

EFFECTO DE LA TÉCNICA DE ULTRASONIDOS APLICADA A LA UVA PREVIAMENTE A LA MACERACIÓN-FERMENTACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA DE LOS VINOS OBTENIDOS

Acosta, Anette; Lizama, Victoria y Álvarez, M^a Inmaculada¹;

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado el efecto de la cavitación producida mediante sonicación, en la extracción de compuestos polifenólicos de uva tinta Bobal. Así pues se realizaron 11 ensayos, separados en dos bloques, con y sin maceración con hollejos, con tratamiento de sonicación de tipo pulsado o en continuo, con sus correspondientes testigos. Los resultados obtenidos reflejan una influencia marcada de la maceración con hollejos y el tratamiento de ultrasonidos en los valores intensidad colorante, índice de polifenoles totales, concentración de antocianos y taninos, así como en el grado medio de polimerización de los taninos extraídos. Los factores que más influyen en una mayor extracción de compuestos polifenólicos son la maceración con hollejos, en combinación con un tratamiento pulsado de ultrasonidos frente al tratamiento en continuo.

Palabras Clave: Polifenoles, ultrasonidos, taninos, uvas, antocianos, HPLC.

ABSTRACT

This paper studies the effect of cavitation produced by sonication in the extraction of polyphenolic compounds from Bobal red grape. Thus 11 trials separated into two groups; with and without maceration with the skins, with pulsed or continuous sonication, with their corresponding controls were performed. The results show a clear influence of the maceration with the skins and ultrasonic treatment in the values of color intensity, total polyphenols index, anthocyanins and tannins concentration, and the average degree of polymerization of the tannins extracted. The factors that most influence a greater extraction of polyphenolic compounds are maceration with the skins in combination with pulsed ultrasonic treatment, over continuous treatment.

Keywords: Polyphenols, ultrasound, tannins, grapes, anthocyanins HPLC.

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022- Valencia (España).

RESUM

En aquest treball s'ha estudiat l'efecte de la cavitació produïda mitjançant la sonicació, en l'extracció de compostos polifenòlics de raïm tinta Bobal. Així, doncs es van realitzar 11 assajos, separats en dos blocs, amb i sense maceració amb pellofes, amb tractament de sonicació de tipus polsat o en continu, amb els seus corresponents blancs o amb les seues referències corresponents. Els resultats obtinguts reflectixen una influència marcada de la maceració amb pellofes i el tractament d'ultrasons als valors d'intensitat de colorant, l'índex de polifenols totals, la concentració d'antocians i tanins, així com el grau mitjà de polimerització dels tanins extrems. Els factors que més influïxen en una major extracció de compostos polifenòlics són la maceració amb pellofes en combinació amb un tractament polsat d'ultrasons enfront del tractament en continu.

Paraules Clau: Polifenols, ultrasons, tanins, raïm, antocians, HPLC.

INTRODUCCION

Los polifenoles son compuestos bioactivos con gran capacidad antioxidante que han despertado un gran interés desde el punto de vista nutricional, por sus acciones no solo en estado de salud, sino en la prevención de las alteraciones funcionales y estructurales de diversas enfermedades. Los compuestos fenólicos se suelen clasificar en dos grandes grupos los no flavonoides y los flavonoides. De los flavonoides los de mayor influencia sobre el color, su evolución y otras características definitorias de la calidad del vino tinto, son los antocianos y flavanoles, este último se subdivide en catequinas y taninos condensados (Zamora, 2003).

Moléculas responsables del color en los vinos.

Los polifenoles son las sustancias responsables del color de la uva y, por lo tanto, de los vinos. La uva blanca produce sólo polifenoles amarillos, que son los llamados taninos y la tinta, además de los taninos, produce polifenoles rojos que son los llamados antocianos.

Los polifenoles no sólo afectan al color sino también al gusto. Los taninos son compuestos polifenólicos, que dan características gustativas de astringencia, sensación áspera en la boca. Sin embargo, se ha visto que los taninos reaccionan entre sí agrupándose y perdiendo astringencia, debido al envejecimiento del vino, ofreciendo así un sabor más suave.

Calidad del vino

La calidad de la uva es esencial para la calidad del producto final y ésta depende de numerosos factores, entre ellos, el grado de maduración. Durante la vinificación en tinto, la maceración es una etapa esencial para la obtención de vino con alto índice de color, ya que es durante esta etapa cuando son extraídos los compuestos fenólicos de las pieles y semillas. Pero

la extracción de estos compuestos no está siempre en relación directa con su contenido en la uva, pues uvas ricas en compuestos fenólicos no conducen necesariamente a vinos muy coloreados. Tres factores son indispensables para comprender este fenómeno: la localización de los compuestos fenólicos en las pieles, su evolución durante la maduración y su extractibilidad. Según Gonzalez-San jose y Diez (1992), Ribéreau Gayon et al. (1998a) y Guidoni et al. (2002), la síntesis de los compuestos fenólicos es una consecuencia colateral de la formación y acumulación de azúcares en el grano de uva.

Extractibilidad de los compuestos fenólicos

La extractibilidad de los antocianos está fuertemente condicionada por la degradación de las membranas y de las paredes celulares de las células del hollejo, mientras que la de los taninos, especialmente los de las semillas, depende menos de este factor (Saint-Cricq et al., 1998).

Además la simultaneidad entre la fermentación alcohólica y la maceración condiciona la extracción de los taninos, ya que estas moléculas son poco solubles en agua y más solubles en alcohol. A su vez, el alcohol tendría el efecto de disgregar las membranas vacuolares y celulares, facilitando la liberación de los taninos ligados (Glories y Saucier, 2000; Amrani Joutei y Glories, 1995).

Los ultrasonidos pueden definirse como ondas acústicas inaudibles de una frecuencia superior a 20 kHz. Se diferencian ultrasonidos de baja intensidad ($<1 \text{ W cm}^{-2}$, 0,1-20 MHz) o de alta intensidad ($10-1000 \text{ W cm}^{-2}$, $<0,1 \text{ MHz}$). Los primeros son excelentes para medir propiedades del medio en el que se propagan ya que no producen ninguna modificación. Los de alta intensidad, sin embargo, pueden provocar cambios físicos y químicos en el material en el que se aplican.

Los ultrasonidos son una herramienta bien conocida y probada para la extracción de material vegetal intracelular y compuestos aromáticos. La actividad mecánica de los ultrasonidos apoya la difusión de los disolventes en el tejido. Los ultrasonidos rompen de la pared mecánicamente por las fuerzas de cizalla, produciendo un efecto de cavitación en el líquido, facilitando así la transferencia de la célula en el solvente. La reducción del tamaño de partícula de la cavitación ultrasónica aumenta la superficie de contacto entre el sólido y la fase líquida; favoreciendo así la intensificación del sabor del vino mediante la extracción de compuestos fenólicos y aromáticos.

En los últimos años, varias técnicas de extracción han sido desarrolladas para la extracción de sustancias nutraceuticas de las plantas, como son los polifenoles, incluida la extracción mediante ultrasonidos, microondas, fluido supercrítico y disolvente acelerado (Wang y Weller, 2006). De estas distintas técnicas de extracción, es la de ultrasonidos la más barata, simple y una alternativa eficiente en comparación a las otras (Jing, Baoguo, Yanping, Yuan, y Xuehong, 2008).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la cavitación producida mediante sonicación en superficie radiante de 400 w a 25 kHz, puede provocar la degradación de las células del hollejo, facilitando la extracción de compuestos polifenólicos. Para cumplir con este objetivo la uva será sometida a distintos protocolos de sonicación.

MATERIALES Y METODOS

Tratamientos.

Para el ensayo se utilizó 800 g de uva, por tratamiento, de la variedad Bobal fueron despalilladas a mano, posteriormente trituradas mediante la trituradora doméstica Thermomix (modelo TM 31), a velocidad 1 y a un tiempo de 2 minutos. Posteriormente se sometió las muestras a 3 distintos tratamientos; sonicación de las muestras mediante superficie radiante de 400 W a 25 KHz, a tiempos de 0, 10 y 20 minutos de forma continua o pulsada (pulsos de 1 minuto). Además se sometió a prensado antes o después de la fermentación alcohólica.

De este proceso se obtuvieron 11 muestras, realizadas por triplicado, las cuales fueron agrupadas en función del tratamiento recibido. Se realizaron 33 microvinificaciones en tarros de vidrio o botellas dependiendo si éstas fueron maceradas o no con sus hollejos, en el caso de los tarros estas muestras realizaron la fermentación en maceración con sus hollejos; mientras que las de botellas fermentaron solo con el mosto, sin hollejos.

Así pues los 11 grupos, de los cuales hay 3 testigos, el primero sufre maceración con sus hollejos, pero no recibe tratamiento de ultrasonidos (0-N) y otros dos testigos que tampoco sufren tratamiento de ultrasonidos, ni maceración fermentativa con sus hollejos, por lo tanto son prensados prefermentativamente a intervalos de tiempo de 10 y 20 minutos (0-10S y 0-20S). De esto se obtuvieron las distintas codificaciones siendo la primera cifra el tratamiento de ultrasonidos continuo o pulsado, la segunda del prensado (S) o maceración con hollejos (N). Así pues se obtuvieron dos bloques: el primero de los que no sufrieron maceración con hollejos 0-10S, 0-20S, 10C-S, 10P-S, 20C-S, 20P-S; y por otro lado los que sí 0-N, 10C-N, 10P-N, 20C-N, 20P-N.

Posteriormente se añadió a las botellas y tarros 5 g/hL de anhídrido sulfuroso, antes de la fermentación. El mosto se inoculó con levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* previamente hidratada (20g/hL). Durante la maceración-fermentación se realizó un control diario de la densidad y de la temperatura (oscilando entre 27 y 28°C) y un bazuqueo de 10 minutos.

Se esperó hasta llegar a una densidad de aproximadamente 995 g/L, lo que nos indica que la fermentación alcohólica ha terminado y da paso a la fermentación maloláctica, por tal motivo se añadió bacterias lácticas del género *Oenococcus oeni*. La evolución de la fermentación maloláctica, se controla mediante cromatografía de papel (OIV, 1979).

Una vez terminada la fermentación maloláctica, los vinos se trasiegan y estabilizan agregando 30 mg/L de SO₂. Posteriormente los vinos se someten a estabilización natural y tras 30 días se trasiegan y conservan a 15°C.

Después de dos meses de su embotellado, los vinos se someterán a los análisis químicos para establecer el efecto de los distintos tratamientos sobre la concentración y evolución de los polifenoles, estos análisis se realizaron por triplicado.

Materiales

Determinaciones espectrofotométricas: se empleó un espectrofotómetro JASCO V-630 de doble haz UV-Visible (JASCO, Tokyo, Japón). Para cuantificar los antocianos pormenorizados, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC) marca JASCO modelo MD-2010 Plus, (JASCO, Tokyo, Japón) equipado con un detector Diodo Array LC-Net II/ADC (Tokyo, Japón). Para la determinación de los las coordenadas CieLab, se usó un espectrocolorímetro marca Minolta, modelo CM-3600d; Y

Sonicación: El equipo utilizado en el tratamiento de ultrasonidos, es un prototipo de planta piloto que consta de un depósito troncocónico de acero inoxidable en cuya base se instalaron 4 transductores de 100W-25 kHz y un generador externo. Las ondas de ultrasonidos se transmiten únicamente desde la base del depósito y se corresponde con una superficie radiante de 175 cm²

Métodos analíticos

La determinación de los parámetros convencionales de la madurez tecnológica de las uvas (densidad, grado Brix, pH, acidez total) se ha realizado siguiendo los métodos que se recogen en el Reglamento Oficial de la Unión Europea (OIV, 1979).

DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Determinación de la madurez polifenólica de las uvas: La madurez de la pulpa puede ser perfectamente válida para la determinación de la fecha de vendimia para la elaboración de vinos blancos, pero no sirve de referencia correcta en el caso de los vinos tintos, ya que la madurez de las semillas y de la piel no se correlaciona necesariamente con el grado de madurez de la pulpa. La madurez de la pulpa es la relación máxima entre el contenido de azúcares y acidez total, mientras que la madurez polifenólica nos indica la madurez óptima para la elaboración de vinos tintos de calidad.

Por tal motivo es absolutamente necesario definir el término de madurez fenólica, en contraposición a la madurez de la pulpa.

Determinación de la madurez de hollejos y pepitas por el método de Glories modificado por Saint-criq de Gaulejac: Se fundamenta en la extracción de los compuestos fenólicos de las uvas a dos pH distintos, a partir de un triturado de éstas. Por un lado a pH 1 se favorece la extracción de la práctica totalidad de los compuestos fenólicos de la uva, ya que ese pH tan ácido provoca la degradación de las células de los hollejos; y a pH 3,2 (próximo al pH real de las uvas) se accede a los compuestos fenólicos fácilmente extraíbles.

Intensidad colorante: Se define como el sumatorio de $A_{420} + A_{520} + A_{620}$ mediante análisis espectrofotométrico (Glories, 1978).

Índice de polifenoles totales: El Índice de Polifenoles Totales valora la totalidad de los compuestos polifenólicos de los vinos por medición de la absorbancia a la longitud de onda que escinde el grupo fenol. (Ribéreau-Gayon, 1979) La metodología consiste en diluir previamente el vino por un factor de 100 y medir la absorbancia del vino a 280 nm (UV) bajo 10 mm de paso óptico en una cubeta de cuarzo, frente al agua. El núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de onda.

Concentración de antocianos: Los antocianos son los responsables del color rojo azulado de la piel de uvas tintas y naturalmente del color del vino tinto; por otro lado, los polifenoles influyen directa o indirectamente sobre la característica de los vinos, confiriéndoles una gran parte de su estructura, su color y de sus propiedades sensoriales (Ribéreau-Gayón, 1979).

Concentración de taninos: Llamamos taninos a diversos compuestos fenólicos que tienen como característica común que precipitan con las proteínas en solución, y que ralentizan o inhiben las acciones enzimáticas por combinación directa con su fracción proteínica. En la uva y por tanto en los vinos que no han pasado por madera hay taninos condensados (procianidinas o proantocianidinas formados por monómeros y polímeros de catequinas) y ácido gálico (tanino hidrolizado), si los vinos han estado en madera aparece también ácido elágico (tanino hidrolizado).

Las proantocianidinas tienen la propiedad de ser transformables parcialmente en antocianidinas rojas por calentamiento en medio ácido. Este calentamiento conduce a la ruptura de ciertas uniones y a la formación de carbocationes que se transforman parcialmente en cianidina y catequinas si el medio es suficientemente oxidante (reacción de Bete-Smith). Este método consiste en utilizar ésta propiedad para la detección de taninos en el medio (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1966).

Índice de etanol: Los taninos al combinarse con sales inorgánicas, péptidos y con polisacáridos precipitan con facilidad con el etanol. Una forma

de determinar estos polifenoles combinados es aumentar el grado alcohólico del vino utilizando etanol del 96%. Este método nos indica el porcentaje de taninos combinados con sales, péptidos y polisacáridos (Glories, 1984).

Índice de DMACH: El proceso se basa en la estimación del grado de polimerización de los taninos de la uva y del vino, utilizando el aldehído p-dimetilaminoacimaldehído (D.M.A.C.H.) (Vivas, 1994).

Índice de PVPP: El Índice de Polivinilpirrolidona (PVPP) indica el porcentaje de antocianos combinados con los taninos. La mayor concentración de combinaciones antocianos-taninos justifica la mayor contribución de los antocianos al color (presentan un rojo más intenso y menor tonalidad azul), y sobre todo la estabilidad del color, evitan la oxidación de los antocianos, así como la disminución de la astringencia de los taninos (Blouin, 1977; Vivas et al., 1995).

Índice de Gelatina: El índice de gelatina valora el porcentaje de taninos capaces de reaccionar con las proteínas, es decir, los taninos astringentes. El valor del Índice aumenta con la astringencia (Glories, 1978).

Parámetros CIELab: Se obtienen a partir de las medidas de absorbancia del mosto, realizadas en el rango de longitudes de onda comprendidas entre 380 y 780 nm, con cubetas de 2 mm de espesor y referidas a un observador de 10°, un iluminante D65 y cubetas de 2 cm. Para ello se emplea un espectrofotómetro conectado a un ordenador con un programa específico de color (MIDAS) que realiza el cálculo directo de los parámetros Cielab L*, a*, b*, C* y H*.

Matiz: El matiz o la tonalidad es el parámetro que nos indica la importancia relativa del amarillo sobre el rojo, será el cociente entre A_{420} y A_{520} , expresado en tanto por ciento (Zamora, 2003).

DETERMINACIONES MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN FASE LÍQUIDA (HPLC)

La determinación de los antocianos pomenorizados se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución HPLC. Se lleva a cabo la cuantificación de delphinidina, cianidina, peonidina, petunidina y malvidina. Para ello, se empleó el equipo de HPLC JASCO serie MD-2010 Plus, (JASCO, Tokyo, Japón), equipado con un detector de Diode Array. La separación se efectuó mediante la columna Gemini NX de 250 x 4.6 mm de 5 μ m Phenomenex (Torrance, CA). Los solventes utilizados como fase móvil, fueron ácido fórmico 4.5% en agua bidestilada (Fase A) y acetonitrilo 100% (Fase B) a un flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección fue 20 μ L de muestra filtrada por filtro de celulosa de 0,45 μ m de tamaño de poro. El gradiente de utilizado es el siguiente, (% B): 10% de 0 a 10 min, 15% de 10 a 25 min, 0% de 25 a 30 min, 10 % de 30 a 40 min, y ha sido ligeramente modificado de el realizado por Hebrero *et al.* (1998). La detección se realizó a 520 nm de longitud de onda y se cuantificaron mediante una recta patrón

construida con distintas concentraciones de malvidina-3-glucósido (S-0911, Extrasynthèse, Genay, Francia) (Hebrero *et al.* 1989).

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Se utilizó el programa Statgraphics plus 5.1 para Windows con el fin de llevar a cabo en análisis normalizado de la varianza (ANOVA). El objetivo fue determinar si existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha determinado la composición inicial de la uva objeto de este estudio. En la tabla 1 podemos observar los valores medios obtenidos, y sus respectivas desviaciones estándar, de los parámetros convencionales; y en la tabla 2 la determinación de la madurez polifenólica de las uvas de partida.

Las determinaciones analíticas se han realizado por triplicado.

TABLA 1. Medias y desviaciones estándar de los grados Brix y densidad en la uva

Vino	° BRIX			Densidad (g/L)		
0-10S	21,9 a	±	0,1	1093,3 a	±	0,6
0-20S	21,9 a	±	0,3	1093,3 a	±	1,2
0-N	22,4 a	±	0,2	1095,0 a	±	1,0
10C-S	22,1 a	±	0,5	1094,0 a	±	2,0
10P-S	21,7 a	±	0,1	1092,3 a	±	0,6
20C-S	22,0 a	±	0,2	1093,7 a	±	0,6
20P-S	21,8 a	±	0,5	1092,7 a	±	2,3
10C-N	22,0 a	±	0,7	1093,3 a	±	2,9
10P-N	22,0 a	±	0,6	1093,7 a	±	2,5
20C-N	22,4 a	±	0,5	1095,3 a	±	2,3
20P-N	22,2 a	±	0,6	1094,7 a	±	2,1

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

En la tabla 1 se aprecian pocas diferencias respecto a los grados Brix y densidades de las distintas muestras, si bien es de destacar que se parte de unos valores algo superiores en algunas muestras, debido a la propia heterogeneidad de la materia prima, ya que aunque los granos fueron escogidos al azar en un mismo racimo se encuentran uvas con diferentes grado de madurez (°Brix), siendo las más maduras las de la parte superior del racimo y por lo tanto una mayor concentración de azúcares en comparación a las de la parte más inferior del racimo.

TABLA 2. Madurez polifenólica de las uvas

Parámetros polifenólicos totales y extraíbles		
	pH1	pH3,2
Intensidad Colorante	24,06 ± 1,44	10,10, ± 0,91
Antocianos (mg/L)	298,95 ± 14,91	136,29 ± 7,25
Índice de Polifenoles Totales	56,52 ± 1,90	42,71 ± 0,54
Polifenoles (mg/L)	862,70 ± 37,18	621,02 ± 16,11
Taninos (g/L)	0,81 ± 0,017	0,61 ± 0,03

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

A partir del análisis de la uva por la metodología de Saint Cricq (1999) en la tabla 2 podemos observar como la Intensidad Colorante de la uva objeto de este estudio no muestra unos valores muy elevados, al igual que sucede con la concentración de antocianos, y estos valores son proporcionalmente más bajos cuando analizamos el color y los antocianos extraíbles (los obtenidos a pH 3,2), que son los más representativos del comportamiento de estas uvas durante la vinificación. Esto da lugar a una baja extractibilidad de los antocianos y por tanto del color, que precisará técnicas de vinificación más drásticas de extracción.

TABLA 3. Parámetros de extractibilidad de las uvas

Parámetros de extractibilidad	
Extractibilidad del color (EC%)	57,99 ± 3,08
Extractibilidad antocianos (EA%)	54,31 ± 3,21
Extractibilidad polifenoles (EP%)	27,92 ± 3,01
Extractibilidad taninos (ET%)	22,13 ± 4,4
Madurez de pepitas (MP %)	75,87 ± 1,18

Por otro lado en la tabla 3 se puede observar el potencial de extracción de polifenoles totales es muy superior al de los antocianos, y su extractibilidad mucho mayor; siendo los taninos los polifenoles más abundantes, el comportamiento de éstos tiene que ser similar al de los polifenoles, observando en ellos una alta extractibilidad. Pero esta alta extractibilidad de taninos no nos permite conocer si es debida a los taninos de hollejos o a los de pepitas, pero posiblemente sean muy extraíbles los dos. La madurez de las pepitas nos indica el estado de madurez de sus taninos, y los altos valores observados indican una madurez deficiente. Por tanto, el hecho de que los taninos de pepitas sean verdes y extraíbles, es un problema importante que va a condicionar la extracción de éstos.

Por tanto las técnicas de extracción más adecuadas para estas uvas serían aquellas que potenciasen la extracción de antocianos, minimizando la extracción de los taninos de pepita, siendo las maceraciones prefermentativas muy interesantes ya que evitarían prolongar la maceración

fermentativa cuando la concentración de alcohol es elevada, que es cuando se extraen los taninos de pepita.

Evolución de los parámetros polifenólicos durante la fermentación

Con la finalidad de determinar si existen diferencias significativas en la extracción de compuestos polifenólicos entre los vinos procedentes de uvas sometidas a los distintos tratamientos con ultrasonidos con y sin maceración con sus hollejos; se ha determinado la composición de estos a lo largo de la fermentación alcohólica.

Todas las experiencias se realizaron por triplicado, y la determinación de los parámetros polifenólicos en cada una de las experiencias se realizaron también por triplicado, figurando en las tablas la media y desviación estándar de los análisis realizados para cada parámetro y en cada uno de los muestreos.

En la tabla 4 se recogen los valores de Intensidad Colorante durante los muestreos realizados a lo largo de la fermentación. Podemos observar dos bloques perfectamente diferenciados, los correspondientes a los vinos que no maceraron con sus hollejos (0-10S, 0-20S, 10C-S, 10P-S, 20C-S, 20 P-S) que tienen valores más bajos, y los correspondientes a los vinos que maceraron con sus hollejos (0-N, 10C-N, 10P-N, 20C-N, 20P-N).

TABLA 4. Medias, desviaciones estándar y ANOVA de los valores de Intensidad Colorante, durante la maceración

IC					
VINO	15/10/2013	18/10/2013	21/10/2013	23/10/2013	28/10/2013
0-10S	1,79 ± 0,24a	1,94 ± 0,26a	2,09 ± 0,40a	2,01 ± 0,17a	2,09 ± 0,24a
0-20S	1,81 ± 0,14a	2,11 ± 0,13a	1,88 ± 0,28a	1,83 ± 0,10a	1,79 ± 0,12a
0-N	1,83 ± 0,30a	9,87 ± 1,13b	24,06 ± 2,80b	19,36 ± 0,85b	17,94 ± 0,95c
10C-S	2,82 ± 0,03b	2,32 ± 0,34a	2,84 ± 0,17a	2,60 ± 0,30a	2,53 ± 0,40b
10P-S	2,43 ± 0,16b	2,74 ± 0,35a	2,61 ± 0,23a	2,60 ± 0,17a	2,56 ± 0,15b
20C-S	3,28 ± 0,11c	3,67 ± 0,26a	3,69 ± 0,15a	3,54 ± 0,39a	3,43 ± 0,13b
20P-S	3,25 ± 0,42c	3,06 ± 0,31a	3,01 ± 0,50a	3,00 ± 0,65a	2,79 ± 0,42b
10C-N	3,29 ± 1,21c	10,08 ± 1,06b	25,68 ± 2,35b	20,80 ± 3,91b	17,94 ± 0,28c
10P-N	2,22 ± 0,32ab	10,23 ± 0,71b	24,98 ± 1,99b	19,57 ± 1,33b	18,96 ± 1,41c
20C-N	3,06 ± 0,13bc	9,96 ± 2,40b	24,13 ± 0,64b	19,07 ± 1,27b	18,60 ± 0,35c
20P-N	2,76 ± 0,07b	10,34 ± 2,92b	23,66 ± 1,03b	19,71 ± 2,23b	18,50 ± 0,53c
F-ratio	584,83	28,81	221,61	106,44	584,31
P-value	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

Todos aquellos tratamientos sin maceración siguen una disminución paulatina de la intensidad colorante a lo largo de la fermentación debida a la oxidación, precipitación y adsorción de antocianos por las paredes celulares de las levaduras. Por otra parte, las muestras que fermentaron con sus hollejos (0-N, 10C-N, 10P-N, 20C-N, 20P-N) tienen un comportamiento

similar en cuanto a que la máxima intensidad colorante se produce en el sexto día de maceración.

Tal y como se observa en la tabla 4 inicialmente (15/10/2013) se produce un incremento de la intensidad colorante como consecuencia del tratamiento de ultrasonidos obteniendo valores de 1,79 en los ensayos sin tratamiento de sonicación y 3,28 con tratamiento de sonicación. Por tal motivo, se aprecia que los valores más altos de intensidad colorante se presentan en las muestras que recibieron tratamiento ultrasonidos, habiendo diferencias significativas entre ellas, destacando del grupo sin maceración la muestra 20C-S y de los que maceraron con sus hollejos 10P-N y 20C-N. Dicho comportamiento, puede atribuirse al sobrecalentamiento de la muestra inherente al tratamiento de ultrasonidos.

El descenso de intensidad colorante, es menos acusado en aquellos ensayos sin maceración que han sido sometidos al tratamiento de ultrasonidos, siendo proporcional su valor al tiempo de tratamiento de sonicación y en continuo sobre el tratamiento pulsado.

El matiz es la medida que nos indica la importancia del color amarillo sobre el rojo. La evolución del matiz durante la maceración sufre una disminución para luego aumentar en la conservación, esto se debe a las interacciones antociano-tanino. Como se puede apreciar en la tabla 5, este comportamiento esperado se cumple obteniendo valores más elevados el cuarto día de maceración (28/10/2013), debido a que las interacciones entre antocianos y taninos ya se están produciendo durante la maceración. Así pues, se observa en que las muestras no maceradas disminuyen ligeramente sus valores a lo largo del tiempo, debido a la baja concentración, por tal motivo habrá menores interacciones antociano-tanino, dando como resultado valores altos en comparación al grupo que maceró con sus hollejos, encontrándose diferencias significativas. En relación al bloque que maceró con sus hollejos, se observa una disminución acusada a lo largo del tiempo en los valores del matiz, esto se debe a que las interacciones antociano-tanino están teniendo lugar a lo largo de la maceración. Además como se aprecia en el bloque de los vinos que sufrieron maceración con hollejos, las muestras con tratamiento de ultrasonidos pulsado, presentan los valores ligeramente menores en relación a sus homólogos de su mismo bloque, como es el caso de 20P-N con 52,76 frente a 20C-N con 53,77, lo que saca a relucir el mayor efecto del tratamiento de sonicación pulsado en relación a la mayor extracción de compuestos polifenólicos.

TABLA 5. Medias, desviaciones estándar y ANOVA de los valores obtenidos de Matiz, durante la maceración

Matiz					
VINO	15/10/2013	18/10/2013	21/10/2013	23/10/2013	28/10/2013
0-10S	104,52 ± 5,48b	99,90 ± 5,04b	70,19 ± 2,47b	70,22 ± 0,73bc	81,44 ± 5,62bc
0-20S	102,46 ± 2,48c	91,79 ± 3,98b	70,20 ± 4,15b	71,94 ± 4,94bc	83,47 ± 4,30c
0-N	111,24 ± 7,06a	69,99 ± 8,45a	44,53 ± 1,20a	50,22 ± 3,77a	53,13 ± 2,46a
10C-S	100,69 ± 7,86b	88,99 ± 9,26b	68,39 ± 2,51b	71,50 ± 1,97bc	77,88 ± 2,54bc
10P-S	101,19 ± 10,96bc	98,69 ± 7,69b	68,93 ± 3,60b	72,56 ± 3,67bc	79,93 ± 3,57bc
20C-S	94,27 ± 3,16b	99,69 ± 9,96b	66,41 ± 2,29b	68,93 ± 3,62b	76,12 ± 2,31bc
20P-S	102,48 ± 9,70bc	100,78 ± 5,44b	68,10 ± 5,26b	75,21 ± 3,54c	78,28 ± 5,17bc
10C-N	105,75 ± 7,03a	61,20 ± 10,55a	45,70 ± 2,45a	53,03 ± 2,88a	54,05 ± 3,10a
10P-N	99,32 ± 9,72a	65,78 ± 1,47a	44,61 ± 1,01a	48,07 ± 2,27a	52,79 ± 1,38a
20C-N	94,74 ± 7,15a	64,45 ± 6,70a	45,04 ± 0,43a	50,98 ± 1,14a	53,77 ± 0,65a
20P-N	92,74 ± 11,94a	65,78 ± 8,17a	44,77 ± 0,26a	51,51 ± 2,02a	52,76 ± 0,23a
F-ratio	52,86	15,2	60,88	40,35	52,86
P-value	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

Como se puede observar en la tabla 6 la evolución del índice de polifenoles totales (IPT) durante la fermentación se mantiene prácticamente constante en los vinos sin maceración a lo largo de toda la fermentación. Así pues se aprecia que los valores iniciales de IPT son más altos en aquellas muestras sometidas al tratamiento de ultrasonidos, con respecto a los ensayos sin tratamiento, siendo al inicio mayor el efecto del tratamiento de ultrasonidos en continuo con respecto al tratamiento pulsado.

TABLA 6. Medias, desviaciones estándar y ANOVA de los valores de IPT, durante la maceración

IPT					
VINO	15/10/2013	18/10/2013	21/10/2013	23/10/2013	28/10/2013
0-10S	22,57 ± 2,17ab	22,84 ± 3,22a	21,14 ± 1,50a	22,48 ± 2,31ab	23,17 ± 3,37ab
0-20S	18,81 ± 4,86ab	24,18 ± 1,95a	18,3 ± 1,55ab	20,63 ± 1,42a	21,10 ± 1,29a
0-N	20,66 ± 2,35c	72,11 ± 1,74b	77,80 ± 2,65de	74,66 ± 9,12c	76,18 ± 4,16c
10C-S	27,35 ± 2,09ab	29,66 ± 4,64a	23,14 ± 2,55bc	23,49 ± 2,67ab	23,80 ± 3,10ab
10P-S	25,67 ± 1,08ab	27,25 ± 2,05a	23,09 ± 1,48bc	23,80 ± 2,39ab	24,07 ± 1,19ab
20C-S	30,30 ± 3,19b	27,95 ± 4,16a	26,64 ± 1,24c	28,22 ± 2,72b	28,92 ± 2,68b
20P-S	26,49 ± 3,30ab	25,87 ± 1,81a	24,74 ± 3,15abd	23,67 ± 3,66ab	24,43 ± 2,41ab
10C-N	27,92 ± 0,94d	73,53 ± 6,38b	73,03 ± 3,41de	86,73 ± 3,31d	87,73 ± 5,70d
10P-N	22,67 ± 3,46d	85,93 ± 1,76d	81,26 ± 3,96de	84,27 ± 4,05d	85,17 ± 3,02d
20C-N	30,11 ± 1,60d	76,83 ± 7,23bc	79,27 ± 0,70de	83,70 ± 2,45d	84,23 ± 3,77d
20P-N	27,17 ± 1,71d	80,95 ± 0,89cd	77,91 ± 1,37de	82,81 ± 2,06d	86,43 ± 9,80d
F-ratio	138,74	133,65	376,94	167,25	138,74
P-value	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

Como era de esperar, el máximo valor de IPT se encuentra al octavo día en aquellas muestras que han sido fermentadas con sus hollejos; encontrándose diferencias significativas entre la muestra no sometida a ningún tratamiento de ultrasonidos (0-N) con las que sí sufrieron dicho tratamiento, aunque el tiempo y tipo de tratamiento no provoca la aparición de diferencias significativas al final de la fermentación.

Composición final de los vinos

Una vez concluida la fermentación maloláctica, los vinos se embotellaron y se conservaron a 18°C durante 2 meses, determinándose a finales de enero su composición polifenólica.

En la tabla 7 se recogen las medias y desviación estándar y ANOVA de los parámetros relacionados con la concentración de polifenoles en el vino, y en la tabla 8 se observan las medias y desviación estándar y ANOVA de los parámetros relacionados con el estado de los polifenoles, y por último en las tablas 9, 10 y 11 los parámetros relacionados con el color en el vino.

TABLA 7. Medias, desviaciones estándar y diferencias significativas de los parámetros la concentración de polifenoles en el vino

VINO	IPT	TANINOS (g/L)	Antocianos (mg/L)
0-10S	16,4 ± 2,09 a	0,81 ± 0,08 a	24,65± 2,77 ab
0-20S	16,14 ± 0,83 a	0,77 ± 0,12 a	22,63 ± 1,35a
0-N	62,6 ± 1,66 bc	2,36 ± 0,34 b	316,39 ± 29,62 e
10C-S	18,16 ± 2,27 a	0,85 ± 0,26 a	35,87 ± 6,79 ab
10P-S	18,21 ± 0,88 a	0,83 ± 0,14 a	30,75 ± 2,70 ab
20C-S	20,38 ± 3,23 a	0,83 ± 0,15 a	43,26 ± 5,66 b
20P-S	16,14 ± 2,34 a	0,7 ± 0,17 a	30,87 ± 6,06 ab
10C-N	59,73 ± 9,76 b	2,33 ± 0,5 b	266,88 ± 52,51 c
10P-N	69,14 ± 5,29 c	2,71 ± 0,2 c	323,68 ± 26,04 e
20C-N	65,03 ± 0,3 bc	2,46 ± 0,17 b	297,25 ± 27,60 d
20P-N	65,55 ± 1,09 bc	2,78 ± 0,21 d	297,96 ± 6,80 d
F-ratio	105,92	128,44	376,32
P-value	0,0000	0,0000	0,0000

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

Como se observó en los anteriores parámetros iniciales analizados existe una clara diferencia entre bloques, destacando con valores más altos de composición polifenólica los que maceraron con sus hollejos, debido a que éstos aportan los polifenoles presentes en su piel y los taninos de las pepitas. Así pues en la tabla 7 se puede apreciar que existe una separación clara de los bloques con y sin maceración, apreciando diferencias

significativas entre estos; el bloque con maceración obtuvo los valores más altos de IPT, taninos y antocianos; obteniendo así valores ligeramente más altos en los que recibieron tratamiento de ultrasonidos pulsado, lo que confirma una vez más que existe una sinergia entre el tratamiento de ultrasonidos pulsado y la maceración que produce una mayor extracción de los compuestos polifenólicos. Prueba de esta hipótesis es la muestra 10P-N, con los valores más altos de IPT, taninos y antocianos.

En la tabla 8 se detallan los valores para los distintos índices estudiados en el trabajo, empezando por el índice de etanol, el cual se define como el porcentaje de taninos combinados con polisacáridos provenientes de los hollejos y/o de las paredes celulares de las levaduras, sin embargo en este estudio solamente se debe a las uvas, ya que los vinos no fueron sometidos a ningún proceso de crianza sobre lías. Los ensayos correspondientes a los vinos con menor concentración de taninos, es decir, aquellos que no fueron macerados, poseen una mayor proporción de taninos unidos a polisacáridos, sin aparecer un efecto claro del tratamiento de ultrasonidos, aunque en los ensayo de tratamiento de 20 minutos y pulsado, su contenido es mayor, pudiendo ser debido a que los ultrasonidos provoquen una mayor extracción de polisacáridos de los hollejos. Este resultado, no se observa en los ensayos sometidos a 20 minutos y pulsado con maceración, debido probablemente a que la mayor concentración de taninos haya provocado la precipitación de taninos con polisacáridos.

El índice de PVPP nos indica el porcentaje de taninos combinados con antocianos, lo que se traduce en una mayor estabilidad del color del vino; así pues los sometidos a ultrasonidos, después de dos meses de conservación son los que presentan los valores más altos de IPVPP, aunque correspondan a muestras con bajos valores de IC; por lo que es de prever que si se analizan los vinos tras un tiempo de conservación más largo, se encontrarían muchas diferencias en los valores de IPVPP, correspondiendo una mayor estabilidad a aquellos que tienen valores superiores de IC.

El índice de gelatina nos indica la proporción de taninos astringentes, y por lo tanto, con mayor capacidad de reaccionar con proteínas; éstos se extraen sobre todo en medio alcohólico. Es por ello, que aquellos vinos que hayan tenido maceración con los hollejos, tendrán una concentración de taninos mayor. Los resultados de índice de gelatina obtenidos, son directamente proporcionales a la concentración de taninos (tabla 7). El tratamiento de ultrasonidos, ha provocado diferencias significativas entre las muestras sonicadas y no maceradas, por lo que cabe pensar que las ondas ultrasónicas favorezcan la extracción de taninos de pepitas; sin embargo no existen diferencias significativas entre los ensayos sometidos a tratamiento de ultrasonidos y con maceración, con respecto al que ensayo que no tiene tratamiento de ultrasonidos (0-N) debido probablemente a que la presencia de alcohol en el medio durante la maceración provoca la extracción de taninos de las pepitas, compensando las diferencias iniciales. Lo que hace pensar que los ultrasonidos producen un aumento en la extracción de taninos de las pepitas; sin embargo en nuestros resultados no se obtienen

diferencias significativas entre la muestra testigo 0-N con respecto a los sonicados y macerados. Aunque no se observan diferencias entre algunos de los tratamientos sonicados continuos, independientemente del tiempo, 20C-N y 10C-N, con respecto al 0-N (sin tratamiento de ultrasonidos), pero si se aprecian diferencias significativas con respecto al tratamiento pulsado, siendo mayores los valores de 20 minutos respecto a los de 10 minutos.

Por último el índice de DMACH nos indica el grado de polimerización de los taninos, siendo su valor inversamente proporcional al tamaño de los taninos. Así pues, los vinos que tienen menores valores de este índice son los que corresponden a taninos con mayor grado de polimerización, en este caso aparecen en las muestras no sonicadas; aquellas muestras sonicadas y no maceradas presentan taninos con un grado de polimerización intermedio. Aunque no aparece una clara tendencia, los vinos con mayor contenido en taninos con menor grado polimerización corresponden a las muestras que han sido previamente sonicadas y maceradas, aunque no aparecen diferencias significativas con la testigo no macerada (0-N). Este comportamiento se debe a que en presencia de alcohol se favorece la extracción de taninos, se extraen de las partes sólidas, concretamente de las pepitas, que son los que poseen un menor grado de polimerización.

TABLA 8. Medias, desviaciones estándar y ANOVA de los parámetros polifenólicos relacionados con estado de los polifenoles

VINO	I. Etanol	I. PVPP	I. GELATINA	I. DMACH
0-10S	27,72 ± 6,44 bc	43,46 ± 6,19 bc	5,41 ± 5,27 b	41,18 ± 5,1 a
0-20S	26,44 ± 2,06 bc	40,81 ± 8,08 abc	6,58 ± 5,4 a	40,39 ± 8,95 a
0-N	27,47 ± 13,62 bce	35,38 ± 13,55 a	63,77 ± 5,11 c	59,08 ± 7,71 d
10C-S	28,14 ± 11,53 cd	40,82 ± 7,12 abc	9,49 ± 3,97 a	54,67 ± 12,49 bc
10P-S	27,78 ± 6,51 bce	38,47 ± 6,50 ab	10,32 ± 5,79 ab	47,04 ± 16,9 ab
20C-S	38,45 ± 2,99 e	40,9 ± 8,60 abc	12,28 ± 3,99 ab	45,12 ± 9,88 ab
20P-S	33,88 ± 7,99 de	43,53 ± 7,62 bc	11,47 ± 4,43 ab	39,35 ± 10,01 a
10C-N	22,45 ± 4,79 bc	47,12 ± 10,84 c	66,7 ± 5,71 c	66,22 ± 8,88 d
10P-N	23,59 ± 1,99 a	37,82 ± 8,75 ab	63,07 ± 6,36 c	59,60 ± 7,68 d
20C-N	21,2 ± 8,88 ab	41,25 ± 4,37 abc	63,87 ± 5,47 c	56,29 ± 11,89 cd
20P-N	25,97 ± 4,33 bc	35,56 ± 5,27 a	66,22 ± 5,02 c	52,86 ± 9,67 cd
F-ratio	6,39	1,64	20,19	8,19
P-value	0,0000	0,1092	0,0000	0,0000

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

En la tabla 9 se observa que los parámetros relacionados con el color han disminuido respecto al último valor obtenido justo antes de finalizar la fermentación. En relación a los valores de intensidad colorante se aprecia que los vinos que no sufrieron maceración con hollejos presentan valores menores de este parámetro, sin embargo dentro de este bloque existen diferencias significativas, ya que los vinos que no recibieron tratamiento de

ultrasonidos (0-10S y 0-20S) presentan menor coloración frente a los que sí recibieron el tratamiento, además destacan con valores superiores dentro del bloque los que sufrieron el tratamiento de forma pulsada frente a los de tratamiento de ultrasonidos en continuo.

Por otra parte el bloque de maceración obtuvo valores de IC mayores, lo que era de esperar, debido a que estuvieron en contacto con sus hollejos y pepitas, destacando que, al igual que en el otro bloque comentado, los que sufrieron tratamientos de ultrasonidos pulsados sobre los de tratamiento en continuo; lo que nos hace pensar que existe una relación directa entre el tratamiento de ultrasonidos pulsado y la mayor extracción de polifenoles, esto puede deberse a que entre cada pulsación de un minuto, existe un tiempo de reposo de 1 minuto, esto hace que el tratamiento sea más largo y que aumente la temperatura y que además haya una mayor difusión de los solutos en el medio. El aumento de temperatura producirá dos efectos una mayor extracción y una mayor oxidación que se traduce en un incremento de A_{420} y del matiz. Los valores mayores de matiz en los vinos no macerados, se debe a un proceso de oxidación de antocianos por la baja presencia de taninos (perdiéndose su actividad antioxidante). Los valores de matiz, resultan superiores en los vinos sometidos a ultrasonidos dentro del grupo de los no macerados, debido probablemente a la presencia de taninos que amortiguan la oxidación de antocianos.

TABLA 9. Medias, desviaciones estándar y ANOVA de los parámetros polifenólicos relacionados con los parámetros del color

VINO	A420	A 520	A620	IC	MATIZ
0-10S	1,5 ± 0,3 a	1,7 ± 0,4 a	0,5 ± 0,1 b	1,79 ± 0,28 a	88,25 ± 7,08b
0-20S	1,4 ± 0,1 a	1,6 ± 0,2 a	0,5 ± 0,1 b	1,75 ± 0,19 a	89,60 ± 5,69b
0-N	11,2 ± 0,3 cd	16,1 ± 0,7 cd	4,8 ± 0,2 a	16,01 ± 0,52 cd	69,60 ± 2,68a
10C-S	2,1 ± 0,4 ab	2,4 ± 0,4 ab	0,7 ± 0,2 b	2,57 ± 0,50 ab	86,74 ± 3,07b
10P-S	1,9 ± 0,1 ab	2,2 ± 0,2 ab	0,69 ± 0,06 b	2,45 ± 0,19 ab	88,67 ± 1,97b
20C-S	2,5 ± 0,2 b	3,1 ± 0,2 b	0,98 ± 0,07 b	3,29 ± 0,21 b	83,04 ± 3,49 b
20P-S	1,9 ± 0,2 ab	2,3 ± 0,4 ab	0,71 ± 0,11 b	2,48 ± 0,32 ab	87,61 ± 8,82 b
10C-N	11,3 ± 0,6 d	16,2 ± 0,8 d	5,17 ± 0,30 a	16,33 ± 0,58 d	70,27 ± 5,14 a
10P-N	11,1 ± 0,7 cd	16,6 ± 0,9 cd	5,12 ± 0,34 a	16,41 ± 1,00 d	67,04 ± 0,28 a
20C-N	10,8 ± 0,5 cd	15,7 ± 1,0 cd	4,90 ± 0,34 a	15,71 ± 0,89 cd	68,49 ± 2,75 a
20P-N	10,5 ± 0,5 c	15,4 ± 0,7 c	4,77 ± 0,18 a	15,32 ± 0,62 c	68,45 ± 3,47 a
F-ratio	436,99	413,28	369,8	499,49	14,21
P-value	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

La malvidina es el antociano mayoritario en la uva y por lo tanto en el vino. Mediante la aplicación de la técnica de HPLC, se han cuantificado las distintas antocianidinas, delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido. En la tabla 10 se aprecia que los valores obtenidos son normales siendo el

mayoritario la malvidina-3-glucósido. También se puede observar que sigue existiendo una clara diferenciación entre los bloques de vinos con y sin maceración, y dentro de estos últimos, aparecen diferencias significativas entre tratamientos pulsado y continuo. En el bloque de vinos sin maceración, las muestras que recibieron tratamiento de ultrasonidos de tipo continuo produjeron los valores más altos de malvidina-3-glucósido y siendo proporcional al tiempo de tratamiento. La aplicación de sonicación en continuo, (20 minutos), dio lugar a vinos con los mayores valores dentro del bloque de los no macerados; así pues la muestra 20C-S tiene un valor de 2,48 mg/L de malvidina-3-glucósido en comparación con la muestra 0-10S que tiene un valor de 1,43 mg/L de malvidina-3-glucósido.

TABLA 10. Medias, desviaciones estándar y ANOVA de los antocianos pormenorizados expresados en equivalentes de malvidina-3-glucosido.

Antocianos pormenorizados					
Vino	Delfinidina-3-glu (mg/L)	Cianidina-3-glu (mg/L)	Petunidina-3-glu (mg/L)	Peonidina-3-glu (mg/L)	Malvidina-3-glu (mg/L)
0-10S	0,00 ± 0,00a	0,11 ± 0,05a	0,17 ± 0,09a	0,00 ± 0,00a	1,43 ± 0,68a
0-20S	0,14 ± 0,12abc	4,51 ± 3,98bc	5,09 ± 4,49bc	1,58±1,41bc	1,89 ± 0,98a
0-N	0,09 ± 0,07abc	1,49 ± 2,31ab	1,81 ± 2,63ab	0,51±0,88ab	27,28 ± 6,53b
10C-S	0,02 ± 0,03ab	0,13 ± 0,02a	0,22 ± 0,05a	0 ± 0,00a	1,84 ± 0,35a
10P-S	0,00 ± 0,00a	0,12 ± 0,02a	0,19 ± 0,00a	0 ± 0,00a	1,49 ± 0,13a
20C-S	0,03 ± 0,03ab	0,14 ± 0,04a	0,29 ± 0,12a	0 ± 0,00a	2,48 ± 0,86a
20P-S	0,09 ± 0,12abc	1,97 ± 3,07ab	2,53 ± 3,81ab	0,75±1,30ab	2,35 ± 0,86a
10C-N	0,23 ± 0,03c	6,89 ± 1,5c	7,76 ± 1,25c	2,74 ± 0,84c	29,55 ± 4,14bc
10P-N	0,23 ± 0,01c	5,99 ± 0,40c	6,98 ± 0,23c	2,28 ± 0,1c	32,00 ± 1,18bc
20C-N	0,22 ± 0,04c	4,76 ± 0,82bc	5,72 ± 1,03bc	1,89±0,29bc	26,12 ± 4,22b
20P-N	0,16 ± 0,14bc	3,93 ± 3,34bc	4,59 ± 0,23bc	1,62±1,41bc	30,15 ± 1,73bc
F-ratio	3,7	4,89	4,68	4,66	78,34
P-value	0,0051	0,0009	0,0012	0,0013	0,0000

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

Por otra parte, el efecto de la maceración es claro y hace incrementar todos los antocianos, por la presencia de hollejos durante la fermentación y potenciado este efecto por los distintos tratamientos de ultrasonidos. Así pues se observa que las muestras tratadas con ultrasonidos durante 20 minutos presentan valores más bajos que las tratadas durante 10 minutos, aunque no aparecen diferencias significativas y lo mismo sucede en el ensayo 10C-N frente a 20C-N con 29,55 y 26,12 mg/L de malvidina-3-glucósido, respectivamente. Por otro lado en relación al tipo de tratamiento ultrasonidos, es decir, continuo o pulsado, se observa valores mayores en las muestras con tratamiento pulsado frente al continuo. Se puede concluir que la combinación de estos tres factores: tiempo, tratamiento pulsado o continuo y la maceración da lugar a un incremento de la concentración de malvidina-3-glucósido. Concretamente, en las muestras maceradas con menor tiempo y tratamiento pulsado, como es el caso de la muestra 10P-N

da lugar a 32,0 mg/L y la muestra 20P-N 30,15 mg/L de malvidina-3-glucósido, lo que confirma la hipótesis antes mencionada. El comportamiento de las demás fracciones de antocianidinas es muy similar al del mayoritario malvidina-3-glucósido.

En la tabla 11 se muestran los valores de los parámetros de color CieLab, los cuales como en las anteriores tablas presentan una diferenciación de bloques (con y sin tratamiento de sonicación). Se observa que los vinos no macerados y sonicados (0-10S, 0-20S, 10C-S, 10P-S, 20C-S, 20P-S) presentan un valor de luminosidad (L*) mayor en relación a los que sí fueron macerados (0-N, 10C-N, 10P-N, 20C-N, 20P-N), esto es de esperar, debido a que los no macerados presentan menor intensidad colorante (tabla 8). Así pues, los vinos que fueron macerados independientemente del tratamiento de ultrasonidos presentan menor luminosidad, es decir, mayor saturación, destacando de estos el color rojo (a*) sobre el amarillo (b*). Dentro de este bloque se aprecia que los vinos macerados con tratamiento de ultrasonidos pulsado presentan una mayor coloración frente a sus homólogos con tratamiento continuo, lo que confirma una vez más la estrecha relación entre el tratamiento de ultrasonidos pulsado y la mayor extractabilidad de compuestos polifenólicos.

TABLA 11. Medias, desviaciones estándar y ANOVA de los parámetros polifenólicos relacionados con los parámetros de color CieLab

VINO	CieLab								
	L*			a*			b*		
0-10S	41,50	± 5,59	d	48,66	± 2,94	d	26,07	± 0,67	b
0-20S	41,93	± 6,03	d	48,77	± 2,35	d	26,63	± 1,56	b
0-N	0,55	± 0,05	a	6,02	± 0,40	b	1,38	± 0,09	a
10C-S	29,30	± 5,80	c	48,64	± 1,61	d	31,12	± 2,78	e
10P-S	30,35	± 1,97	c	48,60	± 1,02	d	30,87	± 1,16	de
20C-S	19,88	± 1,76	b	46,33	± 1,12	c	28,71	± 1,67	c
20P-S	31,28	± 6,80	c	48,33	± 2,04	d	29,93	± 1,43	d
10C-N	0,49	± 0,20	a	2,75	± 1,38	a	0,60	± 0,35	a
10P-N	0,49	± 0,11	a	2,75	± 0,69	a	0,62	± 0,16	a
20C-N	0,46	± 0,09	a	2,52	± 0,62	a	0,52	± 0,20	a
20P-N	0,51	± 0,06	a	2,86	± 0,36	a	0,62	± 0,09	a
F-ratio	264,73			2758			1692,29		
P-value	0,0000			0,0000			0,0000		

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas al 95%

CONCLUSIONES

1. Se comprueba la efectividad de la aplicación de ultrasonidos, en la uva despalillada y estrujada, en la mejora de la extractibilidad de los compuestos polifenólicos. Así pues, en relación a los parámetros polifenólicos cuantificados durante la fermentación (IC, IPT y matiz), los resultados indican una mayor extractibilidad mediante el uso del tratamiento de ultrasonidos en continuo sobre el pulsado.
2. La mayor extracción de compuestos polifenólicos se logra sometiendo a los vinos a maceración con sus hollejos y a un tratamiento de ultrasonidos de tipo pulsado, esto se debe a que el tratamiento de tipo pulsado produce un aumento de la temperatura y esto producirá dos efectos, una mayor extracción y una mayor oxidación. Así de este estudio se concluye que la mejor conjunción de las variables es el tratamiento de ultrasonidos de tipo pulsado durante 10 minutos (10P-N).
3. En el caso de los vinos sin maceración, la mayor extracción de compuestos polifenólicos se consigue con tratamiento de ultrasonidos de tipo continuo y por un periodo de tiempo de 20 minutos.
4. Después de dos meses de conservación, se observa que tanto el índice de polifenoles totales (IPT), concentración de antocianos y de taninos, es superior en las muestras sometidas a maceración con sus hollejos en los distintos tratamientos aplicados, sobresaliendo en las muestras con maceración, las muestras sometidas a ultrasonidos de tipo pulsado y a un tiempo de 10 minutos.
5. La técnica de sonicación favorece la extracción de taninos de los hollejos y también de pepitas, haciendo incrementar la astringencia cuantificada por el Índice de gelatina, sin embargo, la maceración compensa las diferencias iniciales, aunque el valor más alto se obtiene en el ensayo 10P-N.
6. El grado de polimerización de taninos, en los vinos no macerados y no sonicados es mayor, mientras que los sonicados y no macerados presentan un grado de polimerización intermedio, y por último aunque no aparece una clara tendencia, los vinos con taninos de menor grado polimerización son los que han sido previamente sonicados y macerados, este comportamiento se debe a que los taninos presentes en las partes sólidas, pepitas, se extraen con mayor facilidad en medio alcohólico.
7. En relación a los parámetros relacionados con el color en el vino (IC, matiz, antocianos pormenorizados y parámetros CIElab), los vinos sometidos a maceración y a tratamiento de ultrasonidos de tipo pulsado, presentan una mayor coloración, sobresaliendo el ensayo 10P-N. Así pues, presentan una mayor intensidad colorante, un valor de matiz, debido a que la presencia de taninos amortigua la oxidación de antocianos.

BIBLIOGRAFIA

- Aleixandre, J, Álvarez, I, 2003. Tecnología enológica. Ed. Síntesis. Madrid.
- Amrani Joutei, K.; Glories, Y. (1995). Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Rev.Fr.Oenol.* 153, 28-31.
- Bautista, A. 2005. Técnicas enológicas para la obtención de vinos de Monastrell de alto contenido polifenólico. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Fuster, A.; Escot, S. 2002. Élevage des vins rouges sur lies fines: choix de la levure fermentaire et ses conséquences sur les interactions polysaccharyles pariétaux/polyphénols. *Rev. OEnol.*, 104: 20-22.
- Galvin, C (1993) Etude de certaines réactions de dégradation des anthocyanes et leurs condensation avec les flavanols ; conséquences sur la couleur des vins. Tesis Doctoral, Univ. de Bordeaux II.
- Glories, Y. 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. Thèse a L'Université de Bordeaux II.
- Glories, Y.; Saucier, C. (2000). Tannin evolution from grape to wine. Effects on wine taste. En: *The ASEV 50th Anniversary Annual Meeting*, Rautz, J. (Ed.), ASEV, Davis, CA, 353-355.
- Gonzalez-san José, M. L.; Diez, C.; 1992: Relationship between anthocyanins and sugars during the ripening of grape berries. *Food Chem.* 43, 193-197.
- Guidoni, S.; allara, P.; Schubert, A.; 2002: Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 224-226.
- Hebrero, E., C. Garcia-Rodriguez, C. Santos-Buelga and J. C. Rivas-Gonzalo. 1989. Analysis of anthocyanins by high performance liquid chromatography-diode array spectroscopy in a hybrid grape variety (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* 41B). *Am. J. Enol. Vitic.* 40:283-291.
- Jing W, Baoguo S, Yanping C, Yuan T, Xuehong L. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem.* 2008;106:804–10.
- Méndez, J 2005. Estudio de la maduración fenólica y antocianica en uvas tintas de bobal para diferentes condiciones agrológicas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- OIV (1979) Recopilación de los Métodos Internacionales de Análisis de Vinos. Madrid: Ministerio de Agricultura.
- Ribéreau-Gayon, J.; Peynaud, E.; Sudraud, J; Ribéreau-Gayon, P. 1987. *Tratado de Enología. Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones.* Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Ribéreau-Gayon, Glories, Y , Maujean, A, Dubourdieu, D. 1998. *Tratado de Enología. Tomo II: Química del vino. Estabilización y tratamiento de los vinos.* Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Ribéreau-Gayon, P. y Stonestreet, E. 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.*, 9: 119-142.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N., Vivas, N. et Glories, Y. 1998. Maturité phénolique: définition et contrôle. *R. F. OE.* 173: 22-25.
- Santos-Buelga, C, Escribano-Bailon, M, Lattanzio, V, 2010. Recent advances in polyphenol research. Ed. Blackwell Publishing. Estados Unidos.
- Vivas, N., Laguerre, M., Glories, Y., Bourgeois, G. & Vitry, C., 1995. Structure simulation of two ellagitannins from *Quercus robur* L. *Phytochemistry* 39, 1193- 1199.
- Yang T, Di, W, Qing-An, Z, Da-Wen, S. 2014. Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(2):706–715.
- Weller, C.L., Wang, L.J., Hwang, K.T., Carr, T.P., Cuppett, S.L. and Schlegel, V.L. 2006. Lipid Nutraceuticals from Cereal Grains and Oilseeds. *International Symposium on Healthcare Technology Development*, January Chonbuk National University, Jeonju, Korea. January 19-21.
- Zamora, F.2003. Elaboración y crianza del vino tinto:Aspectos científicos y prácticos. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.