

APLICACIÓN DE COPIGMENTOS EN CAMPO Y ANTES DE LA FERMENTACIÓN: INCIDENCIA DE LA ADICIÓN DE COPIGMENTOS Y DE LA MACERACIÓN PREFERMENTATIVA EN LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA DE LOS VINOS DE MONASTRELL

MASTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

JUAN ALBERTO ANAYA MARTÍNEZ

DIRECTORES:

María Inmaculada Álvarez Cano

María José García Esparza

CENTRO:

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Universidad Politécnica de Valencia

“APLICACIÓN DE COPIGMENTOS EN CAMPO Y ANTES DE LA FERMENTACIÓN: INCIDENCIA DE LA ADICIÓN DE COPIGMENTOS Y DE LA MACERACIÓN PREFERMENTATIVA EN LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA DE LOS VINOS DE MONASTRELL”

Anaya, J.A.; Álvarez, I.; García, M.J.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es mejorar la calidad polifenólica de los vinos de Monastrell sin tener que recurrir a la sobremaduración de las uvas. Para ello se ha evaluado el color y el equilibrio polifenólico de los vinos procedentes de uvas tratadas con aplicación en campo de extractos vegetales ricos en copigmentos (extracto de té verde, extracto de romero, extracto de trigo sarraceno), con aplicación en campo y con adición prefermentativa de los copigmentos rutina, ácido cafeico y catequina, valorándose también el efecto de la vinificación tradicional y de la vinificación con maceración prefermentativa en frío, en el color y la composición antocianica y tánica de los vinos de Monastrell. Los resultados obtenidos muestran que la aplicación de extractos vegetales y copigmentos en campo producen un efecto similar, siendo más efectiva la adición prefermentativa de copigmentos. El extracto de trigo sarraceno, rico en rutina, incrementa la concentración de antocianos y el color del vino. El extracto de té verde, rico en catequina, no incrementa el color aunque eleva la concentración total de antocianos y el color debido a los antocianos copigmentados. El extracto de romero, rico en ácido cafeico, aumenta el color pero éste es más inestable. La maceración prefermentativa en frío no afecta al color, pero sí aumenta la concentración polifenólica de los vinos.

PALABRAS CLAVE: Monastrell, adición prefermentativa, copigmentos, extractos vegetales y polifenoles.

RESUM

L'objectiu d'aquest treball és millorar la qualitat polifenòlica dels vins de Monastrell sense haver de recórrer a la sobremaduració del raïm. Per això s'ha avaluat el color i l'equilibri polifenòlic dels vins procedents de raïm tractats amb aplicació en camp d'extractes vegetals rics en copigments (extracte de te verd, extracte de romer, extracte de blat sarraí), amb aplicació en camp i amb addició prefermentativa dels copigments rutina, àcid cafeic i catequina, i es valorarà també l'efecte de la vinificació tradicional i de la vinificació amb maceració prefermentativa en fred, en el color i la composició antocianica i tánica dels vins de Monastrell. Els resultats obtinguts mostren

que l'aplicació d'extractes vegetals i copigments en camp produeixen un efecte similar, siguen més efectiva l'addició prefermentativa de copigments. L'extracte de blat sarraí, ric en rutina, incrementa la concentració d'antocians i el color del vi. L'extracte de te verd, ric en catequina, no incrementa el color encara que eleva la concentració total d'antocians i el color a causa dels antocians copigmentats. L'extracte de romer, ric en àcid cafeic, augmenta el color però aquest és més inestable. La maceració prefermentativa en fred no afecta el color, però sí augmenta la concentració polifenòlica dels vins.

PARAULES CLAU: Monastrell, addició prefermentativa, copigments, extractes vegetals i polifenols.

ABSTRACT

The aim of this work is to improve the polyphenolic quality Monastrell wines. To get this objective it is going to be evaluated the possible colour improvement and phenolic equilibrium of Monastrell red wines by application in vineyard of vegetal extracts rich in copigments (green tea extract, rosemary extract, buckwheat extract), and by the application in vineyard and prefermentation addition in must of copigments rutin, caffeic acid and catechin, evaluating too the effect of traditional winemaker and prefermentative maceration to low temperature on the color, anthocyanin and tannic composition of Monastrell red wines. The results show to apply in vineyard vegetal extracts and copigments are the same but prefermentation addition of copigments is better. Buckwheat extract, rich in rutin, improves anthocyanins concentration and wine Monastrell colour. Green tea extract, rich in catechin, doesn't improve wine colour but increase anthocyanins total concentration and copigmentate fraction of color. Rosemary extract, rich in caffeic acid, improves wine colour but this is unstable. Prefermentative maceration doesn't affect wine colour but improves its polyphenolic concentration.

KEY WORDS: Monastrell, prefermentation addition, copigments, vegetal extracts y polyphenols.

INTRODUCCIÓN

El color es una de las características organolépticas más importantes para el consumidor a la hora de apreciar un vino. El color puede considerarse como la tarjeta de visita de los vinos tintos, la cual debe ser necesariamente atrayente y estable, dado que la empresa elabora los vinos para venderlos. Además, el mercado actual exige vinos de gran intensidad de color, con importante predominancia de matices rojos y azulados, y que mantengan estas características en el tiempo (Zamora, 2003).

La composición fenólica es determinante en las propiedades organolépticas de los vinos tintos. Los antocianos extraídos del hollejo de la uva durante la maceración son los compuestos que mayor influencia tienen en el color rojo de los vinos, siendo responsables también de los tonos azules, púrpuras y morados (Mazza y Brouillard, 1990). Es generalmente aceptado que el incremento de color y de la estructura fenólica de los vinos va acompañado de un incremento de la calidad de éstos. Las técnicas de cultivo empleadas en el viñedo, la variedad de uva, su grado de madurez, y las técnicas de vinificación aplicadas, determinan la concentración y composición en polifenoles de los vinos, determinando, por tanto, el color del vino.

Los antocianos se almacenan en las uvas tintas durante su maduración. Localizados habitualmente en el hollejo y en las 3 ó 4 primeras capas celulares del hipodermo, estos pigmentos se encuentran también en el seno de la pulpa en las cepas tintoreras. A nivel subcelular, se encuentran en las vacuolas, en orgánulos especializados definidos como antocianoplastos (Peckett y Small, 1980).

Desde un punto de vista general, la estructura de los antocianos se caracteriza por dos anillos bencénicos unidos por un anillo heterocíclico que va a poder ser del tipo pirano o pirilio. Los antocianos se diferencian por sus niveles de hidroxilación y de metilación, por la naturaleza, el número y la posición de las osas unidas a la molécula (glicósidos de núcleo flavilium polihidroxilado y/o metoxilado), y también por la naturaleza y el número de los ácidos que esterifican los azúcares. La variabilidad creada por esta diversidad de estructura y la coexistencia de estas distintas moléculas en el seno de una misma planta, permite discriminar género y especie (Mazza y Miniati, 1993). Los antocianos, por hidrólisis dan lugar a un azúcar (glucosa, galactosa, ramnosa) y una aglúcona denominada antocianidina o antocianidol.

En *Vitis vinifera* encontramos monoglucósidos de Malvidina, Petunidina, Delfinidina, Peonidina, Cianidina,. De ellos, la malvidina 3-glucósido y sus derivados son los máximos responsable del color del vino tinto (Cacho, 2003). En estudios realizados sobre composición antociánica de diferentes cepas de *V. vinifera*, el contenido global (de 500 mg/kg hasta 3.000 mg/Kg) y los niveles de cada antociano varían individualmente para cada variedad. Los principales ácidos que esterifican el azúcar, en posición 6, son en la *V. vinifera* el ácido acético, el ácido p-cumárico y el ácido cafeico. El reparto de los antocianos ha conducido a clasificaciones establecidas según los contenidos en monoglucósidos, y en ésteres acéticos y cinámicos (Roggero

et al., 1986). A título de ejemplos, la variedad *Cabernet sauvignon* se distingue de la variedad *Syrah* por un nivel superior de 3-glucósido de malvidol acetilado, mientras que la variedad *Pinot noir* no comprende ningún antociano acilado. Además, los niveles relativos de antocianos pueden variar en función de la temperatura, de las condiciones de insolación y también del terreno (Larice et al., 1989).

El color de los vinos tintos depende de la concentración de antocianos, pero también de su estado en el vino, estado que depende de varios factores, siendo uno de ellos el fenómeno de la copigmentación. La copigmentación se define como la asociación entre antocianos y otros compuestos fenólicos menos coloreados, dando lugar a una estructura compleja que aumenta la intensidad del color rojo del vino. Este efecto es muy importante en los vinos jóvenes, ya que es el responsable del 30-50% de su color. La reacción de copigmentación de los antocianos fue reportada por primera vez por Robinson y Robinson en 1931. La copigmentación es un equilibrio que implica la asociación preferencial y no covalente de los antocianos libres con un grupo de componentes, fenólicos o no, que se denominan copigmentos (sustancias poco coloreadas o incoloras), para formar complejos de apilamiento vertical tipo "sándwich" (Boulton, 2001). Su unión se mantiene por enlaces de baja energía, de tipo Van der Waals, y su estabilidad se debe a la disposición de las moléculas de azúcar del antociano en la parte externa, entre las cuales se establecen uniones mediante puentes de hidrógeno, impidiendo el acceso de las moléculas de agua al interior de estos complejos, protegiendo de este modo a los antocianos de la hidratación, y haciendo que los equilibrios se desplacen hacia las formas coloreadas (Santos-Buelga et al., 2001). Los copigmentos poseen sistemas capaces de asociarse con el ión flavilium, lo que los protege del ataque nucleofílico del agua (Bakowska et al., 2002) impidiendo que éstas alcancen al antociano, lo hidraten y lo decoloren. Dado que el ataque por el agua convierte al ión flavilium en la pseudobase no coloreada, se cree que la copigmentación es uno de los principales factores de estabilización de la estructura del flavilium in vivo (Osawa, 1982; Brouillard, 1983). Además, los copigmentos pueden formar complejos coloreados con las formas incoloras de los antocianos (Baranac et al. 1996, 1997 a, b, c; Brouillard et al 1989). Los cambios de color que se producen en frutos, vegetales y flores pueden ser atribuidos a estas reacciones (Asen et al 1972; Mistry et al 1991; Davies y Mazza, 1993).

Las reacciones de copigmentación actúan sobre la coloración de los antocianos, mediante un efecto hiperocrómico y un efecto batocrómico (Baranowski y Nagel, 1983; Brouillard et al., 1989; Bloor y Falshaw, 2000). Un incremento en la concentración de copigmentos produce una intensificación del color, debido al desplazamiento de las formas menos coloreadas de los antocianos libres hacia las formas coloreadas y, además, los propios antocianos copigmentados que se forman aportan mayor intensidad colorante que el catión flavilio. Las moléculas que actúan como copigmentos incluyen gran variedad de compuestos, que deben adoptar una configuración plana para poder asociarse a los antocianos y se hallan de modo natural en uvas y mostos. Los copigmentos presentes en los hollejos

de las uvas determinan el impacto de la copigmentación (Boulton, 2001). Según Goto y Kondo (1991), existen tres mecanismos de copigmentación de antocianos: copigmentaciones intramoleculares, intermoleculares y autoasociaciones, revistiendo especial importancia la estructura del copigmento y el pH (Donner et al., 1998). Cuando un copigmento se adiciona a una solución antociánica levemente ácida, aumenta la intensidad colorante al formarse complejos coloreados (Baranac et al., 1996,1997), siendo mucho más notorio a 520 que a 420 nm (Liao et al., 1992). En los vinos las principales moléculas implicadas en la copigmentación son fenólicas, procedentes tanto de compuestos no flavonoides como flavonoides (Zamora, 2003). Entre los copigmentos no flavonoides, los ácidos hidroxicinámicos presentan el mayor potencial de copigmentación, entre los que destaca el ácido cafeico como factor de copigmentación, con un importante papel en el color de los vinos tintos al estar presente en la uva de forma natural (Darias et al., 2001, 2002; Schwarz et al., 2005; Álvarez et al., 2006, 2008). Los compuestos flavonoides por su parte constituyen el grupo más importante de los polifenoles de la uva y el vino. Entre los flavonoles cabe destacar el efecto copigmentante de la rutina, ensayado tanto en soluciones modelo como en vinos (Baranac et al., 1996; Hermosín et al., 2005 a,b; Álvarez et al., 2006, 2008),obteniendo efectos importantes en la coloración de vinos tintos. Destacar por último el efecto copigmentante de los 3-flavanoles (Boulton, 2000), muy significativo en el caso de la (-) epicatequina (Liao et al., 1992).

La suplementación prefermentativa con estos copigmentos puede suponer un incremento de los procesos naturales de asociación inter e intra moleculares de los antocianos y un incremento de la intensidad y estabilidad del color. La adición prefermentativa de rutina, ácido cafeico y catequina incrementa más o menos significativamente el color de los vinos. Así, existen estudios de copigmentación con ácido cafeico, catequina y rutina en adición prefermentativa, mostrando el ácido cafeico un notable efecto en la extracción de color, y la rutina un efecto potenciador de la copigmentación y extracción de antocianos (Darias-Martín et al., 2001, 2002; Hermosín et al., 2005 a; Schwarz et al., 2005). La adición de copigmentos en viñedo y en fases pre y post fermentativas fue ensayada por Álvarez et al. (2006, 2008) adicionando distintos copigmentos combinados con técnicas de maceración prefermentativa en frío y de microoxigenación postfermentativa, obteniendo que en uvas y vinos de variedad tempranillo, la adición de copigmentos aumenta los procesos de copigmentación.

Tras la fermentación, el contenido en antocianos decrece por degradación, precipitación, unión con sulfuroso, acomplejado con metales (Mirabel *et al.*, 1999). Minimizar estas pérdidas de color es importante para conservar la calidad de los vinos. La gran reactividad de los antocianos es también la causa su desaparición progresiva durante el envejecimiento del vino. Para explicar dicha desaparición, se han propuesto reacciones de oxidación de sus formas calconas con pérdida irreversible del color (Brouillard, 1982; Furtado et al., 1993), así como reacciones de asociación entre antocianos y flavanoles, dando lugar a “pigmentos poliméricos” que estabilizan el color (Somers, 1976; Somers y Evans, 1974).

Las combinaciones entre antocianos y flavanoles, mediante polimerizaciones parciales originan formas resonantes que aportan un grado de estabilidad a este tipo de compuestos, y permiten preservar el color de los vinos, sugiriendo algunos autores que las reacciones de copigmentación de antocianos que tiene lugar en los vinos jóvenes podría constituir un primer paso en la formación de pigmentos más estables durante el envejecimiento de los mismos (Liao *et al.*, 1992; Brouillard y Dangles, 1994; Cacho, 2003; Santos-Buelga *et al.*, 2001).

Las técnicas de vinificación ejercen gran influencia en la extracción de los componentes de las uvas, afectando a la concentración y composición de los vinos tintos. Temperatura, duración de la maceración, presencia o ausencia de etanol, son factores que afectan a dichas características así como a los fenómenos de copigmentación (Gómez-Mínguez y Heredia, 2004). La maceración prefermentativa en frío permite una mayor y mejor extracción polifenólica, influyendo en el aumento de la concentración de antocianos, el índice de ionización y la copigmentación de los mismos, que afecta entre otros a la estabilidad del color, consiguiendo aunar la ralentización del proceso fermentativo y la desorganización de las membranas celulares de los hollejos y facilitando la salida de compuestos aromáticos y fenólicos (Reynols *et al.*, 2001; Gómez-Mínguez y Heredia, 2004; Parenti *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2004 a,b, 2005). La maceración prefermentativa en frío debe realizarse a temperaturas próximas a los 5-8 °C. Combinada con una temperatura de fermentación que potencie la extracción de compuestos polifenólicos favorables a la calidad del vino, y con un tiempo de maceración fermentativa no muy elevado que limite la cantidad de alcohol, constituye un criterio enológico de gran interés en la vinificación en tinto (Reynols *et al.*, 2001; Álvarez *et al.*, 2006).

Uno de los problemas que presenta la variedad Monastrell es su largo ciclo de maduración, que obliga a vendimiar la uva con alto grado alcohólico para poder conseguir una madurez polifenólica suficiente que permita obtener un color estable y una concentración tánica equilibrada. Esto obliga a comercializar vinos con un alto contenido alcohólico, no muy aceptados por el consumidor, y contrarios a la política de descenso del consumo de alcohol, y con una muy baja acidez que obliga a retoques que suelen desequilibrar organolépticamente al vino, y esto junto con la elevada concentración de enzimas polifenoloxidasas que presenta la variedad, ocasiona graves problemas en la elaboración, dificultando la estabilidad del color y el equilibrio polifenólico de estos vinos. La aplicación de copigmentos en campo mediante la utilización de extractos vegetales ricos en determinados copigmentos, junto con la incorporación de técnicas de maceración prefermentativa que potencien la copigmentación inducida en el campo, podría dar lugar a un adelanto de la madurez antociánica de las uvas y a una mayor polimerización polifenólica posterior, que permitiese realizar la vendimia sin tener que llegar a los estados de sobremaduración habituales.

La finalidad de este trabajo es aplicar al cultivo y elaboración de la uva Monastrell diferentes copigmentos en forma de extractos vegetales aplicados al viñedo, así como copigmentos en mosto, junto con diferentes tecnologías

de vinificación, para intentar mejorar la calidad polifenólica de las uvas y vinos de la variedad Monastrell.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se ha llevado a cabo en un viñedo de la variedad Monastrell ubicado en la localidad de Fontanars dels Alforins (Valencia), perteneciente a la Denominación de Origen “Valencia”, subzona Clariano. Se trata de un viñedo de nueve años de Monastrell/Richter-110 (110-R), conducido en espaldera simple, sistema de poda en cordón royat doble y cultivada en secano.

Seguimiento de la maduración de la uva

Las labores de cultivo realizadas en la parcela fueron las habituales en la zona, procurando eliminar cualquier factor limitante al desarrollo del ensayo, ya fuera de tipo nutricional o sanitario, que pudiera distorsionar los resultados obtenidos a partir de los tratamientos experimentales aplicados.

Se realizó el seguimiento de la maduración polifenólica de esta parcela con la finalidad de aplicar los extractos y copigmentos en el momento óptimo, cuando el potencial antociánico de la vendimia permitiera que fuera efectiva la copigmentación en la uva.

La evaluación de las características tecnológicas de calidad de la uva se realizó de acuerdo con los métodos oficiales de la U.E. Los muestreos de las parcelas para el seguimiento de la maduración se verificaron semanalmente a partir del envero, concentrándose cada dos-tres días en fechas próximas a la madurez. Para el seguimiento de Índices de maduración se partió de un muestreo que afectaba a todas las plantas implicadas en cada una de las parcelas elementales, tomando una cantidad de uva suficiente para la realización de las analíticas. En cada uno de los racimos se tomaron las bayas dos a dos y de caras opuestas (expuesta al sol / no expuesta al sol) adquiriéndose uvas de las partes superior (2), media (4) e inferior (2).

Las uvas se emplearon directamente para la determinación del peso de 100 bayas, triturándose posteriormente durante 2 segundos en una picadora, separándose mediante colador inmediatamente las fases sólida y líquida. Con la fase líquida se realizaron, después de centrifugación, las determinaciones correspondientes a pH, acidez total tartárica, grado en la escala Brix determinado con un refractómetro de mesa digital, contenido en ácido málico mediante método enzimático, intensidad colorante e índice de polifenoles totales presentes en el mosto mediante espectrofotometría.

Aplicación de extractos y copigmentos

Diez días antes del momento estimado como idóneo para realizar la vendimia, se procedió a la aplicación de extractos y copigmentos en las parcelas previamente marcadas. Se realizaron ensayos en campo de aplicación de extracto de té verde, extracto de trigo sarraceno y extracto de

romero, así como adición directa en campo de los copigmentos que contenían estos extractos: catequina, rutina y ácido cafeico. Se llevaron a cabo dos experiencias conjuntas, en una de ellas se aplicaron los extractos vegetales ricos en copigmentos, y en la otra fueron aplicados directamente los tres copigmentos de forma individualizada. También se empleó la uva sin tratamientos de este viñedo para llevar a cabo los ensayos de adición prefermentativa en bodega, y los ensayos control.

Todas las aplicaciones se realizaron mediante pulverización foliar en la zona de los racimos. Los extractos y copigmentos se disolvieron previamente en agua, hasta alcanzar una concentración que nos permitiera una aplicación en campo similar a la que se realizó prefermentativamente en bodega (90 mg/Kg de uva), y se incorporaron junto con un surfactante no iónico que favoreciera la adherencia a los hollejos (Cera de Montana 20 % a dosis 2,5 mL/L), a razón de 200 mL de disolución para cada cepa. Se considera, basándonos en la experiencia previa, que este período de tiempo era el óptimo para que se produjeran las reacciones de copigmentación esperadas.

Los copigmentos rutina (Ru), ácido cafeico (Cf) y catequina (Kt), fueron adquiridos comercialmente. La procedencia de los mismos fue:

- Ru: SIGMA Rutin hydrate. Mínimun R5143 (25g).
- Cf: SIGMA Caffeic acid C 0625 (25 g).
- Kt: FLUKA (+) Catechin hydrate 22110 (25 g).

Todos ellos de Laboratorios SIGMA-ALDRICH de Madrid-España.

Los extractos de té verde (Té) y romero (Ro) fueron adquiridos comercialmente, mientras que el extracto de trigo sarraceno (Tr) fue preparado en laboratorio. La procedencia de los mismos fue:

- Té: Laboratorios ACOFRAM, Madrid-España.
- Ro: Laboratorios GUINAMA, Valencia-España.
- Tr: Preparado en el laboratorio del Departamento de Tecnología de Alimentos de la UPV-Valencia, mediante extracción alcohólica de harina de trigo sarraceno, adquirida comercialmente de Laboratorios GUINAMA, Valencia-España, en agitación con calor y posterior concentración con rotavapor y filtrado.

Mediante HPLC se determinó la concentración polifenólica de los extractos para calcular la cantidad a añadir en la aplicación, aproximándola a la concentración del copigmento puro.

El diseño experimental de los ensayos fue de tipo factorial, en bloques completos al azar con tres repeticiones, siendo las parcelas elementales de 30 cepas cada una para aquellas que recibían tratamiento, y de 120 cepas cada una para las que no recibían tratamiento. Las aplicaciones realizadas del diseño experimental fueron las siguientes:

- Rutina (Ru) (0,5 g/L).
- Ácido cafeico (Cf) (0,5g/L).

- Catequina (Kt) (0,5 g/L).
- Extracto de té verde (Té) (concentración de catequina equivalente a 0,5 g/L).
- Extracto de trigo sarraceno (Tr) (concentración de rutina equivalente a 0,5 g/L).
- Extracto de romero (Ro) (concentración de ácido cafeico equivalente a 0,5 g/L).
- Control sin tratamiento (S/A).

Fueron considerados por tanto 7 tratamientos experimentales distintos que, con 3 repeticiones, componían un total de 21 parcelas elementales diferentes. De éstas, 18 parcelas de 30 cepas cada una a las que se aplicaron los distintos tratamientos, y 3 parcelas de 120 cepas cada una sin tratamiento que se utilizaron para la experiencia de adición prefermentativa en bodega de los copigmentos puros y para los distintos controles de la experiencia. En total, el ensayo se desarrolló sobre 900 cepas y 1.800 Kg de vendimia.

Microvinificación de las uvas

Una vez alcanzados los índices de madurez previamente fijados, sin llegar a la sobremaduración de las uvas, se estableció el momento óptimo de vendimia del ensayo completo. La vendimia se realizó 10 días después de la aplicación de los copigmentos, de forma manual, en cajas de 20 kg, procediéndose en el plazo máximo de una hora a su despalillado y estrujado en una despalilladora de paletas-estrujadora de rodillos, previa toma de muestras para determinar la composición de la uva. La pasta fue encubada en depósitos de 50 L, conteniendo cada uno de ellos una cantidad de 30 Kg de pasta de vendimia. Para el sulfitado de la uva se adicionaron 5 g/hL de SO₂.

Todos los ensayos de vinificación se realizaron por triplicado. Se realizaron 6 microvinificaciones de las uvas control sin tratamientos en campo, 6 microvinificaciones de cada uno de los ensayos de campo con los 3 extractos vegetales en campo y 6 microvinificaciones de cada uno de los ensayos de campo con los 3 copigmentos de forma individual. Con la uva sin tratar en campo se realizan 6 microvinificaciones con adición prefermentativa en bodega de los 3 copigmentos (Ru, Cf y Kt) a una dosis de 90 mg/Kg de uva. Tres de las vinificaciones control y tres de cada experiencia, fermentaron de forma tradicional sin realizar maceración prefermentativa en frío. Tres de las microvinificaciones control y tres de cada experiencia fueron sometidas a maceración prefermentativa en frío.

Se emplearon levaduras seleccionadas *Sacharomyces cerevisiae*, var. Bayanus, procediendo a una maceración-fermentación a 27-28 °C para todos los tratamientos, aplicando dos remontados diarios con las mismas pautas para todas ellas, extrayéndose muestras cada 2 días durante el proceso de maceración-fermentación.

Se estableció para los vinos no criomacerados de un momento óptimo de descube, fijado en 10 días, que se aplicó para todos los vinos elaborados.

Se practicó entonces un prensado a baja presión, 1,2 atmósferas, y mezcla del vino flor con el vino de primera prensada. Y se determinó la composición aromática y polifenólica de los vinos, antes de la fermentación maloláctica.

La fermentación maloláctica se favoreció con la adición previa de 1g/hL de bacterias *Oenococcus oeni*. Una vez concluida la fermentación maloláctica, y previo sulfitado a 30 mg/L de sulfuroso libre, los vinos se trasegaron y homogeneizaron, y se extrajeron muestras para determinar la composición aromática y polifenólica de los vinos.

Maceración prefermentativa en frío

Las experiencias con maceración prefermentativa se prolongaron durante 5 días, enfriando la pasta estrujada a 6-8 °C y conservando esta temperatura mediante aportación de frío a las camisas de los depósitos.

Fermentación alcohólica

Los mostos en los que no se realizó maceración prefermentativa en frío fueron los primeros en iniciar la fermentación, previa siembra de 20 g/hL de levaduras seleccionadas *Sacharomyces cerevisiae*, var. *Bayanus*. La fermentación se realizó por el sistema tradicional en depósitos cilíndricos de fondo plano provistos de camisas para el control de temperatura. La temperatura de fermentación se mantuvo entre 27-28 °C. Durante el proceso de maceración-fermentación se realizaron dos remontados diarios de la mitad del volumen de mosto cada vez, siguiendo diariamente la evolución de temperatura y densidad. Se tomaron muestras cada tres días para realizar el seguimiento de la extracción de compuestos y la valoración organoléptica, para determinar el momento óptimo de descube, que se estableció en aquel en que los vinos alcanzaran una estructura suficiente para poder realizar con ellos crianza, sin extraer compuestos herbáceos de hollejos o amargos y duros de pepitas. Una vez sangrado el depósito se practicó prensado con prensa de membrana hidráulica, y se añadió el vino de un primer prensado a 1,2 atmósferas de presión. Se tomaron muestras del vino antes y después de mezclarlo con el vino prensa. En el mismo depósito se dejó concluir la fermentación alcohólica, controlando que la temperatura no descendiera de 20 °C para que la fermentación agotara todos los azúcares, dando por terminada la misma cuando los vinos presentaron menos de 2 g/L de azúcares reductores.

En los ensayos de maceración prefermentativa en frío, se dejó de aplicar frío a los cuatro días y se calentó el depósito hasta temperatura ambiente, para realizar la siembra de levaduras al quinto día. En estos depósitos se siguió la misma pauta de fermentación-maceración que en los que no se realizó maceración prefermentativa en frío. El descube se realizó con el mismo criterio que en los testigos, para evitar diferencias en el tiempo y temperatura de maceración fermentativa en unos y otros.

Fermentación maloláctica

Una vez concluida la fermentación alcohólica, se realizó la fermentación maloláctica previa adición a todos los depósitos de 1 g/hL de bacterias *Oenococcus oeni*. Una vez concluida la fermentación maloláctica, los vinos fueron corregidos a 30 mg/L de sulfuroso libre, trasegados previo enfriamiento, homogeneizados y trasegados a un recipiente de cristal de 10 litros.

Determinación de la composición de los vinos una vez concluida la fermentación maloláctica.

Al mes de concluida la fermentación maloláctica, se determinaron los parámetros fisicoquímicos convencionales, la composición fenólica y el color de los vinos elaborados. Las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado, estableciendo la media de las tres determinaciones efectuadas, y repitiendo las determinaciones si un dato se observaba que era anómalo. El valor final de cada compuesto para cada ensayo, fue la media de las tres vinificaciones y de las tres determinaciones analíticas efectuadas por vinificación. A continuación se procedió a estudiar los resultados obtenidos y a elaborar las conclusiones.

Determinaciones polifenólicas

Para la determinación de la Intensidad Colorante y Tonalidad se sigue el método oficial de análisis de la UE (Comisión Europea, 1990). Para ello se realizan mediciones directas de la muestra a 420, 520 y 620 nm mediante un espectrofotómetro UV/VIS JASCO V-530 con cubetas de vidrio de 0,1 cm de paso de luz y utilizando el agua destilada como referencia.

El método utilizado para cuantificar el contenido polifenólico total de los vinos es el de Singleton y Rossi (1965). El principio del método consiste en la oxidación en medio básico de los grupos hidroxilo de los fenoles por el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico), que se reduce produciendo una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno. Esta coloración produce una absorbancia máxima a los 750 nm y es proporcional al contenido de compuestos polifenólicos.

Para la determinación de los antocianos coloreados se utiliza el método por decoloración por bisulfito (García-Barceló, 1990). Este método se basa en la propiedad que presentan estos compuestos de cambiar de estructura química con la variación del pH del medio en su combinación con bisulfito sódico.

El porcentaje de color debido a los antocianos copigmentados, polimerizados y libres se determinan siguiendo la metodología descrita por Boulton (1996), ajustando previamente las muestras a pH 3,60 y filtrando a través de una membrana de 0,45 μm de tamaño de poro.

Para determinar los taninos totales se utiliza el método recogido por Saint-Criq et al. (1998). Esta determinación se basa en la propiedad característica de los flavanodiolos 3-4, llamada reacción de Bate-Smith: la

hidrólisis en medio ácido, con calor y en presencia de oxígeno transforma estas moléculas en antocianinas (coloreadas).

Para evaluar el grado de polimerización de los taninos se utilizará el método de p-dimetilaminocinamaldehído (DMACH) propuesto por Vivas et al. (1994). El grado de condensación de las proantocianidinas será tanto más alto cuanto más bajo sea el índice DMACH.

En los vinos se determina también la concentración de antocianos totales y los monoglucósidos principales de la uva: malvidín 3-glucósido, cianidín 3-glucósido, petunidín 3-glucósido, delphinidín 3-glucósido y peonidín 3-glucósido. Se realizó por inyección de la muestra previamente filtrada (filtro de mcnylon de 0.45 μm) en un cromatógrafo líquido (JASCO serie MD-2010 Plus, Tokyo, Japón), equipado con detector Diodo Array (JASCO LC-Net II/ADC, Tokyo, Japón). La separación se realizó mediante la columna Gemini NX (Phenomenex, Torrance, CA), 250 mm x 4.6 mm de 5 μm de tamaño de partícula. El volumen de la muestra inyectada fue de 20 μL y el análisis se realizó a $T^{\text{a}}=35^{\circ}\text{C}$. Los disolventes empleados fueron trifluoroacético al 0.1% en agua (Fase A) y acetonitrilo (Fase B), a un flujo de 0.5 mL/min. Se optimizaron las condiciones de gradiente, propuestas por Boido *et al.*, (2006), a las mostradas en la tabla siguiente. Los cromatogramas se analizaron a 520 nm, para cuantificar los antocianos. Los resultados se expresan en equivalentes de malvidina-3-glucósido.

| Tiempo (min) | Fase A |
|--------------|--------|
| 0 | 90 |
| 5 | 90 |
| 20 | 85 |
| 25 | 85 |
| 30 | 85 |
| 60 | 82 |
| 70 | 62 |
| 80 | 90 |

Para la cuantificación de copigmentos en los extractos se utilizó el mismo método, pero en este caso integrando a $\lambda=280, 316$ y 365 nm, para cuantificar respectivamente catequina, rutina y ácido cafeico.

Análisis estadístico de los resultados.

El tratamiento estadístico fue llevado a cabo con el programa informático STATGRAPHICS Plus 5.1 for Windows. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar si existían diferencias significativas debidas a los tratamientos entre los parámetros analizados de los vinos obtenidos. Asimismo, se aplicó el Test de Rango Múltiple de Tukey para comprobar las diferencias entre las medias.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se recogen los valores medios de los parámetros comunes analizados después de la fermentación maloláctica, en los vinos de Monastrell procedentes de aplicación de extractos y copigmentos en campo y bodega, elaborados por fermentación tradicional, y con maceración prefermentativa a 4-6 °C durante 4 días.

TABLA 1. Valores medios de los parámetros comunes de los vinos de Monastrell.

| VINOS | Densidad (g/L) | Grado alcohólico (%Vol) | Acidez total (g/L ác. tart.) | pH | Azúcares (g/L) | Acidez volátil (g/L ac. acét.) | SO ₂ T (mg/L) | SO ₂ L (mg/L) |
|---------|----------------|-------------------------|------------------------------|-------|----------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| S/A T | 0,997 | 13,70 | 5,52 | 3,62 | 1,28 | 0,22 | 92 | 30 |
| CTr T | 0,996 | 13,72 | 5,63 | 3,71 | 1,51 | 0,21 | 98 | 28 |
| Cru T | 0,997 | 13,75 | 5,61 | 3,66 | 1,33 | 0,30 | 99 | 27 |
| BRu T | 0,997 | 13,72 | 5,65 | 3,59 | 1,42 | 0,26 | 99 | 29 |
| CTé T | 0,997 | 13,76 | 5,55 | 3,64 | 1,36 | 0,24 | 88 | 30 |
| CKt T | 0,996 | 13,80 | 5,54 | 3,70 | 1,24 | 0,28 | 94 | 30 |
| BKt T | 0,996 | 13,73 | 5,60 | 3,55 | 1,71 | 0,23 | 95 | 26 |
| CRo T | 0,995 | 13,73 | 5,55 | 3,58 | 1,31 | 0,25 | 86 | 28 |
| CCf T | 0,997 | 13,75 | 5,63 | 3,60 | 1,40 | 0,29 | 97 | 32 |
| BCf T | 0,997 | 13,70 | 5,62 | 3,65 | 1,42 | 0,30 | 98 | 33 |
| S/A MF | 0,996 | 13,72 | 5,66 | 3,60 | 1,46 | 0,30 | 87 | 30 |
| CTr MF | 0,995 | 13,75 | 5,70 | 3,66 | 1,18 | 0,26 | 89 | 29 |
| Cru MF | 0,995 | 13,76 | 5,68 | 3,70 | 1,20 | 0,24 | 96 | 28 |
| BRu MF | 0,996 | 13,75 | 5,65 | 3,62 | 1,13 | 0,24 | 87 | 30 |
| CTé MF | 0,997 | 13,76 | 5,75 | 3,63 | 1,26 | 0,28 | 96 | 32 |
| CKt MF | 0,994 | 13,75 | 5,70 | 3,64 | 1,34 | 0,29 | 94 | 31 |
| BKt MF | 0,996 | 13,74 | 5,60 | 3,66 | 1,17 | 0,23 | 95 | 30 |
| CRo MF | 0,994 | 13,79 | 5,64 | 3,70 | 1,13 | 0,24 | 97 | 26 |
| CCf MF | 0,997 | 13,76 | 5,62 | 3,65 | 1,62 | 0,30 | 102 | 34 |
| BCf MF | 0,996 | 13,82 | 5,56 | 3,67 | 1,46 | 0,24 | 87 | 35 |
| P-value | 0,085 | 0,064 | 0,053 | 0,067 | 0,069 | 0,096 | 0,079 | 0,058 |

S/A: Control sin adición; CTr: adición de extracto de trigo sarraceno en campo; CRu: adición de rutina en campo; BRu: adición prefermentativa de rutina; CTé: adición de extracto té verde en campo; CKt: adición de catequina en campo; BKt: adición prefermentativa de catequina; CRo: Adición de extracto de romero en campo; CCf: adición de ácido cafeico en campo; BCf: adición prefermentativa de ácido cafeico; T: vinificación tradicional; MF: vinificación con maceración prefermentativa en frío. Para un mismo parámetro analítico, la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los vinos, y diferente letra, indica que existen diferencias significativas al 99 % según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

No se observaron diferencias significativas en los parámetros convencionales relacionados con el grado alcohólico, acidez total y pH de los vinos estudiados, lo que indica que ni la adición de extractos y copigmentos

en campo o bodega, ni la realización de maceración prefermentativa en frío previamente a la fermentación, influyeron en la acumulación de azúcares ni en los valores de acidez y pH. Para una mejor interpretación de los resultados polifenólicos, fueron considerados en distintos apartados los parámetros polifenólicos directamente relacionados con el color, con la concentración de antocianos y su contribución al color y los relacionados con los polifenoles totales y los taninos condensados.

Compuestos polifenólicos relacionados con el color

La tabla 2 recoge los valores medios, desviaciones estándar y ANOVA de los parámetros polifenólicos con el color.

El color del vino es un atributo sensorial muy importante, no sólo por ser la primera imagen del vino, sino también porque es un indicador de otros atributos relacionados con su aroma y su sabor. Por el color del vino se puede tener una idea de su edad, concentración tánica, estado de conservación, e incluso de su calidad sanitaria, como ausencia de alteraciones, enfermedades y defectos.

La intensidad colorante es una medida representativa del color de los vinos, ya que contempla la aportación al color de los tonos amarillos, rojos y azules característicos de los vinos. Esta medida depende de la concentración de compuestos coloreados y del estado de estos compuestos. En tabla 2 podemos observar la intensidad colorante en los vinos control y en los vinos adicionados con extractos y copigmentos en campo y bodega. Podemos apreciar un ligero incremento de color en los vinos suplementados con rutina y ácido cafeico, este efecto también fue encontrado por otros autores al realizar adiciones prefermentativas de estos copigmentos (Mirabel et al., 1999; Darías et al., 2001,2002; Schwarz et al., 2005; Lizama et al., 2007; Álvarez et al., 2008). En cambio, este efecto no se manifestó cuando los copigmentos se incorporaron al viñedo mediante la adición de extractos de té verde y romero, ya que no hubo diferencias de color entre estos vinos y el control. En cuanto a las técnicas de vinificación, no se observaron diferencias de color en los vinos en función de las técnicas de vinificación, al contrario de lo observado por otros autores, que observaron que la adición de copigmentos junto con la maceración prefermentativa en frío, puede incrementar la extracción de componentes polifenólicos de la uva y aumentar con ello el color de los vinos (Álvarez et al., 2006; Pardo et al., 1994).

La A520 refleja el componente rojo del color de los vinos. Tiene un comportamiento similar al observado en la intensidad colorante, lo que pone de manifiesto que en estos vinos la tonalidad roja, que es la mayoritaria, fue la que estableció las diferencias entre ellos.

El Tono nos indica la contribución del amarillo al color de los vinos. Podemos observar como la adición de copigmentos, tanto en forma de extracto vegetal como directamente en campo y bodega, incrementaron la coloración amarilla de los vinos. Además, los vinos elaborados con maceración prefermentativa y adicionados con rutina en bodega y con ácido cafeico en campo y bodega, mostraron un significativo incremento del Tono con respecto a los vinos no macerados. El alargamiento de la fase

prefermentativa es siempre un proceso peligroso, ya que los vinos están expuestos a la acción del oxígeno sin la protección que aporta la fermentación. En esta experiencia se trabajó durante la maceración prefermentativa con los depósitos totalmente llenos, pero el aumento de la tonalidad amarilla parece indicar que esta protección no fue suficiente, y que durante este periodo tuvo lugar una ligera oxidación que provocó un ligero incremento del componente amarillo, siendo más evidente este efecto en los tratamientos realizados con ácido cafeico.

TABLA 2. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los parámetros polifenólicos relacionados con el color, en los vinos de Monastrell.

| VINOS | Intensidad Colorante | | A520 | | Tono (%) | |
|----------------|----------------------|-------------|--------|-------------|----------|-------------|
| S/A T | 7,378 | ± 0,996 a | 3,923 | ± 0,681 a | 66,458 | ± 7,943 abc |
| CTr T | 8,686 | ± 2,685 bc | 4,405 | ± 1,474 bc | 71,983 | ± 6,695 bcd |
| CRu T | 8,556 | ± 0,437 bc | 3,930 | ± 0,213 ab | 73,502 | ± 1,593 bcd |
| BRu T | 9,797 | ± 2,688 bc | 5,081 | ± 1,438 bc | 67,154 | ± 2,850 abc |
| CTé T | 6,951 | ± 0,001 a | 3,303 | ± 0,033 a | 74,092 | ± 1,587 d |
| CKt T | 8,245 | ± 1,145 abc | 4,148 | ± 0,558 abc | 72,719 | ± 4,538 cd |
| BKt T | 7,371 | ± 0,088 ab | 3,732 | ± 0,078 ab | 72,677 | ± 1,771 cd |
| CRo T | 8,213 | ± 1,081 bc | 4,623 | ± 0,457 bc | 68,089 | ± 0,981 abc |
| CCf T | 9,529 | ± 2,182 bc | 5,218 | ± 1,258 cd | 63,808 | ± 9,144 a |
| BCf T | 10,147 | ± 1,559 c | 5,210 | ± 0,535 d | 67,896 | ± 0,755 abc |
| S/A MF | 7,25 | ± 1,210 a | 3,774 | ± 0,680 a | 65,747 | ± 5,480 ab |
| CTr MF | 8,465 | ± 0,741 bc | 4,284 | ± 0,674 bc | 72,453 | ± 2,875 d |
| CRu MF | 9,1790 | ± 2,1305 bc | 4,584 | ± 0,977 bc | 70,1215 | ± 1,770 bcd |
| BRu MF | 8,436 | ± 0,347 bc | 4,329 | ± 0,247 bc | 69,883 | ± 2,646 bcd |
| CTé MF | 6,967 | ± 0,643 ab | 3,567 | ± 0,334 ab | 73,764 | ± 1,639 d |
| CKt MF | 7,372 | ± 0,255 ab | 3,808 | ± 0,117 ab | 69,955 | ± 0,514 bcd |
| BKt MF | 7,888 | ± 1,196 abc | 3,963 | ± 0,486 ab | 73,068 | ± 0,945 d |
| CRo MF | 8,321 | ± 0,438 bc | 4,321 | ± 0,437 bc | 69,634 | ± 3,387 bc |
| CCf MF | 8,825 | ± 0,241 bc | 4,604 | ± 0,057 bc | 67,433 | ± 1,105 abc |
| BCf MF | 8,538 | ± 1,623 bc | 4,899 | ± 0,758 bc | 73,053 | ± 4,332 d |
| P-value | 0,039 | | 0,0079 | | 0,0001 | |

S/A: sin adición; CTr: adición de extracto de trigo sarraceno en campo; CRu: adición de rutina en campo; BRu: adición prefermentativa de rutina; CTé: adición de extracto té verde en campo; CKt: adición de catequina en campo; BKt: adición prefermentativa de catequina; CRo: Adición de extracto de romero en campo; CCf: adición de ácido cafeico en campo; BCf: adición prefermentativa de ácido cafeico; T: vinificación tradicional; MF: vinificación con maceración prefermentativa en frío. Para un mismo parámetro analítico, la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los vinos, y diferente letra, indica que existen diferencias significativas al 95% (intensidad colorante) y al 99% (A520 y el tono) según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

Parámetros relacionados con la concentración de antocianos totales y pormenorizados

Las tablas 3 y 4 recogen la concentración de antocianos totales en los vinos, y la pormenorización de los distintos tipos de antocianos, cuantificados por HPLC. Los resultados obtenidos mostraron que existe una correlación directa entre la concentración de antocianos totales (decolorables y no decolorables) y la suma de las distintas fracciones de antocianos pormenorizados, siendo la malvidina-3-glucósido el antociano más abundante en todos los ensayos. Hay que tener en cuenta que, al mismo tiempo, se están produciendo reacciones de condensación entre los distintos antocianos con flavanoles presentes en los vinos, que sí se incluyen en los valores de antocianos totales (Boido et al., 2006).

La concentración de antocianos totales se incrementó con respecto al control en la mayor parte de los tratamientos, a excepción de los realizados con ácido cafeico. Es interesante destacar el efecto significativo de la adición de extractos vegetales en la concentración total de antocianos, efecto que en el extracto de romero no puede ser atribuido al ácido cafeico (polifenol mayoritario de este extracto), ya que su adición como copigmento puro tanto en campo como en bodega, no consiguió incrementar dicha concentración. Por otra parte, la maceración prefermentativa contribuyó a incrementar el efecto de la adición de copigmentos en la concentración de antocianos, siendo los vinos resultantes de la aplicación de extractos vegetales en el campo y los macerados prefermentativamente, los que presentaron la mayor concentración de antocianos totales. Sin embargo, no existe correlación entre la intensidad colorante de los vinos y su concentración en antocianos totales, lo que pone de manifiesto que el incremento de la concentración de antocianos en los vinos fue debido a la presencia de antocianos que en el momento del análisis no se encontraban en forma coloreada.

La concentración del antociano malvidina-3-glu mostró un comportamiento similar al observado para los antocianos totales, siendo el ácido cafeico el único copigmento que no incrementaba la concentración de este antociano. Para este compuesto, el efecto de la maceración prefermentativa no fue tan evidente como en el caso de la concentración total de antocianos. Los antocianos peonidina-3-glu, petunidina-3-glu, cianidina-3-glu y delphinidina-3-glu tuvieron un comportamiento semejante, se observó un incremento de estos compuestos con la aplicación de extractos vegetales en campo y con la maceración prefermentativa, pero en cambio, la adición de los copigmentos directamente en campo y bodega no mostró una tendencia determinada, siendo la rutina en campo y la catequina en bodega, los copigmentos que provocaron mayor incremento de estos compuestos. La formación de productos de condensación afecta de manera más evidente a la concentración de los antocianos minoritarios, y por ello los resultados obtenidos fueron menos claros que en el caso de la malvidina-3-glu, o en la concentración total de antocianos. La presencia de los antocianos minoritarios está relacionada con la intensidad del color y con su estabilidad, así es conocida la reactividad de la malvidina al reaccionar con las proantocianidinas en presencia del acetaldehído (Dallas et col., 1996). La

presencia de cantidades elevadas de cianidina-3-glu y peonidina-3-glu podría contribuir a una menor estabilidad del color, ya que estas fracciones son fácilmente oxidables, pero éstas solo representaron entre un 5 y un 10% del total de los antocianos presentes, por lo que su efecto sobre la estabilidad del color pudo no evidenciarse.

TABLA 3. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de la concentración de antocianos totales y pormenorizados (mg/L de malvidina-3-glu-eq).

| VINOS | Antocianos totales (mg/L Malvidina-3-glu-eq) | | Malvidina-3-glu (mg/L Malvidina-3-glu-eq) | | Peonidina-3-glu (mg/L Malvidina-3-glu-eq) | |
|----------------|--|-------------|---|-------------|---|-------------|
| S/A T | 531,226 | ±14,477 b | 174,102 | ±11,431 bc | 30,614 | ±2,594 b |
| CTr T | 569,238 | ±4,269 cd | 213,379 | ±35,734 cd | 38,382 | ±1,792 c |
| CRu T | 581,458 | ±11,206 d | 226,250 | ±11,198 d | 40,415 | ±5,100 d |
| BRu T | 569,501 | ±45,450 cd | 223,908 | ±45,146 cd | 21,954 | ±12,775 b |
| CTé T | 585,331 | ±3,525 d | 236,935 | ±7,348 e | 46,405 | ±1,249 de |
| CKt T | 584,138 | ±32,801 d | 220,274 | ±34,803 cd | 26,600 | ±5,206 abc |
| BKt T | 571,593 | ±16,941 cd | 228,333 | ±0,695 d | 39,768 | ±1,946 cd |
| CRo T | 591,256 | ±18,232 d | 215,490 | ±25,608 bc | 42,595 | ±4,675 cd |
| CCf T | 515,140 | ±50,303 abc | 175,696 | ±36,899 bc | 26,084 | ±19,961 abc |
| BCf T | 492,753 | ±48,430 ab | 126,905 | ±49,505 ab | 19,890 | ±16,830 a |
| S/A MF | 543,847 | ±58,977 bc | 166,107 | ±30,548 abc | 26,408 | ±15,753 abc |
| CTr MF | 579,743 | ±4,269 d | 223,884 | ±35,734 d | 48,886 | ±1,792 de |
| CRu MF | 571,172 | ±54,158 cd | 188,245 | ±26,488 bc | 40,425 | ±5,100 cd |
| BRu MF | 670,443 | ±15,921 e | 225,734 | ±28,759 de | 21,954 | ±12,775 b |
| CTé MF | 595,836 | ±3,525 de | 247,439 | ±7,348 e | 56,909 | ±1,249 e |
| CKt MF | 584,138 | ±32,801 d | 215,466 | ±26,283 cd | 42,704 | ±6,581 cd |
| BKt MF | 571,593 | ±16,941 cd | 211,304 | ±5,800 cd | 54,057 | ±1,320 e |
| CRo MF | 601,761 | ±18,232 d | 225,994 | ±25,608 d | 53,099 | ±4,675 e |
| CCf MF | 503,309 | ±13,391 ab | 130,917 | ±2,287 a | 27,528 | ±1,699 abc |
| BCf MF | 490,072 | ±24,432 a | 154,965 | ±34,323 ab | 37,808 | ±12,558 bcd |
| P-value | 0,0000 | | 0,0000 | | 0,0000 | |

S/A: sin adición; CTr: adición de extracto de trigo sarraceno en campo; CRu: adición de rutina en campo; BRu: adición prefermentativa de rutina; CTé: adición de extracto té verde en campo; CKt: adición de catequina en campo; BKt: adición prefermentativa de catequina; CRo: Adición de extracto de romero en campo; CCf: adición de ácido cafeico en campo; BCf: adición prefermentativa de ácido cafeico; T: vinificación tradicional; MF: vinificación con maceración prefermentativa en frío. Para un mismo parámetro analítico la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los vinos, y diferente letra, indica que existen diferencias significativas al 99% según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

TABLA 4. Continuación. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de la concentración de antocianos totales y pormenorizados (mg/L de malvidina-3-glu-eq).

| VINOS | Petunidina-3-glu (mg/L Malvidina-3-glu-eq) | Cianidina-3-glu (mg/L Malvidina-3-glu-eq) | Delfinidina-3-glu (mg/L Malvidina-3-glu-eq) |
|----------------|--|---|---|
| S/A T | 35,673 ±1,881 bc | 7,064 ±0,470 abc | 18,130 ±0,879 cd |
| CTr T | 40,996 ±4,900 cd | 10,430 ±0,496 cd | 20,261 ±1,572 cde |
| CRu T | 45,124 ±2,834 d | 10,533 ±2,171 cd | 23,811 ±0,826 de |
| BRu T | 24,355 ±13,643 ab | 5,658 ±2,907 ab | 14,204 ±8,510 ab |
| CTé T | 45,189 ±0,434 d | 11,148 ±0,705 cd | 22,782 ±0,402 cde |
| CKt T | 32,268 ±7,713 bc | 5,614 ±1,046 a | 16,724 ±5,126 bc |
| BKt T | 44,798 ±0,836 d | 9,084 ±1,183 bc | 23,292 ±1,270 de |
| CRo T | 43,180 ±6,508 d | 12,018 ±2,161 d | 22,675 ±3,587 cde |
| CCf T | 27,227 ±18,966 ab | 7,175 ±5,282 ab | 13,780 ±9,928 ab |
| BCf T | 20,626 ±16,235 a | 4,697 ±3,650 a | 10,221 ±8,867 a |
| S/A MF | 27,676 ±15,970 ab | 6,746 ±3,983 abc | 15,432 ±9,250 abc |
| CTr MF | 51,500 ±4,900 de | 10,640 ±0,496 cd | 22,362 ±1,572 cde |
| CRu MF | 29,200 ±17,765 abc | 7,170 ±4,367 abc | 16,232 ±10,273 bc |
| BRu MF | 49,998 ±6,520 de | 13,817 ±2,591 d | 28,110 ±3,149 e |
| CTé MF | 55,694 ±0,434 e | 13,249 ±0,705 e | 24,883 ±0,402 d |
| CKt MF | 43,188 ±5,583 d | 9,689 ±1,640 bc | 23,211 ±3,780 cde |
| BKt MF | 41,243 ±0,052 cd | 12,000 ±0,438 de | 21,466 ±0,183 bcd |
| CRo MF | 53,684 ±6,508 e | 14,119 ±2,161 ef | 24,776 ±3,587 de |
| CCf MF | 25,606 ±1,507 ab | 6,396 ±0,554 ab | 13,727 ±0,776 ab |
| BCf MF | 28,522 ±7,062 abc | 8,579 ±2,352 b | 13,443 ±2,969 ab |
| P-value | 0,0000 | 0,0000 | 0,0001 |

S/A: sin adición; CTr: adición de extracto de trigo sarraceno en campo; CRu: adición de rutina en campo; BRu: adición prefermentativa de rutina; CTé: adición de extracto té verde en campo; CKt: adición de catequina en campo; BKt: adición prefermentativa de catequina; CRo: Adición de extracto de romero en campo; CCf: adición de ácido cafeico en campo; BCf: adición prefermentativa de ácido cafeico; T: vinificación tradicional; MF: vinificación con maceración prefermentativa en frío. Para un mismo parámetro analítico, la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los vinos, y diferente letra, indica que existen diferencias significativas al 99% según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

Color debido a las distintas combinaciones de los antocianos en el vino

La tabla 5 recoge la concentración de antocianos coloreados y el porcentaje de color debido a los antocianos copigmentados, polimerizados y libres. Como puede observarse, la concentración de antocianos coloreados fue muy inferior a la de antocianos totales, ya que parte de estos antocianos se encontraban en combinaciones incoloras o ligeramente coloreadas. Se observó un incremento significativo en los vinos suplementados con rutina, tanto directamente en campo o bodega, como con el extracto de trigo sarraceno. La suplementación con rutina aumentó también la concentración de antocianos totales y el color de los vinos.

La adición prefermentativa de catequina también incrementó significativamente la concentración de antocianos coloreados, aunque este incremento no se tradujo en una mayor Intensidad Colorante. Otros autores (Darias-Martín et al., 2001, 2002; Gris et al., 2007) encontraron un incremento significativo de la concentración de antocianos coloreados cuando realizaron adiciones prefermentativas de rutina o ácido cafeico, no observándose este último efecto en estos vinos. La maceración prefermentativa, al igual que observamos para el color, no dio lugar al incremento de estos parámetros en los vinos de Monastrell.

TABLA 5. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de la concentración de antocianos coloreados (mg/L) y del porcentaje de color debido a los antocianos copigmentados, polimerizados y libres, en los vinos de Monastrell.

| VINOS | Antocianos coloreados (mg/L) | % color Antocianos Copigmentados | % color Antocianos Polimerizados | % color Antocianos Libres |
|---------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| S/A T | 204,642 ± 11,289 a | 23,043 ± 1,838 a | 25,016 ± 0,994 abc | 51,940 ± 2,705 e |
| CTr T | 254,874 ± 14,833 cd | 23,244 ± 6,072 ab | 29,658 ± 4,994 bc | 47,098 ± 1,212 cd |
| CRu T | 255,778 ± 36,627 cde | 25,857 ± 1,800 abc | 25,479 ± 0,169 abc | 48,664 ± 1,771 cde |
| BRu T | 252,864 ± 30,063 cde | 24,793 ± 1,822 abc | 25,055 ± 1,290 abc | 50,155 ± 3,095 de |
| CTé T | 222,284 ± 14,549 bcd | 28,037 ± 3,062 bcd | 24,949 ± 0,810 abc | 47,014 ± 2,270 bcd |
| CKt T | 201,990 ± 2,330 ab | 27,777 ± 0,790 cd | 25,919 ± 0,434 abc | 46,304 ± 0,584 bc |
| BKt T | 277,518 ± 3,836 e | 34,415 ± 1,098 de | 22,617 ± 0,336 ab | 42,968 ± 0,929 a |
| CRo T | 210,007 ± 3,097 abc | 23,280 ± 3,405 abc | 26,793 ± 1,748 abc | 49,928 ± 1,851 de |
| CCf T | 211,193 ± 11,830 abc | 24,881 ± 6,40 abc | 24,524 ± 0,035 abc | 49,307 ± 4,927 cde |
| BCf T | 210,103 ± 10,360 abc | 25,191 ± 1,612 ab | 26,198 ± 4,652 cd | 48,610 ± 3,236 de |
| S/A MF | 211,380 ± 16,473 ab | 24,675 ± 1,558 b | 24,955 ± 1,131 bc | 50,456 ± 0,826 e |
| CTr MF | 236,762 ± 12,769 bc | 25,675 ± 2,763 abc | 26,754 ± 1,875 cd | 47,571 ± 1,539 bcd |
| CRu MF | 215,030 ± 20,999 ab | 27,171 ± 2,545 ab | 26,582 ± 3,652 cd | 46,247 ± 1,408 de |
| BRu MF | 269,823 ± 56,489 de | 31,400 ± 6,131 cde | 22,794 ± 2,374 ab | 45,807 ± 4,001 abc |
| CTé MF | 219,653 ± 21,752 abc | 28,679 ± 1,231 bcd | 22,638 ± 2,531 abc | 48,683 ± 2,163 bcd |
| CKt MF | 215,573 ± 31,541 abc | 35,751 ± 1,244 e | 21,332 ± 0,203 a | 42,917 ± 1,072 b |
| BKt MF | 267,150 ± 1,733 d | 33,680 ± 1,635 d | 21,579 ± 0,536 a | 44,741 ± 1,166 ab |
| CRo MF | 197,962 ± 12,741 ab | 25,542 ± 2,221 abc | 26,452 ± 1,789 abc | 48,006 ± 1,873 cde |
| CCf MF | 180,491 ± 3,920 a | 27,149 ± 1,14 bcd | 26,039 ± 2,323 abc | 46,813 ± 2,093 bcd |
| BCf MF | 200,001 ± 61,178 ab | 26,674 ± 5,89 bcd | 28,437 ± 3,238 bc | 44,996 ± 2,736 bc |
| P-value | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |

S/A: sin adición; CTr: adición de extracto de trigo sarraceno en campo; CRu: adición de rutina en campo; BRu: adición prefermentativa de rutina; CTé: adición de extracto té verde en campo; CKt: adición de catequina en campo; BKt: adición prefermentativa de catequina; CRo: Adición de extracto de romero en campo; CCf: adición de ácido cafeico en campo; BCf: adición prefermentativa de ácido cafeico; T: vinificación tradicional; MF: vinificación con maceración prefermentativa en frío. Para un mismo parámetro analítico, la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los vinos, y diferente letra, indica que existen diferencias significativas al 99% según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

En la tabla 5 podemos observar también el porcentaje de color debido a los antocianos copigmentados. La copigmentación es un factor determinante del color del vino y de su futura estabilidad. A medida que aumenta la concentración de compuestos polifenólicos, aumenta el porcentaje de antocianos copigmentados en la uva (Price et al., 1995; Mazza y Brouillard, 1990), pero la presencia de etanol en los vinos contribuye a la disociación de los complejos formados por copigmentación, disminuyendo el porcentaje de copigmentación, y dando lugar de nuevo a antocianos libres (Hermosín y González, 2003). Además, la copigmentación actúa retirando los antocianos copigmentados del pool de antocianos libres produciendo una mayor extracción de éstos de los hollejos y su difusión hacia el vino, y facilitando además posteriores procesos de condensación y polimerización, responsables de la estabilidad del color (Rivas-Gonzalo et al., 1995, 2003; Boulton, 1996, 2001; Mirabel et al., 1999). Las técnicas de vinificación tienen que ir encaminadas a mantener los antocianos en forma copigmentada, para que no precipiten ni se oxiden durante el proceso de fermentación y conservación de los vinos (Boulton, 2001; Gris et al., 2007).

La adición de copigmentos da lugar a un ligero incremento del color debido a los antocianos copigmentados, tal como observaron Baranac et al. (1996), Hermosín et al. (2005), Darías-Martín et al. (2001, 2002), y Schwarz et al. (2005). Este incremento resultó significativo cuando se adicionó catequina, tanto en campo como en bodega. En cuanto a los extractos vegetales, solo el extracto de té verde incrementó significativamente el color debido a la copigmentación, quizás debido a su alta concentración en catequina. La participación de estos compuestos en los fenómenos de copigmentación, puede ser la causa de una menor pérdida de antocianos durante la vinificación, lo que se traduce en el aumento final de la concentración de antocianos en los vinos (Liao et al., 1992; Mirabel et al., 1999). La maceración prefermentativa dio lugar a un significativo incremento de la copigmentación en todos los vinos estudiados, independientemente del tipo de copigmento adicionado, como se vio en otros trabajos (Álvarez et al., 2006, 2008).

Los antocianos se polimerizan con otros compuestos, principalmente flavanoles, dando lugar a estructuras más resistentes a la degradación y menos sensibles a la decoloración (Rivas-Gonzalo et al., 1995), por tanto su formación representa un incremento de la estabilidad del color en los vinos. Las reacciones de polimerización entre los antocianos y flavanoles permiten preservar el color de los vinos, aseverando algunos autores que las reacciones de copigmentación de antocianos son el primer paso hacia la formación de los pigmentos poliméricos estables (Liao et al., 1992).

En la tabla 5 observamos también que el color debido a los antocianos polimerizados no mostró diferencias importantes, ya que fue inferior en los vinos suplementados con catequina, ligeramente superior en los vinos adicionados de extracto de trigo sarraceno y ácido cafeico en bodega, comportándose de forma similar al control para el resto de los copigmentos, y la técnica de vinificación tampoco tuvo una influencia determinante. Este comportamiento pudo ser debido a que al tratarse de vinos recién elaborados, aun eran poco significativas las reacciones de polimerización.

Para que éstas se produjeran hubiera sido necesario un proceso de conservación en el que interviniera el oxígeno mediante la formación de puentes de etanal entre antocianos y otros compuestos, principalmente flavanoles, siendo necesario para ello la presencia de antocianos libres no oxidados y de antocianos procedentes de las estructuras copigmentadas (Bakker et al., 1993; Bishop y Nagel, 1984; Boulton, 1997; Castellari et al., 1999).

La adición de copigmentos disminuyó la fracción libre de los antocianos, de forma inversa al aumento de la fracción de antocianos copigmentados. Por tanto, la adición de copigmentos, a la vez que aumentó los procesos de copigmentación, hizo que los vinos fueran más estables ya que contribuyó a disminuir la fracción inestable de los antocianos representada por los antocianos libres. Con el ácido cafeico, en cambio, se observó un porcentaje superior de color debido a los antocianos libres que, por su intensa coloración roja, pudo ser la causa de la mayor Intensidad Colorante observada, aunque con el tiempo este color puede perderse debido a su inestabilidad.

Compuestos polifenólicos relacionados con los polifenoles totales y los taninos condensados.

En este apartado se estudió el efecto combinado de la adición de copigmentos y de la vinificación tradicional y la maceración prefermentativa en los taninos y en los parámetros relacionados con el estado de éstos en los vinos. Los flavanoles se encuentran en la uva y van aumentando a medida que se produce su madurez, al mismo tiempo se van produciendo reacciones de polimerización entre estos compuestos dando lugar a estructuras más complejas conocidas como procianidinas o taninos condensados. Durante la vinificación se producen al mismo tiempo reacciones de polimerización y de rotura de polímeros, resultando muy difícil establecer el verdadero estado de polimerización de los flavanoles en los vinos (Reynolds et al., 2001; Gómez-Mínguez y Heredia, 2004).

En la tabla 6 se recogen los parámetros relacionados con los polifenoles totales, la concentración de taninos condensados y el grado de polimerización de estos taninos.

El índice de Folin está directamente relacionado con la concentración total de polifenoles en los vinos. El análisis estadístico realizado con los valores del índice de Folin para los vinos elaborados con adición de distintos copigmentos mediante las dos técnicas de vinificación utilizadas, puso de manifiesto la existencia de un efecto destacado de la maceración prefermentativa, que incrementaba la concentración de polifenoles totales de forma significativa tanto en los vinos control elaborados sin adición de copigmentos, como en los adicionados. Este incremento de la concentración de polifenoles puede ser atribuible a la mayor permanencia del mosto con los hollejos (Pardo et al., 1994; Parenti et al., 2004; Álvarez et al., 2005) y se pone de manifiesto en el incremento observado tanto para los antocianos totales como para los taninos. Con respecto a los copigmentos utilizados, no

se observó un efecto significativo de éstos sobre la concentración total de polifenoles.

TABLA 6. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los parámetros polifenólicos relacionados polifenoles totales y taninos condensados, en los vinos de Monastrell.

| VINOS | I Folin (%) | Taninos (g/L) | I Dmach (%) |
|----------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| S/A T | 51,462 ± 1,271 bc | 2,103 ± 0,114 c | 60,152 ± 0,681 ab |
| CTr T | 49,598 ± 1,810 abc | 1,923 ± 0,068 bc | 62,709 ± 0,869 abc |
| CRu T | 50,048 ± 1,105 abc | 2,004 ± 0,112 bc | 61,054 ± 2,630 abc |
| BRu T | 54,523 ± 0,544 de | 2,048 ± 0,101 bcd | 56,544 ± 6,403 a |
| CTé T | 48,140 ± 0,516 a | 1,685 ± 0,203 a | 72,966 ± 8,438 cde |
| CKt T | 51,723 ± 1,976 bce | 2,013 ± 0,107 bcd | 66,127 ± 3,485 abc |
| BKt T | 51,553 ± 1,206 bc | 1,964 ± 0,038 bc | 82,571 ± 2,040 ef |
| CRo T | 48,433 ± 0,006 ab | 1,787 ± 0,183 ab | 66,676 ± 0,430 abc |
| CCf T | 51,223 ± 0,006 abc | 1,982 ± 0,034 abc | 64,677 ± 5,504 abc |
| BCf T | 50,480 ± 0,043 abc | 1,831 ± 0,191 abc | 64,120 ± 4,357 abc |
| S/A MF | 54,882 ± 2,042 de | 2,173 ± 0,197 d | 59,387 ± 8,224 ab |
| CTr MF | 51,431 ± 0,854 bc | 1,975 ± 0,327 abc | 64,457 ± 4,861 bcd |
| CRu MF | 54,833 ± 1,561 de | 2,013 ± 0,326 abc | 58,086 ± 11,271 ab |
| BRu MF | 56,920 ± 0,436 e | 1,934 ± 0,470 abc | 71,071 ± 5,165 de |
| CTé MF | 49,675 ± 0,687 a | 1,865 ± 0,251 ab | 73,768 ± 3,712 de |
| CKt MF | 52,063 ± 0,315 cd | 2,123 ± 0,031 cd | 78,871 ± 1,288 e |
| BKt MF | 55,045 ± 5,218 de | 2,229 ± 0,351 d | 88,622 ± 3,744 f |
| CRo MF | 49,321 ± 1,126 ab | 1,902 ± 0,096 abc | 68,954 ± 4,349 bcd |
| CCf MF | 50,585 ± 0,007 abc | 2,020 ± 0,088 bc | 67,781 ± 1,011 cd |
| BCf MF | 54,955 ± 0,023 de | 2,047 ± 0,167 bcd | 71,266 ± 2,601 de |
| P-value | 0,0000 | 0,0055 | 0,0000 |

S/A: sin adición; CTr: adición de extracto de trigo sarraceno en campo; CRu: adición de rutina en campo; BRu: adición prefermentativa de rutina; CTé: adición de extracto té verde en campo; CKt: adición de catequina en campo; BKt: adición prefermentativa de catequina; CRo: Adición de extracto de romero en campo; CCf: adición de ácido cafeico en campo; BCf: adición prefermentativa de ácido cafeico; T: vinificación tradicional; MF: vinificación con maceración prefermentativa en frío. Para un mismo parámetro analítico, la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los vinos, y diferente letra, indica que existen diferencias significativas al 99% según el Test de Rango Múltiple de Tukey.

A medida que aumenta la madurez de la uva, aumenta paralelamente la concentración de taninos en los hollejos, haciéndose más fácilmente extraíbles. Tanto en la uva como en el mosto, durante el proceso de vinificación y conservación de los vinos, los flavanoles interaccionan entre sí, dando lugar a taninos condensados de mayor o menor grado de polimerización.

Tal como se puede apreciar en la tabla anterior, la adición de copigmentos no contribuyó a incrementar la concentración de taninos condensados en los vinos, tal como observamos para los polifenoles totales.

En cambio, la maceración prefermentativa incrementaba ligeramente la extracción de taninos, a pesar de la necesidad de etanol para realizar una intensa extracción de éstos.

Los fenómenos de polimerización de los flavanoles se producen tanto durante la maduración de la uva, como durante la vinificación y conservación de los vinos.

El índice de DMACH se basa en la estimación del grado de polimerización de los taninos. El fraccionamiento de los taninos según su grado de polimerización tiene gran dificultad debido a que tienden a formar complejos muy estables con los compuestos con los que están en contacto. La determinación del grado de polimerización se realiza mediante valoraciones químicas relacionadas con las dimensiones moleculares de los taninos, de forma que cuanto mayor es el grado de polimerización menor será este índice, ya que quedarán menos posiciones libres para reaccionar. El índice de Dmach mostró un comportamiento opuesto al grado de polimerización de los taninos de los vinos, observándose una menor polimerización en los ensayos adicionados de catequinas en bodega, tal como era de esperar, ya que se trata de un flavanol monómero cuya presencia contribuye a disminuir el grado de polimerización de los taninos de esos vinos. Los otros copigmentos adicionados no influyeron en el grado de polimerización de los taninos, aunque la combinación de copigmentos y maceración prefermentativa contribuyó a mantener los vinos con un menor grado de polimerización.

CONCLUSIONES

La aplicación de rutina en campo y bodega mostró un incremento del color de los vinos, la fracción de antocianos coloreados y la concentración total de antocianos y de sus fracciones, especialmente de malvidina. La aplicación en campo del extracto de trigo sarraceno, rico en rutina, tuvo un efecto similar a la aplicación directa de rutina en el viñedo, por tanto la utilización de este extracto podría constituir un punto de partida interesante para incrementar el color de los vinos de Monastrell, incluso en viñedos con producción integrada o ecológica. La suplementación de rutina en la uva a la entrada en bodega fue más efectiva que si ésta se realizaba en campo, ya que se produjeron menores pérdidas de producto, pero la utilización de este producto no está legislada, y desde el punto de vista del efecto en el consumidor, resulta más interesante la utilización de un extracto vegetal que la de un producto químico.

La adición de catequina incrementó la concentración total de antocianos y mantuvo éstos en forma copigmentada durante más tiempo, retrasando el proceso de polimerización tanto de los antocianos como de los taninos. El extracto de té verde, rico en catequina, tuvo un efecto similar a la adición de catequina en el viñedo, pero la adición de catequina en bodega mostró un efecto más significativo. El hecho de que la adición de este producto no contribuyera al incremento del color, y retrasara la polimerización

polifenólica, junto con su alto precio, hace que su uso no parezca recomendable para los vinos de Monastrell.

La adición de ácido cafeico puro o de extracto de romero, incrementó el color de los vinos pero en cambio dio lugar a menor concentración de antocianos totales. El mayor porcentaje de color debido a los antocianos libres pudo ser la causa de la mayor intensidad colorante observada, aunque con el tiempo este color puede perderse debido a su inestabilidad.

La maceración prefermentativa no afectó al color de los vinos, pero aumentó significativamente la concentración total de antocianos, la fracción de antocianos copigmentados, los polifenoles totales y la concentración de taninos. Por tanto, podría ser una práctica recomendada para aquellas vendimias de Monastrell en las que no interese retrasar mucho la vendimia para no elevar en exceso el grado alcohólico de los vinos.

REFERENCIAS

- ÁLVAREZ, I.; GARCÍA, M. A.; MARTÍN, P.; GONZÁLEZ, R.; RODRÍGUEZ, M., 2004. Efecto de la maceración prefermentativa en frío en la composición de vinos tintos de Tempranillo. En "III Congreso Español de Ingeniería de Alimentos". Pamplona.
- ÁLVAREZ, I.; GARCÍA, M. A.; MARTÍN, P.; GONZÁLEZ, R. 2005 a. Utilización de la criomaceración para mejorar la extracción de compuestos polifenólicos en uvas de Tempranillo procedentes de cultivo con altos niveles de fertilización. Jornadas Técnicas de los grupos de investigación enológica españoles. GIENOL.
- ALVAREZ, I.; ALEIXANDRE, J.; GARCÍA, M.J.; LIZAMA, V. 2006. Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in the Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta* 563, 109-116.
- ALVAREZ, I.; ALEIXANDRE, J.; GARCÍA, M.J.; LIZAMA, V. JL. 2008. Effect of the prefermentative addition of copigments on the polyphenolic composition of Tempranillo wines after malolactic fermentation. *European Food Research and Technology*. On line DOI 10.1007/s00217-008-0957-0.
- ASEN, S., STEWART, R.N. and NORRIS, K.H., 1972 "Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color". *Phytochemistry*, 11, 1139 – 1145.
- BAKKER, J., PICINELLI, A. and BRIDLE, P. 1993 "Model wine solutions: colour and composition changes during ageing". *Vitis*, 32, 111-118.
- BAKOWSKA, A., KUCHARSCA, A.Z., OSZMIANSKI, J. 2002. "The effects of Heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex". *Food Chemistry* 81 (2003) 349 – 355.
- BARANAC, J.M., PETRANOVIV, N.A. and DIMITRIC-MARKOVIC, J.M., 1996. "Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1333-1336.
- BARANAC, J.M., PETRANOVIV, N.A. and DIMITRIC-MARKOVIC, J.M. 1997. Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 3. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1698-1700.
- BARANOWSKI, E.S.; NAGEL, C.W. (1983). Kinetics of malvidin-3-glucoside condensation in wine model solutions. *J. FoodSci.* 38, 932-936.
- BISHOP, P.D. NAGEL, C.W. 1984. "Characterization of the condensation product of Malvidin 3,5-diglucoside and catechin". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 1022-1026.
- BLOOR, S.J.; FALSHAW, R. (2000). Covalently linked anthocyanin-flavonol pigments from blue *Agapanthus* flowers. *Photochemistry*, 53, 575-579.
- BOIDO, E.; ALCALDE-EON, C.; CARRAU, F.; DELLACASSA, E.; RIVAS-GONZALO, J.C. 2006. Aging effect on the Pigment Composition and Color of *Vitis vinifera* L. Cv. Tannat Wines. Contribution of the Main Pigment Families to Wine Color. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6692-6704.

- BOULTON, R. B., 1996. Methods for the assement of copigmentation in red wines. Presented at the 47th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture, Reno, NV.
- BOULTON, R., 1997. "Copigmentation in red wines. Some skin contact, a seedy side or is it just pulp fiction?". American Vineyard: UC Davis Viticulture and Enology Lab 05/97.
- BOULTON, R., 2000. "The variation in Skin Composition and Wine Color for Six Vineyard Sites". 3rd International Burgundy – California – Oregon Colloquium.
- BOULTON, R., 2001. "The copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review". *Am. J. Enol. Vitic.* 52 , 67 – 87.
- BROUILLARD, R. 1982. Chemical structure of anthocyanidins. In: Anthocyanins as foodcolors. P. Markakis (Ed.). pp 1-40. Academic Press, N. York.
- BROUILLARD, R., 1983. *Phytochemistry*, 20 Pg 1311.
- BROUILLARD, R. MAZZA, G., SAD, Z., ALBRECHT-GARY, A.M. and CHEMINAT, A., 1989. "The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for structural study of aqueous solutions". *Journal of the American Chemical Society*, 111, 2604 – 2610.
- BROUILLARD, R.; DANGLES, O. 1994. Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chemistry*, 51, 365-371.
- CACHO, J. (2003). El vino y su composición y nuestros sentidos. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza (España)* 47: 13.
- CASTELLARI, M., MATRICARDI, L., ARFELLIS, G., GALASSI, S., AMATI, A., 1999. "Level of single phenolics in red wine as a function of the oxygen supplied during stotag". *Food Chemistry* 69 (2000) 61 – 67.
- COMISIÓN EUROPEA, 1990. Reglamento (CEE) No 2676/90 de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos oficiales de análisis de vinos, zumos y mostos de uva. En: *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L272* (3 de octubre de 1990). Comisión Europea ed. Bruselas. Bélgica: 0001-0192.
- DALLAS, C.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; LAUREANO, O. Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2, and acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2402-2407.
- DARIAS-MARTÍN, J., CARRILLO, M., DÍAZ, E., BOULTON, R.B., 2001. "Enhancement of wine colour by prefermentation addition of copigments". *Food Chemistry* 73 (2001) 217 – 220.
- DARIAS-MARTÍN, J., B. MARTÍN, M. CARRILLO, R. LAMUELA, C. DÍAZ AND R. BOULTON 2002. The effect of caffeic acid on the color of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (7): 2062-2067.
- DAVIES, A.J. and MAZZA, G. 1993. "Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colourless phenolic compounds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 716-720.
- DONNER, H., KALT, W., MAZZA, G. 1998. "Simple and monoacylated cyanidin 3-glucosides copigmented with chlorogenic acid, protocatechuic acid and caffeine". 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry.
- FURTADO, P.; FIGUEREIDO, P.; CHAVES, H.; PINA, F. 1993. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. 7. *Photochem. Photobiol. A. Chem.* 75, 113-118.
- GARCÍA BARCELÓ, J., 1990. Técnicas analíticas para vinos. GAB. ISBN: 84-404-7827-5.
- GÓMEZ-MINGUEZ, M.; HEREDIA, F. 2004. Effect of the maceration techniques on the relationships between anthocyanin composition and objective color of Syrah wines. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5117-5123.
- GOTO, T.; KONDO, T., 1991 "Structures and molecular staking of anthocyanins flower color variation". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, 17-33.
- GRIS, E.F.; FERREIRA, E.A.; FALCAO, LD ; BORDIGNON-LUIZ, M.T., 2005. Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extract in model system. *Food Chemistry*, Amsterdã, v. 100, n. 3, p. 1289 -1296, 2007.
- HERMOSÍN GUTIÉRREZ, I.; GONZÁLEZ (2003). Influence of etanol content on the extend of copigmentation in a Cencibel young red wine. *J. Agric. Food Chem*, 51, 4079-4083.
- HERMOSÍN GUTIÉRREZ, I. y SCHWARZ, M. 2005 a. Efectos de la naturaleza del copigmento y de la variedad de uva en el color de vinos tintos elaborados con adicción prefermentativa de copigmentos. *Actas de las VIII Jornadas de los Grupos de Investigación Enológica (GIENOL)*. Palencia. 80-82.

- HERMOSÍN GUTIÉRREZ, I. y SÁNCHEZ-PALOMERO y VICARIO ESPINOSA, A. 2005 b. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92, 269-283.
- LAURICE, J.L.; ARCHIER, P.; ROCHEVILLE-DIBORNE, C.; COENS, S.; ROGGERO, J.P., 1989. Composition anthocyanique des cépages Il-Essal de classification sur trios ans par analyse en composantes principales ad etude des variations annuelles de cépages de meme provenance. *Rev. Fr OEnol*, 121, 7-12.
- LIAO, H.,Y. CAI Y E. HASLAM, 1992. "Polyphenol interactions. Anthocyanins : Copigmentation and colour changes in red wines", *J. Sci. Food. Agric.*, 1992; 59: 299-305.
- LIZAMA, V.; ALVAREZ, I.; ALEIXANDRE, JL; GARCIA, MJ. 2007. Efecto de la adición prefermentativa de copigmentos en la composición polifenólica de los vinos de Tempranillo. *Avances en ciencias y técnicas enológicas*. I.S.B.N.: 978-84-690-6060-5.
- MAZZA, G., BROUILLARD, R. 1990. "The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions." *Phytochemistry*, 29, 1097 – 1102.
- MAZZA, G.; MINIATI, E. 1993. *Grapes In: Anthocyanins in fruits, vegetables and grains* C.R.C. Press, Boca Ratón, Ann Arbor, London, Tokyo, 149-199.
- MIRABEL, M.; SAUCIER, C.; GUERRA, C.; GLORIES, Y. (1999). Copigmentation model wine solutions: occurrence and relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitíc.* 50, 211-217.
- MISTRY, T.V., CAI, Y., LILLEY, T.H., and HASLAM, E., 1991. "Polyphenol interactions. Part 5. Anthocyanin copigmentation". *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, 2, 1287-1296.
- OSAWA, Y. 1982. "Anthocyanins as Food colors" Markakis, Ed., London academic Press, London. Pg. 41.
- PARDO, F. ; NAVARRO, G, (1994). Evolución de los compuestos fenólicos de vinos tintos obtenidos con diferente tiempo de maceración. *Viticultura y Enología Profesional*, 34, 51-57.
- PARENTI, A.; SPUGNOLI, P.; CALAMAI, L.; FERRARI, S.; GORI, C. 2004. Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovesi grape. *Eur. J. Food Res. Technol*, 218: 360-366.
- PECKET, R.C.; SMALL, C.J., (1980). Occurrence, location and development of anthocyanoplasts. *Phytochem*, 19: 2571.
- PRICE, S.F., et al., 1995. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2): p. 187-194.
- REYNOLDS, A.; CLIFF, M.; GIRARD, B; KOPP, T. 2001. *Am. J. Enol. Vit.*, 52(3), 235-242.
- RIVAS-GONZALO, J.C.; BRAVO-HARO, S.; SANTOS-BUELGA, C. (1995). Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence ofacetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.*, 43,1444-1449.
- RIVAS-GONZALO, J., C. SANTOS BUELGA Y O. LOCK, 2003. *Química y Estabilidad*. pp.26-59. In: Muñoz, O (Ed). *Antocianos y Betalainas, colorantes naturales de aplicación industrial* CYTED. Edit. Salesianos, Santiago, Chile.
- ROBINSON, G.M.; ROBINSON, R. 1931. "A survey of anthocyanins". *Biochemical Journal*, 25, 1687.
- ROGGERO, J.P., COEN, S., RAGONNET, B., 1986. High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah,. An approach to anthocyanin metabolism. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 77-83.
- SAINT-CRIQ, N., VIVAS, N, GLORIES, Y. 1998. Maturité phenolique: definition et contrôle. *Revue Francaise d'Oenologie*. 173: 22-25.
- SANTOS-BUELGA, C. 2001. Sustancias polifenólicas y color del vino tinto. *Enología Avuí*, 29-37.
- SCHWARZ, M.; PICAZO-BACETE, J.J.; WINTERHALTER, P.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2005. Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented afterthe addition of copigments. *J. Agric. Food Chem*, 53, 8372-8381.
- SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16 (3): 144-158.
- SOMERS, T.C. and EVANS, M.E. 1974 "Wine Quality: Correlations with colour density and anthocyanin equilibrium in a group of young red wines". *J. Sci. Fd. Agric.* 25: 1369-1379.

- SOMERS, T.C. 1976. Pigment development durin ripening of the grape. *Vitis* 14:269-277.
- VIVAS, N., GLORIES, Y., LAGUNE, L., SAUCIER, C., AUGUSTIN, M., 1994. Estimation of the polymerisation level of procyanidins from grapes and winesby use of p-dimethylaminocinnamaldehyde. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 28: 319-336.
- ZAMORA, F. 2003. "Incidencia de las técnicas de vinificación sobre la extracción y estabilización de la materia colorante en función del grado de madurez de la uva". Cursos de verano Casado del Alisal. Hacia un mejor conocimiento del vino.