoluciones de antocianos adicionadas con extractos de semillas sobremaduras de Pedro Ximénez y Moscatel (PX y MO) a tres concentraciones de fenoles totales (100, 200 y 400 mg/L). La concentración de antocianos en todas las disoluciones fue de 50 mg/L. Las disoluciones preparadas se guardaron en ausencia de luz durante 90 días, realizándose 8 muestreos a lo largo de este periodo: a las 2 horas y en los días 1, 6, 13, 20, 34, 56, y 90 desde el comienzo de la reacción.

La composición antociánica de las disoluciones se determinó mediante HPLC-DAD-MS (Alcalde-Eon et al., 2014). La composición fenólica de los extractos se analizó mediante RRLC-DAD según el método de Jara-Palacios et al. (2014b). La determinación de fenoles totales se realizó por el método Folin Ciocatelteu (Singleton et al., 1965).

Mediante espectrofotometría de transmisión y procesado de los espectros visibles con CromaLab® (Heredia et al., 2004) se obtuvieron las coordenadas de color CIELAB. Por aplicación de la Colorimetría Diferencial, según la metodología descrita por Gordillo et al. (2012, 2015), se proponen distintas variables basadas en diferencias de color (ΔE^*_{ab} , ΔL^* , ΔC^*_{ab} , Δh_{ab}) para la evaluación integral del efecto cuantitativo y cualitativo de la copigmentación en el color. A su vez, el porcentaje de copigmentación se determinó por comparación del color total de las disoluciones de antocianos (E_0) y el color total de la misma disolución adicionada con extractos de semillas sobremaduras de PX y MO (E_C), según la ecuación $[(E_C - E_0)/E_0] \times 100$.

Las semillas sobremaduras de la variedad Moscatel (MO) presentaron una concentración en fenoles totales mayor que Pedro Ximénez (PX) (3806 y 1228 mg/100 g de extracto seco, respectivamente), mostrando un mayor potencial fenólico. La riqueza fenólica de MO fue incluso mayor que la descrita en bibliografía sobre semillas procedentes de uvas frescas (no sobremaduras) (Özcan et al., 2017; Jara-Palacios et al., 2014c).

Catequina, ácido gálico y epicatequina fueron los fenoles más abundantes en las semillas sobremaduras, siendo los dos primeros compuestos más abundantes en MO que en PX. Las semillas de MO también presentaron mayores concentraciones en las procianidinas mayoritarias: B1, EC galato y B2. Estas diferencias en la composición fenólica de las semillas MO y PX podrían ser atribuidas a las condiciones ambientales producidas durante la deshidratación postcosecha (Bondada et al., 2017).

Con respecto al efecto de copigmentación, los resultados mostraron que los extractos de semillas sobremaduras MO indujeron a mayores incrementos en el color de los antocianos del vino, siendo la magnitud del efecto en esta variedad dependiente de la dosis fenólica añadida (6% y 12% para 100 y 400 mg/L, respectivamente).

A su vez, el efecto producido en los antocianos fue mayor que el descrito sobre estudios de adición de semillas no sometidas a procesos de sobremaduración en concentraciones similares (González-Manzano et al., 2009; Jara-Palacios et al., 2014c).

La diferencia en la magnitud de copigmentación de los extractos (MO y PX) pudo ser debida a la diferencia cualitativa en la composición fenólica de las variedades de semillas sobremaduras. Así, para una misma concentración, los extractos de MO, con mayores concentraciones de ácido gálico, catequina y procianidina B1, produjeron mejores copigmentaciones que los extractos de PX, más ricos en epicatequina y procianidinas B2, B2 3-*O*-galato y B7.

En la evaluación del efecto debido a la copigmentación sobre el color, se determinaron los cambios producidos en los parámetros CIELAB (L^* , C^*_{ab} and h_{ab}). Se observó que el incremento de la concentración de los extractos de PX y de MO provocó aumento del croma (C^*_{ab}) y disminución de la claridad (L^*) en las disoluciones de antocianos, lo que indica modificaciones hacia colores más oscuros y vivos. Estos cambios fueron mayores en los extractos de MO, principalmente, a 400 mg/L, la mayor concentración ensayada, produciendo aumentos del 6% de los valores de C^*_{ab} y un descenso del 7% de L^* . El efecto de los extractos de PX sobre el color los antocianos fue comparativamente menor, indicando una actividad más débil como copigmentos.

Por otro lado, la adición de los extractos de MO y PX incrementaron los valores del tono (h_{ab}) en las disoluciones de antocianos, con un efecto más acusado con los extractos de MO (aumento de 7° a 10° a 400 mg/L). Los extractos de PX produjeron una menor modificación del tono de las disoluciones de antocianos, por lo que mantuvieron mejor su tono original.

Las diferencias de color (ΔE^*_{ab}) calculadas entre las disoluciones de antocianos y las mismas adicionadas con extractos fenólicos de MO y PX estuvieron, en la mayoría de los casos por encima de 3 unidades CIELAB, visualmente perceptibles según Martínez et al. (2001). La adición de extractos de MO condujo a mayores diferencias (6.0, 7.6 y 8.8 unidades a 100, 200 y 400 mg/L, respectivamente) que las de los extractos de PX, aunque fueron visualmente apreciables a partir de la adición de 200 mg/L (2.3, 2.9 y 3.4 a 100, 200, y 400 mg/L, respectivamente).

La evolución de los parámetros colorimétricos de las disoluciones (L^* , C^*_{ab} and h_{ab}) se estudió durante 90 días en oscuridad. En general, durante el almacenamiento, se observó un incremento en el tono (h_{ab}) mientras que el croma y la claridad, permanecieron más estables durante todo el periodo de almacenamiento. Las disoluciones de antocianos con extractos de PX y MO mostraron menores valores de claridad (L^*) y mayores valores de croma (C^*_{ab}) que las disoluciones de antocianos sin copigmentos adicionados. Estos datos indican que los copigmentos procedentes de las semillas sobremaduras preservaron colores más intensos y oscuros de los antocianos. Este efecto fue más pronunciado con los extractos de MO.

Sin embargo, los cambios sobre el tono (h_{ab}) fueron muchos más intensos que los producidos sobre el croma y la claridad, por lo tanto, la variación del color durante el envejecimiento fue principalmente cualitativa. Los resultados mostraron que las disoluciones de antocianos con extractos añadidos de semillas sobremaduras presentaron generalmente unos valores de h_{ab} mayores durante el almacenamiento que las mismas sin copigmentos añadidos.

Por último, se calculó la variación global de color entre el comienzo y el final del periodo de evolución para cada disolución (ΔE^*_{ab} entre el día 1 y el día 90). Se comprobó que los valores de ΔE^*_{ab} fueron menores en las disoluciones de antocianos con extractos de semillas sobremaduras de MO, indicando una menor modificación del color y, por ello, mayor estabilidad. Esta menor variación se debió fundamentalmente a los menores incrementos en el tono. Por el contrario, las disoluciones de antocianos con extractos de PX presentaron mayores valores de ΔE^*_{ab} (menor estabilidad) debido, fundamentalmente, a los mayores incrementos en el tono.

La estabilidad química de las disoluciones se estudió a través de los cambios en el contenido antociánico durante el almacenamiento. Los resultados mostraron que todas las disoluciones sufrieron una disminución tanto del contenido total global como de las distintas fracciones de antocianos (derivados glucósidos y acilados), lo que es acorde con los resultados publicados en trabajos previos (González-Manzano et al., 2009).

La mayor disminución de antocianos totales se produjo en las disoluciones con extractos de MO y PX a 400 mg/L, (32 % y 31%, respectivamente). Este hecho pudo ser debido a la degradación por oxidación o a la formación de nuevos pigmentos más estables (Guadalupe et al., 2008). Por este motivo se estudió la formación de nuevos pigmentos antociánicos derivados en las muestras finales (90 días) mediante HPLC-MS. Así, en las disoluciones de 400 mg/L tanto para MO como para PX, se identificaron dos nuevos pigmentos derivados, malvidina 3,5-diglicosido-etil-(epi)-catequina y malvidina 3-p-cumaril glucosido-5-glucosido-etil-(epi)-catequina, cuyo contenido fue ligeramente mayor en las disoluciones preparadas con extractos de MO que en las que contenían extractos de PX (0.8 mg/L vs. 0.57 mg/L, respectivamente).

Como principales conclusiones de estos resultados se puede decir:

- que las semillas sobremaduras son fuentes naturales ricas en fenoles, concretamente de flavanoles, ácidos benzoicos y procianidinas. Las semillas de Moscatel presentaron una mayor riqueza en estos compuestos que las de Pedro Ximénez principalmente en ácido gálico, catequina y las procianidinas B1, B2 y EC-galato. Sin embargo, las semillas de Pedro Ximénez presentaron una mayor riqueza en epicatequina.
- que los extractos de semillas sobremaduras Moscatel principalmente y de Pedro Ximénez en menor medida mostraron ser fuentes importantes de copigmentos, incluso mejores que los extractos procedentes de semillas frescas. Estos extractos de semillas sobremaduras son capaces de incrementar el color en las disoluciones de antocianos mediante reacciones de copigmentación.
- que los copigmentos fenólicos de las semillas sobremaduras de Moscatel y Pedro Ximénez favorecen la formación de pigmentos más estables como malvidina 3,5-diglicosido-etil-(epi)-catequina y malvidina 3-p-cumaril glucosido-5-glucosido-etil-(epi)-catequina.
- que el efecto sobre el color de los antocianos del vino sintético producido por la adición de extractos de Moscatel principalmente y en menor medida extractos de Pedro Ximénez es visualmente apreciable. Este efecto depende de la concentración

añadida y se mantiene durante el almacenamiento, produciendo colores más oscuros (menor claridad y mayor croma) en las disoluciones de antocianos y más estables en el caso de los extractos de Moscatel.

CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN CON EXCITACIÓN A 1064 nm PARA LA VALORIZACIÓN DE SEMILLAS SOBREMADURAS COMO SUBPRODUCTO ENOLÓGICO

En: Dispersive Raman spectroscopy excited at 1064 nm for the nondestructive and rapid valorization of overripe seed byproducts from sundried grapes and phenolic quantification. TALANTA (Enviado)

La técnica fundamental para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos es la cromatografía líquida de alta eficacia, y la espectrofotometría en el caso de la cuantificación de fenoles totales. Estos análisis implican un consumo de tiempo, tanto en la preparación de la muestra como en el posterior análisis de los datos, además de la destrucción de la muestra, y el uso de reactivos químicos, lo que supone un coste económico y la generación de residuos.

Por el contrario, las técnicas analíticas basadas en la espectroscopía vibracional son capaces de medir de manera rápida, sin destrucción de las muestras y sin necesidad de utilizar reactivos, lo que implica importantes ahorros económicos y medioambientales. Estos beneficios están propiciando el surgimiento de las técnicas vibracionales como alternativa a los métodos tradicionales de análisis (Baca-Bocanegra et al., 2019).

Entre ellas, la espectroscopia Raman se basa en la medida de la luz que es dispersada por un material cuando incide sobre él un haz de luz monocromático. Esta dispersión inelástica proporciona una "huella molecular" de los compuestos químicos presentes en la muestra (Mandrile et al., 2016). Es una técnica no invasiva, que ofrece ventajas competitivas respecto a otras técnicas espectrales como la baja señal en agua y vidrio. Tiene alta sensibilidad a grupos funcionales polarizables como C-C y C=C, que se encuentran usualmente en cadenas poliméricas, por lo que podría ser una herramienta útil para evaluar el grado de polimerización. En este sentido, se ha utilizado en los últimos años para autentificar y clasificar alimentos, proporcionando resultados positivos en la determinación de moléculas orgánicas (proteínas, lípidos y carbohidratos), e incluso en compuestos fenólicos (Gallego et al., 2011; Rygula et al., 2013; Mignani et al., 2016). Sin embargo, hasta el momento, se han desarrollado pocos estudios en el uso de esta técnica en uvas y subproductos de uvas.

A pesar de su gran aplicabilidad, las medidas realizadas con excitaciones a 785 nm generan fuertes señales de fluorescencia que pueden enmascarar la señal Raman. Para

reducir la fluorescencia, se desarrollan equipos que funcionan con excitación a 1064 nm, lo que lleva a una mayor resolución espectral y con ello, mejores resultados.

En este estudio se aplica la espectroscopía Raman con excitación a 1064 nm, como método rápido y no destructivo, con el objetivo de evaluar la capacidad de esta técnica para discriminar semillas sobremaduras en función de su composición fenólica, y predecir su contenido en los principales compuestos fenólicos durante el proceso de sobremaduración.

PARTE EXPERIMENTAL

Para el estudio se utilizaron semillas de tres variedades de uva blanca sobremaduras, cultivadas en tres zonas vitivinícolas del sur de España: Pedro Ximénez (PX) (D.O. Montilla-Moriles, Córdoba), Moscatel (MO) (D.O. Málaga, Málaga) y Zalema (ZA) (D.O. Condado de Huelva, Huelva), todas ellas con 10 días de sobremaduración. Las semillas se separaron a mano y, una vez limpias, se tomaron 10 grupos de semillas al azar, para cada variedad (PX, MO y ZA).

También se realizó el seguimiento de semillas de Zalema durante un proceso de sobremaduración por exposición directa al sol, de 16 días. Se seleccionó esta variedad para el estudio ya que, a pesar de ser la uva autóctona y mayoritaria en la DO Condado de Huelva, y una de las variedades con mayor extensión de cultivo en Andalucía, su conocimiento es aún limitado. El seguimiento se realizó a diario, separando 3 grupos de muestras en cada toma.

Las muestras se sometieron a análisis espectroscópico Raman y, como método de referencia, la determinación de fenoles se llevó a cabo mediante RRLC-DAD según Jara-Palacios et al. (2014b). Los datos químicos y espectroscópicos se procesaron mediante MATLAB, aplicando un análisis de componentes principales (PCA) para evaluar diferencias entre variedades, así como a lo largo de la sobremaduración.

En el estudio de variedades, la primera fase del análisis Raman incluyó el pretratamiento de los espectros mediante suavizado (media móvil de 5 puntos, repetido 5 veces) y la corrección de la línea de base (entre 2120 y 2820 cm^{-1} , intervalo donde no se generaron bandas espectrales Raman). Para el análisis se seleccionó la región espectral 500-2000 cm^{-1} , donde estuvieron contenidas las mayores bandas Raman.

Para las medidas espectroscópicas, las semillas se trituraron y se introdujeron en viales de vidrio. El aspecto granular de la superficie de la muestra (triturado de semillas) causó fuerte variabilidad en la intensidad de la señal Raman, dificultando la extracción

de la información de los espectros. Para minimizar este efecto, realizó una etapa adicional de pretratamiento, restringiendo el análisis a la región 1240-1850 cm^{-1} y eliminando el fondo del espectro mediante un ajuste polinómico de 3^{er} grado.

Los espectros Raman se caracterizaron por tener una banda intensa alrededor de 1600 cm^{-1} , que se ha relacionado en bibliografía con los modos vibratorios del anillo aromático, específicamente de los flavonoides. (Larkin, 2011). De hecho, como se describió en estudios anteriores, esta señal podría deberse a la influencia de flavanoles monoméricos como epicatequina y catequina, o de taninos, compuestos muy abundantes en las semillas de uvas sobremaduras (Nogales et al., 2017b; Mazurek et al., 2018). Las bandas a 1360, 1450 y 1650 cm^{-1} también se pueden atribuir al efecto de la catequina, principalmente a la vibración de los enlaces C-OH, C-O, -OH y de los anillos aromáticos. Las bandas generadas en la región de 1630 a 1500 cm^{-1} se pueden atribuir a vibración de ambos anillos aromáticos, mientras que la mayoría de las bandas en longitudes de onda inferiores se pueden atribuir principalmente a la vibración de uno de ellos (Torregiani et al, 2008).

Los espectros más intensos se dieron en la variedad ZA y, aunque, en general, el promedio de los espectros de las semillas PX, MO y ZA fueron similares, se observaron diferencias en las absorbancia en determinadas longitudes de onda. ZA y PX mostraron un contraste relativamente más débil que MO entre la intensidad de la señal de Raman a 1619 cm^{-1} y las señales a 1590 y 1657 cm^{-1}

A través de técnicas cromatográficas, se detectaron diferencias cuantitativas entre las diferentes variedades de semillas sobremaduras, siendo las semillas MO las de mayor riqueza fenólica, seguidas por las semillas de ZA y por último de PX (281 ,179 y 108 mg/100 g de extracto seco, respectivamente).

Por familia fenólica, los mayoritarios fueron flavanoles totales, con diferentes estados de polimerización (monoméricos, procianidinas y oligoméricos). Las diferencias en la concentración de flavanoles totales estuvieron en concordancia con la intensidad de las bandas Raman a 1360, 1450, 1600 and 1650 cm^{-1} , aunque estas bandas también podrían deberse a otros enlaces como C=C, CH₂, HCC, HCO y HOC, procedentes de compuestos químicos de otra naturaleza (polisacáridos, lignina y lípidos) también presentes en las semillas (Nogales et al., 2017a).

A partir de los datos Raman, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para el reconocimiento de patrones, con el objetivo de diferenciar las semillas según la variedad, consiguiendo discriminar las variedades con un 96% de varianza total. El PC1 (92%) presentó valores positivos para las semillas de ZA, mientras que fueron

negativos para PX y MO, por lo que este componente principal pudo discriminar con bastante éxito las semillas ZA. Por otro lado, el PC2 (4%) consiguió discriminar las semillas de MO, con valores positivos, de las ZA y PX con valores negativos.

Los resultados mostraron que la primera componente principal (PC1) estaba relacionada con la intensidad global del espectro, sobre la que tiene una mayor influencia la banda en la zona de 1600 cm^{-1} , mientras que en la segunda (PC2), la mayor influencia procede de las bandas a 1590 , 1619 y 1657 cm^{-1} .

El seguimiento del **proceso de sobremaduración de 16 días de las semillas ZA** también se evaluó mediante espectroscopía Raman. Se comprobó que el espectro Raman obtenido para algunas de estas muestras mostraba una distorsión debido a la irregularidad de las muestras. Por ello, se realizó una criba a través de pretratamientos espectrales (PCA y estadística T-cuadrado de Hotelling), eliminándose un 8% de las medidas (*outliers*). Posteriormente, análogo al estudio anterior, los espectros se suavizaron y se eligió para el análisis la banda $1240\text{-}1850\text{ cm}^{-1}$, corrigiéndose también el fondo del espectro.

La intensidad del espectro Raman, con mayor influencia de la banda a 1600 cm^{-1} , tendió a crecer durante los primeros 8 días, para luego decrecer entre los días 9 y 12, y volver a aumentar desde el día 13 hasta el final del proceso de sobremaduración.

La correlación entre los datos espectrales (Raman) y los datos químicos (composición fenólica) de las semillas sobremaduras se estudió por aplicación de la estadística multivariante mediante análisis de componentes principales (PCA), para establecer fases de sobremaduración en las semillas en relación a la información espectral.

En cuanto a la información espectral, en una primera evaluación se clasificaron las muestras en 4 niveles de maduración, correspondientes con los intervalos de días [0-3], [4-9], [10-12] y [13-16]. Sin embargo, se observó una mejor clasificación al realizar una división en 2 niveles, concretamente en los intervalos [0-12] y [13-16].

En cuanto a la información química a lo largo del proceso de sobremaduración, se observó que catequina y epicatequina fueron más abundantes al inicio del estudio (semillas menos maduras). Por el contrario, la concentración de ácido gálico aumentó durante la sobremaduración.

Al correlacionar los datos espectrales y químicos, se observó un comportamiento similar de PC1 con los flavanoles monoméricos (catequina y epicatequina) durante las primeras etapas del proceso de sobremaduración (0-10 días). A partir de este momento se observó un aumento brusco del PC1 desde el día 11 hasta el final del

proceso de sobremaduración, coincidiendo esta tendencia con el comportamiento del ácido gálico.

De manera exploratoria, con fines cuantitativos, se utilizaron los valores espectrales (PC1 de los espectros Raman) para predecir las concentraciones de los principales compuestos fenólicos. Se encontraron coeficientes de correlación inferiores a 0.4 para la catequina y epicatequina, pero se obtuvieron mejores resultados para el ácido gálico, donde el coeficiente fue de 0.73.

Como principales conclusiones de estos resultados se puede decir:

- que la espectroscopia de Raman es una técnica rápida y no destructiva, eficaz para la valorización de semillas de uva sobremaduras, cuyos espectros están fuertemente influenciados por los flavanoles monoméricos (catequina y epicatequina), y se logra la discriminación por variedades mediante análisis de componentes principales (PCA).
- que la espectroscopia Raman puede utilizarse para clasificar las semillas de la variedad Zalema por estados de sobremaduración, principalmente entre etapas tempranas (0-12 días de sobremaduración) y tardías (13-16 días de sobremaduración).
- que la información obtenida de los espectros Raman se pueden utilizar para predecir de una manera relativamente satisfactoria las concentraciones de algunos compuestos fenólicos, en particular del ácido gálico.



Conclusiones

CONCLUSIONES

Se ha evaluado el aprovechamiento de semillas sobremaduras por exposición directa al sol, procedentes de la elaboración de vinos dulces, como fuentes de fenoles para la mejora del color de vinos tintos en clima cálido. A partir de los resultados obtenidos, ha sido posible extraer las siguientes conclusiones:

PRIMERA: Las semillas de uva blanca de la variedad Pedro Ximénez sometida a sobremaduración postcosecha por exposición directa al sol, constituyen un subproducto agrícola con gran potencial para su aprovechamiento enológico por su riqueza en copigmentos fenólicos tales como ácido gálico, epicatequina, procianidinas B2, B2 3-O-galato, y otros flavanoles oligoméricos (trímeros y tetrámeros).

SEGUNDA: La adición de 3 g/L de semillas sobremaduras Pedro Ximénez durante la fase fermentativa conduce a vinos tintos con una mejor estructura fenólica, un mayor grado de copigmentación y una mayor calidad y estabilidad del color y por tanto es una técnica de vinificación eficaz para la elaboración de vinos tintos en climas cálidos.

TERCERA: La adición de semillas tras el descube de los hollejos permite controlar el tiempo de contacto vino-semillas. Los vinos tintos con adición postfermentativa doble (maceración de 12 g/L de semillas durante 30 días, y una segunda adición de 12 g/L de semillas durante otros 30 días) presentaron la mayor concentración de copigmentos flavanólicos y la mayor calidad y estabilidad cromática (tonos rojo neto, más oscuros y más vivos)

CUARTA: Los extractos de semillas sobremaduras de Moscatel y Pedro Ximénez, ricos en compuestos fenólicos, inducen efectos químicos y colorimétricos positivos (cualitativos y cuantitativos) en disoluciones modelo de antocianos obtenidos de hollejos tintos. Los extractos de Moscatel, con más alta proporción de ácido gálico, catequina y procianidina B1, dieron lugar a los mayores efectos inmediatos de copigmentación y, en consecuencia, colores visualmente más apreciados, más oscuros y saturados.

QUINTA: Los extractos de Moscatel y Pedro Ximénez mejoraron la estabilidad química de los antocianos, favoreciendo la formación de pigmentos derivados, más estables, como malvidina 3,5-diglucosido-etil-(epi)-catequina y malvidina 3-p-cumaril glucosido-5-glucosido-etil-(epi)-catequina.

SEXTA: La aplicación de la Colorimetría Triestímulo Diferencial ha permitido verificar la estabilidad en el tiempo del color de las disoluciones. Con extractos de Moscatel, las disoluciones antociánicas fueron más estables, presentando menores diferencias de color (ΔE^*_{ab}) a lo largo de la fase de estabilización.

SÉPTIMA: La espectroscopía Raman con excitación a 1064 nm ha permitido analizar y discriminar con éxito semillas sobremaduras de distintas variedades de uva. Determinadas bandas espectrales cercanas a los 1600 cm^{-1} están fuertemente influenciadas por los flavanoles monoméricos presentes en las semillas (catequina y epicatequina), permitiendo una óptima discriminación por variedades mediante análisis de componentes principales.

OCTAVA: En el caso de la variedad Zalema, mediante la espectroscopía Raman se pudieron clasificar las semillas según su estado de sobremaduración, principalmente entre etapas tempranas (0-12 días de sobremaduración) y tardías (13-16 días de sobremaduración).

NOVENA: El análisis multivariante de la información espectral Raman no logró una predicción precisa del contenido en compuestos fenólicos, como indicadores de calidad, debido a que la técnica está condicionada por factores físicos y químicos propios de la muestra (falta de homogeneidad e interferencia de otros compuestos).

CONCLUSIONS

The use of overripe seeds obtained from grapes submitted to direct exposure to the sun for elaborating sweet wines has been evaluated as a source of phenols for the improvement of the color of red wines produced in warm climate. It has been possible to draw the following conclusions from the results:

FIRST: The seeds of white grape Pedro Ximénez variety subjected to post-harvest overripening by direct exposure to the sun, constitute an agricultural by-product with great potential for its oenological use due to its richness in phenolic copigments such as gallic acid, epicatechin, procyanidins B2, B2-3-O-gallate, and other oligomeric flavanols (trimers and tetramers).

SECOND: The addition of 3 g/L of Pedro Ximénez overripe seeds for macerating during the fermentation leads to red wines with a better phenolic structure, a higher levels of copigmentation and quality and stability of color; therefore, it is an efficient winemaking technique for the production of red wines in warm climates.

THIRD: The addition of seeds after removing skins allows controlling the wine-seed contact time. Red wines obtained with double post-fermentative addition of seeds (maceration of 12 g/L of seeds for 30 days, and a second addition of 12 g/L of seeds for another 30 days) showed the highest concentration of flavanol copigments and the highest quality and chromatic stability (red tones, darker and more vivid)

FOURTH: Extracts of Moscatel and Pedro Ximénez overripe seeds, rich in phenolic compounds, induce positive chemical and colorimetric effects (both qualitative and quantitative) in model solutions of anthocyanins from red grape skins. The Moscatel extracts, with a higher proportion of gallic acid, catechin and procyanidin B1, gave rise to the greater and quick effects of copigmentation and, consequently, colors visually more appreciated, darker and saturated.

FIFTH: Moscatel and Pedro Ximénez extracts improved the chemical stability of the anthocyanins, favoring the formation of more stable derivative pigments, such as malvidin 3,5-diglucoside-ethyl-(epi)-catecholine and malvidin 3-p-coumaryl glucoside-5-glucoside-ethyl-(epi)-catechol.

SIXTH: The application of Differential Tristimulus Colorimetry allowed verifying the color stability of the solutions over time. Moscatel extracts lead to more stable anthocyanin solutions, showing lower color differences (ΔE^*_{ab}) along the stabilization phase.

SEVENTH: Raman spectroscopy with excitation at 1064 nm successfully allowed analyzing and discriminating overripe seeds from different grape varieties. Certain spectral bands close to 1600 cm^{-1} are strongly influenced by the monomeric flavanols present in the seeds (catechin and epicatechin), allowing optimum discrimination by varieties through principal component analysis (PCA).

EIGHT: In the case of Zalema variety, the seeds could be classified by means of Raman spectroscopy according to their overripening state, mainly between early stages (0-12 days of overripening) and late stages (13-16 days of overripening).

NINTH: The multivariate analysis of the Raman spectral information did not achieve an accurate prediction of the phenolic content, as quality indicators, because the technique is conditioned by physical and chemical factors of the sample (lack of homogeneity and interference of other compounds).



Bibliografía

REFERENCIAS

- Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.(2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. *Anal. Chim. Acta*, 563, 238-254.
- Alcalde-Eon, C.; García-Estévez, I.; Ferreras-Charro, R.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Ferrer-Gallego, R.; Escribano-Bailón, M.T. (2014). Adding oenological tannin vs. overripe grapes: Effect on the phenolic composition of red wines. *J. Food Compos. Anal.*, 34, 99-113.
- Aleixandre-Tudo, J.L.; Du Toit, W. (2018). Cold maceration application in red wine production and its effects on phenolic compounds: A review. *LWT-Food Sci. Technol.*, 95, 200-208.
- Álvarez, I.; Aleixandre, J.; García, M.; Lizama, V. (2006). Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Anal Chim. Acta.*, 563, 109–115.
- Álvarez, I.; Aleixandre, J.L.; García, M.J.; Lizama, V.;Aleixandre-Tudó, J.L. (2009). Effect of the prefermentative addition of copigments on the polyphenolic composition of Tempranillo wines after malolactic fermentation. *Eur. Food Res. Technol.*, 228(4), 501-510.
- Anastasiadi, M.; Pratsinis, H.; Kletsas, D.; Skaltsounis, A.; Haroutounian, S. (2010). Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by products: evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Res. Int.*, 43, 805–813.
- Areta, A.; Bardají, I.; Iráizoz, B.(2017). Spanish wines in the US market: What attributes do US consumers look for in Spanish wines?. *Span. J. Agric. Res.*, 15, 1-15.
- Arvanitoyannis, I.S.; Ladas, D.; Mavromatis, A. (2006) Potential uses and applications of treated wine waste: a Review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41, 475-487.
- Baca-Bocanegra, B.; Nogales-Bueno, J.; Heredia-Mira, F.J.; Hernández-Hierro, J.M.(2018a). Estimation of total phenols, flavanols and extractability of phenolic compounds in grape seeds using vibrational spectroscopy and chemometric tools. *Sensors*, 18 (8), 2426.
- Baca-Bocanegra, B.; Nogales-Bueno, J.; Hernández-Hierro, J.M.; Heredia, F.J. (2018b). Evaluation of extractable polyphenols released to wine from cooperage byproduct by near infrared hyperspectral imaging. *Food Chem.*, 244, 206-212.
- Baca-Bocanegra, B.; Hernández-Hierro, J.M.; Nogales-Bueno, J.; Heredia, F.J. (2019) . Feasibility study on the use of a portable micro near infrared spectroscopy device for the “in vineyard” screening of extractable polyphenols in red grape skins. *Talanta*, 192, 353–359.
- Baderschneider, B.; Winterhalter, P. (2001). Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* , 49(6), 2788-98.
- Baiano, A.; De Gianni, A.; Mentana, A.; Quinto, M.; Centonze, D.; Del Nobile, M.A. (2016). Colour-related phenolics, volatile composition, and sensory profile of Nero di Troia wines treated with oak chips or by micro-oxygenation. *Eur. Food Res. Technol.*, 242 (10), 1631–1646.
- Basilio, N.; Pina, F. (2016). Chemistry and Photochemistry of Anthocyanins and Related Compounds: A Thermodynamic and Kinetic Approach. *Molecules*, 21, 1502,1-25.

- Bautista-Ortín, A. B.; Martínez-Cutillas, A.; Ros-García, J. M.; López-Roca, J. M.; Gómez-Plaza, E. (2005). Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 40, 1-12.
- Bautista-Ortín, A.B.; Fernandez-Fernandez, J.I.; Lopez-Roca, J.M.; Gomez-Plaza, E. (2007). The effects of enological practices in anthocyanidins, phenolic compounds and wine colour and their dependence of grape characteristics. *J. Food Compos. Anal.*, 20 (7), 546-552.
- Bautista-Ortín, A.B.; Rodríguez-Rodríguez, P.; Gil-Muñoz, R.; Jiménez-Pascual, E.; Busse-Valverde, N., Martínez-Cutillas, A., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E. (2012). Influence of berry ripeness on concentration, qualitative composition and extractability of grape seed tannins. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 18(2), 123-130.
- Bautista-Ortín, A.B.; Busse-Valverde, N.; Fernández-Fernández, J.I.; Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R. (2016). The extraction kinetics of anthocyanins and proanthocyanidins from grape to wine in three different varieties. *OENO ONE* , 50(2), 91-100.
- Bellincontro, A.; De Santis, D.; Botondi, R.; Villa, I.; Mencarelli, F. (2004). Different postharvest dehydration rates affect quality characteristics and volatile compounds of Malvasia, Trebbiano and Sangiovese grapes for wine production. *J. Sci. Food Agric.*, 84, 1791–1800.
- Berké, B.; De Freitas, V. (2007). A colorimetric study of oenin copigmented by procyanidins. *J. Sci. Food Agric.*, 87(2), 260–265.
- Bernabéu, R.; Olmeda, M. ; Díaz, M. (2005): Estructura de preferencias de los consumidores de vino y actitudes hacia los vinos con Denominación de Origen. El caso de Castilla-La Mancha. *Economía Agraria y Recursos Naturales*, 5(9), 57-80.
- Bernabéu, R.; Díaz, M.; Oliveira, F.(2016). Consumer preferences for red wine in the spanish market. *Ciência Téc. Vitiv.*, 31(2), 88-97.
- Bimpilas, A. ; Panagopoulou, M. ; Tsimogiannis, D. ; Oreopoulou, V. (2016). Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chem.*, 197, 39–46.
- Bondada, B.; Harbertson, E.; Shrestha, P. M.; Keller, M. (2017). Temporal extension of ripening beyond its physiological limits imposes physical and osmotic challenges perturbing metabolism in grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *Sci. Hortic.*, 219, 135-143.
- Bonetti, F.; Brombo, G.; Zuliani, G. (2017). Nootropics, Functional Foods, and Dietary Patterns for Prevention of Cognitive Decline. *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*, 2017.
- Bontpart, T.; Marlin, T.; Vialet, S.; Guiraud, J.L.; Pinasseau, L.; Meudec, E.; Sommerer, N.; Cheynier, V.; Terrier, N.(2016). Two shikimate dehydrogenases, VvSDH3 and VvSDH4, are involved in gallic acid biosynthesis in grapevine. *J. Exp. Bot.*, 67(11), 3537-50.
- Boulton, R. (1996). A method for the assessment of copigmentation in red wines In In 47th annual meeting of the American society for enology and viticulture Reno, NV.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 67-87.
- Braidot, E.; Zancani, M.; Petrusa, E.; Peresson, C.; Bertolini, A.; Patui, S.; Macrì, F.; Vianello, A. (2008). Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signal Behav.*, 3(9), 626–632.

- Busse-Valverde, N.; Gomez-Plaza, E.; Lopez-Roca, J.M.; Gil-Muñoz, R.; Bautista-Ortín, A. (2011). The Extraction of Anthocyanins and Proanthocyanidins from Grapes to Wine during Fermentative Maceration Is Affected by the Enological Technique. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 5450-5455.
- Bustamante, M.A.; Paredes, C.; Moral, R.; Moreno-Caselles, J.; Pérez-Murcia, M.D.; Pérez-Espinosa, A.; Bernal, M.P. (2007). Co-composting of distillery and winery wastes with sewage sludge. *Water Sci Technol.*, 56(2), 187-92.
- Bustamante, M.A.; Moral, R.; Paredes, C.; Pérez-Espinosa, A.; Moreno-Caselles, J.; Pérez-Murcia, M.D. (2008). Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manag.*, 28(2), 372-80.
- Canals, R.; Llaudy, M.C.; Valls, J.; Canals, J.M.; Zamora F. (2005). Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4019-4025.
- Canals, R.; Llaudy, M.C.; Canals, J.M.; Zamora F.; Canals, R. (2008). Influence of the elimination and addition of seeds on the colour, phenolic composition and astringency of red wine. *Eur. Food Res. Technol.*, 226(5), 1183-1190.
- Cano-López, M.; López-Roca, J.M.; Pardo-Minguez, F.; Gómez Plaza, E. (2010). Oak barrel maturation vs. micro-oxygenation: Effect on the formation of anthocyanin-derived pigments and wine colour. *Food Chem.*, 119, 191-195.
- Canuti, V., Puccioni, S., Giovani, G., Salmi, M., Rosi, I., Bertuccioli, M. (2012). Effect of oenotannin addition on the composition of sangiovese wines from grapes with different characteristics. *Am. J. Enol. Vitic.*, 63, 220-231.
- Casas, L.; Mantell, C.; Rodríguez, M.; Martínez de la Ossa, E.J.; Roldán, A.; De Ory, I.; Caro, I.; Blandino, A. (2010). Extraction of resveratrol from the pomace of *Palomino fino* grapes by supercritical carbon dioxide. *J. Food Eng.*, 96(2), 304-308.
- Casassa, F.; Harbertson, J. (2016). Balancing Tannin Maturity and Extraction Studying the relationships between seed maturity, length of maceration and ethanol amount on Merlot wines. *Wines and Vines (Sept)*.
- Casassa, F. (2017). Flavonoid Phenolics in Red Winemaking. *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications, IntechOpen*.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.*, 55(3), 992-1002.
- Cejudo-Bastante, M.J.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Pérez-Coello, S. (2011). Micro-Oxygenation and Oak Chip Treatments of Red Wines: Effects on Colour-Related Phenolics, Volatile Composition and Sensory Characteristics. Part I: Petit Verdot Wines. *Food Chem.*, 124, 727-737.
- Cejudo-Bastante, M.J.; Gordillo-Arrobas, B.; Hernanz-Vila, M.D.; Escudero-Gilete, M.L.; González-Miret Martín, M.L.; Heredia, F.J. (2014). Effect of the time of cold maceration on the evolution of phenolic compounds and colour of Syrah wines elaborated in warm climate. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 49(8), 1886-1892.
- Cejudo-Bastante, M.J.; Rodríguez-Morgado, B.; Jara-Palacios, M.J.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Parrado, J.; Heredia, F. J. (2016). Pre-fermentative addition of an enzymatic grape seed hydrolysate in warm climate winemaking. Effect on the differential colorimetry, copigmentation and polyphenolic profiles. *Food Chem.*, 209, 348-357.

- Cejudo-Bastante, M.J.; Rivero-Granados, F.J.; Heredia, F.J. (2017). Improving the color and aging aptitude of Syrah wines in warm climate by wood-grape mix maceration. *Eur. Food Res. Technol.*, 243(4), 575-582.
- Chamkha, M.; Cathala, B.; Cheynier, V.; Douillard, R. (2003). Phenolic Composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot Noir Vintages. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3179–3184.
- Chang, X.; Heene, E.; Qiao, F.; Nick, P. (2011). The Phytoalexin Resveratrol Regulates the Initiation of Hypersensitive Cell Death in *Vitis* Cell. *PLoS One.*, 6(10), 26405.
- Chen, K.; Escott, C.; Loira, I.; Del Fresno, J.M.; Morata, A.; Tesfaye, W.; Calderon, F.; Benito, S.; Suárez-Lepe, J.A. (2016). The Effects of Pre-Fermentative Addition of Oenological Tannins on Wine Components and Sensorial Qualities of Red Wine. *Molecules*, 21(11), 1445.
- Cheng, G.; Jie-Qiong Fa, J.; Xi, Z.; Zhang, Z. (2015). Research on the quality of the wine grapes in corridor area of China. *Food Sci. Technol.*, 35(1), 38-44.
- Cheynier, V.; Scheider, R.; Salmon, J.; Fulcrand, H. (2010). Chemistry of Wine. *Comprehensive Natural Products II : Chemistry and Biology*, 3, 1119–1172.
- Chira, K.; Jourdes, M.; Teissedre, P.L. (2012). Cabernet sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. *Eur. Food Res. Technol.*, 234, 253–261.
- Clodoveo, M.L.; Dipalmo, T.; Rizzello, C.G.; Corbo, F.; Crupi, P. (2016). Emerging technology to develop novel red winemaking practices: An overview. *Innov. Food Sci. Emer. Technol.*, 38, 41–56.
- Codex Alimentarius Commission (2009). Joint FAO/WHO food standards program Report of the forty-first session of the Codex Committee on Food Additives: Shanghai, China, 16–20 March 2009 (FAO/WHO: Rome).
- Cohen, S.D.; Tarara, J.M.; Gambetta, G.A.; Matthews, M.A.; Kennedy, J.A. (2012). Impact of diurnal temperature variation on grape berry development, proanthocyanidin accumulation, and the expression of flavonoid pathway genes. *J. Exp. Bot.*, 63(7), 2655–2665.
- Darías-Martín, J.; Carrillo, M.; Díaz, E.; Boulton, R.B. (2001). Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chem.*, 73, 217–220.
- De Andrade-Neves, N.; De Araújo-Pantoja, L.; Soares-dos Santos, A. (2014). Thermovinification of grapes from the Cabernet Sauvignon and Pinot Noir varieties using immobilized yeasts. *Eur. Food Res. Technol.*, 238, 79–84.
- De Freitas, V.; Mateus, N. (2011). Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.*, 401, 1467-1477.
- De Llaudy, M.C.; Canals, R.; Canals, J.M.; Zamora F. (2008). Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. *Eur. Food Res. Technol.*, 226, 337-344.
- Del Rio, J. L. P.; Kennedy, J. A. (2006). Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 125–132.
- Deloire, A. (2010). Berry development– An overview. Part 1. Morphology and anatomy of a berry. *Berry development*.

- Díaz, J. ; Bernal, A.; Pomar, F.; Merino, F. (2001). Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science*, 161, 179–188.
- Dore, M.H.I. Climate change and changes in global precipitation patterns: What do we know?. (2005). *Environment International*, 31, 1167–1181.
- Duchêne, E.; Schneider, C. (2005). Grapevine and climatic changes: A glance at the situation in Alsace. *Agron. Sustain. Dev.*, 25, 93–99.
- Dumitriu, D.; Peinado, R. A.; Peinado, J.; De Lerma, N. L. (2015). Grape pomace extract improves the in vitro and in vivo antioxidant properties of wines from sun light dried Pedro Ximénez grapes. *J. Funct. Foods*, 17, 380-387.
- Dumitriu, D.; López de Lerma, N.; Cotea, V.; Zamfir, C.I.; Peinado, R.A. (2016). Effect of aging time, dosage and toasting level of oak chips on the color parameters, phenolic compounds and antioxidant activity of red wines (var. Fetească neagră). *Eur. Food Res. Technol.*, 242(12), 2171-2180.
- Dwyer, K.; Hosseinian, F.; Rod, M. (2014). The Market Potential of Grape Waste Alternatives, *J. Food Res.*, 3(2).
- Eiro, M.J.; Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.*, 50(25), 7461-6.
- Fang, F.; Li, J.M.; Zhang, P.; Tang, K.; Wang, W.; Pan, Q.H.; Huang, W.D. (2008). Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines. *Food Res. Int*, 41(1), 53–60.
- Favre, G.; González-Neves, G.; Piccardo, D.; Gómez-Alonso, S.; Pérez-Navarro, J.; Hermosín-Gutiérrez, I.(2018). New acylated flavonols identified in *Vitis vinifera* grapes and wines. *Food Res. Int.*, 112, 98–107.
- Feringa, H.H.; Laskey, D.A.; Dickson, J.E.; Coleman, C. (2011). The effect of grape seed extract on cardiovascular risk markers: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Am. Diet Assoc.*, 111(8), 1173-81.
- Fernandes, A.; Oliveira, J.; Teixeira, N.; Mateus, N.; De Freitas, V. (2017). A review of the current knowledge of red wine colour. *J. Int. .Sci. Vigne Vin*, 51(1), 1-21.
- Foiklang, S.; Wanapat, M.; Norrapoke, T. (2016). Effect of Grape Pomace Powder, Mangosteen Peel Powder and Monensin on Nutrient Digestibility, Rumen Fermentation, Nitrogen Balance and Microbial Protein Synthesis in Dairy Steers. *Asian-Australas J. Anim. Sci.*, 10, 1416-23.
- Frutos, P.; Hervás, G.; Giráldez, F.J.; Mantecón, A.R. (2004) .Review. Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.*, 2 (2), 191-202.
- Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Oszmanski, J.; Moutounet, M. (1997). An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytochemistry*, 46, 223-227.
- Gaiotti, F.; Pastore, C.; Filippetti, I.; Lovat, L.; Belfiore, N.; Tomasi, D.(2018). Low night temperature at veraison enhances the accumulation of anthocyanins in Corvina grapes (*Vitis Vinifera* L.). *Scientific Reports*, 8, 8719.
- Gallego, A.L ; Guesalaga, A.R. ; Bordeu, E.; González, A.S. (2011). Rapid measurement of phenolics compounds in red wine using Raman spectroscopy. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement.*, 60(2), 507-512.

- Galpin, V.C. (2006). A comparison of legislation about winemaking additives and processes. *Cape wine master diploma assignment, South Africa*.
- Ganichot, B. (2002). Evolution of harvesting dates in meridional Rhône. *Proceedings of 6th Rencontres rhodaiennes, Orange, France, 38–41*.
- García, T. (2010). Análisis de las preferencias del consumo de vinos IGP por parte del segmento joven de la población. Aplicación a la D.O. Navarra. *International EAAE-SYAL Seminar – Spatial Dynamics in Agri-food Systems*.
- García-Estévez, I.; Alcalde-Eon, C.; Puente, V.; Escribano-Bailón, M.T. (2017). Enological Tannin Effect on Red Wine Color and Pigment Composition and Relevance of the Yeast Fermentation Products. *Molecules, 22(12), 2046*.
- Garcia-Jares, C.; Vazquez, A.; Lamas, J.P.; Pajaro, M.; Alvarez-Casas, M.; Lores, M. (2015). Antioxidant White Grape Seed Phenolics: Pressurized Liquid Extracts from Different Varieties. *Antioxidants, 4(4), 737–749*.
- García-Marino, M.; Hernández-Hierro, J.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. (2010). Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Anal. Chim. Acta., 660, 134-142*.
- Garde-Cerdán, T.; Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Crc. Cr. Food Sci. Techol., 17, 438-447*.
- Garrido, J.; Borges, F. (2013) Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food Res. Int., 54, 1844–1858*.
- Gazzola, D.; Vincenzi, S.; Gastaldon, L.; Tolin, S.; Pasini, G.; Curioni, A. (2014). The proteins of the grape (*Vitis vinifera* L.) seed endosperm: fractionation and identification of the major components. *Food Chem., 155, 132–139*.
- Gil, M.; Kontoudakis, N.; Gonzalez, E.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J.M.; Zamora, F. (2012). Influence of grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines. *J. Agric. Food Chem., 60, 7988-8001*.
- Girard, B.; Kopp, T.G.; Reynolds, A.G.; Cliff, M. (1997). Influence of vinification treatments on aroma constituents and sensory descriptors of Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic. 48, 198-206*.
- Gómez-Míguez, M.; Heredia, F.J. (2004). Effect of the maceration technique on the relationships between anthocyanin composition and objective color of Syrah wines. *J. Agric. Food Chem., 52(16), 5117-5123*.
- Gómez-Míguez, M.; González-Manzano, S.; Escribano-Bailón, M.T.; Heredia, F.J.; Santos-Buelga, C. (2006). Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin-3-glucoside. *J. Agric. Food Chem., 54, 5422-5429*.
- Gómez-Míguez, M.; González-Miret Martín, M.L.; Heredia-Mira, F.J. (2007). Evolution of Color and Anthocyanin Composition of Syrah Wines Elaborated With Pre-Fermentative Cold Maceration. *J. Food Eng., 79, 271-278*.
- Gómez-Míguez, J.; González-Miret Martín, M.L.; Hernanz-Vila, M.L.; Fernández- Recamales, M. Á.; Vicario- Romero, I.M.; Heredia, F.J. (2007). Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *J. Food Eng., 78(1), 238-245*.
- Gómez-Plaza, E.; Gil-Munoz, R.; Lopez-Roca, J.M.; Martinez-Cutillas, A.; Fernandez-Fernandez, J.I. (2001). Phenolic compounds and color stability of red wines: Effect of skin

maceration time. *Am. J. Enol. Vitic.*, *52*, 266-270.

- González-Manzano, S.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C.(2004). Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta*, *513*, 283-289.
- González-Manzano, S.; Dueñas, M.; Rivas-Gonzalo, J.; Escribano-Bailón, M.; Santos-Buelga, C. (2009). Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chem.*, *114*, 649-656.
- González-Neves, G.; Gil, G.; Barreiro, L.; Favre, G.(2010). Pigment profile of red wines cv. Tannat made with alternative winemaking techniques. *J. Food Compos. Anal.*, *23*, 447-454.
- Gonzalez-Neves, G.; Favre, G.; Piccardo, D.; Graciela, G.(2016). Anthocyanin profile of young red wines of Tannat, Syrah and Merlot made using maceration enzymes and cold soak. *Int. J. Food Sci. Tech.*, *51*, 260-267.
- Gonzalez-Paramás, A.M.; Esteban-Ruano, S.; Santos-Buelga, C.; De Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J.C. (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *J. Agric. Food Chem.* *52*(2), 234-238.
- González-San José, M.L. (2005). Transferencia de color de la uva al vino. *ACE Revista de Enología*, *61*.
- Gordillo, B.; López-Infante, M.I.; Ramírez-Pérez, P.; González-Miret, M.L.; Heredia, F.J.(2010). Influence of prefermentative cold maceration on the color and anthocyanic copigmentation of organic Tempranillo wines elaborated in a warm climate. *J. Agric. Food Chem.*, *58*(11), 6797-6803.
- Gordillo-Arrobas, B.; Rodríguez-Pulido, F.J.; Escudero-Gilete, M.L.; González-Miret, M.L.; Heredia, F.J. (2012). Comprehensive colorimetric study of anthocyanic copigmentation in model solutions. Effects of pH and molar ratio. *J. Agric. Food Chem.* *2012*, *60*, 2896-2905.
- Gordillo-Arrobas, B.; Cejudo-Bastante, M.J.; Rodríguez-Pulido, F.J., González-Miret Martín, M.L., Heredia-Mira, F.J. (2013). Application of the differential colorimetry and polyphenolic profile to the evaluation of the chromatic quality of Tempranillo red wines elaborated in warm climate. Influence of the presence of oak wood chips during fermentation. *Food Chem.*, *141* (3), 2184-2190.
- Gordillo-Arrobas, B.; Cejudo-Bastante, M.J.; Rodríguez-Pulido, F.J.; Jara-Palacios, M.J.; Ramírez-Pérez, P.; González-Miret, M.L.; Heredia, F.J. (2014). Impact of adding white pomace to red grapes on the phenolic composition and color stability of Syrah wines from a warm climate. *J. Agric. Food Chem.*, *62*(12), 2663-2671.
- Gordillo-Arrobas, B.; Rodríguez-Pulido, F.J.; González-Miret, M.L.; Quijada-Morín, N.; Rivas-Gonzalo, J.C.; García-Estévez, I.; Heredia, F.J.; Escribano-Bailón, M.T. (2015). Application of differential colorimetry to evaluate anthocyanin-flavonol-flavanol ternary copigmentation interactions in model solutions. *J. Agric. Food Chem.*, *63*, 7645-7653.
- Gordillo-Arrobas, B.; Baca-Bocanegra, B.; Rodríguez-Pulido, F.J., González-Miret Martín, M.L., García-Estévez, I.; Quijada-Morín, N.; Heredia, F.J.; Escribano-Bailón, M.T. (2016). Optimisation of an oak chips-grape mix maceration process. Influence of chip dose and maceration time. *Food Chem.*, *206*, 249-259.
- Guchu, E.; Ebeler, S.E.; Lee, J.; Mitchell, A.E. (2015) Monitoring selected monomeric polyphenol composition in pre- and post-fermentation products of *Vitis vinifera* L. cv. Airen and cv. Grenache noir. *LWT - Food Sci. Technol.*, *60*, 552-562.

- Guerrand, D.; Gervais, J.P. (2002) . Extraction of red wine phenolics during fermentation: A new pectinase preparation. *Aust. N.Z. Grapegr. Winemaker* 2002, 466, 61-64.
- Gutierrez, I.; Lorenzo, E.; Espinosa, A. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chem.*, 92(2), 269–283.
- Harbertson, J.F.; Parpinello, G.P.; Heymann, H.; Downey, M.O. (2012) . Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. *Food Chem.*, 131, 999-1008.
- Harrington, J.F. (1972). Seed Storage and longevity. *Seed Biology (ed. T. Kozlosky) New York, USA*, 142-145.
- He, F.; Pan, Q.; Shi, Y.; Duan, C. (2008). Chemical synthesis of proanthocyanidins *in vitro* and their reactions in aging wines. *Molecules.*, 13(12), 3007–3032.
- He, J.; Giusti, M.M. (2010) Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* , 1,163–87.
- He, F.; Liang, N.; Mu, L.; Pan, Q.; Wang, J.; Reeves, M.J.; Duan, C. (2012). Anthocyanins and Their Variation in Red Wines II. Anthocyanin Derived Pigments and Their Color Evolution. *Molecules*, 17(2), 1483-1519.
- Heredia, F.J.; Francia-Aricha, E.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Vicario, I.M.; Santos-Buelga, C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes. I. pH effect. *Food Chem.* 63(4), 491-498.
- Heredia, F.J.; Álvarez, C.; González-Miret, M. L. ; Ramírez, A. (2004). CromaLab, Análisis de color. Sevilla. España. Registro General de la Propiedad Intelectual. SE1052-04
- Heredia-Mira, F.J.; Escudero-Gilete, M.J.; Hernanz-Vila, M.D.; Gordillo-Arrobas, B.; Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; González-Miret, M.L. (2010). Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. *Food Chem.*, 118(2), 377-383.
- Hernández, I.; Alegre, L.; Munné-Bosch, S. (2006). Enhanced oxidation of flavan-3-ols and proanthocyanidin accumulation in water-stressed tea plants. *Phytochemistry*, 67(11), 1120-6.
- Hernanz, D.; Recamales, A.F.; González-Miret, M.L.; Gómez-Míguez, M. J.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. (2007). Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale. *J. Food Eng.*, 80, 327-335.
- Hidalgo-Togores, J. (2011). Elaboración de vinos tintos y claretes *Tratado de enología Vol.I, 2nd ed., Mundi Prensa: Madrid, Spain*
- Huglin, P.; Schneider, C. (1998). *Biologie et écologie de la vigne, 2nd ed. Éditions Tec & Doc Lavoisier: Cachan, France.*
- Hawkins, E.; Ortega, P.; Suckling, E. (2017). Estimating Changes in Global Temperature since the Preindustrial Period. *Bulletin of the American Meteorological Society* , 98(9), 1841-1856.
- Ikerfel-MAPA (2000): Las denominaciones de origen de vinos en el mercado nacional.
- Jackson, R.S. (2008). Wine Science: Principles and Applications. *Food Science and Technology.*
- Jandera, P.; Skeifíková, V.; Rehová, L.; Hájek, T.; Baldriánová, L.; Skopová, G.; Kellner, V.,

- Horna, A. (2005). RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a CoulArray detector. *J. Sep. Sci.*, 28(9-10), 1005-22.
- Jara-Palacios, M.J.; Hernanz, D.; Escudero-Gilete, M.L.; Heredia, F.J. (2014a). Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *Food Res. Int.*, 66, 150–157.
 - Jara-Palacios, M. J.; Hernanz, D.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Escudero-Gilete, M. L.; Heredia, F.J. (2014b). Detailed phenolic composition of white grape by-products by RRLC/MS and measurement of the antioxidant activity. *Talanta*, 125, 51–57.
 - Jara-Palacios, M.J.; Gordillo, B.; González-Miret, M.L.; Hernanz, D.; Escudero-Gilete, M. L.; Heredia, F.J. (2014c). Comparative Study of the Enological Potential of Different Winemaking Byproducts: Implications in the Antioxidant Activity and Color Expression of Red Wine Anthocyanins in a Model Solution. *J. Agric. Food Chem*, 62, 6975-6983.
 - Jara-Palacios, M.J.; Hernanz-Vila, M.D.; Cifuentes-Gomez, T.; Escudero-Gilete, M.L.; Heredia-Mira, F. J.; Spencer, J.P. (2015). Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chem.*, 183, 78-82.
 - Jara-Palacios, M.J.; Hernanz-Vila, M.D.; Escudero-Gilete, M.L.; Heredia, F. J. (2016). The Use of Grape Seed Byproducts Rich in Flavonoids to Improve the Antioxidant Potential of Red Wines. *Molecules*, 21(11), 1526-1538.
 - Jayaprakasha,G.K.; Singh, R.P.;Sakariah,K.K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem.*, 73 ,3 ,285-290.
 - Jian, W.;He, D.; Song, S. (2016). Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling Studies of New Oxadiazole-Stilbene Hybrids against Phytopathogenic Fungi. *Scientific Reports*, 6, 31045.
 - Jing, P.; Bomser, J.A.; Schwartz; S.J.; He, J.; Magnuson, B.A.; Giusti, M.M. (2008). Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *J. Agric. Food Chem.*, 56(20), 9391-8.
 - Jones, G.V. (2007). Climate Change: Observations, Projections, and General Implications for Viticulture and Wine Production. *Working Paper 7, Economics Department Walla Walla: Whitman College.*
 - Jones, G.V. (2018). The Climate Component of Terroir. *Elements*, 14, 167–172.
 - Kennedy, J.A.; Matthews, M.A.; Waterhouse, A.L. (2002). Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 268-274.
 - Kennedy, J.A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Cien. Inv. Agr.*, 35(2), 107-120.
 - Khoo, H.E.; Azlan, A.; Tang, S.T.; Lim, S.M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.*, 61(1),1361779.
 - Kocabey, N.; Yilmaztekin, M.; Hayaloglu, A.A. (2016). Effect of maceration duration on physicochemical characteristics, organic acid, phenolic compounds and antioxidant activity of red wines from *Vitis vinifera* L. Karaoglan. *J. Food Sci. Tech.*, 53(9), 3557-3565.
 - Kontoudakis, N.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J.M.; De Freitas, V.; Zamora, F. (2011a). Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and

quality. *Food Chem.*, 124, 767-774.

- Kontoudakis, N.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J.M; Zamora, F. (2011b) .Use of unripe grapes harvested during cluster thinning as a method for reducing alcohol content and pH of wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2011, 17, 230–238.
- Kovac, V.; Alonso, E.; Revilla, E. (1995) The Effect of Adding Supplementary Quantities of Seeds During Fermentation on the Phenolic Composition of Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 363-367.
- Koyama, K.; Goto-Yamamoto, N.; Hashizume, K. (2007). Influence of Maceration Temperature in Red Wine Vinification on Extraction of Phenolics from Berry Skins and Seeds of Grape (*Vitis vinifera*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71 (4), 958–965, 200.
- Kudo, M.; Sodeyama, M.(2002). Weight distribution of red wine polyphenols affected by length of maceration. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 332A.
- Kumar, S.; Pandey, A. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 1-16.
- Kyraleou, M.; Tzanakouli, E.; Kotseridis, Y.; Chira, K.; Ligas, I.; Kallithraka, S.; Teissedre, P.L. (2016). Addition of wood chips in red wine during and after alcoholic fermentation: differences in color parameters, phenolic content and volatile composition. *OENO ONE*, 50 (4), 209-222.
- Larkin, P. (2011). Infrared and Raman Spectroscopy. *Principles and Spectral Interpretation, first Edition. Elsevier.*
- Leolini, L.; Moriondo, M.; Fila, G.; Costafreda-Aumedes, S.; Ferrise, R.; Bindi, M. (2018). Late spring frost impacts on future grapevine distribution in Europe. *Field Crops Research*, 222, 197-208.
- Li, L.; Sun, B. (2017). Grape and wine polymeric polyphenols: Their importance in enology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 21, 1-17.
- Li, Z.J.; Liu, M.; Dawuti, G., Dou, Q.; Ma, Y.; Liu, H.G., Aibai, S. (2017). Antifungal Activity of Gallic Acid In Vitro and In Vivo. *Phytother. Res.*, 31(7), 1039-1045.
- Liu, Y.; Liang, N.; Wang, J.; Pan, Q.; Duan, C.(2013). Effect of the prefermentative addition of five enological tannins on anthocyanins and color in red wines. *J. Food Sci.*, 78(1), 25-30.
- López de Lerma, N.; Peinado, J.; Peinado, R.A. (2013) .*In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of musts and skin extracts from off-vine dried *Vitis vinifera* cv. “Tempranillo” grapes. *J. Funct. Foods*, 5(2), 914-922.
- Lorincz, G.Y.; Kállay, M.; Pásti, G.Y.(1998). Effect of carbonic maceration on phenolic composition of red wines. *Acta Alimentaria*, 27,341-355.
- Lorrain, B.; Ky, I.; Pechamat, L.; Teissedre, P.L. (2013). Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines, and Extracts. *Molecules.*, 18(1), 1076–1100.
- Loureiro, V.; Brasil, R.; Malfeito-Ferreira, M. (2016). A New Wine Tasting Approach Based on Emotional Responses to Rapidly Recognize Classic European Wine Styles. *Beverages*, 2(1), 6.
- Lukic, I.; Budic-Leto, I.; Bubola, M.; Damijanac, K.; Staver, M.(2017). Pre-fermentative cold maceration, saignée, and various thermal treatments as options for modulating volatile aroma and phenol profiles of red wine. *Food Chem.*, 224, 251-261.
- Mandrile, L.; Zeppa, G.; Giovannozzi, A.M. ; Rossi, A.M. (2016). Controlling protected

- designation of origin of wine by Raman spectroscopy. *Food Chem.*, 211, 260- 267.
- Martínez, J. A.; Melgosa, M.; Pérez, M. M.; Hita, E.; Negueruela, A. I. (2001). Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Sci. and Technol. Int.*, 7, 439-444.
 - Martínez de Toda, F. (1991). *Biología de la vid: fundamentos biológicos de la viticultura.*, Mundi-Prensa: Madrid, Spain., 346.
 - Mattivi, F.; Guzzon, R.; Vrhovsek, U.; Stefanini, M.; Velasco, R. (2006) Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 54(20), 7692-702.
 - Mazurek, S.; Fecka, I.; Węglińska, M.; Szostak, R. (2018). Quantification of active ingredients in *Potentilla tormentilla* by Raman and infrared spectroscopy. *Talanta*, 189, 308-314.
 - McRae, J.M.; Kennedy, J.A. (2011). Wine and Grape Tannin Interactions with Salivary Proteins and Their Impact on Astringency: A Review of Current Research. *Molecules*. 16(3), 2348–2364.
 - Mencarelli, F.; Bellincontro, A.; Nicoletti, I.; Cirillo, M.; Muleo, R.; Corradini, D. (2010). Chemical and Biochemical Change of Healthy Phenolic Fractions in Winegrape by Means of Postharvest Dehydration. *J. Agric. Food Chem.*, 58(13), 7557-7564.
 - Mendes, J.A.S.; Prozil, S.O.; Evtuguin, D.V.; Lopes, L.P.C. (2013). Towards comprehensive utilization of winemaking residues: Characterization of grape skins from red grape pomaces of variety Touriga Nacional. *Ind. Crop. Prod.*, 43, 25-32.
 - Middleton, E. J. (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 439, 175–182.
 - Mignani, A. G. ; Ciaccheri, L.; Mencaglia, A.A. ; Di Sanzo, R.; Carabetta, S.; Russo, M. (2016). Dispersive Raman Spectroscopy for the Nondestructive and Rapid Assessment of the Quality of Southern Italian Honey Types. *J. Light. Technol.* , 34(19) , 4479-4485
 - Miljić, U.; Puškaš, V.; Vučurović, V.; Razmovski, R. (2014). Acceptability of wine produced with an increased content of grape seeds and stems as a functional food. *J. Inst. Brew.*, 120, 149–154.
 - Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.*, 43(7), 1844-1855
 - Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O; Ricardo da Silva, J.M. (2003). Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6475–6481
 - Monagas, M.; Bartolome, B.; Gomez-Cordoves, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food. Sci.*, 45(2), 85-118.
 - Moreno-Vigara, J.J; García-Mauricio, J.C. (2013) Pedro Ximénez and Malaga. *Sweet, Reinforced and Fortified Wines. Grape Biochemistry, Technology and Vinification*, Willey-Blackwell: New Jersey, USA, 251-267.
 - Muir, R.M.; Ibáñez, A.M.; Uratsu, S.L.; Ingham, E.S.; Leslie, C.A.; McGranahan, G.H.; Batra, N.; Goyal, S.; Joseph, J.; Jemmis, E.D.; Dandekar, A.M.(2011). Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*). *Plant Mol. Biol.*, 75(6), 555-565.
 - Naumann, H.D.; Muir, J.P.; Lambert, B.D.; Tedeschi, L.; Kothmann, M.M. (2013) Condensed tannins in the ruminant environment: A perspective on biological activity. *J.*

Agr. Sci., 1(1), 8-20.

- Neves, A.C.; Spranger, M.I.; Zhao, Y.; Leandro, M.C.; Sun, B. (2010). Effect of addition of commercial grape seed tannins on phenolic composition, chromatic characteristics, and antioxidant activity of red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 11775-11782.
- Nielsen, (2009). Estudio de base sobre el consumidor español de vino con segmentación actitudinal de consumidores. Genoma del consumidor del vino en España. *Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, FEV y OeMv*.
- Nogales-Bueno, J.; Hernández-Hierro, J.M.; Rodríguez-Pulido, F.J.; Heredia, F.J.(2014) . Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skins in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: a preliminary approach. *Food Chem.*, 152, 586-591.
- Nogales-Bueno, J.; Baca-Bocanegra, B.; Rooney, A.; Hernández-Hierro, J.M.; Heredia, F.J.; Byneb, H.J. (2017a). Linking ATR-FTIR and Raman features to phenolic extractability and other attributes in grape skin. *Talanta*, 167, 44-50.
- Nogales-Bueno, J.; Baca-Bocanegra, B.; Rooney, A.; Hernández-Hierro, J.M.; Byrne, H.J.; Heredia, F.J. (2017b). Study of phenolic extractability in grape seeds by means of ATR-FTIR and Raman spectroscopy. *Food Chem.*, 232, 602-609.
- Nogales-Bueno, J.; Baca-Bocanegra, B.; Jara-Palacios, M.J.; Hernández-Hierro, J.M.; Heredia, F.J. (2017c). Evaluation of the influence of white grape seed extracts as copigment sources on the anthocyanin extraction from grape skins previously classified by near infrared hyperspectral tools. *Food Chem.*, 225, 1685-1690.
- Obradovic, D.; Schulz, M.; Oatey, M. (2005). Addition of natural grape tannins to enhance the quality of red wine. *Aust. N.Z. grapegrow. winemak.*, 493, 52-54.
- Obreque-Slier, E.; Peña-Neira, A.; López-Solís, R.; Zamora-Marín, F.; Ricardo-da Silva, J.M., Laureano, O. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58(6), 3591-9.
- OIV. 2006. International Oenological Codex. *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Paris, France*.
- OIV. 2016. Código internacional de prácticas enológicas. *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Paris, France*.
- Oliveira, J.; Mateus, N.; De Freitas, V. (2013). Flavanols: Catechins and Proanthocyanidins. *Natural Products*, 1753-1801.
- Özcan, M.M.; Juhaimi, F.A.; Gülcü, M.; Uslu, N.; Geçgel, Ü.; Ghafoor, K.; Dursun, N. Effect of harvest time on physico-chemical properties and bioactive compounds of pulp and seeds of grape varieties (2017). *J. Food Sci. Technol.*, 54(8), 2230-2240.
- Panprivech, S.; Lerno, L.A.; Brenneman, C.A.; Block, D.E.; Oberholster, A. (2015). Investigating the Effect of Cold Soak Duration on Phenolic Extraction during Cabernet Sauvignon Fermentation. *Molecules*, 20(5), 7974–7989.
- Parga-Dans, E.; Alonso-González, P. (2017). ‘Marketing quality’ in the food sector: Towards a critical engagement with the ‘quality turn’ in wine. *Geoforum*, 85, 5-8.
- Parker, M.; Smith, P.A.; Birse, M.; Francis, I.L.; Kwiatkowski, M.J.; Lattey, K.A.; Liebich, B.; Herderich, M.J. (2007). The effect of pre- and post-ferment additions of grape derived tannin on Shiraz wine sensory properties and phenolic composition. *Aust. J. Grape Wine*

Res., 13(1), 30-37.

- Pauling, L. (1940). The nature of the chemical bond and the structure of molecules and crystals. *An introduction to modern structural chemistry, 2nd Edn. Oxford University Press, London.*
- Pedroza, M.A.; Carmona, M.; Alonso, G.L.; Salinas, M.R.; Zalacain, A. (2013). Pre-bottling use of dehydrated waste grape skins to improve colour, phenolic and aroma composition of red wines. *Food Chem.*, 136, 224–236.
- Peinado, J.; Lopez de Lerma, N.; Moreno, J.; Peinado, R.A. (2009). Antioxidant activity of different phenolics fractions isolated in must from Pedro Ximenez grapes at different stages of the off-vine drying process. *Food Chem.*, 114, 1050–1055.
- Peinado, J.; López de Lerma, N.; Peralbo-Molina, A.; Priego-Capote, F.; De Castro, C.; McDonagh, B. (2013). Sunlight exposure increases the phenolic content in postharvested white grapes. An evaluation of their antioxidant activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Funct. Foods*, 5 (4), 1566-1575.
- Pellegrini, N.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Brenna, O.; Brighenti, F.; Pietta, P. (2000). Polyphenol content and total antioxidant activity of vini novelli (young red wines). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 732-735.
- Perestrelo, R.; Lu, Y.; Santos, S.A.O.; Silvestre, A.J.D.; Neto, C.P.; Câmara, J.S.; Rocha, S.M. (2012). Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra Vitis vinifera L. grape skins by HPLC–DAD–ESI–MSn. Novel phenolic compounds in Vitis vinifera L. grape. *Food Chem.*, 135, 94–104.
- Pinelo, M.; Arnous, A.; Meyer, A.S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 579–590.
- Puškaš, V.S.; Miljić, U. (2012). Effects of fining on phenolic compounds and colour of red wine obtained with addition of increased amounts of grape solid phase in pomace. *Hemijaska industrija*, 66(5), 727-734.
- Püssa, T.; Floren, J.; Kuldkepp, P.; Raal, A. (2006). Survey of grapevine Vitis vinifera stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 54(20), 7488-94.
- Quijada-Morín, N.; Hernández-Hierro, J.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailon, M.T. (2015). Extractability of Low Molecular Mass Flavanols and Flavonols from Red Grape Skins. Relationship with Cell Wall Composition at Different Ripeness Stages. *J. Agric. Food Chem.*, 63 (35), 7654–7662.
- Quijada-Morin, N.; Garcia-Estevez, I.; Nogales-Bueno, J.; Rodriguez-Pulido, F.J.; Heredia, F.J.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailon, M.T.; Hernandez-Hierro, J.M. (2016). Trying to set up the flavanolic phases during grape seed ripening: A spectral and chemical approach. *Talanta*, 160, 556-561.
- Resco, P.; Iglesias, A.; Bardaji, I.; Sotes, V. (2016). Exploring adaptation choices for grapevine regions in Spain. *Regional Environmental Change*, 16(4), 979-93.
- Revilla, E.; Ryan, J.M.; Kovac, V.; Nemanic, J. (1998). The effect of the addition of supplementary seeds and skins during fermentation on the chemical and sensory characteristics of red wines. *Developments in Food Science*, 583-596.
- Ribereau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Doneche, B.; Lonvaud, A. (2006). The Microbiology of Wine and Vinifications. *The chemistry of wine stabilization and treatments. In P. Ribéreau-*

Gayon (Ed.), *Handbook of enology*. Eds.; John Wiley and Sons, LTD: Chinchester, UK, 2006; Vol.1 & Vol.2.

- Río Segade, S.; Torchio, F.; Gerbi, V.; Quijada-Morin, N.; García-estevez, I.; Giacosa, S.; Escribano-Bailón, M.T.; Rolle, L. (2016). Chemical and morphological characterization of Chardonnay and Gewürztraminer grapes and changes during chamber-drying under controlled conditions. *Food Chem.*, 199, 893-901.
- Rivero, F.J.; Gordillo, B.; Jara-Palacios, M.J.; González-Miret, M.L.; Heredia, F.J. (2017). Effect of addition of overripe seeds from white grape by-products during red wine fermentation on wine colour and phenolic composition. *LWT-Food Sci.Technol.*, 84, 544–550.
- Rivero, F.J.; Jara-Palacios, M.J.; Gordillo, B.; Heredia, F.J.; González-Miret, M.L. (2019). Impact of a post-fermentative maceration with overripe seeds on the color stability of red wines. *Food Chem.*, 272, 329-336.
- Rodríguez-Pulido, F.J.; Gómez-Robledo, L.; Melgosa, M.; Gordillo, B.; González-Miret, M.L.; Heredia, F.J. (2012). Ripeness estimation of grape berries and seeds by image analysis. *Comput. Electron. Agr.*, 82, 128–133.
- Ruggieri, L.; Cadena, E.; Martínez-Blanco, J.; Gasol, C.M.; Rieradevall, J.; Gabarrell, X.; Gea, T.; Sort, X.; Sánchez, A. (2009). Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process. *J. Clean. Prod.*, 17(9), 830-838.
- Ruiz, M.J.; Zea, L.; Moyano, L.; Medina, M. (2010). Aroma active compounds during the drying of grapes cv. *Pedro Ximenez* destined to the production of sweet Sherry wine. *Eur. Food Res. Technol.*, 230(3), 429-435.
- Ruiz, M.J.; Moyano, M.L.; Zea, L. (2014). Changes in aroma profile of musts from grapes cv. *Pedro Ximenez* chamber-dried at controlled conditions destined to the production of sweet Sherry wine. *LWT-Food Sci.Technol.*, 59, 560-565.
- Rygula, A. ; Majzner, K.; Marzec, K.M. ; Kaczor, A.; Pilarczyk, M.; Baranska, M. (2013) Raman spectroscopy of proteins: A review. *J. Raman Spect.*, 44, 1061-1076.
- Sacchi, K.L.; Bisson, L.F.; Adams, D.O. (2005). A Review of the Effect of Winemaking Techniques on Phenolic Extraction in Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 56(3), 197-206.
- Santos-Buelga, C. ; De Freitas, V. (2009). Influence of Phenolics on Wine Organoleptic Properties. In M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*, (pp. 529-570). *Science+Business Media*.
- Schurer, A.P.; Mann, M.E.; Hawkins, E.; Tett, S.F.B ; Hegerl, G.C. (2017). Importance of the Pre-Industrial Baseline in Determining the Likelihood of Exceeding the Paris Limits. *Nat. Clim. Chang.*, 7(8), 563–567.
- Serratosa, M.P.; Lopez-Toledano, A.; Merida, J.; Medina, M. (2008). Changes in color and phenolic compounds during the raisining of grape cv. *Pedro Ximénez*. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 2810–2816.
- Serratosa, M. P.; Marquez, A.; Moyano, L.; Zea, L.; Merida, J. (2014). Chemical and morphological characterization of Chardonnay and Gewürztraminer grapes and changes during chamber-drying under controlled conditions. *Food Chem.*, 159, 128-136.
- Setford, P.C.; Jeffery, D.W.; Grbin, P.R.; Muhlack, R.A. (2017). Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of process modelling. *Trends Food Sci Technol.*, 69, 106-117.

- Shi, J.; Yu, J.; Pohorly, J.E.; Kakuda, Y. (2003). Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *J. Med. Food., Winter, 6(4), 291-9.*
- Singh, M.; Kaur, M.; Silakari, O. (2014). Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *Eur J Med Chem., 84, 206-239.*
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic. 16, 144-158.*
- Souquet, J.M.; Labarbe, B.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M. (2000). Phenolic composition of grape stems. *J. Agric. Food Chem., 48(4), 1076-80.*
- Sousa, A.; Araújo, P.; Cruz, L.; Brás, N.F.; Mateus, N., De Freitas, V. (2014). Evidence for Copigmentation Interactions between Deoxyanthocyanidin Derivatives (Oaklins) and Common Copigments in Wine Model Solutions. *J. Agric. Food Chem., 62, 6995-7001*
- Stafne, E. (2011) Etapas del Desarrollo de la Uva (Stages of Grape Berry Development).
- Steiner, B. (2009). Old World wines revisited: consumers' valuation of Spanish and German wines in the UK wine market. *University of Alberta, Dept of Rural Economy. Staff paper, 09-03.*
- Sun, B.; Spranger, I.; Roque-do-Vale, F.; Leandro, C.; Belchoir, P. (2001). Effect of different winemaking technologies on phenolic composition in Tinta Miúda red wines. *J. Agric. Food Chem., 49, 5809-5816.*
- Swanson, B.G. (2003). Flavans. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition).*
- Tanwar, B.; Modgil, R. Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits (2012). *Spatula DD, 2(1), 59-68.*
- Talaverano, M. I.; Moreno, D.; Rodríguez Pulido, F.J.; Valdés, M. E.; Gamero, E.; Jara-Palacios, M.J.; Heredia, F.J. (2016). Effect of early leaf removal on Vitis Vinifera L. cv. Tempranillo seeds during ripening based on chemical and image analysis. *Scientia Horticulturae., 209, 148-155.*
- Tarara, J.M.; Lee, J.; Spayd, S.E.; Scagel, C.F. (2008). Berry Temperature and Solar Radiation Alter Acylation, Proportion, and Concentration of Anthocyanin in Merlot Grapes. *Am. J. Enol. Vitic., 59, 235-247.*
- Teixeira, A.; Eiras-Dias, J.; Castellarin, S.D.; Gerós, H. (2013). Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *Int. J. Mol. Sci., 14, 18711-18739.*
- Teixeira, J.; Gaspar, A.; Garrido, E.M.; Garrido, J.; Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International.*
- Teixeira, N.; Cruz, L.; Brás, N. F.; Mateus, N.; Ramos, M. J.; De Freitas, V. (2013). Structural Features of Copigmentation of Oenin with Different Polyphenol Copigments. *J. Agric. Food Chem., 61, 6942-6948.*
- Teixeira, A.; Baenas, N.; Dominguez-Perles, R.; Barros, A.; Rosa, E.; Moreno, D.A.; Garcia-Viguera, C. (2014). Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int. J. Mol. Sci., 15(9), 15638-78.*
- Terrier, N.; Poncet-Legrand, C.; Cheynier, V. (2009). Flavanols, flavonols and dihydroflavonols. *In Wine Chemistry and Biochemistry. Moreno-Arribas, M; Polo, M. (Eds). Springer: USA, 463-507.*
- Tomi, I.H.R.; Ali, G.Q.; Jawad, A.H.; Yousif, E. (2017). Synthesis and characterization of

- gallic acid derivatives and their utilized as organic photo-stabilizers for poly (vinyl chloride). *J. Polym. Res.*, 28(4), 119.
- Torreggiani, A.; Tamba, M.; Trincherò, A.; Bonora, S. (2005). Copper (II)-Quercetin complexes in aqueous solutions: Spectroscopic and kinetic properties. *J. Mol. Struct.* 744-747, 759-766.
 - Trouillas, P.; Sancho-García, J. C.; De Freitas, V.; Gierschner, J.; Otyepka, M.; Dangles, O. (2016). Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chem. Rev.*, 116, 4937-4982.
 - Valentin, D.; Parr, W.P.; Peyron, D.; Grose, C.; Ballester, J. (2016). Colour as a driver of Pinot noir wine quality judgments: An investigation involving French and New Zealand wine professionals. *Food Qual. Prefer.*, 48, 251-261.
 - Van Leeuwen, C.; Darriet, P. (2016). The Impact of Climate Change on Viticulture and Wine Quality. *Journal of Wine Economics*, 11(1), 150–167.
 - Vanzo A., Cecotti R., Vrhovsek U., Torres A.M., Mattivi F., Passamonti S. (2007). The fate of trans-caftaric acid administered into the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.*, 55(4), 1604-1611.
 - VenuGopal, K.S.; Cherita, C.; Anu-Appaiah, K.A. (2018). Augmentation of chemical and organoleptic properties in *Syzygium cumini* wine by incorporation of grape seeds during vinification. *Food Chem.*, 242, 98-105.
 - Versari, A.; Parpinello, G.P.; Mattioli, A.U. (2007). Characterisation of Colour Components and Polymeric Pigments of Commercial Red Wines by Using Selected UV-Vis Spectrophotometric Methods. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 28(1), 6-10.
 - Versari, A.; Du Toit, W.; Parpinello, G.P. (2013). Oenological tannins: a review. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 19(1), 1-10.
 - Villangó, S.; Pásti, G.; Kállay, M.; Leskó, A.; Balga, I.; Donkó, A.; Ladányi, M.; Pálfi, Z.; Zsófi, Z. (2015). Enhancing phenolic maturity of Syrah with the application of a new foliar spray. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 36 (3) , 304-315.
 - Watson, B.T.; Chen, H.P.; Price, S.F.(2000). Maceration enzymes affect Oregon Pinot noir color and phenolic profiles. *Am. J. Enol. Vitic.*, 51, 297.
 - Webb, L. B.; Whetton, P. H.; Barlow, E. W. R. (2011). Observed trends in winegrape maturity in Australia. *Global Change Biology*, 17(8), 2707–2719.
 - Wirth, J.; Caillé, S.; Souquet, J.M.; Samson, A.; Dieval, J.B.; Vidal, S.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. (2012). Impact of post-bottling oxygen exposure on the sensory characteristics and phenolic composition of Grenache rosé wines. *Food Chem.*, 132(4), 1861-1871.
 - Yamane, T.; Shibayama, K. (2006). Effects of changes in sensitivity to temperature on skin coloration in 'Aki Queen' grape berries. *J. Japan. Soc. Hortic. Sci.*, 74, 458-462.
 - Yilmaz, Y.; Toledo, R.T. (2004). Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 52(2), 255-60.
 - Yildirim, H.K.; Altindişli, A. (2015). Changes of Phenolic Acids During Aging of Organic Wines. *Int. J. Food Prop.*, 18, 1038–1045.
 - Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. AMV Ed. Mundiprensa, Madrid, España.
 - Zoecklein, B.W.; Pélanne, L.M.; Birkenmaier, S.S.; Reed, K. (2009). Impact of délestage

with partial seed removal. *Winemaking*, July/Agust

- Zou, H.; Kilmartin, P. A.; Inglis, M. J.; Frost, A. (2002). Extraction of phenolic compounds during vinification of Pinot Noir wine examined by HPLC and cyclic voltammetry. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 8(3), 163–174.

