

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y
Bromatología**

**PROANTOCIANIDINAS DE UVAS Y VINOS
DE LAS VARIEDADES MONASTRELL,
CABERNET SAUVIGNON Y SYRAH**



**NAIARA BUSSE VALVERDE
2013**



D^ª ENCARNA GÓMEZ PLAZA, Catedrática de Universidad y D^ª ANA BELÉN BAUTISTA ORTÍN, Profesora Asociada del Área de Tecnología de Alimentos del Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología AUTORIZAN

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “PROANTOCIANIDINAS EN UVAS Y VINOS DE LAS VARIEDADES MONASTRELL, CABERNET SAUVIGNON Y SYRAH”, realizada por D^ª NAIARA BUSSE VALVERDE bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia

En Murcia, a 25 de Enero de 2013

Fdo. Encarna Gómez Plaza

Fdo. Ana Belén Bautista Ortín

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directoras de tesis, Encarna Gómez Plaza, Catedrática de Universidad y Ana Belén Bautista Ortín, Doctora y Profesora Asociada del Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, por su dedicación, confianza y orientación, ya que sin ellas no hubiera sido capaz de llegar donde estoy.

A José María López Roca, Catedrático del Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, por “apadrinarme” y protegerme durante todo este tiempo, ya que nunca caminaré sola.

También quiero dar las gracias al personal de la Estación Enológica de Jumilla, especialmente a José Ignacio y Rocío por su ayuda y colaboración.

A todos mis compañeros del grupo: Yolanda, Rafa, Pedro, Alberto, Inmaculada, Laura y Estefanía, así como a mis compañeros del departamento: Rocío, Miriam, Pedro, Maca, Víctor, Belén, Mariela, Silvia, Adriana, Inés, Esther, Paola, Rafa, Jordi, Sandra y Virginia por los momentos pasados y los grandes amigos encontrados. Sin olvidar a Carmen y Antonio por dedicarme su tiempo cuando los necesité.

A mis amigos de la Universidad: Rocío, María, Cristina, Ainhoa, Rocí, Edu, Javi, Aarón, Alberto, Miguel, Juanico y Mari ya que con ellos comenzó mi gran aventura, gracias por tantos momentos que me habéis hecho pasar y los que nos quedan.

A mis amigas de siempre Mamen, Aida, Elena, Raquel, Marta, Mari, Laura, Angela, Julia y M^aJosé que siempre han estado cuando las he necesitado y espero contar con ellas durante mucho más tiempo, os quiero.

Por último, me gustaría agradecer a mis padres, Dori y Paco la confianza que en mí han depositado, me siento muy orgullosa de cómo me habéis educado, ya que gracias a eso, estoy donde estoy. A mi hermana y a Belén, por el grandísimo apoyo recibido durante este último año, las grandes aventuras recorridas y los grandes momentos vividos. Gracias a toda mi familia por estar siempre a mi lado. Os quiero.

Quiero dedicar este trabajo:

A mi abuela, María, porque todavía la echo de menos.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Proyecto de Investigación “PROANTOCIANIDINAS EN UVAS Y VINOS DE LA VARIEDAD MONASTRELL Y EN SUS HÍBRIDOS INTRAESPECÍFICOS”, subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

ÍNDICE

I. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.	1
II. INTRODUCCIÓN.	7
II.1. LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DE LAS UVAS.	9
II.1.1. Flavanoles y proantocianidinas.	10
II.2. DETERMINACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN UVA Y VINO.	12
II.2.1. Determinación por precipitación de proteínas.	13
II.2.2. Determinación por métodos colorimétricos.	14
II.2.3. Determinación de la concentración y composición de proantocianidinas utilizando agentes nucleofílicos.	16
II.2.4. Otras determinaciones cromatográficas.	19
II.2.5. Determinación por espectrometría de masas.	20
II.3. LAS PROANTOCIANIDINAS EN LAS UVAS Y SU TRANSFERENCIA AL VINO.	22
II.4. IMPORTANCIA DE LAS PROANTOCIANIDINAS EN LOS VINOS.	26
II.5. EVOLUCIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS EN LOS VINOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	33
III.1. UVA.	35
III.1.1. Material vegetal.	35
III.2. VINO.	36
III.2.1. Vinificaciones.	36
III.2.1.1. Campaña 2009.	36
III.2.1.1.1. Diseño de las vinificaciones.	37
III.2.1.2. Campaña 2010.	38
III.2.1.3. Campaña 2011.	39
III.3. METODOLOGÍA.	40
III.3.1. Determinaciones físico-químicas de la uva.	40
III.3.1.1. Grado Brix.	41
III.3.1.2. pH.	41
III.3.1.3. Acidez Total.	41
III.3.1.4. Ácido L-Málico.	41
III.3.1.5. Ácido Tartárico.	41

III.3.2. Determinación de proantocianidinas en uva y vino por cromatografía Líquida.	42
III.3.2.1. Extracción de proantocianidinas.	42
III.3.2.1.1. Extracción de proantocianidinas de uva utilizando acetona al 70%.	42
III.3.2.1.2. Extracción de proantocianidinas de uva utilizando una solución de etanólica al 12.5%.	43
III.3.2.1.3. Extracción de las proantocianidinas de semilla utilizando soluciones modelo y enzimas de maceración.	43
III.3.2.1.4. Extracción de proantocianidinas del vino.	44
III.3.2.2. Análisis cromatográfico de proantocianidinas.	45
III.3.2.3. Identificación y cuantificación de las proantocianidinas.	46
III.3.3 Determinación de los parámetros cromáticos del vino.	48
III.3.4. Análisis sensorial.	50
III.3.4.1. Evaluación de la astringencia de los vinos.	50
III.3.4.2. Prueba triangular.	51
III.3.4.3. Análisis descriptivo.	51
III.3.5. Análisis estadístico.	52
IV. CONTENIDO Y COMPOSICIÓN PROANTOCIANIDÍNICA DE LA UVA. EFECTO DE LA VARIEDAD, GRADO DE MADURACIÓN Y LOCALIZACIÓN DEL VIÑEDO.	55
IV.1. INTRODUCCIÓN.	57
IV.1.1. Localización de proantocianidinas en las uvas.	57
IV.1.2. Síntesis de proantocianidinas.	60
IV.1.3. Evolución de las proantocianidinas durante el proceso de maduración.	62
IV.2. RESULTADOS.	64
IV.2.1. Contenido y composición de proantocianidinas de uva de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah en el momento de la vendimia.	64
IV.2.1.1. Proantocianidinas del hollejo de la uva.	65
IV.2.1.2. Proantocianidinas en semilla de la uva.	68

IV.2.2. Evolución del contenido y composición de las proantocianidinas durante la maduración de la uva.	70
IV.2.2.1. Evolución del contenido y composición de proantocianidinas en hollejo de la uva durante la maduración.	71
IV.2.2.1.1. Proantocianidinas totales.	72
IV.2.2.1.2. Composición de las proantocianidinas.	73
IV.2.2.2. Evolución del contenido y composición de proantocianidinas en semillas de la uva durante la maduración.	76
IV.2.2.2.1. Proantocianidinas totales.	76
IV.2.2.2.2. Composición de las proantocianidinas.	77
IV.2.2.3. Efecto de la altitud en el contenido y composición de proantocianidinas durante la maduración de la uva de la variedad Monastrell.	81
IV.2.2.3.1. Proantocianidinas totales en el hollejo.	83
IV.2.2.3.2. Composición de las proantocianidinas del hollejo.	84
IV.2.2.3.3. Proantocianidinas totales en la semilla.	88
IV.2.2.3.4. Composición de las proantocianidinas de las semillas.	89
IV.2.3. Papel del disolvente de extracción en la concentración de proantocianidinas extraídas de la uva Monastrell durante la maduración.	93
IV.2.3.1. Papel del disolvente de extracción en la concentración de proantocianidinas extraídas del hollejo de uva Monastrell durante la maduración.	93
IV.2.3.1.1. Proantocianidinas totales.	93
IV.2.3.1.2. Composición de las proantocianidinas.	95
IV.2.3.2. Papel del disolvente de extracción en la concentración de proantocianidinas extraídas de las semillas de uva Monastrell durante la maduración.	97
IV.2.3.2.1. Proantocianidinas totales.	98
IV.2.3.2.2. Composición de las proantocianidinas.	99

V. PROANTOCIANIDINAS EN LOS VINOS DE MONASTRELL, CABERNET SAUVIGNON Y SYRAH.	105
V.1. INFLUENCIA DE ALGUNAS TÉCNICAS ENOLÓGICAS EN LA CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS.	107
V.1.1. Introducción.	107
V.1.1.1. Maceración prefermentativa en frío.	108
V.1.1.2. Congelación del mosto con nieve carbónica.	109
V.1.1.3. Enzimas pectolíticos.	110
V.1.2. Resultados.	111
V.1.2.1. Evolución del contenido y composición de proantocianidinas durante la maceración fermentativa de uvas de la variedad Monastrell en función a la técnica enológica aplicada.	111
V.1.2.1.1. Proantocianidinas totales.	111
V.1.2.1.2. Composición de las proantocinidinas.	114
V.1.2.2. Comprobación del efecto de los enzimas de maceración sobre la extracción de proantocianidinas de semillas.	119
V.1.2.3. Concentración y composición de las proantocianidinas de vinos de Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah.	124
V.1.2.3.1. Concentración y composición de proantocianidinas de los vinos control de las tres variedades.	124
V.1.2.3.2. Efecto de distintos tratamientos enológicos sobre las proantocianidinas de los vinos.	127
V.2. EFECTO DEL TIEMPO DE MACERACIÓN EN EL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN EL VINO DE LAS VARIEDADES MONASTRELL, CABERNET SAUVIGNON Y SYRAH.	133
V.2.1. Introducción.	133
V.2.2. Resultados.	135
V.2.2.1. Evolución del contenido y composición de proantocianidinas durante la maceración fermentativa.	135
V.2.2.1.1. Concentración de las proantocianidinas.	135
V.2.2.1.2. Composición de las proantocinidinas.	141

V.2.2.2. Contenido y composición de proantocianidinas en el vino al final de fermentación alcohólica tras la aplicación de diferentes tiempos de maceración.	145
V.2.2.2.1. Concentración y composición de las proantocianidinas.	146
V.2.2.2.2. Características sensoriales de los vinos.	150
V.3. EFECTO DE LA AUSENCIA DE SEMILLAS EN EL PERFIL FENÓLICO Y CROMÁTICO DEL VINO MONASTRELL.	152
V.3.1. Introducción.	152
V.3.2. Resultados.	153
V.3.2.1. Evolución del perfil fenólico y cromático del vino durante el proceso de vinificación.	153
V.3.2.1.1. Concentración y composición de las proantocianidinas.	154
V.3.2.1.2. Características cromáticas de los vinos.	157
V.3.2.1.3. Características sensoriales de los vinos.	160
V.I. CONCLUSIONES.	163
V.II. BIBLIOGRAFÍA.	169

I. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Las proantocianidinas o taninos condensados son, junto con los antocianos, las moléculas más significativas de algunas de las características organolépticas de los vinos tintos, sobre todo color y sabor. Su estudio es importante para evaluar el potencial de determinadas variedades y técnicas enológicas. Sin embargo, han sido mucho menos estudiadas que otros flavonoides como los antocianos, porque las técnicas de fraccionamiento e identificación de las proantocianidinas son más complejas, quedando muchas lagunas todavía en cuanto a su caracterización. Así, por ejemplo, no se conoce totalmente su mecanismo de biosíntesis, los datos que existen con respecto a los efectos edafoclimáticos sobre su formación son contradictorios, apenas hay estudios sobre la influencia de diversas técnicas enológicas sobre su limitada extractabilidad ni como se podría favorecer (o limitar en su caso) su transferencia al vino. Asimismo, en los vinos existe todo un abanico de nuevas estructuras (resultantes de las reacciones con los antocianos y reacciones de oxidación) muy poco conocidas todavía, tanto estructuralmente como en cuanto a la función real que tienen en la estabilidad del color de los vinos y los cambios de astringencia que ocurren durante el envejecimiento.

El principal reto de las distintas técnicas empleadas en vinificación consiste en extraer los compuestos polifenólicos de las uvas responsables del color y estructura de los vinos tintos (principalmente antocianos y taninos) sin afectar al correcto desarrollo de la fermentación alcohólica. El éxito en la elaboración de un vino ligero y afrutado o de un vino muy estructurado, así como el futuro desarrollo de las características organolépticas, se basa en el control apropiado de la extracción de antocianos y taninos de las uvas al vino. Esta extracción es siempre incompleta y sujeta a fuertes variaciones. Generalmente, los vinos contienen solo del 20 al 50% de los compuestos fenólicos originalmente presentes en la uva. El objetivo principal no es la máxima extracción, sino una óptima extracción de los compuestos de máxima calidad.

Diversos factores controlan la extracción y afectan de distinta forma a los diversos compuestos. Uno de los factores es la calidad de la vendimia; su grado de madurez y su calidad sanitaria determinan el contenido en polifenoles así como su

extractabilidad. Un segundo factor primordial es la duración de la maceración durante la vinificación, donde se forma gran parte del futuro vino. Los taninos de los hollejos difunden fácilmente junto con los antocianos en el medio acuoso que es el mosto pero los taninos de las semillas requieren la presencia de alcohol para su extracción. Como el etanol se incrementa durante la fermentación, la duración de la maceración afectará al contenido de antocianos y taninos. Otro factor que ejercerá un papel importante es la técnica de elaboración aplicada. Hoy en día existe un gran interés por aquellas técnicas que faciliten una disgregación de la estructura celular de los hollejos y faciliten la salida de los compuestos fenólicos del interior de estas estructuras.

Por ello, el objetivo global de este trabajo de investigación, es conocer en profundidad la composición cuantitativa y cualitativa de las proantocianidinas de las pieles y semillas de uvas de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah, así como la transferencia de las mismas al vino y el efecto de algunas técnicas enológicas para modular su extracción.

Para ello se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Estudio de la evolución de la concentración y composición de las proantocianidinas de hollejos y semillas de las uvas de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah desde pre-envero hasta el momento de cosecha.
- Determinar el efecto de las condiciones edafoclimáticas durante el ciclo de formación y maduración de uvas de la variedad Monastrell sobre la concentración y composición de proantocianidinas.
- Efecto de distintas técnicas de elaboración (maceración prefermentativa en frío, congelación de las bayas y utilización de enzimas de maceración) sobre el perfil y cantidad de proantocianidinas en los vinos de Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah.
- Efecto de diferentes actividades enzimáticas, normalmente presentes en los enzimas de maceración comerciales, en la extracción y composición de las

proantocianidinas de semillas de las variedades Monastrell y Cabernet Sauvignon.

- Dinámica de extracción y composición de las proantocianidinas de la uva durante el proceso de maceración, así como la determinación y composición de las mismas en el vino de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah.
- Influencia de la ausencia de semillas en el perfil fenólico y cromático del vino de uvas Monastrell durante el proceso de vinificación.

II. INTRODUCCIÓN

II.1 LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DE LAS UVAS

Los polifenoles son constituyentes fundamentales del mundo vegetal. Se encuentran en todos los órganos de las plantas, desde las raíces a los frutos, con estructuras químicas variadas. En la uva, los compuestos fenólicos juegan un papel importante en la calidad, y la manera en la cual estas sustancias son transformadas durante la vinificación influye directa o indirectamente sobre las características de los vinos, confiriéndoles una gran parte de su estructura, su color y de sus propiedades sensoriales.

El estudio de los compuestos fenólicos de la uva siempre ha sido de gran interés por los investigadores cuyos primeros aportes decisivos se deben al enólogo francés Ribéreau-Gayon en la década de los años 60. En los últimos años, los polifenoles de los vinos han sido sujeto de un creciente estudio debido a sus propiedades antioxidantes y sus potenciales efectos sobre la salud.

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos se caracterizan por presentar un núcleo aromático acompañado por uno a o varios núcleos hidroxilo. Estos se clasifican como compuestos no flavonoides y flavonoides (Figura II.1).

Figura II.1 Clasificación de los compuestos fenólicos (Zamora, 2003).

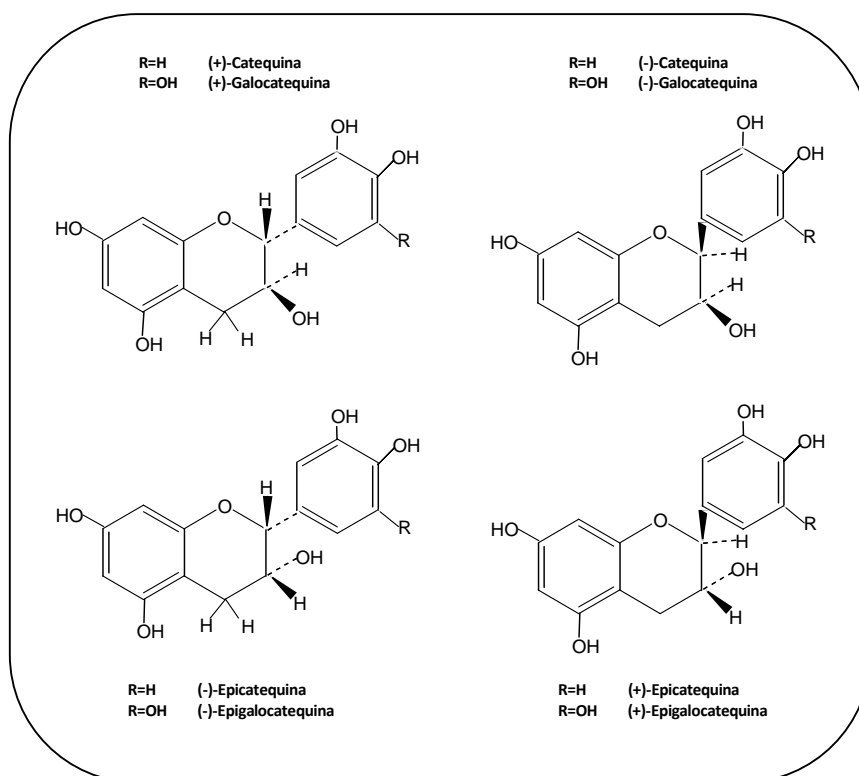


La uva contiene compuestos no flavonoides en la pulpa, piel, semillas y raspón, mientras que los compuestos flavonoides se encuentran fundamentalmente en la piel, semilla y raspón.

II.1.1 FLAVANOLES Y PROANTOCIANIDINAS

Los flavanoles representan una compleja familia compuesta por las diferentes formas isoméricas de la catequina y sus polímeros (Cheynier et al., 2000) (Figura II. 2).

Figura II.2 Estructura química de los flavan-3-oles.

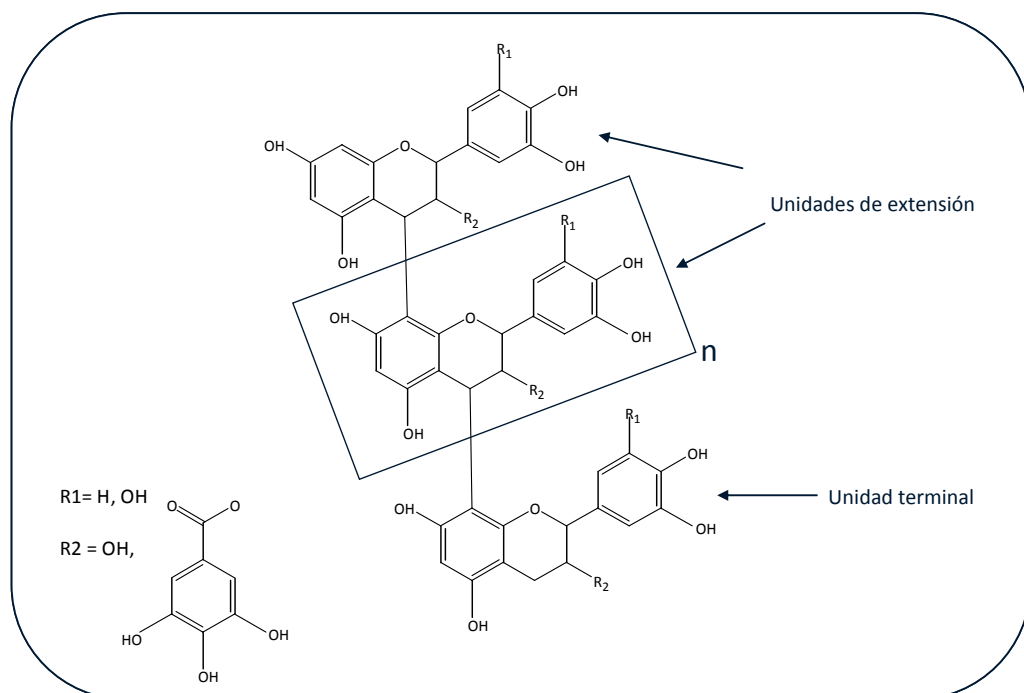


La estructura básica de la catequina presenta dos carbonos asimétricos por lo que existen 4 isómeros: (+)/(-) catequina y epicatequina. Además el anillo aromático externo puede presentar un tercer grupo OH, dando lugar a las correspondientes (+)/(-) galocatequina y epigalocatequina. Por otra parte el grupo OH en posición 3 del

heterociclo puede estar galoilado, es decir, puede estar esterificado con una molécula de ácido gálico, por lo que también se puede incluir los 3-galatos de (+)/(-) (galo) catequina y epi (galo) catequina.

Los flavanoles polímeros reciben el nombre de taninos condensados o proantocianidinas y corresponden a cadenas formados por diferente número de unidades de los diversos flavanoles unidas mediante enlaces C4-C8 o C4-C6 (Ricardo da Silva et al., 1991). La figura II.3 corresponde a los polímeros que se denominan de tipo B. También existen los polímeros de tipo A, que poseen una unión suplementaria de tipo éter entre el carbono 3 y el carbono 7. Su presencia ha sido detectada en la uva recientemente (Passos et al., 2007).

Figura II.3 Estructura química de las proantocianidinas.



En la uva, las estructuras mayoritarias son la (+)-catequina, la (-)-epicatequina, la (-)-epigallocatequina y la (-)-epicatequina-3-O-galato (Cheynier et al., 2000). No obstante, los flavanoles monómeros representan tan sólo una pequeña proporción de

la cantidad de estos compuestos en las uvas, ya que la mayor parte de ellos se encuentran en forma de polímeros (Czochanska et al., 1980).

Estas moléculas pueden presentar un número muy elevado de unidades, ya que los grados de polimerización medios pueden llegar a ser del orden de 11 en las semillas (Prieur et al., 1994) y de 30 en los hollejos (Souquet et al., 1996), siendo el grado medio de polimerización en el vino de aproximadamente 7 (Sarni-Manchado et al., 1999).

El nombre de procianidinas por el que también se conoce a los polímeros de flavanoles tiene su origen en la propiedad que presentan en medio fuertemente ácido, de dar lugar, por hidrólisis, a cianidina. No obstante en el caso de que el polímero esté formado por unidades de galocatequina y/o epigalocatequina se obtendría por hidrólisis ácida delphinidina y por tanto se hablaría de prodelfinidinas (Porter et al., 1986). Por ello, lo más correcto es hablar de proantocianidinas. Los taninos de los hollejos están constituidos por procianidinas y prodelfinidinas (Souquet et al., 1996), mientras que los de las semillas únicamente por procianidinas parcialmente galoiladas (Prieur et al., 1994).

Las proantocianidinas son las responsables del sabor amargo y de la astringencia del vino (Glories, 1999; Noble, 1990; Robichaud et al., 1990), pero también de parte de la componente amarilla del color (Glories, 1984, Ribéreau-Gayon et al., 1999), de la sensación de estructura y cuerpo del vino (Fischer, 1999; Ribéreau-Gayon et al., 1999; Montedoro y Bertuccioli, 1988) y de la capacidad del vino para envejecer (Fischer, 1999; Saucier et al., 1997), entendiéndose por ello la capacidad de mantener el color a lo largo del tiempo.

II.2 DETERMINACIÓN DE PROANTOCINIDINAS EN UVA Y VINO

Para poder determinar el contenido y la composición de proantocianidas en las uvas y en los vinos se requiere de una amplia selección de técnicas de análisis para poder cuantificarlas de manera eficiente. Hasta la fecha, se han utilizado numerosos

métodos de determinación e identificación de proantocianidinas, tanto de uva como de vino, y algunos de ellos se muestran a continuación.

II.2.1 DETERMINACIÓN POR PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Los estudios existentes sobre las proantocianidinas son menores que en otros flavonoides, fundamentalmente por su mayor dificultad de análisis. Tradicionalmente se utilizaban los métodos de precipitación de taninos con proteínas para conocer su concentración. Hagerman y Butler (1978) desarrollaron un método con albúmina del suero bovino (BSA) y numerosas variaciones de este método han sido utilizadas posteriormente. Glories (1984) propuso un índice de gelatina donde las procianidinas se miden por su capacidad de precipitar gelatina. También se han propuesto métodos para la cuantificación de procianidinas que se basan en redissolver el complejo tanino-proteína y cuantificar indirectamente los taninos por colorimetría con FeCl_3 a 510 nm (Harbertson et al., 2003). En general, todos los ensayos de precipitación de proteínas dependen mucho de variables como el pH, punto isoeléctrico de la proteína, fuerza iónica, tipo de proteína y la temperatura. Por ello, es difícil comparar resultados entre distintos métodos. Esto podría corregirse estableciendo un método de validación; sin embargo, todos los ensayos de precipitación de proteínas se ven obstaculizados por la incapacidad de medir directamente el tanino eliminado ya que el espectro en el cual se miden es a 280 nm y sufre interferencias con la absorbancia debida a la proteína añadida.

La modulación o inhibición de la actividad enzimática por la interacción de taninos también ha sido utilizada para la cuantificación de taninos. Los ejemplos incluyen la determinación indirecta de estos a través de la medición de la fosfatasa alcalina (Ittah et al., 1991; Adams y Habertson, 1999), la inhibición de la β -galactosidasa (Dick et al., 1988) o la acción degradativa de la tripsina en proteínas (McNabb et al., 1998).

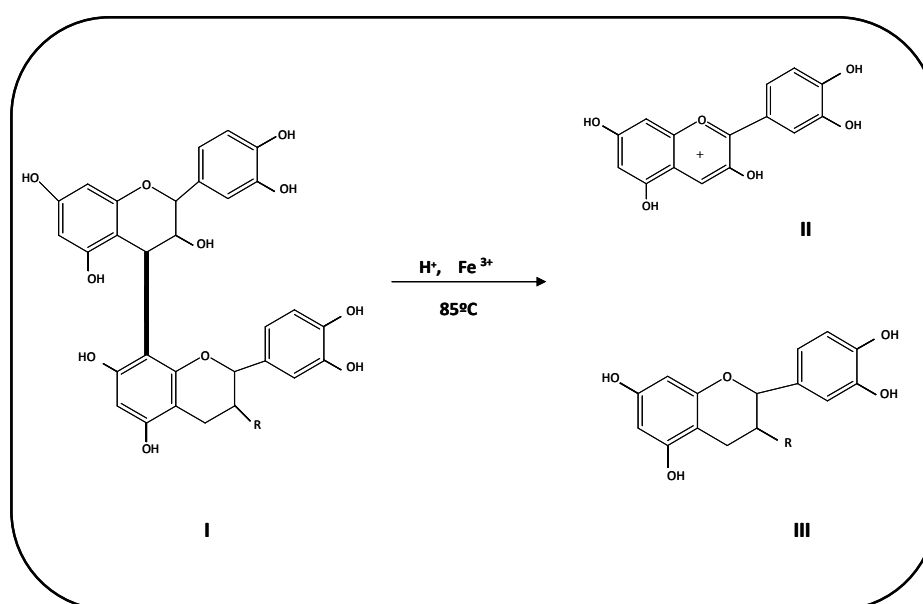
Un punto interesante de los ensayos de precipitación de proteínas es que pueden ser usados para modelar la sensación de astringencia en humanos. Pero estos

métodos no permiten ningún conocimiento sobre que composición tienen esos taninos, aun cuando se sabe que la astringencia, por ejemplo, depende no solo de la concentración de taninos sino también de su tamaño y su grado de galoilación.

II.2.2 DETERMINACIÓN POR MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

También se han utilizado métodos colorimétricos para determinar la concentración de proantocianidinas, aunque todos los métodos descritos fallan por su falta de selectividad, funcionando bien solo en muestras muy purificadas. Uno de estos métodos incluye el uso de butanol-HCl (95:5) y calor (Figura II.4).

Figura II.4 Formación de antocianidinas en medio ácido.



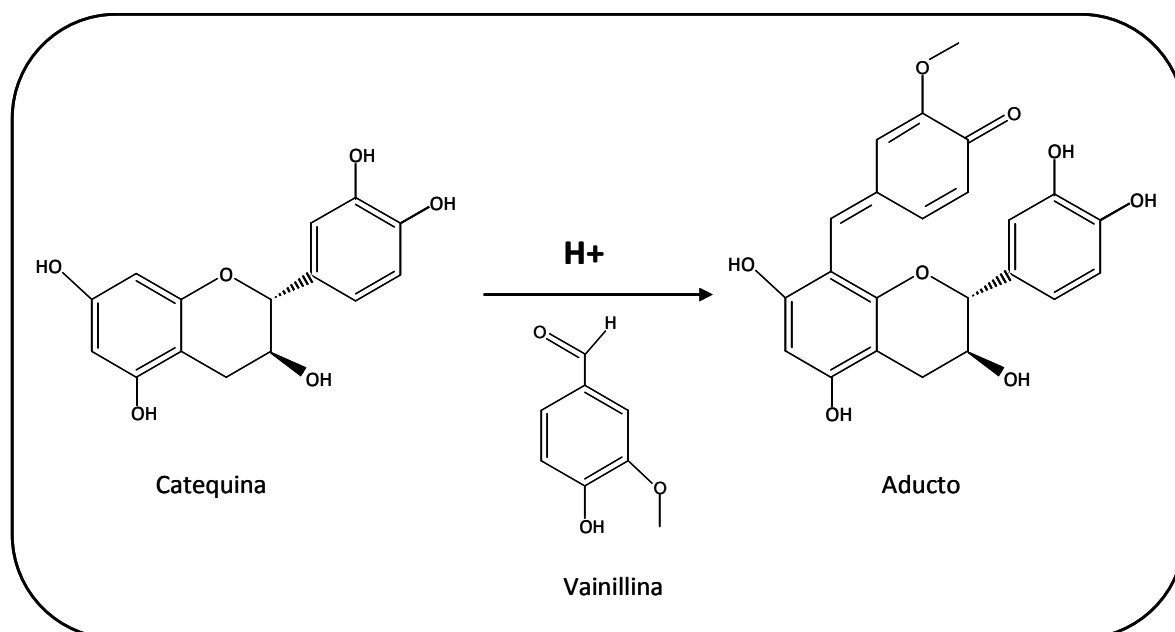
En estas condiciones los taninos se despolimerizan dando subunidades que son oxidadas a antocianidinas (Porter et al., 1986). Este ensayo se usa ampliamente como ensayo diagnóstico ya que es selectivo para los taninos condensados. Este método puede presentar variaciones en el contenido de agua y el tipo de metal utilizado, por lo que debe de usarse con precaución como ensayo cuantitativo. Nitao et al. (2001)

adaptaron el método del butanol-HCl a una reacción de flujo continuo para aumentar el rendimiento de la reacción. Otros métodos están basados en reacciones de oxidación-reducción para la determinación de proantociaidinas totales utilizando como por ejemplo el azul de Prusia (Butler et al., 1994), pero una vez más estos ensayos no son muy específicos ya que otros compuestos del vino pueden interferir.

Recientemente se han descrito métodos enzimáticos que se basan en la utilización de la enzima peroxidasa la cual cataliza la oxidación de los fenoles a radicales fenoxi pudiendo reaccionar con compuestos aromáticos para dar lugar a aductos intensamente coloreados (Stevanato et al. 2004).

Otros de los métodos colorimétricos son los ensayos de vainillina (Sun et al., 1998) o el 4-dimetilaminocinamaldehído (DMACA). El ensayo de la vainillina se ha usado extensamente para la determinación cuantitativa de taninos condensados. El ensayo es bastante sensible, relativamente simple y específico, dando una reacción coloreada con un máximo de absorbancia a 500 nm (Figura II.5).

Figura II.5 Reacción de los taninos con la vainillina.



Su principal problema es una falta de repetitividad entre muestras, días y laboratorios. El método de DMACA emplea la absorbancia a 635 nm para medir los aductos formados entre el DMACA y los taninos (Treutter, 1989). Se cree que esta reacción es más específica que la de la vainillina. Además, el uso de la derivatización postcolumna con DMACA también se ha usado para la detección de taninos en el análisis de HPLC (Treutter et al., 1994).

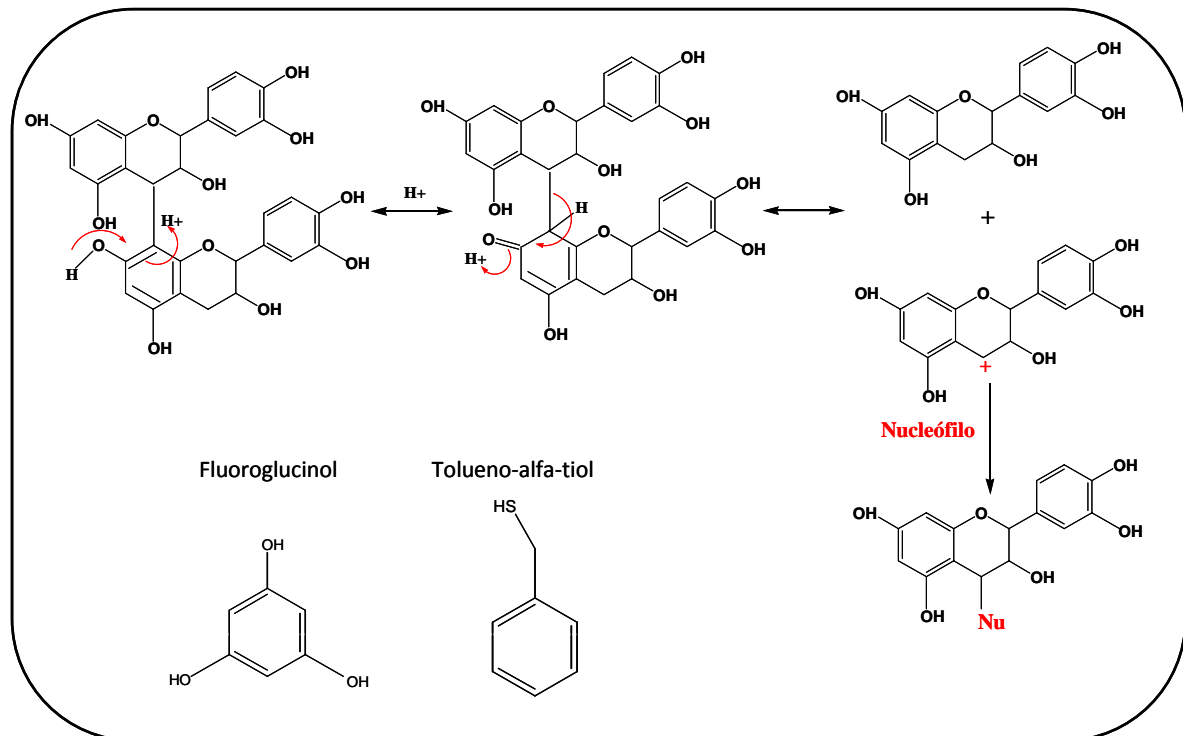
II.2.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIÓN DE PROANTOCIANIDINAS UTILIZANDO AGENTES NUCLEOFÍLICOS

Para realmente acceder a información sobre la composición de las proantocianidinas y su grado medio de polimerización es necesario recurrir a métodos de tiólisis o floroglucinólisis (Kennedy y Jones, 2001). Estos métodos están basados en la ruptura de los enlaces interflavánicos en medio ácido y en presencia de un agente nucleofílico (Figuras II.6 y II.7) (bencilmercaptano o fluoroglucinol), seguido de un análisis por HPLC de los productos de reacción. Esto nos da idea de la naturaleza y proporción de las diferentes unidades constitutivas de los taninos condensados y permite calcular su grado medio de polimerización.

Los dos agentes nucleofílicos más comúnmente utilizados son el fluoroglucinol y el bencilmercaptano, los cuales se utilizaron por primera vez en la década de 1960 y a principios de 1970 (Geissman et al., 1966; Jurd et al., 1967; Thompson et al., 1972). Cuando se desea una conversión cuantitativa de proantocianidinas en sus subunidades, algunos estudios han sugerido que el bencilmercaptano es el reactivo preferido (Matthews et al., 1997; Gupta et al., 1978), sin embargo, este reactivo tiene un olor muy desagradable y su uso está muy limitado ya que necesita condiciones especiales de manipulación. Por otro lado, el fluoroglucinol como reactivo, tiene varias ventajas potenciales respecto al bencilmercaptano. La primera es que el fluoroglucinol es inodoro, por tanto, no requiere de condiciones especiales de manipulación y en

segundo lugar es que tiene la capacidad de formar aductos muy polares (Hemingway et al., 1989).

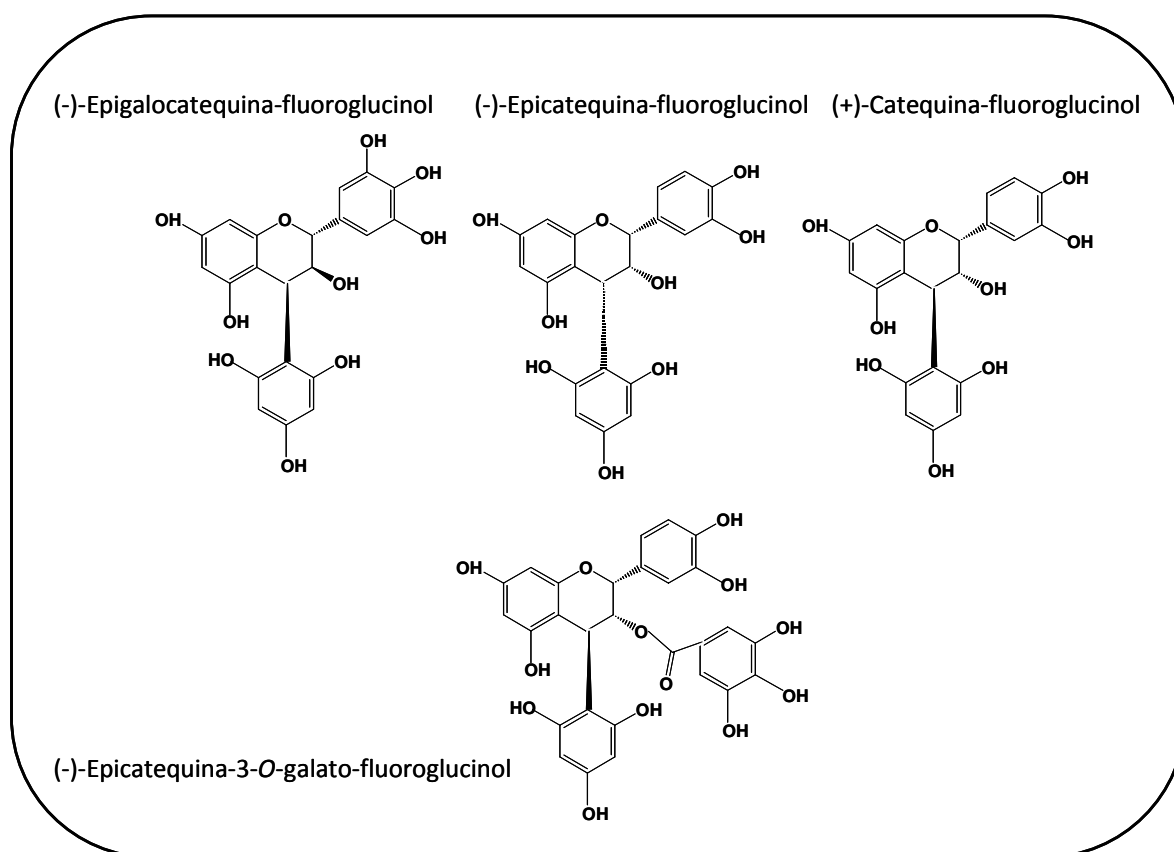
Figura II.6 Mecanismo hipotético de ruptura de las procianidinas en medio ácido y en presencia de un agente nucleofílico.



Kennedy et al. (2001) realizaron un ensayo utilizando y comparando los dos agentes; fluoroglucinol y el bencil mercaptano. Para las proantocianidinas de semilla, la composición de las subunidades, el grado medio de polimerización así como el rendimiento de conversión fueron muy similares en ambos métodos. En el caso de las proantocianidinas del hollejo, las composiciones de las subunidades fueron diferentes, pero no hay explicación evidente para esta diferencia. El rendimiento de conversión de las proantocianidinas de semilla fue de 56,4% para Syrah y 80,1% para Chardonnay, aparentemente bajo y variado, pero eso puede ser indicativo de la heterogeneidad en la unión entre los flavanoides y esto no significa debilidad de estos métodos. En un primer estudio, utilizando el método de la fluoroglucinol para supervisar el desarrollo

de proantocianidinas en la semilla de Syrah, el rendimiento de conversión también varió considerablemente a lo largo del periodo de maduración (Kennedy et al., 2000a), las proantocianidinas procedentes de uvas del pre-verano mostraron un el rendimiento de conversión del 89%, y después del verano dicho rendimiento disminuyó considerablemente (69%).

Figura II.7 Aductos que se forman por el ataque del fluoroglucinol.



Si se usa el fluoroglucinol como agente, los productos de ruptura se estiman usando factores de respuesta relativos a la (+)-catequina, utilizada como patrón de cuantificación. Para calcular el grado medio de polimerización (GPM), la suma de todas las subunidades (monómeros y aductos del fluoroglucinol, en moles) se divide por la

suma de todos los monómeros (en moles), también puede ser determinado el porcentaje de galoilación, como la suma de los porcentajes de unidades galoiladas y la masa molecular (PM).

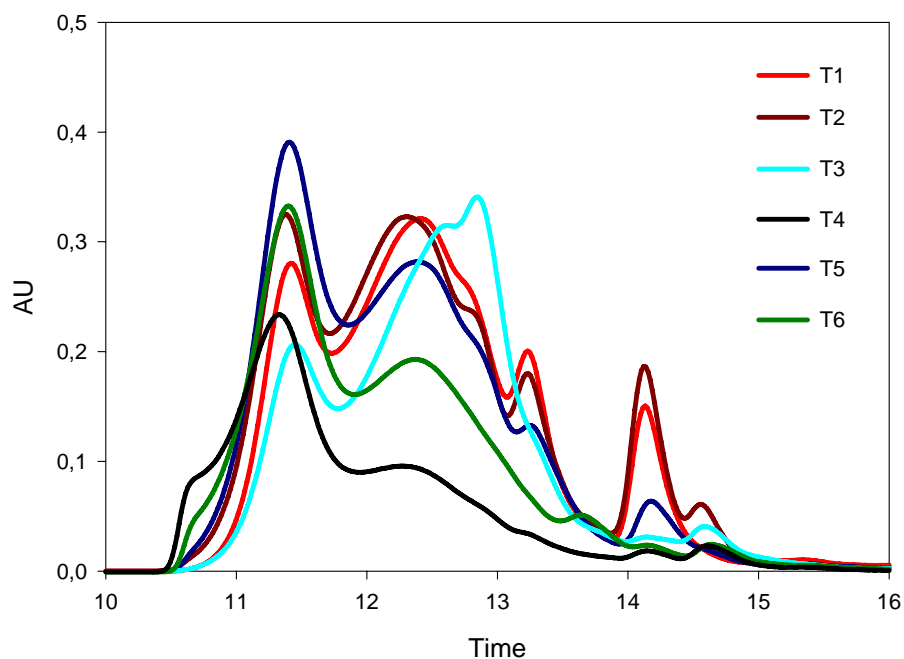
II.2.4 OTRAS DETERMINACIONES CROMATOGRÁFICAS

La cromatografía líquida se ha utilizado de forma habitual para la determinación y cuantificación de taninos. La cromatografía en fase reversa sirve para la cuantificación de taninos de pequeño tamaño (hasta tetrámeros) y para las unidades despolimerizadas de los métodos de despolimerización con agentes nucleofílicos. Para separar estructuras más grandes se puede recurrir a otras técnicas como la cromatografía en fase normal, que tiene capacidad para separar procianidinas de bajo y medio peso molecular (Rigaud et al., 1993; Gu et al., 2002; Kelm et al., 2006; Appeldoorn et al., 2009). Kennedy y Waterhouse (2000) desarrollaron un método para el análisis de compuestos fenólicos de alto peso molecular por cromatografía en fase normal, optimizando el método para que la presencia de antocianos no interfiriese en las medidas.

Para el análisis de la distribución de pesos moleculares de compuestos de naturaleza polimérica, la técnica más utilizada es la cromatografía de permeación en gel (GPC), también llamada de exclusión por tamaño (SEC). Esta técnica cromatográfica, muy utilizada en la caracterización de polisacáridos (Hellín et al., 2001; Ros et al., 2004; Tao y Zhang, 2008), también se ha aplicado en el estudio de compuestos polifenólicos (Kennedy y Taylor, 2003; Kurumatani et al., 2005; Kasai et al., 2006; Pietarinen et al., 2006a,b).

La GPC puede proporcionar, a diferencia de la catálisis ácida, mayor información sobre la distribución de la masa en muestras de taninos. En la Figura II.8 podemos observar, para seis taninos enológicos comerciales, la distinta distribución de fracciones de diversos tamaños moleculares en las muestras.

Figura II.8 Análisis por SEC de la distribución de distintas fracciones de distinta masa molecular en muestras de taninos enológicos comerciales.



II.2.5 DETERMINACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas es método instrumental muy útil para obtener información composicional de las proantocianidinas. Se pueden aplicar diversas técnicas: (1) HPLC/EM o HPLC/EM², lo que permite obtener información cuantitativa e información estructural y (2) análisis directo sin separación por HPLC, usando introducción directa e ionización por electrospray o ionización por MALDI (ionización por desorción asistida por matriz láser), lo que da información estructural rápidamente y sin preparación complicada de las muestras.

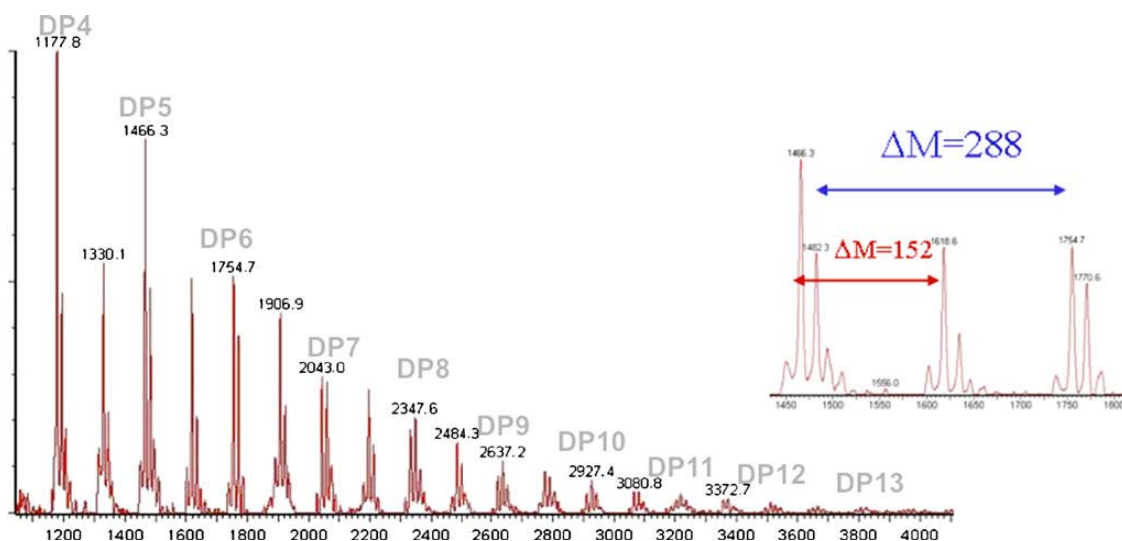
Entre las técnicas de espectrometría de masas para la identificación de las distintas unidades que componen las proantocianidinas de uvas y vinos, la espectrometría de masas con ionización mediante electro-spray se considera muy eficiente para el análisis estructural de polifenoles (Fulcrand et al., 1999; Lazarus et al., 1999; Hayasaka et al., 2003; Karonen et al., 2004; Flamini, 2003).

Los compuestos fenólicos se pueden detectar por espectrometría de masas ya sea en positivo o en el modo de iones negativos. El modo positivo está muy bien adaptado para la detección de antocianinas que se encuentran presentes en los extractos ácidos en sus formas catiónicas (ion flavilium). El modo negativo, por el contrario, es más eficiente en los derivados de antocianinas que llevan un grupo carboxílico (Fulcrand et al., 1998). Ambos modos han sido exitosamente utilizados para analizar flavonoides no cargados como los flavan-3-oles.

La espectrometría de masas con ESI tiene limitaciones en la evaluación de muestras con una amplia distribución de pesos moleculares, ya que el espectro siempre está dominado por el compuesto de peso molecular más bajo y las intensidades de los picos disminuyen conforme aumenta la longitud de la cadena. Esto también se observa con la técnica de espectrometría de masas mediante ionización por desorción asistida por láser y tiempo de vuelo (MALDI-TOF), si bien esta técnica permite identificar mejor polímeros grandes (Shoji et al., 2006; Es-Safi et al., 2006).

MALDI es una técnica altamente sensible, muy adecuada para el análisis de mezclas complejas y polidispersas. Permite la detección de iones moleculares intactos (MNa^+ , MK^+ , o MH^+) con una gran precisión. Esta técnica se ha aplicado para determinar información estructural de los taninos, tal y como la naturaleza de la unidad básica, la presencia de galoilación y el rango de masas. La Figura II.9 presenta un típico espectro de masas obtenido por MALDI de un extracto de semillas de uvas, donde se observa claramente la información que se puede obtener: la unidad básica es la (epi)catequina, no pudiéndose distinguir entre los dos isómeros (la repetición de la unidad de 288 Da es una huella de esta unidad básica) y la galoilación también se puede observar (la repetición de unidades de 152 Da confirma la presencia de unidades galoiladas).

Figura II.9 Espectro de masas de una muestra de taninos determinado por MALDI.



II.3 LAS PROANTOCIANIDINAS EN LAS UVAS Y SU TRANSFERENCIA AL VINO

Los taninos están presentes, tanto en variedades tintas como en variedades blancas, en el hollejo, en la semilla y en la pulpa de las uvas. Los taninos presentes en los hollejos pueden ser clasificados en tres categorías en función de su localización (Amrani Joutei et al., 1994): (1) taninos de las vacuolas, que están en forma condensada en las células próximas a la epidermis, (2) taninos ligados a la membrana proteofosfolipídica de las células de la piel y (3) taninos integrados en la pared celulopectídica. Solamente los taninos de las vacuolas pueden ser fácilmente extraídos y pueden ser considerados como taninos libres, a diferencia de los que están enlazados a otros compuestos como proteínas, pectinas y fosfolípidos.

En las semillas, los taninos se encuentran tanto en la epidermis como en el tegumento externo e interno.

Los taninos se extraen durante la vinificación desde las partes sólidas de los racimos (Bourzeix et al., 1986; Sun et al., 1999). Por tanto, los taninos del vino contienen tanto procianidinas como prodelphinidinas (González-Manzano et al., 2004).

La extracción de los taninos de la uva al mosto-vino ha sido descrita como una difusión (Boulton, 1995), e incluye a los flavan-3-oles, sus oligómeros de 2 a 8 unidades, polímeros de mayor número unidades y también las formas galoiladas de ellos. Los taninos de los hollejos y semillas poseen diferentes cinéticas de extracción, basadas, fundamentalmente, en su diferente localización. Los taninos de los hollejos comienzan a solubilizarse conjuntamente con los antocianos al inicio de la maceración, si bien su extracción se prolonga mucho más en el tiempo. Por el contrario, los taninos de las semillas presentan una extracción más lenta, acelerándose hacia la mitad de la fermentación, cuando la cantidad de alcohol en el medio comienza a ser importante. Estas diferentes dinámicas de extracción de los flavanoles y procianidinas desde las semillas al mosto-vino es un aspecto importante a la hora de considerar la técnica de vinificación a seguir (Singleton y Draper, 1964; Boulton, 1995). Además, los trabajos de Fournand et al. (2006) también determinaron que, además de la localización, la extractibilidad de los taninos parece ser dependiente del tamaño de las moléculas, siendo las de más alto grado de polimerización las más difícilmente extraídas. El porcentaje de galoilación es también más alto en los taninos que no se extraen.

Asimismo, se ha observado que la presencia de antocianos en un vino tinto es un factor que favorece la extracción y retención en solución de grandes cantidades de taninos oligómeros y polímeros (Kantz y Singleton, 1991). Comparando con las uvas blancas, que podrían tener concentraciones comparables en los hollejos y semillas de procianidinas, parece ser que se extraen mayores cantidades de polifenoles polímeros en vinos tintos (Kantz y Singleton, 1991; Singleton y Trouslade, 1992) y esto es debido a la formación de aductos antociano-tanino.

La extracción y la difusión de los compuestos fenólicos aumentan, por tanto, con la duración de la maceración y con la renovación del mosto-vino que impregna las partes sólidas, lo cual se consigue mediante la realización de remontados o por

hundimiento del sombrero. La temperatura y el SO₂ también favorecen la extracción de taninos de la uva al mosto-vino.

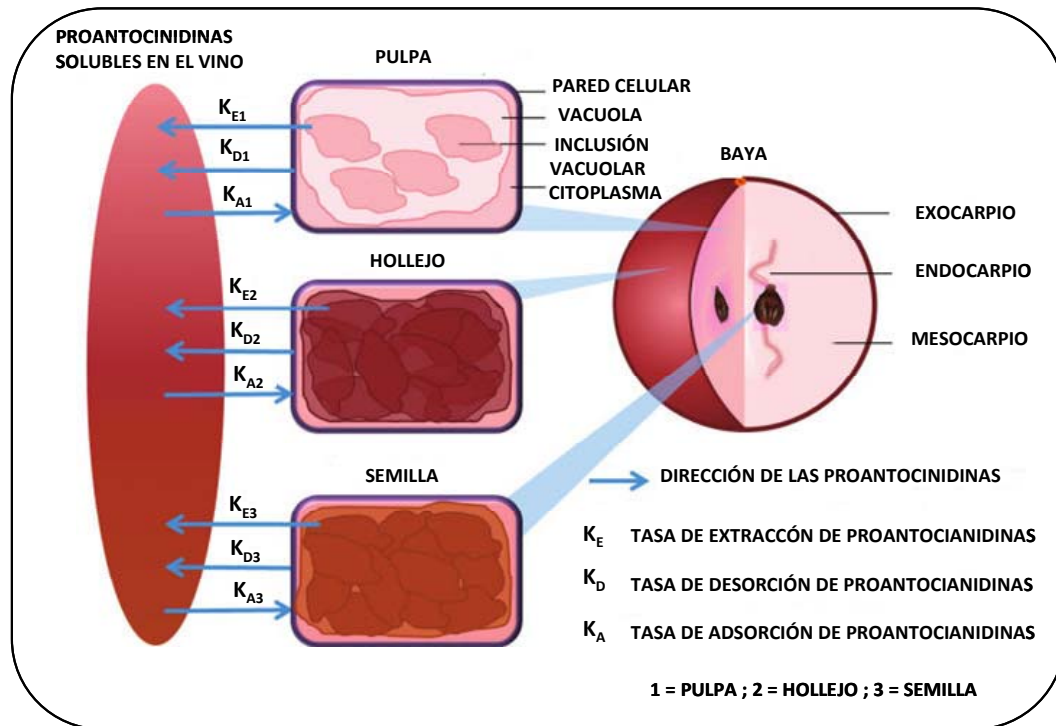
Tradicionalmente se ha establecido que los taninos de las pieles son organolépticamente mejores que los de las semillas, más “suaves” y “redondos” y menos astringentes. Es interesante destacar que la proporción de taninos de pieles y semillas en los vinos podría ser modulada por la elección de la técnica de vinificación. Numerosos estudios han investigado el efecto de prácticas enológicas como tiempo de maceración (Ribereau-Gayon et al., 1970; Scudamore-Smith et al., 1990), temperatura de fermentación (Kovac et al., 1992), utilización de enzimas pectolíticos (Bautista-Ortín et al., 2005; Ducasse et al., 2010), maceraciones prefermentativas (Parley, 1997; Ponte et al., 2004) sobre la extracción de proantocianidinas, tanto del hollejo como de las semillas. El uso de algunas de estas técnicas enológicas son objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

No queremos dejar de comentar los nuevos estudios que indican que en la extracción de taninos de las uvas al mosto-vino, las interacciones de estos con las paredes celulares del hollejo y de la pulpa pueden jugar un papel muy determinante. Bindon et al. (2010a) estudiaron la interacción entre las proantocianidinas de la uva y el material de la pared celular (MPC), encontrando dos aspectos importantes: (1) que durante el estrujado y fermentación de la uva el material de la pared celular resulta ser una barrera para la extracción de las proantocianidinas, y (2) que el material de pared celular suspendido en el mosto podría unirse y eliminar una gran cantidad de proantocianidinas extraídas del hollejo y semillas. De este modo, el material de la pared celular altera significativamente la composición de las proantocianidinas a través de su afinidad por estas moléculas.

Un reciente estudio sobre la extractabilidad de las proantocinidinas de la uva, ha llamado la atención sobre las implicaciones potenciales de la interacción del material de la pared celular (MPC) y las proantocianidnas (PAs) en la eliminación de las PAs libres durante el proceso de fermentación (Halin et al., 2010; Pinelo et al., 2006). Experimentos modelo han verificado que el MPC, especialmente el derivado de la pulpa, puede eliminar un proporción significante de PA durante la vinificación (Bindon

et al., 2010a). En el vino, por tanto, el incremento de éstas durante la fermentación alcohólica es el resultado de una compleja secuencia de etapas, tal y como se observa en la Figura II.10.

Figura II.10 Modelo de extracción, adsorción y desorción de las proantocianidinas durante la vinificación (Bindon et al., 2010a).



Cuando representamos la trayectoria del movimiento de las PAs fuera de la vacuola como un ratio constante (K_E), éste será determinado por la concentración de las PAs vacuolares y la concentración de PAs y otros solutos en el medio, determinando así el gradiente de concentración. Las limitaciones de " K_E " vendrán dadas por la permeabilidad de la pared celular y la habilidad de las PAs para adsorberse sobre las paredes y otros contenidos celulares (parámetro representado por K_A). El punto de adsorción podría ser cualquier espacio intracelular o extracelular. La posibilidad de que las PAs adsorbidas puedan desorberse se expresa como " K_D ", constante de desorción. A parte de los factores obvios los cuales influirán sobre el proceso de extracción, tales como la concentración de etanol en el vino o el contenido de proantocianidinas,

también hay factores de la vinificación que pueden influir sobre los ratios constantes definidos anteriormente.

II.4 IMPORTANCIA DE LAS PROANTOCIANIDINAS EN LOS VINOS

Uno de los principales hechos que despiertan el interés por el estudio de las proantocianidinas es su importante relación con las características sensoriales de los vinos tintos, como el color, amargor y astringencia. Los taninos se identifican por su habilidad para complejarse y precipitar proteínas. Esta propiedad se cree que es la responsable de la astringencia de los taninos del vino (Gawel, 1997). La astringencia oral es una sensación táctil donde la normal lubricación de las superficies orales se pierde por la precipitación de las proteínas de la saliva (Haslam y Lilley, 1988; Green, 1993; Gawel, 1997; Clifford, 1998). Se ha demostrado que la astringencia depende de características estructurales de la proantocianidina tal y como el grado medio de polimerización (GPM) y el porcentaje de galoilación (Vidal et al., 2003). Por tanto, el conocimiento de la concentración y la composición estructural de las proantocianidinas de la uva y del vino podría ser esencial para definir las características del vino.

La astringencia es un proceso complejo que implica muchos mecanismos no muy bien conocidos, incluyendo un aumento en la fricción (Rossetti et al., 2009; Wijk et al., 2005), interacciones entre taninos y proteínas epiteliales (Payne et al., 2009) o con los receptores del gusto amargo, particularmente los taninos condensados más pequeños (Kallithraka et al., 1997; Kallithraka et al., 2001; Brossaud et al., 2001). La composición exacta de la saliva puede variar entre individuos pero se ha demostrado que se compone por proteínas ricas en prolina (PRP), así como en proteínas ricas en histidina o α -amilasa, lactoferrina y mucinoglicoproteínas (Charlton et al., 2002; Bajec et al., 2008; Condelli et al., 2006; De Freitas et al., 2001), siendo la prolina y la histidina las principales proteínas de unión de los taninos. La prolina son proteínas desplegadas con múltiples repeticiones en tándem proporcionando numerosos sitios de unión para la interacción de los taninos.

Sin embargo, la complejidad de la sensación de astringencia se observa en los estudios de Obreque-Slier et al. (2010), quienes demostraron que la reacción entre taninos hidrolizables (del tipo galotaninos y elagitaninos, cuya presencia en el vino solo ocurre si el vino ha estado en contacto con madera) y gelatina *in vitro* no produce agregados insolubles, y sin embargo, producían una sensación astringente *in vivo*, lo que sugiere que la precipitación no es una condición necesaria para que los taninos sean percibidos como astringentes.

Otra causa de la dificultad para evaluar la astringencia de las proantocianidinas *in vivo* es la distinta respuesta fisiológica de los individuos a la hora de catar el vino y percibir la astringencia del mismo, ya que el flujo salival, la viscosidad y la composición proteica varía entre personas, teniendo esto un efecto significativo sobre la percepción de la astringencia (Demiglio et al., 2008; Dinnella et al., 2009; Condelli et al., 2006). La concentración de las proteínas y en particular una mayor tasa de flujo en la saliva han demostrado que, generalmente, reducen la sensación de astringencia. La viscosidad no está directamente relacionada con la lubricación, sin embargo, la sensación de astringencia sí que puede ser producida por una disminución en la viscosidad de la saliva aumentando la fricción (Wijk et al., 2005).

De todas formas, no hay que olvidar que la astringencia no siempre es considerada como un aspecto negativo del vino; algunos autores afirman que la astringencia del vino, cuando no es excesiva, mejora la sensación de complejidad y persistencia (Gawel et al., 2001).

El otro proceso de fundamental importancia de las proantocianidinas en el vino es su importancia en las reacciones que aseguran el color del vino en el tiempo. Durante el proceso de elaboración y envejecimiento de un vino, la concentración de antocianos libres va disminuyendo hasta incluso desaparecer, sin que el color rojo del vino se pierda en la misma proporción. Esta disminución de la concentración de antocianos se debe tanto a reacciones de degradación como de estabilización. Las reacciones de estabilización tienen, la mayoría de las veces, su origen en la formación de combinaciones entre antocianos y taninos. Los antocianos son inestables y deben estar combinados con taninos para formar pigmentos estables, que realmente son los

responsables del color de los vinos con el tiempo. Estos pigmentos estables pueden producirse por condensaciones directas antociano-tanino (A-T) o tanino-antociano (T-A) o bien mediadas por puente de etilo, reacción favorecida en presencia de acetaldehído (Fulcrand et al., 2006).

Además, también se han detectado en los vinos otros compuestos, los flavanil-piranoantocianos, compuestos que aparecen por la unión de un tanino más o menos polimerizado o un piranoantociano (compuestos formados durante la fermentación o post-fermentación) (Francia-Aricha et al., 1997). Los piranoantocianos se forman por reacción de los antocianos con compuestos de bajo peso molecular, principalmente metabolitos producidos por las levaduras, como el acetaldehído, ácido pirúvico o vinilfenol, por medio de una reacción de cicloadición (Fulcrand et al., 1996; Fulcrand et al., 1997).

Los pigmentos formados absorben a longitudes de onda más bajas que los antocianos y se les ha relacionado con el cambio de color de rojo malva a rojo anaranjado que sufren los vinos durante el envejecimiento. Son muy estables e insensibles a las variaciones del pH y sulfuroso.

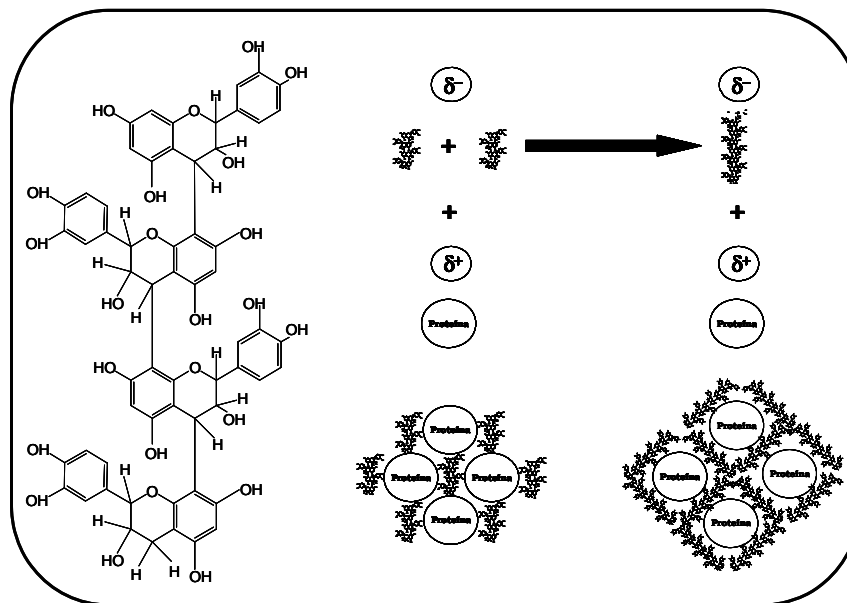
II.5 EVOLUCIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS EN LOS VINOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Los taninos son especies muy reactivas y la formación y la ruptura de enlaces entre flavanoles ocurre continuamente al pH del vino (Cheynier et al., 2000). También las procianidinas se enlazan y precipitan con proteínas y son sustratos de reacciones de oxidación enzimática y no enzimática (Cheynier et al., 2000). Esto significa que ellos también juegan un papel importante en el potencial redox y el estado de oxidación del vino.

Dos son las posibles vías que siguen los taninos para su polimerización, en función de la forma de interactuar entre ellos:

Condensación directa: en el vino las procianidinas se hidrolizan formando un carbocatión, que a su vez reacciona con la carga negativa de otra procianidina, formando un polímero de mayor peso molecular mediante uniones C4-C8 o C4-C6 (Figura II.11).

Figura II.11 Condensación directa de taninos.

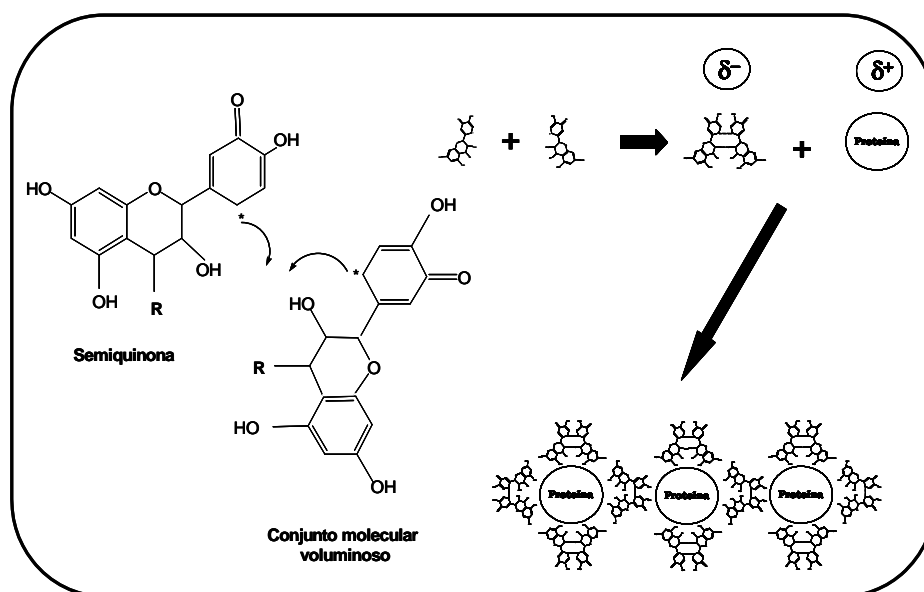


Condensaciones mediadas por acetaldehído: en presencia de oxígeno, la oxidación del etanol forma etanal, el cual es capaz de unir moléculas de procianidinas, formando un polímero de elevado peso molecular (Figura II.12).

Los compuestos formados mediante puentes de acetaldehído son también amarillos pero menos reactivos y su astringencia se ve muy atenuada por lo que participan en las sensaciones de volumen en boca. Este tipo de reacción tiene una cinética superior a la polimerización lineal, lo que conduce a la formación rápida de compuestos polímeros grandes susceptibles de precipitar en función del grado de polimerización y de la concentración. Pero también las procianidinas se pueden hidrolizar formando carbocationes de carga eléctrica positiva que pueden sufrir una adición nucleofílica por otra molécula de flavanol, o bien, por un antociano en su

forma hemiacetal. Este proceso conduce a la reducción de la longitud media de las cadenas de procianidinas y finalmente, a la acumulación de proantocianidinas oligoméricas (Vidal et al., 2002).

Figura II.12 Condensación de taninos mediada por acetaldehído.



Las procianidinas polímeras reaccionan más lentamente que las oligoméricas y las procianidinas formadas por puente de etilo son las que más rápidamente reaccionan. Estas reacciones de ruptura de cadenas de proantocianidinas, que conduce a un descenso de la longitud media de las moléculas, parece ser que organolépticamente produce un descenso de la astringencia y un aumento de las sensaciones amargas (Vidal et al., 2002).

Con el tiempo, un vino tinto muestra un descenso de proantocianidinas totales, particularmente prodelfinidinas, aunque un menor descenso de compuestos galoilados (Cheynier et al., 1997). Los cambios en las proantocianidinas del vino son además complejos porque implican la formación de aductos con los antocianos (Vidal et al. 2002). En los vinos, tal y como se ha comentado anteriormente, los taninos reaccionan con los antocianos y con ellos mismos cambiando su grado de polimerización y

afectando a la astringencia. Su ruptura en medio ácido puede hacer decrecer su tamaño medio haciéndolos menos astringentes. La identificación de las condiciones que favorecen el incremento o descenso del tamaño de los taninos y su impacto en las propiedades sensoriales y estabilidad del vino son cuestiones que todavía no están suficientemente estudiadas. Los estudios de Jorgensen et al. (2004) mostraron que aunque los taninos de las uvas son fácilmente despolimerizados en medio ácido, los del vino no lo son tan fácilmente. Por tanto, una de las preguntas que normalmente se plantean los diversos autores es como influye el tamaño de los taninos del vino en la astringencia. Se podría pensar que lo hace de igual forma que los de la uva, pero las estructuras encontradas en el vino no son iguales que las que se encuentran en la uva y no se sabe con claridad como la incorporación de antocianos o el grado de oxidación de los taninos influye en la astringencia, ni como caracterizar el grado de oxidación de los taninos del vino.

Los estudios de Poncet-Legrand et al. (2010) mostraron que la oxidación de taninos crea nuevos enlaces que son resistentes a las reacciones de tiólisis y por tanto se incrementa mucho la dificultad de su análisis. Estos nuevos enlaces pueden ser intra o intermoleculares y cuando los taninos están en alta concentración, el grado medio de polimerización se incrementa, lo que parece indicar que se forman grandes, ramificadas y complejas macromoléculas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 UVA

III.1.1 MATERIAL VEGETAL

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral se realizó durante tres campañas consecutivas:

- **Campaña 2009**: en esta campaña se utilizaron uvas (*Vitis vinifera L.*) de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah, cultivadas en secano y sistema de vaso en una parcela de la D.O. de Jumilla, pertenecientes a la bodega Finca Luzón. La edad del viñedo era de diez años, óptima para la obtención de vinos de calidad. Cuando las uvas alcanzaron un grado de maduración entorno a 15ºBe (26,8 ºBrix), se procedió a la vendimia y a la recogida de muestras representativas de uva y por triplicado.

- **Campaña 2010**: el material vegetal de estudio en esta campaña también fue uvas de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah cultivadas en la misma parcela que en la campaña anterior. Este año se llevó a cabo un control de maduración de la uva desde pre-envero hasta la recolección de la misma, mediante la realización de un muestreo semanal. Para la obtención de una muestra representativa se cogieron sobre unas 2000 bayas de todas las direcciones del racimo y de los distintos brazos de la cepa de varias filas distribuidas en el viñedo.

- **Campaña 2011**: en esta campaña solo se utilizó uva de la variedad Monastrell cultivada en secano y sistema de vaso de tres parcelas de la D.O. de Bullas situadas a diferentes altitudes. La parcela 1 o zona 1 estaba situada a una altura de 650 metros, la parcela 2 o zona 2 a 730 metros y la parcela 3 o zona 3 a 835 metros. En esta campaña también se llevó a cabo un control de la maduración de la uva, mediante la realización de un muestreo semanal desde pre-envero hasta que la uva alcanzó un contenido de azúcares entorno a 12ºBe (21,5 ºBrix). La caída de granizo durante la primera quincena del mes septiembre en las parcelas 1 y 2 hizo que el estudio no pudiera continuar hasta que la uva alcanzara el punto de madurez más óptimo. También en esta campaña se contó con uva de Monastrell cultivada en secano y sistema de vaso en una

parcela de la D.O. de Jumilla, perteneciente a la bodega Finca Luzón, vendimiada cuando esta alcanzó el punto de madurez óptimo (14^ºBe).

Todos los muestreos se realizaron por triplicado y las muestras de uva fueron transportadas rápidamente al laboratorio donde una parte de las mismas fue utilizada para el análisis de los parámetros físico-químicos, mientras la otra parte fue congelada a -20°C para el posterior análisis de proantocianidinas.

III.2 VINO

III.2.1 VINIFICACIONES

III.2.1.1 CAMPAÑA 2009

El objetivo de las elaboraciones de esta campaña fue determinar el efecto de la aplicación de distintas prácticas enológicas en uvas de Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah, tales como la adición de enzimas de maceración, adición de nieve carbónica o hielo seco y la aplicación de una maceración prefermentativa en frío en el contenido y composición de las proantocianidinas, tanto durante la maceración fermentativa (como en el caso de las uvas Monastrell), como en el vino terminado (vinos de Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah).

La uva fue vendimiada de forma manual en cajas de 20 Kg y transportada rápidamente a la bodega experimental de Jumilla. A continuación, la uva se introdujo en una cámara frigorífica para disminuir su temperatura a 10°C y que el inicio de la maceración tuviera lugar a baja temperatura. En todas las vinificaciones, la uva fue despallada, estrujada y sulfitada con una dosis de 8 g de SO₂ por cada 100 Kg de uva. La acidez total fue corregida a 5,5 g/L. Todas las vinificaciones se realizaron por triplicado en depósitos de 100 L de acero inoxidable, conteniendo 90 Kg de uva estrujada y despallada.

III.2.1.1.1 Diseño de las vinificaciones:

a) Congelación con nieve carbónica

Para determinar el efecto de la nieve carbónica sobre el contenido y composición de las proantocianidinas se adicionaron 100 Kg de nieve carbónica directamente a los depósitos de 100 litros, conteniendo 90 kg de uvas estrujadas y despalladas. El uso de la nieve carbónica mantuvo el mosto congelado durante 3 días. Después se añadió levadura de fermentación Levuline GALA (Oenofrane, Francia) a una dosis de 10 g/100 Kg de uva. El tiempo de maceración fermentativa fue de 10 días.

b) Maceración prefermentativa en frío

Para determinar el efecto de la maceración prefermentativa a baja temperatura sobre el contenido y composición de las proantocianidinas, los depósitos de 100 litros se introdujeron en una cámara de refrigeración a 10°C durante 10 días, practicándose remontados dos veces al día. Transcurrido este tiempo, los depósitos fueron trasladados a la bodega y se añadió como levadura de fermentación Levuline GALA (Oenofrane, Francia) con una dosis de 10 g/100 Kg de uva. El tiempo de maceración fermentativa se prolongó durante 10 días.

c) Enzimas

Para determinar el efecto de los enzimas comerciales sobre el contenido y composición de las proantocianidinas, en el momento del encubado se añadió un enzima comercial (Enozym Vintange, Agrovin S.A., España) a una dosis de 5 g/100 Kg de uva. La levadura de fermentación utilizada fue Levuline GALA (Oenofrane, Francia) con una dosis de 10 g/100 Kg de uva y el tiempo de maceración fue de 10 días.

d) Testigo

La vinificación testigo se llevó a cabo en depósitos de 100 litros. La levadura de fermentación utilizada fue Levuline GALA (Oenofrane, Francia) con una dosis de 10 g/100 Kg de uva y el tiempo de maceración fue de 10 días.

La fermentación de todos los vinos se realizó a 25°C y se tomaron lecturas de temperatura y densidad del mosto, dos veces al día hasta que el °Be llegó a cero. Durante el proceso de maceración se realizaron dos remontados diarios para favorecer el proceso de oxigenación y de extracción de compuestos fenólicos. Transcurrido ese tiempo de maceración, se procedió al descube para obtener finalmente un vino, mezcla del vino flor y el vino prensa.

Finalizadas la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica, la cual tuvo lugar de manera espontánea, los vinos fueron trasegados y se recogieron las muestras de los vinos ya finalizados, para cada vino de las diferentes variedades y cada tratamiento para la realización de los análisis de proantocianidinas.

Además, en el caso de las elaboraciones de vinos de la variedad Monastrell, se realizó un muestreo cada dos días durante los 10 días de maceración fermentativa para llevar a cabo los análisis de proantocianidinas.

III.2.1.2 CAMPAÑA 2010

El objetivo de las elaboraciones de esta campaña fue determinar, para las uvas de Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah, la dinámica de extracción y la composición de las proantocianidinas durante la vinificación, aplicando una maceración fermentativa de 20 días. Asimismo, se determinó el efecto de la aplicación de diferentes tiempos de maceración (descubes a 5, 10 y 20 días) en el contenido y composición de las proantocianidinas en los vinos de las diferentes variedades tras finalizar la fermentación alcohólica.

La uva fue vendimiada cuidadosamente y transportada a la bodega en cajas de 20 Kg. Todos los vinos se hicieron por triplicado en depósitos de acero inoxidable de 100 litros utilizando en cada uno de ellos 90 Kg de uva. En todas las vinificaciones y antes de que empezara la fermentación alcohólica la acidez se corrigió a 5,5 g/L y se adicionaron levaduras seleccionadas (Levuline GALA, Oenofrane, Francia, levaduras rehidratadas usando 10 g de levadura/100 kg de uva). Todas las vinificaciones se realizaron a una temperatura aproximada de 25°C. Se llevaron a cabo dos remontados diarios y se fue registrando la temperatura y densidad durante todo el proceso.

Se aplicaron tres diferentes tiempos de maceración (5, 10 y 20 días). Transcurridos los distintos tiempos maceración, se procedió al descube para obtener finalmente un vino, mezcla del vino flor y el vino prensa. Hasta este momento, se recogieron muestras del mosto-vino cada dos días durante los 20 días de maceración fermentativa que duró la maceración más larga, para llevar a cabo los análisis de proantocianidinas.

Al finalizar la fermentación alcohólica, los vinos fueron trasegados y se almacenaron a temperatura controlada (12-15°C) adicionando además nitrógeno en el espacio de cabeza de los depósitos para evitar el inicio de la fermentación maloláctica. Los análisis de proantocianidinas y sensorial para todos los vinos se realizó un mes después del final de la fermentación alcohólica.

III.2.1.3 CAMPAÑA 2011

El objetivo de las elaboraciones de esta campaña era determinar el efecto de la ausencia de semillas durante el proceso de vinificación de uva Monastrell sobre el contenido y composición de proantocianidinas y en los parámetros cromáticos.

Para ello, se seleccionaron y desgranaron a mano 12 kilos de uva. A la mitad de esos kilos se le quitaron las semillas abriendo la baya por la mitad con la ayuda de un bisturí y a los otros seis kilos restantes solo se abrió la baya por la mitad. Las vinificaciones se llevaron a cabo con 2 kilos de uva con y sin semillas (vino testigo) en tarros de cristal de 5 litros con una tapa agujereada y revestida de teflón para dejar

salir el gas carbónico generado durante el proceso de fermentación alcohólica. En todas las vinificaciones, la uva fue sulfitada con una dosis de 80 mg de SO₂ por cada Kg de uva y también se le adicionó nieve carbónica (sobre 100 g) para desplazar el oxígeno del espacio de cabeza de los tarros de cristal. La acidez total fue corregida a 5,5 g/L y se adicionaron levaduras seleccionadas a una dosis de 20 g/hL (Zymaflores Rx60, Laffort, Francia).

La fermentación tuvo lugar a unos 25°C y a medida que avanzaba el proceso el sombrero fue sumergido con la ayuda de unas tapas de plástico. La maceración duro 10 días. Terminada la fermentación alcohólica los vinos fueron embotellados y almacenados a 20°C. Los vinos fueron analizados a los 4, 7 y 10 días de maceración, al finalizar la fermentación alcohólica y después de 3 meses de envejecimiento en botella.

III.3. METODOLOGÍA

III.3.1 DETERMINACIONES FÍSICO-QUÍMICAS DE LA UVA

Se preparó una muestra de aproximadamente 300 g de uva, cortando los granos por el pedúnculo y eligiendo aquellos más representativos de la muestra recogida en la parcela. A continuación, se procedió a su trituración, usando un Robot coupe modelo Gt 550 (Robot coupe, Francia) durante dos minutos, seleccionando una baja velocidad para evitar la ruptura de las pepitas.

En el mosto obtenido por centrifugación del triturado de la uva a 4400 rpm durante 15 minutos, se determinaron el grado Brix, acidez total, pH, ácido málico y tartárico.

III.3.1.1 GRADO BRUX

La medida se realizó en un refractómetro digital Atago modelo PR-101 (Atago, USA) con sensor de temperatura y ajuste previo del cero con agua destilada. A partir de este dato se obtienen mediante tablas, los valores de grado Baumé, contenido de azúcares, densidad y grado probable del vino.

III.3.1.2 pH

Se mide con un valorador automático Metrohm modelo 686 (Metrohm, Suiza), siguiendo el método oficial CEE, Reglamento N° 2676/90.

III.3.1.3 ACIDEZ TOTAL

Se obtiene potenciométricamente con un valorador automático Metrohm modelo 686 (Metrohm, Suiza), según el método oficial CEE, Reglamento N° 2676/90. Los resultados se expresan en g/L de ácido tartárico.

III.3.1.4 ÁCIDO L-MÁLICO

Se determina mediante test enzimático con secuenciador automático Hycel, modelo Lisa 200 (Hycel Diagnostics, EEUU), según el método oficial CEE Reglamento N° 2676/90. Los resultados se expresan en g/L de ácido málico en el mosto.

III.3.1.5 ÁCIDO TARTÁRICO

Se ha determinado siguiendo el método colorimétrico Rebelein modificado, con valorador secuencial automático Hycel, modelo Lisa 200 (Hycel Diagnostics, EEUU). Los resultados se expresan en g/L de ácido tartárico en el mosto.

III.3.2 DETERMINACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN UVA Y VINO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Para poder tener información sobre el contenido, composición y grado medio de polimerización de las proantocianidinas en uva y vino se ha utilizado el método de la fluoroglucinolisis propuesto por Kennedy y Jones (2001). Este método está basado en la ruptura de los enlaces interflavánicos en medio ácido y en presencia de un agente nucleofílico (fluoroglucinol), seguido de un análisis de HPLC de los productos de reacción.

III.3.2.1 EXTRACCIÓN DE PROANTOCIANIDINAS

III.3.2.1.1 Extracción de proantocianidinas de uva utilizando acetona al 70%

Se utilizó el método descrito por Hernández-Jiménez et al. (2009). Diez bayas de cada una de las tres variedades, Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah fueron peladas, separando las pepitas y los hollejos de la pulpa. Después las pepitas y hollejos fueron introducidos por separado en tubos Falcom con 10 mL de una disolución de acetona/H₂O (70%). También se añadió nitrógeno gaseoso en el espacio de cabeza para evitar posibles oxidaciones. La extracción, se llevó a cabo en un agitador orbital a 200 rpm y a temperatura ambiente durante 24 horas y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de extracción, el sobrenadante fue separado y concentrado en un centrivap (Figura III.1) (Labconco, USA) a 35°C durante 24 horas. Después de liofilizarlo el extracto seco obtenido fue redisoluto en 2 mL de metanol.

Figura III.1 Concentrador a vacío (Centrivap).



III.3.2.1.2 Extracción de proantocianidinas de uva utilizando una solución etanólica al 12,5%

Treinta bayas de cada una de las tres variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah fueron peladas separando manualmente las semillas y los hollejos de la pulpa. Después las semillas y los hollejos fueron introducidos en tubos Falcom con 50 mL de una solución hidroalcohólica (12,5% de etanol, 2 g/L de ácido tartárico y pH 3,6). También se añadió nitrógeno gaseoso en el espacio de cabeza para evitar posibles oxidaciones. La extracción, se llevó a cabo en un agitador orbital a 200 rpm y a temperatura ambiente durante 72 horas y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de extracción, el sobrenadante fue separado y concentrado en un centrivap (Labconco, USA) a 35°C durante 24 horas. Después de liofilizarlo, el extracto seco fue redissuelto en metanol.

III.3.2.1.3 Extracción de las proantocianidinas de semilla utilizando soluciones modelo y enzimas de maceración

0,5 g de semillas procedentes de 1000 bayas de uva de las variedades Monastrell y Cabernet Sauvignon fueron introducidos en frascos de cristal de 25 mL con 15 mL de diferentes soluciones: una solución control acuosa (5 g/L de ácido tartárico a pH 3,6), una solución control hidroalcohólica (idéntica a la solución control acuosa pero conteniendo 12,5% de etanol) y ambas soluciones a las cuales se les adicionó cuatro enzimas puros (todos ellos proporcionados por Sigma, St. Luis, MO, EEUU) y un enzima comercial. Los enzimas puros fueron xilanasa de *Thermomyces lanuginosus* (EC 3.2.1.8, 2,5 unidades/mg de sólido), celulasa de *Aspergillus Níger* (EC 3.2.1.4, 1,92 unidades/mg de sólido) y dos enzimas pécticos: poligalacturonasa de *Rhizopus sp* (EC 3.2.2.15, ca. 600 units/g de sólido) y pectínmetilesterasa de *Orange Peel* (EC 3.1.1.11, 137 unidades/mg de sólido). El enzima comercial fue Enozym Vintage (Agrovim, S.A., España), utilizado en el proceso de vinificación de las uvas de la vendimia de 2009. Este enzima se obtiene a partir de cultivos de *Aspergillus niger* y contiene actividades enzimáticas pectolíticas: poligalacturonasa, pectínliasa y

pectínesterasa, estando presentes también las actividades β -glucanasa, celulasa, hemicelulosa y proteasa.

Las enzimas se añadieron a una dosis de 100 mg/L, excepto en el caso de pectínmetilesterasa que fue de 5 mg/L debido a su alta actividad enzimática y de la enzima comercial que fue de 10 mg/L (dosis recomendada por el fabricante). La concentración final de las enzimas fue de 0,25 unidades/mL para xilanasas, 0,19 unidades/mL para celulosa, 0,06 unidades/mL para poligalacturonasa y 0,68 unidades/mL para pectínmetilesterasa. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

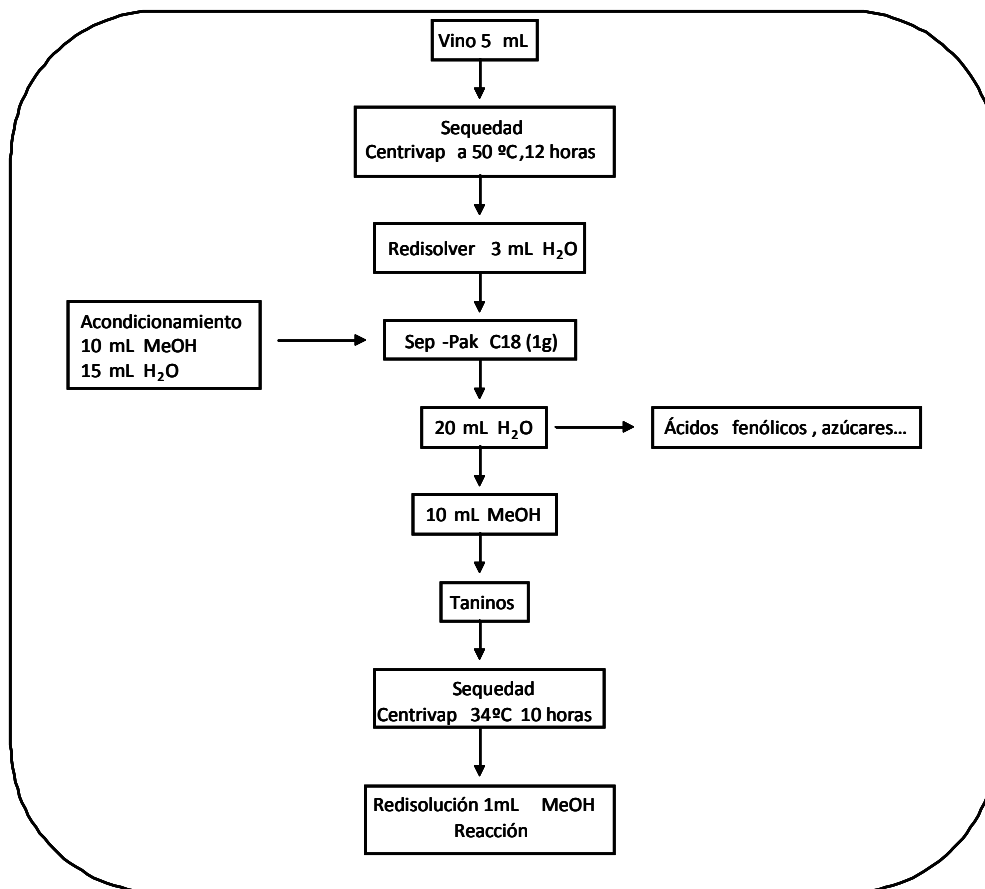
Para minimizar la posible oxidación de las proantocianidinas y el crecimiento de levaduras se adicionó nitrógeno en el espacio de cabeza de los tubos y la extracción se llevó a cabo en un agitador magnético a 700 rpm y a temperatura ambiente durante 48 horas, todo ello en oscuridad. El sobrenadante fue concentrado en un centrivap (Labconco, USA) a 35°C durante 24 horas. Después de liofilizarlo, el extracto seco obtenido fue redissuelto en metanol.

III.3.2.1.4 Extracción de proantocianidinas del vino

Para la extracción de proantocianidinas del vino se utilizó una optimización del método propuesto por Pastor del Río et al. (2006) y que se muestra en la Figura III.2.

Para ello, 5 mL de cada vino fueron concentrados en un centrivap a 50°C durante 12 horas. A continuación, los extractos secos fueron redissueltos en 3 mL de agua y pasados por cartuchos Sep-Pak C18 (1g, Waters, Mildford, USA) previamente acondicionados con 10 mL de metanol y 15 mL de agua. Después, los cartuchos se lavaron con 15 mL de agua para eliminar compuestos interferentes (ácidos fenólicos, azúcares, etc) y los compuestos de interés se eluyeron con 10 mL de metanol. El extracto metanólico fue concentrado de nuevo en el centrivap a 35°C durante 10 horas, liofilizado y redissuelto posteriormente en 1 mL de metanol.

Figura III.2 Fraccionamiento de proantocianidinas en el vino.



III.3.2.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE PROANTOCIANIDINAS

Para la determinación de proantocianidinas de semillas, hollejos y vino se utilizó una optimización del método descrito por Kennedy y Taylor (2003). Para ello, a 100 µL de extracto metanólico de cada una de las muestras se le añadió 100 µL del reactivo de floroglucinolisis conteniendo 100 g/L de floroglucinol y 20 g/L de ácido ascórbico en HCl 0,2 N en metanol.

La reacción se llevo a cabo a 50°C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 2 volúmenes de acetato de sodio 200 mM para parar la reacción. Después las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 13000 rpm y colocadas en viales para su posterior inyección en el HPLC.

Para poder determinar los taninos monoméricos presentes de forma natural, el extracto metanólico, se analizó también sin la reacción de fluoroglucinol en las mismas condiciones descritas anteriormente.

III.3.2.3 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS

La separación de los productos de reacción (unidades terminales y aductos con el fluoroglucinol) se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido Waters 2695 (Waters, PA, USA), equipado con un detector diodo-array Waters 2696. La columna utilizada fue una Atlantis C18 (250 x 4,6mm, 5 μ m de tamaño de partícula) protegida con una precolumna del mismo material (20 x 4,6mm, 5 μ m de tamaño de partícula) (Waters, Milford, MA).

El volumen de muestra inyectada fue 10 μ L y el análisis fue realizado a una temperatura de 30°C. Los disolventes utilizados fueron ácido fórmico al 2% (A) y una mezcla de acetonitrilo/H₂O/fórmico (B) (80:18:2) con un flujo de 0,8 mL/min. Las condiciones de gradiente fueron las mostradas en la tabla III.1.

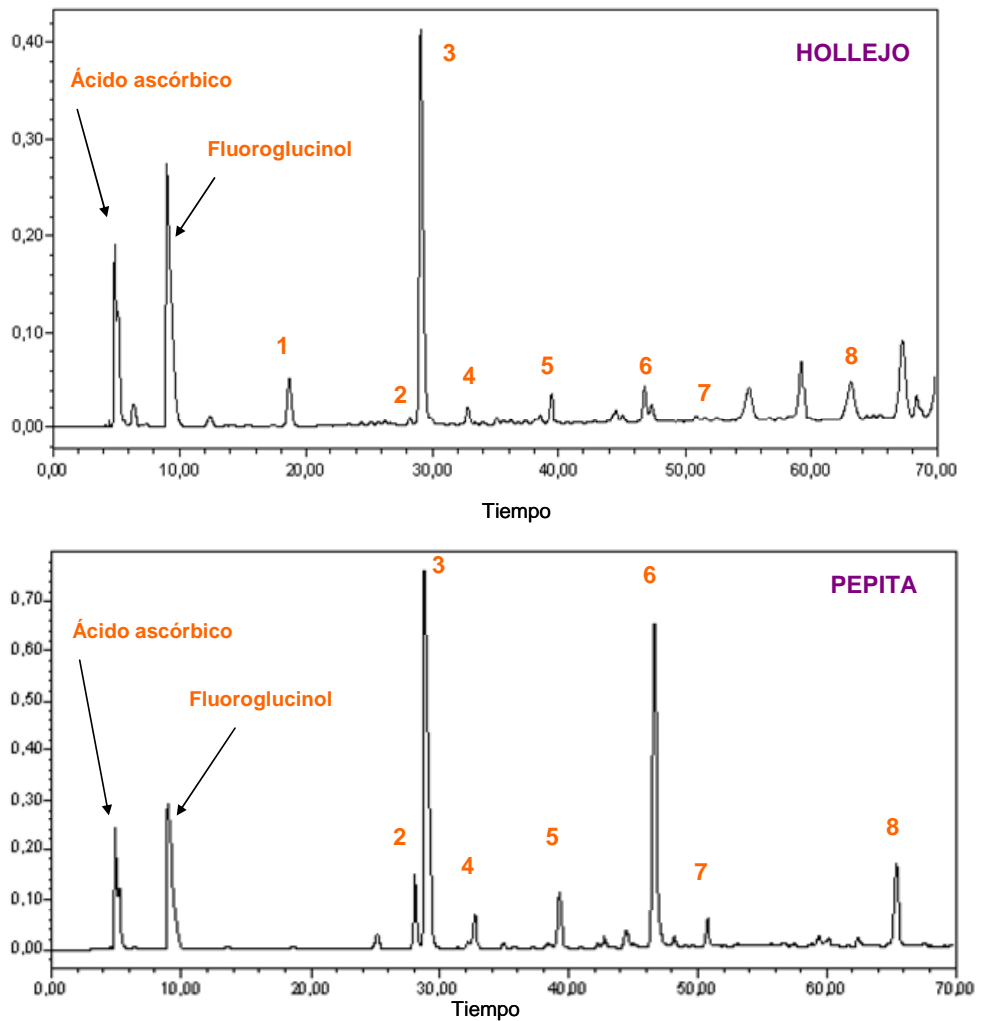
Tabla III.1 Condiciones cromatográficas.

Tiempo (min)	A	B
0	100	0
5	100	0
35	90	10
65	80	20
80	75	25

Tabla III. 2 Coeficientes molares.

Compuesto	Coeficiente mM
(+)-Catequina terminal	$4,57 \times 10^{-7}$
(-)-Epicatequina terminal	$4,57 \times 10^{-7}$
(-)-Epicatequinagalato terminal	$1,34 \times 10^{-7}$
(+)-Catequina extensión	$4,66 \times 10^{-7}$
(-)-Epicatequina extensión	$4,66 \times 10^{-7}$
(-)-Epigallocatequina extensión	$1,57 \times 10^{-6}$
(-)-Epicatequinagalato extensión	$1,26 \times 10^{-7}$

Figura III.3 Cromatogramas de los diferentes compuestos identificados en el hollejo y pepita de la uva.



Abreviaturas. 1: (-)-Epigallocatequina-fluoroglucinol; 2: (+)-Catequina-4-fluoroglucinol; 3: (-)-Epicatequina-4-fluoroglucinol; 4: (-)-Epicatequina-2-fluoroglucinol; 5: (+)-Catequina; 6: (-)Epicatequina-3-O-galato-fluoroglucinol; 7: (-)-Epicatequina; 8: (-)-Epicatequina-3-O-galato.

Los diferentes compuestos fueron identificados a 280 nm (Figura III.3) comparando sus tiempos de retención y espectros respecto a patrones externos. Los productos de ruptura se estiman usando los factores de respuesta relativos a la (+)-catequina (Extrasynthèse, Geny, France), utilizada como patrón de cuantificación (Tabla III.2). Para calcular el grado medio de polimerización (GPm), la suma de todas las subunidades (monómeros y aductos del fluoroglucinol, en moles) se divide por la suma de todos los monómeros (en moles). También puede ser determinado el porcentaje de galoilación, como la suma de los porcentajes de unidades galoiladas y la masa molecular (Pm).

El porcentaje de las proantocianidinas del vino que proceden del hollejo y las semillas derivadas del vino se determinaron siguiendo el método propuesto por Peyrot des Gayons y Kennedy (2003). Según este método, la relación entre el porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión de las proantocianidinas presentes en el vino y la uva multiplicado por 100 nos da el valor del porcentaje de proantocianidinas del hollejo, mientras que el porcentaje de proantocianidinas de las semillas se obtuvo restando este valor a 100. La concentración de proantocianidinas del hollejo y de las semillas en el vino se determinó multiplicando estos porcentajes por el contenido de proantocianidinas totales presentes en el mismo.

III.3.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CROMÁTICOS EN EL VINO

La intensidad de color (IC) fue calculada como la suma de las absorbancias a 620 nm, 520 nm y 420 nm (Glories, 1984) y el tono como el cociente entre las absorbancias a 420 nm y 520 nm (Sudraud, 1958). Los antocianos totales fueron determinados siguiendo el método descrito por Ho et al. (2001) y el índice de polifenoles totales (IPT) fue calculado acorde con el método propuesto por Ribéreau-Gayon et al. (1983).

El cálculo de los parámetros de copigmentación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Levensgood y Boulton (2004). Para la obtención de estos parámetros es necesaria la determinación de varias medidas espectrofotométricas:

- A_{280} y A_{365} : La preparación de la muestra es igual para la obtención de estos dos valores. En un vaso de precipitado de 150 mL se añadieron 50 mL de agua a 0,5 mL de muestra de vino. Se agitó y se midió la absorbancia en cubetas de 1 cm de paso óptico a 280 y 365 nm, respectivamente.

En el vino previamente ajustado a pH 3,6 se determinó:

- A_{acet} : Se adicionaron 20 μ L de acetaldehído al 10% a 2 mL de la muestra de vino, agitándose inmediatamente. Después de 45 min, se midió la absorbancia a 520 nm en celdas de 0,1 cm de espesor. La medida se expresa referida a cubetas de 1 cm de paso óptico.

- A_{20} : En un tubo de 10 mL se mezclaron 200 μ L de vino y 3,8 mL de vino sintético (24 mL de etanol absoluto, 176 mL de agua destilada y 0,5 g de bitartrato pótasio, ajustando el pH a 3,6). Se agitó y a los 10 min se midió la absorbancia a 520 nm en cubetas de 1 cm de espesor.

- A_{SO_2} : 160 μ L de SO_2 al 5% se añadieron a 2 mL de muestra. Se agitó y tras 1 min se midió la absorbancia a 520 nm en cubetas de 0,2 cm de paso óptico. Se expresa referida a cubetas de 1 cm de paso óptico.

Con los resultados de estas analíticas se obtuvieron los siguientes resultados:

- Color del vino debido a antocianos copigmentados: $CC = A_{acet} - A_{20}$
- Antocianos totales: $AT = A_{20} - A_{SO_2}$
- Color debido a pigmentos poliméricos: $CP = A_{SO_2}$
- Estimación del contenido en el factor flaconas: $CF = A_{365}$
- Estimación de fenoles totales (monómeros y taninos): $PT = A_{280}$
- Fracción de color debido a copigmentación = $(A_{acet} - A_{SO_2}) / A_{acet}$
- Fracción de color debido a antocianos libres = $(A_{20} - A_{SO_2}) / A_{acet}$

- Fracción de color debido a pigmentos poliméricos= A_{SO_2} / A_{acet}

Todas estas medidas fueron realizadas, en el mosto-vino y en el vino previamente centrifugados, en un espectrofotómetro HELIOS α (TermoSpectronic, EEUU).

III.3.4 ANÁLISIS SENSORIAL

El análisis sensorial de los vinos fue llevado a cabo en una sala aclimatada a 20°C y libre de olores, provista de cabinas individuales y luz blanca.

III.3.4.1 EVALUACIÓN DE LA ASTRINGENCIA DE LOS VINOS

Diez-doce jueces del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Murcia fueron seleccionados en función a su disponibilidad. Estos fueron entrenados para evaluar diferentes descriptores del vino utilizando para ello soluciones modelo que simulaban las mismas condiciones de éste. Todas las catas se realizaron en copas oscuras y a nariz tapada.

Para el entrenamiento, las soluciones modelo contenían etanol (12%), ácido tartárico (3, 5 y 6 g/L) para la evaluación de acidez, sulfato de quinina (0,05, 0,1 y 0,2 g/L) para el amargor y sulfato de aluminio (0,5, 1 y 2 g/L) para la astringencia. A cada juez se le pidió que mantuviera la solución modelo en su boca un cierto tiempo y que después valorara la intensidad de cada uno de estos parámetros en una escala de 0-7 puntos. Entre las distintas soluciones los panelistas se iban enjuagando la boca con agua mineral, después comieron rosquillas durante 30s y finalmente se volvían a enjuagar la boca con agua mineral durante 45s.

Para la cata de vinos, las muestras fueron presentadas a los jueces de forma aleatoria y cataron cuatro muestras por sesión. Antes de la cata, las tres repeticiones de cada uno de los vinos fueron mezcladas para obtener una muestra más representativa y evitar posibles diferencias entre las mismas.

III.3.4.2 PRUEBA TRIANGULAR

La prueba triangular se aplica para determinar si existen diferencias entre las características de los vinos. Es una prueba de diferenciación en la que se presentan al catador tres muestras codificadas, dos de las cuales son iguales y se le pide que indique cual es la muestra diferente y cual es la muestra preferida. Para determinar los resultados se utilizó la técnica del juicio forzado en la que se suman únicamente las respuestas correctas y se comprueba mediante tablas estadísticas si la diferencia es significativa. Los catadores que participaron en esta prueba fueron 12, sin entrenamiento previo, a los que se les presentó una ficha de cata en la que debían de evaluar el grado de diferencia apreciado para los atributos de la fase visual, olfativa y gustativa.

III.3.4.3 ANÁLISIS DESCRIPTIVO

En el análisis descriptivo los atributos a valorar son previamente descritos (Figura III.4) y se les pide a los catadores que cuantifiquen la magnitud de las características del vino que se pretende describir. Estas características se dividen en tres grandes grupos que hacen referencia al color, al aroma y al gusto. El panel de cata para este tipo de prueba está formado por 10 catadores experimentados, miembros de la universidad de Murcia.

El vino se dejó durante aproximadamente 30 min a temperatura ambiente antes de su evaluación. Después, unos 40 mL del mismo fueron introducidos en copas codificadas y presentadas a los panelistas.

Figura III.4 Ficha de cata descriptiva.



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS,
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

Facultad de Veterinaria

FECHA: _____ **CATADOR:** _____
MUESTRA: _____

Puntuación: (de 0 a 10). A mayor sensación mayor puntuación

COLOR:	Puntuación	GUSTO:	Puntuación
		INTENSIDAD	
INTENSIDAD		CALIDAD	
TONALIDAD		CUERPO	
AROMA:	Puntuación	EQUILIBRIO	
INTENSIDAD		PERSISTENCIA	
CALIDAD		AMARGOR	
VEGETAL		ASTRINGENCIA	
AFRUTADO		SEQUEDAD	
CONFITURA		VERDOR	
ESPECIADOS		MADUREZ	
TOSTADOS			
COMPOTA			

Observaciones:

III.3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos han sido realizados utilizando el paquete estadístico Statgraphics 5.0 Plus.

El análisis de la varianza se ha utilizado para determinar si existen diferencias significativas entre medias. La separación de medias se ha realizado aplicando el test LSD.

El uso de las técnicas estadísticas multivariantes, nos han permitido resumir y sintetizar grandes conjuntos de variables en función de ciertos objetivos de cara a obtener informaciones válidas que permitan una mejor comprensión del fenómeno objeto de estudio. En este estudio se ha utilizado el análisis CLUSTER que busca y agrupa individuos o grupos tan similares como sea posible.

**IV. CONTENIDO Y COMPOSICIÓN PROANTOCIANIDÍNICA
DE LA UVA. EFECTO DE LA VARIEDAD,
GRADO DE MADURACIÓN Y LOCALIZACIÓN DEL VIÑEDO**

IV.1 INTRODUCCIÓN

Las proantocianidinas de la uva son importantes en la calidad organoléptica del vino. El conocimiento de la cantidad y composición de las proantocianidinas antes de vendimia nos puede dar información sobre los taninos que pueden ser extraídos al vino durante el proceso de maceración, lo cual puede ser importante desde un punto de vista cualitativo. Los estudios de Mercurio et al. (2010) y Kassadra y Kennedy (2011) han mostrado como el precio que puede llegar a alcanzar un vino está muy relacionado con la cantidad de compuestos fenólicos, especialmente taninos, presentes en los vinos.

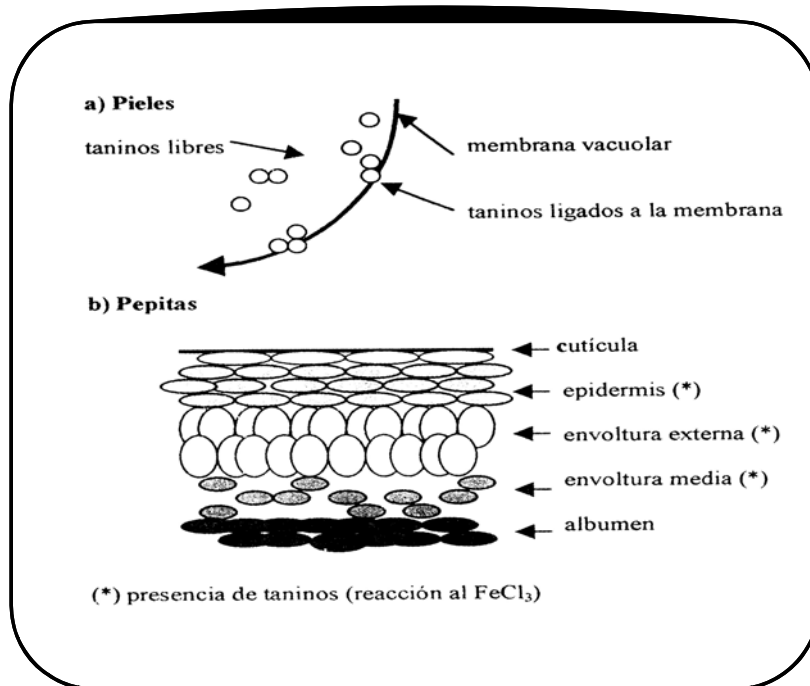
IV.1.1 LOCALIZACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN LAS UVAS

Durante la vinificación en tinto, la maceración es la etapa durante la cual tiene lugar la extracción de los compuestos fenólicos desde las partes sólidas de la uva al mosto-vino. En la dinámica de esta transferencia juega un papel muy importante la localización celular de estos compuestos en la baya.

Los taninos están presentes, tanto en variedades tintas como en variedades blancas, en el hollejo, en la semilla y en la pulpa. Los taninos presentes en los hollejos pueden ser clasificados en tres categorías en función de su localización (Amrani Joutei et al., 1994) (Figuras IV.1 y IV.2):

- a) Taninos de las vacuolas, que están en forma condensada en las células próximas a la epidermis y en forma de granulaciones difusas en las células internas del mesocarpio.
- b) Taninos ligados a la membrana proteofosfolipídica de las células de la piel, insensibles a la acción de ultrasonidos.
- c) Taninos integrados en la pared celulopectídica.

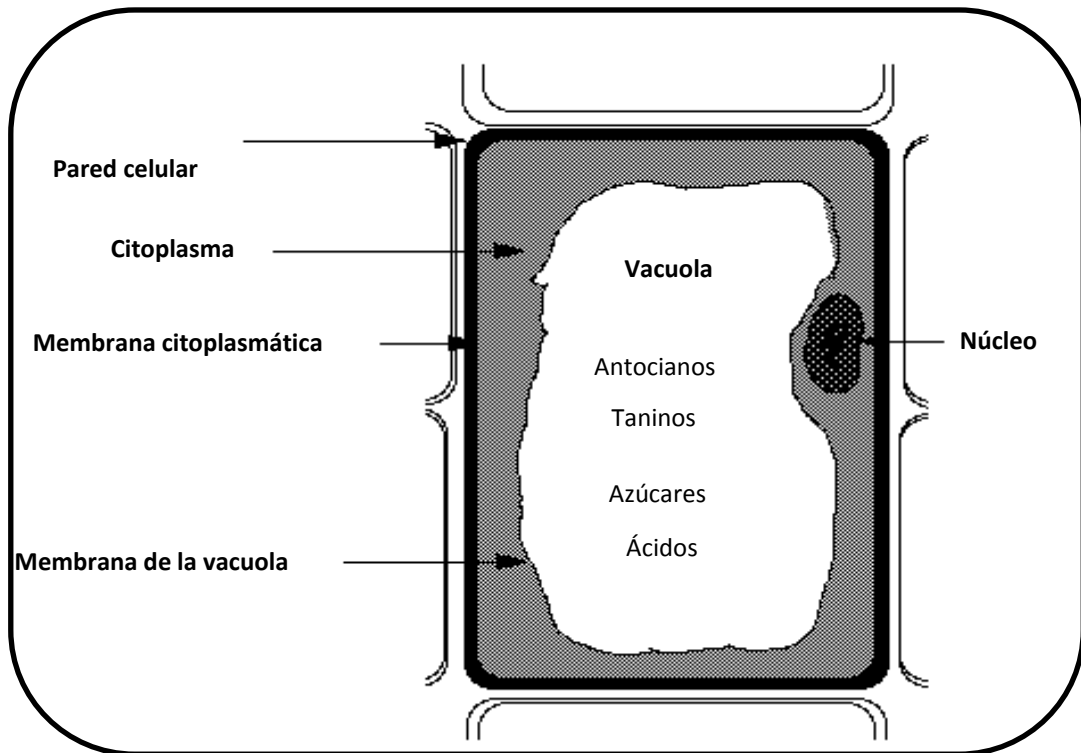
Figura IV.1 Localización de los taninos en la baya (Saint - Cricq et al., 1999).



Solamente los taninos de las vacuolas pueden ser fácilmente extraídos y pueden ser considerados como taninos libres, a diferencia de los que están enlazados a otros compuestos como proteínas, pectinas y fosfolípidos. Su estructura consiste en procianidinas más polimerizadas que la de las semillas e incluyen algunas unidades trihidroxiladas (Souquet et al., 1996).

Los taninos no se encuentran en la misma cantidad en todas las células del hollejo. Algunas células poseen grandes cantidades de taninos, fundamentalmente las localizadas en la epidermis del hollejo, mientras que otras contienen pequeñas cantidades e incluso ninguna (Glories y Saucier, 2000).

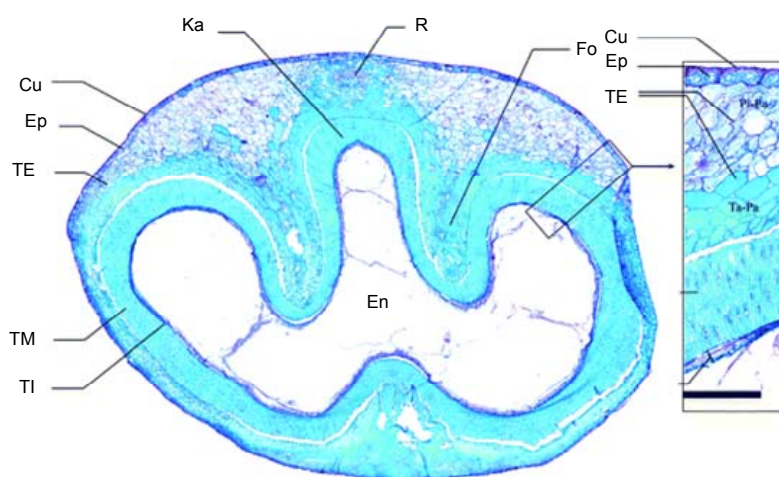
Figura IV.2 Localización de taninos en las vacuolas de las células de la piel.



En las semillas, los taninos ocupan una posición de defensa del embrión, estando presentes en la epidermis, la parte media del tegumento externo y la capa interna del tegumento interno (Cadot et al., 2006a) (Figura IV.3). Los flavan-3-oles monómeros están concentrados en el tegumento externo, por tanto, estos compuestos son más fácilmente extraídos durante el proceso de elaboración del vino. Cadot et al. (2006a) indicaron que la zona que se encuentra entre la cutícula y las capas internas lignificadas es, tal vez, la más importante en cuanto a la concentración de polifenoles, ya que ella contiene la mayor parte de compuestos solubles. La presencia del tegumento medio, el cual es impermeable y muy duro, podría impedir la extractabilidad de los compuestos fenólicos del tegumento interno durante el proceso de elaboración del vino. Estos mismos autores no detectaron proantocianidinas en el endosperma. Esta observación está en desacuerdo con Thorngate y Singleton (1994), quienes encontraron flavan-3-oles en el endosperma aunque en cantidades más bajas que aquellas encontradas en la cubierta externa blanda de las semillas. La presencia de

estos compuestos en el endosperma podría ser atribuida simplemente a la contaminación de éste con material de la cubierta de las semillas.

Figura IV.3 Sección longitudinal de una semilla (Cadot et al., 2006a).



Abreviaciones. Cutícula (Cu), epidermis (Ep), tegumento externo (TE), tegumento interno (TI), tegumento medio (TM), endosperma (En), Karina (Ka), Rafe (R), Fosetas (Fo)

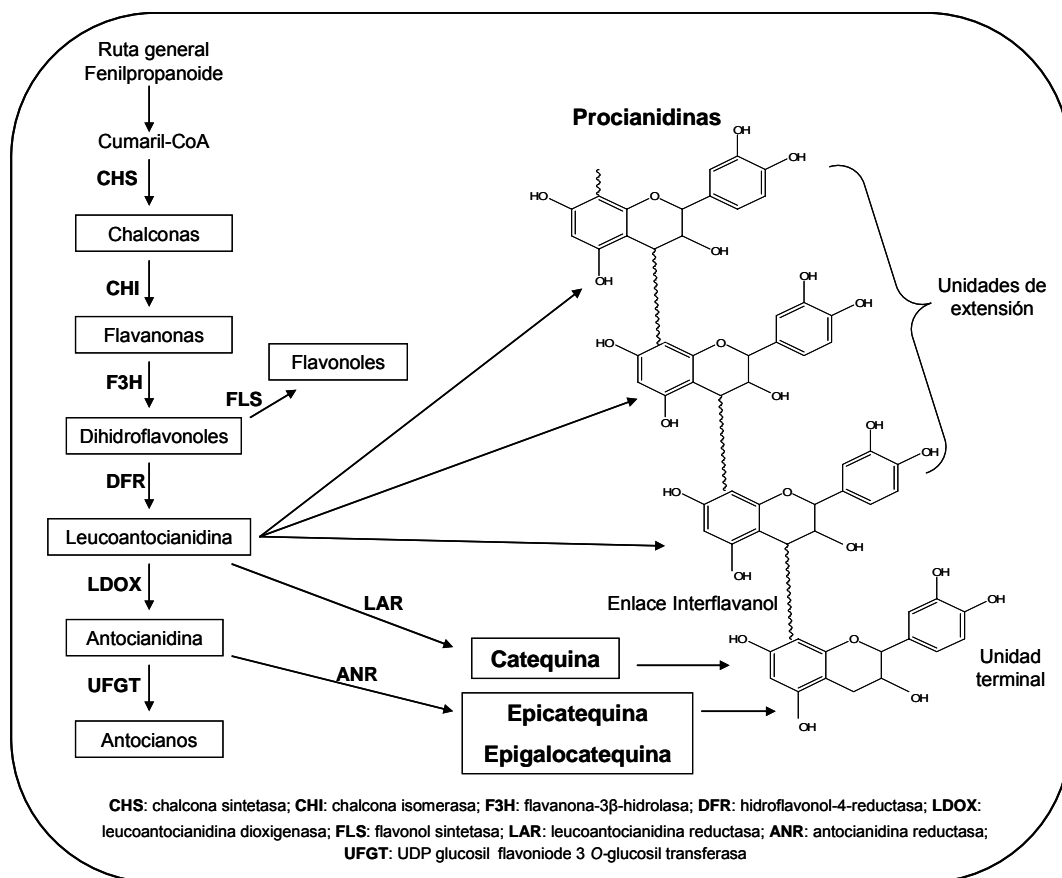
Los taninos de las semillas se encuentran en estado libre y también esterificados con el ácido gálico. Geny et al. (2003) observaron que la concentración, grado medio de polimerización y proporción de epicatequina-3-O-galato de los taninos en las pepitas era más alta en aquellos localizados en las paredes de las células, que en las partes más internas de las mismas, siendo además esta diferencia más grande cuando las pepitas han madurado.

IV.1.2 SÍNTESIS DE PROANTOCIANIDINAS

La biosíntesis de los taninos o proantocianidinas es parte de la ruta de los flavonoides que también produce antocianos y flavonoles. La genética y bioquímica de esta ruta ha sido caracterizada en varias plantas (Shirley et al., 1992; Holton y Cornish,

1995; Boss et al., 1996; Winkel-Shirley, 2001). La síntesis de proantocianidinas y antocianos comparten etapas en común (Figura IV.4), conduciendo a la síntesis de los flavan-3,4-dioles (tales como las leucocianidinas), las cuales son precursores de la síntesis de antocianos y de las unidades de extensión de las proantocianidinas (Stafford, 1990). Se cree que la síntesis de las proantocianidinas ocurre por adición de un intermediario derivado de un flavan-3,4-diol (tal como la leucoantocianidina) a una unidad de flavan-3-ol terminal (tal como la catequina o epicatequina) con una adición secuencial de unidades de extensión como se muestra en la figura. Según este modelo, para la producción de proantocianidinas de alto grado de polimerización se requiere una mayor transformación de flavan-3,4-dioles en unidades de extensión, que de flavan-3-oles en unidades terminales (Haslam, 1998).

Figura IV.4 Biosíntesis de procianidinas en la uva (Bog et al., 2006 y 2007).



La biosíntesis de los flavan-3-oles ha sido considerada tradicionalmente como un producto del enzima leucoantocianidina reductasa (LAR), que convierte a la leucoantocianidina en catequina y su posterior transformación en epicatequina por la acción de una epimerasa (Stafford, 1990). La actividad de la enzima LAR ha sido encontrada en varias plantas, estando correlacionada con la acumulación de proantocianidinas (Stafford, 1990; Joseph et al., 1998; Marles et al., 2003). Hasta años después no se encontró un enzima (ANR, antocianidina reductasa) capaz de convertir las antocianidinas a (-)-epicatequina (Xie et al., 2003). De esta forma, la alteración en la estereoquímica se realiza a través de un intermediario aquiral (antocianidina) y no por la acción de una epimerasa, como se había propuesto antes. De esta forma, ANS (antocianidina sintetasa) no solo es un enzima relacionado con la síntesis de antocianos sino también de los flavan-3-oles y las proantocianidinas

Los trabajos de Bogs et al. (2005, 2006 y 2007) en uva han demostrado que las enzimas LAR y ANR pueden producir los flavanoles monómeros requeridos para la formación de proantocianidinas, siendo responsables de la regulación de los procesos de acumulación y composición de las mismas durante el desarrollo de la baya. Lo que todavía no es totalmente conocido, a fecha de hoy, es la forma de síntesis de los polímeros o proantocianidinas. Hay teorías que defienden que es simplemente una reacción química y otros defienden que es una reacción catalizada enzimáticamente.

IV.1.3 EVOLUCIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN

En general, se ha considerado tradicionalmente que los taninos de las pepitas, con un bajo grado de polimerización y alto de galoilación, presentan sensaciones sensoriales de notable acidez y astringencia, mientras que los taninos de los hollejos presentan estructuras complejas, con altos grados de polimerización que varían poco durante la maduración, comunican sensaciones muy apreciadas de tipo más suaves, carnosas y grasas (Ribéreau-Gayon y Glories, 1980). Por ello es importante conocer

cómo evolucionan estos compuestos, tanto en el hollejo como en la semilla, durante la maduración por su importante implicación en la calidad final del vino

Las vías de biosíntesis de los taninos están activas ya al inicio del desarrollo de la uva. La acumulación de procianidinas en pepitas y hollejos parece ser independiente y comienza en la etapa del cuajado, alcanzando los niveles más altos entorno al envero. Después, durante la maduración, los contenidos de proantocianidinas en pepitas y hollejos disminuyen (Downey et al., 2003; Pastor del Rio y Kennedy, 2006). Ristic e Iland (2005) mostraron que el descenso en el contenido de proantocianidinas en las pepitas va acompañado de cambios de color en las mismas. Kennedy et al. (2000a,b) han sugerido que estos cambios de color en las semillas son debidas a la oxidación de taninos durante la maduración, pero la estructura química de los compuestos resultantes de esta supuesta oxidación, todavía no ha sido descrita.

Pero no todos los estudios han encontrado un descenso en el contenido de taninos durante la maduración. Así, algunos autores han encontrado fluctuaciones e incluso incrementos en estos compuestos (Saint-Cricq de Gaulejac et al., 1997; Harbertson et al., 2002; Delgado et al., 2004; Canals et al., 2005; Bordiga et al., 2011).

Hay varios motivos que podrían explicar las diferencias observadas entre distintos estudios. Una variable muy importante podría ser la metodología analítica utilizada para la extracción de los taninos, que es diferente entre algunos estudios y por tanto los datos no serían totalmente comparables. Además, está demostrado que la variedad, el año climatológico y factores edafológicos pueden también jugar un papel muy importante en las diferencias observadas (Ricardo de Silva et al., 1991, 1992; Katalinic y Males 1997; Chira et al., 2009, 2011; Mattivi et al., 2009; Hernández-Jiménez et al., 2009). La composición y concentración de estos compuestos pueden verse afectados por el estado hídrico (Ojeda et al., 2002, Matthews et al., 1988; Roby et al., 2004), nitrógeno disponible (Delgado et al., 2004), exposición al sol y temperatura (Downey et al., 2004). De todas formas, es de destacar que se ha observado que las condiciones edafoclimáticas afectan notablemente a la composición de proantocianidinas en las pieles pero no tanto a la de las semillas.

Entre los factores ambientales, la composición polifenólica depende en gran medida del clima (Guiloux et al., 1981). En muchas zonas vitícolas, parte de los viñedos están situados en las laderas de los valles, y las condiciones climáticas son diferentes de un viñedo a otro. Por ejemplo, la temperatura y la humedad están estrictamente relacionadas con la altitud del viñedo. A mayor altitud, la temperatura y la humedad son más bajas en aquellos que están situados, por ejemplo, al lado de ríos. La humedad y la temperatura, entre otros factores, pueden tener una gran influencia en la acumulación de antocianinas en las bayas (Darné et al., 1991; Guiloux et al., 1981; Kliewer et al., 1972), pero parece ser que hay pocos estudios sobre la correlación entre los taninos y la humedad y temperatura del viñedo.

IV.2 RESULTADOS

IV.2.1 CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROANTOCIANIDINAS DE UVA DE LAS VARIEDADES MONASTRELL, CABERNET SAUVIGNON Y SYRAH EN EL MOMENTO DE VENDIMIA

En las tablas IV.1, IV.2 y IV.3 se puede observar las características físico-químicas de la uva, así como el contenido y composición de las proantocianidinas en el hollejo y semillas de la uva de las tres variedades en el momento de vendimia en la campaña 2009 y 2010.

Las uvas de la campaña del 2009 fueron vendimiadas con un contenido de azúcar bastante similar (Tabla IV.1), aunque se pueden observar algunas diferencias en cuanto a su acidez, siendo Syrah la variedad que presentó un mayor valor, debido principalmente a un mayor contenido de ácido málico. Respecto al pH, las tres variedades presentaron valores muy similares.

Tabla IV.1 Características físico-químicas de las uvas en el momento de la vendimia en 2009 y 2010.

	Monsatrell	Cabernet S.	Syrah	Monsatrell	Cabernet S.	Syrah
	2009			2010		
°Brix	28,2 a	28,2a	29,0a	23,9 a	24,7 a	24,6 a
Acidez Total (g/L)	4,2 a	4,5 a	5,6 b	3,1 a	3,4 b	4,1 c
pH	3,6 a	3,8 b	3,9 b	3,7 a	3,8 b	3,7 a
Ac. Tartárico (g/L)	5,3 a	5,3 a	5,4 a	4,2 a	5,2 b	5,1b
Ac. Málico (g/L)	0,9 a	2,5 b	4,1 c	0,9 a	1,1 b	2,1 c

Letras diferentes en una misma fila y para cada vendimia indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Las uvas de la campaña 2010 fueron también vendimiadas con un contenido de azúcar bastante similar entre las tres variedades, pero con un valor inferior respecto a aquellas de la campaña anterior. Los valores de acidez observados son también inferiores respecto a las uvas del 2009, encontrándose además diferencias significativas entre las tres variedades. Esta menor acidez es debida a un menor contenido de los ácidos málico y tartárico, aunque estos predominan en Cabernet Sauvignon y Syrah, dando por tanto valores de acidez mayores respecto a Monastrell. Los valores de pH son bastante similares a los de la campaña anterior.

IV.2.1.1 PROANTOCIANIDINAS DEL HOLLEJO DE LA UVA

La Tabla IV.2 muestra la concentración de proantocianidinas en los hollejos de las tres variedades los dos años de estudio. En la campaña 2009, la variedad Syrah muestra la concentración más baja de estos compuestos, expresada en $\mu\text{g/g}$ de hollejo y por mg/kg de bayas; en cambio, Monastrell presenta los valores más altos (duplican a los de Syrah) mientras que Cabernet Sauvignon presenta valores intermedios. En la campaña 2010, la concentración de estos compuestos se incrementa para las variedades Syrah y Cabernet Sauvignon, siendo dicho incremento del doble para esta última variedad. En cambio para las uvas de Monastrell, la concentración de taninos en

los hollejos es inferior respecto a la obtenida en la campaña anterior.

Tabla IV.2 Concentración y composición de proantocianidinas en los hollejos de la uva en la campaña 2009 y 2010.

	Monastrell	Cabernet S.	Syrah	Monastrell	Cabernet S.	Syrah
	2009			2010		
Taninos µg/g	7746,6 c	5299,6 b	3443,8 a	6051,9 b	10406,2 c	4947,3 a
Taninos µg/baya	1386,5 c	706,5 b	414,4 a	823,0 ab	1057,2 b	605,2 a
Taninos mg/Kg	720,8 b	667,8 b	282,0 a	667,1 a	1329,1 b	547,7 a
GPm	14,1 b	26,6 c	8,5 a	16,5 a	21,6 b	16,3 a
%Galoilación	1,4 a	1,6 a	6,6 b	2,4 b	1,1 a	2,5 b
%Cat-term	4,1 a	3,6 a	9,4 b	3,6 b	2,6 a	4,3 c
%Ecat-term	2,3 b	0,0 a	2,5 b	2,4 b	2,0 ab	1,7 a
%Cat-ext	1,0 b	1,6 c	0,0 a	1,6 a	1,5 a	1,4 a
%Ecat-ext	63,7 c	43,8 a	58,5 b	55,2 c	40,4 a	49,6 b
%Egcat-ext	27,5 a	49,4 b	23,0 a	34,9 a	52,5 c	40,5 b
%Ecatg-ext	1,4 a	1,6 a	6,6 b	2,3 b	0,9 a	2,3 b

Abreviaciones. GPm, grado medio de polimerización; Cat-term, (+)-catequina terminal; Ecat-term, (-)-epicatequina terminal; Cat-ext, (+)-catequina de extensión; Ecat-ext, (-)-epicatequina de extensión; Egcat-ext, (-)-epigalocatequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato de extensión. Letras diferentes en una misma fila y para cada vendimia indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Los resultados obtenidos para Syrah son muy similares a los medidos por Hernández-Jiménez et al. (2009) para uvas cultivadas en el misma área, aunque para Monastrell encontraron concentraciones más altas que las obtenidas en esta experiencia. Los valores encontrados en Cabernet S. son más bajos que los descritos por Cosme et al. (2009). Se sabe que el año climatológico y la localización del viñedo tienen un gran efecto sobre la concentración de taninos en los hollejos.

También se encontraron diferencias en el GPm entre las variedades del 2009, siendo Cabernet S. la que presentaba los valores más altos. En la vendimia del 2010, el valor de este parámetro se incrementa ligeramente para las proantocianidinas de Monastrell, se duplica para aquellas de Syrah, y disminuye para Cabernet S., aunque ésta sigue presentando las proantocianidinas más polimerizadas. De todas formas, los valores obtenidos en este estudio, tanto para Syrah como para Cabernet S., son más bajos que los determinados por otros autores. Así, por ejemplo, Cosme et al. (2009)

encontraron un G_{Pm} de 27 para hollejos de Syrah y de 41,7 para Cabernet S. y Bogs et al. (2005) entre 25-40 para Syrah.

En el caso del porcentaje de galoilación, en la campaña 2009 no se observan diferencias entre Monastrell y Cabernet S., presentando Syrah los valores más altos (6,6%), mientras que en el 2010 los valores de éste parámetro descienden bastante para Syrah, aproximándose a aquellos encontrados para Monastrell. Souquet et al. (1996) encontraron que las unidades galoiladas en hollejos de uva se hallaban entre 3-6% y que eran independientes del G_{Pm}, aunque contrariamente a esto, Hernández-Jiménez et al. (2009) encontraron una correlación positiva entre el grado medio de polimerización y el porcentaje de galoilación.

En lo que respecta a la composición de taninos, tanto en la vendimia 2009 y 2010, el principal constituyente de las subunidades terminales en los hollejos de las tres variedades fue la (+)-catequina, resultado observado también por Downey et al. (2003), no detectándose la (-)-epicatequina-3-*O*-galato, coincidiendo así con Hanlin y Downey (2009).

En la vendimia de 2009, no se detectó (-)-epicatequina terminal en Cabernet S. En cambio, el contenido de esta subunidad fue detectada tanto en Monastrell como en Syrah. La (-)-epicatequina de extensión fue la subunidad más abundante en Monastrell y Syrah, coincidiendo con los estudios de Kennedy y Jones (2001) y Downey et al. (2003) y la (-)-epigallocatequina fue la más abundante en Cabernet S. El nivel de porcentaje de prodelfidinas es similar al descrito por Cosme et al. (2009).

En la vendimia de 2010 destaca la presencia de (-)-epicatequina terminal en Cabernet S. (no detectada en el año anterior) y la presencia de mayores porcentajes de la (-)-epigallocatequina, sobre todo para Syrah, donde éstos prácticamente se duplican. El mayor contenido de prodelfinidinas en las uvas de este año podría dar lugar a vinos con mejores sensaciones en boca que aquellos elaborados con las uvas de 2009.

IV.2.1.2 PROANTOCIANIDINAS EN SEMILLA DE LA UVA

Las semillas presentaron mayor cantidad de proantocianidinas que los hollejos como se puede observar en la tabla IV.3.

Tabla IV.3 Concentración y composición de proantocianidinas en semillas de la uva en la campaña 2009 y 2010.

	Monastrell	Cabernet S.	Syrah	Monastrell	Cabernet S.	Syrah
	2009			2010		
Taninos mg/g	38,1 a	35,7 a	32,6 a	31,1 b	24,9 ab	22,0 a
Taninos g/baya	3,0 b	2,2 a	3,0 b	1,8 b	1,3a	1,8 b
Taninos mg/Kg	1562,4 a	2105,2 b	2011,9 b	1464,3 a	1690,7 a	1644,9 a
Gpm	6,8 b	6,1 ab	5,5 a	7,6 b	6,0 a	6,1 a
%Galoilación	15,2 b	12,4 a	17,5 c	17,4 c	14,3 a	15,6 b
%Cat-term	6,0 a	6,4 a	6,1 a	4,9 a	6,9 b	6,5 b
%Ecat-term	5,8 a	7,0 b	7,1 b	4,6 a	6,3 c	5,6 b
%Ecatg-term	3,1 a	3,1 a	5,0 b	0	0	0
%Cat-ext	10,0 b	6,3 a	6,5 a	7,6 b	6,0 a	7,3 b
%Ecat-ext	63,1 a	67,8 b	62,8 a	65,5 a	66,5 a	65,0 a
%Ecatg-ext	12,1 b	9,3 a	12,5 b	13,7 b	10,7 a	11,3 a

Abreviaciones. Gpm, grado medio de polimerización; Cat-term, (+)-catequina terminal; Ecat-term, (-)-epicatequina terminal; Cat-ext, (+)-catequina de extensión; Ecat-ext, (-)-epicatequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato de extensión. Letras diferentes en una misma fila y para cada vendimia indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

En la vendimia 2009, cuando los valores fueron expresados en mg/g de semilla, las cantidades encontradas fueron muy similares para las tres variedades, en un rango entre 32,6 mg/g para Syrah y 38,1 mg/g para Monastrell. Sin embargo, cuando los valores se expresan en mg/kg de baya fresca, Cabernet S. y Syrah presentan valores similares y superiores a los de Monastrell. En la vendimia 2010, la concentración de proantocianidinas fue inferior a la campaña anterior, encontrándose diferencias significativas entre Monastrell y Syrah cuando dicha concentración fue expresada en mg/g de semilla y valores similares entre las tres variedades cuando ésta fue expresada en mg/kg de baya. Hernández-Jiménez et al. (2009) también encontraron diferencias entre las proantocianidinas de Syrah y Monastrell cuando estas fueron expresadas como mg/g de semilla, aunque en este caso, Syrah mostraba valores

superiores a Monastrell. Los estudios de Harbeston et al. (2002) con Syrah obtuvieron valores de 1,4 mg/baya en pepitas, mientras que Ristic et al. (2007) obtuvieron valores entre 1,61-1,93 mg/baya para esta misma variedad. En cambio, Cosme et al. (2009) encontraron valores de procianidinas en las semillas de Cabernet S. muy altos (90,3 mg/g).

Con respecto a la composición de las proantocianidinas, una de las mayores diferencias que hay respecto a los hollejos es la ausencia de unidades de (-)-epigallocatequina y el alto porcentaje de galoilación. En la vendimia de 2009, Monastrell presentó el mayor grado de polimerización de las procianidinas, mientras Syrah mostró el más bajo, pero con un mayor porcentaje de galoilación. En la vendimia de 2010, los valores de G_{Pm} son bastantes similares a la campaña anterior, mientras el porcentaje de galoilación se incrementa para las proantocianidinas de Monastrell y Cabernet S. y disminuye para aquellas de Syrah, mostrando además Monastrell los valores más altos. Los valores de G_{Pm} y de galoilación están en los rangos obtenidos por Prieur et al. (1994), quienes encontraron valores de 13-29% para la galoilación y de 2,3-15,1 para G_{Pm}.

El análisis de la composición de las unidades terminales de las proantocianidinas de las uvas vendimiadas en el 2009 mostró que (+)-catequina y (-)-epicatequina fueron las unidades predominantes, presentando Cabernet S. y Syrah los valores más altos en el porcentaje de (-)-epicatequina y Syrah en los de (-)-epicatequina-3-*O*-galato. En el caso de las unidades de extensión la (-)-epicatequina fue la unidad predominante en las tres variedades, observándose los valores más altos en Cabernet Sauvignon. Monastrell presentó el mayor porcentaje de (+)-catequina y epicatequina-3-*O*-galato junto con Syrah. En el caso de la composición de las uvas vendimiadas en el 2010 no hay grandes diferencias respecto a aquellas de la campaña anterior. Mattivi et al. (2009) encontraron en las semillas de diferentes variedades contenidos de (+)-catequina y (-)-epicatequina superiores a los de este estudio, la variedad Syrah presentando un 76,1% de (-)-epicatequina, sin embargo Cabernet S. tan solo un 55,4% a diferencia de los 67,8% encontrados en nuestro caso. Downey et al. (2003) encontraron en las semillas de Syrah que la (-)-epicatequina constituía un 65%

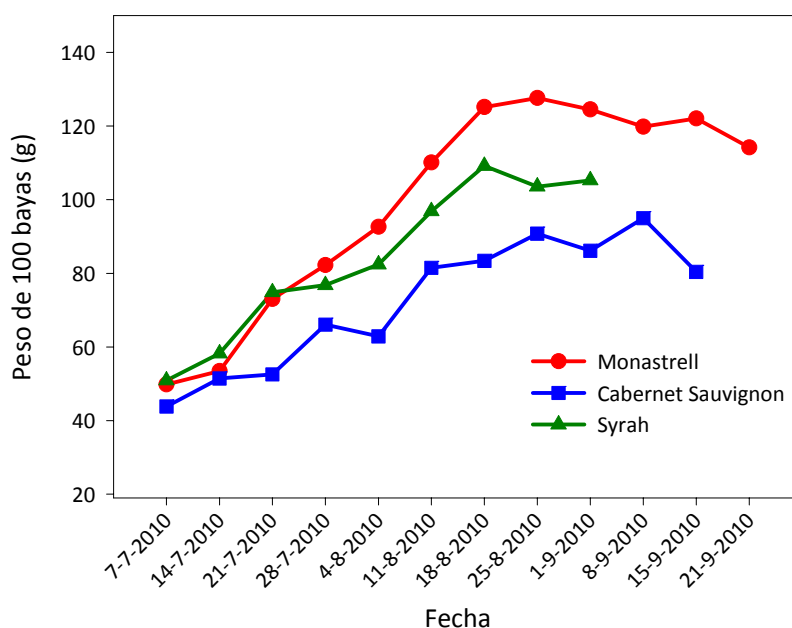
de las unidades de extensión, valores muy similares a los nuestros y ligeramente inferiores para la variedad de Cabernet S. y un 25% en el caso de la (-)-epicatequina-3-O-galato, valores superiores a los obtenidos por nuestros.

IV.2.2 EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS DURANTE LA MADURACIÓN DE UVA

En los gráficos IV.1-IV.5 y IV.6-IV.9 se puede observar la evolución de las características físico-químicas, así como del contenido y composición de las proantocianidinas en el hollejo y semillas de la uva durante la maduración de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah en la campaña 2010.

Los gráficos IV.1 y IV.2 muestran la evolución del peso de la baya y sólidos solubles de las tres variedades durante el periodo de maduración de la uva.

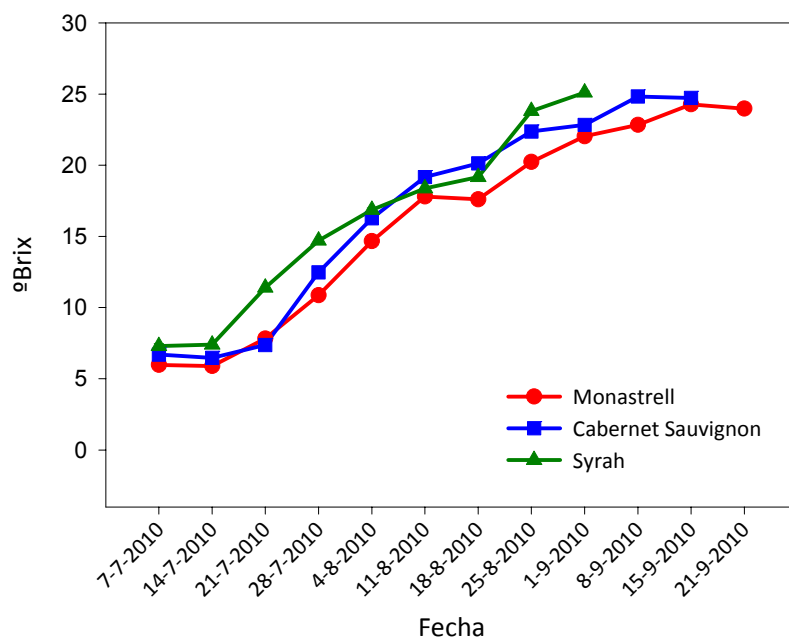
Gráfico IV.1 Evolución del peso de 100 bayas durante el periodo de maduración en las tres variedades.



Los muestreos se iniciaron a principios de julio y el envero ocurrió sobre el 20 de julio para las uvas de la variedad Cabernet Sauvignon y Syrah y el 7 de agosto para las de Monastrell. El periodo más corto de maduración se observó para la variedad Syrah, cuyas uvas fueron cosechadas 21 días antes que Monastrell y 15 días antes que Cabernet Sauvignon. Las bayas más grandes fueron encontradas en uvas de la variedad Monastrell, y las más pequeñas en Cabernet Sauvignon.

En el caso del contenido de sólidos solubles expresado en °Brix, la evolución es bastante similar para las tres variedades y fueron cosechadas con el mismo valor de estos compuestos.

Gráfico IV.2 Evolución de los sólidos solubles durante el periodo de maduración en las tres variedades.



IV.2.2.1 EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN EL HOLLEJO DE LA UVA DURANTE LA MADURACIÓN

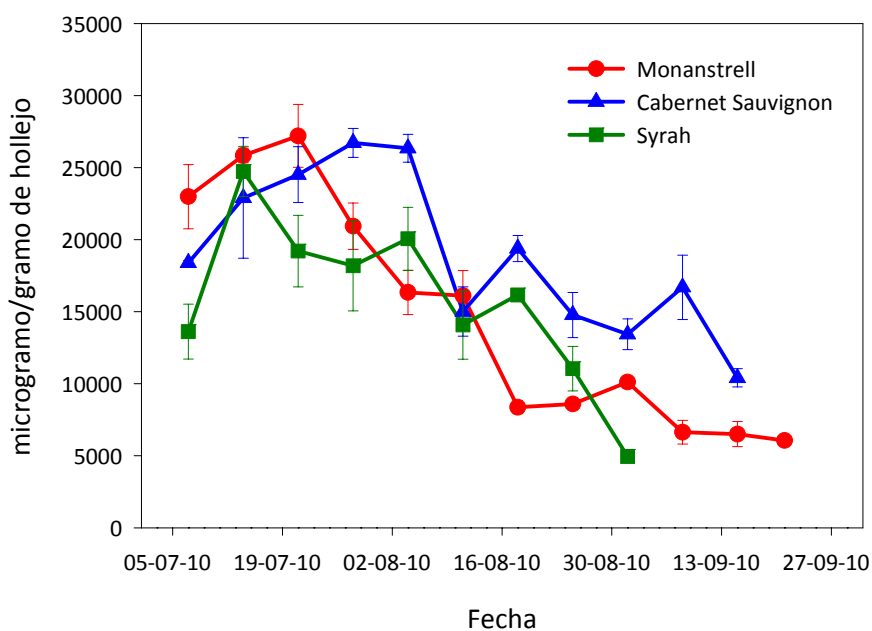
Los gráficos IV.3-IV.5 muestran la evolución del contenido de proantocianidinas

y composición de las mismas en hollejos de uva de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah durante la maduración.

IV.2.2.1.1 Proantocianidinas totales

La concentración de proantocianidinas (Gráfico IV.3) fue máxima para las tres variedades en los primeros muestreos (antes del envero), siendo alcanzada primero por Syrah, seguida de Monastrell y Cabernet Sauvignon y después desciende con el avance de la maduración.

Gráfico IV.3 Evolución del contenido de proantocianidinas del hollejo durante el periodo de maduración en las tres variedades.



Otros autores también han encontrado que la mayor parte de la síntesis de taninos tiene lugar inmediatamente después de la fructificación y ésta es máxima varias semanas antes del envero. Normalmente, también se observa una segunda fase de acumulación de taninos justo antes del envero, momento en que se alcanzan las máximas concentraciones de estos compuestos (Downey et al., 2003). Bogs et al. (2005) demostraron que los genes más relacionados con la síntesis de taninos no eran

ya detectados a partir del momento del envero. Esto puede explicar en parte por qué los taninos no se acumulan durante la maduración (después del envero) pero no explica completamente el descenso observado en nuestro estudio. Otros autores han atribuido el descenso en los niveles de taninos después del envero bien a un proceso de extracción menos eficiente conforme avanza la maduración de la uva o a una degradación de los mismos. Ya que no se ha podido demostrar ningún proceso catabólico de degradación de los taninos en la uva, la hipótesis de la disminución de la extractabilidad es más plausible. Esa disminución de la extractabilidad podría ser debida a una conjugación de taninos con otros componentes celulares (Downey et al., 2003), una polimerización simultánea de taninos cerca de las paredes celulares (Gagne et al., 2006) o a un proceso oxidativo de los taninos poliméricos (Kennedy et al., 2000b; Cadot et al., 2006b).

Aunque los valores de taninos máximos alcanzados por estas tres variedades fueron bastantes similares, al final del proceso de maduración fue Cabernet Sauvignon la que mostró el mayor contenido de estos compuestos, seguida de Monastrell y Syrah.

IV.2.2.1.2 Composición de las proantocianidinas

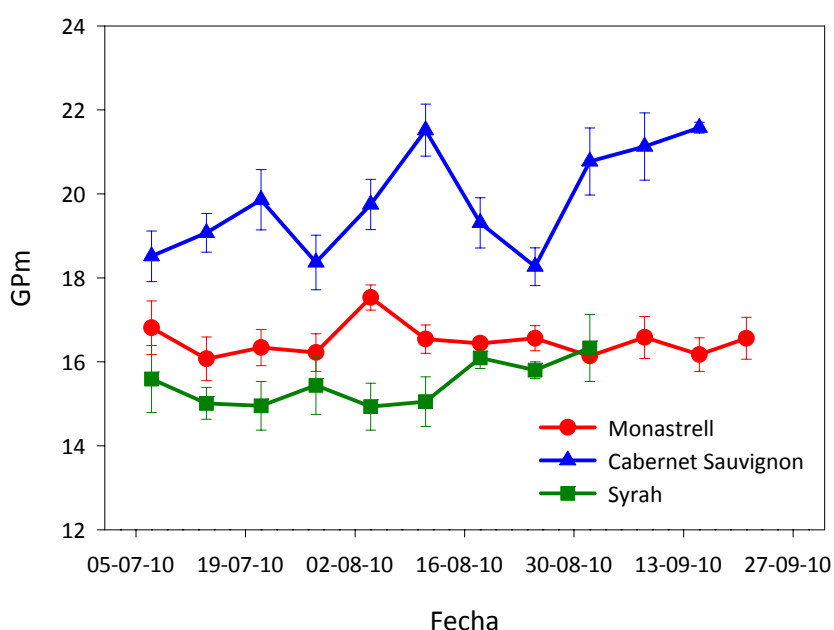
El G_{Pm} de las proantocianidinas (Gráfico IV.4) se incrementa de forma importante durante los primeros muestreos para Monastrell y sobre todo, para Cabernet Sauvignon, para después mantenerse constante, como es el caso de Monastrell, o descender en el caso de Cabernet Sauvignon durante la segunda quincena de agosto para volver a incrementar después, hasta el momento de vendimia. En cambio, para Syrah, las proantocianidinas van incrementando ligeramente su tamaño durante todo el periodo estudiado.

Las proantocianidinas de Cabernet Sauvignon son las más polimerizadas desde el inicio del estudio hasta el momento de vendimia, mientras que no se observan diferencias en los valores de G_{Pm} de aquellas presentes en Monastrell y Syrah.

Bindon y Kennedy (2011) no observaron grandes cambios en los valores de

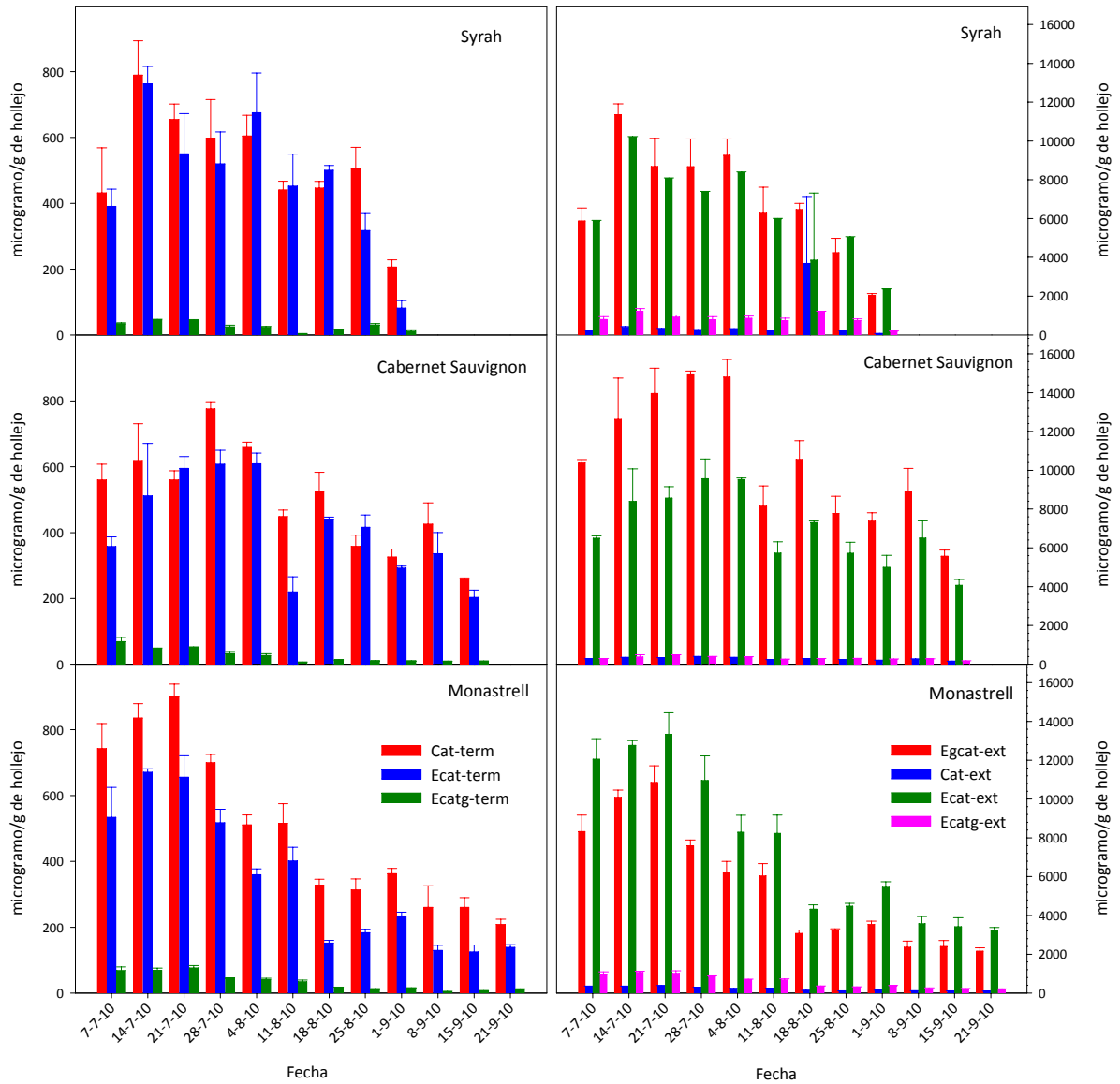
G_{Pm} en uvas de Cabernet Sauvignon durante la maduración y el valor final obtenido fue de 28, un poco más alto al encontrado en este estudio. Por el contrario, Bordiga et al. (2011) observaron un aumento significativo del G_{Pm} de las proantocianidinas en uvas de Cabernet Sauvignon a lo largo de la maduración salvo en el último muestreo donde el G_{Pm} descendió.

Gráfico IV.4 Evolución del grado medio de polimerización de las proantocianidinas del hollejo durante el periodo de maduración en las tres variedades.



El gráfico IV.5 muestra la evolución de la composición de los taninos del hollejo de las tres variedades durante el periodo de maduración. Respecto a las unidades terminales, la (+)-catequina fue la subunidad más abundante, seguida de la (-)-epicatequina, sin embargo, (-)-epicatequina-3-*O*-galato presentó cantidades muy bajas en todo el periodo de maduración. Las subunidades de extensión presentaron valores más elevados que las terminales, destacando la (-)-epigallocatequina como la subunidad más importante en Cabernet Sauvignon y Syrah y la (-)-epicatequina en Monastrell. La (+)-catequina y la (-)-epicatequina-3-*O*-galato presentaron valores inferiores en las tres variedades, aunque ésta última predominó sobre (+)-catequina en Syrah y Monastrell.

Gráfico IV.5 Evolución de la composición de las proantocianidinas del hollejo de la uva durante el periodo de maduración en las tres variedades. Abreviaciones. Cat-term, (+)-catequina terminal; Ecat-term, (-)-epicatequina terminal; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato terminal; Cat-ext, (+)-catequina de extensión; Ecat-ext, (-)-epicatequina de extensión; Egcat-ext, (-)-epigalato catequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato de extensión.



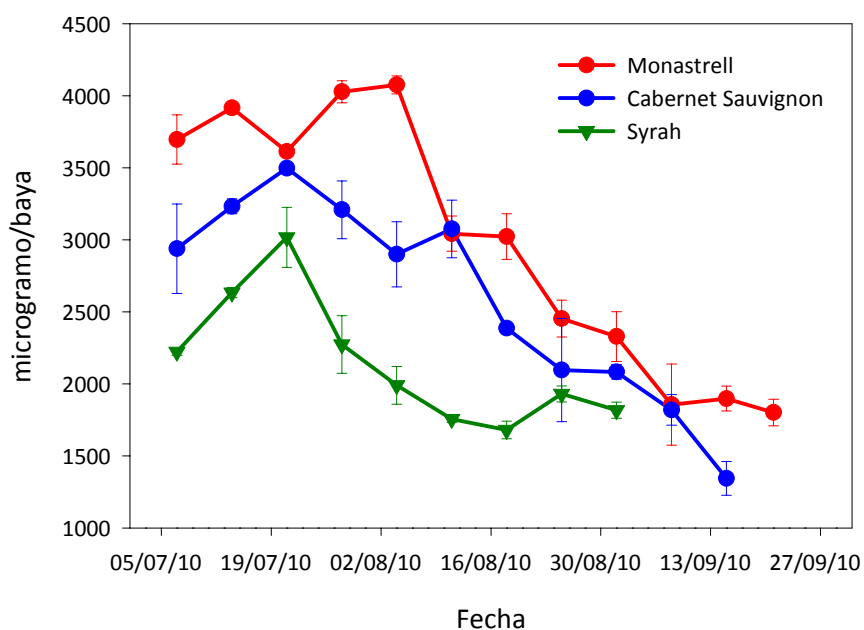
IV.2.2.2 EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN SEMILLAS DE UVA DURANTE LA MADURACIÓN

Los gráficos IV.6-IV.9 muestran la evolución del contenido de proantocianidinas y composición de las mismas en semillas de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah durante la maduración.

IV.2.2.2.1 Proantocianidinas totales

La evolución de los taninos poliméricos para las tres variedades alcanzó un máximo en el envero y después decreció con el avance de la maduración (Gráfico IV.6).

Gráfico IV.6 Evolución de proantocianidinas poliméricas de las semillas durante el periodo de maduración en las tres variedades.



Esta disminución también fue observada por Liu et al. (2010) para Cabernet Sauvignon. Estos resultados son similares a aquellos obtenidos para las proantocianidinas extraídas del hollejo, justificándose este comportamiento de forma

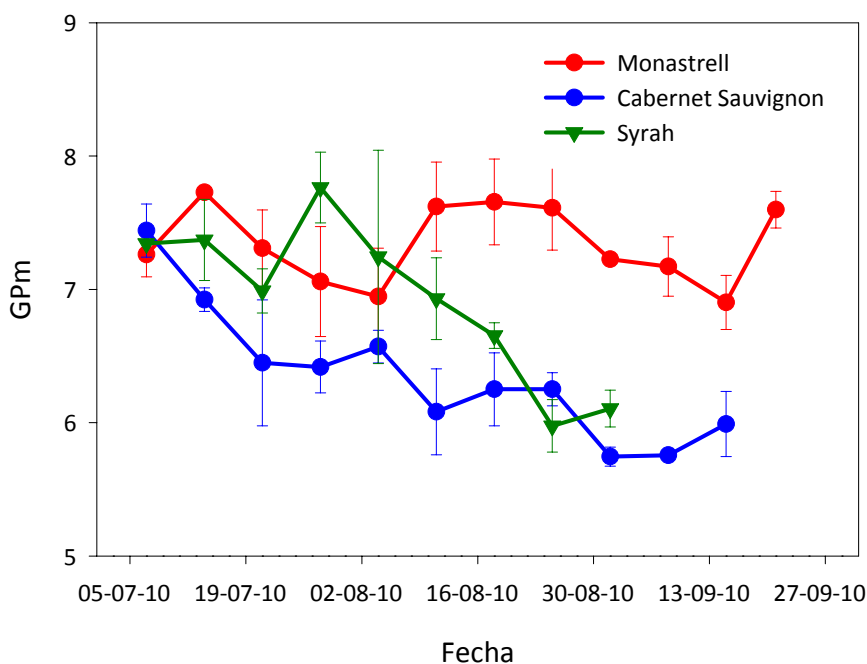
similar.

En el momento de vendimia, las variedades Monastrell y Syrah presentaron la mayor concentración de taninos poliméricos extraídos de las semillas. Las cantidades encontradas durante la maduración expresadas como mg/baya coinciden con las obtenidas con uvas de estas mismas variedades en la campaña de 2009. Las diferencias observadas pueden ser debidas a factores tales como la localización del viñedo, el año de vendimia o a la variedad, teniendo todos ellos un efecto sobre el contenido final de taninos (Cortell et al., 2005; Chira et al., 2009; Hanlin y Downey, 2009).

IV.2.2.2 Composición de las proantocianidinas

El Gpm de las proantocianidinas (Gráfico IV.7) no sufrió grandes cambios durante el periodo de maduración.

Gráfico IV.7 Evolución del grado medio de polimerización de las proantocianidinas de las semillas durante el periodo de maduración en las tres variedades.



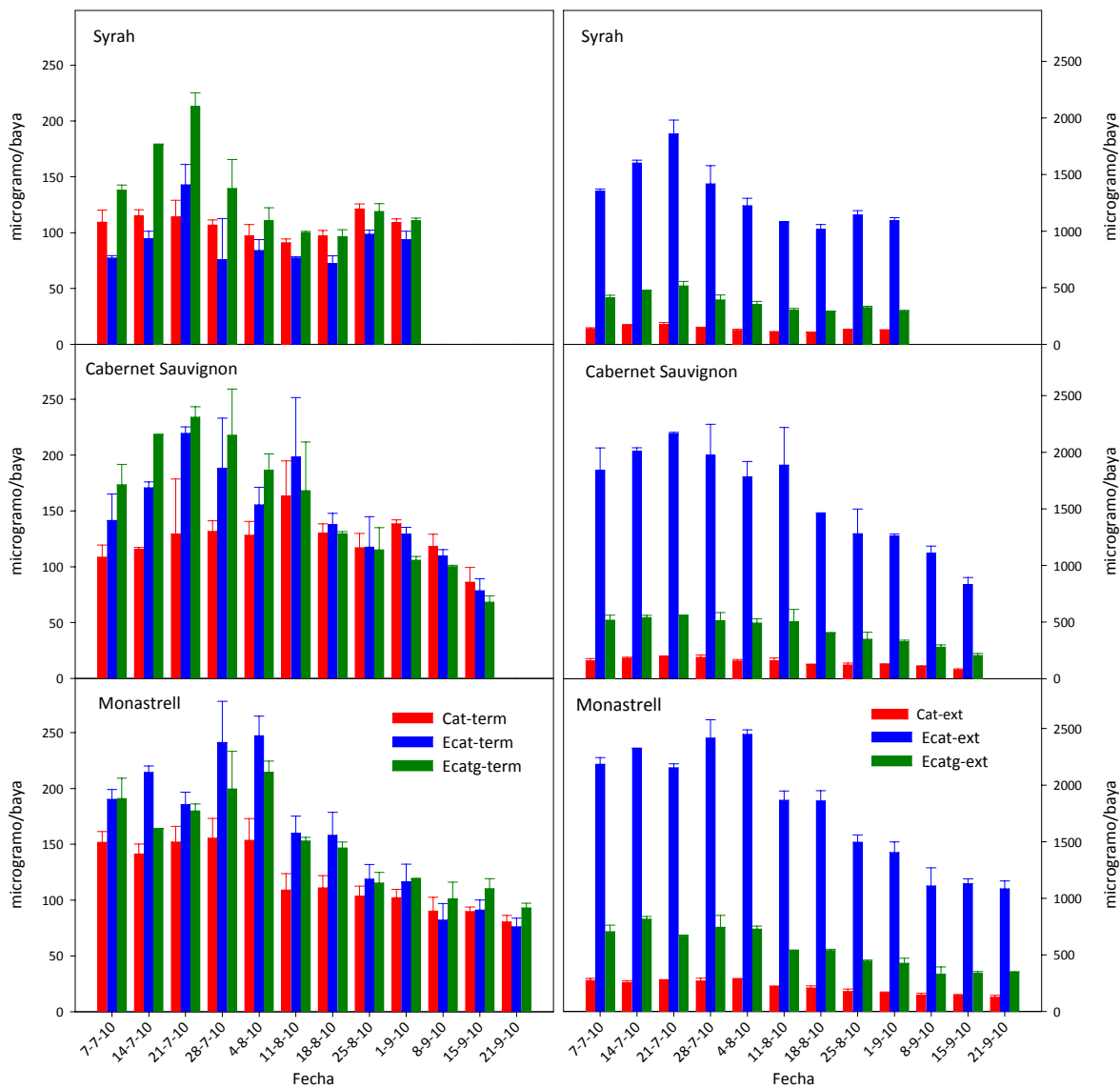
De forma similar, Downey et al. (2003) también encontraron que el G_{Pm} permanecía constante durante la maduración en Syrah, con un valor entorno a 5, similar al valor reportado por Chira et al. (2009). En este estudio, se observa un descenso en los valores de G_{Pm} de 7,5 a 6 para las variedades Cabernet Sauvignon y Syrah, mientras que para Monastrell, aunque hay fluctuaciones en G_{Pm} durante la maduración, éste mostró casi el mismo valor en los primeros y últimos muestreos (entorno a 8). Chira et al. (2011) también encontraron que Monastrell tenía las proantocianidinas más polimerizadas de todas las variedades mediterráneas que ellos estudiaron.

Respecto a la composición de las proantocianidinas, los gráficos IV.8 y IV.9 muestran la concentración de cada una de las subunidades terminales y de extensión, así como el contenido de monómeros para las tres variedades. En el caso de las subunidades terminales para uvas de Monastrell (Gráfico IV.8), la (-)-epicatequina y la epicatequina-3-*O*-galato se encuentran en mayor concentración que la (+)-catequina, especialmente en el envero. Con el avance de la maduración, las diferencias son menos pronunciadas y la concentración de las tres subunidades es muy similar en el momento de la vendimia.

Los taninos de las semillas de Cabernet Sauvignon presentaron concentraciones y composiciones muy similares a las de Monastrell, aunque en este caso, desde principios de septiembre, la (+)-catequina fue la subunidad terminal mayoritaria. Resultados muy parecidos son también encontrados para semillas de Syrah, destacando una alta concentración de (-)-epicatequina-3-*O*-galato cerca del envero.

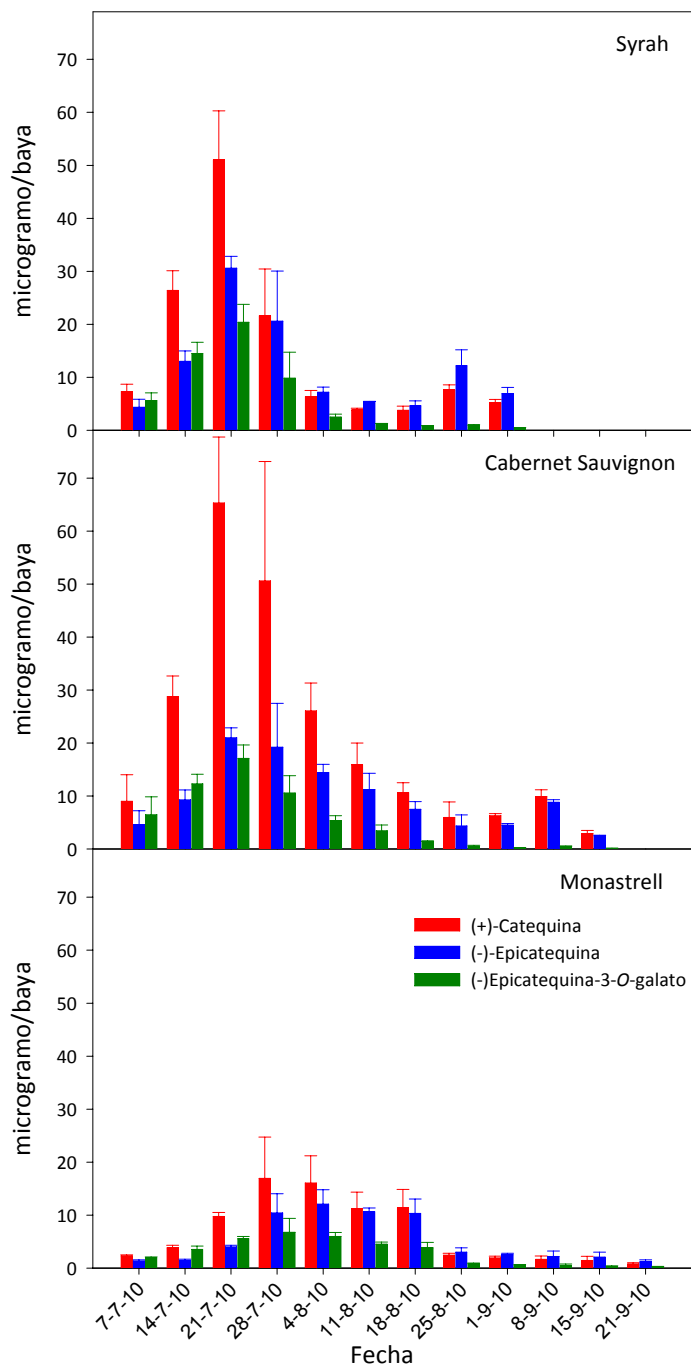
Con respecto a las subunidades de extensión (Gráfico IV.8), la (-)-epicatequina mostró la mayor concentración en las tres variedades, triplicando casi los valores de las otras unidades. (+)-Catequina presentó los valores más bajos. Estos resultados son similares a los encontrados en otros estudios (Downey et al., 2003; Obreque-Slier et al., 2010).

Gráfico IV.8 Evolución de la composición de las proantocianidinas de las semillas de la uva durante el periodo de maduración para las tres variedades. Abreviaciones. Cat-term, (+)-catequina terminal; Ecat-term, (-)-epicatequina terminal; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato terminal; Cat-ext, (+)-catequina de extensión; Ecat-ext, (-)-epicatequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato de extensión.



El gráfico IV.9 muestra la composición y concentración de los flavanoles monómeros en las semillas de las tres variedades.

Gráfico IV.9 Evolución de la concentración de diferentes flavanoles monoméricos durante el periodo de maduración en las tres variedades.



Las concentraciones más altas de estos compuestos son observadas para las uvas de Cabernet Sauvignon y Syrah cerca del envero, aunque, estas mismas variedades mostraron una disminución considerable desde mediados de agosto, terminando con concentraciones muy similares a las observadas en uvas de Monastrell. Esta rápida disminución en el contenido de monómeros fue también observada por Cadot et al. (2006b). Al comienzo de la maduración, (+)-catequina parece dominar los perfiles, pero al final del proceso, la (-)-epicatequina presenta concentraciones similares, mientras que (-)-epicatequina-3-O-galato es detectada en concentraciones muy bajas.

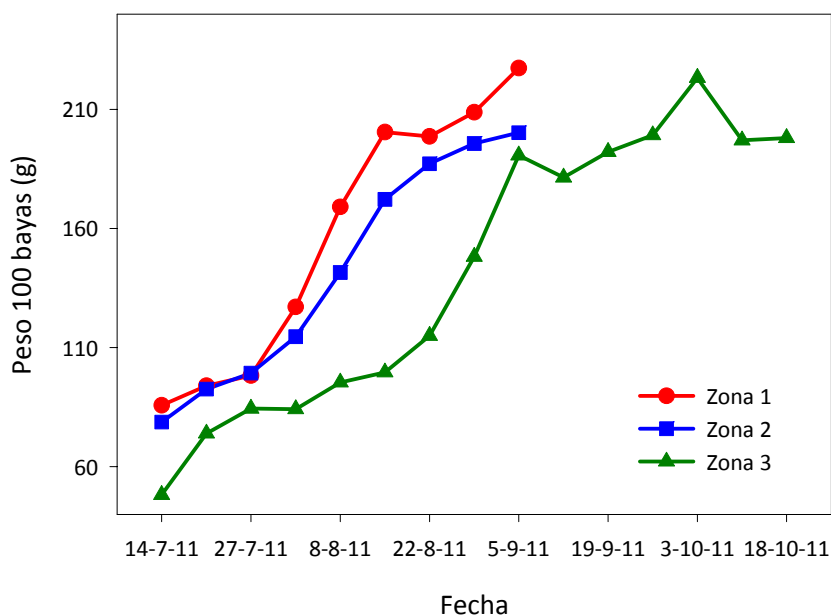
Estos resultados son muy similares a los de otros estudios donde se utilizó la misma metodología, es decir, los taninos de las semillas alcanzan un máximo en el momento del envero y desciende con el avance de la maduración, mientras que los valores de Gpm sólo varían ligeramente.

IV.2.2.3 EFECTO DE LA ALTITUD EN EL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROANTOCIANIDINAS DURANTE LA MADURACIÓN DE LA UVA DE LA VARIEDAD MONSTRELL

En los gráficos IV.10-IV.19 se puede observar la evolución de las características físico-químicas de la uva, así como del contenido y composición de las proantocianidinas en el hollejo y semillas durante el periodo de maduración de uva de la variedad Monastrell cultivada en tres zonas de la D.O. de Bullas que se diferencian fundamentalmente por su altitud.

Los gráficos IV.10 y IV.11 muestran la evolución del peso de la baya y sólidos solubles de uva Monastrell en las tres zonas a diferente altitud durante el periodo de maduración.

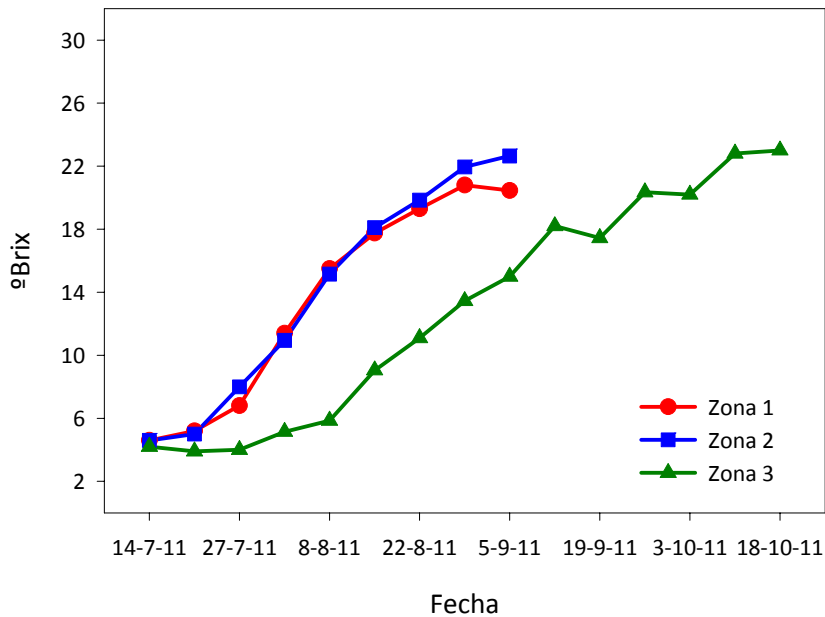
Gráfico IV.10 Evolución del peso de 100 bayas durante la maduración de uva Monastrell cultivada a diferente altitud.



Los muestreos se iniciaron la segunda quincena de julio y acabaron para la zona 1 y 2 a primeros de septiembre y para la zona 3 a finales de octubre. El envero ocurrió sobre el 2 de agosto para la uva de las zonas 1 y 2 y 20 días más tarde para la uva de la zona 3. Se observa claramente que el ciclo de maduración para las uvas de las zonas 1 y 2 es bastante similar y más corto que para aquellas de la zona 3. Esto implica que para una misma fecha de vendimia, las uvas de las zonas 1 y 2 muestran una mayor madurez de la pulpa (mayor contenido de azúcares) y mayor tamaño de la baya que las observadas en las uvas de la 3. Mateus et al. (2001), en un estudio similar, encontraron que el ritmo de acumulación de los azúcares en la uva además de depender de la altitud, también dependía de la variedad.

Hay que destacar que las uvas de la zona 1 presentan un tamaño de la baya ligeramente superior respecto a las uvas de la zona 2 durante todo el proceso de maduración, presentando un contenido de azúcares ligeramente inferior al final del estudio. Las uvas de la zona 3 alcanzaron al final del estudio un valor de °Brix y tamaño de la baya bastante similar al mostrado por aquellas uvas de la zona 2.

Gráfico IV.11 Evolución de los sólidos solubles durante la maduración de uva Monastrell cultivada a diferente altitud.



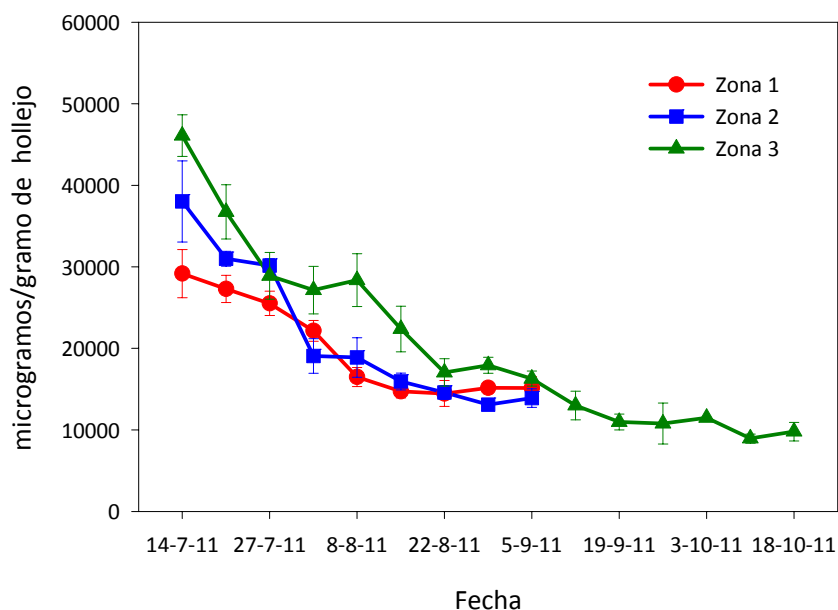
IV.2.2.3.1 Proantocianidinas totales en el hollejo

Los resultados se muestran en el Gráfico IV. 12. Se observan grandes diferencias en el contenido de proantocianidinas del hollejo de la uva en las tres zonas durante los muestreos realizados en el mes de julio, aunque estas diferencias disminuyen con el avance del proceso de maduración, sobre todo, en el caso de las proantocianidinas de las uvas de las zonas 1 y 2.

Los valores de proantocianidinas descienden durante todo el proceso de maduración para las uvas de las tres zonas, siendo el descenso más acusado desde el inicio de los muestreos hasta mitad de agosto.

En el momento del envero, 2 de agosto para la uva de las zonas 1 y 2 y 22 de agosto para la uva de la zona 3, no se observan diferencias en los valores de proantocianidinas de la uva de las tres zonas. Pero al final del estudio, las uvas de las zonas 1 y 2 muestran valores similares de proantocianidinas, mientras que en la uva de la zona 3 la concentración de estos compuestos es inferior.

Gráfico IV.12 Evolución del contenido de proantocianidinas del hollejo durante el periodo de maduración de uva Monastrell cultivada a diferente altitud.



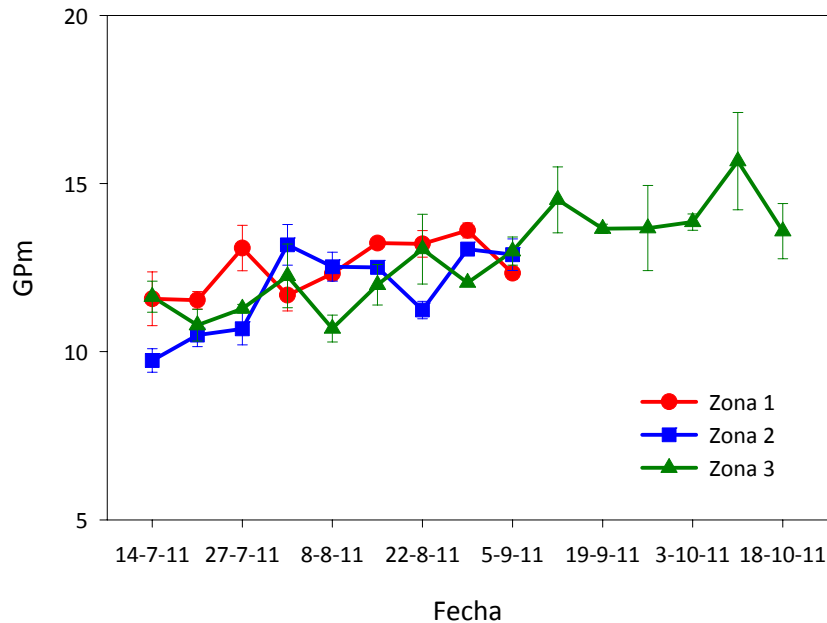
Mateus et al. (2001) también observaron un descenso, con ciertas fluctuaciones, en los valores de proantocianidinas del hollejo desde el envero hasta vendimia, encontrando además en los últimos muestreos valores de proantocianidinas mayores en la uva cultivada a menor altitud. Estos resultados ponen de manifiesto que la altitud tiene un efecto sobre las proantocianidinas contrario a aquel observado para los antocianos, cuya concentración se ve incrementada al aumentar la misma (Mateus et al., 1999).

Hay que destacar que en estas uvas de Monastrell cultivadas en tres zonas diferentes de Bullas, a diferencia de aquella cultivada en Jumilla, no se observa una segunda fase de acumulación de proantocianidinas antes del envero.

IV.2.2.3.2 Composición de las proantocianidinas del hollejo

En cuanto al Gpm de las proantocianidinas del hollejo, este en general se incrementa a lo largo del proceso de maduración, observándose solamente ligeras diferencias entre las uvas de las tres zonas.

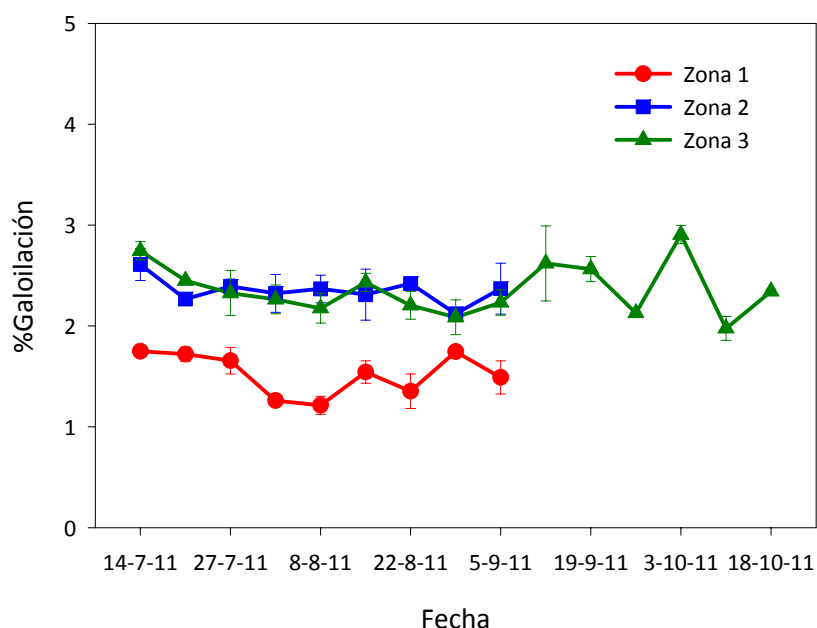
Gráfico IV.13 Evolución del grado medio de polimerización de las proantocianidinas del hollejo durante el periodo de maduración de uva Monastrell cultivada a diferente altitud.



Inicialmente, el valor de GPM más bajo es mostrado por las proantocianidinas de la uva de la zona 2, no observándose diferencias entre aquel mostrado por las proantocianidinas de las uvas de las zonas 1 y 3 (entre las cuales hay mayor diferencia de altitud). Al final del estudio, los valores de GPM más altos son encontrados en las proantocianidinas de las uvas de la zona 3, seguidas de aquellas de las zonas 2 y 1. También se observa que el estado de polimerización de las proantocianidinas de las uvas cultivadas en Bullas es menor que el encontrado en las proantocianidinas de la uva de Jumilla.

En lo que respecta al porcentaje de galoilación (Gráfico IV.14), este parámetro sufre ligeras oscilaciones en sus valores durante el proceso de maduración, aunque los valores obtenidos al final del estudio son bastantes similares a aquellos obtenidos al inicio del mismo.

Gráfico IV.14 Evolución del porcentaje de galoilación de las proantocianidinas del hollejo durante el periodo de maduración de uva Monastrell cultivada a diferente altitud.

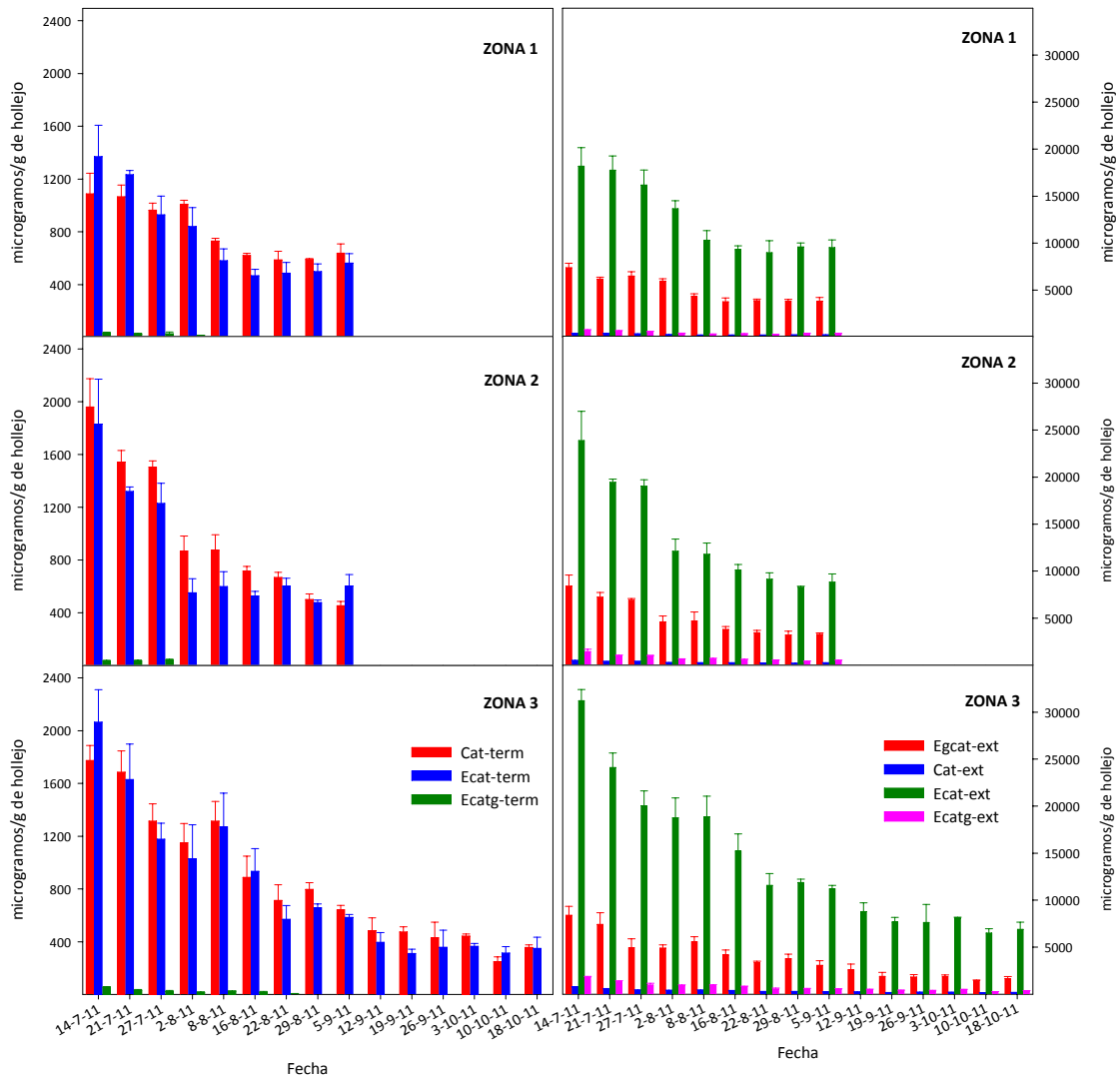


Hay que destacar que las proantocianidinas del hollejo de la uva de la zona 1 muestra los valores más bajos del porcentaje de galoilación durante todo el proceso de maduración, en cambio aquellas de la uva de las zonas 2 y 3 son más galoiladas, y además, no se observan diferencias en su porcentaje de galoilación.

El gráfico IV.15 muestra la composición de las proantocianidinas del hollejo de la uva en las tres zonas durante el proceso de maduración.

Respecto a las unidades terminales, la (+)-catequina y la (-)-epicatequina fueron las que presentaron los valores más altos para las tres zonas, sin embargo, la (-)-epicatequina-3-O-galato mostró valores muy bajos y solo estuvo presente en los primeros muestreos realizados durante el proceso de maduración. Hay que destacar que los valores de (-)-epicatequina terminal predominan sobre los de (+)-catequina en los primeros muestreos realizados en la uva de la zona 1, en el primero y el último de la zona 3 y en el último de la zona 2. Además, los valores de subunidades terminales en los primeros muestreos en la zona 1 son mucho más bajos que en la zona 2 y 3, siendo en estos últimos más próximos.

Gráfico IV.15 Evolución de la concentración de las unidades terminales y de extensión de las proantocianidinas del hollejo de uva Monastrell cultivada a diferente altitud. Abreviaciones. Cat-term, (+)-catequina terminal; Ecat-term, (-)-epicatequina terminal; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato terminal; Cat-ext, (+)-catequina de extensión; Ecat-ext, (-)-epicatequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epigalocatequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato de extensión.



En las tres zonas, el contenido de las unidades terminales fue decreciendo a medida que iba avanzando el periodo de maduración, mostrando al final del estudio los valores más bajos de estas unidades las proantocianidinas de la zona 3 (esto se corresponde con valores más altos de GPM, como se ha visto anteriormente).

Las subunidades de extensión presentan valores mucho más altos que las terminales, destacando la (-)-epicatequina como la subunidad más importante. La (+)-catequina y la (-)-epicatequina-3-O-galato presentaron los valores más bajos en las

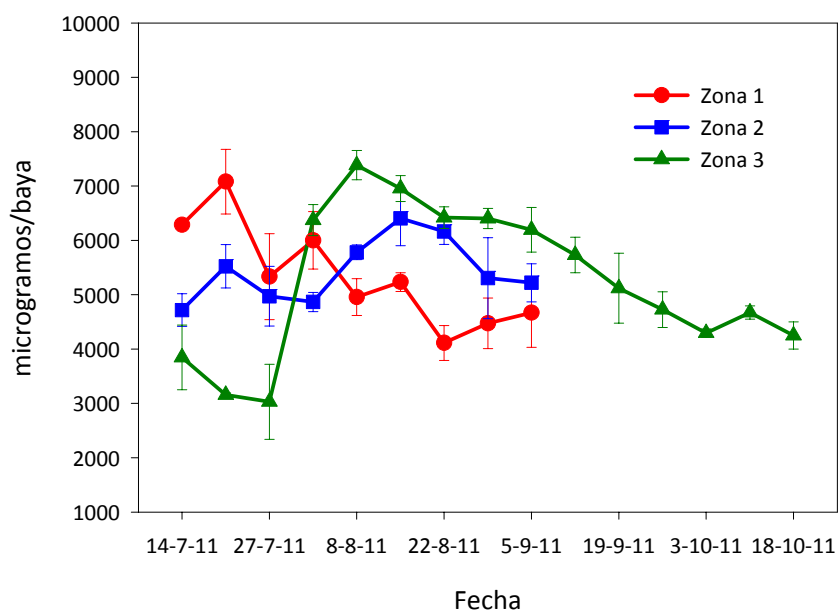
proantocianidinas de las uvas cultivadas en las tres zonas. En los primeros muestreos, los valores de subunidades de extensión son mucho mayores en las proantocianidinas de la uva de la zona 3 y menores en aquellas de la zona 1.

Los valores de las subunidades de extensión descienden a lo largo del proceso de maduración, observándose al final de estudio un contenido más bajo de éstas en las proantocianidinas de la uva de la zona 3.

IV.2.2.3.3 Proantocianidinas totales en las semillas

Solamente las proantocianidinas de las semillas de la uva de las zonas 2 y 3 incrementan su concentración a lo largo de la maduración, alcanzando valores más altos aquellas presentes en la uva de la zona 3. Después, los valores disminuyen hasta el final del estudio. En cambio, las proantocianidinas de la zona 1 evolucionan de manera diferente, inicialmente muestran valores de estos compuestos superiores respecto a aquellos de la uva de las otras dos zonas, descendiendo a lo largo de la maduración e incrementando ligeramente en la uva de los últimos muestreos.

Gráfico IV.16 Evolución de la concentración de la proantocianidinas de las semillas durante el periodo de maduración de uva Monastrell cultivada a diferente altitud.



Mateus et al. (2001) también encontraron algunas diferencias con respecto a la altitud del viñedo. Observaron un descenso en los valores de proantocianidinas de las semillas durante el proceso de maduración, aunque este fue más acusado para la uva cultivada a menor altitud en el caso de la variedad Touriga Nacional. Sin embargo, no encontraron diferencias en función de la altitud del viñedo para las uvas de la variedad Touriga Francesa. Esto pone de manifiesto que la evolución de estos compuestos también es bastante dependiente de la variedad.

Al final del estudio de maduración, la mayor concentración de proantocianidinas es mostrada por la uva de la zona 1 y los más bajos por aquella cultivada en la zona 3. El trabajo de Torchio et al. (2010) con uvas de Barberá cultivadas en diferentes áreas también mostró diferencias en los valores de proantocianidinas cuando estas presentaron un contenido de azúcares próximo al alcanzado en este estudio.

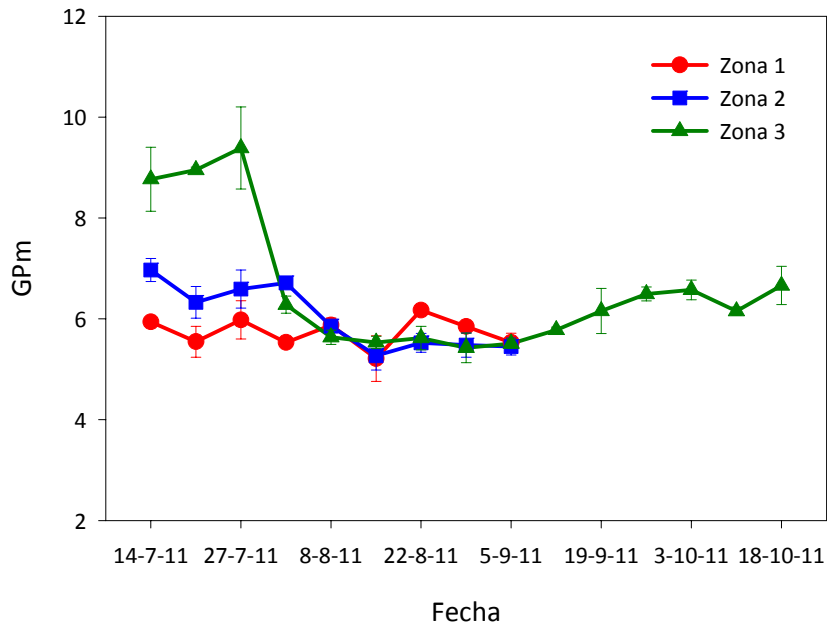
También hay que destacar que las cantidades de proantocianidinas de semillas encontradas en la uva cultivada en Bullas son mayores que aquellas encontradas en el estudio de maduración de la uva Monastrell de Jumilla. Estas diferencias encontradas en la uva serán reflejadas en el vino, el cual podría ser más astringente y amargo.

IV.2.2.3.4 Composición de las proantocianidinas de las semillas

Inicialmente se observan grandes diferencias en los valores de GPm de las proantocianidinas de la uva cultivada en las tres zonas (Gráfico IV.17). Este parámetro sólo tuvo grandes cambios en las proantocianidinas de la uva cultivada en la zona 3 durante los primeros muestreos, donde sufrió un descenso acusado desde julio hasta agosto, para después incrementarse ligeramente hasta el final del estudio. En este momento, las proantocianidinas de la zona 3 son las más polimerizadas, mientras que aquellas de la zona 1 son las que muestran un menor GPm.

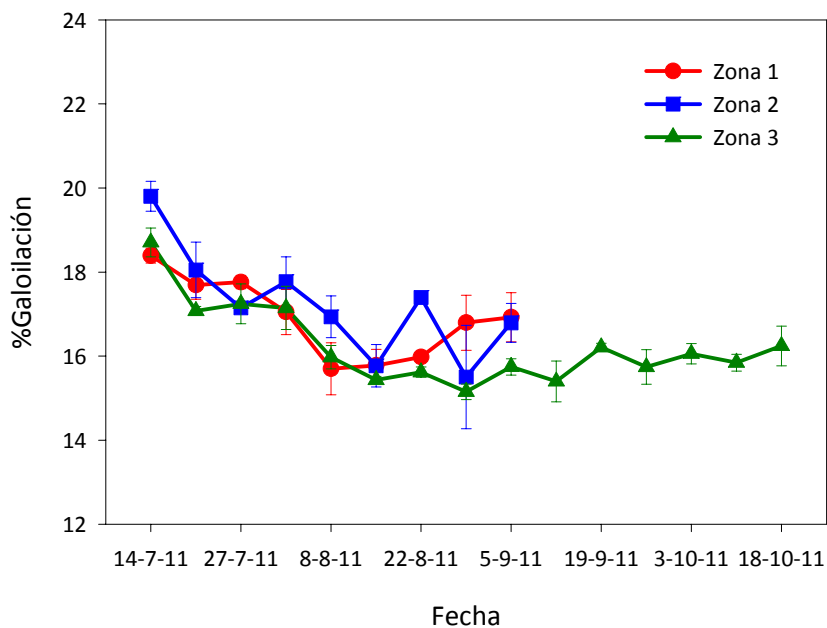
Al final del estudio no se observan diferencias entre los valores de GPm de las proantocianidinas de las zonas 1 y 2, siendo además estos valores más bajos que aquellos observados en las proantocianidinas de la uva de la zona 3.

Gráfico IV.17 Evolución del grado medio de polimerización de las proantocianidinas de las semillas durante el periodo de maduración de uva Monastrell cultivada a diferente altitud.



El porcentaje de galoilación (Gráfico IV.18) es mayor inicialmente para las proantocianidinas de la uva de la zona 2, no observándose diferencias entre aquellas de las otras dos zonas.

Gráfico IV.18 Evolución del porcentaje de galoilación de las proantocianidinas de las semillas durante el periodo de maduración de uva Monastrell cultivada a diferente altitud.



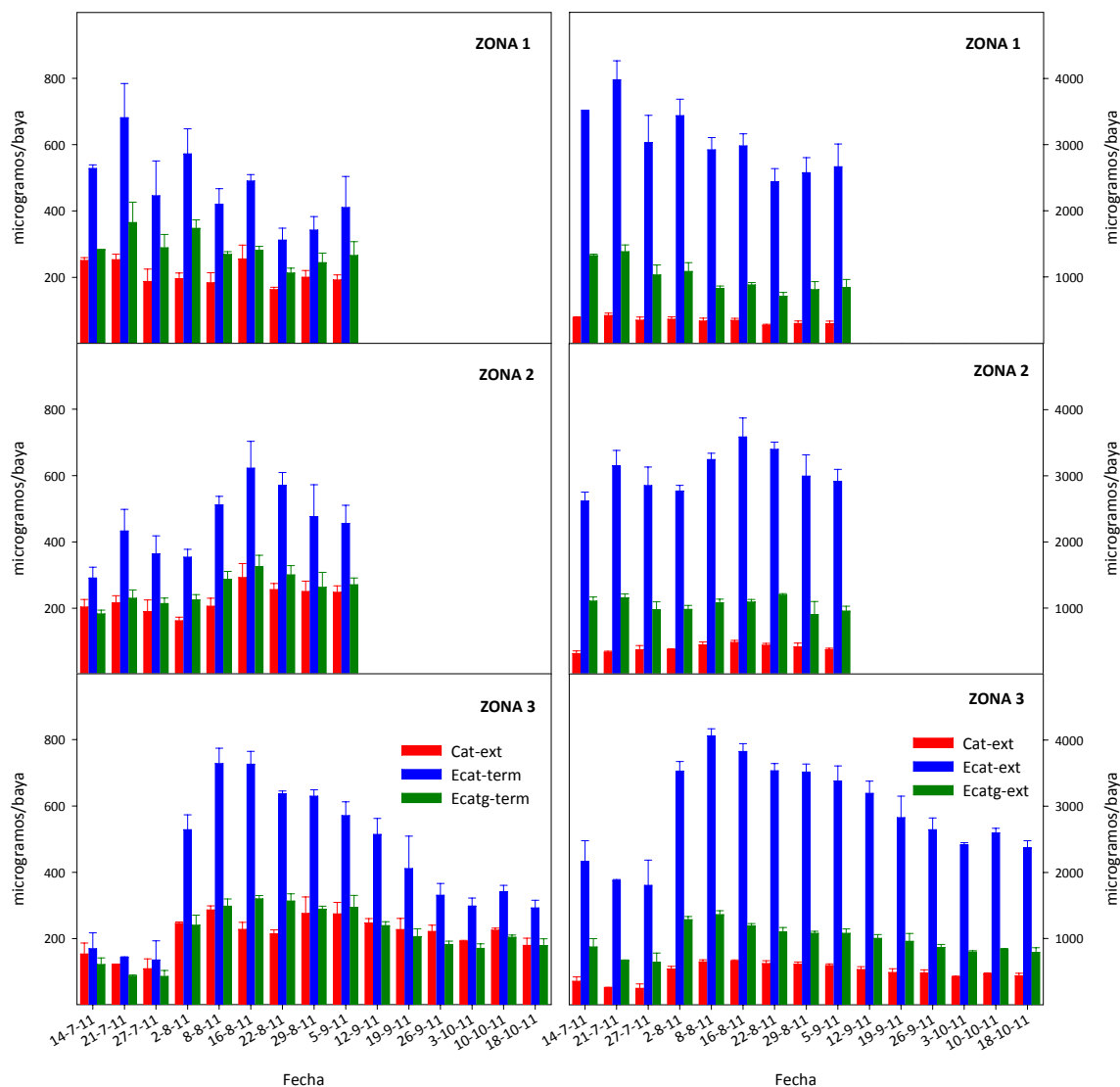
Los valores de este parámetro descienden a lo largo de la maduración, incrementando ligeramente durante los últimos muestreos. Al final de estudio, no se observan grandes diferencias en los valores de este parámetro en las proantocianidinas de la uva de las tres zonas, aunque estos son ligeramente mayores en las zonas 1 y 2. Una evolución similar a este parámetro fue también observada por Mateus et al. (2001) en los valores de (-)-epicatequina-3-*O*-galato durante la maduración de uvas Touriga Nacional y Touriga Francesa, encontrando en el último muestreo mayores valores de estos compuestos en la uva de la variedad Touriga cultivada a menor altitud, mientras que un resultado contrario fue observado para la variedad Touriga Francesa.

La composición de las proantocianidinas se muestra en el Gráfico IV. 19, para las subunidades terminales y de extensión.

En el caso de las subunidades terminales, en general la (-)-epicatequina seguida de (-)-epicatequina-3-*O*-galato se encuentran en mayor proporción que la (+)-catequina. Aunque esta subunidad predominó sobre (-)-epicatequina-3-*O*-galato antes y después del envero en la uva de la zona 3. Al final del estudio, los mayores contenidos de subunidades terminales son encontrados en la uva de las zonas 1 y 2.

En el caso de las subunidades de extensión, la (+)-catequina mostró los valores más bajos y la (-)-epicatequina los más altos, triplicando el contenido de las otras subunidades, resultado también observado en el estudio de maduración de la uva de Jumilla. Además, los contenidos de estas subunidades son mayores en las uvas de las zonas 1 y 2 que en aquellas de la zona 3, tanto antes del envero como al final del estudio.

Gráfico IV.19 Evolución de la concentración de las unidades terminales y de extensión de las proantocianidinas de las semillas durante el periodo de maduración de uva Monastrell cultivada a diferente altitud. Abreviaciones. Cat-term, (+)-catequina terminal; Ecat-term, (-)-epicatequina terminal; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato terminal; Cat-ext, (+)-catequina de extensión; Ecat-ext, (-)-epicatequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato de extensión.



Este estudio demuestra que la diferente altitud del viñedo solo afectó a la cantidad de taninos en la uva y no a su composición, presentando las uvas cultivadas a más altura menor cantidad de taninos, tanto en hollejo como en semillas, efecto contrario al observado en los antocianos, cuyos niveles se incrementan al aumentar la altura del viñedo (Mateus et al., 1999).

IV.2.3 PAPEL DEL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE UVA MONASTRELL DURANTE LA MADURACIÓN

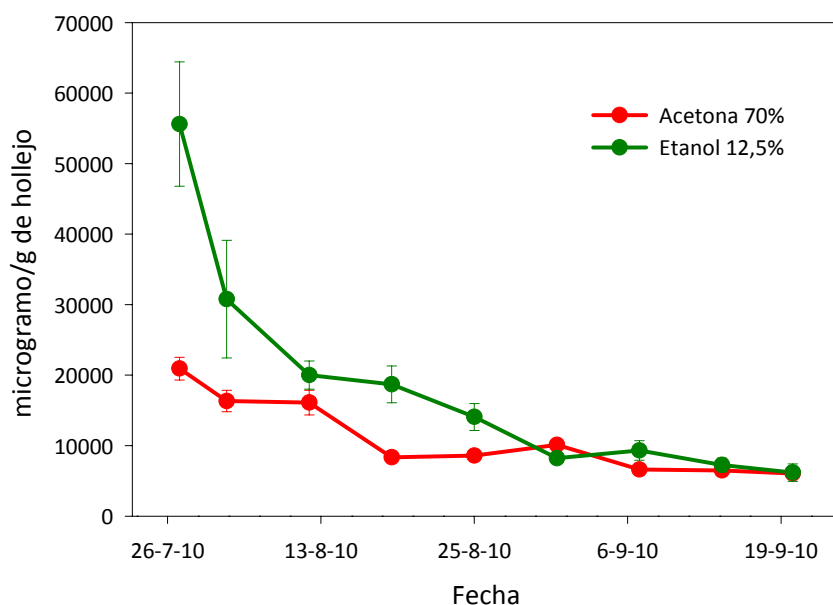
El disolvente más comúnmente usado para la extracción y análisis de las proantocianidinas de la uva ha sido siempre la acetona 70%, ya que se considera como el disolvente más efectivo para este fin (Downey y Hanlin 2010; Harbertson y Downey 2009; Kallithraka et al., 1995). Trabajar con este disolvente nos puede proporcionar información sobre la cantidad total de taninos extraíbles de las uvas, pero algunos estudios previos también consideran que la extracción usando este disolvente puede sobrestimar la cantidad de taninos que serán extraídos durante el proceso de maceración en la elaboración del vino. Por tanto, la estimación de la concentración de proantocianidinas en las uvas utilizando como medio de extracción una disolución de vino sintético podría ser más apropiada. En este estudio se ha comparado los resultados obtenidos con el método que utiliza acetona 70% para la extracción con un método que implica una extracción de 72 horas con etanol 12,5% y pH 3,6.

IV.2.3.1 PAPEL DEL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DEL HOLLEJO DE UVA MONASTRELL DURANTE LA MADURACIÓN

IV.2.3.1.1 Proantocianidinas totales

La evolución de los taninos del hollejo en la variedad Monastrell cuando se utilizó como disolvente de extracción etanol al 12,5% dio resultados sorprendentes (Gráfico IV.20). A partir del primer muestreo, los taninos extraídos con la solución modelo eran casi tres veces más altos que los extraídos con acetona, disminuyendo de manera significativa después de esta fecha. Desde el 29 de agosto (22 °Brix) hasta el momento de vendimia se observó el mismo rango de valores de taninos con ambos métodos.

Gráfico IV.20 Evolución del contenido de proantocianidinas del hollejo de uva Monastrell durante el periodo de maduración extraídas con acetona al 70% y etanol al 12,5%.

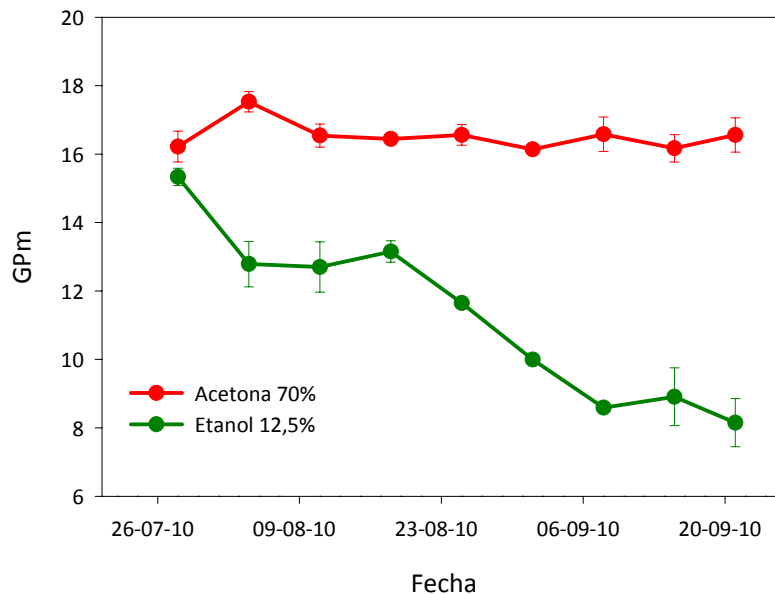


Lo que probablemente explique la diferencia que hay entre los dos métodos de extracción es una combinación de dos factores: por un lado, los tiempos de extracción (72 horas con el método de etanol frente a las 24 horas utilizadas con acetona) y por otro lado, el estado de los hollejos y las interacciones entre taninos y las paredes celulares. Un estudio cinético realizado por Geny et al. (2003) indicó que los taninos son rápidamente extraídos de la vacuola aunque, la extracción completa de la fracción de taninos unidos a la pared celular tardaría unas 14 veces más. En uvas inmaduras, el mayor tiempo de extracción empleado con etanol podría explicar la mayor cantidad de taninos extraídos con este método. Con el avance de la maduración, los taninos son transferidos de las vacuolas a las paredes celulares y los cambios en la estructura de las paredes celulares durante dicha maduración podría reducir la extractabilidad de los taninos (Le Bourvellec et al., 2004; Le Bourvellec et al., 2007; Downey y Hanlin, 2010). Estos compuestos parecen ser mas difíciles de extraer, incluso cuando se utilizan largos tiempos de extracción como con el método del etanol. El método de la acetona implica un menor tiempo de extracción, pero, sin embargo, este podría ser compensado por una mayor capacidad de la acetona para romper los enlaces de hidrogeno y liberar los taninos unidos covalentemente a la pared celular.

IV.2.3.1.2 Composición de las proantocianidinas

El GPM de las proantocianidinas de Monastrell extraídas con acetona y etanol fue muy similar en los primeros muestreos, pero después de esto, los valores de GPM son siempre mayores con el método de la acetona (Gráfico IV.21). Harbertson y Downey (2009) y Downey y Hanlin (2010) compararon la extracción de taninos con etanol y acetona, encontrando que la acetona extraía taninos con un mayor peso molecular.

Gráfico IV.21 Evolución del grado medio de polimerización de las proantocianidinas del hollejo de uva Monastrell durante el periodo de maduración extraídas con acetona al 70% y etanol al 12,5%.



Los taninos de mayor peso molecular se encuentran principalmente asociados a las paredes celulares y la acetona tiene una mayor capacidad para romper los enlaces de hidrogeno que une a los taninos con dichas paredes que el etanol. Mattivi et al. (2009) también encontraron que los valores del GPM de los taninos extraídos del hollejo con una solución similar al vino eran más bajos que aquellos extraídos con otros disolventes. Estos autores indicaron que estas diferencias eran de esperar, ya que los taninos de gran tamaño no pueden ser extraídos en gran medida por una

solución hidroalcohólica que simule las condiciones del vino.

Al comparar la composición de los taninos del hollejo para la variedad Monastrell con los métodos de acetona y etanol (Gráficos IV.22 y IV.23) se observa que en ambos casos, (+)-catequina era la unidad terminal más abundante, seguida de (-)-epicatequina, observándose cantidades muy bajas de (-)-epicatequina-3-*O*-galato. Respecto a las subunidades de extensión, (+)-catequina y (-)-epicatequina-3-*O*-galato estaban presentes en porcentajes muy bajos, siendo (-)-epicatequina la subunidad más abundante, seguida de (-)-epigalocatequina.

La composición de los taninos cambió ligeramente durante el periodo de maduración. Respecto a los diferentes métodos de extracción, casi no se observan diferencias en los porcentajes de las subunidades de extensión pero si en las subunidades terminales, donde el porcentaje de (+)-catequina fue siempre mayor en los taninos extraídos con etanol al 12,5%. Estos resultados fueron muy similares a los encontrados por Mattivi et al. (2009), quienes obtuvieron altos porcentajes de (+)-catequina terminal.

Gráfico IV.22 Evolución de la composición de las unidades terminales de las proantocianidinas del hollejo de uva Monastrell durante el periodo de maduración extraídas con acetona al 70% y etanol al 12,5%. Abreviaciones. Cat-term, (+)-catequina terminal; Ecat-term, (-)-epicatequina terminal; Ecatg-term, (-)-epicatequinagalato terminal.

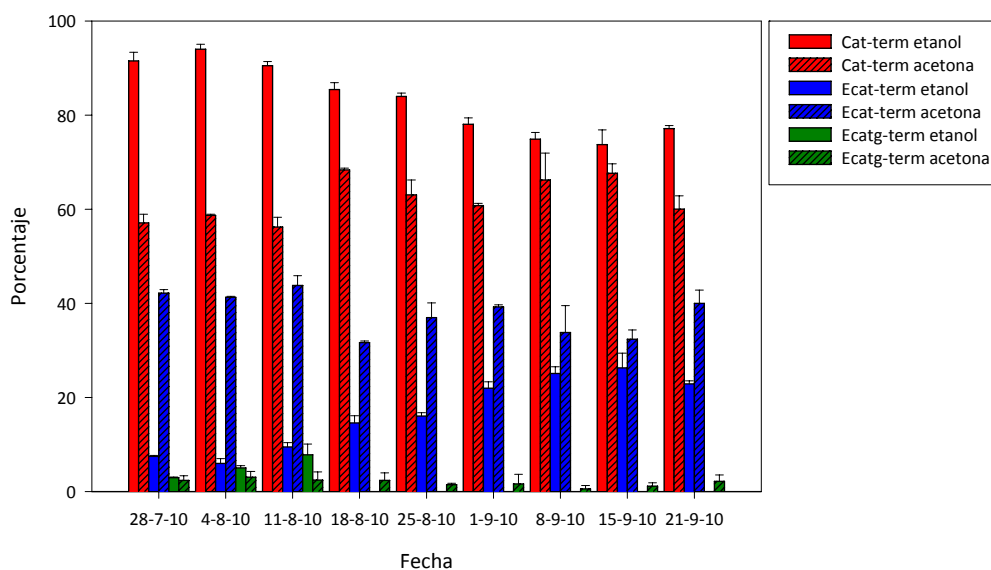
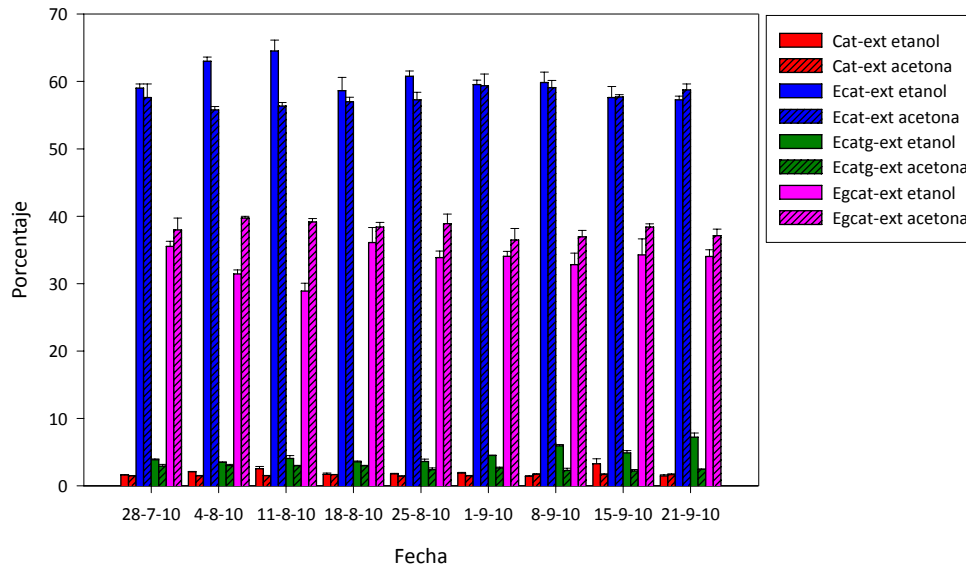


Gráfico IV.23 Evolución de la composición de las unidades de extensión de las proantocianidinas del hollejo de uva Monastrell durante el periodo de maduración extraídas con acetona al 70% y etanol al 12,5%. Abreviaciones. Cat-ext, (+)-catequina de extensión; Ecat-ext, (-)-epicatequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato de extensión; Egcac-ext, (-)-epigallocatequina de extensión.



Estos resultados ponen de manifiesto que el uso de acetona como método de extracción proporciona una predicción bastante exacta de la cantidad de taninos del hollejo que pueden ser extraídos en el vino durante el proceso de maceración, especialmente cuando la evaluación se realiza con uva madura. Sin embargo, la extracción con acetona sobreestimaré el Gpm de los taninos que se podrán extraer del hollejo durante la vinificación.

IV.2.3.2 PAPEL DEL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE LAS SEMILLAS DE UVA MONASTRELL DURANTE LA MADURACIÓN

Está bastante establecido que uvas insuficientemente maduras pueden dar vinos mas astringentes y amargos y esto se ha atribuido al hecho de que las semillas de estas uvas pueden liberar una mayor cantidad de proantocianidinas altamente

galoiladas (Romeyer et al., 1986). Sin embargo, de nuevo, la mayoría de los estudios que hay sobre la evolución de los taninos de las semillas durante la maduración han sido realizados utilizando acetona como disolvente de extracción y la información que obtenemos utilizando este disolvente puede no ser comparable con lo que ocurre durante la fermentación. Por eso, también para las semillas hemos comparado los resultados obtenidos desde pre-vero hasta el momento de vendimia con una extracción de taninos de semilla en acetona al 70% durante 24h, con un método que implicaba una maceración de 3 días (72 horas) en una solución modelo que contenía 12,5% de etanol.

IV.2.3.2.1 Proantocianidinas totales

La extracción de proantocianidinas poliméricas utilizando la solución de etanol al 12,5% mostró un descenso de la concentración de taninos con el avance de la maduración (Gráfico IV.24), al igual que los resultados obtenidos con acetona, encontrando una correlación positiva ($r^2 = 0,87$) al comparar la concentración de taninos obtenida con ambos disolventes (Gráfico IV.25). Sin embargo, la extracción de taninos con etanol al 12,5% fue mucho mayor que la obtenida con acetona al 70%, hasta los últimos muestreos donde esta situación cambió. En el primer muestro, los taninos extraídos con la solución modelo fueron ocho veces superiores a los extraídos con acetona al 70%, disminuyendo significativamente después de esta fecha. Alrededor del 25 de agosto (22 °Brix) se observó el mismo rango de valores para ambos métodos, mientras que en el momento de vendimia, la concentración de taninos fue cuatro veces mayor con el método de acetona (0,43mg/baya vs 1,80mg/baya).

Gráfico IV.24 Evolución de las proantocianidinas de las semillas de uva Monastrell durante el periodo de maduración extraídas con acetona al 70% o etanol al 12,5%.

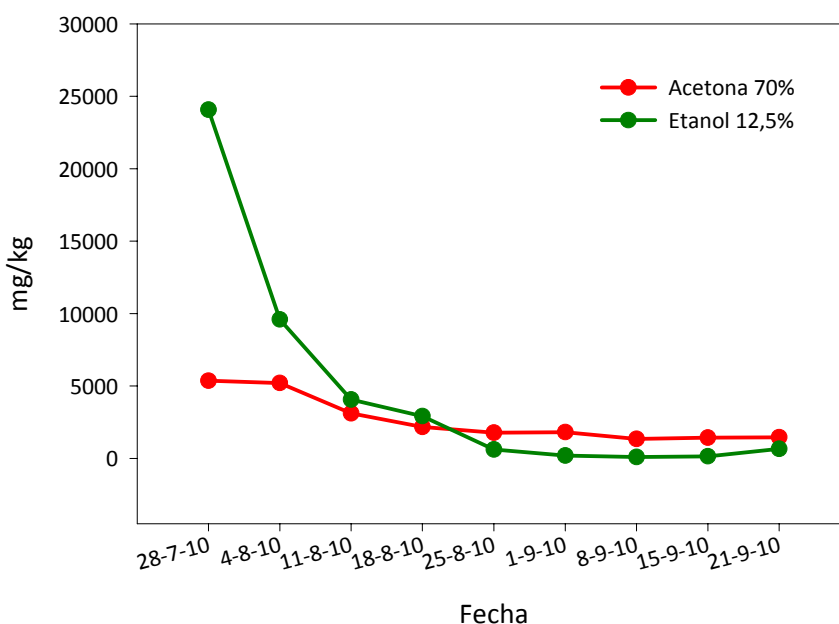
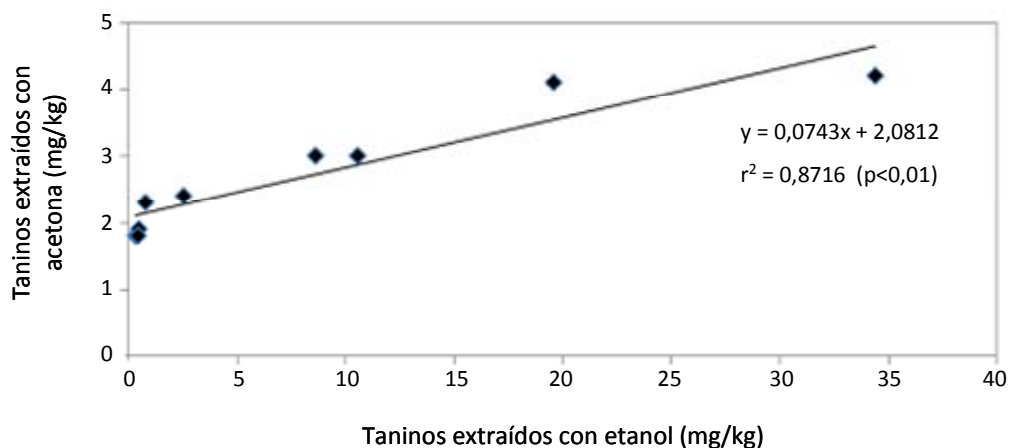


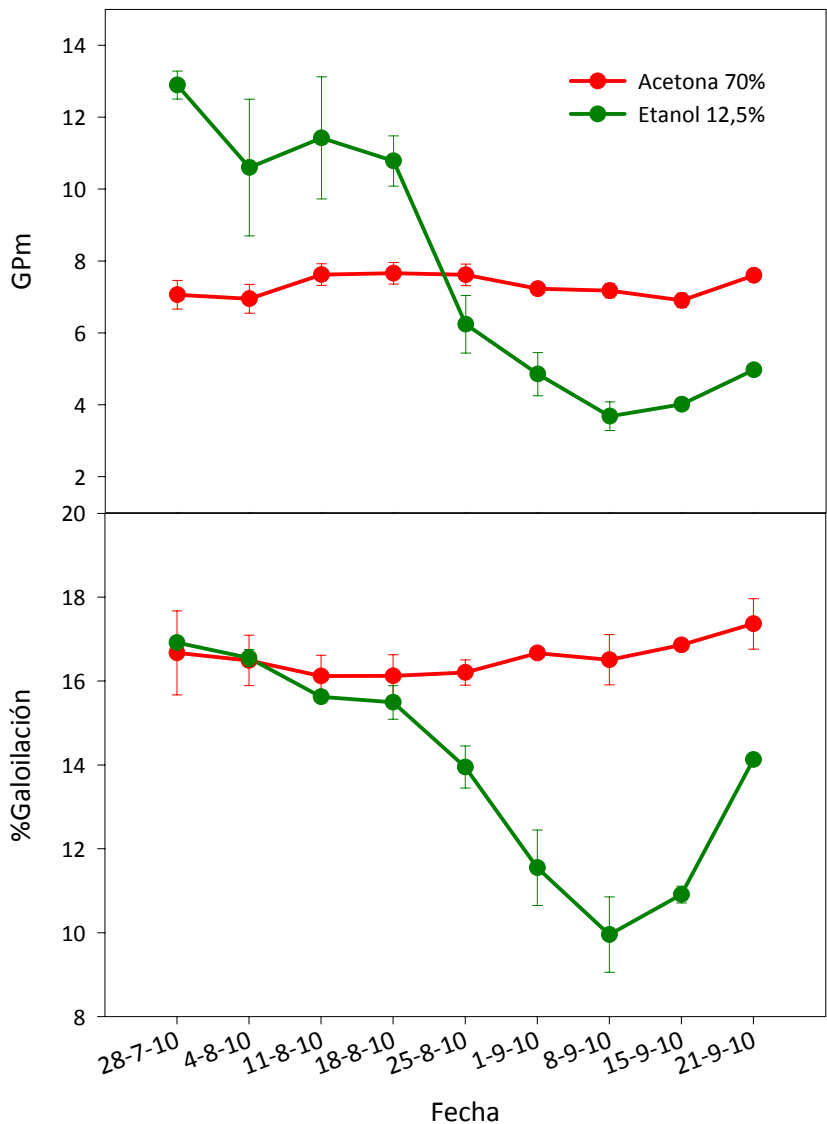
Gráfico IV.25 Correlación entre la concentración de proantocianidinas de semilla extraídas con acetona al 70% y con etanol al 12,5%.



IV.2.3.2.2 Composición de las proantocianidinas

El G_{Pm} fue mayor para los taninos extraídos con etanol al 12,5% en los primeros muestreos, pero a mitad de la maduración esto cambió, y el mayor tamaño de los taninos era mostrado por aquellos extraídos con acetona (Gráfico IV.26).

Gráfico IV.26 Evolución del grado medio de polimerización y el porcentaje de galoilación de las proantocianidinas de semillas de uva Monastrell durante el periodo de maduración extraídas con acetona al 70% o etanol al 12,5%.



En el caso del porcentaje de galoilación, no se observan diferencias en los valores de este parámetro en los dos primeros muestreos en lo que respecta al disolvente utilizado, pero después, estos valores permanecen prácticamente constantes durante el resto del estudio con acetona, mientras que con etanol al 12,5% sufren un descenso acentuado e incrementan de forma importante en los últimos muestreos.

Respecto a la composición de los taninos (Tablas IV.4, IV.5 y IV.6) no se observan diferencias en los porcentajes de las diferentes unidades de extensión y además, éstas fueron muy pequeñas cuando se observa la composición monomérica (expresada en porcentaje), excepto en los últimos muestreos, donde las unidades galoiladas no son detectadas en los taninos extraídos con la solución modelo. Las mayores diferencias se observaron en las unidades terminales donde (+)-catequina fue siempre mayor en los taninos extraídos con etanol al 12,5%. Un ensayo similar fue conducido por Mattivi et al. (2009) agitando semillas maduras durante 5 días usando una solución modelo con etanol al 12,5%. Sus resultados también mostraron bajos valores de Gpm y un mayor porcentaje de (+)-catequina en las subunidades terminales.

Tabla IV.4 Comparación de las unidades terminales de las proantocianidinas (expresadas en porcentaje) extraídas con etanol al 12,5% o con acetona al 70%.

Fecha	%C-term etanol	%C-term acetona	%EC-term etanol	%EC-term acetona	%ECG-term etanol	%ECG-term acetona
28 de Julio	49,68±0,76	29,55±0,98	8,20±0,10	45,69±1,05	42,12±0,86	24,75±0,98
4 de Agosto	48,21±0,66	28,29±2,10	8,87±2,82	45,66±1,01	42,92±6,16	26,05±1,22
11 de Agosto	50,27±2,24	29,45±1,66	7,74±4,65	43,29±0,77	41,99±5,05	27,26±1,74
18 de Agosto	52,50±0,66	30,37±0,12	11,71±4,61	43,19±1,46	35,79±6,03	26,44±1,59
25 de Agosto	49,94±5,34	34,77±0,30	19,41±4,47	39,82±0,62	30,65±3,81	25,41±0,32
1 de Septiembre	44,01±1,63	34,44±0,16	30,27±2,46	39,13±2,21	25,72±3,28	26,44±2,02
8 de Septiembre	48,11±2,28	37,81±0,78	32,52±2,87	34,31±1,04	19,37±2,50	27,88±0,75
15 de Septiembre	41,65±4,31	35,48±1,03	36,53±3,79	35,93±1,30	21,82±0,52	28,58±0,71
21 de Septiembre	45,91±0,36	36,98±1,49	26,02±0,50	34,91±1,36	28,08±0,43	28,11±1,38

Abreviaciones. %C-ext, porcentaje de (+)-catequina de extensión; %EC-ext, porcentaje de (-)-epicatequina de extensión; %ECG-ext, porcentaje de (-)-epicatequinagalato de extensión.

Tabla IV.5 Comparación de las unidades de extensión de las proantocianidinas (expresadas en porcentaje) extraídas con etanol al 12,5% o con acetona al 70%.

Fecha	%C-ext etanol	%C-ext acetona	%EC-ext etanol	%EC-ext acetona	%ECG-ext etanol	%ECG-ext acetona
28 de Julio	8,60±0,49	8,50±0,15	76,60±0,52	76,17±1,04	14,80±0,03	15,34±0,97
4 de Agosto	9,29±0,21	8,86±0,13	76,90±0,04	76,26±0,57	13,82±0,19	14,88±0,70
11 de Agosto	9,59±0,21	9,00±0,28	77,31±0,24	76,56±0,57	13,10±0,10	14,44±0,38
18 de Agosto	10,28±0,79	8,56±0,38	76,31±0,59	76,87±0,10	13,41±0,20	14,58±0,38
25 de Agosto	10,58±0,63	8,98±0,69	78,69±0,09	76,20±0,37	10,74±0,80	14,81±0,32
1 de Septiembre	13,03±0,43	8,85±0,12	79,10±0,58	76,05±0,36	7,87±0,72	15,10±0,47
8 de Septiembre	18,46±2,20	9,84±0,42	75,09±1,38	75,50±0,37	6,45±1,03	14,66±0,71
15 de Septiembre	13,24±0,02	9,38±0,30	79,47±0,29	75,75±0,49	7,29±0,31	14,87±0,22
21 de Septiembre	11,17±0,35	8,79±1,21	78,36±0,03	75,48±1,29	10,47±0,38	15,74±0,57

Abreviaciones. %C-term, porcentaje de (+)-catequina terminal; %EC-term, porcentaje de (-)-epicatequina terminal, %ECG-term, porcentaje de (-)-epicatequinagalato terminal.

Tabla IV.6 Comparación de flavan-3-oles monoméricos (expresados en porcentaje) extraídos con etanol al 12,5% o con acetona al 70%.

Fecha	%C etanol	%C acetona	%EC etanol	%EC acetona	%ECG etanol	%ECG acetona
28 de Julio	53,02±0,27	48,99±2,50	30,56±1,97	31,11±2,03	16,42±1,92	19,90±0,66
4 de Agosto	49,23±1,49	46,61±4,62	39,04±1,63	35,45±1,33	11,73±0,18	17,93±3,48
11 de Agosto	43,42±1,10	42,06±7,00	49,54±1,91	40,82±6,39	7,05±0,93	17,12±1,30
18 de Agosto	42,43±4,57	44,46±1,10	49,24±1,42	40,55±0,87	8,33±3,49	14,99±0,24
25 de Agosto	44,21±4,58	39,39±2,52	55,79±4,58	47,75±2,86	0,00±0,10	12,86±0,35
1 de Septiembre	45,28±1,84	38,40±2,20	54,72±1,84	50,08±1,12	0,00±0,10	11,51±1,08
8 de Septiembre	45,57±2,87	38,49±1,74	54,43±2,87	49,95±1,57	0,00±0,10	11,55±1,50
15 de Septiembre	47,95±0,10	36,32±4,39	52,05±0,10	54,75±2,35	0,00±0,10	8,93±2,19
21 de Septiembre	46,64±1,25	34,21±2,49	53,36±1,25	52,90±1,63	0,00±0,12	12,90±2,15

Abreviaciones. %C, porcentaje de (+)-catequina; %EC, porcentaje de (-)-epicatequina; %ECG, porcentaje de (-)-epicatequinagalato.

Es probable una combinación de dos efectos que expliquen las diferencias obtenidas entre ambos métodos a lo largo de la maduración: en primer lugar y al igual que se ha comentado anteriormente, el mayor tiempo de extracción (72h frente a 24h) y en segundo lugar, el estado de las semillas. Los compuestos fenólicos han sido

localizados en tres zonas de las semillas: la epidermis, una amplia parte del tegumento externo y en la capa más interna del tegumento interno (Cadot et al., 2006a). En semillas inmaduras, la lignificación es baja, y es fácil que el disolvente pueda acceder al tegumento interno, lo cual explicaría la gran cantidad de taninos extraídos en los primeros muestreos después de macerar las semillas durante 3 días con disolución de etanol al 12%. Con el avance de la maduración, la solidificación de las células externas, las cuales son ricas en taninos, podría afectar a la extracción de estos compuestos. Además, con el progreso de la maduración, también ha sido descrito que hay un endurecimiento del tegumento medio y una lignificación muy intensa, lo cual lo convierte en impermeable (Cadot et al., 2006a). Esto impediría que los compuestos fenólicos del tegumento interno fueran extraídos durante la maceración etanólica, mientras que la extracción de estos compuestos si que sería posible con acetona al 70%.

Los resultados obtenidos muestran que existen bastantes diferencias en cuanto a la concentración de taninos de semilla en función del método que se utilice. Esto puede tener un interés práctico. En aquellas condiciones donde la madurez de la pulpa se alcance antes que las semillas maduren (fenómeno que a veces ocurre en zonas cálidas con variedades que no están bien adaptadas), la solución hidroalcohólica que es el vino extraerá mayor cantidad de taninos que lo esperado según los resultados que nos mostraría una extracción con acetona, y lo contrario ocurrirá con semillas maduras. Estos resultados señalan la importancia de la metodología de extracción utilizada para predecir los taninos de las semillas que serán transferidos al vino durante la maduración de las mismas.

**V. PROANTOCIANIDINAS EN LOS VINOS DE
MONASTRELL, CABERNET SAUVIGNON Y SYRAH**

V.1 INFLUENCIA DE ALGUNAS TÉCNICAS ENOLÓGICAS EN LA CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS

V.1.1 INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos de la uva van a difundir durante la etapa de maceración de los hollejos y semillas con el mosto-vino, aunque sólo una parte del total de los fenoles de la uva serán extraídos de las diversas partes como las pieles, las semillas y la pulpa (Singleton y Draper, 1964; Kantz y Singleton, 1991; Boulton, 1995; Klenar et al., 2004).

Los taninos de los hollejos y semillas poseen diferentes cinéticas de extracción. Los taninos de los hollejos comienzan a solubilizarse conjuntamente con los antocianos al inicio de la maceración, si bien su extracción se prolonga mucho más en el tiempo. Por el contrario, los taninos de las semillas difunden mas lentamente, sobre todo al principio de la maceración, y su extracción se acelera cuando hay etanol en el medio, y, por tanto, influye notablemente la duración de la maceración en el contenido final de taninos de los vinos, sobre todo de aquellos que provienen de las semillas (Singleton y Draper, 1964; Boulton, 1995). Otros factores como la temperatura durante la fermentación y la adición de SO₂ también van a influir positivamente en la acumulación de estos compuestos en el vino (Oszmanski et al., 1986). Asimismo, tanto la extracción como la difusión de los compuestos fenólicos aumentan con la renovación del mosto-vino que impregna las partes sólidas, lo cual se consigue mediante la realización de remontados o por hundimiento del sombrero.

Además de las diferentes prácticas enológicas, los trabajos de Fournand et al. (2006) indicaron que la extractibilidad de los taninos también parece ser dependiente del tamaño de las moléculas, siendo las de más alto grado de polimerización más

difícilmente extraídas. El porcentaje de galoilación es también más alto en los taninos que no se extraen.

Tradicionalmente se ha establecido que los taninos de las pieles son organolépticamente mejores que los de las semillas y, dada la diferente localización de estos taninos y sus distintas cinéticas de extracción, diferentes técnicas de elaboración podrían modular la proporción de taninos de pieles y semillas de los vinos. A continuación, se presenta una revisión de algunas técnicas que se pueden utilizar para modular la extracción de proantocianidinas de la uva al vino y que han sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

V.1.1.1 MACERACIÓN PREFERMENTATIVA EN FRÍO

Es una maceración a baja temperatura y en ausencia de alcohol durante un tiempo tal que permita la difusión selectiva de compuestos hidrosolubles de la uva: antocianos, taninos del hollejo, aromas, polisacáridos etc. (Delteil et al., 2004). La difusión prioritaria de antocianos durante la fase pre-fermentativa, así como de taninos del hollejo puede explicar el aumento de color normalmente observado en los vinos obtenidos (Álvarez et al., 2005). La ausencia de etanol favorecería la formación de especies poliméricas de mayor peso molecular, lo que también puede contribuir a aumentar la intensidad de color (Timberlake y Bridle, 1976). Tradicionalmente se ha mantenido que durante la fase prefermentativa no hay extracción de taninos de semillas y que esta técnica permitiría moderar o incluso acortar los tiempos de maceración fermentativa y evitar posibles sobre-extracciones de taninos amargos y/o herbáceos desde las semillas.

Esta práctica facilita además la manifestación de caracteres aromáticos propios de la uva, ya que se favorece la liberación, a partir de los fragmentos de los hollejos, de aromas libres y ligados. Se obtienen vinos de mayor cuerpo y persistencia en boca (Flanzy, 1999). Algunos autores condicionan el éxito de la técnica al nivel de madurez de la uva (Llaudy et al., 2003), ya que obtienen mejores resultados con uvas menos maduras.

En la aplicación de esta técnica se han utilizado temperaturas y tiempos variables, entre 3-10°C y entre 3 y 8 días, en ausencia de oxígeno o en presencia de éste, así como con distintos momentos de inoculación de levaduras (previo al inicio de la maceración pre-fermentativa o después de finalizada la misma). Es también común el uso simultáneo de enzimas pectolíticos (Parley, 1997), ya que la actividad enzimática natural de la uva es baja a las temperaturas de trabajo.

La maceración pre-fermentativa es una técnica ampliamente empleada para la vinificación en tinto de uvas con bajos niveles de compuestos fenólicos, como es el caso de Pinot Noir (Heatherbell et al., 1996; Parley, 1997; Ponte et al., 2004) y Sangiovese (Ferrari et al., 2004; Parenti et al., 2006), donde es usada para añadir complejidad a los vinos.

V.1.1.2 CONGELACIÓN DEL MOSTO CON NIEVE CARBÓNICA

La congelación del mosto de uva antes de fermentación también es una técnica que puede tener un importante efecto sobre la extracción de compuestos fenólicos, como en el caso de la maceración pre-fermentativa. La congelación que se produce incrementa el volumen del líquido intracelular produciendo una desorganización de las paredes celulares de la baya, favoreciendo la liberación de compuestos fenólicos al medio. También se puede utilizar nitrógeno líquido con el mismo fin. La ventaja de utilizar el dióxido de carbono en estado sólido es que al sublimarse va a proteger a las bayas de la actuación del oxígeno antes del proceso de fermentación (Sacchi et al., 2005).

Los estudios de Couasnon (1999) mostraron que la utilización de nieve carbónica en uvas de Merlot, Cabernet Sauvignon y Cabernet Franc produjo en los vinos un incremento de un 52% en el contenido de taninos y de un 50% para antocianos. Este gran incremento en el contenido de taninos podría ser debido a que la congelación también produzca la ruptura de las células de las pepitas que contienen los taninos, incrementando la extractabilidad de estos, aunque esto no ha sido demostrado hasta la fecha.

V.1.1.3 ENZIMAS PECTOLÍTICOS

La extracción de compuestos fenólicos de las células del hollejo durante la maceración requiere que las paredes celulares de las células se rompan para permitir liberar el contenido de las vacuolas.

Con este fin, los enzimas pectolíticos, también conocidos como enzimas de maceración, han sido utilizados desde hace años en mostos tintos porque en estos se podría mejorar la extracción del color y los compuestos fenólicos de la uva tinta. Numerosos estudios han mostrado estos resultados (Ough y Berg, 1974; Ough y Crowell, 1979; Felix y Villettaz, 1983; Zent y Inama, 1992).

Los llamados enzimas de maceración son una mezcla de diferentes actividades enzimáticas (celulasa, hemicelulasa, pectinasas y proteasas) diseñadas para incrementar la degradación de las paredes celulares de las células del hollejo y así, facilitar la liberación de los compuestos fenólicos contenidos en su interior. Algunas de estas actividades enzimáticas, como la actividad pectolítica, han sido también observadas en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* pero sus niveles son normalmente demasiado bajos para jugar un papel significativo durante la vinificación (Eschstruth y Divol, 2011).

La mayoría de los estudios realizados sobre el papel de los enzimas de maceración han estado muy ligados al efecto de estos enzimas sobre los compuestos fenólicos contenidos en el hollejo, principalmente los antocianos, dejando de lado el papel sobre otros compuestos fenólicos del hollejo como los taninos. Sin embargo, ya en algunos estudios se encontró una acción clara de los enzimas en la extracción de taninos (Watson et al., 2000; Bautista-Ortín, 2005; Romero-Cascales, 2008; Ducasse et al., 2010), los cuales van a inducir la formación de compuestos coloreados estables aumentando la intensidad de color del vino durante el proceso de envejecimiento (Revilla y González-San José, 2001), además, confiriendo al vino una mayor sensación de cuerpo y estructura (Watson et al., 1999).

La mayoría de los trabajos han obviado el posible papel de los enzimas de maceración sobre las semillas. Cadot et al. (2006) observaron que los taninos de

semilla están localizados en la epidermis y en los tegumentos externos e internos de las semillas. La presencia de actividades enzimáticas como celulasas, pectinasas, hemicelulasas y proteasas podrían también favorecer la degradación de las paredes celulares de las semillas, facilitando una mayor difusión de sus taninos, aunque esto ha sido muy poco estudiado.

En este capítulo se estudia el efecto de estas distintas técnicas de elaboración sobre la dinámica de difusión de los taninos del hollejo y la semilla, para determinar el papel que pueden ejercer a la hora de modular la composición tánica de los vinos.

V.1.2 RESULTADOS

V.1.2.1 EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROANTOCIANIDINAS DURANTE LA MACERACIÓN FERMENTATIVA DE UVAS DE LA VARIEDAD MONASTRELL EN FUNCIÓN DE LA TÉCNICA ENOLÓGICA APLICADA

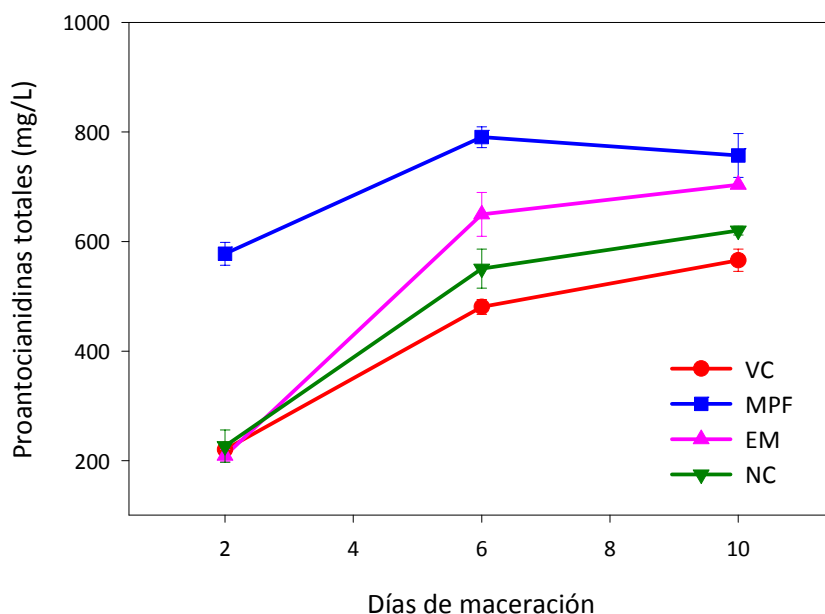
En los gráficos V.1, V.2, V.3 y V.4 se puede observar la evolución de proantocianidinas totales y la composición de las mismas durante la maceración fermentativa de uvas Monastrell del año 2009, comparando una vinificación control (VC) con la aplicación de la maceración prefermentativa en frío (MPF), nieve carbónica (NC) y el uso de un enzima de maceración comercial (EM). Las muestras fueron analizadas a los 2, 6 y 10 días de maceración fermentativa.

V.1.2.1.1 Proantocianidinas totales

El gráfico V.1 muestra la evolución del contenido de proantocianidinas durante los 10 días de maceración fermentativa. En general, el contenido de proantocianidinas se incrementa en el mosto-vino para todas las vinificaciones al aumentar el tiempo de contacto con las partes sólidas de la uva, siendo dicho incremento mucho mayor durante los 6 primeros días de maceración, comportamiento que también fue

encontrado por otros autores (Koyama et al., 2007; Sampaio et al., 2007; Llaudy et al., 2008).

Gráfico V.1 Evolución de la concentración de proantocianidinas totales (mg/L) durante el proceso de maceración fermentativa.



A los 2 días de maceración fermentativa, la vinificación que previamente tuvo una maceración prefermentativa de diez días en frío (MPF) presenta valores de proantocianidinas aproximadamente tres veces superiores a los del resto de vinificaciones, indicando una importante extractabilidad de estos compuestos en ausencia de alcohol. En este momento inicial no se observan diferencias en los valores de proantocianidinas entre el resto de tratamientos respecto al testigo. Es de destacar el diferente comportamiento de la vinificación con nieve carbónica respecto a la vinificación con maceración prefermentativa en frío, lo que puede ser debido a que todavía al inicio de la maceración fermentativa, parte de la pasta en esta vinificación se encuentre aún congelada, viéndose impedido el paso de proantocianidinas al mosto-vino. En la vinificación MPF la cantidad de proantocianidinas se incrementó hasta el día 6 de maceración, manteniéndose después estable.

Otros autores también han constatado una importante extracción de taninos tras varios días de etapa prefermentativa a baja temperatura (Peyrot des Gachons y Kennedy, 2003) y con 2 o 4 días (Sampaio et al., 2007), pero los valores encontrados por estos autores son inferiores a los encontrados por nosotros. Álvarez et al. (2005) también encontraron un efecto positivo de la maceración prefermentativa en la concentración y polimerización de proantocianidinas y el color y estabilidad en vinos de Monastrell.

Las otras vinificaciones también mostraron un sustancial incremento en el contenido de proantocianidinas durante la primera parte del proceso fermentativo, pero éste se vio más ralentizado desde el día 6 hasta el 10 de maceración. Con el avance del proceso de maceración también comienzan a establecerse diferencias entre las vinificaciones con enzima, nieve carbónica y testigo. Al final del proceso macerativo, la vinificación con enzima mostró valores de proantocianidinas similares a aquellos presentados por MPF. En este momento, las concentraciones de proantocianidinas presentadas por las diferentes vinificaciones se encuentran en el rango encontrado en otros trabajos (Cerpa-Calderón et al., 2008; Sampaio et al., 2007). Los trabajos de Bautista-Ortín et al. (2005) con vinos de Monastrell también constataron un efecto claro de los enzimas sobre el contenido de taninos. Más tarde, Ducasse et al. (2010) también reportaron mayores concentraciones de proantocianidinas en vinos de Merlot tratados con la aplicación de enzimas.

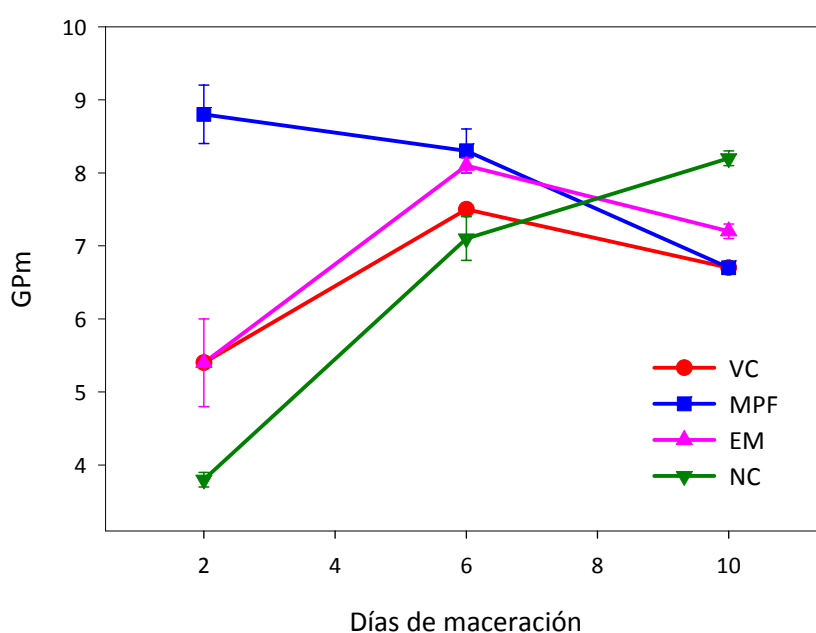
También la vinificación donde se utilizó nieve carbónica llegó al final de la maceración fermentativa con valores de proantocianidinas superiores a la vinificación control.

Por tanto, las tres técnicas ensayadas consiguen un aumento de las proantocianidinas totales en los vinos al final de la etapa de maceración fermentativa, destacando sobre todo los niveles observados en la vinificación MPF y cuando se utilizó un enzima de maceración.

V.1.2.1.2 Composición de las proantocianidinas

El valor del grado medio de polimerización (GPm), junto con el porcentaje de galoilación (%G) y el porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión (%Egcat-ext) (Gráficos V.2, V.3 y V.4) pueden proporcionar información de cómo la composición de las proantocianidinas del mosto-vino cambia durante la maceración fermentativa.

Gráfico V.2 Evolución del grado medio de polimerización de las proantocianidinas durante el proceso de maceración.



Las proantocianidinas del hollejo de la uva contienen unidades de (-)-epigallocatequina, (la cual no está presente en las proantocianidinas de las semillas) y un mayor GPm que las proantocianidinas de las semillas. Por tanto, el porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión podría darnos información de la cantidad de proantocianidinas derivadas del hollejo que están presentes en el vino, mientras que el porcentaje de galoilación, el cual es mucho mayor en las proantocianidinas de las semillas que en los hollejos (Souquet et al., 1996; Prieur et al., 1994), nos puede dar información acerca de la extracción de las proantocianidinas de las semillas durante el proceso de maceración.

Gráfico V.3 Evolución del porcentaje de galoilación durante el proceso de maceración.

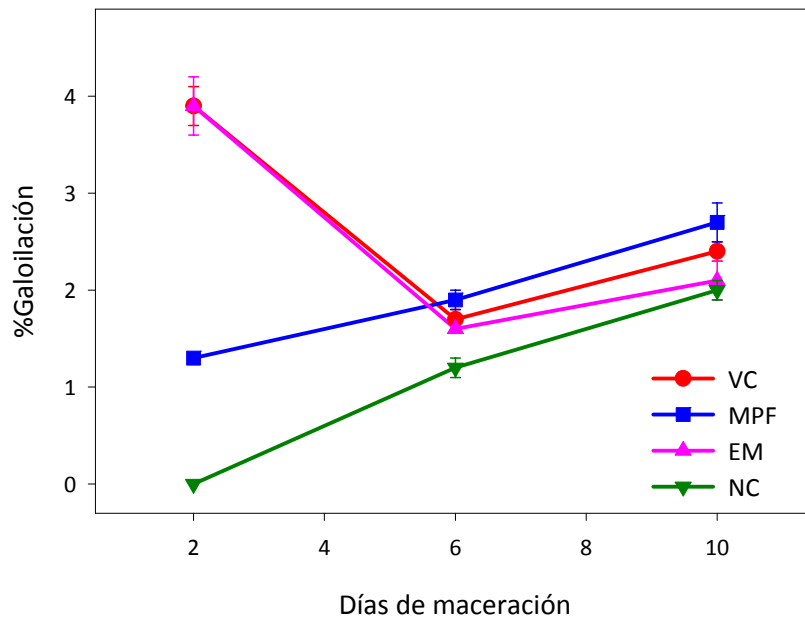
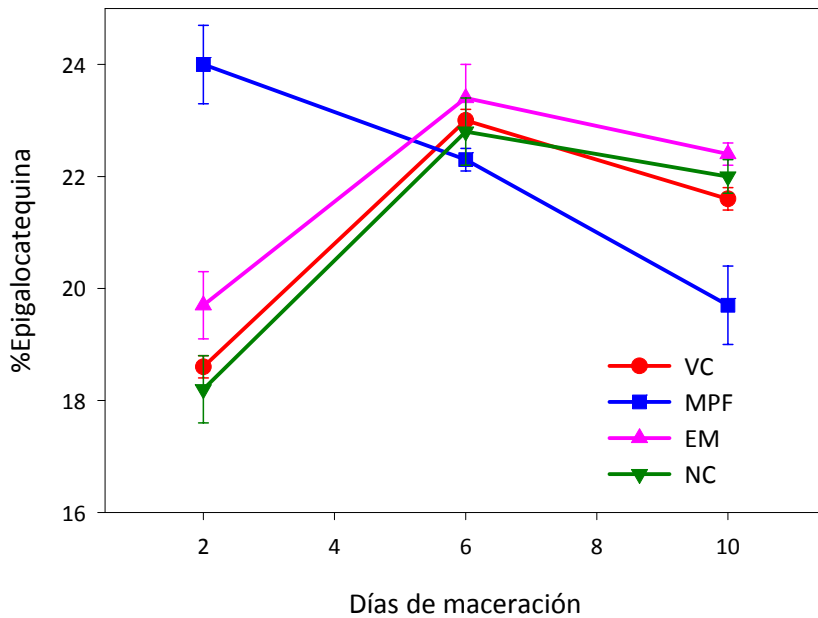


Gráfico V.4 Evolución del porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión durante el proceso maceración.



Un estudio muy interesante de Peyrot des Gachon y Kennedy (2003) mostró que en el vino puede ser determinado el porcentaje de taninos que proceden de los hollejos

y de las semillas. Estos autores demostraron que la composición de las subunidades de extensión no era dependiente del tiempo de extracción y la duración de la maceración, y como las subunidades de extensión son diferentes en semillas y hollejos, concluyeron que era posible determinar el porcentaje de proantocianidinas de hollejos y semillas extraídas en el vino, simplemente comparando la proporción relativa de las subunidades de extensión de las proantocianidinas en el vino con sus subunidades correspondientes en la uva. Así, midiendo la cantidad relativa molar de las unidades de extensión de (-)-epigallocatequina y (-)-epicatequina debería ser posible determinar la proporción relativa de proantocianidinas de semillas y hollejos.

Estos tres parámetros evolucionan de manera diferente en las distintas vinificaciones. En la vinificación MPF, las proantocianidinas presentan un valor inicial de GPm y de %Egcat elevado y un %G bajo, sugiriendo que en este momento (inicio de la fermentación alcohólica), las proantocianidinas presentes en el mosto proceden principalmente del hollejo de la uva. Así, teniendo en cuenta la composición de la uva de partida (mostrada en el capítulo anterior) y siguiendo el método propuesto por Peyrot des Gayons y Kennedy (2003), se ha calculado que el porcentaje de proantocianidinas derivadas del hollejo en el mosto en el día 2 de maceración era de 87,2%, valor muy parecido a aquel encontrado por estos mismos autores en un ensayo similar. Este resultado era esperado, ya que durante la maceración de la uva a baja temperatura y en ausencia de alcohol, la extracción de proantocianidinas del hollejo debería estar favorecida frente la extracción de proantocianidinas de las semillas (Canal et al., 2005; Llaudy et al., 2010).

Cuando la fermentación alcohólica comenzó, la composición de las proantocianidinas de la vinificación MPF cambió rápidamente, teniendo lugar un importante descenso en los valores de GPm y el %Egcat y un incremento en los valores de %G. Al final del proceso de maceración fermentativa, la vinificación MPF fue la que presentó proantocianidinas con el más bajo % Egcat y GPm y el más alto %G, indicando que esta vinificación, contrariamente a lo que sería esperado, contenía la más alta proporción de taninos derivados de las semillas (29%), mientras que las vinificaciones control, tratada con enzima y con nieve carbónica mostraron valores del 21,5, 19, y

20% respectivamente. Estos valores son muy similares a aquellos mostrados por Cerpa-Calderón y Kennedy (2003) después de 9 días de maceración fermentativa.

Estos resultados nos hacen pensar que la maceración prefermentativa en frío también tiene un cierto efecto sobre la estructura de las semillas. De forma similar a lo descrito por Hernández-Jiménez et al. (2012), durante los días que las semillas pasan en el medio acuoso prefermentativo, éstas se hidratan y parece ser que se “preparan” para que sus proantocianidinas difundan fácilmente en las etapas posteriores, cuando el etanol ya esté presente en el medio (maceración fermentativa). Esto es importante que sea tenido en cuenta ya que esta técnica se utiliza normalmente para favorecer la extracción de taninos de las pieles frente a las de las semillas.

En las vinificaciones control y EM, el G_{Pm}, el %G y el %E_{gcat} evolucionan de forma similar; parece que la acción del enzima facilita una mayor extracción de proantocianidinas, tanto de la piel como de las semillas, pero sin cambiar su proporción o composición en comparación con la vinificación control. Ambos mostos experimentaron un incremento en los valores de G_{Pm} y el %E_{gcat} durante la primera parte de la fermentación, lo cual es indicativo de una fácil extracción de las proantocianidinas del hollejo al comienzo de fermentación, mientras que después se observó un descenso en la extracción de estos compuestos en la segunda parte de la maceración fermentativa, coincidiendo con un incremento en la extracción de proantocianidinas procedentes de las semillas.

La vinificación con nieve carbónica se comportó de manera diferente a las demás. Su concentración final de proantocianidinas totales fue más baja que para la vinificación MPF, pero el G_{Pm} de estas se incrementó a lo largo de la maceración fermentativa, mientras que el %G y el %E_{gcat} fueron similares a aquellos valores presentados por las proantocianidinas presentes en la vinificación control. Estos resultados indican que el uso de la nieve carbónica claramente facilita la extracción de proantocianidinas de alto peso molecular del hollejo por degradación de las estructuras celulares de la piel de la uva. El trabajo de Koyama et al. (2007) también constata que las procianidinas de bajo grado medio de polimerización del hollejo son más rápidamente extraídas que las de mayor grado medio de polimerización, de ahí

que el grado de polimerización incrementa con el avance del proceso de maceración si el tipo de vinificación lo favorece. Aunque además del tamaño, las propiedades químicas de las proantocianidinas, tales como la hidrofobicidad y el número de grupos hidroxilo presentes en las mismas, también pueden influir en su cinética de extracción. Así, las proantocianidinas de mayor hidrofobicidad y mayor número de grupos hidroxilo, indicativo de un mayor GPM, podrían estar más fuertemente enlazadas a otros compuestos en la uva, siendo liberadas en el mosto-vino más tarde con la ayuda del incremento de etanol.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Gil-Muñoz et al. (2010), la nieve carbónica parece tener un efecto significativo en variedades con hollejos que presenten paredes celulares rígidas, como es el caso de Monastrell (Ortega-Regules et al., 2006). Sacchi et al. (2005) también indicaron que la congelación podría romper las células de las semillas que contienen taninos, incrementando el contenido de estas proantocianidinas en el vino, pero nosotros no hemos observado este efecto.

Por tanto, los resultados obtenidos indican que la maceración prefermentativa en frío tiene un comportamiento distinto al esperado, ya que produce los vinos con el mayor contenido de proantocianidinas de las semillas. Los enzimas de maceración también promueven una alta extracción de proantocianidinas pero sin cambios importantes en su composición respecto a la vinificación control, indicando que quizás el enzima promueve tanto la extracción de proantocianidinas de la piel como de las semillas. Sólo la nieve carbónica parece favorecer la extracción de proantocianidinas del hollejo de elevado peso molecular.

Varios estudios han destacado que diferencias en la cantidad y composición de las proantocianidinas del vino podrían conducir a diferencias en las características sensoriales de éstos y que un incremento en el contenido de proantocianidinas derivadas del hollejo en el vino mejora la astringencia del mismo. Siendo así, el uso de la nieve carbónica podría ser considerado como una técnica interesante para obtener vinos con baja astringencia, mientras que la técnica de maceración prefermentativa podría conducir a vinos con alto nivel de astringencia, aunque podrían ser apropiados para vinos destinados a envejecimiento.

V.1.2.2 COMPROBACIÓN DEL EFECTO DE LOS ENZIMAS DE MACERACIÓN SOBRE LA EXTRACCIÓN DE PROANTOCIANIDINAS DE SEMILLAS

Para comprobar si realmente los enzimas de maceración tienen capacidad para actuar sobre las paredes celulares de las células de las semillas, liberando así las proantocianidinas presentes en las mismas, se llevó a cabo un ensayo con semillas de uva de las variedades Monastrell y Cabernet Sauvignon, tanto en un medio acuoso como en un medio hidroalcohólico y en ausencia y en presencia de diferentes enzimas puras y el enzima comercial utilizado en el proceso de elaboración del vino, analizando la presencia de proantocianidinas en los distintos medios.

Las tablas V.1 y V.2 muestran los resultados de la concentración y composición de proantocianidinas de las variedades Monastrell y Cabernet Sauvignon en ambos medios.

Los resultados para la variedad Monastrell, tanto en medio acuoso o hidroalcohólico (Tabla V.1) confirman la presencia de cantidades significativas de proantocianidinas después del proceso de maceración en la solución modelo, incluso en el caso de la solución control sin enzima o alcohol (solución acuosa), aunque, en presencia de etanol, la extracción de proantocianidinas de las semillas se incrementó en un 43% comparado con la solución acuosa control. El etanol puede facilitar la eliminación de los lípidos que recubren la semilla (Glories y Saucier, 2000), promoviendo además, una mayor degradación de la cutícula y de las paredes celulares de las células donde se encuentran presentes las proantocianidinas y favoreciendo la difusión de las mismas al medio.

Respecto a la aplicación de los diferentes enzimas en medio acuoso, se observa que la celulasa y la poligaracturonasa y el enzima comercial incrementan la extracción de proantocianidinas, mientras que el uso de xilanasas y pectínmetilesterasa no incrementaron los valores de proantocianidinas de forma significativa con respecto a la solución testigo sin enzima. La poligalacturonasa consigue triplicar el contenido de proantocianidinas y la celulasa duplicarlo, mientras que el complejo enzimático

comercial (que posee todas estas actividades) consigue cuadruplicar en el medio los valores de estos compuestos.

Tabla V.1 Concentración y composición de proantocianidinas en semillas de Monastrell en solución acuosa e hidroalcohólica tras la adición de diferentes enzimas.

	Testigo	Celulasa	PG	Xilanasa	PE	EV
	Solución acuosa					
PAs (mg/L)	1126 a	2402 b	3345 c	1535 ab	1168 a	4622 d
GPm	8,9 a	9,5 ab	9,1 a	10,3 c	9,9 bc	9,0 a
%Galoilación	9,0 a	10,6 b	14,7 c	10,6 b	7,9 a	15,4 c
	Solución hidroalcohólica					
PAs (mg/L)	1616 a	4851 c	4501 c	2444 b	4603 c	7727 d
GPm	9,1 cd	8,9 c	9,2 cd	9,3 d	7,7 a	8,3 b
%Galoilación	10,2 a	13,1 b	15,4 c	10,8 a	10,3 a	15,7 c

Abreviaciones. PG, poligalacturonasa; PE, pectínmetilesterasa; EV, enozym vintage; PAs, proantocianidinas; GPm, grado medio de polimerización. Letras diferentes en una misma fila y para cada tipo de solución indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

El incremento del contenido de proantocianidinas en el medio con la actuación de celulasa y poligalacturonasa y del enzima comercial es un resultado esperado ya que estos enzimas pueden conseguir una mayor degradación de la pared celular de las semillas, ya que ésta pared esta compuesta por hemicelulosa, celulosa y pectinas.

Glories et al. (2003) ya observaron un efecto positivo de la poligalacturonasa y celulasa en la degradación del hollejo de la uva y la liberación de proantocianidinas. Estos autores describieron como la actividad poligalacturonasa degrada la laminilla media y la pared primaria, favoreciendo la liberación de proantocianidinas principalmente granulados del interior de la vacuola, mientras que la celulasa degrada las fibras de celulosa, permitiendo la liberación de proantocianidinas de la pared. Un efecto similar debe ocurrir en las estructuras de las semillas.

La pectínmetilesterasa no incrementa la extracción de proantocianidinas de semillas. Este efecto podría ser explicado por el tipo de ruptura que este enzima cataliza. Este enzima lleva a cabo la desesterificación de la pectina, lo cual favorece la actuación secuencial de otros enzimas, sin embargo, cuando la pectínmetilesterasa se aplica sola en la solución parece no tener efecto. Lo mismo ocurre con xilanasa (uno de los enzimas que degradan la hemicelulosa), la cual, por si sola no tiene capacidad suficiente para degradar las paredes celulares de las semillas.

Con la presencia de alcohol, los enzimas también consiguen una mayor difusión de proantocianidinas al medio, ya que el etanol puede ayudar a la solubilización de los componentes de las paredes celulares (Sun-Waterhouse et al., 2011). En este caso, todas las soluciones enzimáticas, incluyendo la pectínmetilesterasa (la cual no tenía efecto en solución acuosa), incrementa el triple el contenido de proantocianidinas, mientras que con el complejo enzimático el incremento es alrededor de seis veces, indicando que este es más efectivo en la extracción de proantocianidinas que cualquier actividad enzimática individual. Estos resultados sugieren que, para las semillas de Monastrell, la acción del alcohol y los enzimas es sinérgica. La degradación de las capas externas de las semillas por el alcohol facilita el acceso de los enzimas a las diferentes estructuras.

El grado medio de polimerización de las proantocianidinas se incrementa ligeramente con la adición de enzimas, aunque solo se observan diferencias significativas respecto al testigo con los enzimas xilanasa y pectínmetilesterasa. Esto puede ser debido a que estos enzimas actúen solamente sobre las paredes de las células de las semillas, lugar donde se encuentran las proantocianidinas más polimerizadas (Geny et al., 2003), mientras que los otros enzimas pueden también llegar hasta zonas más internas de las células (la laminilla media rica en pectinas) favoreciendo la salida de proantocianidinas menos polimerizadas, viéndose de esta manera compensado el tamaño de las mismas. La presencia de etanol no produce cambios en los valores de GPm, excepto en el caso de la pectínmetilesterasa y el enzima comercial, donde las proantocianidinas presentan un menor GPm.

En el caso del porcentaje de galoilación, este aumenta significativamente en presencia de cualquiera de los enzimas, excepto en el caso de la pectínmetilesterasa en ambos medios y también de xilanasa en medio hidroalcohólico. El complejo enzimático y la poligalacturonasa presentan las proantocianidinas más galoiladas. Geny et al. (2003) encontraron que la proporción de (-)-epicatequina-3-O-galato era mayor en la fracción de las paredes celulares que en la fracción interna de las células de las semillas, por lo que una mayor degradación de dichas paredes por parte de estos enzimas podría favorecer una mayor liberación de proantocianidinas más galoiladas.

Con la presencia de etanol, destaca un incremento importante en las unidades galoiladas de extensión por parte de celulasa y poligalacturonasa.

La Tabla V.2 muestra los resultados obtenidos para semillas de Cabernet Sauvignon. Para las dos soluciones control (en ausencia o en presencia de alcohol) se obtienen valores de proantocinaidinas superiores respecto a los encontrados para Monastrell. Además, en presencia de alcohol ese incremento es del 80% frente al 43% obtenido para Monastrell. Estas diferencias observadas pueden ser debidas a diferentes concentraciones de proantocianidinas en las semillas de ambas variedades y también, posiblemente la existencia de diferencias a nivel estructural entre las semillas de ambas variedades.

Con la aplicación de enzimas, y en ambos medios, el incremento en el contenido de proantocianidinas es significativo solamente con el enzima celulasa y el enzima comercial. En general, los incrementos observados son más bajos cuantitativamente que aquellos obtenidos con semillas de Monastrell.

En el caso del G_{Pm}, este es menor para las proantocianidinas de semillas de Cabernet Sauvignon que para aquellas presentes en semillas de Monastrell. En presencia de los diferentes enzimas y en medio acuoso, el valor de G_{Pm} es mayor con xilanasa y menor con celulasa y poligalacturonasa (ambos comparados con la solución control), pero en presencia de etanol, sólo las proantocianidinas presentes en la solución control están más polimerizadas.

Tabla V.2 Concentración y composición de proantocianidinas en semillas de Cabernet Sauvignon en solución acuosa e hidroalcohólica tras la adición de diferentes enzimas.

	Testigo	Celulasa	PG	Xilanas	PE	EV
Solución acuosa						
PAs (mg/L)	2572 ab	3897 d	2872 bc	2254 a	3135 bcd	3464 cd
GPm	7,0 c	5,5 a	5,9 ab	7,8 d	6,4 bc	6,2 ab
%Galoilación	9,2 c	9,2 c	8,8 bc	6,7 a	8,1 b	9,5 c
Solución hidroalcohólica						
PAs (mg/L)	4659 a	5751 d	5161 bc	4525 a	5452 cd	4883 ab
GPm	8,6 d	5,4 a	8,2 cd	8,0 bcd	7,2 b	7,4 bc
%Galoilación	10,8 a	11,0 ab	11,4 b	11,6 c	10,9 ab	11,0 ab

Abreviaciones. PG, poligalacturonasa; PE, pectínmetilesterasa; EV, enozym vintage; PAs, proantocianidinas; GPm, grado medio de polimerización. Letras diferentes en una misma fila y para cada tipo de solución indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

El porcentaje de galoilación de las proantocianidinas de las semillas de Cabernet Sauvignon es muy similar al de aquellas presentes en Monastrell y este se incrementa solo ligeramente con la presencia de etanol. González-Manzano et al. (2004) también observaron un incremento en el contenido de derivados galoilados con el aumento del porcentaje de etanol en el medio.

Con el uso de enzimas, y en medio acuoso, el porcentaje de galoilación o bien no se ve afectado, como el caso de la celulasa, poligalacturonasa y el enzima comercial, o bien disminuye con pectínmetilesterasa y xilanas. En medio etanólico, este aumenta ligeramente con la aplicación de todos los enzimas, aunque sólo con poligalacturonasa lo hace de forma más significativa.

El diferente comportamiento observado en los enzimas con semillas de Cabernet Sauvignon respecto al obtenido en las semillas de Monastrell en el mismo medio, puede ser indicativo de la existencia de diferencias a nivel estructural y composición entre las semillas de ambas variedades. Estas diferencias ya fueron encontradas por Ortega-Regules et al. (2008) a nivel del hollejo.

Los resultados de este estudio muestran, por tanto, que los enzimas de maceración normalmente usados en el proceso de elaboración del vino para incrementar el color, pueden favorecer la extracción de proantocianidinas de las semillas (y no solamente del hollejo), especialmente aquellos ricos en las actividades celulasa y poligalacturonasa, aunque el efecto será más o menos marcado dependiendo de la variedad de uva.

V.1.2.3 CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS DE VINOS DE MONASTRELL, CABERNET SAUVIGNON Y SYRAH.

En las tablas V.3, V.4, V.5 y V.6 se observan, para vinos elaborados con uvas de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah, las distintas concentraciones y composiciones de las proantocianidinas de los vinos control y de los vinos obtenidos con los distintos tratamientos enológicos aplicados. Los vinos fueron analizados un mes después de finalizar la fermentación maloláctica.

V.1.2.3.1 Concentración y composición de proantocianidinas de los vinos control de las tres variedades

Comparando los tres vinos control (Tabla V.3), el vino de Syrah mostró el contenido más bajo de proantocianidinas, el menor grado medio de polimerización y mayor porcentaje de galoilación.

Los vinos de Monastrell y Cabernet Sauvignon presentan un perfil similar, aunque el vino de Cabernet Sauvignon mostró valores más altos de proantocianidinas, GPm y porcentaje de galoilación que el vino de Monastrell.

Adams y Scholz (2007), utilizando el método de la precipitación proteica para la cuantificación de proantocianidinas, encontraron valores más bajos de proantocianidinas para vinos de Syrah (484 mg/L). Romero-Cascales (2005), utilizando también el método de precipitación proteica, obtuvo valores de taninos muy similares

a los actuales en los vinos de Cabernet Sauvignon y Syrah y valores más bajos para Monastrell. No se puede olvidar que el contenido en proantocianidinas puede cambiar notablemente año a año. Esto lo puso de manifiesto Cosme et al. (2009) al encontrar concentraciones de proantocianidinas comprendidas entre 289-776 mg/L para los vinos de Cabernet Sauvignon a lo largo de tres años.

Tabla V.3 Concentración y composición de proantocianidinas en vinos de Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah.

	Monastrell	Cabernet S.	Syrah
Taninos (mg/L)	834,9 b	845,1 c	591,6 a
Taninos (mg/g)	25,6 b	25,9 b	17,5 a
GPm	6,2 b	6,6 c	3,0 a
%Galoilación	2,6 a	3,6 b	5,0 c
%Cat-term	10,4 b	9,8 a	16,5 c
%Ecat-term	4,3 a	4,8 a	16,1 b
%Ecatg-term	0,2 a	0,5 b	0,6 b
%Cat-ext	2,0 a	2,2 b	3,0 c
%Ecat-ext	60,5 c	43,9 a	46,9 b
%Egcat-ext	20,2 b	35,8 c	12,5 a
%Ecatg-ext	2,4 a	3,1 b	4,5 c

Abreviaciones. GPm, grado medio de polimerización; Cat-term, (+)-catequina terminal; Ecat-term, (-)-epicatequina terminal; Cat-ext, (+)-catequina de extensión; Ecat-ext, (-)-epicatequina de extensión; Egcat-ext, (-)-epigalocatequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato de extensión. Letras diferentes en una misma fila indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Como se ha comentado anteriormente, la (-)-epigalocatequina de extensión detectada en los vinos sólo puede proceder de los hollejos. Los valores más altos del porcentaje de esta subunidad, con respecto al total de subunidades, se han encontrado en los vinos de Cabernet Sauvignon y los más bajos en los vinos de Syrah. Con respecto a las unidades terminales, (+)-catequina fue la predominante en los vinos de Monastrell y Cabernet Sauvignon, mientras que los vinos de Syrah presentaron porcentajes similares de (+)-catequina y (-)-epicatequina. En cuanto a las unidades de extensión, la (-)-epicatequina fue la más importante en los tres vinos.

Aplicando el método propuesto por Peyrot de Gachons y Kennedy (2003) a nuestros resultados, el porcentaje de proantocianidinas de hollejos es respectivamente del 73,4 para vinos de Monastrell, 72,4 para Cabernet Sauvignon y 54,3 para vinos Syrah. Comparando con los resultados de Peyrot des Gachons y Kennedy (2003), estos autores encontraron valores de proantocianidinas de hollejos del 56,6% en vinos de Pinot Noir, después de 8 días de fermentación, mientras que Cerpa-Calderon y Kennedy (2008) en el día 9 de fermentación encontraron que el 73% de los taninos en vinos de Merlot provenía de los hollejos. Sampaio et al. (2009) encontraron una extracción de taninos del hollejo y semillas respectivamente del 41,7 y 57,6% en vinos terminados de Pinot Noir elaborados a nivel industrial. Estos resultados mostraron que las proantocianidinas de los hollejos proporcionan, en general, más del 50% de las proantocianidinas presentes en el vino.

Otro dato que puede ser interesante sería el cálculo del porcentaje de extracción de las proantocianidinas del hollejo y las semillas a partir de los valores teóricos máximos que, en función de los valores medidos en la uva, podrían haber sido encontrados en el vino. Teniendo en cuenta que el rendimiento en vino en nuestra prensa fue del 0,65 L/kg, la concentración potencial de proantocianidinas de hollejos y semillas (en función de la concentración medida en las uvas) será respectivamente de 1109 y 2404 mg/L para el vino de Monastrell, 1027 y 3239 mg/L para el vino de Cabernet Sauvignon y 434 y 3095 mg/L para el vino de Syrah. Teniendo en cuenta las cantidades encontradas realmente en los vinos control, esto supuso un porcentaje de extracción de proantocianidinas de hollejos y semillas respectivamente del 55,3 y 9,2% para Monastrell, 59,6 y 7,18% para Cabernet Sauvignon y 74,1 y 8,7% para Syrah. Cerpa-Calderon y Kennedy (2008), también observaron que la cantidad de taninos extraídos durante la fermentación era una pequeña fracción comparada con la encontrada en la uva en el momento de vendimia, aunque ellos encontraron porcentajes de proantocianidinas de hollejos más bajos y de semillas más altos que los nuestros, respecto a la máxima extracción teórica. La comparación entre variedades indica que hay muy pocas diferencias entre las tres variedades en cuanto a la cantidad de taninos que se extraen de las semillas y, sin embargo, hay diferencias notables en

cuanto a la extracción de proantocianidinas de los hollejos. Los valores de Cabernet Sauvignon y Monastrell son similares pero Syrah mostró mucha mayor difusión de sus proantocianidinas del hollejo al vino.

V.1.2.3.2 Efecto de distintos tratamientos enológicos sobre las proantocianidinas de los vinos

Los resultados del efecto de las distintas técnicas enológicas para los vinos de Monastrell se muestran en la Tabla V.4.

Cuando finalizó la elaboración del vino de Monastrell, y comparando los tres tratamientos con el vino testigo, se puede observar un ligero aumento, aunque no estadísticamente significativo, en el contenido de proantocianidinas para la vinificación donde se usó el enzima de maceración o la nieve carbónica, siendo el incremento estadísticamente significativo en el caso del vino con maceración prefermentativa.

Tabla V.4 Concentración y composición de proantocianidinas en los vinos de Monastrell y sus distintos tratamientos.

	VC	VMPF	VEM	VNC
Taninos (mg/L)	834,9 a	1111,4 b	926,3 a	926,5 a
Taninos (mg/g)	25,6 a	35,9 b	27,8 a	26,8 a
GPm	6,2 a	6,4 ab	6,8 bc	6,9 c
%Galoilación	2,6 b	3,3 c	2,6 b	2,0 a
%Cat-term	10,4 b	9,7 a	9,9 ab	9,8 a
%Ecat-term	4,3 b	3,6 a	3,5 a	3,7 a
%Ecatg-term	0,2 a	0,5 b	0,2 a	0,2 a
%Cat-ext	2,0 a	2,4 b	1,8 a	1,8 a
%Ecat-ext	60,5 a	60,8 a	61,2 a	62,5 b
%Egcat-ext	20,2 a	20,2 a	21,0 a	20,2 a
%Ecatg-ext	2,4 b	2,8 c	2,3 b	1,8 a

Abreviaciones. VC, vinificación control; VEM, vinificación con un enzima de maceración; VMPF, vinificación con maceración prefermentativa en frío; VNC, vinificación con nieve carbónica; GPm, grado medio de polimerización; Cat-term, (+)-catequina terminal; Ecat-term, (-)-epicatequina terminal; Cat-ext, (+)-catequina de extensión; Ecat-ext, (-)-epicatequina de extensión; Egcat-ext, (-)-epigalocatequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato de extensión. Letras diferentes en una misma fila indica diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

Lo mismo observaron Álvarez et al. (2005), que también encontraron un efecto positivo de la maceración prefermentativa en la concentración y polimerización de proantocianidinas y el color y estabilidad en vinos de Monastrell. Estos autores observaron que la concentración polifenólica no estaba directamente relacionada con la duración de los tratamientos, ya que los resultados no mejoraban al incrementar el tiempo de maceración prefermentativa.

En los vinos de Cabernet Sauvignon (Tabla V.5), el contenido de proantocianidinas es superior con la aplicación de la maceración prefermentativa y el enzima comercial, consiguiendo un incremento del 13,2 y 11% respectivamente con respecto al vino control, mientras que el tratamiento de nieve carbónica presenta valores más parecidos al testigo.

Tabla V.5 Concentración y composición de proantocianidinas en el vino de Cabernet Sauvignon y sus distintos tratamientos.

	VT	VMPF	VE	VCN
Taninos (mg/L)	845,1 a	957,0 b	937,6 b	819,6 a
Taninos (mg/g)	25,9 a	28,2 b	28,2 b	25,0 a
GPm	6,6 c	5,2 a	6,1 b	5,5 a
%Galoilación	3,6 a	4,5 c	4,2 b	4,1 b
%Cat-term	9,8 a	11,6 b	10,2 a	11,6 b
%Ecat-term	4,8 a	6,8 d	5,6 b	6,2 c
%Ecatg-term	0,5 a	0,7 c	0,6 b	0,5 a
%Cat-ext	2,2 a	2,7 c	2,5 b	2,7 c
%Ecat-ext	43,9 a	48,5 bc	47,0 b	49,5 c
%Egcat-ext	35,8 c	25,9 a	30,6 b	25,9 a
%Ecatg-ext	3,1 a	3,8 c	3,6 b	3,6 b

Abreviaciones. VC, vinificación control; VEM, vinificación con un enzima de maceración; VMPF, vinificación con maceración prefermentativa en frío; VCN, vinificación con nieve carbónica; GPm, grado medio de polimerización; Cat-term, (+)-catequina terminal; Ecat-term, (-)-epicatequina terminal; Cat-ext, (+)-catequina de extensión; Ecat-ext, (-)-epicatequina de extensión; Egcat-ext, (-)-epigalocatequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato de extensión. Letras diferentes en una misma fila indica diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

En los vinos de Syrah se observan pequeñas diferencias (Tabla V.6). El tratamiento de maceración prefermentativa en frío incrementó el contenido de

proantocianidinas, mientras que con el enzima y la nieve carbónica los valores fueron inferiores al vino testigo.

Gil-Muñoz et al. (2009) no observaron un aumento en el contenido de proantocianidinas en vinos de Syrah con la aplicación de diferentes tratamientos a una temperatura prefermentativa baja. Como indicaron los datos sobre el porcentaje de extracción de las proantocianidinas del hollejo al vino, la variedad Syrah no parece tener dificultades en extraer sus proantocianidinas, por lo que técnicas enológicas como los enzimas de maceración o la nieve carbónica, encaminadas a favorecer la degradación de paredes celulares rígidas, no tienen efecto en los vinos de esta variedad.

Tabla V.6 Concentración y composición de proantocianidinas en el vino de Syrah y sus distintos tratamientos.

	VT	VMPF	VE	VCN
Taninos (mg/L)	591,6 bc	615,7 c	467,1 ab	445,8 a
Taninos (mg/g)	17,5 b	19,1 b	13,5 a	13,5 a
GPm	3,0 b	2,6 a	3,0 b	2,6 a
%Galoilación	5,0 a	5,6 b	5,5 ab	5,3 ab
%Cat-term	16,5 a	17,2 a	16,4 a	18,4 a
%Ecat-term	16,1 a	20,3 b	16,1 a	20,1 b
%Ecatg-term	0,6 a	1,0 b	0,7 a	0,7 a
%Cat-ext	3,0 a	3,4 b	2,9 a	2,9 a
%Ecat-ext	46,9 b	43,6 ab	45,4 b	39,9 a
%Egcat-ext	12,5 b	10,0 a	13,7 b	13,5 b
%Ecatg-ext	4,5 a	4,6 a	4,8 a	4,6 a

Abreviaciones. VC, vinificación control; VEM, vinificación con un enzima de maceración; VMPF, vinificación con maceración prefermentativa en frío; VCN, vinificación con nieve carbónica; GPm, grado medio de polimerización; Cat-term, (+)-catequina terminal; Ecat-term, (-)-epicatequina terminal; Cat-ext, (+)-catequina de extensión; Ecat-ext, (-)-epicatequina de extensión; Egcat-ext, (-)-epigalocatequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epicatequinagalato de extensión. Letras diferentes en una misma fila indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

En cuanto a la composición de las proantocinidinas, los diferentes tratamientos no modifican los porcentajes de (-)-epigalocatequina en los vinos Monastrell, pero si disminuyen, con respecto al control, para los de Cabernet Sauvignon y Syrah. Se

encontraron pequeñas diferencias en cuanto al G_{Pm} para los vinos de Monastrell y Syrah (sólo se observó un incremento en los vinos de Monastrell que fueron tratados con nieve carbónica). Para el caso de Cabernet Sauvignon, este mismo parámetro disminuye en todos los tratamientos respecto al vino control.

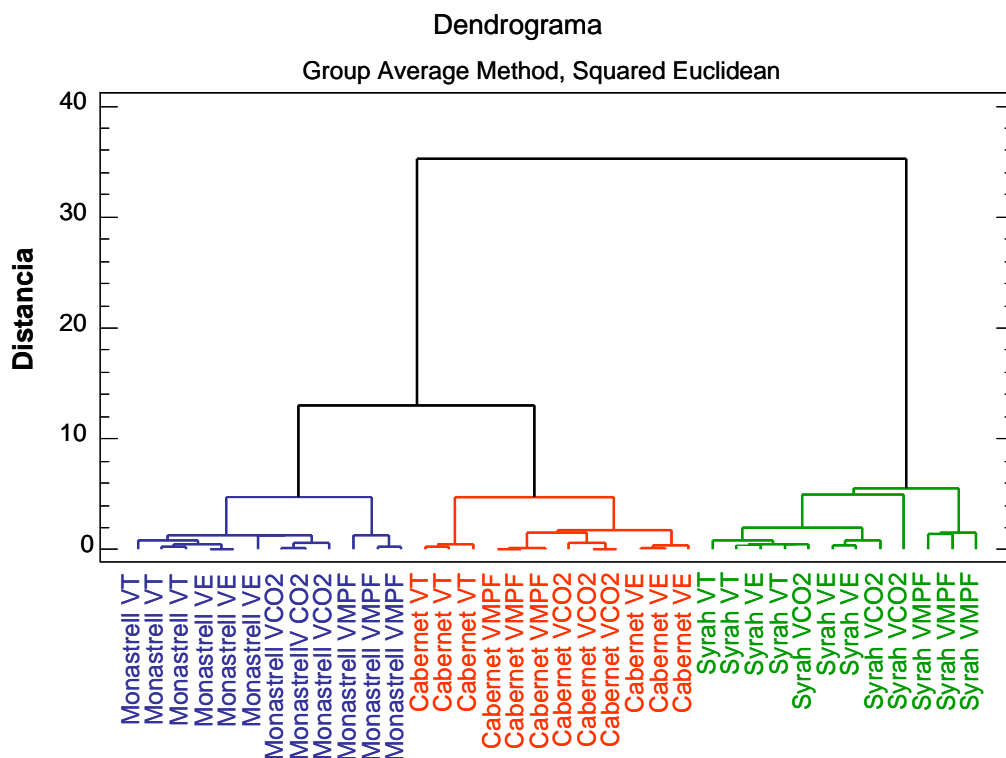
El porcentaje de galoilación se incrementa en todos los vinos tratados con nieve carbónica (aunque este incremento no fue significativo en vinos de Syrah). Este resultado llama la atención ya que se esperaría que la aplicación de técnicas de bajas temperaturas y las enzimas de maceración, las cuales deberían ayudar a la degradación física de las paredes celulares del hollejo, incrementaran la cantidad de proantocianidinas derivadas del hollejo en estos vinos, pero nuestros resultados indican que no es esto lo que sucede. El que el porcentaje de (-)-epigallocatequina no se incremente, unido a un descenso o estabilización del G_{Pm} y a un incremento en los valores del porcentaje de galoilación, es indicativo de que el incremento de las proantocianidinas es debido principalmente a un incremento de aquellas procedentes de las semillas. La justificación de estos fenómenos observados ya ha sido comentada en el punto anterior.

Estos resultados también muestran que la aplicación del enzima tiene solo un efecto limitado sobre la concentración y composición de proantocianidinas a diferencia de los resultados de Ducasse et al. (2010), quienes observaron mayores contenidos de proantocianidinas en vinos de Merlot tratados con la aplicación de enzimas, un aumento en el porcentaje de galoilación y un alto porcentaje de (-)-epigallocatequina, lo que indica que este tratamiento favoreció en estos vinos la extracción de proantocianidinas de mayor peso molecular, como consecuencia de una mayor degradación enzimática de la pared celular de la piel.

Uno de los análisis multivariantes que normalmente son utilizados para determinar si las diferentes variables medidas en los vinos pueden proporcionar una separación entre muestras es el análisis cluster (Figura V.1). Este análisis tiene como objetivo buscar grupos similares de muestras sin conocimiento alguno de su procedencia, variedad o tratamiento enológico utilizado y fue utilizado con el fin de determinar si existía algún agrupamiento de las muestras en función de la técnica

enológica utilizada, utilizando como variables, los datos de la composición de las proantocianidinas de los distintos vinos. El análisis indica que las muestras de vino se agrupan en función del tipo de variedad de uva y no por la técnica enológica aplicada. Hay dos grupos claramente diferenciados, por un lado tenemos los vinos de Monastrell y Cabernet Sauvignon, ambos muy similares y por otro lado tenemos un cluster que agrupa a los vinos de Syrah. Estos resultados fueron muy similares a los encontrados por Harbertson et al. (2008), quienes estudiaron las proantocianidinas de vinos comerciales (elaborados bajo diferentes condiciones enológicas) a partir de cinco variedades de uva, de tres países y tres continentes. Estos autores observaron que los vinos elaborados a partir de diferentes variedades de uva podrían ser diferenciados unos de otros en función a la concentración media de proantocianidinas, aunque a veces hubiera cierta superposición.

Figura V.1. Análisis cluster de los distintos tratamientos y variedades relacionadas con el contenido de proantocianidinas (VT: vinificación testigo, VE: vinificación con un enzima de maceración, VMPPF: vinificación con maceración prefermentativa en frío, VCO2: vinificación con nieve carbónica).



Por tanto, los resultados obtenidos muestran que los diferentes tratamientos solo conducen a pequeñas diferencias en el perfil proantocianidínico cuantitativo y cualitativo en los vinos, siendo estas diferencias mayores con la aplicación de la maceración prefermentativa a baja temperatura. Los resultados también indican que cuando se observa un incremento en la concentración de proantocianidinas es principalmente debido a un incremento de aquellas procedentes de semillas incluso con el tratamiento de maceración prefermentativa en frío, el cual tiene lugar en ausencia de etanol, sugiriendo que el etanol no es fundamental para la extracción de proantocianidinas de semilla.

V.2 EFECTO DEL TIEMPO DE MACERACIÓN EN EL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN EL VINO DE LAS VARIEDADES MONASTRELL, CABERNET SAUVIGON Y SYRAH

V.2.1 INTRODUCCIÓN

Es en el periodo de maceración de los hollejos y semillas con el mosto-vino cuando los compuestos fenólicos de la uva, entre ellos las proantocianidinas, van a difundir al vino, aunque sólo una parte del total de los fenoles de la uva serán extraídos de las pieles, las semillas y la pulpa (Singleton y Draper, 1964; Kantz y Singleton, 1991; Boulton, 1995; Klenar et al., 2004).

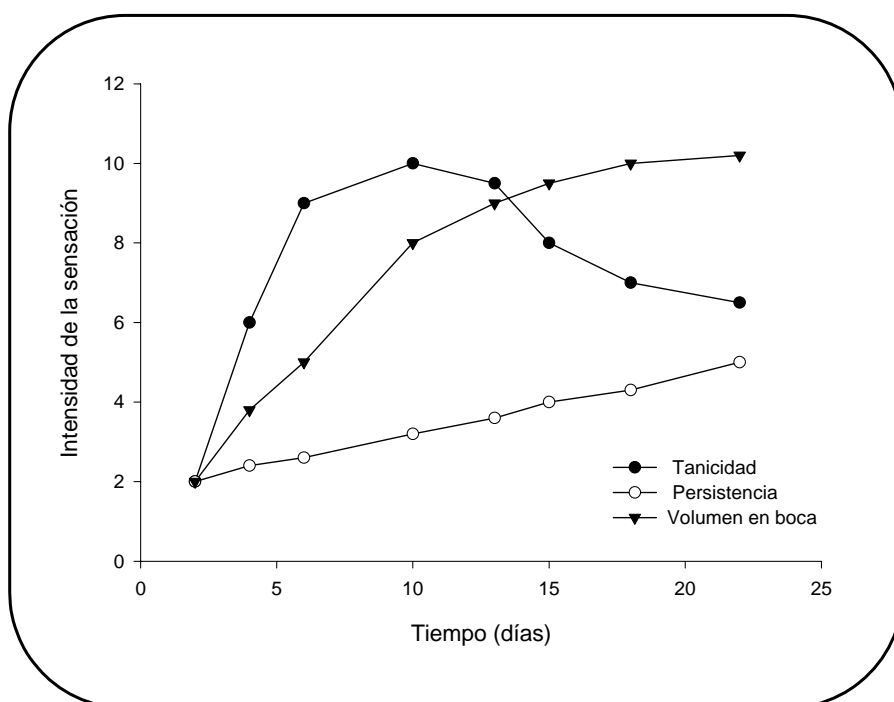
La extracción de los taninos puede ser descrita como una difusión (Boulton, 1995). Esta difusión incluye los flavan-3-oles, sus oligómeros de 2 a 8 unidades, polímeros de mayor número de unidades y también algunas formas galoiladas de ellos. Los taninos de los hollejos y semillas poseen diferentes cinéticas de extracción. La mayor parte de los taninos de los hollejos, debido a su localización, comienzan a solubilizarse conjuntamente con los antocianos, si bien su extracción se prolonga mucho más en el tiempo. Por el contrario, los taninos de las semillas presentan una difusión más lenta, la cual se acelera hasta mitad de la fermentación, cuando el alcohol facilita la disolución de la cutícula. Por tanto, esta diferente dinámica de extracción de los flavanoles y proantocianidinas desde las semillas al mosto-vino es un aspecto importante al considerar la extensión del tiempo de maceración (Singleton y Draper, 1964; Boulton, 1995). Además, los trabajos de Fournand et al. (2006) indican que también el tiempo de maceración puede influir sobre el tipo de tanino extraído, ya que determinaron que la extractibilidad de los taninos parece ser dependiente del tamaño de las moléculas, siendo las de más alto grado de polimerización más difícilmente extraídas. Por supuesto no hay que olvidar que otros factores como la temperatura durante la fermentación, la renovación del mosto-vino que impregna las

partes sólidas y la adición de SO_2 van a influir positivamente en la acumulación de estos compuestos en el vino (Oszmanski et al., 1986).

Otro hecho que se ha observado es que la presencia de antocianos en un vino tinto es muy importante para la extracción y retención en solución en grandes cantidades de taninos oligómeros y polímeros (Kantz y Singleton, 1991). Comparando con las uvas blancas que podrían tener concentraciones comparables en los hollejos y semillas de procianidinas, parece ser que se extraen mayores cantidades de polifenoles polímeros en vinos tintos (Kantz y Singleton, 1991; Singleton y Trouslade, 1992) y esto es debido a la formación de aductos antociano-tanino.

Tradicionalmente, la maceración corta es empleada para obtener vinos jóvenes, de consumo rápido, ya que con unos pocos días de maceración se consigue una correcta extracción del color y de los aromas afrutados y se evita obtener vinos muy tánicos y astringentes, ya que es esperable menos cantidad de taninos de las semillas (Gil-Muñoz et al., 1999; Gómez-Plaza et al., 2001; Zamora, 2003; Llaudy et al., 2008) (Figura V.2).

Figura V.2 Influencia del tiempo de maceración en las sensaciones tánicas de los vinos (Zamora, 2003).



El tiempo de maceración se alargará en la elaboración de vinos que experimentarán un proceso de envejecimiento, para obtener la estructura necesaria y poder garantizar la estabilidad del color (Auw et al., 1996). Estos vinos suelen pasar un tiempo de afinamiento en botella, por lo que con el aumento del tiempo de maceración la astringencia no tiene por qué volverse excesiva e incluso puede disminuir después de este periodo (Scudamore-Smith et al., 1990; Sims y Bates, 1994).

En este estudio se pretende poner realmente de manifiesto como es la dinámica de extracción de taninos desde el hollejo y las semillas durante 20 días de maceración, si esta dinámica es diferente dependiendo de la variedad de uva y como es la composición tánica de los vinos que resultan de elaboraciones con 5, 10 o 20 días de maceración fermentativa.

V.2.2 RESULTADOS

V.2.2.1 EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROANTOCIANIDINAS DURANTE LA MACERACIÓN FERMENTATIVA

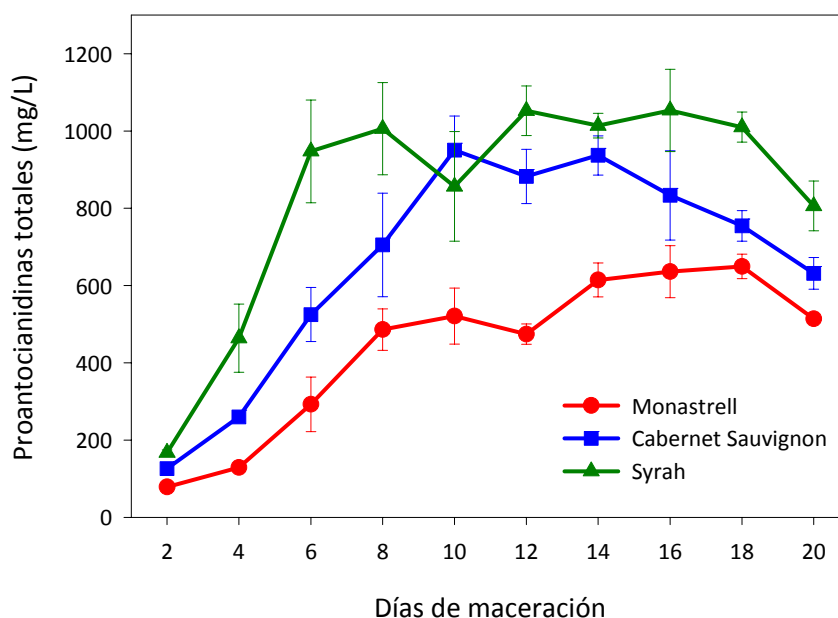
En los gráficos V.5-V.10 se puede observar la evolución de proantocianidinas totales, proantocianidinas procedentes del hollejo y de las semillas, así como la composición de las mismas durante 20 días de maceración fermentativa de uvas Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah del año 2010. Las muestras fueron analizadas cada dos días.

V.2.2.1.1 Concentración de las proantocianidinas

En general, la cinética de extracción de las proantocianidinas totales de la uva (Gráfico V.5) mostró una extracción rápida durante los primeros días de maceración, seguida de una estabilización o ligera extracción (como en el caso de la variedad Monastrell), observándose un descenso hacia el final del proceso.

Es conocido que la concentración de proantocianidinas se incrementa durante el proceso de maceración fermentativa, y que estos compuestos siguen extrayéndose después que el contenido de antocianos en el mosto-vino haya alcanzado el máximo valor y además, altos niveles de proantocianidinas pueden estabilizar los antocianos y el color del vino (Gómez-Plaza et al., 2001). El incremento en la extracción de proantocianidinas también puede conducir a una mayor formación de pigmentos poliméricos (Sacchi et al., 2005).

Gráfico V.5 Evolución de la concentración de proantocianidinas totales (mg/L) durante el proceso de maceración.



A los dos días de maceración, no se observaron diferencias en el contenido de proantocianidinas entre los mostos-vinos de las tres variedades, aunque estas fueron incrementándose con el aumento del tiempo de maceración, debido a la diferente velocidad de difusión de las proantocianidinas según la variedad. Esta velocidad de difusión fue mayor para las proantocianidinas de Syrah, seguidas de aquellas de Cabernet Sauvignon y siendo mucho menor para aquellas de Monastrell.

Para las tres variedades estudiadas, la concentración más alta de proantocianidinas fue alcanzada a los 10 días de maceración en el vino de Cabernet Sauvignon (950 mg/L), en el día 12 por el vino de Syrah (1053 mg/L) y en el día 18 en el vino de Monastrell (649 mg/L). Después de la máxima extracción, los valores de proantocianidinas se mantuvieron estables para los vinos de Cabernet Sauvignon y Syrah, aunque cerca del final del proceso de maceración la concentración de estos compuestos disminuyó ligeramente.

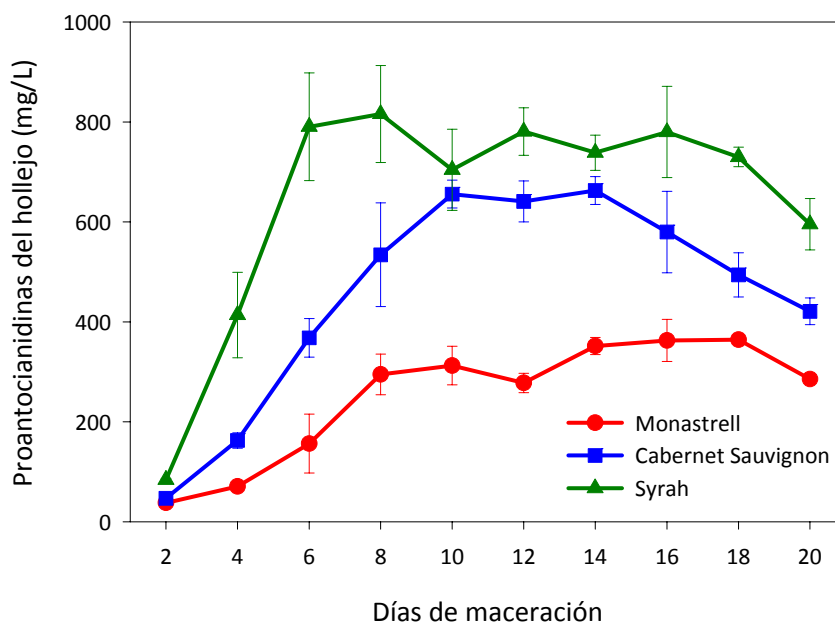
Durante todo el proceso de contacto de las partes sólidas de la uva con el mosto-vino, el vino de Syrah presentó el mayor contenido de proantocianidinas totales, aunque las uvas de Syrah presentaron el más bajo contenido de proantocianidinas del hollejo y un contenido similar de proantocianidinas de las semillas al de las otras variedades. Las uvas de la variedad Monastrell dieron vinos con el más bajo contenido de proantocianidinas, mientras que las de Cabernet Sauvignon produjeron vinos con valores intermedios de estos compuestos. Romero-Cascales et al. (2005) también demostraron en su estudio, que las uvas de Syrah con un contenido más bajo en proantocianidinas del hollejo que las uvas de Monastrell y un similar contenido en proantocianidinas de las semillas, dieron un vino con un contenido de proantocianidinas totales similar al vino de Monastrell. Estos autores concluyeron que el contenido de proantocianidinas presentes en un vino no se correlacionaba con el contenido de estos compuestos en la uva pero si que lo hacía con la extractabilidad fenólica, parámetro que parece estar estrechamente relacionado con la diferente composición de las paredes celulares en las diferentes variedades (Ortega-Regules et al., 2006).

La cantidad de proantocianidinas presentes en los vinos solo son una parte de las proantocianidinas presentes en la uva y aunque esta cantidad se incrementa en el vino con el tiempo de maceración, también parece depender bastante de la variedad que se trate, ya que la uva de Cabernet Sauvignon, la cual presentaba una mayor cantidad de proantocianidinas, no dio el vino con mayor concentración de estos compuestos. Otros autores también encontraron contenidos de proantocianidinas en el hollejo y semillas de la uva, antes del proceso de elaboración, mucho más altas que

los niveles de las mismas encontrados en el vino (Adams et al., 2008). Parece ser que la extracción de taninos puede ser muy variable en función de la variedad y que las medidas del contenido de taninos totales en uva, en ocasiones, no podrían ser útiles para predecir el contenido de taninos que puede ser esperado en el vino, lo cual ratifica los resultados obtenidos en el capítulo anterior y aquellos observados por Adam y Scholz (2009).

Teniendo en cuenta los valores de la composición de las proantocianidinas medidos en las uvas de partida y siguiendo el método descrito por Peyrot des Gayons y Kennedy (2003), fue posible calcular la contribución del hollejo y de las semillas en la composición proantocianidínica del mosto-vino. Así, la extracción de proantocianidinas del hollejo durante la maceración también presentó una cinética de extracción muy diferente para las tres variedades (Gráfico V.6), pero bastante similar al obtenido con las proantocianidinas totales.

Gráfico V.6 Evolución de la concentración de proantocianidinas del hollejo (mg/L) durante el proceso de maceración.



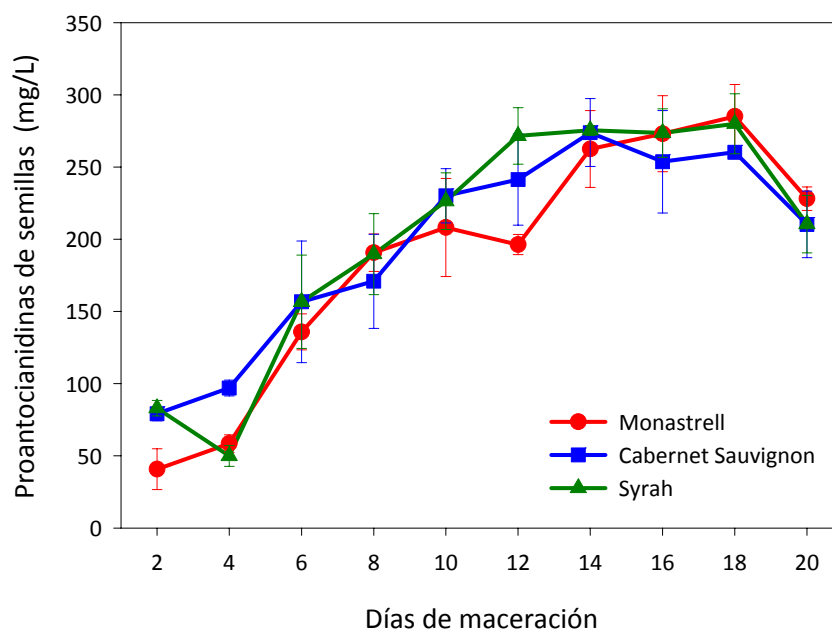
Monagas et al. (2003) también indicaron que las proantocianidinas del vino tenían un perfil más similar a las proantocianidinas del hollejo que a aquellas de las semillas. En los vinos de Syrah, la extracción de proantocianidinas del hollejo alcanzó su valor máximo a los 8 de maceración, y en los vinos de Cabernet Sauvignon en el día 10. Después, en los vinos de ambas variedades se produjo una estabilidad en la concentración de estos compuestos, seguido de un ligero descenso hasta el momento del descube.

El tiempo de estabilización de los valores de proantocianidinas del hollejo es mayor para Syrah que para Cabernet Sauvignon. Los trabajos de Cerpa-Calderón y Kennedy (2008) con uvas de Merlot encontraron la máxima proporción de proantocianidinas extraídas del hollejo sobre el día 9 de maceración, seguida de una estabilización en la concentración de estos compuestos hasta el día 18, periodo durante el cual no hay más extracción. Estos autores sugirieron que esto podría reflejar una adsorción continua de las proantocianidinas extraídas con material de pared celular presente en suspensión y con células de levaduras. Además, también podría existir una saturación de los lugares de enlace disponibles por este material con las proantocianidinas en solución, tal que el ratio de adsorción de las proantocianidinas permaneciera estático en un cierto punto durante la fermentación. Recientemente, ha sido demostrada la existencia de estas interacciones entre el material de pared celular de la uva y las proantocianidinas, tanto del hollejo, como de las semillas (Bindon et al., 2010a,b).

En el caso de los vinos de Monastrell, la extracción de las proantocianidinas del hollejo continuó hasta el día 18 de maceración, justo dos días antes del descube, siendo más lenta y en cantidad inferior respecto a las otras variedades. La menor extracción en esta variedad puede estar relacionada con la mayor cantidad de material de paredes celulares y el mayor grosor de las mismas encontrados por Ortega-Regules et al. (2008) en comparación con Syrah y Cabernet Sauvignon, ya que esto podría actuar como una mayor barrera para la extracción de las proantocianidinas localizadas en el interior de las células del hollejo.

Respecto a la extracción de proantocianidinas de las semillas (Gráfico V.7), la cinética de extracción fue muy similar para las tres variedades y ésta fue incrementándose desde el inicio hasta el final del proceso de maceración.

Gráfico V.7 Evolución de la concentración de proantocianidinas de las semillas (mg/L) durante el proceso de maceración.



Además, no se observaron diferencias en las cantidades extraídas para las tres variedades, aunque estas fueron más bajas comparadas con las proantocianidinas extraídas del hollejo, especialmente para Cabernet Sauvignon y Syrah, ya que en el caso de Monastrell, los valores de proantocianidinas tanto del hollejo, como de las semillas fueron más próximos. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por González-Manzano et al. (2004), Del Llaudy et al. (2008) y Cerpa-Calderón y Kennedy (2008).

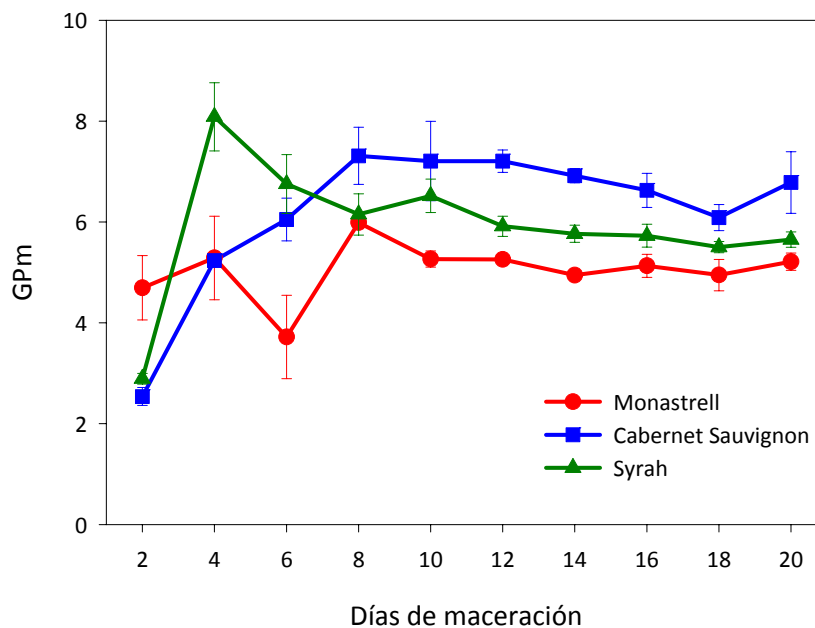
Numerosos autores han encontrado que las proantocianidinas del hollejo son más fácilmente extraíbles que las de las semillas, ya que la extracción en estas últimas requiere mayores tiempos de maceración, siendo favorecida además con el incremento del contenido de etanol en el mosto-vino (Canals et al., 2005; Llaudy et al.,

2008; González-Manzano et al., 2008). Recientemente, ha sido demostrado que el etanol no es esencial para la extracción de proantocianidinas de las semillas, aunque dicha extracción es más intensa y rápida con la presencia de éste (Hernández-Jiménez et al., 2012).

V.2.2.1.2 Composición de las proantocianidinas

Durante el proceso de fermentación macerativa también se estudió la evolución de la composición de las proantocianidinas del mosto-vino. El grado medio de polimerización de las proantocianidinas (G_{Pm}) se muestra en el Gráfico V.8.

Gráfico V.8 Evolución del grado medio de polimerización de las proantocianidinas durante el proceso de maceración.



Este parámetro se incrementa rápidamente para el vino de Syrah, alcanzando el máximo valor en el día 4 de maceración, mientras que para Cabernet Sauvignon y Monastrell este valor máximo es alcanzado dos días más tarde (en el día 6). Después, los valores de este parámetro disminuyeron ligeramente para Monastrell, mientras que en el caso de Syrah este descenso fue prácticamente de 2 unidades,

manteniéndose después estables hasta el día 18 de maceración. En Cabernet Sauvignon también se encontró un ligero descenso en los valores de G_{Pm}, descenso que ocurrió unos días más tarde que para las otras dos variedades. Al final del proceso de maceración, los valores de G_{Pm} se incrementaron ligeramente para las tres variedades.

Aunque las proantocianidinas del vino de Syrah alcanzaron el mayor valor de G_{Pm} seguidas de aquellas presentes en el vino de Cabernet Sauvignon durante los primeros días de maceración, desde mitad del proceso de maceración, el valor más alto de este parámetro fue presentado por éstas últimas, mientras las proantocianidinas del vino de Syrah mostraron valores intermedios comparados con los vinos de las otras variedades. Este resultado puede ser debido a que las proantocianidinas del hollejo de Cabernet Sauvignon estén más polimerizadas que las de las otras variedades.

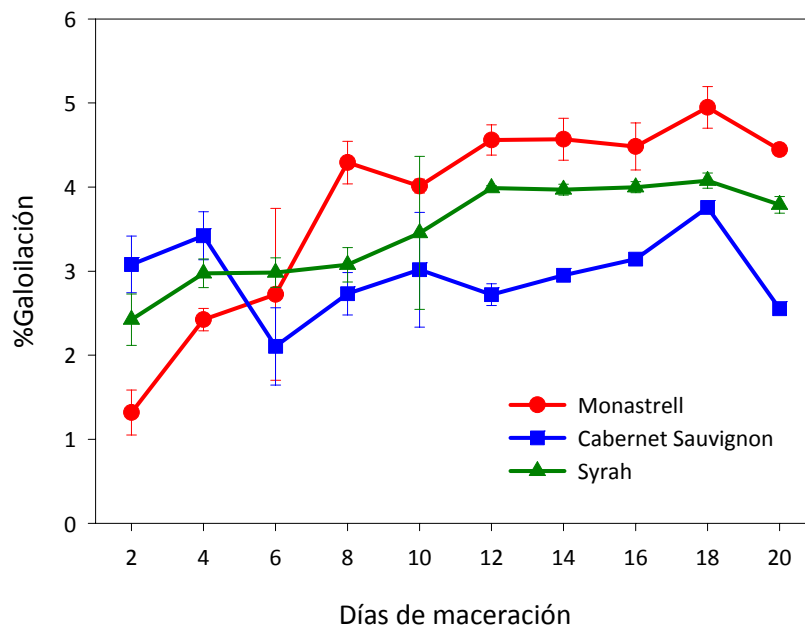
Por tanto, el G_{Pm} de las proantocianidinas presentes en el vino sólo se va a ver principalmente afectado los primeros días de maceración, lo cual no coincide con los trabajos de Llaudy et al. (2008), quienes no encontraron grandes variaciones en los valores de G_{Pm} tras la aplicación de 25 días de maceración.

El incremento en los valores de G_{Pm} observado en la primera mitad de la maceración es coincidente con un incremento en la extracción de proantocianidinas del hollejo en los vinos, las cuales presentan una alta polimerización. Pero los valores del G_{Pm} de las proantocianidinas del mosto-vino no alcanzan nunca valores tan altos como los de las proantocianidinas de los hollejos. Esto puede ser debido a varias causas: (a) la extracción simultánea de proantocianidinas derivadas de las semillas, las cuales están menos polimerizadas y pueden compensar los valores de G_{Pm}, (b) por la adsorción de estos compuestos, principalmente por el material de la pared celular de la pulpa en suspensión, con el cual las proantocianidinas del hollejo de alto peso molecular tienen gran afinidad (Bindon et al., 2010a) (c) a procesos de oxidación (Poncet-Legendre et al., 2010) y de interacción con otros compuestos fenólicos presentes en el vino y (d) la baja eficiencia del medio hidroalcohólico que es el mosto-

vino en la extracción de proantocianidinas de alto peso molecular, tal y como hemos demostrado previamente.

El porcentaje de galoilación de las proantocianidinas afecta tanto al amargor como a la astringencia de los vinos (Lesschaeve y Noble, 2005). El valor de este parámetro se incrementó para todas las variedades hasta el día 18 de maceración (Gráfico V.9), lo cual puede ser explicado por la aportación cada vez mayor de proantocianidinas de las semillas, las cuales son más galoiladas que aquellas del hollejo, disminuyendo después ligeramente en el momento del descube. Este descenso puede ser debido a liberaciones de unidades de ácido gálico de sus correspondientes precursores galoilados (Singleton y Trouslade, 1983).

Gráfico V.9 Evolución del porcentaje de galoilación durante el proceso de maceración.

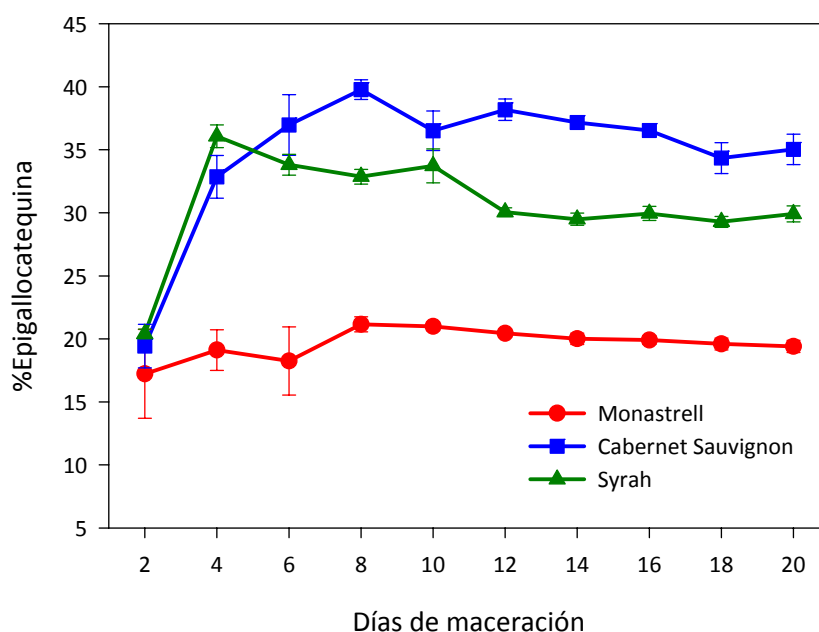


Aunque las proantocianidinas de los vinos de Monastrell mostraron durante los primeros días de maceración valores más bajos del porcentaje de galoilación que aquellas presentes en los vinos de las otras variedades, después, éste se incrementó rápidamente, alcanzando el valor más alto en el momento del prensado. Contrariamente, las proantocianidinas de los vinos de Cabernet Sauvignon presentaron

los valores más bajos de este parámetro. Estos resultados son consistentes con los medidos en las uvas.

La evolución del porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión durante el periodo de maceración nos informa sobre la evolución del porcentaje del contenido de prodelfidinas en el vino. Los valores de este parámetro se incrementaron durante los primeros días de maceración y después disminuyeron ligeramente hacia el final del proceso (Gráfico V.10). El descenso puede estar relacionado con procesos de oxidación de las proantocianidinas donde está presente esta subunidad, ya que se ha indicado que los flavan-3-oles trihidroxilados son más susceptibles de ser oxidados durante el proceso de fermentación que aquellos dihidroxilados, como la (+)-catequina y (-)-epicatequina, debido a diferencias en el potencial redox (Nanjo et al., 1996). Esto podría explicar la menor proporción de proantocianidinas procedentes del hollejo en el mosto vino con el avance de la maceración (Aron y Kennedy, 2007), aunque también es evidente que, ya que se está hablando de porcentajes, el aporte de proantocianidinas de las semillas, que no presentan (-)-epigallocatequina, contribuyan a esa disminución.

Gráfico V.10 Evolución del porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión durante el proceso de maceración.



El porcentaje de prodelfidinas fue diferente para los mostos-vinos de las tres variedades. El porcentaje de prodelfinidinas del vino de Syrah alcanzó el valor máximo en el día 4 de maceración y para Cabernet Sauvignon y Monastrell cuatro días más tarde, mostrando el porcentaje más alto de este parámetro los mostos-vinos de Cabernet Sauvignon y el más bajo los de Monastrell, lo que vuelve a indicar lo difícil que resulta extraer los compuestos fenólicos de los hollejos de uvas de la variedad Monastrell. Francis et al. (2002) indicaron que altos contenidos de prodelfidinas en los vinos pueden disminuir la sensación de astringencia, pudiendo conferir al vino un efecto más suave en boca.

Por tanto, el incremento del tiempo de maceración en este estudio influyó en la extractabilidad de proantocianidinas totales y especialmente en aquellas procedentes de las semillas y el porcentaje de galoilación de las mismas. Pero también se ve claramente que la variedad tiene un peso muy importante en el perfil proantocianidínico del vino. Así, los vinos de Cabernet Sauvignon y Syrah mostraron los valores más altos de proantocianidinas totales, sobre todo en el caso de ésta última variedad, debido a un mayor peso de las proantocianidinas procedentes del hollejo. Esto fue reflejado en valores mayores de GPm y del porcentaje de (-)-epigallocatequina, mostrando además bajos valores del porcentaje de galoilación. En cambio, el vino de Monastrell presentó los valores más bajos de proantocianidinas, las cuales estaban menos polimerizadas, pero con un alto porcentaje de galoilación y un valor menor del porcentaje de (-)-epigallocatequina.

V.2.2.2 CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN EL VINO AL FINAL DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA TRAS LA APLICACIÓN DE DIFERENTES TIEMPOS DE MACERACIÓN.

Las tablas V.7 y V.8 muestran el contenido y composición de las proantocianidinas, así como las características sensoriales de los vinos de Monastrell,

Cabernet Sauvignon y Syrah elaborados con distintos tiempos de maceración (5, 10 y 20 días) al finalizar la fermentación alcohólica en el año 2010.

V.2.2.2.1 Concentración y composición de las proantocianidinas

Como se puede observar en la tabla V.7, para las tres variedades, el contenido de proantocianidinas totales en los vinos, una vez finalizada la fermentación alcohólica, se incrementó con el aumento del tiempo de maceración.

Debemos señalar que estos resultados no son totalmente coincidentes con la evolución de estos compuestos observada durante el curso de 20 días de maceración, ya que según ésta, los valores después de 20 días de maceración fueron similares o incluso inferiores a aquellos obtenidos en los mostos-vinos tras una maceración de 10 días, mientras ahora se observan mayores niveles de proantocianidinas en los vinos que tuvieron una maceración de 20 días. La razón de esta discrepancia puede ser explicada por los trabajos de Aron y Kennedy (2007) que encontraron diferencias en los rendimientos de la reacción de fluoroglucinolisis en vinos después de fermentación alcohólica con respecto a aquellos obtenidos en mosto-vino muestreado durante el proceso de maceración. Además, posiblemente la ruptura de asociaciones entre las proantocianidinas con compuestos no fenólicos del vino, asociaciones demostradas por Bindon et al. (2010a), podrían verse favorecidas por la mayor cantidad de etanol presente en el medio. Tampoco hay que olvidar que tras la etapa del prensado una cierta cantidad de proantocianidinas pasarán de las partes sólidas de la uva al vino siendo partícipes posiblemente también de esas diferencias.

Los tres vinos de Syrah (aquellos obtenidos después de 5, 10 y 20 días de maceración) siguieron mostrando un mayor contenido en proantocianidas seguidos de los vinos de Cabernet Sauvignon y Monastrell, presentando estos últimos el más bajo contenido de proantocianidinas.

Tabla V.7 Concentración y composición de proantocianidinas en vinos de Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah a diferentes tiempos de maceración y después de fin de fermentación alcohólica

	Monastrell			Cabernet S.			Syrah		
	5 días	10 días	20 días	5 días	10 días	20 días	5 días	10 días	20 días
PAs totales (mg/L)	233,3 a	470,6 b	591,7 c	396,9 a	685,8 b	796,5 c	540,9 a	786,0 b	894,7 c
Gpm	5,3 a	4,9 a	4,7 a	7,0 b	7,9 c	5,7 a	6,7 c	6,0 b	5,0 a
%G	1,6 a	1,4 a	1,9 b	1,6 a	1,7 a	2,4 b	2,8 a	3,5 b	3,7 b
%Cat-tem	13,8 a	15,3 a	14,7 a	10,4 b	9,0 a	11,5 b	9,2 a	10,0 a	11,5 b
%Ecat-tem	4,7 a	4,2 a	5,9 b	3,0 a	2,3 a	4,3 b	4,3 a	4,1 a	6,3 b
%Ecatg-tem	0,5a	0,7 b	0,6 a	6,2 a	0,2 a	0,2 a	0,3 b	0,2 b	0,2 a
%Cat-ext	16,3 b	9,0 a	8,1 a	11,0 b	6,0 a	5,2 a	1,0 a	1,3 a	1,8 b
%Ecat-ext	44,9 a	50,1 b	51,2 b	37,9 a	40,7 b	42,9 c	49,8 b	49,2 ab	47,7 a
%Egcat-ext	18,5 a	19,7 a	17,9 a	36,0 a	40,0 b	33,5 a	32,6 b	31,8 b	28,9 a
%Ecatg-ext	1,1 b	0,7 a	1,3 b	1,4 a	1,5 a	2,3 b	2,6 a	3,2 b	3,4 c
PAs hollejo (mg/L)	124,0 a	266,8 b	305,0 c	272,4 a	502,7 b	506,5 b	434,4 a	618,7 b	639,8 b
%PAs hollejo	53,1 a	56,6 a	51,5 a	68,6 a	73,3 b	63,6 a	80,5 b	78,7 b	71,5 a
PAs semilla (mg/L)	109,3a	203,8 b	286,7 c	124,2 a	183,1 b	289,9 c	105,5 a	167,4 b	254,9 c
%PAs semilla	46,9 a	43,3 a	48,5 a	31,3 b	26,7 a	36,2 b	19,5 a	21,3 a	28,5 b
%Extracción teórica PAs hollejo	12,1 a	26,0 b	29,7b	13,3 a	25,6 b	24,8 b	51,7 a	73,4 b	76,0 b
%Extracción teórica PAs semilla	4,8 a	9,0 b	12,7 c	4,8 a	6,2 b	11,1 c	4,2 a	6,7 b	10,1 c

Abreviaciones. PAs, proantocianidinas; Gpm, grado medio de polimerización; %G: porcentaje de galilación, Cat-term, (+)-catequina terminal; Ecat-term, (-)-epicatequina terminal; Cat-ext, (+)-catequina de extensión; Ecat-ext, (-)-epicatequina de extensión; Egcat-ext, (-)-epigalocatequina de extensión; Ecatg-ext, (-)-epicatequina galato de extensión. Letras diferentes en una misma fila y para cada variedad indica diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

En el caso del contenido de proantocianidinas procedentes del hollejo, en general y para las tres variedades fue mayor en aquellos vinos elaborados con largos tiempos de maceración, aunque no se observaron diferencias significativas para los vinos elaborados con 10 y 20 días de contacto, excepto para los vinos de Monastrell, donde la extracción de proantocianidinas derivadas del hollejo es mayor en los vinos con 20 días de maceración. Estos resultados no coinciden con otros estudios los cuales encontraron que después de 4 o 5 días de maceración, la extracción de las proantocianidinas del hollejo tiende a estabilizarse (Canals et al., 2005) y tampoco con la evolución observada de las proantocianidinas del hollejo durante el curso de 20 días de maceración, ya que según esta evolución, el contenido de proantocianidinas del hollejo presentes en los vinos macerados durante 10 días debería ser mayor que aquellos macerados durante más tiempo, sobre todo en el caso de Syrah y Cabernet Sauvignon. De nuevo debemos recordar que estas medidas se han realizado en vinos ya terminados y las diferencias encontradas con respecto a los muestreos realizados durante el proceso macerativo indican la continua evolución de estos compuestos.

Otra vez se ha encontrado, tal y como ya se observó en el estudio durante el periodo de maceración, que la variedad influye de manera muy importante en la cantidad de proantocianidinas del hollejo presente en el vino, mientras que el contenido de proantocianidinas de las semillas fue muy similar para los tres vinos para un tiempo de contacto determinado, siendo independiente de la variedad.

Cuando los valores de las proantocianidinas del hollejo y de las semillas fueron expresados como porcentajes, de nuevo se encontró que los valores del porcentaje de las proantocianidinas procedentes del hollejo fue siempre mayor que el de aquellas procedentes de las semilla, especialmente en los vinos de Cabernet Sauvignon y Syrah, aunque la proporción de las proantocianidinas derivadas de las semillas se incrementó en los vinos elaborados con mayor tiempo de maceración, coincidiendo con el descenso observado en los valores de G_{Pm} de las proantocianidinas de estos vinos. Los vinos de Syrah, mostraron siempre el mayor porcentaje de proantocianidinas derivadas del hollejo independientemente del tiempo de contacto, seguidos de los vinos de Cabernet Sauvignon y Monastrell.

También se calculó el porcentaje teórico de extracción de proantocianidinas del hollejo y de las semillas y los valores de este porcentaje variaron entre 12,1- 29,7% para hollejos y 4,8-12,7% para semillas de uvas de Monastrell, 13,3-25,6% para hollejos y 4,8-11,1% para semillas de uvas de Cabernet Sauvignon y 51,7-76% para hollejos y 4,2-10,1% para semillas de uvas de Syrah. El bajo porcentaje de extracción de proantocianidinas de las semillas coincide con el encontrado por Adams y Scholz (2007), quienes observaron que el 96% de las proantocianidinas de las semillas permanecían en las mismas después de fermentación alcohólica. Bindon et al. (2010a) también calcularon que tras la fermentación alcohólica, solo el 25% de la proantocianidinas totales de la uva se encontraban en el vino.

El grado medio de polimerización de las proantocianidinas (G_{Pm}) tendió a disminuir con el incremento del tiempo de maceración, observándose además algunas diferencias en los vinos de las diferentes variedades. En los vinos de Syrah, este descenso fue muy claro; en el caso de Cabernet Sauvignon, el G_{Pm} alcanzó el máximo valor en vinos elaborados con 10 días de maceración y disminuyó con un tiempo de contacto superior. En el caso de los vinos de Monastrell también se observó un ligero descenso en los valores de G_{Pm}, pero las diferencias no fueron significativas. Estos resultados son bastante coincidentes con aquellos observados en los vinos muestreados durante el curso de 20 días de maceración.

Respecto al porcentaje de galoilación, este en general siguió siendo mayor para las proantocianidinas presentes en los vinos macerados durante 20 días, aunque al final de fermentación alcohólica, sorprendentemente este porcentaje fue mayor para los vinos de Syrah y menor para los vinos de Monastrell, mientras que los vinos de Cabernet Sauvignon mostraron valores intermedios. Posiblemente la diferente evolución de las proantocinaidinas presentes en los distintos vinos pueda ser responsable de que los resultados después de fin de fermentación alcohólica no coincidan con aquellos obtenidos durante la maceración.

Los resultados obtenidos muestran que cuando las proantocianidinas de los vinos macerados durante distintos tiempos de maceración son analizadas tras finalizar el proceso de fermentación alcohólica, estos pueden no coincidir necesariamente con

aquellos observados durante el proceso de maceración. La proporción de proantocianidinas del hollejo y las semillas que son extraídas en el vino es realmente baja y el tiempo de maceración modifica el perfil proantocianidínico de los vinos. Sin embargo, la variedad de uva influye claramente en la proporción de proantocianidinas derivadas del hollejo y de las semillas en el vino y en el porcentaje de extracción, incluso más que el tiempo de contacto. Se necesita más información para determinar cual es exactamente la razón por la que se obtienen bajas concentraciones de proantocianidinas en los vinos y las diferencias observadas entre los vinos elaborados con distintas variedades, así como, encontrar nuevos métodos, si fuera necesario, para aumentar dichas cantidades.

V.2.2.2.2 Características sensoriales de los vinos

Las propiedades organolépticas del vino tinto dependen de manera muy importante de la extracción de los compuestos fenólicos derivados de la uva y de sus reacciones en el vino (King et al., 2003; Basha et al., 2004).

En este análisis sensorial, los catadores tenían la nariz tapada y solo valoraron la acidez, astringencia y el amargor de los diferentes vinos (Tabla V.8).

Los vinos de Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah macerados durante 20 días fueron valorados como los más astringentes, lo cual podría ser explicado por la mayor concentración de proantocianidinas en estos vinos comparados con aquellos de menor tiempo de maceración. Que las proantocianidinas son las responsables de la sensación de astringencia es un fenómeno bien estudiado (Obrique-Slier et al., 2011) y en otros estudios, también se han encontrado diferencias significativas en la astringencia entre vinos con bajo, medio y alto contenido de proantocianidinas (Villamor et al., 2009).

La acidez tiende a disminuir con el incremento del tiempo de maceración, aunque no se observaron diferencias significativas entre los valores encontrados, excepto en el caso de los vinos de Monastrell macerados durante 5 días, los cuales mostraron una mayor puntuación para la acidez. El descenso en los valores de acidez al incrementar el tiempo de maceración podría ser debido a un incremento en el medio

de la concentración de potasio, lo cual conduciría a un incremento en la precipitación de sales tartáricas.

Tabla V.8 Características sensoriales de los vinos de Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah a diferentes tiempos de maceración y después de fin de fermentación alcohólica.

	Monastrell			Cabernet Sauvignon			Syrah		
	5 días	10 días	20 días	5 días	10 días	20 días	5 días	10 días	20 días
Acidez	4,5 b	4,1 a	3,8 a	4,5 a	4,2 a	4,3 a	4,6 a	4,6 a	4,3 a
Astringencia	2,6 a	3,7 b	4,2 b	3,2 a	4,1 b	4,6 b	4,2 a	4,2 a	4,6 a
Amargor	2,6 a	2,9 a	3,2 a	3,2 b	3,4 b	2,5 a	3,4 a	2,8 a	3,2 a

Letras diferentes en una misma fila y para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

En el caso del amargor, solo se encontraron diferencias significativas en los vinos de Cabernet Sauvignon, mostrando los valores más altos de este atributo los vinos macerados con 5 y 10 días de maceración.

Está claro que el tiempo de maceración afectó principalmente a la astringencia y especialmente en los vinos de Monastrell y Cabernet Sauvignon, resultados que se correlacionan con el contenido de proantocianidinas totales en los vinos.

V.3 EFECTO DEL LA AUSENCIA DE SEMILLAS EN EL PERFIL FENÓLICO Y CROMÁTICO DEL VINO MONASTRELL

V.3.1 INTRODUCCIÓN

Las proantocianidinas, bien como copigmentos o través de reacciones covalentes con los antocianos, participan en el color del vino asegurando su estabilidad en el tiempo, pero también son responsables de las sensaciones gustativas del vino. Estas sensaciones gustativas están directamente relacionadas con la cantidad y composición de las mismas. Así, un aumento en el peso molecular de las proantocianidinas incrementa su capacidad para precipitar proteínas, aumentando la sensación de astringencia (Chira et al., 2012), aunque esta percepción se reduce con un aumento en el porcentaje de prodelfidinas (Bindon et al., 2010a). Por otro lado, un aumento en la galoilación de las proantocianidinas ha sido asociado con notas más amargas y más tanicidad (Ferrer-Gallego et al., 2010). Según esto, sólo las proantocianidinas procedentes del hollejo serían las responsables de causar las mejores sensaciones en boca.

Kennedy et al. (2008) indicaron que los enólogos, de manera general, tienen preferencia respecto al origen de las proantocianidinas, prefiriendo aquellas procedentes del hollejo, ya que un incremento en el contenido de estas proantocianidinas debería mejorar la calidad del vino. Por otro lado, los estudios de Mercurio et al. (2010) también mostraron que los vinos eran más apreciados cuando estos presentaban un alto contenido de proantocianidinas, altos porcentajes de epigallocatequina y valores elevados de Gpm. Esto es indicativo de un mayor contenido de proantocianidinas del hollejo, además, este resultado muestra la importancia de la concentración de estos compuestos en el valor comercial que las bodegas atribuyen a sus vinos.

Dada la preferencia de los enólogos por una mayor presencia de proantocianidinas procedentes del hollejo en los vinos, es curioso, que hasta la fecha,

se haya estudiado mayoritariamente el efecto de la adición de taninos enológicos a los vinos, especialmente taninos procedentes de semillas de la uva, en las características organolépticas y cromáticas estos (Oliva et al., 2001; Martínez García et al., 2003; Bautista-Ortín et al., 2005 y 2007) y muy pocos estudios se hayan realizado sobre el efecto de reducir o eliminar los taninos de semillas en el proceso de vinificación. En este sentido, solo se han encontrado los resultados de Lee et al. (2008), quienes estudiaron el efecto de la eliminación de semillas en las primeras etapas del proceso de elaboración en la calidad del vino o aquellos de Zoecklein et al. (2009), quienes estudiaron el impacto del délestage, con una eliminación parcial de las semillas, en las características del vino.

Por ello, tratando de tener más información se ha estudiado el efecto de la eliminación de semillas de las uvas sobre el perfil fenólico y cromático del vino de uvas Monastrell en el curso de la vinificación, comparándolo con un vino testigo donde las semillas estaban presentes.

V.3.2 RESULTADOS

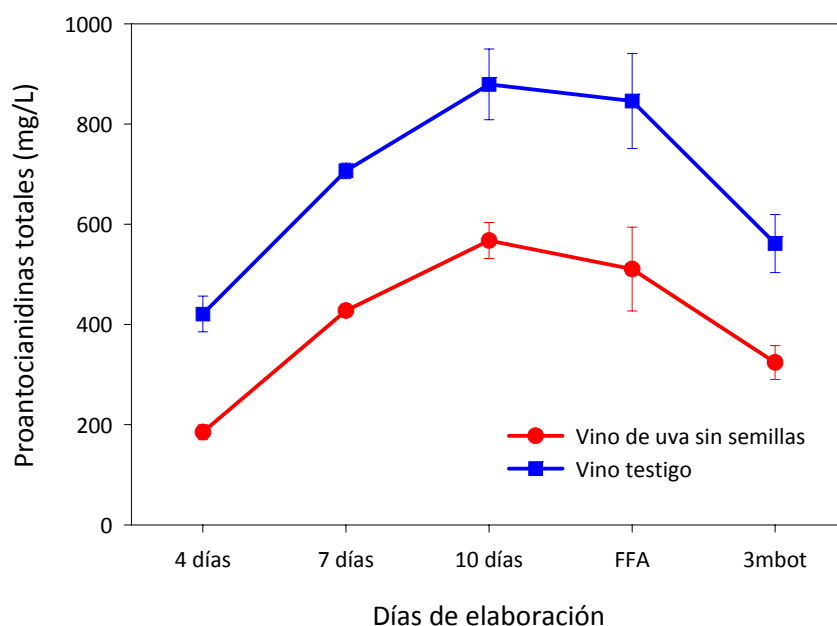
V.3.2.1 EVOLUCIÓN DEL PERFIL FENÓLICO Y CROMÁTICO DEL VINO DURANTE EL PROCESO DE VINIFICACIÓN

En los Gráficos V.11-V.16 y la Tabla V.9 se puede observar la evolución del contenido polifenólico y parámetros cromáticos durante el proceso de vinificación de uvas Monastrell con y sin semillas de la campaña 2011, mientras que el gráfico V.17 muestra las características sensoriales de los vinos después de fin de fermentación alcohólica y después de 3 meses de envejecimiento en botella. Las muestras fueron analizadas durante la maceración, tras finalizar la fermentación alcohólica (FFA) y después de reposar el vino 3 meses en botella (3mbot).

V.3.2.1.1 Concentración y composición de las proantocianidinas

Como era de esperar, la concentración de proantocianidinas (Gráfico V.11) fue mucho mayor cuando las semillas estaban presentes en el medio de fermentación, aunque el perfil de extracción fue casi el mismo para ambos tipos de vinificación. El vino de uva sin semillas presentó un 40% menos de proantocianidinas que el vino testigo. Este resultado coincide con aquel encontrado para el vino Monastrell después de 10 días de maceración (Capítulos V.1 y V.2), donde el porcentaje de proantocianidinas derivadas de las semillas era alrededor del 43%.

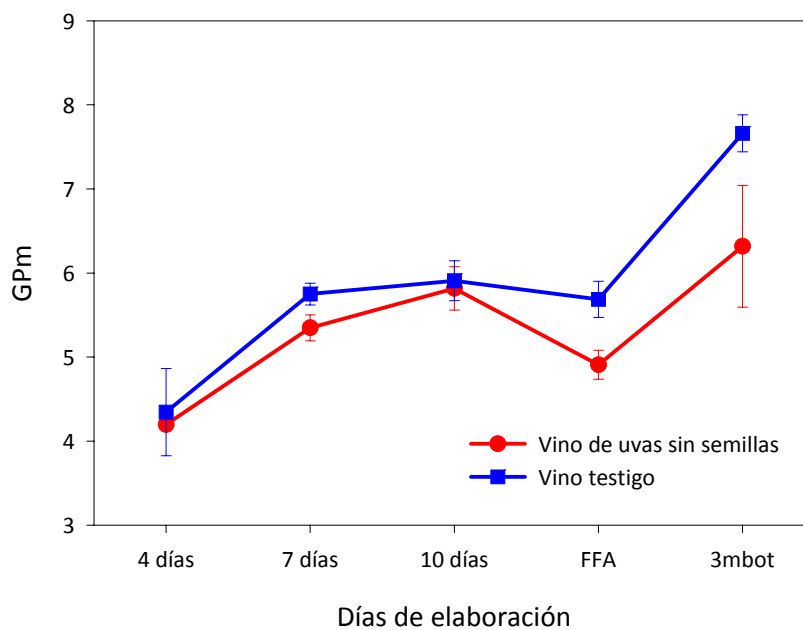
Gráfico V.11 Evolución de la concentración de proantocianidinas totales (mg/L) durante el proceso de vinificación.



Los valores del grado medio de polimerización (GPM) fueron muy similares para ambos vinos hasta el día del descube (Gráfico V.12). Esto no coincide con el resultado esperado. Puesto que la piel de la uva se caracteriza por tener proantocianidinas de alto peso molecular y siendo la única fuente de proantocianidinas en este vino, se debería haber obtenido un mayor valor de GPM en el vino elaborado a partir de uva sin semillas, y sin embargo, no se observaron estas diferencias. Es posible que una proporción significativa de proantocianidinas del hollejo de alto peso molecular no

fuera extraída durante el proceso de maceración, o si esta tuvo lugar, que fuera eliminada de la solución por adsorción sobre las paredes celulares de la uva que están en suspensión en el vino como fue hipotetizado por Bindon et al. (2010a), al explicar por qué no se observa un incremento en los valores de G_{Pm} en las proantocianidinas del vino.

Gráfico V.12 Evolución del grado medio de polimerización de las proantocianidinas durante el proceso de vinificación.

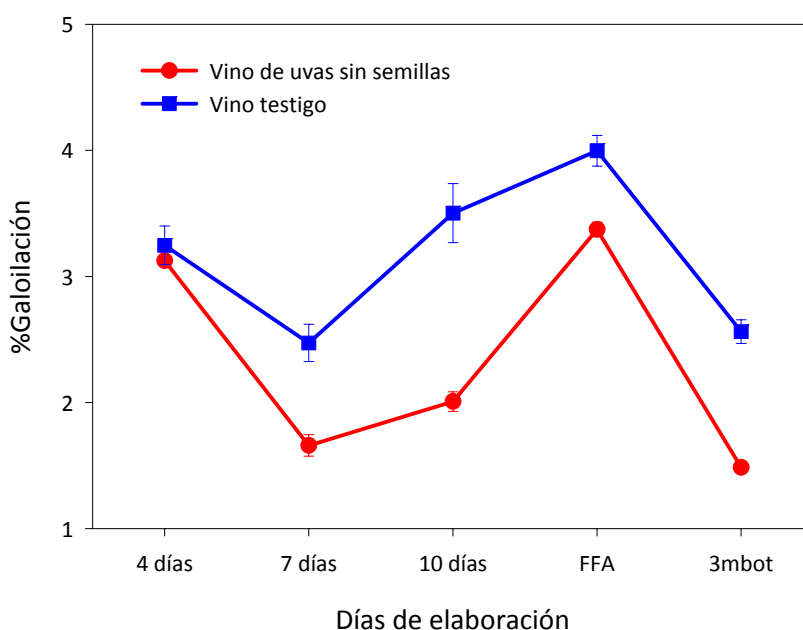


Desde el descube hasta final de fermentación alcohólica, el G_{Pm} disminuyó y este descenso fue más acusado para el vino elaborado de uvas sin semillas. Esta disminución puede ser debida a reacciones de hidrólisis de las proantocianidinas. Contrariamente, durante el embotellado, hay un incremento en los valores de G_{Pm} para las proantocianidinas de ambos vinos, probablemente debido a un aumento en las reacciones de polimerización de estos compuestos. Las condiciones de acidez y la lenta oxidación en el vino producen la ruptura y formación de enlaces, conduciendo a la polimerización de proantocianidinas y la formación de diferentes estructuras. Después de tres meses de envejecimiento en botella, el valor de G_{Pm} fue mayor para

el vino testigo, lo cual va a estar relacionado con una mayor astringencia del mismo, como se puede ver en los resultados del análisis sensorial.

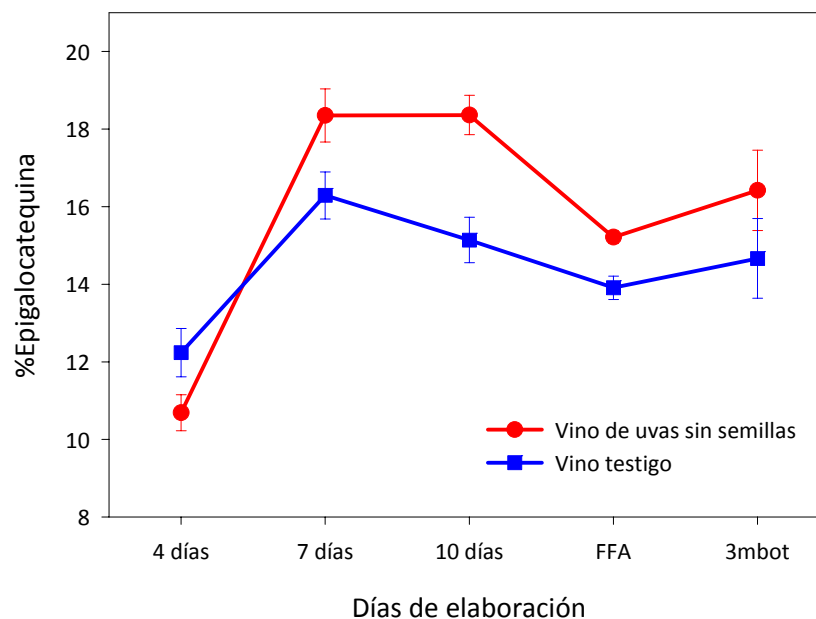
En el caso del porcentaje de galoilación (Gráfico V.13), este fue mayor en el vino testigo, como era de esperar, debido a la mayor galoilación de las proantocianidinas procedentes de las semillas. Las mayores diferencias en este parámetro fueron encontradas en el momento del descube. Del día 4 al 7 de maceración, el valor del porcentaje de galoilación disminuyó debido a una contribución más importante de las proantocianidinas derivadas del hollejo a la composición proantocianidica total del vino. A continuación, se observó un aumento en los valores de este porcentaje hasta el final de fermentación debido, en este caso, a una contribución más importante de las proantocianidinas derivadas de las semillas. Durante el embotellado, la galoilación de las proantocianidinas descendió de manera importante para ambos vinos. Nevest et al. (2010) sugirieron que la razón de dicho descenso podría ser la liberación del ácido gálico de sus correspondientes precursores durante el proceso de almacenamiento del vino.

Gráfico V.13 Evolución del porcentaje de galoilación durante el proceso de vinificación.



El porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión (Gráfico V.14) fue mayor en el vino de uvas sin semillas, ya que el origen de esta subunidad es el hollejo de la uva. El valor máximo se observó en el día 7 de maceración. Desde este día hasta el momento del descube este porcentaje no cambió en el vino de uvas sin semillas y disminuyó en el vino testigo, debido a una contribución más importante de las proantocianidinas de las semillas. Desde el descube hasta el final de fermentación alcohólica se observó una disminución en los valores de este porcentaje para ambos vinos, siendo más acusada para el vino elaborado con uvas sin semillas. Este descenso puede estar relacionado con procesos de oxidación, ya que ha sido observado que la (-)-epigallocatequina es más susceptible a la oxidación que otras subunidades (Nanjo et al., 1996).

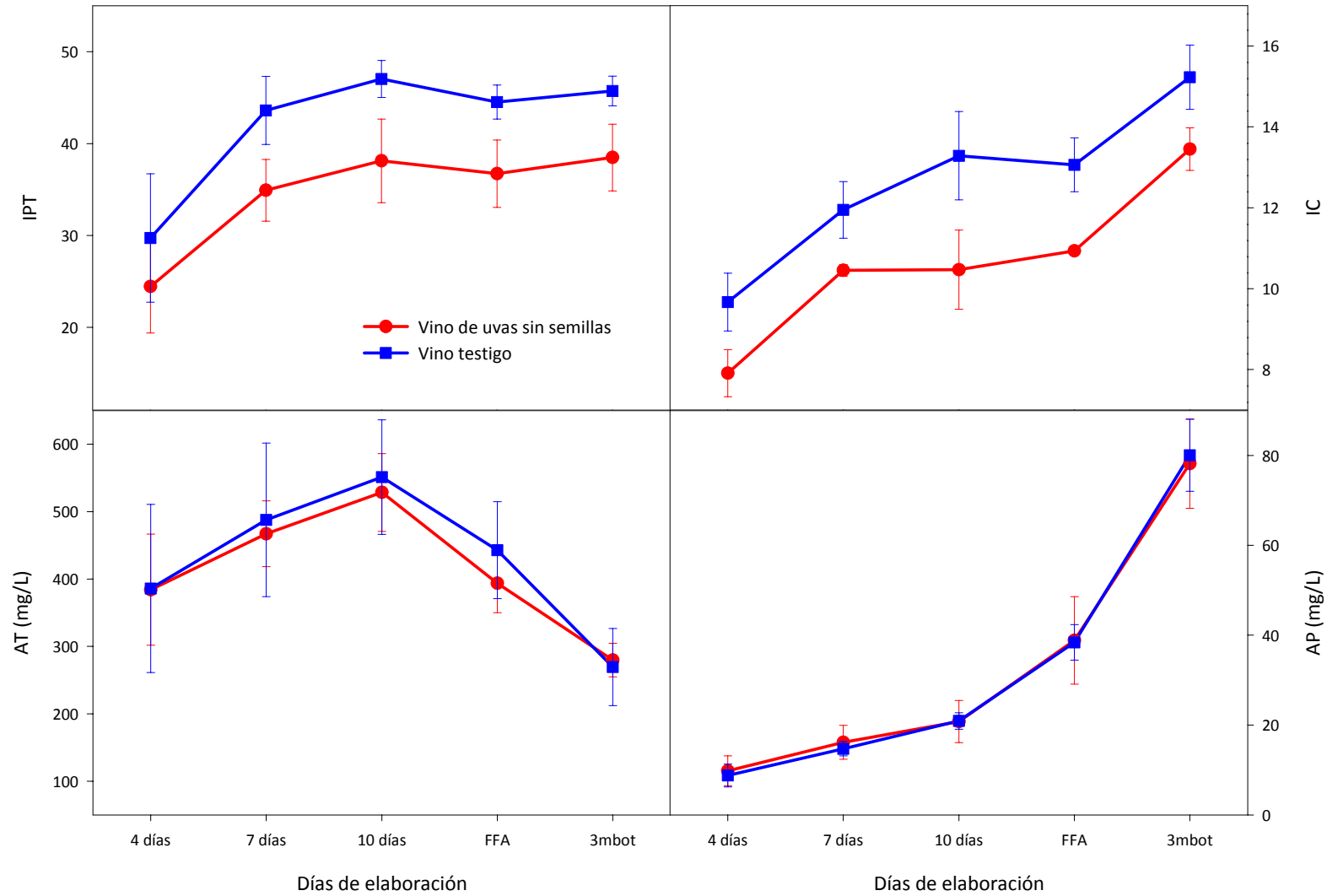
Gráfico V.14 Evolución del porcentaje de (-)-epigallocatequina de extensión durante el proceso de vinificación.



V.3.2.1.2 Características cromáticas de los vinos

El gráfico V.15 muestra la evolución de las determinaciones espectrofotométricas llevadas a cabo en ambos vinos.

Gráfico V.15 Evolución de fenoles totales (IPT), intensidad de color (IC) y antocianos totales (AT) y poliméricos (AP) medidos espectrofotométricamente durante el proceso de vinificación.



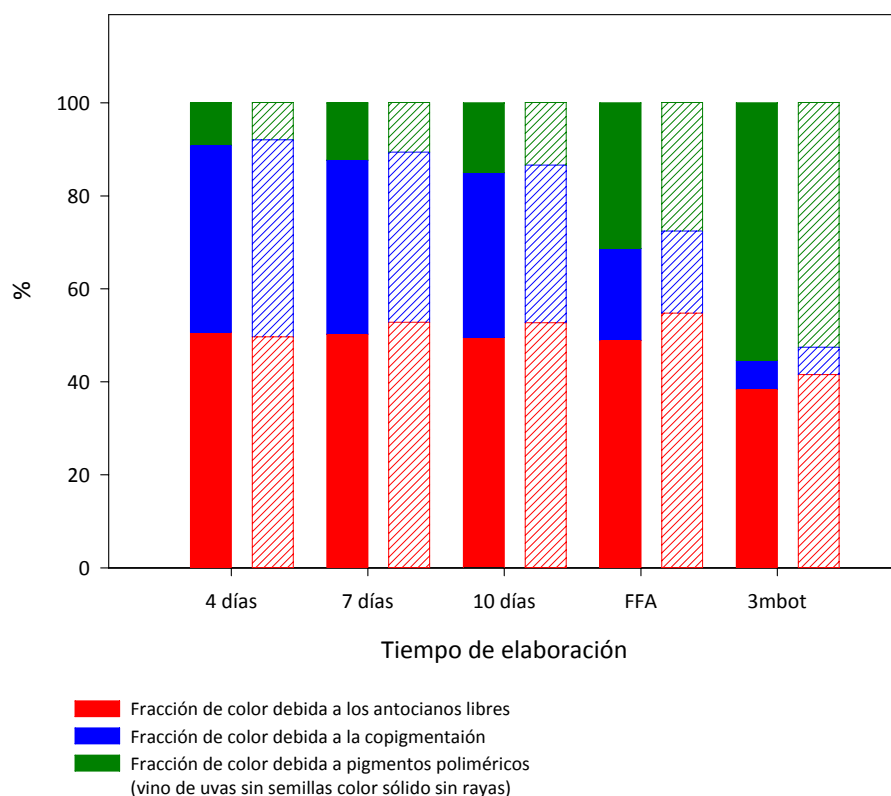
Los valores de fenoles totales (IPT), determinados como la absorbancia a 280 nm, fueron máximos en el momento del descube y se mantuvieron estables hasta el final del estudio. Esto indica que el descenso observado en el contenido de proantocianidinas totales (Gráfico V.11) no es debido a procesos de precipitación. Probablemente las reacciones de las proantocianidinas con otros compuestos fenólicos, las cuales no son sensibles a la reacción de fluoroglucinolisis y los procesos de oxidación, podrían ser responsables del descenso de estos compuestos observado en el vino. McRae y Kennedy (2010) indicaron que después del proceso de fermentación las proantocianidinas continúan sufriendo cambios químicos, los cuales influyen en gran medida en la estructura de los mismos.

La evolución de antocianos totales (AT), medida espectrofotométricamente, muestra un descenso en los valores de estos compuestos muy acusado desde el momento del descube hasta el final de fermentación alcohólica, aunque, esta disminución no fue observada en los valores de intensidad de color (IC), por lo que ésta podría deberse a polimerizaciones y formación de nuevos compuestos coloreados, los cuales son menos sensibles a los cambios de pH en el medio. Esto es corroborado con los valores de antocianos poliméricos (AP), los cuales incrementaron con el avance del proceso de vinificación y de manera similar para ambos vinos. La mayor concentración de proantocianidinas en el vino testigo no afectó a los niveles de antocianos o a su polimerización, pero sí lo hizo en los valores de intensidad de color, siendo estos más altos en este vino. La intensidad de color se calcula como la suma de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm, por lo que valores más altos de este parámetro observados en el vino testigo podría ser debido a una contribución más importante de las proantocianidinas a la absorbancia a 420 nm.

La caracterización del color del vino fue también llevada a cabo con el estudio de copigmentación. Los resultados de este estudio (Gráfico V.16) mostraron que en el momento del descube los vinos eran casi idénticos en cuanto al color, aunque la fracción polimérica era ligeramente mayor en el vino de uvas sin semillas, siendo esta diferencia más acusada a final de fermentación alcohólica. Después de tres meses en botella, la fracción copigmentada fue muy pequeña, mientras que la polimérica se

incrementó bastante, aunque las diferencias entre los vinos eran mínimas, indicando que la ausencia de taninos de semillas en el proceso de elaboración no modifica las reacciones de los antocianos que conducen a las diferentes fracciones de color medidas en el vino.

Gráfico V.16 Evolución de las diferentes fracciones de color debida a antocianos libres, a la copigmentación y a pigmentos poliméricos durante el proceso de vinificación.

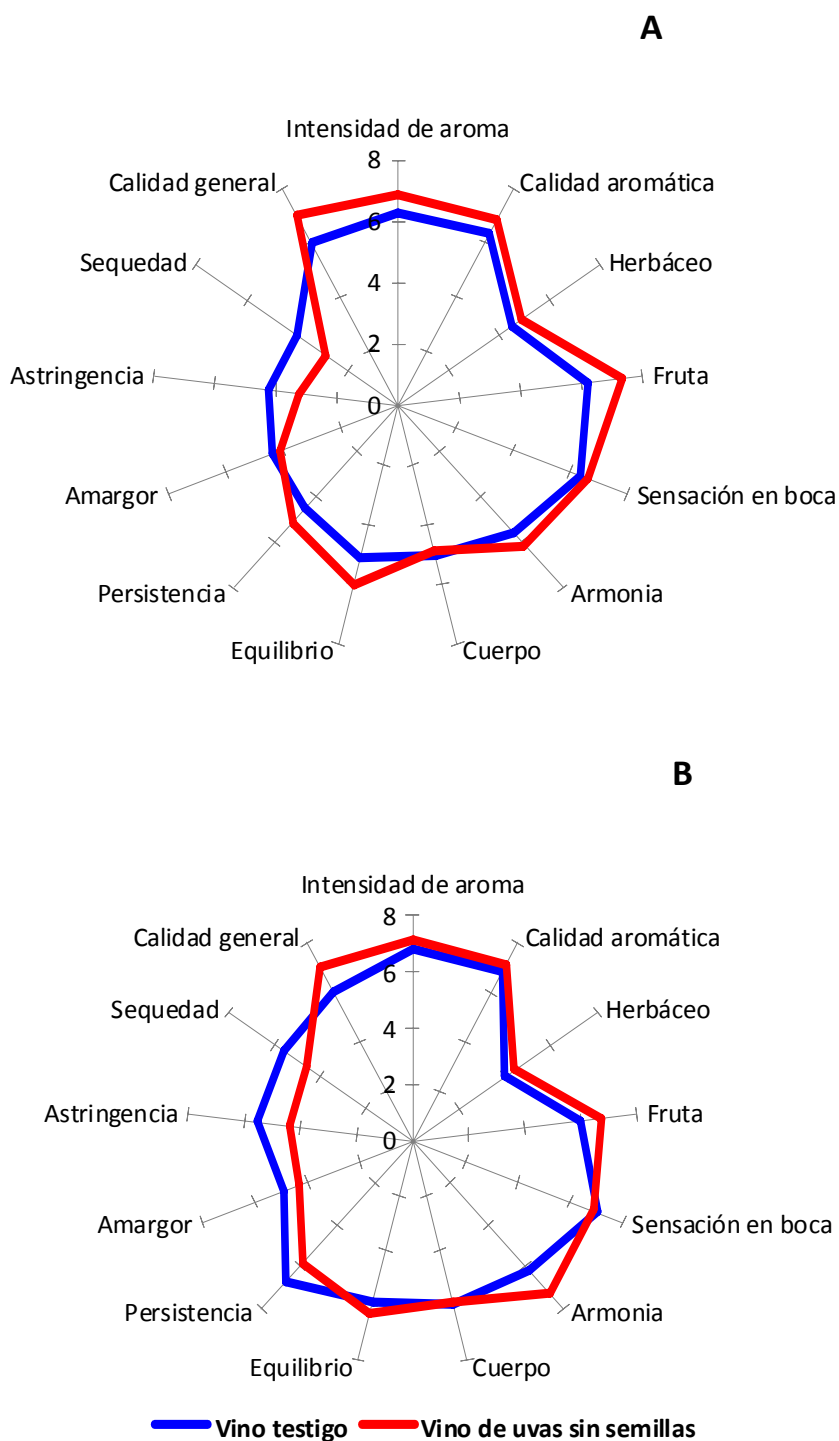


V.3.2.1.3 Características sensoriales de los vinos

Respecto al análisis sensorial (Gráfico V.17), al final de fermentación alcohólica, el vino de uvas sin semillas fue descrito como el más equilibrado, menos astringente y seco y con un aroma más intenso y afrutado. Después de tres meses en botella, la descripción de los vinos fue más similar, especialmente en la fracción aromática, sin

embargo, el vino testigo todavía mostró mayor astringencia, amargor y sequedad en boca. En ambos momentos de análisis, la calidad global fue mayor en el vino de uva sin semillas.

Gráfico V.17 Análisis sensorial descriptivo de los dos vinos estudiados al final de fermentación alcohólica (A) y después de tres meses de envejecimiento en botella (B).



El análisis triangular, mostró que tanto al final de fermentación alcohólica, como después de tres meses en botella, 9 de 12 catadores identificaron correctamente las muestras y prefirieron los vinos sin semilla (datos no mostrados). Estos resultados no coinciden con aquellos obtenidos por Lee et al. (2008), donde en una experiencia con eliminación de semillas al inicio del proceso de elaboración, el vino testigo fue el preferido. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio si que están de acuerdo con aquellos de Cliff et al. (2012), quienes encontraron que con la adición de un extracto de semilla de uva al vino, éste produjo cambios en la astringencia y en muchos otros atributos sensoriales, tales como una disminución del aroma afrutado.

Como conclusión, se puede decir que este estudio demuestra que la ausencia de proantocianidinas de semillas de la uva no va en detrimento en la calidad del vino, ni en las características cromáticas, resaltando la importancia de las proantocianidinas del hollejo en la calidad del mismo como sugieren otros estudios (Kennedy et al., 2008; Mercurio et al., 2010). El vino elaborado a partir de uva sin semillas presenta el mismo contenido en antocianos y las mismas características cromáticas que las del vino testigo, siendo las únicas diferencias la menor intensidad de color y el menor contenido proantocianidínico. Los catadores evaluaron el vino de uvas sin semillas como más afrutado, menos astringente y una mayor calidad global. De modo que, la eliminación de las semillas en las prácticas enológicas podría ser beneficiosa para la calidad del vino. Sin embargo, los estudios de vinos elaborados sin semillas deberían ser realizados durante un tiempo de envejecimiento más largo, como fue indicado por Patterson (2011), ya que la resistencia de las proantocianidinas de las semillas a las reacciones de oxidación (al no presentar (-)-epigallocatequina) puede incrementar la longevidad del vino, disminuyendo la velocidad del deterioro oxidativo.

VI. CONCLUSIONES

Con respecto al estudio realizado en las uvas de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah podemos concluir que:

1. En las uvas, las proantocianidinas se encuentran en mayor cantidad en las semillas, donde, además, presentan un G_{Pm} bajo y un porcentaje de galoilación alto. La composición cuantitativa y cualitativa de las proantocianidinas de las semillas varía menos entre variedades que las del hollejo. En este último, Monastrell y Cabernet Sauvignon mostraron concentraciones más altas de proantocianidinas que las uvas de la variedad Syrah. El G_{Pm} y el %E_{gcat} más alto siempre lo presentaron las uvas de la variedad Cabernet Sauvignon.
2. El contenido máximo de proantocianidinas, tanto en las semillas como en el hollejo, se encontró en el momento del envero, disminuyendo a partir de ese momento, tanto en hollejos como en semillas, variando poco el G_{Pm} de las proantocianidinas durante la maduración.
3. La altitud del viñedo solo afectó a la concentración de proantocianidinas y no a su composición, presentando las uvas cultivadas a más altura menor cantidad de estos compuestos.
4. La comparación de los resultados obtenidos cuando utilizamos acetona como disolvente de extracción de proantocianidinas (el más utilizado para el estudio de estos compuestos) y aquellos obtenidos cuando la extracción se realiza con una disolución hidroalcohólica (más similar a lo que encontramos en el vino) permite concluir que el uso de acetona como método de extracción proporciona una predicción bastante exacta de la cantidad de taninos del hollejo que pueden ser extraídos en el vino durante el proceso de maceración, especialmente cuando la extracción se realiza a partir de uva madura, pero sobreestimaré el G_{Pm} de los taninos extraíbles. Con respecto a las semillas y cuando estas están maduras, el uso de acetona sobreestimaré la cantidad de

taninos que serán extraídos durante la vinificación. Estos resultados señalan la importancia de la metodología de extracción utilizada para predecir los taninos de las uvas que serán transferidos al vino durante fase de maceración.

Con respecto a la composición en proantocianidinas de los vinos estudiados se concluye que:

5. Las uvas de las distintas variedades dan vinos con características tánicas diferentes, aunque su composición cuantitativa no se correlaciona con la encontrada en las uvas respectivas, sobre todo con respecto a las proantocianidinas en el hollejo. Las uvas de la variedad Syrah muestran una fácil extracción de sus taninos, dando lugar a vinos con el mayor contenido en estos compuestos (no siendo las uvas de contenido más alto) mientras que los taninos de las uvas de la variedad Monastrell muestran una menor y más lenta extractabilidad, lo cual está relacionado con la ya descrita baja extractabilidad fenólica que en general presentan las uvas de la variedad Monastrell.

Finalmente, con respecto a las distintas técnicas de vinificación ensayadas se concluye que:

6. La maceración prefermentativa en frío, diseñada para favorecer la extracción de compuestos del hollejo, tiene un comportamiento distinto al esperado, ya que produce los vinos con el mayor contenido de proantocianidinas de las semillas.
7. Los enzimas de maceración promueven una alta extracción de proantocianidinas de la uva al vino, pero sin cambios importantes en su composición respecto a la vinificación control, indicando que el enzima facilita

tanto la extracción de proantocianidinas de la piel como de las semillas, lo cual ha sido demostrado en este estudio por primera vez. Aquellos preparados enzimáticos con actividades celulasa y poligalacturonasa más altas serán los que más faciliten la extracción de proantocianidinas de las semillas, aunque el efecto será más o menos marcado dependiendo de la variedad de uva.

8. La nieve carbónica parece favorecer fundamentalmente la extracción de proantocianidinas de elevado peso molecular del hollejo y, por tanto, podría ser considerada como una técnica interesante para obtener vinos con baja astringencia.
9. El incremento del tiempo de maceración aumenta la extractabilidad de proantocianidinas del hollejo y de las semillas, aunque las proporciones de taninos de hollejo y semilla presentes en los vinos está más marcado por la variedad de uva que por el tiempo de maceración. En vinos ya terminados, el mayor contenido en taninos se encuentra en aquellos con un tiempo de maceración más largo, estando estos taninos menos polimerizados y con un porcentaje de galoilación mayor, debido a un incremento en el porcentaje de taninos de semilla en los vinos con maceraciones más largas.
10. La elaboración con uvas sin semillas demuestra que la ausencia de éstas no va en detrimento en la calidad del vino, ni de sus características cromáticas, resaltando la importancia de las proantocianidinas del hollejo en la calidad del mismo como sugieren otros estudios. El vino elaborado a partir de uva sin semillas presenta el mismo contenido en antocianos y las mismas características cromáticas que las del vino testigo, siendo las únicas diferencias la menor intensidad de color y el menor contenido proantocianidínico. Los catadores evaluaron el vino de uvas sin semillas como más afrutado, menos astringente y una mayor calidad global.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Adams, D.O. y Scholz, R. Tannins: the problem of extraction. In *Proceedings of the Thirteenth Australian Wine Industry Technical Conference*; Blair, R. J., Williams, P. J., Pretorius, I. S., Eds.; Australian Wine Industry Technical Conference Inc: Adelaide, **2007**; pp 1-5.
- Adams, D.O. y Harberston, J.F. Use of alkaline phosphatase for the analysis of tannins in grapes and red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 247-252.
- Alvarez, I.; Aleixandre, J. L.; García, M. J.; Lizama, V. Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 563, 109-115.
- Amrani Joutei, K.; Glories, Y. y Mercier, M. Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis*, **1994**, 33, 133-138.
- Appeldoorn, M.M.; Vincken, J.P.; Sanders, M.; Hollman, P.C.H. y Gruppen, H. Combined normal-phase and reversed-phase liquid chromatography/ESI-MS as a tool to determine the molecular diversity of A-type procyanidins in peanut skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 6007-6013.
- Aron, P. M. y Kennedy, J. A. Compositional Investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir during fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, 5670-5680.
- Auw, J.M.; Blanco, V.; O'Keefe, S.F. y Sims, C.A. Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin and Noble wines and juices. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1996**, 47, 279-286.
- Bajec, M.R. y Pickering, G. Astringency: Mechanisms and perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2008**, 48, 858-875.
- Basha, S.; Musingo, M. y Colova, V. Compositional differences in the phenolics compounds of muscadine and bunch grape wines, *African Journal of Biotechnology*, **2004**, 3, 523-528.
- Bautista-Ortín, A. B.; Martínez-Cutillas, A.; Ros-García, J. M.; López-Roca, J. M. y Gómez-Plaza, E. Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology*, **2005**, 40, 1-12.
- Bautista-Ortín, A.B. Técnicas enológicas para la obtención de vinos de Monastrell de alto contenido polifenólico. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España, **2005**.
- Bautista-Ortín, A.B.; Fernández-Fernández, J.I.; López-Roca, J.M. y Gómez-Plaza, E. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolics compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2007**, 20, 546-552.

- Bindon, K.A.; Smith, P.A. y Kennedy, J.A. Interaction between grapes-derived proanthocyanidins and cell wall material. Effect on proanthocyanidin composition and molecular mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010a**, 58, 2520-2528.
- Bindon, K.; Smith, P.; Holt, H. y Kennedy, J. Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 2. Implications for vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010b**, 58, 10736-10746.
- Bindon, K. y Kennedy, J. Ripening-induced changes in grape skin proanthocyanidins modify their interaction with cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 2696-2707.
- Bogs, J.; Downey, M.; Harvey, J.S.; Ashton, A.R.; Tanner, G.J. y Robinson, S.P. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology*, **2005**, 139, 652–663.
- Bogs, J.; Ebadi, A.; McDavid, D. y Robinson, S.P. Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiology*, **2006**, 140, 279–291.
- Bogs, J.; Jaffe, F.W.; Takos, A.M.; Amanda R.W. y Robinson, S.P. The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiology*, **2007**, 143, 1347–1361.
- Bordiga, M.; Travaglia, F.; Locatelli, M.; Coisson, J. D. y Arlorio, M. Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chemistry* **2011**, 127, 180-187.
- Boss, P.K.; Davies, C. y Robinson, S.P. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology*, **1996**, 111, 1059-1066.
- Boulton, R. Red wines. En: *Fermented beverage production*, Lea, A. and Piggott, J. (Eds.), Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall, London, **1995**, pp. 121-158.
- Bourzeix, M.; Weyland, D. y Heredia, N. Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, de vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bulletin O.I.V.*, **1986**, 669-670, 1171–1254.
- Brossaud, F.; Cheynier, V. y Noble, A.C. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2001**, 7, 33-39.
- Cadot, Y.; Minana Castell, M. T. y Chevalier, M. Flavan-3-ol compositional changes in grape berries (*Vitis vinifera* L. cv Cabernet Franc) before veraison, using two complementary analytical approaches, HPLC reversed phase and histochemistry. *Analytica Chimica Acta*, **2006a**, 563, 65-75.

- Cadot, Y., Minana-Castello, M.T. and Chevalier, M. Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Franc during fruit development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006b**, 54, 9206–9215.
- Canals, R.; Llaudy, M.C.; Valls, J.; Canals, J.M. y Zamora, F. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 4019–4025.
- Cerpa-Calderón, F.K. y Kennedy, J.A. Berry integrity and extraction of skin and seed proanthocyanidins during red wine fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56, 9006-9014.
- Charlton, A.; Baxter, N.; Khan, M.; Moir, A.; Haslam, E.; Davies, A. y Williamson, M. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 1593-1601.
- Cheyrier, V.; Prieur, C.; Guyot, S.; Rigaud, J. y Moutounet, M. The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins. En: *Wine- Nutritional and Therapeutic Benefits*, Watkins, T.R., (Ed.), ACS, Washington, DC, USA, **1997**, pp. 81-93.
- Cheyrier, V.; Remy, S. y Fulcrand, H. Mechanisms of anthocyanin and tannin changes during winemaking and aging. En: *The ASEV 50th Anniversary Annual Meeting*, Rautz, J., (Eds.), ASEV, Davis, CA, **2000**, pp. 337-344.
- Chira, K.; Schmaugh, G.; Saucier, C.; Febre, S. y Teissedre P.L. Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 545-553.
- Chira, K.; Lorraine, B.; Ky, I. y Teissedre, P. L. Tannin composition of Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes from the Bordeaux area for different vintages (2006 to 2009) and comparison to tannin profile of five 2009 vintage mediterranean grapes varieties. *Molecules*, **2011**, 16, 1519-1532.
- Chira, K.; Jourdes, M. y Teissedre, P. Cabernet Sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. *European Food Research and Technology*, **2012**, 234, 253-261.
- Cliff, M.; Stanich, K.; Edwards, J. y Saucier, C. Adding grape seed extract to wine affects astringency and other sensory attributes. *Journal of Food Quality*, **2012**, 35, 263-271.
- Clifford, M.N. Phenol-protein interactions and their possible significant for astringency. En: *Interactions of Food Components*. (Eds.), G.G. Birch and M.G. Lindley (Elsevier: London), **1998**, pp. 143-163.

- Condelli, N.; Dinella, C.; Cerone, A.; Monteleone, E. y Bertuccioli, M. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Chemistry*, **2006**, *17*, 96-107.
- Cortell, J. M.; Halbleib, M.; Gallagher, A. V.; Righetti, T. L. y Kennedy, J. A. Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir) and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, *53*, 5798-5808.
- Cosme, F.; Ricardo-da-Silva, J. M. y Laureano, O. Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry*, **2009**, *112*, 197-204.
- Couasnon, M. B. Une nouvelle technique: La macération préfermentaire à froid-extraction à la neige carbonique. Première partie: Résultats œnologiques. *Revue des Oenologues*, **1999**, *92*, 26-30.
- Czochanska, Z.; Foo, L.Y.; Newman, R.H. y Porter, J.L. Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units and molecular weight. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, **1980**, *1*, 2278-2286.
- Darné, G. Recherches sur la composition en anthocyanes des grappes et des feuilles de vigne. Ph.D. Thesis, University of Bordeaux I, France, **1991**.
- de Freitas, V. y Mateus, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, *49*, 940-945.
- de Wijk, R. A. y Prinz, J.F. The role of friction in perceived oral texture. *Food Quality and Preference*, **2005**, *16*, 121-129.
- del Llaudy, M.; Canals, R.; Canals, J. y Zamora, F. 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. *European Food Research and Technology*, **2008**, *226*, 337-344.
- Delgado, R.; Martín, P.; del Álamo, M. y González, M. Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2004**, *84*, 623-630.
- Delteil, D. La macération préfermentaire a froid (MPF) des raisins méditerranéens et rhodaniens. *Revue des Oenologues*, **2004**, *112*, 29-32.
- Demiglio, P. y Pickering, G.J. The influence of ethanol and pH on the taste and mouthfeel sensations elicited by red wine. *Journal of Food Agriculture and Environment*, **2008**, *6*, 143-150.

- Dick, A.J. y Bearne, S.L. Inhibition of beta-galactosidase of apple by flavanoids and other polyphenols. *Journal of Food Biochemistry*, **1988**, 12, 97-108.
- Dinnella, C.; Recchia, A.; Fia, G.; Bertuccioli, M. y Monteleone, E. Saliva characteristics and individual sensitivity to phenolic astringent stimuli. *Chemical Senses Journal*, **2009**, 34, 295-304.
- Downey, M.; Harvey, J. y Robinson, S. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2003**, 9, 15-27.
- Downey, M.; Harvey, J. y Robinson, S. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape Wine Research*, **2004**, 10, 55-73.
- Downey, M. y Hanlin, R. Comparison of ethanol and acetone mixtures for extraction of condensed tannin from grape skin. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **2010**, 31, 154-159.
- Ducasse, M.A. ; Canal-LLauberes, R.M. ; Lumley, M. Williams, P. ; Souquet, J.M.; Fulcrand, H.; Doco, T. y Cheynier, V. Effect of maceration enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wine. *Food Chemistry*, **2010**, 118, 369-376.
- Eschstruth, A. y Divol, B. Comparative characterization of endo-polygalacturonase (Pgl) from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* under winemaking conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2011**, 91, 623-634.
- Es-Safi, N.; Guyot, S. y Ducrot, P. NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS analysis of pear juice polymeric proanthocyanidins with potent free radical scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 6969-6977
- Felix, R. y Villettaz, J. Wine. En: *Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry*, Godfrey, T. y Reichelt, J. (Eds.), The Nature Press: New York, **1983**; pp. 410-421.
- Ferrari, S.; Parenti, A.; Spugnoli, P.; Calami, L. y Gori, C. Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovesi grape. *European Food Research and Technology*, **2004**, 218, 360-366.
- Ferrer-Gallego, R.; García-Marino, M.; Hernández-Hierro, J.; Rivas-Gonzalo, J. y Escribano-Bailón, M. Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 660, 22-28.
- Fischer, U. y Strasser, M. Tannin management. I. Body, fullness and ageing potential. *Deutsche- Weinmagazing*, **1999**, 18, 36-39.

- Flamini, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spectrometry Review*, **2003**, 22, 218–250.
- Flanzy, C. Fundamentos científicos y tecnológicos. Mundi-Prensa, Madrid, **1999**.
- Fournand, D.; Vicens, A.; Sidhoum, L.; Souquet J.; Moutounet. M. y Cheynier, V. Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 7331-7338.
- Francia-Aricha, E. M.; Guerra, M. T.; Rivas-Gonzalo, J. C. y Santos-Buelga, C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavonols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45, 2262-2266.
- Francis, G. ; Kerem, Z. ; Makkar, H. P. S. y Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, **2002**, 88, 587-605.
- Fulcrand, H.; Doco, T.; Es-Safi, N.; Cheynier, V. y Moutounet, M. Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *Journal of Chromatography* ,**1996**, 752, 85-91.
- Fulcrand, H.; Benabdejalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V. y Moutounet, M. A new class of wine pigments generated by reaction between piruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry* ,**1997**, 47, 1401-1407.
- Fulcrand, H.; Remy, S.; Souquet, J. M.; Cheynier, V. y Moutounet, M. Study of wine tannin oligomers by on-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 1023–1028.
- Fulcrand, H.; Dueñas, M.; Salas, E. y Cheynier, V. Phenolic reactions during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2006**, 57, 289-297.
- Gagne, S.; Saucier, C. y Geny, L. Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 9465-9471.
- Gawel, R. Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **1997**, 4, 74-95.
- Gawel, R.; Iland, P.G. y Francis, I.L. Characterizing the astringency of red wine: A case study. *Food Quality and Preference*,, **2001**, 12, 83-94.
- Geissman, T.A. y Yoshimura, N.N. Synthetic procyanidin. *Tetrahedron Letters*, **1966**, 2669-2673.

- Geny, L.; Saucier, C.; Bracco, S.; Daviaud, F. y Glories, Y. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, *51*, 8051-8054.
- Gil-Muñoz, R.; Gómez-Plaza, E.; Martínez, A. y López-Roca, J.M. Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation: influence of grape temperature. *Journal of Food Composition and Analysis*, **1999**, *12*, 259-272.
- Gil-Muñoz, R.; Moreno-Pérez, A.; Vila, R.; Fernández-Fernández, J.I.; Martínez-Cutillas, A. y Gómez-Plaza, E. Influence of low temperature prefermentative techniques on chromatic and phenolic characteristics of Syrah and Cabernet Sauvignon wines. *European Food Research and Technology*, **2009**, *288*, 777-788.
- Glories, Y. La couleur des vins rouges. 1^{ère} Partie. Les equilibres des anthocyanes et des tannins. *Connaissance de la Vigne et du vin*, **1984**, *18*, 253-271.
- Glories, Y. La maturità fenolica delle uve: primo parametro da controllare per una corretta vinificazione in rosso. *Vignevini*, **1999**, *3*, 46-50.
- Glories, Y. y Saucier, C. Tannin evolution from grape to wine. Effects on wine taste. In *The ASEV 50th Anniversary Annual Meeting*, Ratz, J., Ed.; ASEV: Davis, CA, **2000**; pp 353-355.
- Glories, Y.; Bouya, D.; Amrani Joutei, K.; Quazzani Ghadi, F. y Saucer, C. Examen en microscopie electronique de l'influence d'activites enzymatiques purifiees sur les parois cellulaires des pellicules de raisins. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **2003**, *37*, 23-30.
- Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J.M.; Martínez-Cutillas, A. y Fernández-Fernández, J.I. Phenolic compounds and color stability of red wines. Effect of skin maceration time. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2001**, *52*, 271-275.
- Gonzalez-Manzano, S.; Rivas-Gonzalo, C. y Santos-Buelga, C. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, *513*, 283-289.
- Gonzalez-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M.; Rivas-Gonzalo, J. y Escribano-Bailon, T. Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins. *European Food Research and Technology*, **2008**, *226*, 483-490.
- Green, B.G. Oral astringency: A tactile component of flavor. *Acta Psychologica*, **1993**, *84*, 119-125.
- Gu, L.; Kelm, M.; Hammerstone, J.F.; Beecher, G.; Cunningham, D.; Vannozzi, S. y Prior, R. Fractionation of polymeric procyanidins from Lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, *50*, 4852-4860.

- Guilloux, M. Evolution des composés phénoliques de la grappe pendant la maturation du raisin. Influence des facteurs naturels. Thèse 3^{ème} Cycle, University of Bordeaux II, France, **1981**.
- Gupta, R.K. y Haslam, E. Plant proanthocyanidins. Part 5. Sorghum polyphenols. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1978**, 892-896.
- Hagerman, A.E. y Butler, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1978**, 26, 809–812.
- Hagerman, A.E. y Butler, L.G. Assay of condensed tannins or flavonoid oligomers and related flavonoids in plants. *Methods in Enzymology*, **1994**, 234, 429-437.
- Hanlin, R. L. y Downey, M. O. Condensed Tannin Accumulation and Composition in Skin of Shiraz and Cabernet Sauvignon Grapes during Berry Development. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2009**, 60, 13-23.
- Hanlin, R.; Hrmova, M.; Harbertson, J. F. y Downey, M. Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2010**, 16, 179-188.
- Harbertson, J.F.; Kennedy, J.A. y Adams, D.O. Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2002**, 53, 54-59.
- Harbertson, J.F., Picciotto, E.A. y Adams, D.O. Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2003**, 54, 301–306.
- Harbertson, J. F.; Hodgins, R. E.; Thruston, R. N.; Schaffer, L. J.; Reid, M. S.; Landon, J. L.; Ross, C. F. y Adams, D. O. Variability of tannin concentration in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2008**, 59, 210-214.
- Harbertson, J. F. y Downey, M. Investigating differences in tannin values determined by methylcellulose and protein precipitation. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2009**, 60, 246-249.
- Haslam, E. y Lilley, T.H. Natural astringency in foodstuffs-A molecular interpretation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1988**, 27, 1-40.
- Haslam, E. Polyphenols: structure and biosynthesis. En: *Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action*. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, **1998**, pp. 35-42.

- Hayasaka, Y.; Waters, E.J.; Cheynier, V.; Herderich, M.J. y Vidal, S. Characterization of proanthocyanidins in grape seeds using electrospray mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **2003**, 17, 9–16.
- Heatherbell, D.; Dicey, M.; Goldsworthy, M.S. y Vanhanen, L. Effect of cold maceration on the composition, color, and flavour of Pinot noir wine. En: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Cool Climate Enology and Viticulture*. T. Henick-Kling et al. (Eds.). New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, **1996**, pp. 10-17.
- Hellín, P.; Ros, J.M. y Laencina, J. Changes in high and low molecular weight carbohydrates during *Rhizopus nigricans* cultivation on lemon peel. *Carbohydrate Polymers*, **2001**, 45, 169-174.
- Hemingway, R.W. Reactions at the interflavonoid bond of proanthocyanidins. En: *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*; Hemingway, R.W., Karchesy, J.J., (Eds.), Plenum Press; New York, **1989**, pp. 265-283.
- Hernández-Jiménez, A.; Gómez-Plaza, E.; Martínez-Cutillas, A. y Kennedy J.A. Grape skin and seeds proanthocyanidins from Monastrell x Syrah grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 10798-10803.
- Hernández-Jiménez, A.; Kennedy, J.; Bautista-Ortín, A. B. Y Gómez-Plaza, E. Effect of ethanol on grape seed proanthocyanin extraction. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2012**, 63, 57-63
- Ho, P.; Da Conceição, M.; Silva, M. y Hogg, T. A. Changes in the colour and phenolic composition during the early stages of maturation of port in wood, stainless steel and glass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2001**, 81, 1269-1280.
- Holton, T.A. y Cornish, E.C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, **1995**, 7, 1071-1083.
- Ittah, Y. Titration of tannin via alkaline-phosphatase activity. *Analytical Biochemistry*, **1991**, 192, 277-280.
- Jorgensen, E.M.; Marin, A.B. y Kennedy, J.A. Analysis of the oxidative degradation of proanthocyanidins under basic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 2292-2296.
- Joseph, R., Tanner, G. y Larkin, P. Proanthocyanidins synthesis in the forage legume *Onobrychis vicifolia*: a study of chalcone synthase, dihydroflavonol 4-reductase and leucoanthocyanidin 4-reductase in developing leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, **1998**, 25, 271-278.
- Jurd, L. y Lundin, R. Anthocyanidins and related compounds-XII. Tetramethylleucocyanidin-phloroglucinol and resorcinol condensation products. *Tetrahedron Letters*, **1967**, 2653-2661.

- Kallithraka, S.; Garcia-Viguera, C.; Bridle, P. y Bakker, J. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochemical Analysis*, **1995**, 6, 265-267.
- Kallithraka, S.; Bakker, J. y Clifford, M.N. Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and model solution. *Journal of Sensory Studies*, **1997**, 12, 25-37.
- Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M.N. y Vallis, L. Correlations between saliva protein composition and some T-I parameters of astringency. *Food Quality and Preference*, **2001**, 12, 145-152.
- Kantz, K. y Singleton, V. L. Isolation and determination of Polymeric Polyphenols in wines using Sephadex LH-20. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1991**, 42, 309-316.
- Karonen, M.; Loponen, J.; Ossipov, V. y Pihlaja, K. Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 522, 105-112.
- Kasai, N. y Nakatsubo, G. Size-exclusion chromatography of tea tannins and intercepting potentials of peptides for the inhibition of trypsin-caseinolytic activity by tea tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 5149-5156.
- Kassandra, S. y Kennedy, J. Relationship between red wine grade and phenolics. 2. Tannin composition and size. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 8409-8412.
- Katalinic, V. y Males, P. Compositional changes in grape polyphenols throughout maturation. *Journal of Wine Research*, **1997**, 8, 169-178.
- Kelm, A.; Chris, J. Robbins, R.J.; Hammerstone, J.F. y Schmitz, H.H. High-performed liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 1571-1576.
- Kennedy, J. A.; Matthews, M. A. y Waterhouse, A. L. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* **2000a**, 55, 77-85.
- Kennedy, J. A.; Troup, G.; Pilbrow, J.; Hutton, D.; Hewitt, D.; Hunter, C.; Ristic, R.; Iland, P. y Jones, G. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv Syraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2000b**, 6, 244-254.
- Kennedy, J.A. y Waterhouse, A.L. Analysis of pigmented high-molecular-mass grape phenolics using ion-pair, normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 866, 25-34.

- Kennedy, J.A.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E.J. y Jones, G.P. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, *49*, 5348-5355.
- Kennedy, J. A.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E. J. y Jones, G. P. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, *49*, 5348-5355.
- Kennedy, J. A. y Taylor, A. W. Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2003**, *995*, 99-107.
- Kennedy, J. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* **2008**, *35*, 107-120.
- King, M.; Cliff, M. y Hall, J. Effectiveness of the 'mouthfeel' wheel for the evaluation of astringent sub-qualities in British Columbia red wines. *Journal of Wine Research*, **2003**, *14*, 67-78.
- Klenar, I.; Berovic, M. y Wondra, M. Phenolic compounds from the fermentation of cultivars Cabernet Sauvignon and Merlot from the Slovenian Coastal region. *Food Technology and Biochemistry*, **2004**, *42*, 11-17.
- Kliewer, W. M. y Torres, R. E. Effect of controlled day and night temperatures on grape coloration. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1972**, *23*, 71-77.
- Kovac, V.; Alonso, E.; Bourzeix, M. y Revilla, E. Effects of several enological practices on the content of catechins and procyanidins in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1992**, *40*, 1953-1957.
- Koyama, K.; Goto-Yamamoto, N. y Hashizume, K. Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **2007**, *71*, 958-965.
- Kurumatani, M.; Fujita, R.; Tagashira, M.; Shoji, T.; Kanda, T.; Ikeda, M.; Shoji, A.; Yanagida, A.; Shibusawa, Y.; Shindo, H. y Ito, Y. Analysis of polyphenols from hop bract region using countercurrent chromatography (CCC). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2005**, *28*, 1971-1983.
- Lazarus, S.A.; Adamson, G.E.; Hammerstone, J.F. y Schmitz, H.H. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, *47*, 3693-3701.
- Le Bourvellec, C.; Guyot, S.; Renard, C.M. y Abbal, P. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**, *1672*, 192-202.

- Le Bourvellec, C.; Le Quere, J. M. y Renard, M.C.G. Impact of Noncovalent Interactions between Apple Condensed Tannins and Cell Walls on Their Transfer from Fruit to Juice: Studies in Model Suspensions and Application. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2007**, *55*, 7896-7904.
- Lee, J.; Kennedy, J. A.; Devlin, C.; Redhead, M. y Rennaker, C. Effect of early seed removal during fermentation on proanthocyanidin extraction in red wine: A commercial production example. *Food Chemistry*, **2008**, *107*, 1270-1273.
- Lesschaeve, I. Y Noble, A.C. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preference. *The American Journal of Clinic Nutrition*, **2005**, *81*, 330-335.
- Levengood, J. y Boulton, R. The variation in the color due to copigmentation in young Cabernet Sauvignon wines. En: *Red wine color. Revealing the mysteries*, ACS Symposium Series. 886, (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC., **2004**, pp. 35-52.
- Liu, Y. X.; Pan, Q. H.; Yan, G. y Duan, C. Changes of flavan-3-ols with different degrees of polymerization in seeds of 'Shiraz', 'Cabernet Sauvignon' and 'Marselan' grapes after veraison. *Molecules*, **2010**, *15*, 7763-7774.
- Llaudy, M.C.; Zamora, F.; Canals, R. y Cabanillas, P. La maceración prefermentativa en frío: efectos sobre la extracción de color y los compuestos fenólicos e influencia del nivel de maduración de la uva. *Revista de Enología de la Asociación Catalana de Enólogos*, **2005**, www.acenología.com.
- Llaudy, M.C.; Canals, R.; Canals, M.J. y Zamora, F. 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. *European Food Research and Technology*, **2008**, *226*, 337-344.
- Marles, M.A.S; Ray, H. y Gruber, M.Y. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry*, **2003**, *64*, 367-383.
- Martínez García, J.; Lopez Martin, R.; Santamaría Aquilue, P.; Barua González, M. Y Gutierrez Viguera, A. Efecto de la aplicación de taninos enológicos durante la maceración en la composición y estabilidad polifenólica de los vinos tintos. *Viticultura y Enología Profesional*, **2003**, *85*, 53-62.
- Mateus, N.; Marques, S.; Gonçalves, A.C.; Machado, J.M. y De Freitas, V. Evolution of anthocyanin compounds of Touriga Nacional and Touriga Francesa varieties from Douro Demarcated Region vineyards during ripening. En: *Proceedings of the First International Congress on Pigments in food Technology*, Sevilla, Spain, **1999**, 417-421.
- Mateus, N.; Marques, S.; Gonçalves, A.C.; Machado, J.M. y De Freitas, V. Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro Valley during ripening:

- Influence of cultivation altitude. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2001**, *52*, 115-121.
- Matthews, M. A. y Anderson, M. Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: responses to seasonal water deficits. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1988**, *39*, 313-320.
- Matthews, S.; Mila, I.; Scalbert, A.; Pollet, B.; Lapiere, C.; Hervé du Penhoat, C.L.M.; Ronaldo, C. y Donnelly, D.M.X. Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1997**, *45*, 1195-1201.
- Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Masuero, D. y Trainotti, D. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2009**, *15*, 27-35.
- McNabb, W.C.; Peters, J.S.; Foo, L.Y.; Waghorn, G.C. y Jackson, F.S. Effect of condensed tannins prepared from several forages on the *in vitro* precipitation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (Rubisco) protein and its digestion by trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1998**, *77*, 201-212.
- McRae, J. y Kennedy, J. Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: A review of current research. *Molecules* **2010**, *16*, 2348-2364.
- Mercurio, M. D.; Damberg, R. G.; Cozzolino, D.; Herderich, M. J. y Smith, P.A. Relationship between red wine grades and phenolics. 1. Tannin and total phenolics concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, *58*, 12313-12319.
- Monagas, M.; Gomez-Cordoves, C.; Bartolome, B.; Laureano, O. y Ricardo da Silva, J. M. Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2003**, *51*, 6475-6481.
- Montedoro, G. F. y Bertuccioli, M. Organoleptic importance of certain tannic fractions of aged red wines. *Development and Food Science*, **1988**, *17*, 687-696.
- Nanjo, F.; Goto, K.; Seto, R.; Suzuki, M.; Sakai, M. y Hara, Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, **1996**, *21*, 895-902.
- Nevest, A.; Spranger, I.; Zhaos, Y.; Leadrot, M. C. y Sun, B. Effect of addition of commercial grape seed tannins on phenolic composition, chromatic characteristics and antioxidant activity of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, *58*, 11775-11782.

- Nitao, J.K.; Birr, B.A.; Nair, M.G.; Herms, D.A. y Mattson, W.J. Rapid quantification of proanthocyanidins (condensed tannins) with a continuous flow analyser. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 2207-2214.
- Noble, A.C. Bitterness and astringency in wine. En: Bitterness in foods and beverages. (Eds.), Rousef, Elsevier, R.L., Amsterdam, **1990**, pp. 145-158.
- Obreque-Slier, E. ; Peña-Neira, A.; López-Solis, R.; Zamora-Marin, F.; Ricardo-da Silva, J. M. y Laureano, O. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carmémère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2010**, 58, 3591-3599.
- Obreque-Slier, E.; López-Solís, R.; Peña-Neira, A. y Zamora-Marín, F. Tannin-protein interaction is more closely associated with astringency than tannin-protein precipitation: experience with two oenological tannins and a gelatin. *International Journal of Food Science and Technology*, **2010**, 45, 2629-2636.
- Obreque-Slier, E.; Peña-Neira, A. y López-Solís, R. Interactions of enological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are affected by pH. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2011**, 45, 88-93.
- Ojeda, H.; Andary, C.; Kraeva, E.; Carbonneau, A. y Deloire, A. Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv Shiraz. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2002**, 53, 261-267.
- Oliva, J.; Azorín, P.; Cámara, M. A. y Barba, A. Incidencia de la adición de distintos taninos enológicos en el color de vinos tintos de Monastrell. *Alimentación, equipos y tecnología*, **2001**, 156, 87-92.
- Ortega-Regules, A.; Romero-Cascales, I.; López-Roca, J. M.; Ros-García, J. M. y Gómez-Plaza, E. Anthocyanin fingerprint of grapes: environmental and genetic variations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2006**, 86, 1460-1467.
- Ortega-Regules, A.; Romero-Cascales, I.; Ros-García, J. M.; López-Roca, J. M. y Gómez-Plaza, E. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analítica Chimica Acta* **2006**, 563, 26-32.
- Ortega-Regules, A.; Ros-García, J. M.; Bautista-Ortín, A. B.; López-Roca, J. M. y Gómez-Plaza, E. Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis vinifera* L.). *European Food Research and Technology*, **2008**, 227, 223-231.
- Oszmanski, J.; Romeyer, F.; Sapis, J. y Macheix, J. Grape seed phenolics: Extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1986**, 37, 7-12.

- Ough, C.S. y Berg, H.W. The effect of two commercial pectic enzymes on grape musts and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1974**, *25*, 108-211.
- Ough, C.S. y Crowell, E.A. Pectic-enzyme treatment of white grapes: temperature, variety and skin-contact time factors. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1979**, *30*, 22-27.
- Parenti, A.; Gori, C. y Bartolini, A.B. Criomaceraciones prefermentativa su uve Sangiovese : criogeni e metodiche a confronto. *Vignevini*, **2006**, *33*, 115-120.
- Parley, A. The Effect of Pre-Fermentation Enzyme Maceration on Extraction and Colour Stability in Pinot noir Wine. Thesis of Master Lincoln University, **1997**.
- Passos, C.P.; Cardoso, S.M.; Domingues, M.R.; Domingues, P., Silva, C.M. y Coimbra, M.A. Evidence for galloylated type-A procyanidins in grape seeds. *Food Chemistry*, **2007**, *105*, 1457-1467.
- Pastor del Río, J.L. y Kennedy, J.A. Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2006**, *57*, 125-132.
- Patterson, T. Seed tannin: a necessary evil. *Wines and Vines*, (Eds.), Columns, **2011**, pp. 56-59.
- Payne, C.; Bowyer, P.K.; Herderich, M. y Bastian, S.E.P. Interaction of astringent grape seed procyanidins with oral epithelial cells. *Food Chemistry*, **2009**, *115*, 551-557.
- Peyrot des Gachons y Kennedy, J.A. Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, *51*, 5877-5881
- Pietarinen, S.P.; Willför, S.M.; Vikström, F.A. y Holmbom, B.R. Aspen knots, a rich source of flavonoids. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **2006a**, *26*, 245-258.
- Pietarinen, S.P.; Willför, S.M.; Ahotupa, M.O.; Hemming, J.E. y Holmbom, B.R. Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *Journal of Wood Science*, **2006b**, *52*, 436-444.
- Pinelo, M.; Felipe Laurie, V. y Waterhouse, A. A simple method to separate red wine nonpolymeric and polymeric phenols by solid-phase extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, *54*, 2839-2844.
- Poncet-Legrand, C; Cabane, B.; Bautista-Ortín, A.; Carrillo, S.; Fulcrand, H.; Pérez, J. y Vernhet, A. Tannin-oxidation: Intra- versus intermolecular reactions. *Biomacromolecules*, **2010**, *11*, 2376-2386.

- Ponte, C.; Cravero, M.C.; Bonello, F.; Pazo Alvarez, M.C.; Olivero, M. y Di Stefano, R. La macerazione prefermentativa a freddo nella vinificazioni del Pinot Nero. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, **2004**, 57, 33-62.
- Porter, L.J.; Hrstich, L.N. y Chan, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, **1986**, 25, 223-230.
- Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V. y Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, **1994**, 36, 781-784.
- Revilla, I. y González-San José, M. L. Evolution during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: new anthocyanin pigment formation. *Journal of Wine Research*, **2001**, 12, 183-197.
- Ribereau-Gayon, P. Recherches technologiques sur les composés phenoliques des vins rouges II. Les facteurs de dissolution des composés phenoliques. *Vigne et Vin*, **1970**, 4, 133-144.
- Ribèreau-Gayon, P. y Glories, Y. Structure of condensed phenolic compounds in Vinifera grapes and wine. Influence of ripening and infection by *Botrytis cinera* on phenolic content. In *The Grape and Wine Centennial Symposium*, Rautz, J., Ed.; ASEV: Universidad de California, Davis, **1980**, pp. 228-233.
- Ribereau-Gayon, P.; Pontallier, P. y Glories, Y. Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1983**, 34, 505-516.
- Ribèreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A. y Dubourdieu, D. Handbook of enology, Volume 2: The chemistry of wine, Stabilization and treatments. John Wiley and sons, Ltd., Chichester, **1999**, pp. 129-186.
- Ricardo da Silva, J. M.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Cheminat, A. y Moutounet, M. Procyanidin dimers and trimers from grapes seeds. *Phytochemistry* **1991**, 30, 1259-1264.
- Ricardo da Silva, J. M.; Rosec, J.; Bourzeix, M.; Mourgues, J. y Moutounet, M. Dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvedre grapes and red wines. *Vitis*, **1992**, 31, 55-63.
- Rigaud, J.; Escribano-Bailon, M.T.; Prieur, C.; Souquet, J.-M. y Cheynier, V. Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. *Journal of Chromatography A*, **1993**, 654, 255-260.
- Ristic, R. e Iland, P.G. Relationships between seed and berry development of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2005**, 11, 43-58.

- Ristic, R.; Downey, M., Iland, P.G.; Bindon, K., Francis, I.L.; Herderich, M. y Robinson, S.P. Exclusion of sunlight from shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2007**, 13, 53-65.
- Robichaud, J.L. y Noble, A.C. Astringency and bitterness of selected phenolic in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1990**, 53, 343-353.
- Roby, G.; Harbertson, J. F.; Adams, D. O. y Matthews, M. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: anthocyanins and tannins. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2004**, 10, 100-107.
- Romero-Cascales, I.; Ortega-Regules, A.; López-Roca, J.M.; Fernández-Fernández, J.I. y Gómez-Plaza, E. Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2005**, 56, 212-219.
- Romero-Cascales, I. Extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino. Papel de los enzimas de maceración. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España, **2008**.
- Romero-Cascales, I.; Fernández-Fernández, J. I.; Ros-García, J. M.; López-Roca, J. M. y Gómez-Plaza, E. Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. *International Journal of Food Science and Technology*, **2008**, 43, 1295-1305.
- Romeyer, F. M.; Macheix, J. J. y Sapist, J. C. Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochemistry* **1986**, 25, 219-221.
- Ros, J.M.; Laencina, J.; Hellín, P.; Jordán, M.J.; Vila, R. y Rumpunen, K. Characterization of juice in fruits of different *Chaenomeles* species. *Food Science and Technology*, **2004**, 37, 301-307.
- Rossetti, D.; Bongaerts, J.H.H.; Wantling, E.; Stokes, J.R. y Williamson, A.M. Astringency of tea catechins: More than an oral lubrication tactile percept. *Food Hydrocolloid*, **2009**, 23, 1984-1992.
- Sacchi, K.; Bisson, L. F. y Adams, D. O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2005**, 56, 197-206.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N.; Augustin, M.; Vivas, N. y Glories, Y. A biochemical approach to the evolution of procyanidin in grape seeds during the ripening of red grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Merlot Noir). *Journal of Wine Research*, **1997**, 8, 159-167.
- Saint-Cricq, N.; Vivas, N. y Glories, Y. Maduración fenólica de las uvas tintas. Relación con la calidad de los vinos. Comparación entre los viñedos Merlot y Tempranillo. *La Semana Vitivinícola*, **1999**, 2748, 1126-1136.

- Sampaio, T.L.; Kennedy, J.A. y Carmo Vasconcelos, M. Use of microscale of fermentations in grape in wine research. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2007** 58, 534-539.
- Sarni Manchado, P.; Deleris, A.; Avallone, S.; Cheynier, V. y Moutounet, M. Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by protein used as fining agent in enology. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 81-86.
- Saucier, C.; Bourgeois, G.; Vitry, C.; Roux, D. y Glories, Y. Characterization of (+)-catechin-acetaldehyde polymers: a model for colloidal state of wine polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45, 1045-1049.
- Scudamore-Smith, P.; Hooper, R. y Mclaran, E. Color and phenolics changes of Cabernet Sauvignon wine made by simultaneous yeast/bacterial fermentation and extended pomace contact. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1990**, 41, 57-67.
- Shirley, B.W.; Hanley, S. y Goodman, H.M. Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two Arabidopsis transparent test mutations. *Plant Cell*, **1992**, 4, 333-347.
- Shoji, T.; Masumoto, S.; Moriichi, N.; Kanda, T. y Ohtake, Y. Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1102, 206-213
- Sims, C. y Bates, R.P. Effects of skin fermentation time on the phenols, ellagic acid sediment and sensory characteristics of a red *Vitis rotundifolia* wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1994**, 45, 56-62.
- Singleton, V. L. y Draper, D. E. The transfer of polyphenolic compounds from grape seed into wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1964**, 45, 34-40.
- Singleton, V. L. y Trouslade, E. White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1983**, 34, 27-34.
- Singleton, V.L. y Trouslade, E.K. Anthocyanin-Tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1992**, 43, 63-70.
- Souquet, J.; Cheynier, V.; Broussaud, F. y Moutounet, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, **1996**, 43, 509-512.
- Stafford, H.A. Pathway to proanthocyanidins (condensed tannins), flavan-3-ols, and unsubstituted flavans. En: *Flavonoid Metabolism*, Boca Raton (Eds.), Stafford HA, CRC Press FL, **1990**, pp. 63-100.

- Stevanato, R.; Fabris, S. y Momo, F. Enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 6287-6293.
- Sudraud, P. Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges. *Annals de Technologie Agricole* **1958**, 7, 203-208.
- Sun, B., Leandro, C., Ricardo-da-Silva, J. M., y Spranger, I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46, 1390–1396.
- Sun, B. S.; Pinto, T.; Leandro, M.; Ricardo-da-Silva, J. M. y Spranger, M. I. M. Transfer of catechins and proanthocyanidins from solid parts of the grape cluster into wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 179-184.
- Sun-Waterhouse, D.; Luberriaga, C.; Jin, D.; Wibisono, R.; Wadhaw, S. y Waterhouse, G. Juices, fibres and skin waste extracts from white, pink or red-fleshed apple genotypes as potential food ingredients. A comparative study. *Food and Bioprocess Technology*, **2012**, doi: 10.1007/s11947-011-0692-6.
- Tao Y. y Zhang, L. Characterization of polysaccharide–protein complexes by size-exclusion chromatography combined with three detectors. *Carbohydrate Research*, **2008**, 343, 2251-2257.
- Thomson, R.S.; Jacques, D.; Haslam, E. y Tanner, R.J.N. Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*, **1972**, 1387-1399.
- Thorngate, J. H. y Singleton, V. L. Localization of procyanidins in grape seeds. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1994**, 45, 259-262.
- Timberlake, C. F. y Bridle, P. Anthocyanins: Colour augmentation with catechin and acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1977**, 28, 539-544.
- Torchio, F.; Cagnasso, E.; Gerbi, V. y Rolle, L. Mechanical properties, phenolic composition and extractability indices of Barbera grapes of different soluble solids contents from several growing areas. *Analytica Chimica Acta*, **2010**, 660, 183-189.
- Treutter, D. Chemical-reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4 dimethylaminocinnamaldehyde. *Journal of Chromatography A*, **1989**, 467, 185-193.
- Treutter, D.; Santos-Buelga, C.; Gutmann, M. y Kolodziej, H. Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid-chromatography and chemical-reaction detection. *Journal of Chromatography A*, **1994**, 667, 290-297.

VII. Bibliografía

- Vidal, S.; Cartalade, D.; Souquet, J. M.; Fulcrand, H. y Cheynier, V. Changes in Proanthocyanidin Chain Length in Winelike Model Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, *50*, 2261-2266.
- Vidal, S.; Williams, P.; Doco, T.; Moutounet, M. y Pellerin, P. The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers* **2003**.
- Villamor, R.; Harbertson, J. F. y Ross, C. Influence of tannin concentration, storage temperature, and time on chemical and sensory properties of Cabernet Sauvignon and Merlot wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2009**, *60*, 442-449.
- Watson, B.; Goldberg, N.; Chen, H.; McDaniel, M. y Price, S. Effects of macerating pectinase enzymes on color, phenolic profile and sensory characteristics of Pinot Noir wines. En: *2nd Joint Burgundy-California-Oregon Winemaking Symposium*, Waterhouse, A. L., (Eds.), Davis, **1999**, pp. 36-44.
- Watson, B.T.; Chen, H.P. y Price, S. Maceration enzymes affect Oregon Pinot noir color and phenolic profiles. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2000**, *51*, 297.
- Winkel-Shirley, B. Flavonoid biosynthesis: a colourful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, **2001**, *126*, 485-493.
- Xie, D.Y.; Sharma, S.B.; Paiva, N.L., Ferreira, D. y Dixon, R.A. Role of anthocyanidin reductase, encoded by *Banyuls* in plant flavonoid biosynthesis. *Science*, **2003**, *299*, 396-399.
- Zamora, F. Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. AMV, Madrid, **2003**.
- Zent, J. B. y Inama, S. Influence of macerating enzymes on the quality and composition of red wines obtained from red Valpolicella wine grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1992**, *43*, 311.
- Zoecklein, B.; Pelanne, L.; Birkenmaier, S. y Reed, S. Impact of deslestage with partial seed removal. www.practicalwinery.com/julaug09/page1.htm, **2009**.