

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EFFECTO DE DISTINTAS TÉCNICAS DE VINIFICACIÓN SOBRE
LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES Y LA COMPOSICIÓN DE
LOS VINOS TINTOS DEL CV. TANNAT.**

por

Guzmán FAVRE SILVA

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2008**

Tesis aprobada por:

Director: -----
Ing. Agr. Phd. Gustavo González-Neves

Ing. Agr. MSc. Gerardo Echeverría

MSc. Graciela Gil

15 de diciembre de 2008
Fecha: -----

Autor: -----
Guzmán Favre Silva

AGRADECIMIENTOS

- A Facultad de Agronomía (UDELAR) por haberme dado la posibilidad de desarrollar mi vocación y por todos los recursos brindados a lo largo de la carrera.
- A Gustavo González-Neves por la oportunidad de realizar esta tesis, la formación brindada y el apoyo en el transcurso de la misma.
- A Darwin Charamelo y Graciela Gil por la formación en las determinaciones analíticas.
- Al personal del laboratorio de INAVI por la importante colaboración con las determinaciones analíticas.
- A Sully Toledo por la rigurosidad y seriedad en la corrección de la tesis, por la atención y los aportes que contribuyeron a valorizar este trabajo.
- A las compañeras de cátedra Julia Salvarrey y Mercedes Fourment por la constante motivación, consejos y opiniones brindadas.
- A la Ingeniera Agrónoma Ana Piedra Buena por la preocupación demostrada y soporte ofrecido durante los años de estudio.
- Muy especialmente a Sonia Silva y Oswaldo Favre por hacer posible mi desarrollo personal y el de mis estudios, por el constante estímulo y soporte en el transcurso de la carrera.
- A Andrés Ignacio Favre por haber sido un gran compañero y ejemplo desde el comienzo de mi formación educativa.
- A Irma Borthagaray, Azuna Silva, Gonzalo y Pablo Silva, por la compañía, el ejemplo y la motivación que significaron a lo largo de mi formación.
- A Stefania Emiliani por ser estímulo, contención y compañía en las etapas finales de mis estudios.
- A quienes hoy no están pero que fueron muy importantes para mi.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	6
2.1 <u>INTRODUCCIÓN</u>	6
2.2 <u>POLIFENOLES</u>	7
2.2.1 <u>Introducción</u>	7
2.2.2 <u>Compuestos fenólicos en la uva y el vino</u>	8
2.2.2.1 Flavonoides.....	10
2.2.2.2 Compuestos no flavonoides.....	16
2.2.3 <u>Reacciones de los polifenoles y modificaciones del color durante la vinificación y el añejamiento</u>	17
2.2.4 <u>Localización en la uva de antocianos y taninos</u>	25
2.2.4.1 <u>Introducción</u>	25
2.2.4.2 <u>Hollejos</u>	27
2.2.4.3 <u>Semillas</u>	28
2.2.5 <u>Elementos que intervienen en la extracción de compuestos fenólicos</u>	29
2.2.5.1 <u>Antocianos y taninos</u>	29
2.2.6 <u>Maceración</u>	31
2.3 <u>TÉCNICAS DE VINIFICACIÓN</u>	34
2.3.1 <u>Introducción</u>	34
2.3.2 <u>Maceración prefermentativa en frío</u>	36
2.3.3 <u>Extracción diferida de antocianos</u>	50
2.3.4 <u>Maceración extendida</u>	59
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	66
3.1 <u>INTRODUCCIÓN</u>	66
3.2 <u>DISEÑO EXPERIMENTAL</u>	66
3.3 <u>ANÁLISIS DE LAS UVAS</u>	67
3.4 <u>OBTENCIÓN DE MOSTOS Y ENCUBADO</u>	67
3.5 <u>OPERACIONES REALIZADAS EN EL TRANCURSO DE LAS VINIFICACIONES</u>	68
3.5.1 <u>Adición de LSA y SO₂</u>	68

3.5.2	<u>Remontajes y bazuqueos</u>	68
3.6	SEGUIMIENTO DE LAS VINIFICACIONES.....	69
3.6.1	<u>Prensado y operaciones posteriores al descube</u>	70
3.7	TRATAMIENTOS.....	71
3.7.1	<u>Maceración tradicional</u>	71
3.7.2	<u>Maceración extendida</u>	72
3.7.3	<u>Extracción diferida de antocianos</u>	72
3.7.4	<u>Maceración prefermentaria en frío</u>	72
3.7.5	<u>Análisis de los mostos</u>	73
3.7.6	<u>Análisis de los vinos</u>	73
3.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	75
4.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	76
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS MOSTOS ENCUBADOS.....	76
4.2	CARACTERIZACIÓN FENÓLICA DE LAS UVAS A VINIFICAR.....	77
4.3	CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN Y TEMPERATURA DE LOS MOSTOS SEGÚN TRATAMIENTO.....	78
4.4	SEGUIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES DE ANTOCIANOS Y POLIFENOLES TOTALES DURANTE LAS VIFICACIONES.....	80
4.4.1	<u>Análisis de las curvas de extracción</u>	80
4.4.1.1	Antocianos	80
4.4.1.2	Polifenoles totales	86
4.4.2	<u>Representación estadística, ajuste de modelos</u>	91
4.4.2.1	Antocianos	91
4.4.2.2	Polifenoles	93
4.5	COMPOSICIÓN DE LOS VINOS.....	95
4.5.1	<u>Variables de rutina</u>	95
4.5.1.1	Cinéticas de fermentación y azúcares reductores residuales.....	95
4.5.1.2	Grado alcohólico	96
4.5.1.3	Acidez total	97
4.5.1.4	Acidez volátil	98
4.5.1.5	pH	99
4.5.1.6	Anhídrido sulfuroso libre y total.....	99
4.5.1.7	Extracto seco	100
4.5.2	<u>Análisis de las familias polifenólicas y características del color</u>	101
4.5.2.1	Antocianos	101
4.5.2.2	Polifenoles totales	104
4.5.2.3	Catequinas y proantocianidinas	105
4.5.3	<u>Color y variables asociadas</u>	110
4.5.3.1	IC.....	111

4.5.3.2 Tonalidad	114
4.5.4 <u>Estudio de los componentes del color</u>	117
4.5.4.1 Análisis en función del tiempo.....	121
4.5.4.2 Análisis del porcentaje del color debido a A, C y P según tratamiento y edad del vino	123
5. <u>CONCLUSIONES</u>	129
6. <u>RESUMEN</u>	132
7. <u>SUMMARY</u>	134
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	136

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Exportaciones anuales de vinos de 1997 al 2007 expresadas en miles de litros	3
2. Variedades tintas para vino - plantas, superficie, producción, productividad y densidad de plantación, por variedad - año 2007...	4
3. Principales compuestos fenólicos de la uva.....	9
4. Antocianidinas en el genero <i>Vitis</i>	11
5. Diferentes sustituciones que admiten una unidad de catequina y sus nombres respectivos	14
6. Distribución de los polifenoles en el grano de uva (expresado en mg por kg de uva)	24
7. Frecuencia e intensidad de los remontajes según etapa de vinificación y proporción aproximada del volumen involucrado en cada procedimiento	69
8. Resumen de operaciones realizadas al vino luego del prensado	71
9. Variables de rutina	73
10. Composición fenólica y color	74
11. Contenido en azúcar de los mostos de cada tratamiento por tanque de vinificación	76
12. Características fenólicas de las uvas vinificadas	77
13. Diferencias en el contenido de antocianos entre la MT y la EDA por día de maceración	83
14. Magnitud del descenso en antocianos totales expresado en % del máximo registrado por tratamiento	86
15. Contribución diaria en antocianos y polifenoles totales como % del máximo alcanzado por cada variable según tratamiento y días de maceración	90
16. Estimación de los parámetros a, b y los intervalos de confianza, para el modelo lineal-lineal ajustado a las extracciones de antocianos	91
17. Comparación estadística de los días al punto de corte en la extracción de antocianos según tratamiento.....	92
18. Estimación de los parámetros a, b y p, y los intervalos de confianza, para el modelo lineal-plato ajustado a las extracciones de polifenoles.....	93
19. Comparación estadística de los días al punto de corte en la extracción de polifenoles según tratamiento.....	93
20. Azúcares reductores residuales según tratamiento	95
21. Grado alcohólico de los vinos según tratamiento.....	96
22. Grado alcohólico de los vinos según fecha de análisis.....	96

23. Acidez total en g H ₂ SO ₄ .L ⁻¹ según tratamiento	97
24. Acidez total en g H ₂ SO ₄ .L ⁻¹ según fecha de análisis	97
25. Acidez volátil según tratamiento	98
26. Acidez volátil según fecha de análisis.....	98
27. pH de los vinos según tratamiento en el promedio de las tres fechas de análisis	99
28. Anhídrido sulfuroso libre y total en mg/L de H ₂ SO ₄ según tratamiento	99
29. Extracto seco según tratamiento. Promedio de tres fechas de análisis	100
30. Índices de composición polifenólica de los vinos. Valores medios de 3 fechas de análisis	101
31. Tratamientos ordenados según nivel de la variable considerada	101
32. Valores medios de antocianos en los vinos según fecha de análisis..	103
33. Valores medios en polifenoles totales según fecha de análisis	104
34. Valores medios en catequinas y proantocianidinas según fecha de análisis	110
35. Índices clásicos del color de los vinos según tratamiento. Medias de 3 fechas de análisis	110
36. Tratamientos ordenados según el valor que presentaron de cada variable	111
37. Valores medios de IC según fecha de análisis	113
38. Evolución de la IC en el tiempo según tratamiento	113
39. Evolución de la tonalidad en el tiempo según tratamiento	114
40. Tonalidad e importancia relativa del color rojo, amarillo y azul de los vinos según fecha de análisis.....	115
41. Índices de color copigmentado, polimérico y antocianos libres según tratamiento	117
42. Tratamientos ordenados según el valor que presentaron de cada variable.....	118
43. Valores medios de los componentes del color y de los antocianos de los vinos según fecha de análisis.....	121
44. Participación porcentual de cada componentes del color según tratamiento	123
45. Participación porcentual de cada componentes del color según tratamiento y edad del vino	124
46. Evolución en el porcentaje de participación porcentual de los componentes del color con el tiempo.....	124

Figura No.

1. Clasificación climática multicriterio – Índices adaptados y delimitación de las regiones climáticas vitícolas. Distribución de viñedos	1
2. Evolución de azúcares y acidez durante la maduración de la uva.....	6
3. Antocianos del género <i>Vits</i>	11
4. Efecto del pH sobre el color del vino tinto.....	12
5. Representación grafica de la estructura básica de los taninos	13
6. Antociano destacando el OH en la posición 5 la cual es una estructura común de todos los antocianos de las <i>viníferas</i>	18
7. Cromatograma HPLC a 520 nm de un vino tinto utilizando una columna PLRP	20
8. Representación gráfica de la vitisina A y la vitisina B	21
9. Formación de un complejo de copigmentación a partir de un pigmento (antociano monómero en su forma de catión flavilio) y de un copigmento (flavonol)	23
10. Localización de antocianos y taninos.....	26
11. Tanque de MPF mostrando la sublimación del CO _{2(s)}	39
12. Representación del punto triple para el CO _{2(s)}	45
13. Acetaldehído como producto intermedio de la fermentación alcohólica ..	53
14. Compuestos mediados por acetaldehído.....	53
15. Vista del sombrero de hollejos en un mosto en activa fermentación	55
16. Operación de bazuqueos sobre el sombrero de hollejos	57
17. Paisaje del viñedo.....	66
18. Tanques de vinificación.	67
19. Descobajadora-moledora Alfa 60 R	67
20. Mosto/vino a ser remontado.....	68
21. Toma de densidad y temperatura.	69
22. Ecurrimiento del mosto. Vino gota	70
23. Prensa	70
24. Bloque de hielo seco previo agregado al mosto	72
25. Cinéticas de fermentación según tratamiento.....	78
26. Temperatura de los mostos en °C según tratamiento y día de maceración	78
27. Evolución de la extracción de antocianos en cada tipo de vinificación	80
28. Perfil de extracción de antocianos de la MT y de los últimos 8 días del tratamiento MPF.....	85
29. Evolución de la extracción de polifenoles totales según tratamiento	86
30. Perfil de extracción de polifenoles totales de la MT y de los últimos 8 días del tratamiento MPF	89

31. Contenido medio en antocianos totales de las 3 fechas de análisis	101
32. Contenido en polifenoles totales. Media de 3 fechas de análisis.....	104
33. Contenido de catequinas según tratamiento. Media de 3 fechas de análisis	105
34. Contenido en proantocianidinas según tratamiento. Media de 3 fechas de análisis	105
35. Comparación del contenido en proantocianidinas a los 3 meses del descube.....	107
36. Comparación del contenido en catequinas a los 3 meses del descube...	108
37. Valor promedio de componentes del color según tratamiento	118
38. Evolución de los componentes del color A, C y P en función del tiempo.	122

1 INTRODUCCIÓN

La gran capacidad de adaptación de la vid a diferentes ambientes geográficos y la facilidad con que ésta puede ser propagada, explican en gran medida la amplia distribución mundial de este cultivo.

Uruguay esta comprendido entre los paralelos 30 y 35 de latitud sur, en un clima con influencia atlántica y del estuario del Río de la Plata.

Climáticamente Uruguay esta clasificado según índices (Heliotérmico, de Sequía y de Frescor Nocturno) que determinan la aptitud climática del territorio para el cultivo de la vid y su óptima maduración (metodología propuesta por Tonietto y Carbonneau, 2004).

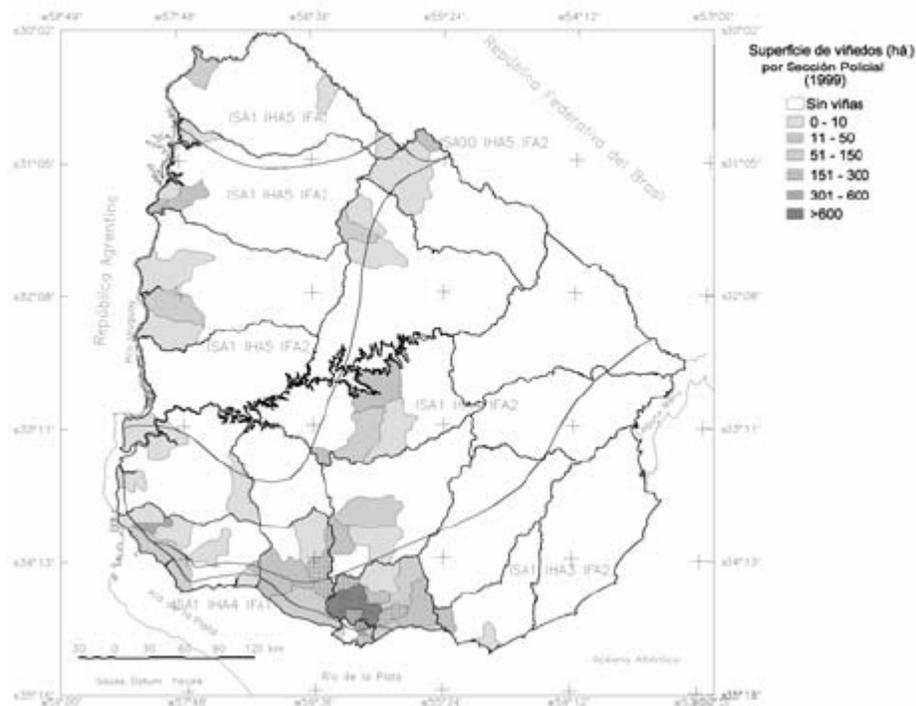


Figura 1. Clasificación climática multicriterio – Índices adaptados y delimitación de las regiones climáticas vitícolas. Distribución de viñedos.

Fuente: Ferrer et al. (2007)

Particularmente la zona Sur-Este (origen de las uvas utilizadas para los ensayos) fue clasificada por Ferrer et al. (2007) como IH_{A3}, IF_{A2}, IS_{A1}, que indican un clima vitícola templado con noches templadas y sequía moderada.

En Uruguay, la principal variedad de *Vitis vinifera* cultivada con el fin de producir vinos de calidad es Tannat, cepa que comparte su establecimiento y evolución a través del tiempo con la historia de la viticultura nacional.

Esta variedad de origen francés, fue introducida por Don Pascual Harriague en 1875 en Salto, adquiriendo una gran importancia que se extiende hasta nuestros días (Echeverría, 2005).

A comienzos de 1990, el sector vitivinícola se encontraba en un mercado altamente protegido de altos costos de producción y vinos de baja calidad, frente al comienzo de un proceso de integración regional, el MERCOSUR.

Ante este escenario, surgía que la vitivinicultura en un sentido amplio, tenía muy poca capacidad de competir en un mercado abierto dado los volúmenes importantes de producción argentinos. También se especulaba con la calidad de los vinos chilenos.

En respuesta a tal situación, la cátedra de Vitivinicultura de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, junto al INAVI, buscaron una estrategia de reconversión necesaria para que el productor pudiera mantenerse y competir. Se definió así la necesidad de diferenciar a Uruguay de los demás países del MERCOSUR, no en volúmenes sino en calidad (La Onda Digital, 2002).

El primer concepto fue que el país necesitaba diferenciarse con una variedad, que no fuese cultivada por los demás países de la región, surgiendo Tannat como la cepa que podría liderar el proceso de reconversión.

Frente a la dificultad que Uruguay no contaba con importantes precedentes de exportación de vinos, fruto de un medio fuertemente protegido, Tannat permitía salir con un producto típico capaz de ser asociado con el país (La Onda Digital, 2002).

Tannat se convierte así en un tema central de investigación, ya que si bien, contaba con más de cien años de producción en Uruguay, nunca se había estudiado localmente su secuencia de proceso (La Onda Digital, 2002).

En tal sentido la investigación se centró tanto en aspectos productivos como enológicos, con el objetivo de mejorar la calidad y explotar al máximo el potencial de la variedad.

En este proceso fue destacable la participación del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INAVI), Facultad de Agronomía, INIA Las Brujas, y los grupos CREA.

En 1995 Uruguay organizó la 75ª Asamblea Mundial de la OIV. Esta asamblea fue de vital importancia ya que abrió las puertas al mercado mundial para la exportación de vinos finos uruguayos.

Al mismo tiempo INAVI con el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, comenzaron un programa de reconversión de viñedos buscando la erradicación de vides americanas (*Vitis labrusca*) y de híbridos productores directos, y la implementación de cepas *Vitis vinífera* más adaptadas a la producción de vinos de buena calidad (González-Neves, 2005b). Si bien opiniones de expertos internacionales ya dejaban cuenta de una mejora muy significativa de la competitividad entre 1990 y 1996 (Echeverría, 2005).

A partir del año 2000, INAVI igualmente impulsa un programa de reconversión de bodegas con la premisa de modernizar los equipamientos de las mismas y de mejorar las prácticas de vinificación (González-Neves, 2005b).

En conjunto, las políticas institucionales, las inversiones del sector privado y los aportes de la investigación, han permitido una mejora importante de la calidad de los vinos producidos así como un mejor posicionamiento de los vinos Tannat de Uruguay en el contexto internacional¹.

La evolución de las exportaciones en los últimos 10 años puede apreciarse en la cuadro No. 1, mientras que el cuadro No. 2 resume la realidad actual del encepado nacional y la contribución de cada variedad a la producción total de uvas tintas destinadas a la vinificación.

Cuadro 1. Exportaciones anuales de vinos de 1997 al 2007 expresadas en miles de litros.

1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
1066	1107	3046	3209	2590	2226	1763	1210	1460	3591	9897

Fuente: adaptado de INAVI (2008a).

¹ Carbonneau, A. 2008. Com. personal.

Cuadro 2. Variedades tintas para vino - plantas, superficie, producción, productividad y densidad de plantación, por variedad - año 2007.

Variedades de Vino	Plantas		Superficie		Producción	
	Descripción	Cantidad existente (con o sin producción)	% respecto al total tintas vino	Ha	% respecto al total tintas vino	Kilogramos
MEZCLA (TINTA)	345.197	1.5	86	1.3	683175	0.7
FRUTILLA	1.607.989	7.0	440	6.7	5136362	5.2
HIBRIDOS TINTOS	2.529.530	11.0	545	8.3	5441570	5.5
TANNAT	6.008.192	26.2	1.714	26.1	27793387	28.0
FOLLE NOIR	251.595	1.1	67	1.0	327286	0.3
CABERNET FRANC	999.496	4.4	299	4.6	4421819	4.5
CABERNET SAUVIGNON	2.368.674	10.3	720	11.0	8267543	8.3
MERLOT	2.793.273	12.2	820	12.5	11927266	12.0
SYRAH	256.566	1.1	84	1.3	690945	0.7
MOSCATEL HAMBURGO (VINO)	4.944.755	21.6	1.533	23.4	31855685	32.1
NEBBIOLO	75.799	0.3	28	0.4	273365	0.3
PINOT NOIR	117.347	0.5	35	0.5	359945	0.4
COT (MALBEC)	120.825	0.5	36	0.5	462736	0.5
PETIT VERDOT	41.010	0.2	12	0.2	169067	0.2
OTRAS TINTAS DE VINO	468.383	2.0	145	2.2	1352484	1.4
Total	22.928.631	100	6.564	100.0	99.162.635	100.0

Fuente: adaptado INAVI (2008b).

Sumado al requerimiento de avanzar en el conocimiento y empleo de nuevas variedades viníferas, permanece la continua necesidad de aumentar la calidad de las cosechas y de perfeccionar técnicas de vinificación para obtener productos diferenciados y de alto valor enológico¹.

En este contexto surge la presente investigación que consistió en comparar tres técnicas alternativas a la vinificación tradicional en tinto de uvas Tannat.

Estas son, la extracción diferida de antocianos (EDA), la maceración prefermentativa en frío (MPF) y la maceración extendida (ME), siendo las dos primeras mencionadas, probadas por primera vez a nivel de investigación en el país.

Los diferentes resultados analíticos fueron evaluados durante el desarrollo de las maceraciones y en los vinos terminados a los tres, seis y doce meses del descube.

En especial fue analizado al efecto de los tratamientos sobre la composición fenólica del mosto/vino, debido a la gran influencia de estos compuestos en la calidad del vino y por ser Tannat una variedad de características excepcionales en este sentido (González-Neves, 2005b).

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUCCIÓN

La uva a cosechar es el resultado de profundos cambios en la composición físico-química que se profundizan en la última etapa de desarrollo de la misma o maduración.

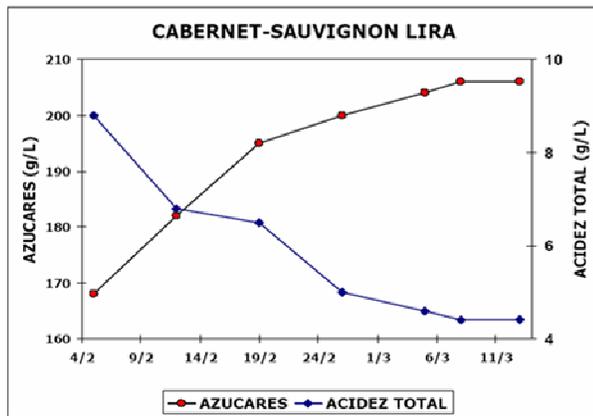


Figura 2. Evolución de azúcares y acidez durante la maduración de la uva.

Fuente: González-Neves et al. (2005a)

Los contenidos de azúcares que eran bajos en la baya hasta enero (menos al 2% y principalmente glucosa), aumentan marcadamente durante la maduración, llegando a un máximo que suele coincidir con el mínimo en el contenido de acidez (figura No. 2) y que definen el punto conocido como madurez tecnológica, el cual es utilizado en muchos casos como un indicador del momento adecuado para la vendimia.

Los valores de azúcares, acidez y pH generalmente encontrados en uvas del cultivar Tannat, explican en parte su gran aptitud enológica.

González-Neves (2005b) expone en ensayos realizados con Tannat, Cabernet Sauvignon y Merlot, que las uvas del cultivar Tannat mostraron los tenores más elevados de acidez total y los valores más bajos de pH para los tres años de estudio. Tannat también mostró los mayores contenidos de azúcares en todos los casos.

La acidez real o pH va a condicionar la mayoría de los procesos que ocurren durante la vinificación así como las características y propiedades del vino.

Los principales microorganismos ingresados a bodega con la vendimia son bacterias, que son más sensibles a la acidez que las levaduras, por lo que ésta es un importante seleccionador microbiano predisponiendo el mosto a una fermentación adecuada².

Mostos con alto pH frecuentemente resultan inestables y dan lugar a vinos que son más susceptibles a la oxidación y al deterioro microbiológico. Particularmente, el dióxido de azufre agregado al vino con tal de prevenir tales fenómenos, debe su concentración en estado libre, (forma activa) al pH del medio.

Otra consecuencia de los altos niveles de pH del mosto y el vino, es un descenso en la calidad y la estabilidad del color de los vinos tintos como resultado de la reducción del grado de ionización de los compuestos involucrados.

2.2 POLIFENOLES

2.2.1 Introducción

Los polifenoles son metabolitos secundarios (entendiéndose por éstos a todos aquellos compuestos orgánicos sintetizados por un organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo) que están presentes en todas las plantas vasculares (Stafford,1991), y su presencia se debe a las múltiples funciones fisiológicas que éstos desarrollan en las mismas.

Se citan más de 4000 flavonoides identificados (Stafford et al., citados por Downey et al., 2006).

La naturaleza cromófora de la estructura en anillo de los polifenoles resulta en la absorción de luz tanto en el espectro visible como en el ultravioleta (Ribéreau-Gayon et al., 1972). La absorción en el ultravioleta protege a las plantas de la radiación UV, lo que ha sido propuesto como el rol ancestral de estos compuestos (Koes et al., 1994).

Los polifenoles incluyen pigmentos que actúan tanto como atrayentes para los polinizadores como para los agentes dispersantes de las semillas (Koes et al., 1994).

Los flavonoides también actúan previniendo el consumo por herbívoros a través del amargor y la astringencia natural de los flavan-3-oles, y los taninos

² González-Neves, G. 2005. Com. personal.

condensados (Feeny, citado por Downey et al., 2006).

Además, muchos flavonoides desarrollan actividad como fitoalexinas, defendiendo a la planta contra ataques fúngicos y bacterianos (Dakora y Phillips, 2002).

Dado los objetivos de esta tesis se cree de particular importancia hacer una reseña de las principales características y consecuencias enológicas de la presencia de estos compuestos en la uva el mosto y el vino. Como lo expresa Kennedy (2006), la comprensión científica de los polifenoles de la uva y del vino es un requerimiento cada vez mayor para manejar eficientemente diferentes estilos de vinos.

2.2.2 Compuestos fenólicos en la uva y el vino

Los polifenoles son de los constituyentes más importantes de la uva y tienen una gran incidencia sobre la calidad del vino, a través de su influencia en las características químicas, sensoriales y nutricionales (González-Neves, 2005b).

En los vinos tintos su importancia relativa es aún mayor. A nivel sensorial son responsables del color, la astringencia, el amargor, y en gran medida del cuerpo y la estructura. El tenor en polifenoles también estará determinando la aptitud o capacidad que tendrá el vino para la guarda. En adición, se atribuye a estos compuestos, propiedades benéficas para la salud a través de su capacidad antioxidante (Konga 2003, Villaño et al. 2006).

La estructura de todos los compuestos fenólicos esta basada en la sustitución de un H por un OH en el anillo de benceno (Kennedy et al., 2006).

Las estructuras donde se da una alternancia de átomos con y sin oxígeno son muy inestables y en las plantas se estabilizan originando compuestos aromáticos del tipo fenólico (Seymour et al., 1993).

Pueden ser subdivididos según sus estructuras químicas y los principales grupos de fenoles presentes en las uvas se muestran en la cuadro No. 3.

Cuadro 3. Principales compuestos fenólicos de la uva.

NO FLAVONOIDES	ESTILBENOS		Resveratrol piceido
	ÁCIDOS FENÓLICOS	ÁCIDOS BENZOICOS C6-C1	p-HIDROXIBENZOICO PROCATÉQUICO VAINÍLLICO GÁLICO SIRÍNGICO GENTÍSICO SALICÍLICO
		ÁCIDOS CINÁMICOS C6-C3	p-CUMÁRICO CAFEICO FERÚLICO
FLAVONOIDES C6-C3-C6	FLAVONOLES	(AGLICONAS)	KAEMPFEROL QUERCETINA MIRICETINA ISORHAMNETINA
	ANTOCIANOS	ANTOCIANIDINAS (AGLUCONAS)	MALVIDINA DELFINIDINA PEONIDINA PETUNIDINA CIANIDINA
	CATEQUINAS		CATEQUINA EPICATEQUINA GALOCATEQUINA EPIGALOCATEQUINA
	PROANTOCIANIDINAS	PROCIANIDINAS	DERIVADOS DE CATEQUINA Y DE EPICATEQUINA
		PRODELFINIDINAS	DERIVADOS DE GALOCATEQUINA Y EPIGALOCATEQUINA

Fuente: González-Neves (2005b).

2.2.2.1 Flavonoides

Los flavonoides son la familia más importantes de compuestos entre los polifenoles de la uva, ya sea por su cantidad relativa como por su influencia en la calidad. Su estructura consta de 2 grupos aromáticos poli-hidroxilados, anillos A y B, conectados por un anillo pirano. El anillo C puede estar más o menos saturado, determinando el número de dobles enlaces (insaturación) la clase de flavonoide. El anillo C totalmente insaturado, corresponde al denominado catión pirilium, y es la estructura de los antocianos, el pigmento rojo de las uvas. Con el anillo C totalmente saturado se encuentran flavanos, una clase que incluye estructuras tanto monoméricas (las catequinas) como poliméricas (las proantocianidinas o taninos condensados) (Fulcrand et al., 2006).

ANTOCIANOS

Los antocianos son los pigmentos rojos de la baya, y en consecuencia, los principales pigmentos de los vinos tintos jóvenes (González-Neves 2005b, Harbertson y Spayd 2005, Kennedy et al. 2006).

Están ubicados en las células externas de la hipodermis de los hollejos de las variedades tintas, libres en las vacuolas, o en conglomerados, carentes de membrana, denominados por algunos autores como antocianoplastos (Amrani y Glories 1994, Amrani y Glories 1995) estando también presentes en la pulpa de las variedades tintoreras.

Desde que Ribéreau-Gayon determinó su estructura en 1959, numerosos estudios se han llevado a cabo con el objetivo de lograr una mejor comprensión de cómo los antocianos se comportan y evolucionan en un medio tan complejo como el del vino.

Estos compuestos se encuentran en la uva y el vino en forma de glucósidos (figura No. 3), con la particularidad que en las variedades de *Vitis vinifera* están en la forma 3-monoglucósidos, mientras que en las *Vitis* de origen americano y en los híbridos también se encuentran en la forma 3,5-diglucósido (Ribéreau-Gayon et al., 1972). Por otra parte, la glucosa puede estar esterificada, hablando en este caso de antocianos acilados. Según la molécula de ácido que participe en la acilación se encuentran los derivados p-cumárico, caféico o acético.

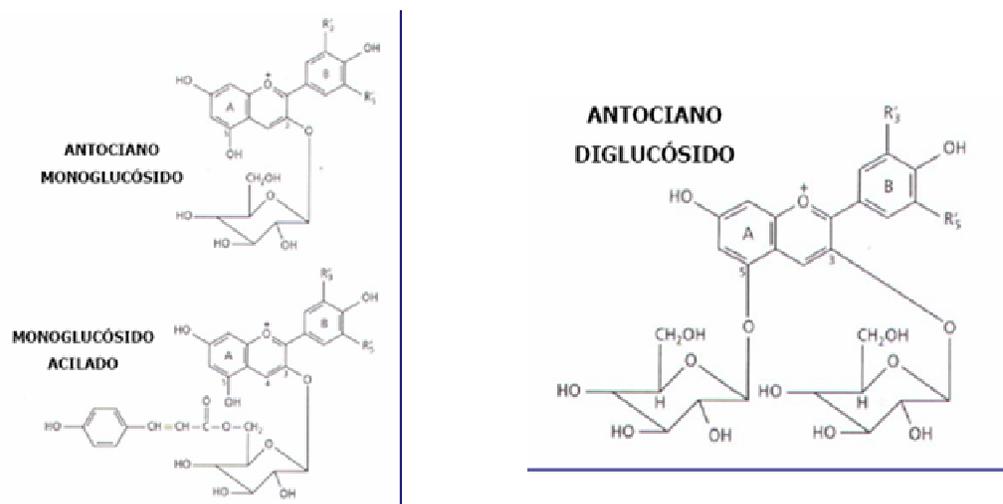


Figura 3. Antocianos del género *Vitis*.

La forma aglicona es denominada antocianidina. En el género *Vitis*, en función de las sustituciones en el anillo B, las antocianidinas presentes son cianidina, petunidina, peonidina, delphinidina y malvidina (cuadro No. 4)

Cuadro 4. Antocianidinas en el género *Vitis*.

R'3	R'5	Antocianidina
OH	H	Cianidina
OCH3	H	Peonidina
OH	OH	Delphinidina
OH	OCH3	Petunidina
OCH3	OCH3	Malvidina

El tenor en antocianos de la uva es muy variable en función de la cepa, las condiciones ambientales y pedológicas así como de las técnicas de manejo del viñedo (Lepadatu et al., citados por González-Neves, 2005b).

En este sentido numerosas investigaciones nacionales, confirman este comportamiento para las principales variedades tintas utilizadas en la viticultura nacional en diversas condiciones ambientales y de manejo del país (González-Neves et al. 2002, González-Neves et al. 2003a, González-Neves 2005b).

Por el contrario, el perfil antociánico, (entendiéndose como tal a las proporciones de las diversas formas en que se pueden encontrar los antocianos) está en función principalmente de la cepa, es decir ésta tiene la capacidad de regular la expresión de cada tipo de antociano (González-Neves, 2005b).

El color de los antocianos varía mucho en función de su estructura química y de las condiciones físico-químicas del medio, en particular del pH (Riberéau-Gayon et al., 1972).

En solución acuosa coexisten cuatro formas moleculares de los antocianos: una base quinoidal, el catión flavilium, una base hemiacetal y una chalcona. Al pH del vino, la forma hemiacetal, que es incolora, es la forma más importante seguida por el catión flavilium, que es la forma roja. La hidratación del catión flavilium representada como $AH^+ + H_2O \rightleftharpoons AOH + H^+$ tiene una pK de 2,6 para el antociano mayoritario en el vino, malvidina-3-glucósido (Brouillard y Delaporte 1977a, Brouillard y Dubois 1977b). Por lo tanto a un pH mayor a 2,6, la malvidina-3-glucósido está mayoritariamente presente en su forma incolora hemiacetal. Por lo que si el pH del vino se encuentra entre 3,2 y 3,6 solo del 25 al 10% de las moléculas se encontrarán en su forma coloreada.

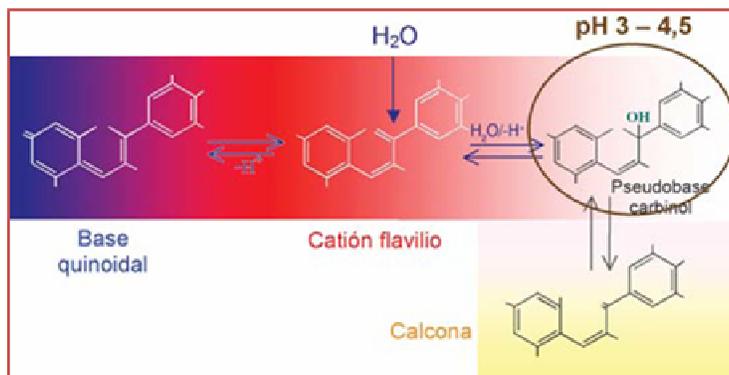


Figura 4. Efecto del pH sobre el color del vino tinto.

Fuente: El color de los vinos parte II. Peña (2006).

El color es una de las primeras características de un vino que puede ser apreciada por el consumidor y es un atributo importante, porque puede ser utilizado, junto con otras variables, como un indicador de calidad (González-Neves et al., 2003b), por lo que es evidente la importancia de conocer los factores que lo determinan.

TANINOS

Cuando el anillo C de los flavonoides se presenta completamente saturado, los compuestos resultantes son los flavanos, una clase de moléculas que incluye estructuras monoméricas, las catequinas, y poliméricas, las proantocianidinas (por su capacidad de dar antocianidinas mediante hidrólisis en medio ácido), comúnmente llamadas taninos o taninos condensados (Fulcrand et al. 2005, Adams 2006).

Éste es un grupo de fenoles que se encuentra en concentraciones importantes en las uvas y que juegan un papel preponderante en la calidad del vino, al cual confiere propiedades sensoriales (astringencia y amargor), de estructura (contribuyen al cuerpo del vino) y participa en algunas de las reacciones que permiten la estabilización del color (Vals-Fonallet 2004, Fulcrand 2006).

Los principales flavan-3-oles de la uva son la (+)-catequina y la (-)-epicatequina. Ellos son isómeros entre sí, con las catequinas mostrando la configuración 2,3,-trans y las epicatequinas la forma 2,3,-cis. También puede ser hallado el 3-galato de epicatequina y la (-)-epigalocatequina, y en concentraciones muy inferiores el 3-galato de catequina y el 3-galato de galocatequina (Souquet et al., 2000).

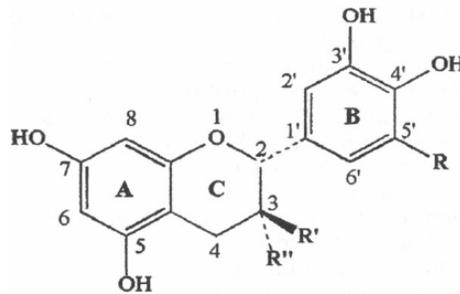


Figura 5. Representación gráfica de la estructura básica de los taninos.

Cuadro 5. Diferentes sustituciones que admiten una unidad de catequina y sus nombres respectivos.

R	R'	R''	CATEQUINA
H	OH	H	Catequina
H	H	OH	Epicatequina
OH	OH	H	Galocatequina
OH	H	OH	Epigalocatequina
H	H	O-GALOIL	Epicatequina-3-O Gallato

Como puede ser observado en la descripción precedente, los flavanos de la uva pueden estar unidos al ácido gálico, llamando a los taninos unidos a este ácido fenólico, taninos galoilados. Esto último es relevante porque a mayor presencia de ácido gálico en las estructuras de los taninos (mayor grado de galoilación), mayor amargor presentarán dichos compuestos. El grado de galoilación disminuye con la maduración.

Entre los polímeros o proantocianidinas, se distinguen las procianidinas, derivados de catequina y epicatequina, y las prodelfinidinas, derivados de galocatequina y de epigalocatequinas. Las proantocianidinas de las uvas son mayoritariamente procianidinas y sus monómeros están unidos por enlaces C4-C8 y en menor proporción por enlaces C4-C6 (Souquete et al. 2000, Vals-Fonallet 2004).

Los polímeros constituyen la mayor parte de los flavanos con una masa molecular y un número de unidades constitutivas variable (Souquet et al., 2000).

La estructura de los taninos de las semillas es diferente a la de los hollejos. Los taninos de las semillas tienen una proporción superior de galatos y un grado de polimerización inferior a los taninos de los hollejos (Souquet et al., 2000).

La epicatequina es el elemento monomérico mayoritario de todas las partes de la baya (Souquet et al., 2000).

El número de unidades que componen el tanino está relacionado con sus propiedades sensoriales. Desde que las catequinas no tienen la capacidad de

flocular las proteínas (no presenta propiedades tánicas), su presencia no está relacionada con la astringencia.

Es frecuentemente señalado que las proantocianidinas de alta masa molecular (por encima de 10 subunidades) son insolubles y de este modo no contribuirían a la astringencia (Lea y Arnold, 1978). Sin embargo proantocianidinas aisladas de manzanas (mDP 70) y uvas (mDP 20) fueron ambas altamente solubles en una solución hidroalcohólica simulando vino y altamente astringentes (Vidal et al., citados por Cheynier et al., 2006).

De esta forma la polimerización de los flavanos aumenta en lugar de reducir la astringencia. Sin embargo, los taninos también sufren reacciones de clivaje generando moléculas de bajo peso molecular que contribuyen a la pérdida de astringencia durante el añejamiento del vino. Finalmente, la conversión de taninos en copolímeros oligómeros taninos-antocianos reducen la astringencia de los vinos, pero el sabor de otros polímeros como los taninos-antocianos mediados por puente etilo, y los polímeros de taninos-piranoantocianinas aún deben ser investigados (Cheynier et al., 2006).

Respecto al momento en que los taninos de los hollejos son formados Harbertson et al. (2002) estudian los cambios en los niveles de taninos por baya en Cabernet Sauvignon, Syrah y Pinot noir durante la maduración. Los resultados citados muestran que los taninos de la hipodermis parecen ser formados en etapas muy tempranas del desarrollo de la baya y cambian muy poco desde envero a cosecha. Por supuesto, su concentración por unidad de peso fresco disminuye durante la maduración en proporción al crecimiento de la uva durante la fase III (Adams, 2006).

Tales resultados están de acuerdo con lo mencionado por Kennedy et al. (2001) respecto a que los taninos incluyendo sus monómeros, las catequinas, son acumulados durante el primer período de crecimiento.

Sin embargo este comportamiento depende de la variedad. Estudios nacionales han mostrado que para Tannat el contenido en taninos de los hollejos continúa aumentando luego de envero en forma apreciable hasta cosecha o próximo a cosecha.

FLAVONOLES

Los flavonoles están presentes en los hollejos de las cepas tintas y blancas. En forma libre pueden ser encontradas en el vino pero en la uva están presentes como sus correspondientes glicósidos (Adams, 2006), pudiendo estar acilados por la glucosa, la galactosa, la xilosa o la arabinosa.

Según las sustituciones en el anillo B, la aglicona se denomina kaemferol, quercetol, mircetol o isoramnosa (Cheynier y Rigaud, 1986).

Éstos son los principales pigmentos amarillos de los hollejos de las uvas negras y blancas y juegan un rol importante como co-pigmentos de los antocianos en los mostos y los vinos tintos jóvenes (Boulton 2001, Schwarz et al. 2005)

2.2.2.2 Compuestos no flavonoides

ESTILBENOS

Los estilbenos son compuestos con una estructura C6-C2-C6. Están únicamente presentes en los hollejos en concentraciones muy variables según la cepa (Jeandet et al., 1995).

El resveratrol puede ser considerado el estilbeno de mayor importancia de la uva. Es una fitoalexina y su síntesis está ligada a las defensas naturales de la viña y a la respuesta ante ataques fúngicos (Jeandet et al., 1995).

La presencia de este compuesto en las uvas y los vinos está siendo muy estudiado en función de sus propiedades antioxidantes y sus posibles efectos en la salud humana (Jeandet et al. 1995, Adrian et al. 2000).

ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos son del tipo benzoico y cinámico. Se encuentran en las células de la hipodermis junto a los taninos y los antocianos así como en las células del mesocarpo y la placenta de la pulpa (Adams, 2006).

En los hollejos aparecen en mayor concentración por lo que su contenido aumenta con la maceración (Gil-Muñoz et al., 1999).

Los ácidos benzoicos son de estructura C6-C1 y los representantes más importantes son los ácidos vainíllico, siríngico y salicílico, y especialmente el ácido gálico que es encontrado bajo forma de éster de los flavanos (Ribéreau-Gayon et al., 1972).

La relación entre los ácidos vainíllinico y siríngico puede ser utilizado para diferenciar ciertos cepáges (Di Stéfano, citado por González-Neves, 2005b).

Los ácidos cinámicos tienen una presencia mucho mayor en el vino que los ácidos benzoicos.

Se encuentran en forma absolutamente mayoritaria bajo la forma de ésteres tartáricos en las vacuolas de las células del hollejo y la pulpa.

Este grupo está compuesto por los ácidos cafeico, p-cumárico y ferúlico, con una estructura C6-C3. Sus ésteres son: cafeiltartárico o caftárico, p-cumaroil-tartárico o coutárico y feruloil-tartárico o fertárico (Ribéreau-Gayon et al., 1972), siendo los principales componentes el ácidos caftárico y coutárico, y en concentraciones muy inferiores el ácido fertárico (Gil-Muñoz et al., 1999).

Son los compuestos más oxidables que existen en la uva, el mosto y el vino. En este sentido, el ácido cafeico es el más reactivo siendo importante sustrato para la enzima polifenoloxidasas.

Están implicados además en la aparición de fenoles volátiles al ser como se hizo mención, sustrato para algunos microorganismos (Chatonnet et al., citados por González-Neves, 2005b).

2.2.3 Reacciones de los polifenoles y modificaciones del color durante la vinificación y el añejamiento

En un medio esencialmente acuoso como el vino, los antocianos libres no pueden permanecer estables por largo tiempo (Brouillard et al. 2003, Kennedy et al. 2006). Por lo tanto, para que un vino tinto mantenga su color a través de los años, sus antocianos nativos deben evolucionar hacia nuevos cromóforos que continúen absorbiendo la luz en el espectro visible (Brouillard et al., 2003).

Una vez que los antocianos son liberados de la vacuola de los hollejos, quedan mucho más expuestos a las reacciones químicas, generando pigmentos genuinos del vino, que no son pigmentos de la uva, aún cuando sus precursores provengan tanto de ésta, como de las levaduras (Brouillard et al., 2003).

Mientras los componentes de los hollejos difunden en el mosto, otras reacciones causan la pérdida de cierta cantidad de estas sustancias al mismo tiempo que son extraídas. Las de mayor relevancia son la oxidación de los antocianos, principalmente enzimática (tirosinasa y eventualmente lacasa), la precipitación de polímeros de moléculas (antocianos-taninos, taninos-polisacáridos, sustancias coloidales, sales de potasio junto con antocianos) y la absorción de los antocianos y taninos en las partes sólidas de la uva y sobre las membranas celulares de las levaduras (con un grado de absorción que dependerá de la cepa de levadura en función de la hidrofiliidad de sus membranas) (Bosso et al., 2004a). Al mismo tiempo existen reacciones de

degradación de los antocianos que generan moléculas incoloras de bajo peso molecular (Cheynier et al., 2006).

Una característica de todas las *Vitis viniferas* es que sus antocianos poseen un grupo hidroxilo libre en el carbono 5 del anillo A. La existencia de este grupo es importante para el desarrollo del color del vino durante la maduración y el añejamiento ya que de él depende la formación de pigmentos del tipo piranoantocianos (Brouillard et al., 2003).

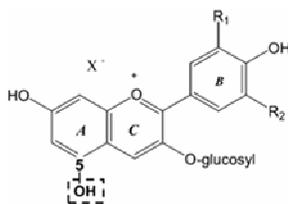


Figura 6. Antociano destacando el OH en la posición 5 la cual es una estructura común de todos los antocianos de las *viníferas*.

Fuente: Brouillard et al. (2003).

El espectro de un vino joven presenta por un lado, un máximo de absorción más o menos estrecho hacia los 520 nm debida a los antocianos en su forma flavilium y asociado con el color rojo, y por otra parte un mínimo hacia los 420 nm (Glories, 1984b) asociado con el color amarillo. A la suma de estas absorbancias, Glories (1984b) incluye para su determinación analítica (intensidad colorante) la A 620 nm (azul) para incluir la medida del color de los antociano en su forma quinoidal, al considerarlo como un componente apreciable de los vinos jóvenes.

El color del vino en el tiempo está asegurado a través de dos procesos de estabilización, la conversión de los antocianos de las uvas en otros pigmentos (polimerización, formación de piranoantocianos), y mecanismos de asociación colectivamente llamados copigmentación (Brouillard et al. 2003, Cheynier et al. 2006).

La conversión de los antocianos en cromóforos más estables a través de reacciones químicas, ocurre cuando la integridad celular de la uva se rompe y los diferentes constituyentes de la baya se mezclan (Fulcrand et al., 2006).

Algunos de los productos formados a partir de antocianos en el curso del añejamiento han sido descritos como pigmentos poliméricos resultantes de reacciones entre antocianos y taninos. Muchos de estos pigmentos resultan de la reacción directa entre estas dos especies moleculares mientras que otros involucran también aldehídos, como el acetaldehído (Saucier et al. 1997,

Atanasova et al. 2002a, Di Stefano y Bosso 2002, Fulcrand et al. 2006). Su formación en este último caso es más rápida que los pigmentos por condensación directa y presentan un color malva (Cano-López et al., 2006).

La polimerización de los antocianos también puede tener lugar a través de la asociación directa antociano-antocianos como de su condensación mediada por acetaldehído produciendo tanto dímeros como oligómeros (Atanasova et al. 2002b, Vidal et al. 2004).

Los “pigmentos poliméricos” han sido definidos (Somers, citado por Harbertson y Spayd, 2006) como la fuente de color estable en los vinos tintos, debido a su resistencia al blanqueamiento por el bisulfito (el cual es igualmente, el método utilizado para la determinación analítica de “P” en el presente trabajo según la metodología propuesta por Lenvenjud y Boulton, 2001) y a su estabilidad en un amplio rango de pH.

Si bien el término color polimérico es generalmente utilizado como sinónimo de color estable, es necesario realizar algunas puntualizaciones de forma de lograr una mejor comprensión tanto de las citas bibliográficas como de los resultados analíticos que incluye el estudio de estos compuestos en el presente trabajo.

En primer lugar, las reacciones de antocianos con taninos y otras moléculas, rinden una variedad de estructuras, con un amplio rango de peso molecular que incluyen tanto pigmentos como especies no coloreadas (Cheynier et al., 2006).

De los pigmentos derivados, muchos son resistentes al blanqueamiento por bisulfito pero ellos no son necesariamente poliméricos (como los muy simples piranoantocianos, ejemplo las vitisinas).

Por otro lado, algunos pigmentos poliméricos (ejemplo los aductos Flavanos-Antocianos) no son resistentes al blanqueamiento por bisulfito. De esta forma, el término resistente al blanqueamiento por sulfito, debería ser el utilizado, en lugar de pigmentos poliméricos³.

Los polímeros resultantes de las reacciones directas entre antocianos (75 a 95% incoloros al pH del vino) y taninos se comportan exactamente como los antocianos precursores, pero la formación de piranoantocianos (100% coloreados) y derivados unidos por puente etilo (50% o más coloreados) tornan el color del rojo al naranja o púrpura e incrementan tanto la intensidad colorante

³ Cheynier, V. 2008. Com. personal

como la resistencia al cambio de pH y blanqueamiento por sulfito (Cheynier et al., 2006).

A modo de ejemplo Atanasova et al. (2002a) se refiere directamente a la fracción estable como color debido a los derivados resistentes a la decoloración por SO_2 .

La relación entre los pigmentos incluidos en el término color poliméricos, el color y su resistencia al blanqueamiento ha sido recientemente estudiada por Versari et al. (2007).

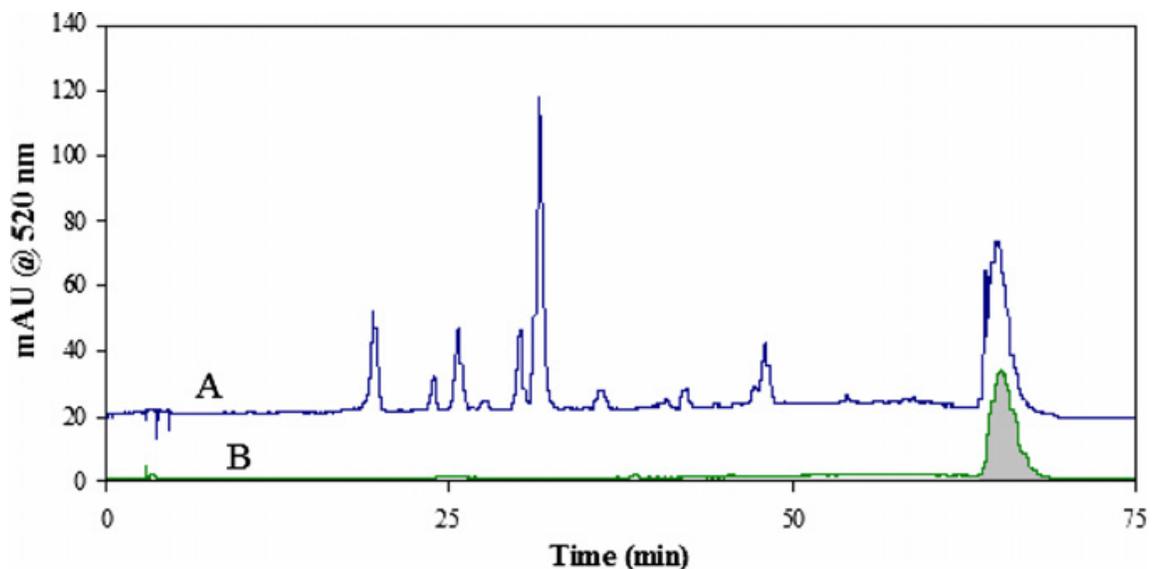


Figura 7. Cromatograma HPLC a 520 nm de un vino tinto utilizando una columna PLRP.

Fuente: Versari et al. (2007).

En la figura No. 7 se ve el cromatograma de un HPLC de un vino tinto monitoreado a 520 nm usando una columna PLRP. Donde:

A-Es una muestra sin adición de SO_2 en la fase móvil

B-Es una muestra con adición de 100 mg/L de SO_2 en la fase móvil.

El área sombreada representa el color polimérico resistente al blanqueamiento.

Estos autores hallaron que en los vinos utilizados para el ensayo, entre un 5 y 22% del pico de color polimérico fue decolorado por el SO_2 . Al mismo tiempo la cantidad de color no afectado, fue estrictamente proporcional a la cantidad total de color polimérico, independientemente del cultivar considerado.

Igualmente observaron que al aumentar la edad del vino también lo hace la fracción estable, siendo la variable que produjo las mayores diferencias.

Por otra parte, algunos constituyentes del vino y metabolitos de las levaduras reaccionan con la porción electrofílica del catión flavilium para formar nuevos pigmentos de mayor estabilidad. De este modo se forma un anillo pirano adicional entre el hidroxilo unido al C5 y el C4 del antociano original, dando lugar a la formación de piranoantocianos (Fulcrand et al., 2006).

El acetaldehído, el piruvato así como otros metabolitos de las levaduras forman con los antocianos este tipo de pigmentos (Fulcrand et al., citados por Fulcrand et al., 2006). Entre los más estudiados se encuentran la vitisina A y la vitisina B cuyas estructuras se observan en la figura No. 8.

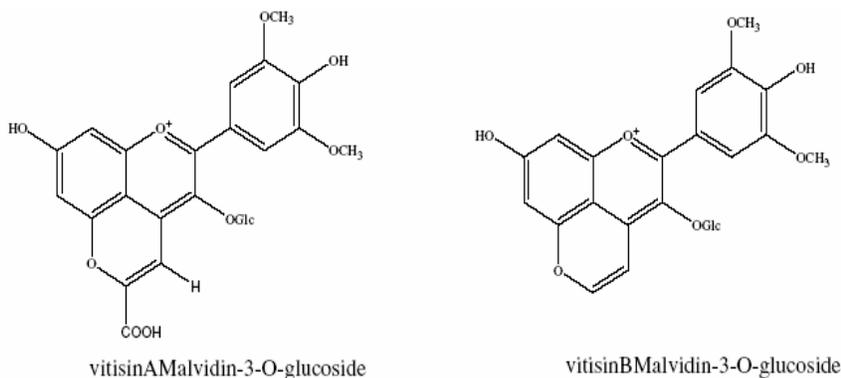


Figura 8. Representación gráfica de la vitisina A y la vitisina B.

Fuente: McDougall et al. (2005)

Otras estructuras más complejas como flavanoil-piranoantocianos e hidroxifenil piranoantocianos han sido detectadas en el vino. En todos estos casos, la gran estabilidad de los compuestos en un amplio rango de pH, ha originado un creciente interés en su estudio y clasificación. No obstante queda por aclarar su participación real en el color del vino desde que suelen encontrarse a concentraciones muy bajas.

Debe quedar claro que los cambios fenólicos durante el añejamiento del vino son procesos dinámicos que conducen a incrementar la diversidad estructural pero no necesariamente a grandes polímeros (Cheynier et al., 2006).

La cantidad relativa de cada especie molecular presentada depende de numerosos factores. El pH determina el porcentaje de catión flavilium comparado con la forma hidratada de los antocianos, y por consiguiente el color y la forma en que reaccionan estos compuestos. También controla algunas otras reacciones: la formación de quinonas y semiquinonas, la polimerización

inducida por acetaldehído, y el clivaje de los enlaces entre flavanos y aquellos mediados por puente de etilo (Fulcrand et al., 2006).

La proporción relativa de antocianos y flavanos afectan la naturaleza y tamaño de los pigmentos y los taninos. Un exceso de antocianos incrementa significativamente los polímeros de antocianos, los cuales son más estables que sus precursores. Mientras que una alta concentración de taninos puede favorecer la reacción directa entre antocianos y flavanos (Fulcrand et al., 2006).

Por otro lado el oxígeno favorece la polimerización oxidativa de los flavanos y la policondesación de antocianos y flavanos mediada por acetaldehído (Fulcrand et al., 2006).

La importancia relativa, así como la estructura de los productos finales formados depende por consiguiente, no solo de la composición inicial del vino sino también de la presencia de metabolitos de levaduras y de la exposición al oxígeno (Cano-López et al., 2006).

Finalmente debe ser enfatizado que la estabilidad química y el color de los pigmentos no están necesariamente relacionados (Cheynier et al., 2006).

Por otra parte, la estabilización del color también puede tener lugar a través de la copigmentación (Cheynier et al., 2006), definida por Boulton (2001) como un fenómeno en el cual pigmentos y otros compuestos orgánicos no coloreados forman asociaciones o complejos que generalmente resultan en el incremento de la absorbancia (efecto hiperocrómico) y en algunos casos en un cambio en la longitud de onda máxima absorbida (efecto batocrómico). Debido a esto último la copigmentación provee al mismo tiempo de estabilización y variación del color (Brouillard et al., 2003).

Los antocianos coloreados (flavilium rojo, o base quinonoidal azul) son estructuras planares. Este diseño espacial de la molécula y la hidrofobicidad conferida por los anillos aromáticos favorecen el apilamiento vertical de las formas coloreadas de los antocianos entre ellos (auto asociación), o con otras estructuras planas (copigmentación propiamente dicha), o con un residuo aromático conectado al pigmento (copigmentación-intramolecular) (Boulton 2001, Fulcrand et al. 2006).

Mirabel et al. (1999) señala que las fuerzas que permiten la formación de apilamientos de copigmento-pigmento está gobernado por interacciones como las de Van der Waals y efectos de solvatación.

De esta forma el ión flavilium es atrapado y protegido de la hidratación y el equilibrio de hidratación es desplazado desde la forma incolora hidratada hacia

las formas rojas del catión flavilium (responsable del efecto hipercrómico según Schwazer et al., 2005) y azules de la base quinonoidal (Boulton 2001, Brouillard et al. 2003, Cheynier et al. 2006).

Esto es importante al pH del vino donde las formas hidratadas normalmente predominan. Las formas antociánicas que más afectan su color son aquellas más sensibles a la hidratación, por el efecto de protección descrito anteriormente (Cheynier et al., 2006).

Según Boulton (2001) estas asociaciones causan que los pigmentos exhiban una intensidad colorante varias veces superior que la esperada a partir de su concentración (típicamente entre 4 y 6 veces), lo que se observa analíticamente como una desviación de la ley de Beer. Este incremento depende principalmente de la naturaleza del pigmento, del cofactor, de la relación cofactor-pigmento y del pH.

Entre los compuestos citados comúnmente como cofactores se incluyen ácidos fenólicos, flavonoides y en particular, derivados de los flavonoles.

El complejo que forma la copigmentación es no obstante fácilmente disgregado por dilución o por solventes orgánicos como el etanol, y es actualmente reconocido que su contribución al color también es susceptible de blanqueamiento por el SO₂ (Boulton, 2001.)

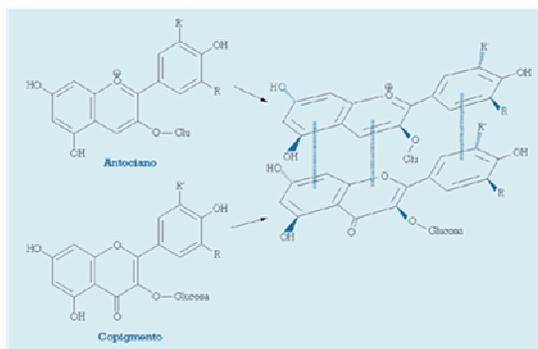


Figura 9. Formación de un complejo de copigmentación a partir de un pigmento (antociano monómero en su forma de catión flavilium) y de un copigmento (flavonol).

Fuente: Gutiérrez (2007)

Los niveles de copigmento en los vinos tintos son al menos tan importantes como los niveles de antocianos determinando el color. Esto es particularmente importante en los vinos jóvenes donde la copigmentación puede ser responsable del 30 a 50% del color rojo total (Schwarz et al., 2005).

Diferentes estudios se han realizado respecto a la eficiencia de los distintos cofactores actuando como copigmentos (Asen et al., citados por Boulton 2001, Boulton 2001, Schwarz et al. 2005).

En general estos estudios realizados con soluciones modelo analizan la eficiencia de un compuesto o grupos de compuestos incrementando el color. Pero es fundamental tener en cuenta la abundancia en que tales compuestos son encontrados en la uva y el vino, de forma de considerar no solo la eficiencia de una unidad de cofactor aumentando el color del vino sino también su concentración. Si bien esto dependerá de la variedad con la cual se trabaje, el siguiente cuadro es un ejemplo de la importancia relativa de los diferentes compuestos fenólicos en la uva.

Cuadro 6. Distribución de los polifenoles en el grano de uva (expresado en mg por kg de uva).

	PULPA	HOLLEJOS	SEMILLAS
ÁCIDOS FENÓLICOS	20 - 170	50 - 200	0
ANTOCIANOS	0	500 - 3000	0
TANINOS	0	100 - 500	1000 - 6000
FLAVONOLES	0	10 - 100	0

Fuente: adaptado de Souquet et al. (2000).

En resumen, el espectro de absorbancia en el rango de luz visible que determina el color, depende directamente de la estructura molecular y más específicamente del alcance de la deslocalización electrónica dentro de una molécula.

La familia de los flavonoides exhibe una gran diversidad de colores, desde los flavanos incoloros, a través de los flavonoles y chalconas amarillas, a las formas rojas y azules de los antocianos.

Los pigmentos derivados de los antocianos exhiben un amplio rango de colores, desde el naranja al azul. Los aductos de taninos con antocianos son rojos como sus precursores los antocianos. Otros productos de reacción incluyen los piranoantocianos que son naranjas, especies púrpuras unidas por

punto de etilo e incluso estructuras azules que son las flavanil-vinil-piranoantocianos (Cheynier et al., 2006).

No todas estas nuevas estructuras poseen mejores propiedades colorantes que los antocianos originales y algunas también pueden cambiar su color con las variaciones de pH.

Como resultado el color de los vinos tintos cambia continuamente durante la vinificación y la guarda (Gil-Muñoz et al., 1999), y los cambios más rápidos ocurren durante el primer año de almacenamiento (Somers y Evans, citados por Gómez-Plaza et al., 2001).

Como los nuevos compuestos formados con frecuencia exhiben diferentes propiedades sensoriales a los de sus precursores, sus cambios estructurales cambian la calidad del vino (Cheynier et al. 2006, Kennedy et al. 2006).

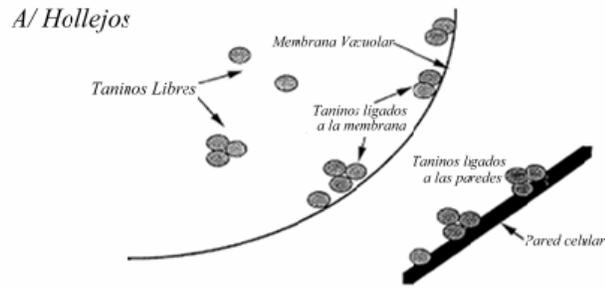
2.2.4 Localización en la uva de antocianos y taninos

2.2.4.1 Introducción

Durante la vinificación en tinto, la maceración es una de las etapas esenciales para la obtención de un vino tinto porque es en el curso de este período que los compuestos fenólicos de los hollejos y las semillas son extraídos (Vivas et al., citados por Amrani y Glories, 1994).

Sin embargo, la extracción de estos compuestos no está en relación directa con su abundancia en la baya ya que uvas ricas en compuestos fenólicos no conducen necesariamente a vinos muy coloreados y viceversa (Amrani y Glories, 1995). En este sentido, González-Neves (2005b) muestra que el contenido en compuestos fenólicos de los vinos realizados con uva de la variedad Tannat puede ser excepcional, pero menor al que podría ser esperado teniendo en cuenta el potencial en éstos de sus uvas.

Por lo tanto dos cosas son indispensables para la comprensión de estos fenómenos; por un lado la localización de los compuestos fenólicos en las uvas y por otro, los fenómenos que afectan su extractibilidad.



B/Semillas

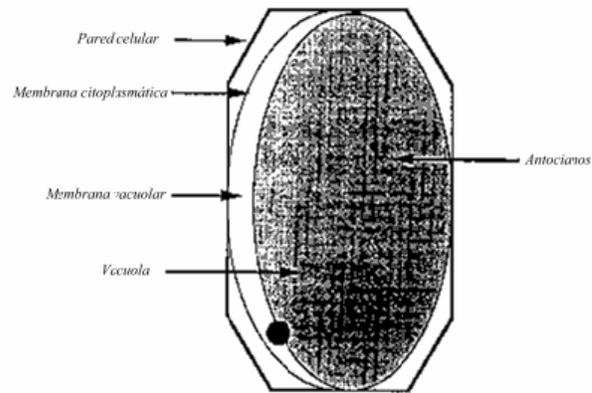
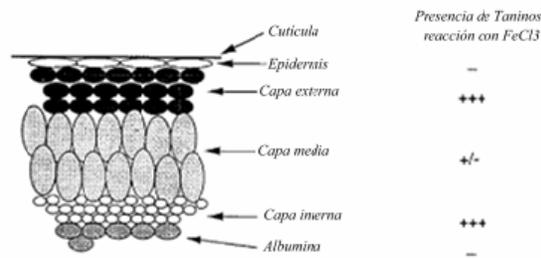


Figura 10. Localización de antocianos y taninos.

Fuente: Amrani y Joutei (1995).

2.2.4.2 Hollejos

Dos tipos de células pueden ser distinguidos en los hollejos de las uvas: una capa simple de células epidérmicas en el exterior del fruto y bajo ésta la hipodermis formada por cinco o seis capas de células, dependiendo el número exacto de la variedad y caracterizada por tener la pared celular engrosada (Amrani y Glories 1995, Adams 2006). En éstas, los antocianos están co-localizados con los taninos.

La hipodermis comienza a formarse en el envero, a partir de las células más externas del mesocarpio.

Estas células mantienen un tamaño reducido, con paredes gruesas y contienen una gran vacuola, que ocupa la mayor parte del volumen celular (Adams, 2006).

Dos tipos de células pueden ser diferenciadas en la hipodermis,: aquellas desprovistas de precipitados tánicos y aquellas células con precipitados granulados o células tánicas (Rajaei, citado por Amrani y Glories, 1995). Dentro de estas últimas los compuestos fenólicos aparecen bajo forma de precipitados groseramente y finamente granulados formando un gradiente centrífugo dentro de la baya. El tamaño de los gránulos aumenta y su número disminuye a medida que se aproximan a la epidermis. Las vacuolas de las células epidérmicas contienen igualmente estos precipitados bajo forma de cúmulos condensados (Amrani y Glories, 1995).

Por otra parte los taninos son igualmente observados en contacto estrecho con la fase interna del tonoplasto (membrana vacuolar). Éstos se presentan con mayor frecuencia bajo la forma de un depósito continuo pero pueden estar presentes como unidades granulares. Estos taninos presentan una conexión específica y relativamente fuerte con el tonoplasto. Dado que éste es próteofosfolipídico y considerando la gran afinidad de los taninos por las proteínas, se puede concluir que la unión de los taninos con el tonoplasto se da mediante la intermediación de las proteínas de membrana. Finalmente existen proantocianidinas ligadas a la pared celular. Estos taninos están unidos a los polisacáridos principalmente mediante esterificaciones. Estos complejos tanino-polisacáridos tienen una incidencia importante en las cualidades organolépticas del vino al ser asociados con atributos de calidad (Amrani y Glories, 1995).

En definitiva, se pueden determinar tres grandes grupos de taninos en los hollejos (cuyas características tendrán influencia en su extractibilidad): taninos ligados a la pared celular, taninos ligados a las membrana vacuolar y taninos

libres en la vacuola, con estos últimos pudiendo estar bajo forma de apilamientos más o menos condensados (Amrani y Glories, 1995).

Las importantes diferencias entre las células hipodérmicas y las que forman la pulpa quedan de manifiesto en un estudio realizado sobre la variedad Traminer. Se observó que para la hipodermis (piel) y mesocarpo (pulpa) de ésta variedad a la cosecha las células del mesocarpo tenían un radio casi 10 veces mayor que el de las células hipodérmicas. Al mismo tiempo estas últimas, presentaron paredes celulares casi 20 veces más espesas que aquellas de las células del mesocarpo (Hardie et al., citados por Adams, 2006). Adams (2006) estima a partir de la información precedente que el volumen de las células del mesocarpo, es 75 veces superior al de las células de pared engrosada de la hipodermis.

Esta presentación del pericarpo de las bayas en su madurez, es importante por dos razones. Primero, esos dos tejidos tienen marcadas diferencias en la composición fenólica a cosecha, y segundo, la diferencia en el tamaño celular, y en particular la diferencia en el grosor de las paredes celulares, es crucial para comprender la pregunta de cómo son extraídos los compuestos presentes en estos tejidos durante la vinificación (Adams, 2006) y la importancia de la maceración en la obtención de un vino tinto.

2.2.4.3 Semillas

Durante el desarrollo inicial de la semilla, los polifenoles se acumulan en su interior junto con el peso fresco y ambos alcanzan un máximo entorno al envero (Adams, 2006).

El tejido clave respecto a estos compuestos es la cubierta de la semilla o testa. En ésta hay dos capas muy diferentes, ambas derivadas del tegumento exterior del ovulo durante el desarrollo inicial de la semilla. Desde el punto de vista de los polifenoles, ambas capas no pueden ser más diferentes. La capa interior sufre una serie de divisiones periclinales (paralelas a la superficie de la semilla) que resulta en células que son delgadas hacia el interior de la semilla pero mucho más gruesas hacia el exterior. Próximo al envero, cuando la semilla aún luce amarilla, las células más internas del tegumento se lignifican. Las células en el exterior de las capas lignificadas retienen su pared primaria delgada, excepto por las más externas, cuyas paredes aumentan su espesor para formar la cutícula en la superficie de la semilla. Las células de pared delgada, entre la cutícula y las capas interiores lignificadas, son quizás las más importantes en términos fenólicos porque son quienes contienen la casi totalidad de los fenoles solubles de las semillas (Adams, 2006).

El pardeamiento comúnmente observado en las semillas que acompaña la maduración del fruto luego de envero, se piensa que es el resultado de la oxidación de los taninos y flavanos-3-oles en esta última capa (Adams, 2006).

2.2.5 Elementos que intervienen en la extracción de compuestos fenólicos

2.2.5.1 Antocianos y taninos

Las paredes celulares y las membranas vacuolares juegan un rol de barrera más bien física que química obstaculizando la difusión de los polifenoles al vino. De ahí la importancia de los procesos de degradación de las membranas y paredes celulares para la vinificación (Amrani y Glories, 1994).

Las paredes celulares que cumplen en la célula vegetal la función de representar una protección contra la presión osmótica y por otra parte contra ciertos agentes patógenos, constituyen evidentemente una barrera a la migración de ciertas moléculas (Amrani y Glories, 1994).

Sacchi et al. (2005) expresa que la limitante para la liberación de los antocianos es una barrera física, como consecuencia de su ubicación en las vacuolas de las células hipodérmicas. De esta forma la extracción requiere que los componentes abandonen tanto la membrana de la vacuola como la célula en sí. De tal forma, para liberar los componentes internos es importante que esas membranas sean degradadas más que solo colapsadas, ya que la estructura resultante de una membrana colapsada puede atrapar componentes internamente.

Durante una maceración tradicional en presencia de hollejos, el contenido de alcohol, el dióxido de carbono y dióxido de azufre, junto con el calor de la fermentación, incrementan la permeabilidad de estas células y membranas. Otros tratamientos que destruyen las membranas celulares también incrementan la liberación de estos pigmentos (Sacchi et al., 2005).

Para un determinado cepaje, los hollejos de una uva madura contienen menos pectinas que los de una uva verde (Amrani y Glories, 1994).

Como resultado éste es un elemento que contribuye a facilitar la extracción de la materia colorante durante la vinificación (Amrani y Glories, 1994).

Sendos estudios de la correspondencia entre la madurez tecnológica de la uva, el contenido máximo en antocianos y la extractibilidad de los mismos, fueron realizados con las principales uvas tintas del país por González-Neves durante el 2001, 2002 y 2003 y publicadas por el mismo autor en el 2005b.

De tales resultados se concluye con claridad que no existe una correspondencia clara y reproducible entre el grado de madurez tecnológica de la uva, el contenido máximo de antocianos y su correspondiente extractibilidad.

En el citado trabajo se expresa que en la mayoría de las parcelas evaluadas, las concentraciones máximas de antocianos totales y antocianos extraíbles se obtienen antes que las concentraciones máximas de azúcar, mientras que el seguimiento del índice de extractibilidad de antocianos (EA%), mostró en la mayoría de los casos una disminución de la proporción de antocianos extraíbles con la maduración, particularmente evidente en Tannat.

Estos índices en consecuencia también deparan una utilidad práctica muy importante, desde que sus valores en cosecha, constituyen un dato muy valioso para la definición de las condiciones de vinificación que permitan explotar de la mejor manera el potencial cualitativo de la uva (Glories, Saint Criq et al., citados por González-Neves, 2005b).

De este modo, la vinificación de uvas que hayan alcanzado menores valores de los índices de extractibilidad y madurez de semillas, según los criterios propuestos por Glories y Augustin (1993) permiten una buena extracción que se corresponde con la realización de remontajes menos frecuentes y menos intensos con una duración del encubado más corto y temperaturas de maceración moderadas.

En contraposición, si las uvas son pobres en antocianos, en la vinificación se puede aumentar la dosis de dióxido de azufre y efectuar remontajes más numerosos (trabajando con uva sana). O también se puede recurrir a técnicas de vinificación que mejoren la extracción (Glories, citados por González-Neves, 2005b).

Si las uvas son ricas en antocianos pero de pobre extracción, también pueden ser empleadas mayores dosis de dióxido de azufre, junto a remontajes más intensos y numerosos al comienzo de la vinificación a fin de permitir la extracción de los pigmentos de difícil difusión (Glories, Saint Criq et al., citados por González-Neves, 2005b).

Cuando la uva tiene una concentración importante de taninos de semillas, los remontajes de final de fermentación deben ser limitados y las temperaturas durante la etapa de maceración post-fermentativa, deben ser mantenidas próximas a los 30°C, para favorecer las asociaciones de los taninos y obtener una reducción de la astringencia. Por el contrario si la uva es pobre en taninos de semilla, es necesario realizar remontajes importantes, con temperaturas elevadas en medio y fin de la fermentación alcohólica, para obtener una buena

estructura polifenólica del vino (Saint Criq et al., Glories, citados por González-Neves, 2005b).

Teniendo lo precedente en consideración, González-Neves (2005b) concluye que el conocimiento de la riqueza fenólica de la uva y de la extractibilidad de estos compuestos, permite un mejor control de la vinificación, a partir de diferentes técnicas, del número e intensidad de los remontajes, del control de las temperaturas y el largo del encubado.

Como puede ser apreciado, tales variables son particularmente las que definen las diferencias entre las técnicas de vinificación empleadas en los ensayos de la presente tesis.

2.2.6 Maceración

Durante la maceración se da la extracción de polifenoles desde las partes solidas de la uva, fenómeno que evoluciona principalmente en función de la composición de la baya, la capacidad de ésta de ceder tales compuestos al medio y de la técnica de vinificación (que desde esta óptica podría ser vista como la capacidad de la técnica en aprovechar las dos primeras características definidas).

Dicha extracción es el resultado de los fenómenos de solubilización y difusión de los compuestos de la uva en el mosto (Amrani y Glories, 1994).

Bosso et al. (2004a) definen la maceración en tinto como el proceso donde se extraen de la parte sólida de la uva sustancias polifenólicas, sales minerales y eventualmente, sustancias aromáticas o sus precursores que intervienen en las características organolépticas finales del vino. La elección de las técnicas y de las intervenciones a efectuar, resulta en que esta fase determina la calidad del vino a consumo.

Los cambios fenólicos asociados con la vinificación comienzan con la extracción selectiva de los constituyentes de la uva en el mosto durante el proceso de maceración. La difusión de antocianos y proantocianidinas de los hollejos es más rápida que la extracción de proantocianidinas desde las semillas, los cuales requieren de una mayor concentración de alcohol y temperatura (Amrani y Glories 1994, Cheynier et al. 2006).

Las cantidades de antocianos y taninos extraídas, son más elevadas en medio hidroalcohólico que en acuoso. Éste efecto si bien no tan trascendente para los antocianos es mucho más importante en el caso de los taninos. Los máximos de extracción de estas moléculas son obtenidos en tiempos de

maceración más largos cuando los hollejos se maceran en presencia de etanol. Al mismo tiempo la disminución en la concentración de antocianos es más débil y comienza más tarde en medio hidroalcohólico. En tanto las concentraciones de taninos en medio alcohólico permanecen estables, sufriendo una importante disminución si el medio es acuoso (Amrani y Glories, 1994).

Las semillas en relación a la cutinización que las cubre, tienen un contenido mucho más difícilmente extraíble que aquel en los hollejos. Una maceración larga en presencia de alcohol, es necesaria para disolver la capa lipídica de la cutícula y así favorecer la difusión de los taninos.

En los hollejos, la dificultad de extracción de éstos compuestos esta en relación directa con su naturaleza y su localización (Amrani y Glories, 1995).

El etanol actúa sobre las membranas celulares y vacuolares de las células de los hollejos y ayuda a desorganizar las estructuras creando orificios que permiten a las moléculas situadas en las vacuolas atravesar las paredes celulares. Este pasaje depende del tamaño molecular de los compuestos (Amrani y Glories, 1994).

En consecuencia, los antocianos y los taninos libres menos polimerizados son extraídos al comienzo de la vinificación, las moléculas de estructuras más complejas y un peso molecular más elevado migran poco a poco al exterior de la célula (Amrani y Glories, 1994).

Amrani y Glories (1994), estudiando los potenciales y tiempos de difusión de los polifenoles de las uvas en soluciones modelo, observaron que éstos varían según su origen. Presentaron que la extracción desde las semillas fue lenta y limitada (menos del 50 % del potencial extraíble) en los hollejos éste proceso se dio rápidamente y en forma más completa, alcanzando el 80% de su potencial.

En el mismo estudio estos autores mostraron que la concentración en el medio de antocianos y taninos liberados de los hollejos disminuyó regularmente luego de un máximo, contrariamente a lo que sucedió con los taninos de las semillas, donde la máxima concentración permaneció estable en el tiempo considerado (9 días en soluciones modelo).

La disminución de la concentración de compuestos fenólicos de los extractos de hollejos en el curso de la maceración muestra que hay dos acciones por parte de estos hollejos. Por una lado la liberación de compuestos de las células vegetales, y por otro su adsorción en las partes sólidas (paredes celulares, membranas). Para los hollejos la adsorción de los compuestos

liberados sobre las partes sólidas prevalece sobre la liberación de los remanentes luego de poco tiempo (18 horas en el estudio citado), mientras que en el caso de las semillas se alcanza un equilibrio (Amrani y Glories, 1994).

De todos modos, es de esperar que en condiciones de bodega donde las semillas y los hollejos están juntos en el medio, estos últimos sean una importante causa de adsorción de polifenoles de ambos orígenes, con otros elementos participando como ser la retención en las levaduras.

Romero-Cascales et al. (2005) trabajando con uva de la variedad Monastrell, expusieron que el máximo nivel de antocianos en el mosto se observó durante los primeros días de maceración, a pesar del hecho que entre el 30 y el 40 % de los antocianos permanecieron en los hollejos.

Igualmente Nagel y Wulf (1979) citan en sus ensayos que el máximo contenido de antocianos fue registrado al tercer día de maceración.

Sin embargo y para el caso de los antocianos, Cheynier et al. (2006) formulan que la concentración de antocianos comienza a decrecer luego de pocos días de maceración, cuando su tasa de conversión en otras especies moleculares es mayor a la de su extracción. Y expresan que si bien, algunos antocianos son reabsorbidos en las partes sólidas de las uvas y las levaduras, los antocianos recuperados luego del prensado usualmente no compensan las pérdidas medidas de la uva al vino.

En el mismo sentido Sacchi et al. (2005) expresan que el pico temprano en la concentración de antocianos y subsiguiente descenso durante la fermentación es inconsistente con que la solubilidad sea el factor limitante que explique tal evolución de estos compuestos en el mosto, y que en su lugar refleja su inestabilidad una vez liberados.

Vinculando la extracción con las características y ubicación de las reservas de taninos en las uvas, Amrani y Glories (1994) expresan que los taninos por su unión con las proteínas de las membranas vacuolares y los polisacáridos de las paredes celulares son difícilmente extraíbles en ausencia de etanol y son los más dependientes para su extracción de la degradación de la pared celular. Además, la presencia de apilamientos de taninos no solubles por el alcohol hacen su extracción aún más difícil.

Mientras tanto Sacchi et al. (2005) exponen que la extracción de los taninos parece estar limitada por la solubilidad de estos compuestos.

Basan tal afirmación en la saturación generalmente observada durante los seguimientos de sus contenidos en los mostos a través del tiempo de

maceración (Watson et al., 1995). Tal afirmación no es necesariamente contradictoria con lo expresado por Amrani y Glories (1994), ya que Sacchi et al. (2005) se refieren particularmente a la limitante para la continuidad de su acumulación (una vez que las barreras físicas han sido afectadas debidamente) mientras que Amrani y Glories (1994) se refieren a los requerimientos para su extracción.

Queda claro que respecto a la cinética de difusión, los antocianos están poco obstaculizados a difundir en relación a los taninos.

2.3 TÉCNICAS DE VINIFICACIÓN

2.3.1 Introducción

Las prácticas de vinificación ayudan a determinar la extracción de compuestos fenólicos y sus subsecuentes reacciones en el vino. Las condiciones de maceración afectan en gran medida la proporción relativa de antocianos y flavanos que difunden al vino (Fulcrand et al., 2006).

Las técnicas de maceración que buscan aumentar la cantidad y calidad de polifenoles en el vino y conservarlos en el tiempo deben tener en cuenta tanto los fenómenos de extracción como los de pérdida y evolución de dichos compuestos.

La vinificación en tinto tradicional comprende el desarrollo simultáneo de la maceración y la fermentación alcohólica (González-Neves et al., 2007). La maceración consiste en extraer de la parte sólida de la uva sustancias polifenólicas, sales minerales, sustancias aromáticas o sus precursores, que intervienen sobre la característica organoléptica final del vino.

El tipo de tecnología y las intervenciones utilizadas en esta fase resultan determinantes de la calidad final del vino (Bosso et al., 2004a).

La maceración es también donde se inician las reacciones de combinación y de condensación entre antocianos y taninos así como el englobado de los taninos astringentes por los polisacáridos de la uva y de las levaduras (Vivas, citado por Sacchi et al., 2005).

De acuerdo a la coincidencia entre el proceso de maceración y el de fermentación, la maceración puede ser prefermentativa, fermentativa o postfermentativa. La presencia de etanol en el medio y las temperaturas predominantes en cada fase inducen la extracción selectiva de los antocianos y de los taninos de los hollejos y semillas. En las maceraciones cortas se prioriza

la extracción de los antocianos, frente a la de los taninos. En las maceraciones largas (postfermentivas) se promueven las combinaciones entre antocianos y catequinas, aumentando el grado de polimerización de los taninos (González-Neves et al., 2007). De esta forma se favorecen las reacciones de condensación y polimerización indispensables para la estabilización del contenido fenólico del vino (Vivas, citado por Sacchi et al., 2005).

Como alternativa a la vinificación tradicional, se han propuesto técnicas que consideran los principios señalados precedentemente.

Como lo expresan Cheynier et al. (2006) la composición fenólica del vino depende de la uva utilizada y de los procesos de vinificación que determinan su extracción en el mosto y reacciones subsiguientes.

Las condiciones de maceración afectan en forma importante la proporción de antocianos y flavanos que difunden hacia el vino, mientras que tal relación afecta la naturaleza y el tamaño de los pigmentos y taninos del vino (Fulcrand et al., 2006).

Debido a la gran influencia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos, numerosas técnicas han sido desarrolladas para influir la extracción de estos compuestos durante la vinificación y la mayoría ha estado dirigida hacia aumentar su extracción (Sacchi et al., 2005).

Es común encontrar en la bibliografía consultada respuestas contradictorias en cuanto al resultado obtenido al aplicar una determinada tecnología de vinificación. Si bien esto es esperable y en ocasiones es consecuencia de las diferencias en las condiciones en que son desarrollados los ensayos (volumen empleado, tiempos utilizados, estado de la materia prima empleada, etc), en otras puede ser atribuido a la interacción de la técnica con la variedad y aún más específicamente, con la uva obtenida en una determinada región.

Como fue expuesto por Bosso et al. (2004b), “a causa de la especificidad de las diversas variedades en su composición en sustancias polifenólicas y eventualmente volátiles o sus precursores, la respuesta a un misma intervención tecnológica no resulta siempre unívoca para todos los vinos”.

De ahí la importancia de desarrollar investigación nacional repitiendo los ensayos en varios años para obtener información de aplicación local.

2.3.2 Maceración prefermentativa en frío

Como su nombre lo indica, esta técnica consiste en postergar el comienzo de la fermentación alcohólica mediante el empleo de alguna tecnología que permita mantener el mosto a baja temperatura, con el objetivo de prolongar el tiempo de maceración en medio acuoso.

De esta forma se genera una etapa de extracción en ausencia de alcohol, que implica la solubilización preferencial de los compuestos más hidrosolubles de los hollejos, favoreciendo la extracción selectiva de antocianos, y taninos de bajo peso molecular (Sacchi et al. 2005, Álvarez et al. 2006).

De esta forma se mejora la relación entre antocianos y taninos en las etapas iniciales de la vinificación que lleva a mejorar la estabilidad de estos compuestos y del color (González-Neves et al., 2007). El aumento de la relación entre antocianos/taninos incrementa significativamente los polímeros de antocianos, los cuales son más estables que sus precursores (Fulcrand et al., 2006), mientras que el medio acuoso favorece los fenómenos de copigmentación (Boulton, 2001).

Al mismo tiempo al no formarse un sombrero de hollejos en la etapa prefermentativa, se obtiene un mayor contacto de éstos con el mosto.

Adicionalmente, la ausencia inicial de etanol en el medio solvente, limita la extracción de los taninos más astringentes de las semillas, produciendo vinos más equilibrados y suaves al paladar (Zinnai et al., 2006).

La etapa del tratamiento de frío es un tiempo de maceración al resguardo de las bajas temperaturas (medio protector, moderadamente extractivo, Casassa et al., 2008). Éstas a su vez son responsables de alterar completamente:

- Los procesos microbianos.
- Las reacciones enzimáticas, oxidativas, de adición, de polimerización, etc.
- La cinética de todos los procesos que intervienen; físico-químicos y biológicos.
- La solubilidad de los compuestos.
- La evolución de éstos una vez extraídos.

- Y en conjunto, el medio de maceración y el ambiente al que están expuestos los elementos extraídos.

Antes de continuar resulta importante recordar de los apartados anteriores que tanto la extracción de antocianos como la de taninos es mayor en medio hidro-alcohólico que en medio acuoso. Pero mientras los antocianos igualmente difunden con facilidad en ausencia de alcohol, la extracción de taninos tiene una dependencia mucho mayor de cierto contenido de etanol en el medio.

A esto se puede agregar que la fase acuosa favorece los fenómenos de adsorción de ambos compuestos en los elementos sólidos del medio, procesos que se dan en forma más lenta en presencia de etanol (Amrani y Glories, 1994).

Por lo tanto, el aumentar el tiempo de maceración en medio acuoso, tiene como uno de sus objetivos, el valerse de tal diferencia relativa para favorecer la extracción de unos compuestos frente a otros (antocianos sobre taninos), y no el de crear un medio donde la difusión de antocianos se vea favorecida en términos absolutos.

En una prospección de los trabajos de investigación en maceración pre fermentativa, pueden encontrarse diferentes formas en la aplicación de la técnica, como ser:

- la forma de lograr el enfriamiento del mosto (estado prefermentativo).
 - ✓ Extracción de calor sin la incorporación de refrigerantes al mosto
 - Tanques en cámara de frío a temperatura controlada
 - Uso de tanques con camisa refrigerante
 - Enfriamiento de la vendimia previo a la molienda
 - Otros métodos
 - ✓ Utilizando un criógeno que entra en contacto con el mosto.
 - $\text{CO}_2(\text{s})$
 - En forma de bloque
 - Como nieve carbónica (desagregado)
 - $\text{N}_2 (\text{L})$.

- Las temperaturas a la que se mantiene el mosto en la etapa prefermentaria.
 - ✓ En general entre 3 y 10° C
 - ✓ Ensayos con temperaturas cercanas a 0°C
 - ✓ Ensayos con temperaturas entre 10 y 15°C
- Duración de la maceración prefermentativa
 - En general de 3 a 10 días
 - Mientras dure el efecto de la refrigeración inicial del mosto
- Tiempo total de encubado
 - Mayor al de los tratamientos testigos
 - Igual al de los tratamientos testigos

Y distintas variantes como ser el momento en que se inoculan las levaduras y se agrega el SO₂ (previo o posterior al tratamiento de frío, fraccionado, etc), al igual que la combinación con otras técnicas como encubado en atmosfera inertizada (con N₂ o CO₂), uso de enzimas pectolíticas, maceración sulfítica y delastage prefermentario, entre otros.

Si la maceración prefermentativa es llevada a cabo con el agregado de un criógeno, no solo se alteran los elementos enumerados con anterioridad y se da un retraso en el comienzo de la fermentación, sino que también se produce un congelamiento parcial de la masa de mosto y hollejos.

Esto provoca la lisis y desorganización de las células de los hollejos y así, de las estructuras que son los principales contenedores de los polifenoles de mayor interés enológico.

El congelamiento incrementa el volumen de los líquidos intracelulares y de este modo distorsiona las membranas y provee de una difusión facilitada de los compuestos aromáticos y fenólicos (Sacchi et al. 2005, Álvarez et al. 2006, Parenti et al. 2006).

Como fue observado precedentemente por Amrani y Glories (1995) en pruebas con enzimas pectolíticas, la distorsión de las paredes y membranas celulares favorece la liberación de taninos ligados a los polisacáridos y a las

membranas vacuolares así como las moléculas de taninos libres intravacuolarmente. Mientras que la extractibilidad de los antocianos tiene mayor independencia de la degradación de la pared celular (Amrani y Glories, 1995).

También se agrega el efecto de sublimación (figura No. 11) o ebullición (según el criógeno de elección) que provoca, mientras haya refrigerante remanente, una continua liberación de gas a continuación del contacto mosto-criógeno que permite limitar la absorción de oxígeno al interior de la masa líquida y proteger de esta forma, la oxidación de los compuestos fenólicos y aromáticos que son liberados.



Figura 11. Tanque de MPF mostrando la sublimación del $\text{CO}_{2(s)}$.

Álvarez et al. (2005) expresan que los procesos de vinificación deben extraer altas cantidades de color y taninos para dar estructura al vino y estabilidad al color sin tornarse demasiados agresivos y astringentes. La maceración prefermentativa ha sido propuesta por algunos autores como una respuesta tecnológica a tales objetivos, particularmente en variedades de alto potencial polifenólico pero de difícil extracción, como es el caso de Tannat (González-Neves, 2005b).

Al mismo tiempo ha sido objeto de numerosas investigaciones en cultivares con baja relación antocianos/taninos, o con alta proporción de antocianos disustituídos (Pinot noir y Sangiovese respectivamente) donde su extracción pretende ser mejorada y posteriormente conservada.

Con menor frecuencia se encuentran trabajos que aplican la técnica en variedades tales como Cabernet Sauvignon, Merlot y Malbec, Nebbiolo, Monastrell etc, no habiendo registros de ensayos previos realizados con Tannat.

Con base en lo anteriormente expuesto, los efectos esperados de quienes aplican esta técnica pueden en primera instancia resumirse en lo expresado por los siguientes autores:

se busca obtener vinos con mayor color y cuerpo, provistos de una mejor capacidad para la crianza y dotados de un perfil aromático más intenso y complejo (Llaudy et al. 2005, Parenti et al. 2006). Dotados de una mayor expresión varietal (Feuillat 1997, Marais 2003, Catania et al. 2007). Este último aspecto es particularmente detallado por Cuenat et al., citados por Zinnai et al. (2006) quienes formulan que la criomaceración representa, una técnica enológica que permite poner en evidencia la caracterización químico-composicional y organoléptica de la uva empleada.

Se obtienen a su vez vinos más complejos, equilibrados y de mayor aroma frutal y fineza (Flanzy, 2003).

Zinnai et al. (2006) sostiene que el potencial de la técnica, tiende a favorecer la actual demanda del consumidor, que prefiere un vino fácilmente identificable y fuertemente ligado a la zona de producción.

El origen de la maceración prefermentativa como técnica dirigida hacia una mejora de la extracción polifenólica, procede de la Borgoña (Delteil, Zamora, citados por Llaudy et al., 2005). Como consecuencia de las bajas temperaturas habituales en la región, era usual que la vendimia llegara muy fría y que el comienzo de la fermentación se retardara unos cuantos días. Los borgoñeses apreciaron rápidamente las ventajas de este retraso y empezaron a buscar sistemas que les permitieran alargar más aún el comienzo de la fermentación. En esa época aún no existían los equipos de frío, por lo que la única solución era aumentar las dosis de dióxido de azufre, lo que es completamente inadmisibles hoy en día (Llaudy et al., 2005).

Como alternativa para conseguir alargar la fase prefermentativa de maceración, se puede utilizar el frío. Esta técnica puede ser considerada como originaria de California, ya que bodegas californianas empezaron a aplicar ésta tecnología como sistema habitual de vinificación (Llaudy et al., 2005).

Entre las variantes presentadas, el uso o no de un criógeno, (junto a la elección del mismo y la forma de manejarlo) es el factor más relevante y puede ser utilizado como criterio para dividir a los ensayos de MPF en dos grandes grupos.

Al repasar la bibliografía disponible, muchos ejemplos pueden ser encontrados donde el éxito de la técnica ha dependido del uso o no de un

elemento refrigerante (o del tipo y forma en que es utilizado), mientras que en otros estudios no se citan mayores diferencias.

En todo caso, serán elementos a tener muy en cuenta a la hora de analizar los resultados de una determinada investigación y más aún cuando se pretendan realizar comparaciones.

Sacchi et al. (2005) en una revisión de la técnica, utilizó tal división para analizar los tratamientos estudiados, separándolos en, “Cold Soak” maceración en frío y “Must freezing”, congelamiento del mosto, cuando el tratamiento implica a su vez tal condición. Debe tenerse en cuenta que otros autores (como Álvarez et al., 2006) emplean el termino “Cold Soak” para referirse a la MPF en sentido general.

Resulta interesante destacar, que al no utilizar un criógeno, se observaría mejor el efecto de la maceración prefermentaria en frío propiamente dicha, al no existir otros factores interviniendo.

Sacchi et al. (2005) hace una clara distinción de los efectos esperables de aplicar la técnica de una u otra forma, realizando a su vez un estudio de trabajos precedentes.

En tal sentido opina que basados en los conocidos efectos del alcohol y la temperatura sobre la extracción de antocianos y taninos, cuando no se emplea un criógeno no debería esperarse una mejora en la extracción. Y prosiguen: “aún si esta técnica permitiera incrementar la extracción de antocianos, no sería de esperar que se incrementase la formación de pigmentos poliméricos que son necesarios para lograr un impacto a largo plazo sobre el color”.

Dallas y Laureano (1994), Dallas et al., citados por González-Neves (2005b) expresan que las temperaturas, las concentraciones de anhídrido sulfuroso libre y el oxígeno suministrado a los vinos, son los factores más importantes para regular las reacciones de condensación entre antocianos y flavanos que conducirán a la estabilización del color.

Teniendo en cuenta lo expresado anteriormente cabe destacar que en la MPF las temperaturas son bajas, el aporte de oxígeno muy reducido y según se maneje la técnica, el agregado SO_2 se posterga hasta finalizar el tratamiento de frío.

Sacchi et al. (2005) argumentan su posición mencionando trabajos realizados con Pinot noir (como Watson et al. 1995, Feuillat 1997) donde la aplicación de la maceración prefermentaria sin el uso de un refrigerante, no tuvo efecto positivo sobre la composición fenólica o ésta fue perjudicada.

Revisando otros trabajos realizados con diferentes variedades (Cabernet Sauvignon, Sangiovese, Pinotage, etc), estos autores mencionan resultados en el mismo sentido o donde escasas ventajas pudieron ser encontradas.

Mientras tanto, Parenti et al. (2006) encontró los mayores contenidos de antocianos combinados en forma estable en el tratamiento testigo, a pesar de haber hallado valores significativamente superiores de antocianos y taninos en la mayor parte de los tratamientos de MPF (con y sin congelamiento del mosto). Vinculan este hecho a que las bajas temperaturas del medio ralentizan los procesos de asociación entre estas moléculas. Expresan en consecuencia que para obtener un vino estable en el tiempo, que conserve el mejoramiento obtenido con la MPF, es fundamental someter al vino a una adecuada maduración en presencia de oxígeno. De todas formas, los vinos obtenidos en la señalada investigación con esta técnica muestran los mejores registros de color aún al año de finalizada la vinificación.

Tales resultados y apreciaciones son contrarias a lo encontrado y concluido por otros autores.

Casassa et al. (2006) infieren a partir de ensayos con el cultivar Merlot, que la MPF permite la evolución de los antocianos hacia formas más estables. Cabe señalar que estos últimos autores adjudican este hecho a un cambio en el medio de maceración, producto de su enriquecimiento en acetaldehído originado por la actividad de levaduras criógenas (elemento comúnmente asociado con la MPF).

Boulton (2001), señala que la copigmentación es favorecida en un medio ausente de etanol ya que es producto de asociaciones hidrofóbicas que pueden ser perturbadas por la temperatura o solventes como el alcohol.

Dangles y Brouillard (1992), Mirabel et al. (1999), explican que los co-solventes orgánicos altamente polares como el etanol, interaccionan con los polifenoles con mayor fuerza que el agua tendiendo a disociar tales asociaciones. Asimismo ambos grupos de autores al igual que Sacchi et al. (2005), expresan que los copigmentos son un primer paso en la evolución de los antocianos hacia formas más estables. En el mismo sentido Timberlake y Bridle (1976), expresan que la ausencia de etanol en el medio, favorecería la formación de especies polifenólicas de mayor peso molecular, lo que también contribuiría a aumentar la intensidad del color. Por lo tanto en primera instancia parecería que no hay coincidencia entre los dos grupos de autores citados precedentemente. Sin embargo, puede apreciarse que en realidad se están evaluando en forma diferente o a diferentes niveles el papel de los factores que

intervienen en la extracción y estabilización de los compuestos fenólicos en la etapa prefermentaria, sin existir necesariamente desacuerdo.

Finalmente Boulton (2001) cita que es común encontrar altos contenidos de color copigmentado en el período acuoso de vinificaciones conducidas con maceración prefermentativa, si bien parte de éste se perdería más tarde con el etanol generado en la fermentación.

Numerosos estudios citan resultados positivos como consecuencia de la MPF aún cuando ésta no implique el congelamiento de hollejos. Casassa et al. (2006), trabajado con uva Cabernet Sauvignon, Merlot y Sangiovese, y realizando la etapa prefermentaria mediante la colocación de los tanques de maceración en cámara refrigerada, encuentran en general, resultados muy positivos.

Para Merlot y Sangiovese, la maceración prefermentativa en frío tuvo un efecto siempre positivo en el color de los vinos, que se mantuvo aún a los 6 meses de elaborados los mismos, dotados de mayor IC, y color polimerizado, menor tonalidad y color copigmentado (aunque sin diferencias significativas para la variable color copigmentado y polimerizado). Asocian estos resultados a la extracción de antocianos durante la fase prefermentaria y a la estabilización de los mismos con el acetaldehído y piruvato producidos por levaduras criógenas. A esto último también asocian una menor evolución de los vinos expresada a través de un menor tonalidad. En el análisis descriptivo encontraron diferencias significativas para la mayoría de los descriptores elegidos. Así, los vinos de este tratamiento fueron percibidos por los degustadores con una mayor intensidad de color, tonalidad violeta, intensidad aromática global, intensidad de aroma frutal, concentración, astringencia y persistencia en boca respecto a otros tratamientos incluyendo el testigo.

Estos ensayos permitieron apreciar a su vez, la interacción entre la cepa y el tratamiento, ya que en las pruebas con Cabernet Sauvignon, la maceración prefermentativa solo se diferenció por su menor tonalidad y sensorialmente por un mayor perfil varietal, pero no favoreció la extracción preferencial de los antocianos, ni dio lugar a vinos de aroma más frutal (Casassa et al., 2006).

Sin embargo en todos los casos la predominancia del aroma a acetaldehído fue distintivo del tratamiento de MPF, característica resaltada en muchos de los trabajos consultados. La presencia de tal elemento si bien es deseable durante la crianza del vino tinto por favorecer la estabilidad del color, su exceso es percibido como un atributo negativo por los degustadores, y siendo el compuesto de mayor afinidad por el SO_2 libre, podría dejar sin protección a los

vinos durante la crianza, por lo que no serían aptos para su pasaje por barricas (Casassa et al., 2006).

Gómez-Míguas et al. (2007), trabajando con el cultivar Syrah, utilizando un volumen considerable de mosto (tanques de 1000 L) y tres repeticiones por tratamiento, también encontraron diferencias positivas al aplicar MPF. En este caso el mosto fue enfriado con un equipo de refrigeración manteniendo la temperatura en torno a los 15° C por 7 días, seguido de 6 días de maceración tradicional (dosificando con 80 mg de SO₂/L). En tales condiciones concluyeron que la maceración prefermentativa es muy útil mejorando el color de los vinos jóvenes. Dicha mejora tuvo diferencias significativas con el testigo, y su magnitud permitiría ser apreciada a simple vista según consideraciones del CIELAB. Al mismo tiempo exponen que el descenso en el contenido de antocianos, entre la separación mosto-hollejos (día 6) y el fin de la fermentación alcohólica (día 12), fue mayor en el testigo, por lo que atribuyen a la MPF la capacidad de aumentar la estabilidad de éstos compuestos, si bien no realizaron estudios de la evolución del color durante el almacenamiento.

Este grupo de investigadores también encontró un mayor contenido de polifenoles totales en comparación con el testigo (el cual tuvo un tiempo de maceración de 6 días).

Cabe señalar que aunque la maceración prefermentativa no logre en muchos casos una mayor extracción de polifenoles, igualmente puede ser asociada con mejores propiedades sensoriales a través de su efecto en la expresión aromática. Feuillat (1997), obtiene por medio de la técnica vinos Pinot noir con menor contenido fenólico en general y menor intensidad colorante, pero bien valorados por su perfil más fino y de aromas más frutados.

Otro grupo de trabajos han sido realizados empleando un criógeno (hielo seco o nitrógeno líquido) que entra en contacto con el mosto.

En virtud de sus características, en particular, de su inocuidad, reducida reactividad, costo y facilidad de aplicación, el anhídrido carbónico al estado sólido o líquido y el nitrógeno líquido representan los criógenos más frecuentemente empleados en el campo alimenticio en general y en el enológico en particular (Zinnai et al., 2006).

Su elección presenta un aspecto interesante vinculado a la caracterización fisicoquímica del producto utilizado, en relación al coeficiente de transmisión de calor y a su miscibilidad con el mosto (Parenti et al., citados por Parenti et al., 2006).

Parenti et al. (2006) encontraron una mejor miscibilidad del nitrógeno líquido y como consecuencia una menor variación térmica en el conjunto de la masa de mosto.

El $\text{CO}_2(\text{S})$ tiene una temperatura de sublimación a temperatura atmosférica de $-78.5\text{ }^\circ\text{C}$ y un calor específico de $0.17\text{ cal.g}^{-1}\text{.k}^{-1}$, mientras que el nitrógeno líquido presenta una temperatura de ebullición $-195.8\text{ }^\circ\text{C}$ a una atmosfera y un calor específico de $0.25\text{ cal.g}^{-1}\text{.k}^{-1}$.

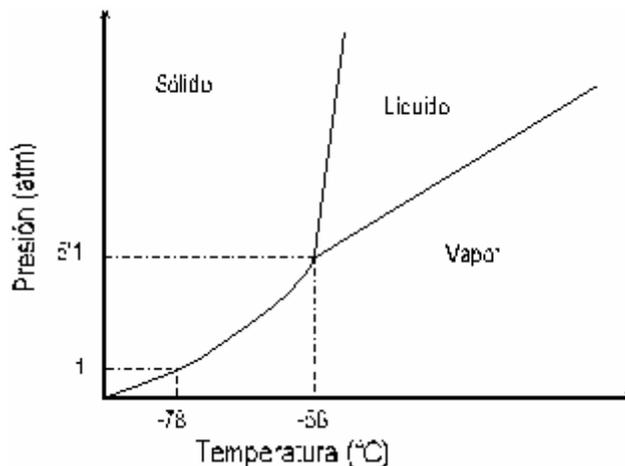


Figura 12. Representación del punto triple para el $\text{CO}_2(\text{s})$.

A modo de ejemplo, presentado por Zinnai et al. (2006), la cantidad aproximada de criógeno necesario para bajar $1\text{ }^\circ\text{C}$ un hectolitro de mosto es de unos 0.6 Kg de hielo seco o 1.9 kg de N_2 líquido.

En principio ésta técnica tiene ventajas sobre la modalidad anteriormente desarrollada.

En principio provoca un rápido enfriado del mosto, lo cual inhiben entre otros procesos, la acción de polifenoloxidasas y eventualmente lacasas. Al mismo tiempo los gases que emana el criógeno en cambio de fase, desplazan y protegen al mosto del oxígeno ambiente.

Asimismo, se produce la ruptura de las células de los hollejos favoreciendo la futura solubilización de sus componentes (Sacchi et al. 2005, Llaudy et al. 2005, Parenti et al. 2006, Casassa 2006). Álvarez et al. (2006), a su vez asocia a lo anterior, una incidencia positiva sobre la extracción de precursores de compuestos aromáticos.

Particularmente a la degradación de los hollejos (cuyas consecuencias enológicas ya fueron discutidas precedentemente) es que se asocian las mayores ventajas de esta modalidad de llevar adelante la maceración prefermentativa.

Es así que Sacchi et al. (2005), cita una serie de trabajos donde la aplicación de la MPF mediante la adición de hielo seco confiere efectos muy positivos al vino producido. Como lo expresa previamente en el mismo trabajo, aquellos factores que contribuyan a la degradación de las membranas celulares (y por tanto aumenten su permeabilidad) pueden incrementar la liberación de los pigmentos.

También hay trabajos que cotejan ambas formas de llevar a cabo la maceración prefermentativa, así como otras variantes.

Cassasa et al. (2007), realizan un ensayo en uva Malbec, comparando los efectos de enfriar el mosto en cámara respecto al uso de hielo seco. Los resultados muestran que mientras que en el primer caso se obtuvieron resultados negativos respecto al testigo en los parámetros de interés, la MPF con $\text{CO}_{2(s)}$ obtuvo resultados positivos. En los aspectos cromáticos considerados los citados autores adjudican el efecto negativo de la MPF en cámara a la ausencia de protección contra los fenómenos oxidativos durante la fase prefermentativa. Al mismo tiempo, asocian los resultados positivos de la técnica aplicada con hielo seco, al efecto combinado, moderadamente extractivo y protector, ejercido por el empleo de $\text{CO}_{2(s)}$. Aun en este último caso la mejora encontrada en el aspecto cromático fue limitada, por lo que recomiendan evaluar cuidadosamente el empleo de la misma desde un punto de vista técnico/económico.

Una vez más se destaca en un ensayo de maceración prefermentativa, en este caso Cassasa et al. (2007), el efecto sobre el perfil aromático. Mientras que para el ensayo conducido en cámara de frío se encontró aroma característico a acetaldehído, en el tratamiento que empleó $\text{CO}_{2(s)}$, se citan aromas balsámicos asociados con el perfil aromático varietal del Malbec. En consecuencia los autores encuentran promisorio el uso de la MPF con hielo seco, como una alternativa para obtener y fijar ciertos aromas deseables y así originar un perfil organoléptico distintivo.

Cabe recordar lo expresado por Álvarez et al. (2006) y observar que mientras el aroma a acetaldehído es un aroma secundario, el encontrado en el caso de utilizar hielo seco, es un aroma primario, reconocido como propio de la variedad.

Álvarez et al. (2006) compara los efectos de realizar la maceración prefermentaria con y sin hielo seco, para dos estados de maduración de la uva y dos tiempos de duración de la etapa prefermentaria, 4 y 8 días. Concluye que para vinos realizados con uva Monastrell, la técnica incrementa la concentración de compuestos fenólicos y su estabilización, ya sea que se realice con o sin hielos seco. Tal incremento fue más importante en proantocianidinas que en antocianos y cuando la fase prefermentativa fue conducida con hielo seco. Los mejores resultados correspondieron a los vinos realizados con uvas de menor madurez (lo que es habitual en ensayos que buscan mejorar la extracción de polifenoles⁴, (Llaudy et al., 2005). Al mismo tiempo no encontraron efectos significativos al ampliar el tiempo de maceración en frío sobre la extracción fenólica.

Estos mismos autores evaluando el costo de realizar la técnica con hielo seco exponen que solo se justificaría incluirlo cuando fuese necesario realizar una extracción y estabilización de los componentes polifenólicos a partir de uva que no alcanzó su mayor madurez.

En todo caso analizando el artículo anterior puede observarse que Álvarez et al. (2006) encontraron diferencias importantes y positivas asociadas a la maceración prefermentaria indistintamente de la forma en que ella fue realizada, con sus mayores efectos sobre el aumento en polifenoles, intensidad y estabilidad del color, copigmentación y polimerización de antocianos y taninos.

Parenti et al. (2006) consideran relevante para obtener diferencias significativas tras aplicar la técnica, el tipo de criógeno utilizado y si es hielo seco, la temperatura mínima que alcanza el mosto.

Si bien todos los tratamientos que compararon estos autores se mantuvieron luego a 5°C por 48 horas, los mismos fueron sometidos a diferentes temperaturas al inicio del tratamiento de frío.

Tal ensayo permito observar la dependencia de los tratamientos basados en CO_{2(s)} de una temperatura mínima a alcanzar para obtener resultados que justifiquen su aplicación. Cuando ésta fue de 5°C no hubo ventajas apreciables respecto al testigo, mientras que las diferencias a favor de la criomaceración aumentaron al descender la temperatura inicial a 0 °C y en forma significativa cuando ésta fue de -5 °C.

⁴ González-Neves, G. 2008. Com. personal

Por el contrario, los tratamientos conducidos con nitrógeno líquido fueron muy superiores al testigo, independientemente de las dos temperaturas iniciales comparadas, + 5°C y 0 °C, y sin diferencias apreciables entre sí. Los autores adjudican estos resultados a la mejor miscibilidad del nitrógeno líquido con la masa del mosto.

Algunos indicadores puntuales pueden ser destacados del anterior artículo. Respecto a la tonalidad y especialmente la absorvancia 480 nm (utilizada por los autores como indicador del componente oxidado), encuentran que todos los tratamientos de maceración prefermentativa obtuvieron menores valores que el testigo. A su vez, los tratamientos con nitrógeno líquido fueron los de menores registros para estas variables.

Respecto a la extracción de compuestos fenólicos, en los tratamientos con hielo seco ésta aumentó considerablemente al llevar el mosto a menores temperaturas iniciales, mientras la prueba a +5°C no mostró diferencias con el testigo. A igualdad de temperaturas los tratamientos que utilizaron nitrógeno fueron más eficientes extrayendo estos compuestos. Notable es la diferencia cuando ambos tratamientos a +5 °C fueron comparados.

Mientras que la temperatura no mostró tener un efecto importante en los ensayos con nitrógeno líquido, solo el tratamiento a -5 °C que utilizó CO_{2(S)} obtuvo mejoras comparables a éstos. Resultados muy similares son presentados para los antocianos y el resto de los parámetros evaluados.

Es interesante resaltar los resultados que obtuvieron estos autores respecto a la extracción de proantocianidinas, citadas por los mismos como indicativos de polimerización de los taninos a igualdad en contenidos de flavanos. En los tratamientos llevados a cabo con nitrógeno líquido el contenido en proantocianidinas es muy significativamente superior al testigo y a los restantes tratamientos de criomaceración.

Tales tratamientos parecen haber favorecido la extracción de sustancia de peso molecular más elevado, característico de los taninos de hollejos y muy interesantes del punto de vista sensorial (Parenti et al., 2006).

La elección del refrigerante a utilizar en un caso particular, evidentemente estará condicionado por la disponibilidad del mismo según la zona de producción y los costos relativos de utilizar uno y otro.

Finalmente y por su importancia en los fenómenos oxidativos de los compuestos fenólicos del mosto-vino, resulta interesante destacar la posible influencia de la MPF en el contenido de ácidos fenólicos, con el objetivo de que

tal conocimiento agregue elementos a la hora de elegir como desarrollar la técnica y con que objetivos.

En tal sentido Di-Stefano y Cravero, citados por Gil-Muñoz (1999) expresan que durante la vinificación, la extracción de ácidos benzoicos depende no solo del tiempo de contacto (maceración), sino que también del contenido de alcohol en el medio. Por esta razón las bajas temperaturas que limitan inicialmente la formación de etanol, pueden determinar una menor extracción de éstos compuestos (Gil-Muñoz et al., 1999). Tal observación será válida siempre y cuando el tiempo de maceración a temperatura ambiente sea menor al de una maceración convencional.

Gil-Muñoz et al. (1999), comparando un mosto iniciado con uvas a bajas temperaturas contra un testigo, encuentran al comienzo, contenidos superiores de esteroides de ácidos cinámicos para el tratamiento con uvas a baja temperatura, concluyendo que probablemente podría deberse a la protección brindada por las bajas temperaturas contra la oxidación. Sin embargo, el contenido fue decreciendo en el tratamiento de frío mientras que aumentó en el testigo en los siguientes 3 días, debido a la menor tasa de extracción con menores temperaturas y a la evolución de los extraídos.

Por lo tanto, es de esperar un menor contenido en estos compuestos mientras perdure el mosto frío, si se compara con un mosto en fermentación.

Consultar trabajos que comparan diferentes formas de llevar adelante una misma técnica dejan en evidencia su notable influencia en los resultados obtenidos. Al mismo tiempo subrayan la importancia de relativizar los éxitos o fracasos obtenidos a las condiciones en que se desarrolla un ensayo.

En todo caso, resulta muy pertinente citar a De Beer et al. (2006) cuando expresa, tras no observar una tendencia clara en los resultados de prolongar la duración de la fase prefermentativa, que tal comportamiento habla de la complejidad de factores que influyen el contenido final en polifenoles de los vinos. Por evidente que parezca, este es un aspecto que no debe descuidarse a la hora de diseñar un ensayo o analizar sus resultados.

2.3.3 Extracción diferida de antocianos

La extracción diferida de antocianos es una técnica de vinificación en tinto desarrollada en el 2002 por Di Stefano y Bosso en el Instituto Sperimentale per l'Enologia di Asti-Italia.

Surge tras la inquietud del mencionado grupo de investigación de encontrar una respuesta a un problema aún no resuelto por los métodos actuales de vinificación en tinto; el lograr la estabilización del color sin recurrir a maceraciones largas que pueden afectar negativamente las propiedades sensoriales del vino (Di Stefano y Bosso, 2002a).

Los autores reconocen dos procesos tradicionales de vinificación en tinto en las principales zonas productoras de Italia. Las maceraciones extendidas destinadas a la elaboración de vinos de crianza, y las maceraciones cortas donde se producen vinos que se consumen jóvenes.

Mientras en el primer caso se busca aumentar la extracción de flavanos para mejorar la estabilización del color, en el segundo, se pretende limitarla de forma de evitar un desbalance sensorial producido por el aporte astringente y/o amargo de estos compuestos (Di Stefano y Bosso, 2002a).

Las ventajas de las maceraciones cortas consisten esencialmente en evitar la excesiva tanicidad y algunas veces el gusto amargo que es percibido en los vinos tras maceraciones largas. Igualmente la posibilidad de obtener un vino poco tánico, dotado de un color intenso, que no requiere de un envejecimiento para su maduración (Di Stefano y Bosso, 2002a).

Habiendo observado tales ventajas, algunos productores de la zona del Piemonte han utilizado maceraciones cortas aún para la elaboración de vinos de gran envejecimiento (Di Stefano y Bosso, 2002a).

Sin embargo, el no tener en cuenta los aspectos involucrados en la estabilidad del color provoca una importante pérdida del mismo que se hace evidente en la primavera siguiente a la vinificación (Di Stefano y Bosso, 2002a).

En consecuencia, el mayor problema que se buscó resolver mediante la extracción diferida de antocianos, fue el de producir un vino base, capaz de afrontar el período de relevante pérdida de antocianos que transcurre entre el fin de la fermentación y el fin del invierno, y con un adecuado equilibrio entre el contenido de antocianos y el de flavanos (Di Stefano y Bosso, 2002a).

Esta técnica se vale para su desarrollo de los avances en el conocimiento de la química y de la bioquímica de la uva y de las levaduras.

Llevada a la práctica, la EDA consiste en limitar el contacto del mosto con los hollejos durante la primera parte de la fermentación alcohólica (hasta que es alcanzado un grado alcohólico cercano a 6) postergando el comienzo de los remontajes. De tal forma se busca restringir la pérdida de antocianos por oxidación en el curso de los primeros días de maceración, retardando su extracción a un momento en el cual el medio presente, junto al acetaldehído, una adecuada concentración de flavanos, de modo de favorecer un rápido comienzo de las reacciones de estabilización de la materia colorante (Bosso et al., 2002a).

El marco teórico que origina y explica la forma de proceder al aplicar la extracción diferida de antocianos toma en cuenta los siguiente elementos:

- ✚ cinética de difusión de antocianos, flavanos y cinamatos durante la maceración.
- ✚ rol del acetaldehído en los procesos de estabilización del color.
- ✚ cinéticas y procesos de producción de acetaldehído.
- ✚ factores que influyen en la producción microbiológica y química del acetaldehído.
- ✚ actividad enzimática de la polifenoloxidasasa (PPO).
- ✚ actividad enzimática de la β -glucosidasasa.

Desde que algunos de estos elementos han sido desarrollados en los capítulos precedentes, se destaca a continuación sus implicancias directas en relación a la EDA.

Al comienzo de la maceración los primeros compuestos fenólicos en pasar de los hollejos al mosto son los antocianos disustituídos (peonidina y cianidina), flavanos de bajo peso molecular y cinamatos, también presentes en la pulpa.

Estos últimos son los elementos más oxidables del mosto y son los responsables de desencadenar oxidaciones acopladas que oxidan otros compuestos fenólicos (Cheynier et al. 1990, Di Stefano et al. 2002b), mientras que los antocianos disustituídos son los primeros en pasar al mosto y en consecuencia los más expuestos a la oxidación.

Al mismo tiempo la PPO responsable de iniciar las oxidaciones señaladas tiene su mayor actividad durante la primera fase de la vinificación, cuando la

fermentación es insipiente y hay un mayor contenido de oxígeno presente en el mosto.

Romero-Cascales et al. (2005) expresan que la degradación enzimática de los antocianos está limitada a los primeros días de fermentación, ya que las levaduras compiten con la polifenoloxidasas por el oxígeno disponible. En sus estudios de 14 días de maceración (con 1000 litros de mosto) encontraron que al séptimo día la actividad de la citada enzima había cesado.

Di Stefano et al. (2002b) estimaron la importancia de la pérdida de antocianos por oxidación en los primeros días de maceración. Expresaron que ésta es cuantitativamente mucho más importante al de los antocianos adsorbidos por las paredes de las levaduras.

En cuanto al acetaldehído, el reconocimiento de su importancia en la estabilización del color y de los compuestos fenólicos del vino data de mucho tiempo (como el trabajo de Trillat en 1907, citado por Saucier et al., 1997) si bien la primera evidencia analítica de productos de condensación acetaldehído-flavano es realizada en vino tinto por Saucier et al. (1997).

La ocurrencia de acetaldehído en el vino tiene dos orígenes diferentes. Uno es su producción bioquímica en el metabolismo de las levaduras durante la fermentación alcohólica. La segunda es la oxidación acoplada del etanol por compuestos polifenólicos (Di Stefano et al. 2002b, Bosso y Guaita 2008).

Su importancia no solo radica en la estabilización del color, sino también en que la formación de pigmentos mediados por acetaldehído es más rápida que la originada por condensación directa y el color de tales pigmentos derivados es más intenso que el del antociano original (Di Stefano et al. 2002b, Cano-López et al. 2006, Cheynier et al. 2006, Fulcrand et al. 2006, Bosso y Guaita 2008).

Al mismo tiempo estos derivados son coloreados en un porcentaje igual o superior al 50% (mientras los antocianos y los polímeros de condensación directa flavanos-antocianos a pH del vino son rojos solo entre un 5 y un 25%) (Cheynier et al., 2006).

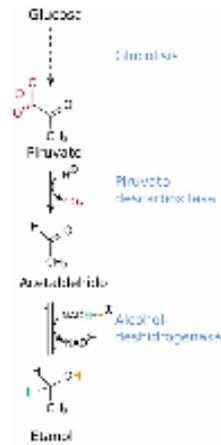


Figura 13 Acetaldehído como producto intermedio de la fermentación alcohólica.

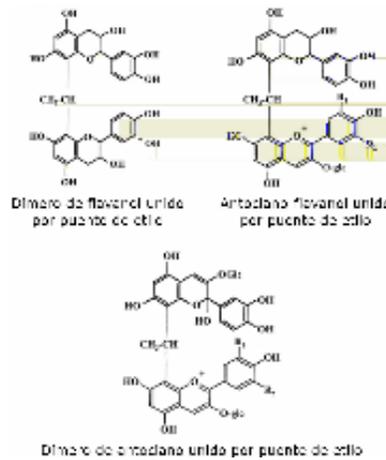


Figura 14. Compuestos mediados por acetaldehído.

Fuente: Cano-López et al. (2006).

De esta forma los antocianos que primero difunden de los hollejos al mosto durante la primera fase de la fermentación se encuentran en presencia de acetaldehído, que las levaduras producen por medio del proceso fermentativo, y de un modesto contenido de taninos, provenientes en gran parte de los hollejos. Como resultado es poco probable la reacción acetaldehído-flavano-antociano debido a que el contenido de flavanos es poco importante (Di Stefano et al., 2002b).

Por otra parte la oxigenación del mosto influye la producción de acetaldehído por las levaduras (variable directamente afectada en la EDA). En presencia de oxígeno, tanto la piruvato descarboxilasa como la alcohol

deshidrogenasa son escasamente activas en las células de las levaduras y en consecuencia se retrasa el comienzo de la fermentación alcohólica y la producción de etanal (Bosso y Guaita, 2008). A medida que la fermentación alcohólica prosigue, la concentración de etanol aumenta, y así los vinos con mayor aporte de oxígeno se tornan más ricos en etanal derivado de la oxidación química del etanol.

De tal forma y en lo que a la realización de esta técnica refiere, en pro de aumentar la producción de acetaldehído durante los primeros días de la fermentación alcohólica, es necesario ayudar a las levaduras a multiplicarse mediante una temperatura adecuada y limitados aportes de oxígeno al mosto (Bosso y Guaita, 2008).

No obstante lo anterior, y si bien tal observación del metabolismo microbiano fue uno de los factores inicialmente considerados en el desarrollo de la técnica, estos mismos autores han observado en sus últimos ensayos⁵, una menor concentración de etanal en los mostos bajo extracción diferida de antocianos durante los primeros días de maceración, más allá que al descube no han observado diferencias con la vinificación tradicional (numerosos remontajes desde el comienzo de la fermentación alcohólica), lo que determina la necesidad de mayor investigación al respecto.

Otros dos aspectos del conocimiento que pudieron ser aplicados fueron la actividad de la β -glucosidasa y la polifenoloxidasa.

Se ha visto que la actividad β -glucosidasa se ve inhibida por la presencia de azúcar impidiendo la hidrólisis de algunos precursores de aromas que se encuentran bajo forma de glicósidos. Igualmente limita la acción de la péctinesterasa, limitando la degradación de la pared celular (Di Stefano et al., 2002b).

En la EDA, la etapa sin remontajes favorece la creación a nivel del sombrero (figura No. 15), de condiciones de temperatura (más elevada), pH (mayor por efecto de la menor lixiviación del potasio), y azúcar (concentración menor respecto al mosto) potencialmente favorables a la acción de las enzimas pectolíticas y β -glucosidasas presentes en la uva. De esta forma se incrementa la liberación de los compuestos presentes en los hollejos, en particular taninos y aromas varietales bajo forma de glicósidos. Estos procesos se expresan en forma más acentuada cuando los hollejos son separados del mosto (Di Stefano et al., 2002b, 2004b).

⁵ Bosso, A. 2008. Com. personal



Figura 15. Vista del sombrero de hollejos en un mosto en activa fermentación.

En resumen, el proceso busca limitar la liberación de elementos desde los hollejos en la primera parte de la maceración. Al mismo tiempo en éstos se darían condiciones para que los compuestos fenólicos, aromáticos, etc, sean liberados con mayor facilidad una vez que el movimiento físico de los remontajes así lo favorezca. Igualmente permitiría una evolución más cercana de la extracción de antocianos y taninos al tiempo que el medio que recibe dichos compuestos es más rico en etanol. Éste permite una liberación aún mayor de flavanos que en presencia de acetaldehído (mosto en activa fermentación) favorecería las reacciones de estabilización del color.

Sin embargo se debe tener en cuenta que habrá otros factores afectados al aplicar esta técnica.

La reducción del aporte inicial de oxígeno, parece estar en contraposición con los requerimientos de oxígeno de las levaduras para un rápido y completo desarrollo de la fermentación alcohólica.

La ausencia de remontajes en los primeros días de maceración y por consiguiente, el menor aporte de oxígeno, efectivamente reducen la tasa de fermentación en dicho período (Bosso et al., 2002b, 2004b).

Según Peynaud (1977) el tiempo que transcurre hasta el comienzo de la fermentación depende, principalmente, de las condiciones de aireación, siendo menor cuando éstas son eficientes aportando oxígeno al mosto. Igualmente aumenta el número de generaciones de levaduras de lo cual depende el correcto término de la fermentación alcohólica.

Peynaud (1977) muestra claramente la influencia del momento de aireación del mosto (mediante remontajes) sobre el grado alcohólico alcanzado por el vino. Se puede apreciar (en pruebas con la cuba cerrada) que el mismo es menor cuando más tarde comienzan los remontajes. De todos modos cabe destacar de los mismos trabajos muestran, que cuando el encubado se lleva a cabo en depósito abierto, esto de por sí es suficiente para un correcto término de la fermentación.

Sin embargo en los trabajos consultados se constató que la EDA no influyó en la correcta finalización de la fermentación alcohólica a pesar de haber tenido ésta en algunos casos, una cinética inicial menor. Esto se apreció a través de la densidad final de los mostos y los resultados de azúcares reductores de los vinos. Aún cuando se trabajó con uvas de alto contenido de azúcares (Casassa et al., 2006).

Sin embargo, se ha de tener en cuenta que de por sí la velocidad de fermentación, como ha sido señalado por González-Neves et al. (2003b), puede afectar la composición fenólica de los vinos tintos ya que las extracciones desde los hollejos y las semillas, así como su solubilización son diferentes según el contenido alcohólico del medio.

Al mismo tiempo la extracción de polifenoles también depende del número y frecuencia de los remontajes así como del aporte de oxígeno (Bosso et al. 2004a, González-Neves 2005b), variables afectadas por la EDA.

Si bien al citado grupo de investigación de Asti pertenece el mayor número de trabajos realizados y consultados, la EDA han sido estudiada por otros autores, y más extensamente los elementos teóricos en que se basa su desarrollo.

En su aplicación, en todos los casos se practica la adición de SO_2 y la siembra de levaduras como en el tratamiento testigo. Las diferentes formas de llevar a cabo la EDA están dadas por algunas variantes en la conducción de la etapa sin remontajes, así como por la combinación de esta técnica con otras que la complementan (como el delestaje fermentativo). El primer caso hace referencia a la conducción del sombrero. Las alternativas son bazuqueos diarios (figura No. 16) o baño del mismo con una pequeña parte del volumen del mosto (entre 5 y 20%). Un caso particular, es la separación total de los hollejos del mosto, llamada por Bosso et al. (2004a) como “fermentación separada de los hollejos”.



Figura 16. Operación de bazuqueos sobre el sombrero de hollejos.

La EDA ha sido probada inicialmente en variedades como la Sangiovese, caracterizadas por bajo potencial en antocianos y alta proporción de disustituidos (cianidina, peonidina). Posteriormente se ha practicado en diversas variedades tintas.

Cabe recordar que Tannat se caracteriza por un elevado potencial en antocianos, elevados valores de índice de extractibilidad (EA) y un perfil antociánico caracterizado por altas proporciones de delphinidina, petunidina (ambos antocianos trisustituídos) y glucósidos no acilados (González-Neves, 2005b). Sin embargo en función de su elevado contenido en flavanos es una variedad donde el cuidado de los aspectos sensoriales relacionados al contenido de estos compuestos es fundamental. Por otra parte, a pesar de su excepcional capacidad para dar vinos de alta intensidad colorante, Tannat ha sido señalada como una variedad donde el color disminuye en forma particularmente importantes en el tiempo cuando el mismo no se encuentra debidamente estabilizado (González-Neves, 2005b).

En las primeras experiencias realizadas por Di Stefano y Bosso (1999) con esta técnica en la elaboración de vino Barbera, encontraron que ésta aportó a la estabilización del color durante la conservación. Asocian la EDA con un incremento respecto al testigo en la absorbancia a 520 nm (color rojo) y de la fracción constituida por pigmentos antocianos-flavanos estables a la acción decolorante del SO₂ (Di Stefano y Bosso, 2002a).

En sendos estudios realizados por Bosso y colaboradores con uva Barbera, presentados en el 2004, fue contrastada la EDA y la fermentación separada de los hollejos, frente a un testigo sometido a bazuqueos durante todo el encubado (sin remontajes) y por otro lado, frente un testigo donde los remontajes se

realizaron desde el primer día de maceración. Luego de la fermentación maloláctica los autores dividieron el volumen de cada tratamiento para someter parte del mismo a una crianza con microoxigenación.

Tal diseño experimental permitió apreciar la importancia del aporte de oxígeno al mosto según etapa de vinificación, así como los efectos de aplicar la EDA y la fermentación separada de los hollejos.

Los autores expresaron que al descube el contenido de antocianos resultó inversamente correlacionado con el aporte inicial de oxígeno.

Encontraron que fuertes aportes de oxígeno durante los primeros días de maceración causaron una reducción de la intensidad colorante del vino en maceraciones de duraciones medias o largas, lo que se pudo observar al comparar la EDA con la vinificación sometida a remontajes desde el primer día. Mientras que los aportes frecuentes de oxígeno al mosto durante la fermentación alcohólica aceleró los procesos de estabilización y las reacciones de condensación entre antocianos y taninos durante la crianza, lo que apreciaron al comparar la EDA, el testigo y el tratamiento sometido a bazuqueos (Bosso et al., 2004a).

Es así que estos autores citan que el color del vino y los contenidos de antocianos al descube dependen más del momento de la aireación que del aporte total de oxígeno.

Por lo que, cuando el testigo y la EDA tienen aportes comparables de oxígeno en fermentación, y el primero, remontajes al reparo del aire o menos intensos previo a la fermentación activa, es esperable encontrar al descube, contenidos levemente mayores de antocianos en la EDA y una evolución similar del color y de su estabilización.

Finalmente estos autores concluyeron que el principal efecto de la EDA, como también ha sido reportado por Bosso et al. (2003), fue la mayor extracción de taninos, particularmente evidente cuando se realizó fermentación con separación de hollejos. Expresan que tal incremento modificó las características sensoriales del vino pero salvo grandes aportes de oxígeno durante la fermentación, no influenciaron la evolución del color durante el envejecimiento ya sea en el ensayo con o sin microoxigenación.

En experiencias con uva Nebbiolo, Bosso et al. (2004a) han contrastado la EDA, y la EDA junto a la aplicación de delestage, a un tratamiento testigo. En este caso cabe señalar que los remontajes realizados al testigo hasta que el mosto contó con 6 grados de etanol, fueron al reparo del aire, por lo que no

permite comparar de la mejor forma el efecto de protección contra la oxidación atribuido a la EDA. En tales condiciones y en forma general el citado grupo de investigación no encontraron diferencias significativas tras aplicar la EDA y tampoco cuando se realizó combinada con un delestaje diario por 3 días en plena fermentación.

En tal ensayo, la mayor diferencia también estuvo en el contenido de taninos, el cual fue superior en la EDA y provocó diferencias sensoriales sin influir según los autores en los procesos de estabilización del color (evaluado a través del índice dTAT%).

Los citados autores llegan a la conclusión, que dada la paridad de resultados, la extracción diferida de antocianos aparece como una alternativa interesante del punto de vista práctico, principalmente debido a la menor mano de obra que emplea durante los primeros días de maceración.

En Argentina, otro grupo de investigación, (Casassa et al., 2006) trabajando con Cabernet Sauvignon y Sangiovese, encontraron asociado a la EDA valores superiores de intensidad colorante (aunque sin diferencias significativas), y menor tonalidad. En el análisis organoléptico estos autores citan que el panel de degustación apreció en la EDA mayor intensidad colorante, aroma frutal, concentración y tonalidad violeta, los cuales fueron al mismo tiempo estadísticamente preferidos frente a un tratamiento de maceración prefermentativa y a un testigo (test de Kramer).

2.3.4 Maceración extendida

La duración de la etapa de maceración junto con los efectos de la temperatura, movimiento del mosto y demás procesos de vinificación, tiene una considerable influencia en el contenido fenólico final del vino (Gil-Muñoz et al., 1999).

La práctica de la maceración extendida consiste en prolongar el contacto de los hollejos con el mosto/vino luego de finalizada la fermentación. Por lo tanto es un tiempo de maceración post-fermentativo.

En consecuencia el medio será rico en etanol al tiempo que no contará con la protección oxidativa del CO₂, y las temperaturas del mosto serán más bajas que durante la fase de activa fermentación.

La maceración extendida ha sido utilizada especialmente para vinos de guarda donde no solo la extracción de un buen contenido de antocianos es importante, sino también la estabilidad del color en el tiempo.

La difusión de los antocianos y taninos de los hollejos en el mosto es más rápida que la extracción de taninos de las semillas, las cuales requieren de una mayor concentración de alcohol y temperatura (Amrani y Glories 1994, González-Neves 2005b).

Basados entonces en lo conocido a cerca del perfil de extracción de estos compuestos, sería de esperar que la maceración extendida incrementase el contenido de taninos pero no así el de antocianos. Es ampliamente aceptado que esta técnica aumenta la extracción de flavanos desde los hollejos y las semillas, y esta creencia está generalmente respaldada por numerosos resultados de investigación.

En 1964, Singleton y Draper, citados por Vrhovsek et al. (2002) expresaron que a medida que el tiempo de maceración se incrementa, las semillas juegan un papel cada vez más importante como fuentes de proantocianidinas. Sin embargo se ha demostrado recientemente que son las catequinas y oligómeros los compuestos principalmente extraídos de las semillas, mientras que los hollejos y el raquis son fuentes importantes de proantocianidinas pliméricas (Sun et al., citados por Vrhovsek et al., 2002).

La maceración extendida más allá del fin de la fermentación alcohólica resulta en mayor proantocianidinas de semillas y menos antocianos (Cheyner et al., 2006).

Sims y Bates (1994) expusieron que los vinos analizados en sus experiencias se habían tornado más astringentes y habían perdido intensidad aromática antes que fuese alcanzada la máxima extracción de color, la que se registró al cuarto día. Concluyeron en consecuencia que había que perder algo de aroma y ganar astringencia para alcanzar el tiempo de maceración necesario para lograr la máxima extracción y estabilidad del color.

Vrhovsek et al. (2002) encontraron que la fracción de los polifenoles que incrementó más su contenido al extenderse el tiempo de maceración fue el de las catequinas. Las proantocianidinas de mayor peso molecular, también mostraron un aumento importante en el citado estudio, superior al observado por los oligómeros (polímeros de entre 2 y 4 unidades de catequinas).

Auw et al. (1996), encontraron que los polifenoles totales, el ácido gálico, y los flavanos, todos se incrementaron al extenderse el tiempo de maceración.

En el mismo sentido Vrhovsek et al. (2002) hallaron en sus estudios un incremento continuo del contenido de proantocianidinas entre 15 y 19 días, mientras que con tiempos mayores de maceración constataron pérdidas.

Pero son numerosos los estudios donde se aprecia que con tiempos de contacto mayores entre los hollejos y semillas y el líquido, se obtienen generalmente un contenido fenólico mayor en los vinos, dado por la solubilización de los compuestos de más difícil extracción (Sims y Bates 1994, Auw et al. 1996, Gerbaux et al. 1998, Burns et al. 2001, Gómez-Plaza et al. 2001). Sin embargo, maceraciones demasiado prolongadas pueden determinar incrementos sustanciales de la astringencia y pérdida de aromas y en algunos casos determinan una disminución de la intensidad colorante (Auw et al. 1996, Di Stefano y Bosso 2002a).

Gerbaux et al. (1998) en estudios de ME con Pinot noir, encontraron que maceraciones que se extienden más allá del tercer día de finalizada la fermentación perjudican en general la calidad del vino (menor contenido de antocianos, intensidad colorante, calidad sensorial, y mayor contenido en polifenoles).

Una consecuencia de la mayor extracción desde las semillas, es que en estas hay una proporción mucho más alta de taninos de alta afinidad por las proteínas, y por ende astringentes, que en los hollejos (Amrani y Glories, 1994). Esto determina que si su participación en el componente tánico del vino es elevada, pueda determinar propiedades sensoriales negativas.

Sin embargo, los fenómenos que definen los contenidos de un compuesto en el mosto-vino no solo dependen de la extracción del mismo, sino también de aquellos que determinan su evolución en el medio y eventual pérdida.

González-Neves (2005b) señala que este efecto puede ser significativo en vinificaciones de pequeñas cantidades de uva, típicamente empleados en ensayos de investigación (vinificaciones modelo). En estudios del citado autor con Tannat, trabajando con 50 kg de uva, se encontraron que las maceraciones más largas dieron lugar a vinos con contenidos fenólicos totales, antociánicos e intensidades colorantes menores, aunque las concentraciones de catequinas fueron superiores con 15 días de maceración, lo que podría estar reflejando la importante contribución de flavanos de las semillas.

Por tal motivo, la ME puede ser inconveniente en variedades caracterizadas por su contenido de taninos astringentes o en especies con elevada proporción de antocianos diglucósidos que no polimerizan como en el caso de los monoglucósidos (Sims y Morris, Kantz y Singleton, citados por Gómez-Plaza, 2001). En este último caso se obtendría un vino con un mayor contenido de flavanos que contribuiría negativamente al perfil sensorial sin poder ser aprovechados los beneficios en la estabilidad del color.

El descenso de la concentración de antocianos comúnmente encontrado en los seguimientos de maceraciones extendidas, es el producto tanto de pérdidas de dichos compuestos desde el mosto/vino (oxidación, hidrólisis, precipitación y readsorción en hollejos y levaduras) como de su evolución hacia compuestos no coloreados y otros cromóforos, algunos de ellos más estables (Sims y Bates 1994, Cheynier et al. 2006).

Cheynier et al., citados por Cheynier et al. (2006), señalan que la concentración de antocianos comienza a decrecer luego de algunos pocos días de maceración, cuando la tasa de su conversión en otras especies moleculares es mayor a su extracción, mientras que Romero-Cascales et al. (2005) exponen que se establece un equilibrio basado en la adsorción-desorción, entre las concentraciones de antocianos en la uva y el vino, y una vez que el equilibrio es alcanzado, no pueden ser extraídos más antocianos desde los hollejos en términos absolutos. Estos últimos autores empleando 1000 litros de mosto, encontraron que los máximos incrementos de antocianos se registraron entre los días 3 y 7, mientras que pequeños cambios se constataron entre el día 7 y 14 con un pequeño descenso en antocianos en este último período.

Watson et al. (1997) evaluaron para Pinot noir el efecto del tiempo de maceración (4, 8, 14, 20 días) en el contenido fenólico de los vinos tras un año de almacenamiento en botella. Encontraron que los vinos fermentados con 8 días de contacto con los hollejos tuvieron los mayores contenidos de antocianos, seguido por los vinos de 14 días de maceración (6 días post-fermentación). Los vinos de menor intensidad colorante fueron los de 4 y 20 días de maceración. Los autores concluyen que el tiempo de maceración postfermentativa significó una importante pérdida de color, según expresan, aparentemente debido a polimerización de antocianos y posterior precipitación y/o destrucción oxidativa de los pigmentos.

Sin embargo, la maceración extendida significativamente incrementó la extracción de fenoles de las semillas incluyendo ácido gálico y catequinas, adjudicado por los autores a la solubilización en presencia de etanol. También encontraron un incremento de los pigmentos poliméricos, debido a la mayor extracción de precursores fenólicos (Watson et al., 1997). De estas últimas variables los mayores contenidos fueron observados en el encubado de 14 días.

Vila (2002) midieron el efecto del tiempo de maceración (5, 10, 20 días) sobre el color y el perfil tánico de los vinos, trabajando a escala industrial (20 mil litros) y con dos variedades Cabernet Sauvignon y Malbec.

En tales condiciones los autores encontraron en Cabernet, que el contenido de color total alcanzó un máximo en el décimo día de maceración y luego disminuyó, mientras que el contenido de fenoles totales creció con un patrón logarítmico. Pasó por una fase de extracción rápida, hasta el décimo día, y continuó con una fase mucho más lenta.

Es así que la caída en la magnitud del color rojo en la maceración de 20 días, significó una pérdida de alrededor de un 10%. Los vinos de tal variedad obtenidos con maceración de 10 días y de 20 días resultaron muy superiores en cuanto a los contenidos de antocianos, color polimérico y taninos. También provocaron sensaciones de concentración y untuosidad mayores. Además resultaron más ásperos, astringentes y secantes que los de 5 días, si bien citan que estas sensaciones fueron moderadas. Finalmente expresan que los vinos de 20 días fueron similares a los de 10 días salvo en que alcanzaron un contenido mayor de polifenoles totales y de taninos no astringentes.

Budic-Leto et al. (2003), igualmente encontraron que prolongar la maceración causó un incremento en el contenido de fenoles, índice de vainillina, proantocianidinas, como también un descenso en el contenido de antocianos.

En Malbec Vila (2002) encontró un comportamiento similar al anterior en cuanto al color, aunque el contenido en polifenoles totales comenzó a decrecer lentamente luego del décimo día, mostrando que también es importante el comportamiento varietal en la determinación de estas variables.

Sin embargo se encuentran autores que han hallado un mayor contenido de antocianos al prolongarse tiempo de maceración. Está claro que dependerá tanto de la variedad y volumen utilizado, como de los tiempos de maceración que se estén comparando.

Gómez-Plaza et al. (2001) resaltan estos aspectos. Expresan que los efectos del tiempo de maceración varían de acuerdo con el cultivar. Igualmente exponen que tiempos mayores de contacto entre hollejos y mosto están usualmente relacionados con una mayor concentración de antocianos en el vino. En sus estudios estos autores encontraron que el aumentar el tiempo de maceración produjo vinos con mayor contenido de antocianos, antocianos ionizados y compuestos poliméricos, mayor intensidad colorante, y en general mayor calidad de color.

Cabe destacar que compararon maceraciones de 4, 5 y 10 días, utilizando 100 kg de uva *Vitis vinífera* variedad Monastrel.

Como fue expresado, uno de los objetivos buscados al aplicar la ME es mejorar la estabilidad del color, especialmente si el estilo de vino buscado implica un período de guarda.

En este sentido Vila (2002) estudiando la evolución de los componentes del color durante la maceración, encontró un claro aumento del color polimérico al tiempo que descendía el color copigmentado y el debido a antocianos permanecía sin mayores variaciones.

En este sentido Gomez-Plaza et al. (2001) encontraron un contenido mayor de color polimérico luego de un año en botella en los vinos que provenían de maceraciones extendidas al tiempo que diferentes autores expresan que los contenidos de pigmentos poliméricos aumentan con el tiempo de maceración asociados a una mayor extracción de flavanos (Gómez-Plaza 2002, Kudo y Sodeyama, Reynolds et al., citados por Sacchi et al. 2005).

Sacchi et al. (2005) señala que el incremento en el contenido de taninos asociado a una maceración extendida, debería también conducir a una mayor formación de pigmentos poliméricos.

Fulcrand et al. (2006) expresan que el aumento de la relación flavanos/antocianos es un elemento que puede favorecer la reacción directa entre antocianos y flavanos compitiendo con la continua asociación y clivaje que sufren los taninos entre si, siendo algunos de sus productos cromóforos más estables que los antocianos originales.

Otro aspecto a tener en cuenta son los efectos de la ME sobre la tonalidad, al estar mas expuestos los antocianos a oxidación, especialmente en el período post-fermentación.

Glories et al. (1984a) asocian mayores valores de tonalidad con vinos que han sufrido mayor evolución.

En los citados estudios de Vila (2002), en Cabernet Sauvignon, la tonalidad alcanzó su mínimo valor al séptimo día, y luego comenzó a aumentar, pero muy levemente. En Malbec, luego de alcanzarse el mínimo de tonalidad, éste aumentó aceleradamente.

Kelebek et al. (2005) encontraron un leve aumento de la tonalidad al extenderse el tiempo de maceración de 6 a 10 días.

En general hay coincidencia en los resultados de aplicar la ME por lo que si se tienen en consideración las características de la variedad utilizada

(especialmente d_{pell} , d_{Tpep} , $d_{pell \%}$, $Mp\%$) y los volúmenes encubados se pueden anticipar algunas de las características del producto a obtener.

En el aspecto sensorial, el aumento en la extracción de polifenoles generalmente constatado, puede colaborar a la estructura y complejidad del vino sometido a crianza, al mejorar el tiempo y los procesos de envejecimiento sus propiedades sensoriales.

Finalmente cabe señalar que las condiciones sanitarias y de maduración de la materia prima, serán especialmente determinantes de la posibilidad de aplicar esta técnica.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 INTRODUCCIÓN

Las vinificaciones fueron realizadas el 8 de marzo del 2006, en la bodega experimental de Facultad de Agronomía.

Se partió de uvas del cultivar Tannat, provenientes de un viñedo comercial ubicado en la región sur de Uruguay, departamento de Canelones, localidad Cuatro Piedras.

En el cuadro cosechado para el ensayo las plantas están conducidas en espaldera alta, con un marco de plantación de 2.30 m x 1.25 m, habiendo sido implantadas en el año 1988. Se encuentran sobre pie SO₄ y están manejadas con poda cordon de royat.



Figura 17. Paisaje del viñedo.

La fecha de la vendimia fue decidida por el productor, teniendo en cuenta condiciones de madurez y estado sanitario de la uva.

La cosecha se realizó en horas de la mañana e inmediatamente fue transportada a la bodega en recipientes de plástico de 20 Kg.

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo un diseño completamente aleatorio con dos repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue un tanque de acero inoxidable de un hectolitro de capacidad (figura No. 18), conteniendo el mosto correspondiente a la molienda de 70 Kg de uva.



Figura 18. Tanques de vinificación.

3.3 ANÁLISIS DE LAS UVAS

Se separó el volumen de uva requerido para cada vinificación, tomando racimos al azar de entre los diferentes cajones ingresados a bodega. Una vez completados los 70 Kg requeridos para cada vinificación, y previa molienda, se extrajeron muestras de uvas, según el método propuesto por Carbonneau et al. (1991), sacando fracciones de racimos de 3 a 5 bayas, alternadamente de la mitad inferior y superior de éstos, hasta totalizar 250 bayas por muestra. Con estos fueron determinados los índices de Glories y Augustin (1993) con modificaciones (González-Neves, 2005b): potencial total en antocianos (ApH1), antocianos extraíbles (ApH3,2) y riqueza fenólica (A280).

3.4 OBTENCIÓN DE MOSTOS Y ENCUBADO

Los mostos fueron obtenidos con una descobajadora-moledora Alfa 60 R (Italcom, Italia) de acero inoxidable y rodillos de goma (figura No. 19). De inmediato los mostos fueron encubados en los citados recipientes hasta completar los días necesarios para el desarrollo de cada tratamiento.



Figura 19. Descobajadora-moledora Alfa 60 R.

A continuación las vinificaciones fueron conducidas de acuerdo a la tecnología requerida por cada técnica.

3.5 OPERACIONES REALIZADAS EN EL TRANCURSO DE LAS VINIFICACIONES

3.5.1 Adición de LSA y SO₂

Luego del encubado se agregó al mosto una dosis de 5 gramos de anhídrido sulfuroso por cada 100 kg de uva y fueron sembrados 20 gramos de levaduras secas activas por hectolitro (*Saccharomyces cerevisiae* WE372, Anchor, Sudáfrica). En el caso de la maceración pre-fermentativa ambas operaciones fueron aplazadas hasta que finalizó el tratamiento de frío.

3.5.2 Remontajes y bazuqueos

En el transcurso de las vinificaciones se efectuaron manualmente operaciones de remontajes con baldes de 15 L de capacidad (figura No. 20).

Mientras que el momento del inicio de los remontajes estuvo condicionado por la tecnología requerida en cada ensayo, la frecuencia e intensidad de los mismos se efectuó teniendo en consideración la etapa del proceso de vinificación en que se encontrara cada tratamiento, como se expone a continuación:



Figura 20. Mosto/vino a ser remontado.

Cuadro 7. Frecuencia e intensidad de los remontajes según etapa de vinificación y proporción aproximada del volumen involucrado en cada procedimiento.

Etapa de la Vinificación	Frecuencia de remontajes	Intensidad	
		mañana	tarde
En ausencia de fermentación activa	Mañana y tarde	55 %	55 %
En fermentación	Mañana y tarde	110 %	55 %
Mañana del prensado y tarde previa	Sin remontajes	-	-
En los 3 días siguientes al prensado	Mañana y tarde	55%	55 %
Luego en la mañana hasta desborrar (3 días más)		55 %	-

A continuación de los remontajes, se practicaron bazuqueos (pigeage), uniformizando así el contenido del recipiente y desagregando el sombrero de hollejos formado durante la fermentación.

3.6 SEGUIMIENTO DE LAS VINIFICACIONES

Dos veces al día se tomaron medidas de densidad y temperatura sobre el mosto-vino (figura No. 21). Éstas se realizaron sobre una muestra recogida en una probeta de 250 mL luego de incorporado el primer balde de remontaje. En los tratamientos que no requerían ésta operación en las primeras etapas, la muestra fue tomada luego de devolver el contenido de la primera probeta extraída.



Figura 21. Toma de densidad y temperatura.

Una vez obtenidos dos registros de densidad por debajo de 1000, las mediciones fueron suspendidas al considerarse finalizada la fermentación alcohólica.

Al mismo tiempo, una muestra del recipiente No. 1 de cada tratamiento fue tomada todas las mañanas a partir del mosto-vino separado para el registro de densidad y temperatura, siendo llevadas al laboratorio para su estudio, (antocianos y polifenoles totales). De esta forma los mostos fueron analizados cada 24 horas desde la molienda hasta el descube, monitoreando así, la dinámica de extracción de estos compuestos.

3.6.1 Prensado y operaciones posteriores al descube

Una vez transcurrido el tiempo de maceración definido para cada tratamiento, el vino fue separado de los hollejos.



Figura 22. Escurrimiento del mosto. Vino gota.



Figura 23. Prensa.

Se recogió el vino gota mientras que el orujo fue prensado con una prensa de mano de acero inoxidable (figuras No. 22 y 23). El vino gota y el vino prensa fueron encubados juntos en los recipientes de acero inoxidable donde transcurrió la maceración hasta el primer desborre.

En tanto, se continuó con los remontajes, con el objetivo de contribuir a eliminar CO₂ remanente y eventuales residuos de azúcar sin fermentar.

A los cinco días del prensado se llevó a cabo el primer desborre, al tiempo que se trasvasa el vino a recipientes de vidrio de 10 L. Cuatro días más tarde se

realizaron las correcciones de anhídrido sulfuroso, adicionando 1.4 gr de metabisulfito por cada 10 litros de vino. De esta forma se impidió el desarrollo de la fermentación maloláctica, ante la posibilidad de que ésta no se produjese naturalmente en todos los casos, lo que hubiese significado introducir una causa de variabilidad no explicada por diferencias entre los tratamientos.

Finalmente y transcurridos otros seis días se practicó un segundo trasiego del vino, permaneciendo posteriormente estacionado hasta el momento de ser analizado.

Cuadro 8. Resumen de operaciones realizadas al vino luego del prensado.

Días desde Prensado	Operación realizada
6	Primer desborre. Se trasvasa a recipientes de 10 litros
10	Se corrige SO ₂
15	Segundo desborre

3.7 TRATAMIENTOS

Los siguientes tratamientos fueron comparados: maceración extendida, maceración prefermentaria en frío, extracción diferida de antocianos y maceración tradicional, esta última tomada como tratamiento testigo.

3.7.1 Maceración tradicional

Una vez que el mosto fue encubado, se agregó el anhídrido sulfuroso, realizando posteriormente un bazuqueo para distribuirlo uniformemente. Las levaduras fueron esparcidas en superficie para su hidratación, siendo integradas al conjunto del mosto con los remontajes de la mañana siguiente.

Teniendo en cuenta el seguimiento de la cinética de fermentación, estudios previos de las características de Tannat en las presentes condiciones de vinificación (González-Neves, 2005b) así como la de extracción de antocianos y polifenoles se decidió realizar la maceración durante 8 días, luego de lo cual, los vinos fueron separados de los orujos.

3.7.2 Maceración extendida

Se procedió como en el caso del tratamiento testigo, siendo únicamente modificado el tiempo de maceración, el cual se extendió a 15 días.

3.7.3 Extracción diferida de antocianos

En este tratamiento, una vez que el mosto fue encubado, sulfitado y sembrado con levaduras, fue mantenido sin remontajes hasta que en el mosto/vino se alcanzó una densidad próxima a 1050, la que indica un contenido en alcohol aproximado de 5 a 6°. Ambas parcelas bajo este tratamiento, lograron tal condición, a las 72 horas de maceración. Finalmente la diferencia con el testigo estuvo dada por la ausencia de remontajes durante el segundo y tercer día de maceración. Durante esos días, las operaciones realizadas sobre la EDA estuvieron limitadas a mojar el sombrero dos veces al día, efectuando ligeros bazuqueos. Al igual que en el tratamiento testigo, la maceración transcurrió durante 8 días.

3.7.4 Maceración prefermentativa en frío

Inmediatamente después del encubado, fue agregado hielo seco en forma de bloque (figura No. 24) y en cantidad suficiente como para bajar la temperatura a menos de 10 °C. Posteriormente, se efectuó un bazuqueo, y se desplazó el criógeno hacia el fondo del recipiente. Ésta operación se realizó en la mañana y en la tarde, (9 hs y 18 hs) durante 5 días.



Figura 24. Bloque de hielo seco previo agregado al mosto.

En la tarde del quinto día de maceración se agregó una cantidad de hielo inferior a la habitual para permitir que el mosto alcanzara a la mañana siguiente, una temperatura cercana a la ambiente, de forma de estar en condiciones de recibir la siembra de levaduras. Finalizando de este modo el tratamiento de frío,

fue agregado el metabisulfito y se inocularon las levaduras, al tiempo que se comenzó con el programa de remontajes. A partir de este momento, se condujo la vinificación como en el tratamiento testigo, durante 7 días más.

3.7.5 Análisis de los mostos

Los mostos fueron analizados cada 24 horas desde la molienda hasta el descube (antocianos y polifenoles totales) a partir de las muestras extraídas todas las mañanas desde el recipiente No. 1 de cada tratamiento, como ya fue mencionado.

La riqueza polifenólica fue determinada a 280 nm y se expresa en unidades de absorbancia, mientras que los antocianos fueron cuantificados utilizando el método de Ribéreau-Gayon y Stonestreet (1965), y sus concentraciones se expresan en mg de malvidin-3-glucósido por litro.

3.7.6 Análisis de los vinos

Los vinos fueron analizados a los 3, 6, y 12 meses de terminadas las fermentaciones alcohólicas.

Se determinaron los parámetros enológicos clásicos (O.I.V, 1990), la composición fenólica (Paronetto, 1977) y el color de los vinos (Glories, 1984), cuadros No. 9 y 10.

Cuadro 9. Variables de rutina.

Variable	Método
Extracto Seco	Densimetría
Grado alcohólico	Destilación + Aerometría
Acidez Total	Volumetría
Acidez volátil	Arrastre de vapor + Volumetría
SO₂ libre y total	Volumetría (método rápido de la O.I.V)
Azúcares reductores	Hagedorn-Hensen (UNIT, 1985)
pH	Potenciometría

Cuadro 10. Composición fenólica y color.

Variable	Método
Polifenoles Totales	Absorbancia 280 nm
Polifenoles Totales (Índice Folin-Ciocalteu)	Índice Singleton y Rossi (1965)
Proantocianidinas	Ribéreau-Gayon y Stonestreet (1966)
Catequinas	Swain y Hillis (1959)
Antocianos totales	Ribéreau-Gayon y Stonestreet (1965)
Intensidad Colorante	Glories (1984b)
Tonalidad	Sudreau (1958)
[C]	Levengood y Boulton (2004)
[A]	Levengood y Boulton (2004)
[P]	Levengood y Boulton (2004)

Para la medición del pH se utilizó un aparato Hanna Instruments 8521, mientras que las mediciones de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro Shimadzu UV 1240, empleando celdas de cuarzo de 1 cm de recorrido óptico para medir A280 y celdas de vidrio de 1 cm para los antocianos.

Los polifenoles totales son expresados en mg de ácido gálico por litro, los antocianos en mg de malvidina 3-glucósido por litro, las catequinas en mg de D-catequina por litro y las proantocianidinas en mg de cloruro de cianidina por litro.

Todos los análisis efectuados fueron hechos por duplicado para cada muestra.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los análisis de rutina y las familias polifenólicas se utilizó el programa SAS. El análisis es el correspondiente a un modelo de parcelas divididas en el tiempo sobre un diseño completamente al azar, donde las observaciones pueden estar autocorrelacionadas.

En el caso de la comparación estadística de las extracciones se ajustaron dos modelos, uno para la extracción de polifenoles y otro para la correspondiente en antocianos. Se utilizó el procedimiento NLIN del SAS, ya que se ajustó un modelo donde los coeficientes y los puntos de corte se estiman al mismo tiempo.

Los contrastes de medias se hicieron por Tukey al 5%.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis realizados en los mostos recién encubados mostraron que la uva asignada a la MPF tuvo un grado de maduración inferior al resto. Igualmente diferencias encontradas en etapas en que la MT y ME eran mantenidas bajo un mismo manejo, muestran que existió un problema de homogeneidad en los mostos encubados.

Por lo tanto, resulta muy difícil separar el efecto del tratamiento, de aquel derivado de diferencias en el estado de maduración de la uva. Lo que es claro, que ambos factores incidieron sobre los resultados obtenidos, por lo que se deberán relativizar las diferencias encontradas entre tratamientos a este hecho.

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MOSTOS ENCUBADOS

El contenido en azúcar de los mostos encubados calculado a través de las densidades medidas sobre los mismos en cada tanque y corregidas según temperatura, fueron utilizadas para caracterizar los mostos de cada tratamiento y determinar diferencias entre ellos.

Cuadro 11. Contenido en azúcar de los mostos de cada tratamiento por tanque de vinificación.

Tratamiento	MT		ME		EDA		MPF	
Tanque	1	2	1	2	1	2	1	2
Azucar g/L	226	223	231	228	231	226	215	218

Se puede ver que todos los tanques tuvieron contenidos similares de azúcares en los mostos con excepción de los dos asignados a la maceración prefermentativa, en los cuales se registró un contenido apreciablemente menor.

4.2 CARACTERIZACIÓN FENÓLICA DE LAS UVAS A VINIFICAR

Los resultados de los análisis realizados a cada lote de uvas llegados a bodega determinaron las siguientes características fenólicas del material evaluado.

Cuadro 12. Características fenólicas de las uvas vinificadas.

	Lote 1	Lote 2
A pH 1	2594 a	2548 a
A pH 3.2	1299 a	1267 b
EA %	49.9	50.3
A 280	67	65

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Si bien las diferencias no son importantes, fueron estadísticas para el potencial en antocianos extraíbles, determinando un mayor registro para el lote 1.

Si son comparados estos resultados con los valores presentados por González-Neves (2005b) para la misma zona de cultivo y tres años de evaluación (2001, 2002 y 2003), se ve que los mismos están en registros cercanos a los del 2003, año que fue superior al 2001 y muy inferior al 2002, vendimias extremadamente malas y buenas respectivamente, respecto a la síntesis y acumulación de polifenoles.

4.3 CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN Y TEMPERATURA DE LOS MOSTOS SEGÚN TRATAMIENTO

La figura 25 muestra como todos los tratamientos pudieron desarrollar correctamente el proceso de fermentación durante la maceración.

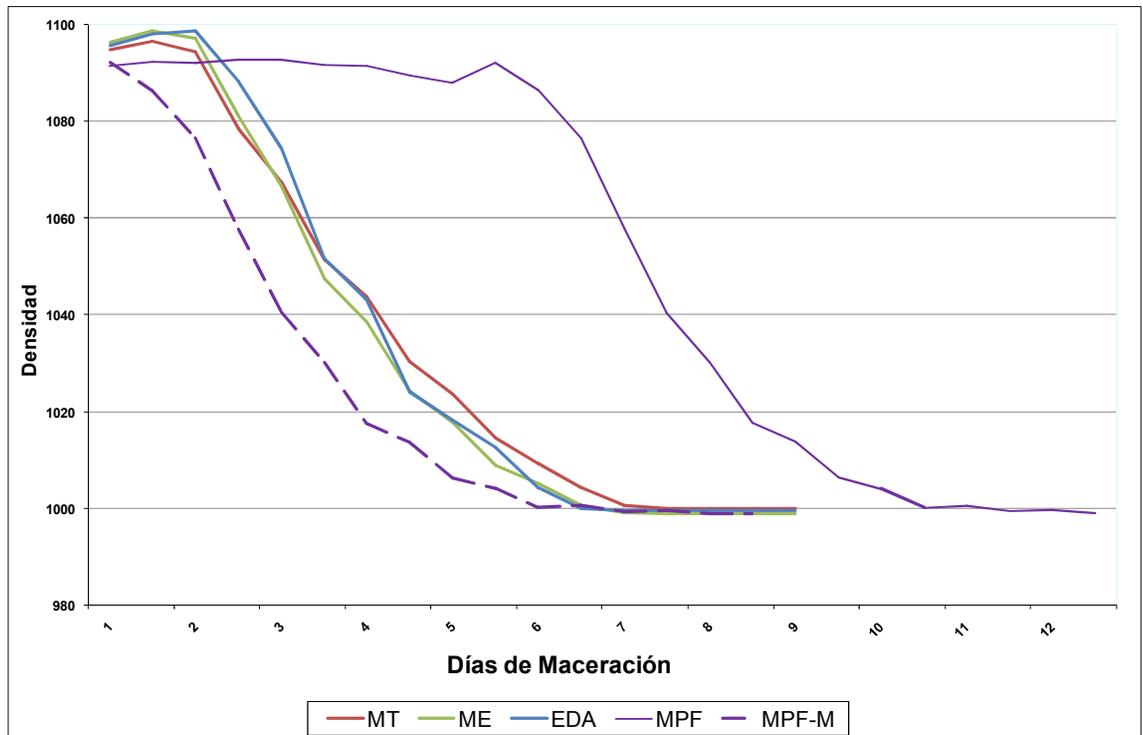


Figura 25. Cinéticas de fermentación según tratamiento.

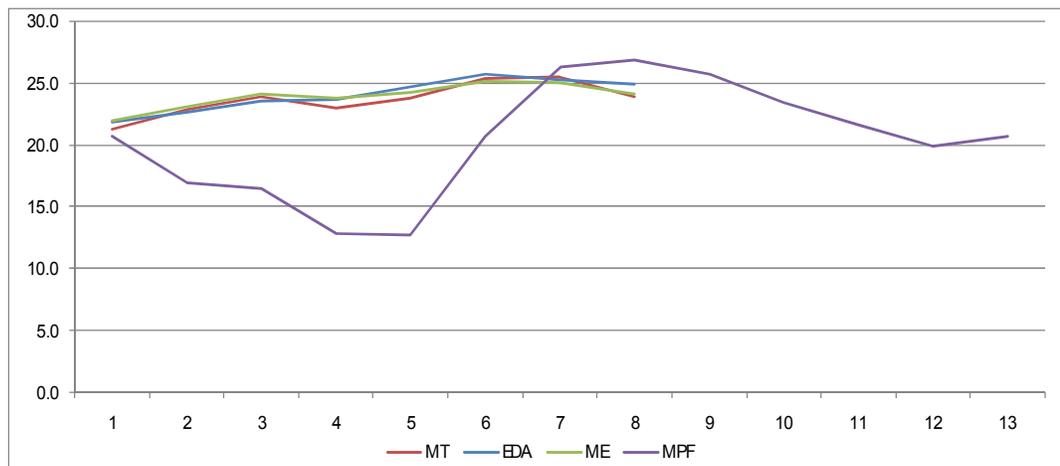


Figura 26. Temperatura de los mostos en °C según tratamiento y día de maceración.

En los primeros registros (tomados a continuación del encubado) se apreció como la MPF tuvo densidades inferiores al resto de los tratamientos lo que reveló una menor concentración de azúcar en los mostos de este tratamiento.

Respecto al efecto del frío en la maceración prefermentativa, se apreció que este fue muy efectivo inhibiendo el comienzo de la fermentación alcohólica (densidad constante durante los días que duró el agregado de hielo seco. Figura No. 25, curvas MPF y MPF-M mismo punto de inicio).

Una vez suspendido el agregado de $\text{CO}_{2(\text{s})}$, el tratamiento desarrolló una cinética de fermentación superior al resto, (como se aprecia en el seguimiento de la curva MPF-M) y alcanzó las mayores temperaturas de fermentación (figura No. 26).

Por lo tanto, más allá de lo expresado anteriormente, es muy probable que en la etapa de frío se hayan desarrollado colonias de levaduras indígenas capaces de reproducirse rápidamente una vez que el mosto alcanzó la temperatura ambiente.

En todo caso su evolución en la fase de frío no fue importante como para apreciar descensos en la densidad del mosto o como para consumir en forma importante factores de crecimiento.

En este sentido los resultados presentados difieren de lo observado por Casassa et al. (2006) quienes obtuvieron una cinética de fermentación considerablemente más lenta en la MPF que en el tratamiento testigo. Estos autores expresaron citando a Cuénat et al. que en general todas las técnicas que alargan la fase prefermentativa, favorecen el desarrollo de levaduras indígenas que consumen factores de crecimiento y secretan metabolitos antagónicos que dificultan luego el desarrollo de las levaduras secas activas.

Igualmente Feuillat (1997) tras investigar los aspectos microbiológicos que tienen lugar durante la etapa de frío señala que aún en presencia de 20 a 30 g/hl de anhídrido sulfuroso la MPF favorece el desarrollo de levaduras indígenas aportadas por la uva.

4.4 SEGUIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES DE ANTOCIANOS Y POLIFENOLES TOTALES DURANTE LAS VINIFICACIONES

4.4.1 Análisis de las curvas de extracción

4.4.1.1 Antocianos

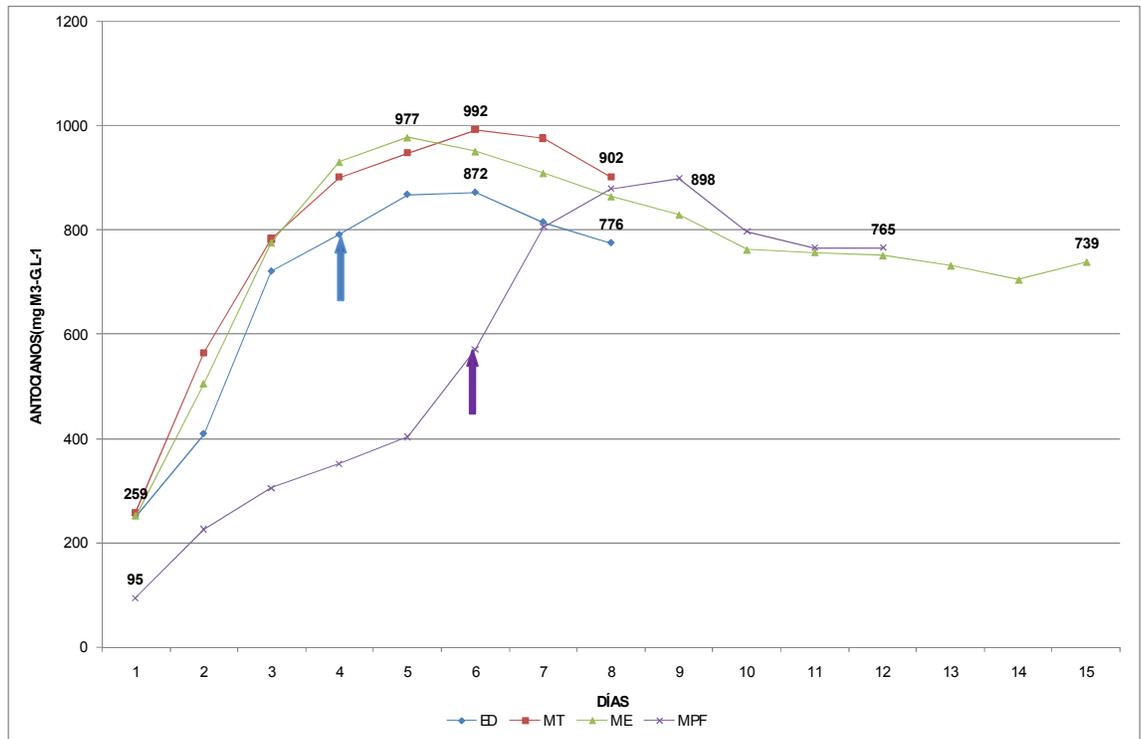


Figura 27. Evolución de la extracción de antocianos en cada tipo de vinificación.

La representación gráfica del seguimiento de las extracciones se presenta en la figura No. 27 para los antocianos y en la figura No. 29 para los polifenoles totales.

El día 1 corresponde a la medición realizada a las 24 horas de ser encubados los mostos.

Se agregan las gráficas 15 y 17 donde MPF-M (modificado) es el perfil de los últimos 8 días del tratamiento MPF, de forma de mejorar la observación de las extracciones durante la etapa de manejo convencional. Se lleva la última medición con tratamiento de frío al día 1.

Las flechas indican según el color, la primera medida realizada estando el tratamiento considerado, bajo condiciones de manejo convencional.

Hasta el descube de la MT, ésta y la ME deberían comportarse como un único tratamiento al estar sometidos al mismo manejo, por lo que las diferencias encontradas en esta etapa se deben exclusivamente al error experimental.

En relación a lo expresado en el apartado 4.2, si se comparan en este caso los resultados de las curvas de extracción del presente trabajo, con los presentados en los estudios precedentes de González-Neves (2005b) trabajando en similares condiciones de vinificación (volumen encubado, tanques de vinificación, duración de la maceración, etc), se puede decir que si bien los análisis de las uvas determinaron características similares a las de un año medio respecto a la síntesis y acumulación de polifenoles como la del 2003, en bodega la maceración tradicional tuvo contenidos de antocianos aún inferiores a los presentados por el citado autor para el año 2001.

Respecto a lo presentado en la figura No. 27, puede ser observado que los tratamientos con manejo diferente al testigo en las etapas iniciales de la fermentación y prefermentativas, modificaron claramente la curva de extracción de antocianos, a lo largo de todo el tiempo de maceración.

No obstante, en todos los casos el contenido de antocianos en el mosto aumentó rápidamente alcanzando un máximo entre el quinto y sexto día de maceración fermentativa con un posterior descenso.

González-Neves (2005b), trabajando en similares condiciones experimentales a la MT, presenta datos de tres años (2001-2003) y en todos los casos los máximos de antocianos se observaron al cuarto día para Tannat. Esta diferencia podría estar dada por una lenta cinética de fermentación y extracción, particularmente observada en el año de los presentes ensayos (figuras No. 25 y 27). Al mismo tiempo en este caso se trabajó con un mayor volumen de mosto (70 kg vs 50 kg).

Como lo expresan González-Neves et al. (2003b), Vila et al. (2005), los tiempos en que se evidencian estos fenómenos están influenciados entre otros factores, por las condiciones de vinificación, la velocidad de fermentación y la variedad con la que se trabaje.

Tal evolución del contenido de antocianos en el mosto/vino durante la maceración concuerda con lo citado igualmente por otros grupos de autores.

Cheyrier et al. (1994), Vasserot et al. (1997), Bosso et al. (2004a), Cheyrier et al. (2006), señalan que las causas del descenso de antocianos

libres en el curso de la vinificación, son los fenómenos de oxidación e hidrólisis, la reabsorción por los orujos, y la adsorción en las levaduras.

En forma reciente, Cheynier et al. (2006) expresaron que la concentración de antocianos comienza a decrecer luego de pocos días de maceración, cuando la tasa de su conversión en otras especies moleculares, excede la de su extracción, más allá que algunos antocianos puedan ser reabsorbidos en las partes sólidas de la uva o las levaduras.

En este sentido, Dallas et al., Gómez-Cordovés et al., citados por González-Neves et al. (2003a), expresan que a su vez, desde la molienda estas moléculas participan en reacciones de adición con otros componentes de los mostos, dando lugar a pigmentos diferentes y a una estabilización del color dada por la condensación y copolimerización de los antocianos con los flavanos.

Sacchi et al. (2005) expresan que esta característica observada en la extracción de antocianos con un pico temprano de su concentración y subsiguiente descenso durante la fermentación es inconsistente con que la solubilidad sea el factor limitante que explique tal evolución de estos compuestos en el mosto, y que en su lugar refleja su inestabilidad una vez liberados.

Los mismos autores formulan que la limitante para su extracción es probablemente una barrera física desde que están localizados en las vacuolas de las células hipodérmicas y han de atravesar éstas y la célula misma para ser liberados.

Nagel y Wulf (1979), Gil-Muñoz et al. (1999), Di Stefano y Bosso (2002a), entre otros, igualmente encontraron que el máximo nivel de extracción de antocianos, es observado durante unos pocos días desde el inicio de la maceración, luego de lo cual usualmente no se observa más extracción, a pesar del hecho de que entre el 30 y 40 % de los antocianos permanecen en los hollejos (Singleton, Van Balen et al., citados por Romero-Cascales et al., 2005).

Lo que queda claro tras observar los resultados presentados y los trabajos citados, que la forma de la curva en el tiempo es el resultado del equilibrio entre la extracción de antocianos y su pérdida o evolución hacia otras formas. Esto refleja tanto su capacidad de pasar rápidamente al mosto como la altísima reactividad que poseen los antocianos.

Hay que resaltar que en vinificaciones modelos, donde los volúmenes encubados son pequeños (decenas de litros), el contacto entre el mosto y los

hollejos es muy superior al que tiene lugar a nivel industrial (grandes cubas). De esta forma, se incrementan particularmente los fenómenos de readsorción en los hollejos, de los compuestos liberados. Este hecho se acentúa en la etapa postfermentativa de la ME al no haber formación de sombrero.

Al comparar los tratamientos se aprecia que la maceración tradicional tuvo una mayor tasa de extracción de antocianos, un contenido máximo superior, y un mayor valor al descube.

A pesar que fue el efecto buscado en los primeros días, la extracción diferida se mantuvo a lo largo de todo el proceso de maceración por debajo de los restantes tratamientos conducidos sin control de temperatura, debido a la ausencia de remontajes en las primeras jornadas de maceración, que marcó la diferencia de manejo respecto a la MT.

El cuadro No. 13 (donde se resalta en rojo los días de maceración diferencial respecto al testigo) muestra que si bien se logró disminuir inicialmente la extracción de antocianos, el efecto de diferirla en el tiempo no fue apreciado.

Cuadro 13. Diferencias en el contenido de antocianos entre la MT y la EDA por día de maceración.

Días de maceración	1	2	3	4	5	6	7	8
Antocianos MT – EDA	8	156	62	111	79	120	160	126

Cabe señalar que la bibliografía consultada establece que los mejores resultados alcanzados con la EDA respecto a la extracción de polifenoles en general, se presentan cuanto más separado permanece el sombrero del mosto y cuando la maceración es media o larga, 10 a 15 días (Di Stefano y Bosso 2002b, Bosso et al. 2002). En los presentes ensayos si bien no se efectuaron remontajes los primeros días, sí fueron realizados bazuqueos, mientras que la duración de la maceración fue de 8 días. Al mismo tiempo la formación de sombrero no fue tan evidente debido a la lenta cinética de fermentación que tuvo lugar en todos los tratamientos (figura No. 25).

Por otra parte, se ve en las curvas de antocianos que la MPF permitió extender el período en el que se incrementa el contenido de antocianos en el mosto hasta el noveno día de maceración (considerando el período de frío y el convencional) si bien la menor tasa de acumulación de en dicho período significó un valor máximo alcanzado inferior al testigo.

Cabe destacar, que la técnica definida en este trabajo como tratamiento testigo, es el resultado de sendos estudios realizados por González-Neves en años sucesivos y presentados en el 2005, sobre la adaptación de la vinificación del cultivar Tannat, en relación a sus características fenólicas. En el citado trabajo se demostró que la variedad Tannat tiene un excepcional potencial total en antocianos (ApH1) pero al mismo tiempo una extractibilidad muy inferior a la encontrada en Merlot y Cabernet Sauvignon. En consecuencia fue definida una conducción de la vinificación (duración de la maceración, frecuencia e intensidad de remontajes, etc) que buscó extraer el mayor contenido de antocianos sin aumentar excesivamente el componente tánico de las semillas. Los resultados se apreciaron en los vinos terminados ya que fue en Tannat donde el autor encontró los mayores porcentajes de antocianos de la uva en el vino. Tales resultados están de acuerdo a lo expresado por Cagnasso et al., citados por González-Neves (2005b) respecto a que el manejo de la maceración permite reducir los problemas de extractibilidad.

Si se tienen en cuenta las recomendaciones de los autores que desarrollaron la técnica para aprovechar al máximo el potencial de la EDA y las citadas características de la variedad Tannat, se puede comprender el resultado apreciado en la curva de extracción.

Bosso et al. (2004b), trabajando con uva Nebbiolo, encontraron una evolución comparable al testigo en la extracción de antocianos de la EDA. Según lo expresado precedentemente, es de esperar que tal comportamiento sea debido a las características extractivas del cultivar Nebbiolo (alta proporción de antocianos disueltos caracterizados por difundir rápidamente al mosto).

Analizando en conjunto lo anterior con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se podría determinar que la EDA, en la forma que fue conducida, no sería una técnica de buena adaptación a variedades como Tannat, que necesitan de un importante movimiento del mosto desde las primeras etapas para poder explotar su potencial polifenólico.

Sería interesante evaluar en Tannat la combinación de esta técnica con el delestaje, de forma de combinar los efectos positivos descritos en la bibliografía para ambas variantes de vinificación, y pensando en superar las aparentes restricciones de la falta de movimiento del mosto en las primeras jornadas de maceración sobre la extracción de polifenoles.

La MPF mantuvo una baja cinética de extracción durante todo el período que duró el tratamiento de frío. Si se comparan las extracciones una vez finalizado el mismo, (figura No. 27) se observa una evolución superior de la MPF respecto a la EDA, aunque estabilizándose finalmente en valores

inferiores. Si bien la MPF comenzó la etapa de manejo convencional con un contenido mayor de antocianos respecto al resto de los tratamientos (400 mg/ L vs 260 aproximadamente), la evolución de la extracción fue más lenta que en la MT y la ME. A su vez, el descenso en la tasa de extracción se dio con mayor rapidez, como también puede observarse en la cuadro No. 15.

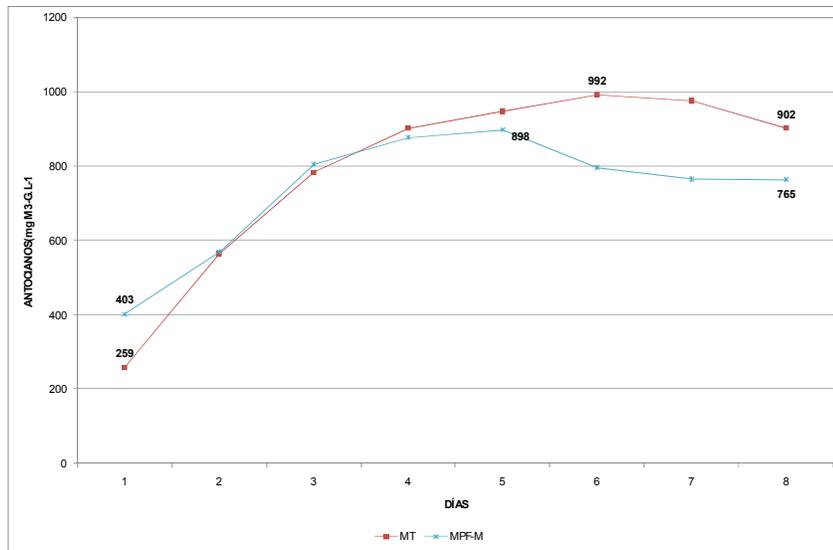


Figura 28. Perfil de extracción de antocianos de la MT y de los últimos 8 días del tratamiento MPF.

Sacchi et al. (2005) cita que durante una fermentación tradicional, el contenido de alcohol, el dióxido de carbono, al anhídrido sulfuroso, junto al calor de la fermentación, incrementan la permeabilidad de las células y las membranas facilitando la extracción de los antocianos. Por lo tanto es de esperar que durante la primera fase de la MPF, a pesar del efecto del criógeno disgregando las estructuras celulares, la falta de acción en conjunto de los elementos anteriormente considerados explique la menor tasa de difusión de los antocianos al mosto.

En la curva de maceración extendida se puede apreciar, que la tendencia observada en los dos tratamientos cuyos descubes se realizaron al octavo día, se mantuvo por dos días más. A continuación hubo una etapa, en que se redujo la velocidad del descenso de antocianos. Finalmente el contenido permaneció relativamente estable en los últimos 3 días.

En la última etapa de la curva de la MPF, tratamiento que tiene un tiempo mayor de maceración respecto al testigo (período de maceración en frío propiamente dicho), igualmente se advirtió una tendencia hacia un contenido final estable en el tiempo considerado. Sin embargo, este aparente equilibrio se obtuvo más rápido que en el caso de la ME.

Al descube el orden de los tratamientos según su contenido de antocianos fue: MT > EDA > MPF > ME. Y se puede ver en la Cuadro No. 14 que la magnitud del descenso en antocianos totales ordenó los tratamientos a la inversa. Por lo tanto, las técnicas que tuvieron los menores contenidos finales de estos compuestos fueron a su vez en los que se verificaron los mayores descensos de antocianos.

Cuadro 14. Magnitud del descenso en antocianos totales expresado en % del máximo registrado por tratamiento.

ME	MPF	EDA	MT
32.3%	17.4 %	12.5 %	10.0 %

4.4.1.2 Polifenoles totales

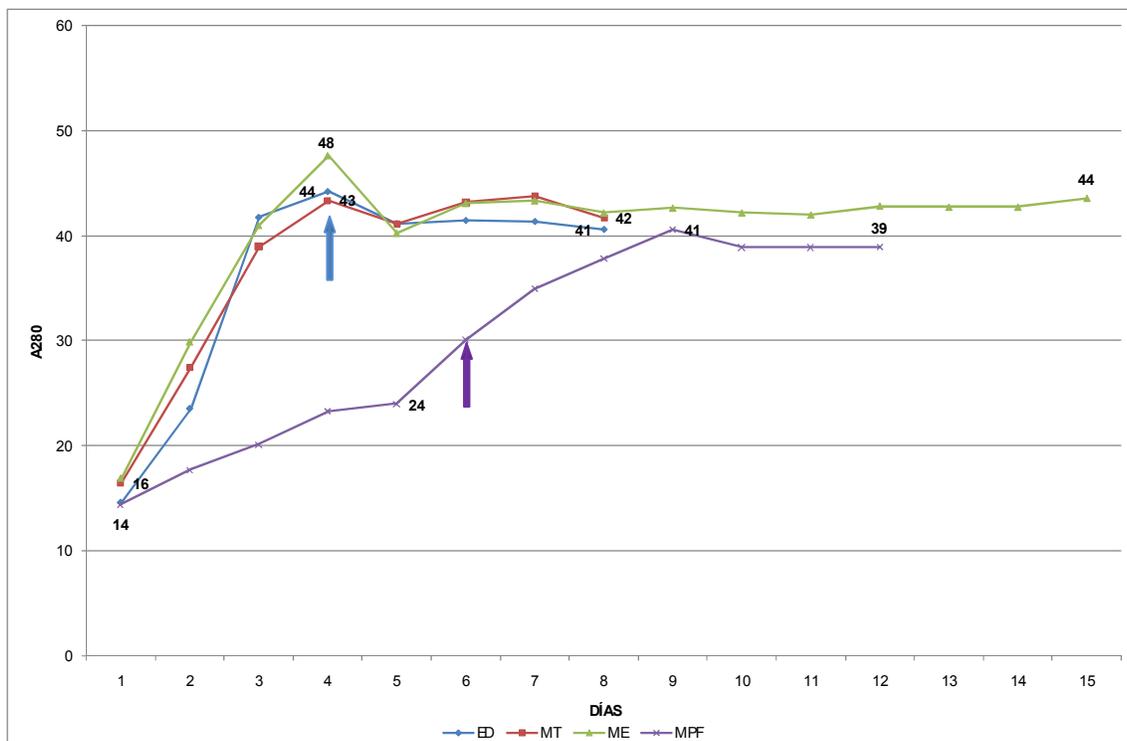


Figura 29. Evolución de la extracción de polifenoles totales según tratamiento.

En la figura No. 29 se aprecia como los contenidos fenólicos totales alcanzaron niveles máximos al cabo de pocos días, con una posterior estabilización.

El momento en que se presentaron dichos máximos están de acuerdo con los resultados presentados por González-Neves (2005b). Sin embargo, mientras que en los presentes ensayos el contenido final de polifenoles totales pareció estabilizarse, en los resultados de dos de los años presentados por el citado autor (2002 y 2003) el nivel de estos compuestos comenzó a descender luego del 4^o o 5^o día. Cabe destacar que en estos últimos, los niveles de PT fueron muy superiores a los registrados en el año del presente ensayo (entre 80 y 100 vs 40 y 45 UA aprox). En el año 2001, donde el autor encontró contenidos máximos que no llegaron a las 60 UA, la forma de la curva de extracción fue similar a la del presente trabajo.

Sacchi et al. (2005) mencionando autores que citan una evolución hacia la estabilización en el contenido de taninos al extenderse el tiempo de maceración (Watson et al. 1995, Gao et al. 1997), concluyen que su solubilidad, parece ser la limitante para una mayor extracción de estos compuestos.

En el presente trabajo se apreció que en la ME continuó la extracción de polifenoles durante todo el tiempo considerado.

Sin embargo los incrementos en los valores del I.P.T fueron poco relevantes o no se registraron a partir del 4^o día de maceración.

Es de suponer que la continuación en la extracción de taninos y catequinas, principalmente desde las semillas, sea la responsable de la estabilización del nivel de polifenoles totales en el tiempo considerado.

González-Neves (2005b) en ensayos de laboratorio estudió por separado la evolución de la extracción de polifenoles totales (A 280 nm) en hollejos y semillas durante 7 días. Sus resultados indican, que a medida que se prolonga la maceración se obtienen tenores más fuertes en taninos de semillas ya que su contenido aumentó en forma continua en el medio hasta finalizar el período de estudio. De las tres variedades evaluadas, Merlot, Cabernet Sauvignon y Tannat, ésta última fue la que mostró, tanto los mayores registros como una tendencia firme hacia continuar incrementando el contenido de tales compuestos al final del período de evaluación.

Por el contrario la evolución de los extractos de hollejos siguió una tendencia muy diferente, siendo observada una velocidad inicial de extracción de polifenoles muy superior que en las semillas. Luego de esta etapa inicial (unas 40 horas), la extracción prosiguió en forma considerablemente más lenta determinando escasos aumentos del valor A 280 o bien una tendencia hacia la estabilización en este índice.

Resultados similares fueron presentados por Amrani y Glories (1994).

De esta forma, es de esperar que los hollejos sean la principal fuente de fenoles en los primeros días de maceración, explicando la rápida acumulación de estos compuestos que se aprecia en la figura No. 29. Aún la EDA con un mosto que permaneció en relativo reposo durante el período de mayor extracción de polifenoles, expresó una importante tasa de acumulación de éstos entre el segundo y el tercer día.

Finalmente la tendencia hacia un contenido estable de polifenoles en los mostos de los tratamientos comparados, queda de manifiesto en las curvas de extracción presentadas, el modelo estadístico ajustado, así como en la cuadro No. 15.

En este último puede apreciarse que en los ensayos sin control de temperatura, hubo un descenso en el contenido de polifenoles en el quinto día de maceración para permanecer relativamente estables en adelante.

Se observa que los contenidos fenólicos totales de los mostos/vinos obtenidos con MPF tuvieron un máximo y un contenido final inferior al de los demás vinos. Estos resultados no coinciden con lo encontrado por Couasnon et al. (1999) quienes hallaron extracciones muy superiores de estos compuestos en la MPF. Sacchi et al. (2005) expone la posibilidad de que el congelamiento pueda también romper las estructuras contenedoras de taninos en las semillas, incrementando su extractibilidad y así aún más el de polifenoles totales.

También puede ser apreciado en esta tabla y en la figura No. 30 que al término del tratamiento de frío, los valores de A 280 son inferiores a los encontrados en el testigo en el segundo día de maceración. Según lo expresado por Amrani y Glories (1995), es de esperar que el contenido en polifenoles en tal caso, estuviese representado por las formas más fácilmente extraíbles (antocianos y taninos libres poco polimerizados).

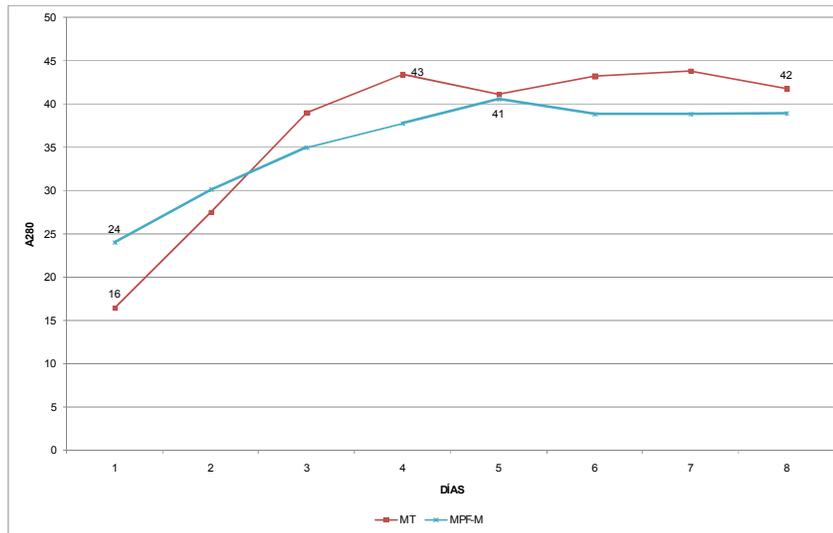


Figura 30. Perfil de extracción de polifenoles totales de la MT y de los últimos 8 días del tratamiento MPF.

Por último se observa en el análisis de las curvas que la EDA siguió más de cerca al tratamiento testigo en la extracción de polifenoles totales que en la de antocianos. Según lo conocido respecto a la evolución de la extracción de ambos componentes, podría ser esperado un comportamiento a la inversa dado el menor movimiento total de mosto en la extracción diferida. Sin embargo, cabe recordar que en general los trabajos consultados mostraron como característica asociada a este tratamiento, una mayor extracción de taninos (Bosso et al. 2002, Bosso et al. 2004ab) asignando este hecho a la mayor actividad de enzimas pectolíticas en un sombrero de hollejos que tiene menos contacto con el mosto en las primeras etapas.

En adición resulta muy interesante observar que éste índice muestra en los primeros cinco días de maceración el comportamiento deseable de encontrar en la extracción diferida, con menores contenidos al testigo inicialmente, y mayores una vez el mosto en movimiento. Sin embargo dicho tratamiento no fue capaz de mantener un mayor contenido de polifenoles en el medio al descube.

Cuadro 15. Contribución diaria en antocianos y polifenoles totales como % del máximo alcanzado por cada variable según tratamiento y días de maceración.

Días.m inc% en:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Antocianos MT (%)	26	31	22	12	5	4	2	-7							
Polifenoles MT (%)	38	25	26	10	-5	5	1	-5							
Antocianos ED (%)	29	18	36	8	9	0	-7	-5							
Polifenoles ED (%)	33	20	41	6	-7	1	0	-2							
Antocianos MPF (%)	11	15	9	5	6	19	26	8	2	-11	-3	0			
Polifenoles MPF (%)	36	8	6	8	2	15	12	7	7	-4	0	0			
Antocianos ME (%)	30	26	28	16	5	-3	-4	-5	-4	-7	0	-1	-2	-3	4
Polifenoles ME (%)	35	27	23	14	-16	6	1	-2	1	-1	0	2	0	0	2

En el cuadro anterior se presenta el incremento o descenso porcentual en antocianos y polifenoles respecto al máximo valor alcanzado por cada variable en cada tratamiento. Se presentan por día de maceración de forma de observar la importancia que tuvo cada jornada al respecto.

El cálculo se realizó de la siguiente forma:

Concentración de polifenoles o antocianos en el día X – concentración del día (X-1) *100 / concentración del día que registró el mayor valor.

En rojo se señala el aporte del día en que el máximo contenido de compuestos fue alcanzado.

Con fondo coloreado, se señalan los días en que el tratamiento considerado estuvo bajo un manejo diferencial respecto al testigo.

Las celdas con márgenes destacados, identifican el día de mayor aporte porcentual de los compuestos considerados.

Este cuadro permite resaltar claramente la importancia del primer y segundo día de maceración en la extracción, tanto de los antocianos como de

los polifenoles totales. A su vez se aprecia con mayor facilidad el efecto de la extracción diferida, donde los máximos aportes de antocianos y polifenoles totales se dieron más tarde que en el tratamiento testigo.

Luego de alcanzado el máximo (valor señalado en rojo), los días sucesivos de maceración significaron en el caso de los antocianos en general (desde este punto de vista) contribuciones negativas, que determinan el descenso observado en las curvas respectivas.

En la maceración extendida se aprecia desde otra perspectiva la citada estabilización de los contenidos de polifenoles totales durante el período post-fermentativo.

4.4.2 Representación estadística, ajuste de modelos

4.4.2.1 Antocianos

Cuadro 16. Estimación de los parámetros a, b y los intervalos de confianza, para el modelo lineal-lineal ajustado a las extracciones de antocianos.

	Parámetro	Estimación	Err Std	LI 95	LS 95	
Interceptos (a) Parte lineal 1	a1_ED	59.9	66.7	-76.8	196.7	
	a1_MT	177	57.1	59.8	294.1	
	a1_ME	38.5	66.7	-98.3	175.3	
	a1_MPF	-40.1	42.4	-127.1	47.0	
Coef regr (b) Parte lineal 1	b1_ED	193.3	24.3	143.3	243.2	a
	b1_MT	171.5	17.2	136.1	206.8	a
	b1_ME	230.7	24.3	180.8	280.7	a
	b1_MPF	109.9	8.4	92.7	127.1	b
Interceptos (a) Parte lineal 2	a2_ED	1050.8	160.5	721.4	1380.2	a
	a2_MT	1272.1	271.2	715.6	1828.6	a
	a2_ME	1089.5	54.4	977.9	1201.2	a
	a2_MPF	1258.2	257	730.8	1785.6	a
Coef regr (b) Parte lineal 2	b2_ED	-33.5	24.3	-83.5	16.4	
	b2_MT	-45.1	38.5	-124	33.9	
	b2_ME	-27.4	5.2	-38.0	-16.7	
	b2_MPF	-43.1	24.4	-93.0	6.9	

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Cuadro 17. Comparación estadística de los días al punto de corte en la extracción de antocianos según tratamiento.

Tratamiento	Puntos de corte (Días)	Comparación	Valor en punto corte	Valores aprox	
				IC días corte	
				LI 95	LS 95
a_ED	4.4	b	904.4	3.9	6.1
a_MT	5.1	b	1044.2	4.6	6.6
a_ME	4.1	b	978.0	3.7	6.1
a_MPF	8.5	a	893.0	7.9	10.0

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Para las curvas de extracción de antocianos se ajustó un modelo completo donde cada tratamiento fue lineal-lineal (primero creciente, y luego decreciente) (cuadro No. 16). En este caso, hubo 2 interceptos y 2 coeficientes de regresión lineales. Solo se pudo comparar estadísticamente la parte de crecimiento lineal y el punto de corte (día en que deja de crecer).

La parte decreciente no se pudo comparar ya que tiene un componente importante de error estándar dando intervalos de confianza muy amplios (no se pudo decir donde están las diferencias).

Los resultados mostraron que la MPF tuvo la menor tasa de extracción en la fase de crecimiento, y el punto de corte significativamente más alto. A pesar de esto último, debido a la menor extracción diaria en la fase de crecimiento lineal, la MPF fue el tratamiento con menor valor de antocianos en el punto de corte.

La ED no se diferenció respecto al testigo en los días al punto de corte. Mientas que el valor en dicho punto fue inferior al de MT pero sin diferencias significativas.

De lo anterior se extrae que la ED redujo la tasa de extracción a un punto en que no fue posible alcanzar los valores máximos obtenidos por el tratamiento testigo.

El ajuste global del modelo fue con R^2 de 86.3%

Descripción estadística

Linear – Lineal

Modelo:

Si dia < dia0 $AT_i = A1 + B1 \cdot \text{dia}_i + E_i$ Regresión lineal creciente

Si dia >= dia0 $AT_i = A2 + B2 \cdot \text{dia}_0 + E_i$ Regresión lineal decreciente

Dia 0 es el día donde se juntan los modelos

4.4.2.2 Polifenoles

Tabla 18. Estimación de los parámetros a, b y p, y los intervalos de confianza, para el modelo lineal-plato ajustado a las extracciones de polifenoles.

	Parámetro	Estimación	Err Std	LI 95	LS 95	
Interceptos Parte lineal	a_ED	-0.5	2.4	-5.3	4.4	
	a_MT	5.1	2.4	0.3	9.9	
	a_ME	5.2	2.4	0.3	10.0	
	a_MPF	10.3	1.2	7.8	12.8	
Coef regr Parte lineal	b_ED	13.6	1.1	11.3	15.8	a
	b_MT	11.3	1.1	9.0	13.5	a
	b_ME	12.1	1.1	9.8	14.3	a
	b_MPF	3.3	0.2	2.8	3.8	b
Platoo	P_ED	41.8	0.7	40.4	43.2	ab
	P_MT	42.7	0.7	41.2	44.1	a
	P_ME	42.9	0.4	42.0	43.9	a
	P_MPF	39.3	0.8	37.7	40.9	b

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Cuadro 19. Comparación estadística de los días al punto de corte en la extracción de polifenoles según tratamiento.

			Valores aprox. IC días corte
Tratamiento	Puntos de corte (Días)	Comparación	LI 95
a_ED	3.11	b	2.91
a_MT	3.33	b	3.06
a_ME	3.14	b	2.9
a_MPF	8.69	a	8.07

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Para el caso de la extracción de polifenoles totales, se ajustó un modelo lineal-plato (lineal creciente, y luego constante) (cuadro No. 18). Se estimaron los parámetros (donde “a” es el punto de corte en el eje “Y”, “b” la tasa de crecimiento y “p” el valor del plato) y el punto de corte (el día en que deja de

crecer). La comparación de parámetros se hizo por intervalos de confianza del 95%.

Se pudieron comparar el coeficiente de regresión lineal (fase de crecimiento) y el plato (la constante).

Ribéreau-Gayon y Stonestreet, citados por Vila (2005), han encontrado que la extracción de fenoles totales a lo largo del tiempo, sigue un modelo de curva logarítmica. En todo caso definen un tiempo donde la extracción es más rápida y otro muy distinto donde la misma es mucho más lenta.

Para los modelos ajustados en el presente trabajo, se apreció que la MPF presentó las mayores diferencias: la menor tasa lineal y el valor de constante mas bajo, aunque no se diferenció estadísticamente de EDA, (se consideran iguales 2 tratamientos para un parámetro, cuando ambos intervalos de confianza se tocan en algún punto). La comparación del punto de corte, muestra en este caso un límite inferior del IC, pero no uno superior. Igualmente, se ve que MPF tiene un punto de corte mucho mayor.

El ajuste global del modelo fue con R^2 de 98.12%.

Linear – Platoon

Modelo:

Si $\text{dia} < \text{dia}0$ $PT_i = a + b \cdot \text{dia}_i + E_i$

Si $\text{dia} \geq \text{dia}0$ $PT_i = a + b \cdot \text{dia}_0 + E_i$ ó $PT_i = P + E_i$, P es una constante

Dia 0 es el día donde se juntan los modelos

4.5 COMPOSICIÓN DE LOS VINOS

4.5.1 Variables de rutina

4.5.1.1 Cinéticas de fermentación y azúcares reductores residuales

Cuadro 20. Azúcares reductores residuales según tratamiento.

Tratamiento	Media (g/L)	
EDA	2.34	a
ME	2.06	b
MT	2.04	b
MPF	1.97	b

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Al analizar el resultado de azúcares reductores (cuadro No. 20) se puede apreciar que el tratamiento de EDA fue el único que permaneció con un pequeño contenido de azúcares fermentables en los vinos, diferenciándose estadísticamente del resto.

Esto podría deberse a la combinación del menor aporte de oxígeno en el mosto en los primeros días de maceración y las relativas bajas temperaturas registradas en los mostos durante el encubado (figura No. 26), ambos factores considerados por Peynaud (1977) como las principales variables que afectan el desarrollo de las levaduras y el proceso fermentativo.

Sin embargo, la bibliografía consultada muestra en general que si bien la EDA modifica la cinética de fermentación (enlenteciéndola en las primeras jornadas) (Bosso et al. 2002, 2004ab, Casassa et al. 2006) finalmente logra grados alcohólicos y densidades de fin de fermentación comparables con tratamientos testigo. De todos modos, se encuentra en algunos casos, que el contenido final de azúcares reductores fue mayor en la EDA (sin diferencias significativas respecto al testigo, Casassa et al., 2006) o que el grado alcohólico finalmente alcanzado fue levemente inferior (Bosso et al., 2004b).

4.5.1.2 Grado alcohólico

Todos los tratamientos alcanzaron grados alcohólicos acordes al potencial de la variedad Tannat y al contenido en azúcar de las uvas de partida.

Cuadro 21. Grado alcohólico de los vinos según tratamiento.

Tratamiento	Media	
EDA	13.10	a
ME	13.00	ab
MT	12.87	b
MPF	12.18	c

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Cuadro 22. Grado alcohólico de los vinos según fecha de análisis.

Análisis	Media	
3 meses	12.88	a
6 meses	12.85	a
12 meses	12.63	b

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Se pudo apreciar una clara diferencia particularmente, entre la MPF y el resto de los tratamientos. Estos resultados están de acuerdo con los análisis realizados a los mostos luego del encubado, que determinaron diferencias de partida en el grado de madurez de las uvas asignadas a la maceración prefermentativa.

Si se tiene en cuenta que las densidades de fin de fermentación de los vinos fueron comparables y que los contenidos de azúcares reductores remanentes no mostraron diferencias grandes, la composición inicial de los mostos estaría explicando los resultados encontrados.

Finalmente se apreció un leve descenso del grado alcohólico en los últimos análisis realizados (cuadro No. 22).

4.5.1.3 Acidez total

Cuadro 23. Acidez total en g H₂SO₄.L⁻¹ según tratamiento.

Tratamiento	Media	
MT	5.50	a
ME	5.16	b
MPF	5.12	b
EDA	5.03	b

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Cuadro 24. Acidez total en g H₂SO₄.L⁻¹ según fecha de análisis.

Análisis	Media	
1	5.30	a
2	5.22	ab
3	5.08	b

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Se pudo apreciar que los valores de acidez encontrados, estuvieron dentro de lo registrado previamente en otros estudios con vinos Tannat (Ferrer y González-Neves, 2001) si se tiene en cuenta la variedad, la edad de los vinos y que no se realizó fermentación maloláctica, si bien en otros casos se han registrado valores inferiores (González-Neves, 2005b presenta resultados de: 3.60, 4.24, y 3.78 g H₂SO₄.L⁻¹ para vinos Tannat en el 2001, 2002 y 2003 respectivamente, pero en tales casos se permitió que los vinos tuvieran fermentación maloláctica).

Se observó el mayor valor en el tratamiento testigo (cuadro No. 23). En la ME se cree que la mayor extracción de potasio desde los hollejos aumentó la precipitación de ácido tartárico en forma de bitartrato de potasio. Ésta también se cree fue la causa del menor valor de acidez registrado en la EDA, que puede estar indicando una mayor degradación y extracción desde los hollejos de acuerdo a lo citado en la bibliografía para esta técnica.

Mientras que en la MPF se cree que el tiempo de maceración en frío significó una pérdida de sales tartáricas al disminuir la solubilidad con la temperatura.

En el tiempo, la acidez disminuyó de forma significativa, probablemente como resultado mayoritario de la comentada precipitación del ácido tartárico.

4.5.1.4 Acidez volátil

Cuadro 25. Acidez volátil según tratamiento.

Tratamiento	Media	
MPF	0.28	a
MT	0.26	a
EDA	0.26	a
ME	0.25	a

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Cuadro 26. Acidez volátil según fecha de análisis.

Análisis	Media	
3 meses	0.26	ab
6 meses	0.24	b
12 meses	0.28	a

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Se registraron valores de acidez volátil muy bajos, inclusive en aquellos tratamientos con mayores tiempos de encubado y aún cuando se trabajó con bajas dosis de anhídrido sulfuroso.

Significa que la higiene, los procedimientos de elaboración y conservación fueron aceptables en todos los tratamientos.

Su concentración se mantuvo estable en el tiempo a pesar de los bajos niveles de SO₂ libre constatados en los análisis ,reafirmando la cita anterior.

4.5.1.5 pH

Los tratamientos con mayor y menor pH (acidez real) fueron coincidentes con los respectivos para la variable acidez total. En todos los casos los valores estuvieron dentro de lo esperado para la variedad, la edad del vino y la ausencia de fermentación maloláctica. Las diferencias entre tratamientos en cada fecha de análisis (datos no presentados) no fueron de entidad como para modificar en forma apreciable las variables relacionadas con el color.

Cuadro 27. pH de los vinos según tratamiento en el promedio de las tres fechas de análisis.

MT	MPF	ME	EDA
3.50 a	3.53 ab	3.56 b	3.57 b

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

4.5.1.6 Anhídrido sulfuroso libre y total

Cuadro 28. Anhídrido sulfuroso libre y total en mg/L de H₂SO₄ según tratamiento.

Tratamiento	SO ₂ total (mg. L ⁻¹)	SO ₂ libre (mg. L ⁻¹)
MT	50.46 a	2.78 a
ME	46.64 a	3.42 a
EDA	58.56 a	4.95 a
MPF	50.93 a	2.28 a

En todos los tratamientos los niveles de anhídrido sulfuroso total fueron muy bajos y reflejaron los niveles agregados de este compuesto en el transcurso de las vinificaciones.

Los contenidos de SO₂ libre mostraron que si bien había presencia de esta forma en el medio, sus contenidos fueron inferiores a los recomendados para un vino tinto en la etapa de conservación (aprox. 20 mg/L²).

4.5.1.7 Extracto seco

Cuadro 29. Extracto seco según tratamiento. Promedio de tres fechas de análisis.

Tratamiento	Extracto seco	
EDA	33.59	a
ME	33.52	ab
MT	32.97	bc
MPF	32.48	c

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Los valores de extracto seco estuvieron dentro de los rangos encontrados en vinos Tannat en investigaciones previas (Ferrer y González-Neves 2002, González-Neves 2005b).

Teniendo en cuenta los constituyentes de esta fracción (sustancias no volátiles: azúcares, glicerina, ácidos fijos, polifenoles, minerales, sustancias nitrogenadas), podría esperarse un mayor valor en aquellos tratamientos que permitieron una mayor extracción.

Casassa et al. (2006) encontraron en sus estudios que aquellos tratamientos que prolongaron el contacto mosto/vino con las partes sólidas, y específicamente la MPF, fueron los que dieron lugar los mayores valores de extracto seco.

En el presente trabajo, la EDA y la ME tuvieron contenidos superiores al testigo para esta variable, lo que considerado junto a lo señalado en el apartado 4.5.1.3 para los resultados de acidez total, podría estar indicando una mayor extracción en estos tratamientos. Sin embargo, la MPF tuvo un valor inferior al testigo y significativamente menor a la extracción diferida y maceración extendida. Se cree fue el resultado de la precipitación de compuestos durante la etapa de frío al disminuir la capacidad del medio de mantener sustancias en solución. No es posible separar este efecto del que podría resultar de una menor extracción.

Finalmente se puede agregar que los parámetros analíticos de rutina permitieron apreciar que los vinos a ser comparados, más allá de estar destinados a la investigación, presentaron valores analíticos que permitirían su comercialización como vinos de calidad (según decreto vigente 283/993 del INAVI). Este es un aspecto imprescindible de constatar para que tenga validez el conjunto de análisis presentados en este trabajo.

4.5.2 Análisis de las familias polifenólicas y características del color

Los valores medios de las principales familias polifenólicas así como del color y las principales variables que definen sus características, son expresados en las tablas y gráficas que se presentan.

La tabla de orden jerárquico muestra como se ordenan los tratamientos según el valor medio de la variable considerada.

Cuadro 30. Índices de composición polifenólica de los vinos. Valores medios de 3 fechas de análisis.

	MT		ME		EDA		MPF	
Polifenoles Tot.(mg.L⁻¹)	1723	a	1782	a	1683	ab	1582	b
Antocianos Tot. (mg.L⁻¹)	468	a	377	b	400	ab	362	b
Catequinas (mg.L⁻¹)	1109	b	1345	a	1163	ab	1170	ab
Proantocianidinas (mg.L⁻¹)	2429	ab	2534	a	2397	ab	2184	b

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Cuadro 31. Tratamientos ordenados según nivel de la variable considerada.

	1°	2°	3°	4°
Antocianos Tot.	MT a	EDA ab	ME b	MPF b
Polifenoles Tot.	ME a	MT a	EDA ab	MPF b
Catequinas	ME a	MPF ab	EDA ab	MT b
Proantocianidinas	ME a	MT ab	EDA ab	MPF b

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

4.5.2.1 Antocianos

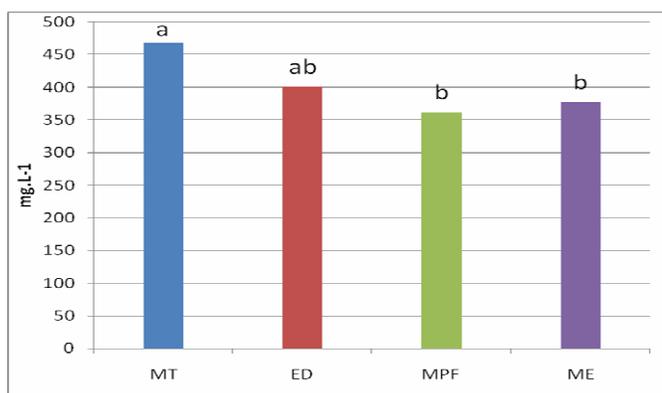


Figura 31. Contenido medio en antocianos totales de las 3 fechas de análisis.

MT fue el tratamiento que tuvo el mayor contenido de antocianos en el promedio de las tres fechas de análisis (e igualmente en cada análisis),

diferenciándose significativamente de la ME y MPF. Watson et al. (1997) al comparar diferentes tiempos de maceración (4, 8, 14, 20 días) en Pinot noir, encontraron igualmente los mayores contenidos de antocianos en la maceración de 8 días, mientras que Kelebek et al. (2005) los registraron al sexto día (3 vs 6 vs 10 días).

El orden jerárquico de los tratamientos según el promedio de los análisis realizados a los 3, 6 y 12 meses, es el mismo que en el caso del análisis de las extracciones previo al descube.

Respecto a la comparación MT-ME, estos resultados estuvieron de acuerdo a lo presentado por González-Neves et al. (2003b) quienes trabajando en similares condiciones de vinificación y al comparar maceraciones de 7 y 15 días, encontraron contenidos muy superiores de antocianos en las de 7 días.

Como fue discutido en el seguimiento de las extracciones de antocianos por tratamiento, cuando el volumen de mosto encubado es pequeño, se incrementan particularmente aquellos procesos de refijación de compuestos en los hollejos, al ser muy superior el contacto que tiene lugar en tales condiciones entre el mosto y las partes sólidas de las uvas, en comparación con un encubado industrial (miles de litros). Si bien se aplica al análisis de todos los tratamientos, será un fenómeno particularmente significativo durante el tiempo de maceración postfermentativo de la ME y para los antocianos, ya que es una etapa sin formación de sombrero y el máximo de extracción de estos compuestos se da en los primeros días de maceración.

Bosso et al. (2004a) encontraron mayores contenidos de antocianos en los vinos realizados con EDA adjudicando este hecho a la menor oxidación de estos compuestos en las primeras etapas de la vinificación. Sin embargo, la extractibilidad de estos compuestos tiene un importante componente varietal y habiéndose comprobado en Tannat la necesidad de aplicar un intenso movimiento al mosto para explotar su potencial antociánico (González-Neves, 2005b), es de esperar que el reducir el número total de remontajes haya tenido una mayor influencia en los resultados que el efecto de menor oxidación consecuencia de tal manejo.

Si se estudian los resultados por fecha de análisis (datos no presentados), puede apreciarse como disminuyó la diferencia entre los tratamientos con el paso del tiempo. Bosso et al., citados por Sacchi et al. (2005) expresaron que las diferencias en antocianos y taninos entre tratamientos disminuyen lentamente durante el añejamiento en botella.

En el presente trabajo, a los tres meses del descube, la MT se separó estadísticamente respecto a los tratamientos restantes. A los seis meses, solo frente a la MPF, para finalmente, en los vinos de un año, no mostrar diferencias significativas respecto a ningún tratamiento, si bien continúa manteniendo valores superiores en todos los casos.

Cuadro 32. Valores medios de antocianos en los vinos según fecha de análisis.

Edad del vino (meses)	3		6		12	
Antocianos Tot.	522.49	a	416.23	b	266.22	c

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

El contenido en antocianos totales desciende claramente con el paso del tiempo, como se observa en los resultados de los vinos a los 3, 6 y 12 meses. Los tres momentos se diferenciaron estadísticamente con valores de antocianos que significaron al año, aproximadamente el 50% de los registrados en el primer análisis.

Tal comportamiento es encontrado en los estudios que analizan esta variable en el tiempo y es consecuencia de las característica químicas de los antocianos, que definen su alta reactividad (Fulcrand et al., 2006). Por consiguiente el descenso observado es en parte debido a su asociación con otras moléculas (metabolitos de las levaduras, flavanos, etc) originando nuevos pigmentos y compuestos no coloreados (Cheynier et al., 2006), así como a la pérdida por oxidación e hidrólisis (Cheynier et al., 1994) y por precipitación con sales tartáricas, otros fenoles, etc.

En estudios realizados por González-Neves et al. (2003), se observó claramente ésta tendencia. Estos autores realizaron el seguimiento mensual del contenido de antocianos en el primer año de conservación de diferentes vinos tintos, mostrando un descenso importante de éstos compuestos a lo largo de todo el período considerado.

4.5.2.2 Polifenoles totales

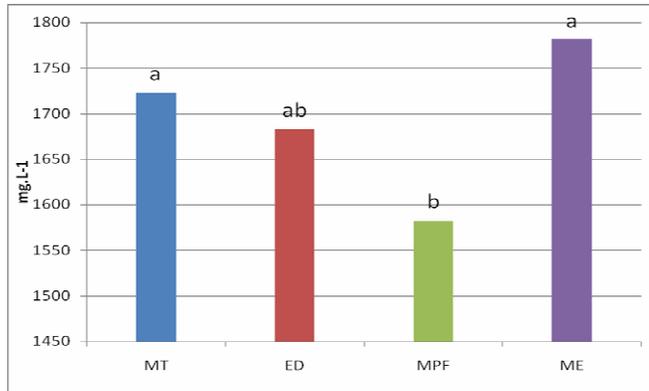


Figura 32. Contenido en polifenoles totales. Media de 3 fechas de análisis.

La ME tuvo el mayor contenido en polifenoles totales mientras que la MPF expresó los menores registros y se diferenció estadísticamente tanto de la ME como de la maceración tradicional.

La EDA solo fue superior a la MPF y puede apreciarse claramente que fue inferior al testigo si bien la diferencia no fue estadística.

La MPF y la ED dos tratamientos que se les asocia en la bibliografía con una mayor degradación de los hollejos y extracción, tuvieron sin embargo, registros de polifenoles totales inferiores al testigo.

Cuadro 33. Valores medios en polifenoles totales según fecha de análisis.

	1		2		3	
Polifenoles Tot.	1717	a	1693	a	1668	a

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Si bien no se encontraron diferencias significativas se apreció un descenso con el tiempo de esta fracción en los vinos embotellados.

4.5.2.3 Catequinas y proantocianidinas

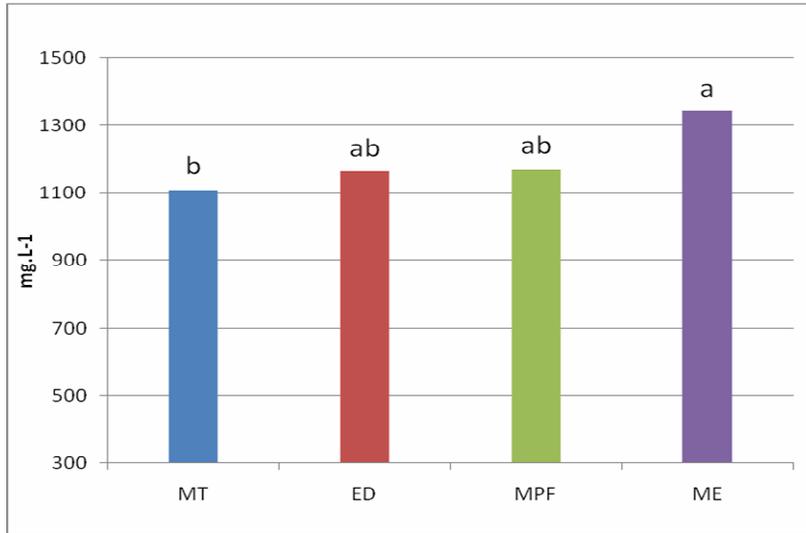


Figura 33. Contenido de catequinas según tratamiento. Media de 3 fechas de análisis.

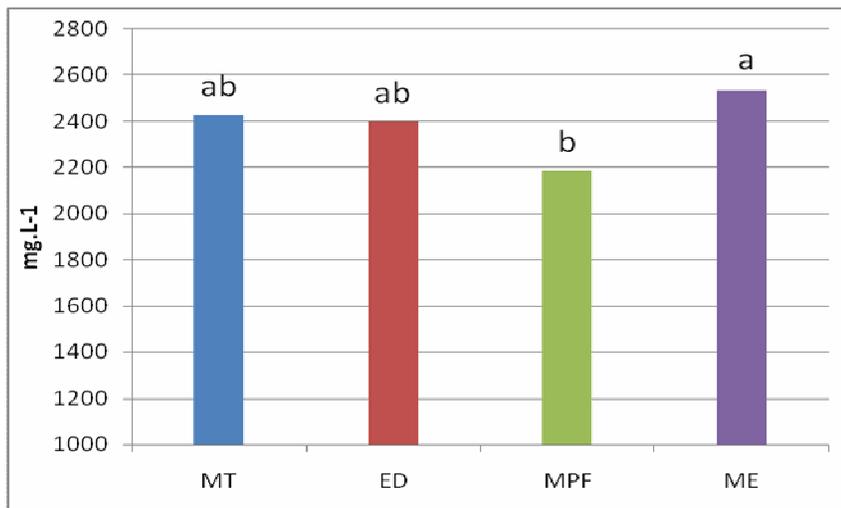


Figura 34. Contenido en proantocianidinas según tratamiento. Media de 3 fechas de análisis.

Para las variables que involucran a los taninos o sus monómeros las catequinas, la ME tuvo los mayores contenidos, si bien diferencias significativas fueron encontradas solo respecto a la MPF para las proantocianidinas y a la MT en el caso de las catequinas.

Estos resultados están de acuerdo a lo citado en la bibliografía respecto al comportamiento extractivo de estos compuestos en función de su localización y dependencia del tiempo de maceración en medio hidro-alcohólico.

Amrani y Glories (1995) expresan que los taninos por su unión con las proteínas de las membranas vacuolares y los polisacáridos de las paredes celulares son difícilmente extraíbles en ausencia de etanol, mostrando que en presencia del mismo, no solo su extracción es superior, sino que se prolonga en el tiempo y en consecuencia su contenido en el medio permanece estable por mayor tiempo. La cubierta lipídica de las semillas también necesita de un tiempo de maceración en presencia de etanol para ser disuelta y liberar su contenido. Claramente, el tiempo extra de maceración de la ME, se realiza una vez que el máximo contenido de etanol es alcanzado por el vino.

Auw et al. (1996) encontraron que los polifenoles totales, el ácido gálico, y los flavanos, todos se incrementaron al extenderse el tiempo de maceración.

En el mismo sentido Vrhovsek et al. (2002) hallaron en sus estudios un incremento continuo del contenido de proantocianidinas entre 15 y 19 días, mientras que con tiempos mayores de maceración constataron pérdidas.

Sims y Bates (1994) expresan que con tiempos mayores de contacto de los hollejos y semillas con el mosto, se obtiene generalmente un contenido fenólico superior en los vinos, explicado por la solubilización de los compuestos de más difícil extracción.

En el presente estudio, si se toman en cuenta únicamente los resultados de los análisis realizados a los tres meses del descube (datos no presentados), se aprecia que la maceración extendida fue un 18 % superior a la MT en el contenido de catequinas y un 3% en el de proantocianidinas.

González-Neves et al. (2003b) en similares condiciones de vinificación (variedad, volumen encubado, tipo de cuba, etc) si bien encontró un contenido de proantocianidinas inferior en una maceraciones de 15 días frente a un testigo de 7 días, halló tenores superiores de catequinas (16 %) en la ME.

Vrhovsek et al. (2002) llegaron a la conclusión que las semillas son las principales fuentes de catequinas, mientras que los hollejos lo son para las proantocianidinas. Igualmente encontraron que la fracción de los polifenoles que incrementó más su contenido al extenderse el tiempo de maceración fue el de las catequinas. Las proantocianidinas de mayor peso molecular, también mostraron un aumento importante en el citado estudio, superior al observado por los oligómeros (polímeros de entre 2 y 4 unidades de catequinas).

Sun et al., citados por Budic-Letó et al. (2003), igualmente expresaron que las semillas son importantes fuentes de catequinas y oligómeros de proantocianidinas, mientras que las mayores extracciones de proantocianidinas polimerizadas deben ser esperadas a partir de los hollejos.

Los resultados citados y la apreciación anterior son coherentes con los resultados de González-Neves (2005b). En ensayos de laboratorio, el citado autor estudió por separado la evolución de la extracción de polifenoles totales (A 280 nm) en hollejos y semillas durante 7 días. En sus resultados al prolongarse la maceración, se obtuvieron tenores superiores de fenoles de semillas (particularmente en Tannat), ya que sus contenidos aumentaron en forma continua en el medio hasta finalizar el período de estudio, mientras que en los hollejos la extracción fue rápida al inicio, pero se estabilizó rápidamente o sus incrementos en el tiempo fueron mucho más lentos.

Sin embargo, la MPF, tratamiento que si bien en condiciones diferentes al testigo (bajas temperaturas) tuvo un tiempo de maceración 5 días superior al mismo, mostró el menor contenido en proantocianidinas, diferenciándose estadísticamente de la ME. Y en especial, al analizar los resultados de los análisis a los vinos de tres meses se observó que a pesar de este tiempo extra de maceración, la MPF fue tan solo un 4.5 % superior al testigo en su contenido de catequinas (figuras No. 35 y 36).

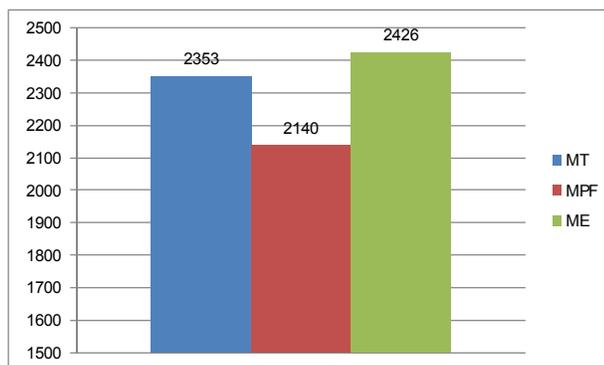


Figura 35. Comparación del contenido en proantocianidinas a los 3 meses del descube.

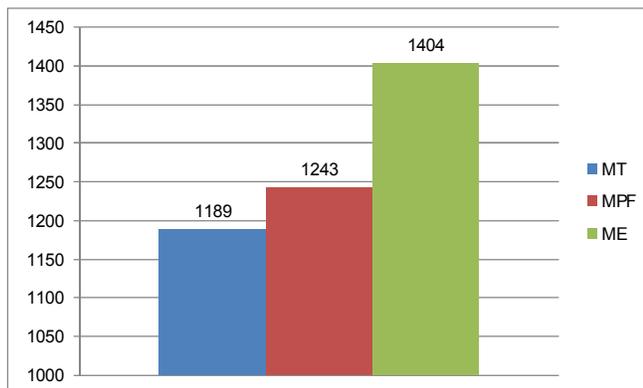


Figura 36. Comparación del contenido en catequinas a los 3 meses del descube.

Con base en estos resultados, se puede inferir que el medio en el cual se desarrolló el tiempo extra de maceración de la MPF, no favoreció significativamente la extracción de compuestos desde las semillas.

Un estudio que apoyaría esta teoría es el presentado por Cheynier et al. (2006), quienes al comparar una maceración tradicional con una postfermentativa y una prefermentativa en frío, encontraron en esta última una mayor concentración de antocianos, proantocianidinas derivadas de los hollejos y una menor concentración en derivados de las semillas, mientras que la maceración extendida resultó en un mayor contenido de taninos de semillas y menor de antocianos.

Los resultados del presente ensayo, están de acuerdo a lo encontrado por Parenti et al. (2006), quienes empleando uva Sangiovese, encontraron igualmente contenidos inferiores al testigo en proantocianidinas cuando utilizaron hielo seco como criógeno.

Sacchi et al. (2005) exponen la posibilidad de que el congelamiento pueda también romper las estructuras contenedoras de flavanos en las semillas. Si bien es muy probable que éste afecte tanto a hollejos como a semillas, los resultados presentados en este trabajo no permiten sacar conclusiones en tal sentido.

En las semillas hay una proporción mucho más alta de taninos de alta afinidad por las proteínas, y por ende astringentes (elevado índice de gelatina), que en los hollejos (Amrani y Glories, 1994). Esto determina que si su participación en el componente tánico del vino es elevada, pueda determinar propiedades sensoriales negativas.

En todo caso, será un elemento a seguir con mayor detalle en futuras investigaciones debido a que podría ser un punto muy interesante a explotar de ésta técnica, cuando se trabaje con variedades como Tannat que tienen un componente importante de taninos de semilla (González-Neves, 2005b) y su extracción pretenda ser limitada.

Respecto a la EDA, ésta tuvo valores inferiores de proantocianidinas que la MT aunque sin diferencias significativas. Esto podría deberse al menor movimiento del mosto en las primeras etapas de maceración, si bien la mayor degradación enzimática de los hollejos adjudicada a esta técnica y desarrollada en capítulos precedentes, es citada como causa de una mayor extracción de proantocianidinas (Di Stefano y Bosso, 2002b).

Catania et al. (2006) han encontrado igualmente contenidos superiores en estos compuestos en la EDA respecto a maceraciones tradicionales y otras técnicas como la MPF.

Teniendo esto en cuenta, cabe señalar que las relativas bajas temperaturas registradas en los mostos durante las vinificaciones realizadas para la presente tesis (figura No. 26), condujeron a una fermentación inicial lenta, con escasa formación de sombrero. De tal forma, no se habría aprovechado este aspecto en todo su potencial.

Otra causa del mayor contenido de flavanos encontrados por algunos autores puede estar en que el aumento en los procesos de estabilización de los antocianos asociados a la EDA, (según Bosso et al., 2004a, mejora de la relación antociano/taninos; adiciones entre antocianos y catequinas mediadas por acetaldehído) y generalmente analizados desde su influencia en la calidad del color, son asociaciones que involucran tanto a los antocianos como a los flavanos, y en consecuencia, la estabilidad de ambos tipos de moléculas se verían favorecidas.

En este sentido Singleton y Trousdale, citados por Vrhovsek et al. (2002) exponen que la polimerización de los antocianos con los taninos también es importante para el mantenimiento de estos últimos en el vino.

Pese a lo señalado para las proantocianidinas, cabe señalar que la EDA mantuvo en las tres fechas de los análisis considerados, mayores contenidos de catequinas que el tratamiento testigo, si bien las diferencias no alcanzaron a ser significativas.

En un sentido más general, cabe señalar que de por sí la velocidad de fermentación puede afectar la composición fenólica de los vinos tintos ya que

las extracciones desde los hollejos y las semillas, así como su solubilización son diferentes según el contenido alcohólico del medio (González-Neves et al., 2003b).

Al analizar la evolución de estos compuestos en el tiempo se observó (cuadro No. 34) que el contenido de catequinas no se modificó en forma importante, mientras que el de proantocianidinas aumentó significativamente.

Cuadro 34. Valores medios en catequinas y proantocianidinas según fecha de análisis.

	1		2		3	
Catequinas	1280.28	a	1100.66	b	1209.09	a
Proantocianidinas	2305.10	b	2352.22	b	2500.82	a

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Los taninos se encuentran bajo un continuo proceso de polimerización así como de división de sus unidades (Fulcrand et al., 2006).

Según estos resultados se podría decir que los procesos de polimerización predominaron frente a los de clivaje, aún en un medio que disminuyó su contenido de polifenoles totales en el tiempo.

4.5.3 Color y variables asociadas

En los siguientes cuadros se muestran los principales parámetros asociados con las características y calidad del color. Se presentan según tratamiento, según como éstos se ordenan jerárquicamente por el valor que presentaron de cada variable y según la edad del vino analizado.

Cuadro 35. Índices clásicos del color de los vinos según tratamiento. Medias de 3 fechas de análisis.

	MT	ME	EDA	MPF
IC	14.80 a	12.22 a	12.35 a	12.13 a
Tonalidad	0.67 a	0.76 a	0.78 a	0.70 a
% amarillo	10.10 a	10.30 a	10.51 a	10.41 a
% rojo	53.88 a	50.85 a	50.28 a	52.67 a
% azul	36.02 a	38.85 a	39.21 a	36.92 a

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Cuadro 36. Tratamientos ordenados según el valor que presentaron de cada variable.

	1°	2°	3°	4°
IC	<u>MT</u>	EDA	ME	MPF
Tonalidad	EDA	ME	MPF	<u>MT</u>
amarillo	EDA	MPF	ME	<u>MT</u>
rojo	<u>MT</u>	MPF	ME	EDA
azul	EDA	ME	MPF	<u>MT</u>

4.5.3.1 IC

Para la Intensidad Colorante se observó que el tratamiento testigo tuvo el mayor valor, mientras que las técnicas de ME y MPF presentaron los menores registros.

La menor IC observada en la ME podría deberse al mayor descenso en el contenido de antocianos observado en los seguimientos de las extracciones de la ME y constatado en los menores valores observados en los vinos terminados. Como fue discutido anteriormente, la ME prevé de un tiempo mayor al testigo para la refijación de antocianos en los hollejos y para la oxidación de éstos compuestos, en ausencia del continuo aporte CO₂ que se origina durante la fermentación y que contribuye a desplazar el oxígeno presente en el medio.

Entre otros autores, Bosso et al. (2004a) expresan que en sus estudios el valor de IC siguió la evolución del contenido de antocianos.

Aunque parte del descenso observado de estos compuestos es debido a la evolución de los antocianos hacia la formación de nuevos pigmentos (Cheynier et al., 2006), los resultados presentados más adelante no muestran un aumento del color estable asociado a este tratamiento.

Kelebek et al. (2005) encontraron igualmente que al extender el tiempo de maceración de 6 a 10 días disminuyó el contenido de antocianos y la IC, con un leve aumento de la tonalidad.

Vila et al. (2005) trabajando a escala industrial (20.000 litros de mosto) halló que al extenderse el tiempo de maceración de 10 a 20 días la IC disminuyó, medida en los vinos respetivos a los cuatro y nueve meses.

Canbas, Glories, citados por Kelebek et al. (2005) exponen resultados en el mismo sentido.

Otros autores sin embargo han encontrado resultados diferentes. Gómez-Plaza et al. (2001) comparando maceraciones de 4, 5 y 10 días hallaron

mayores contenidos de antocianos, IC y mejores propiedades cromáticas en general al extenderse el tiempo de maceración (trabajando con 120 litros de mosto).

En el presente trabajo la EDA tuvo un valor de IC claramente inferior al testigo. Por el contrario Bosso et al. (2004a) encontraron mejoras apreciables del color asociado a la extracción diferida, según los autores debido a un mayor contenido de antocianos totales al descube. Sin embargo en dicho trabajo la evolución de esta variable en el tiempo no mostró diferencias respecto al testigo. Inclusive el mayor contenido de taninos que registró la EDA en los ensayos de estos autores no influyó según exponen, en la estabilidad del color en el tiempo.

En el mismo sentido ensayos de Catania et al. (2006) encontraron buenos resultados tras aplicar esta técnica en la IC.

González-Neves et al. (2005b) expresan que la promoción de las condensaciones entre antocianos y flavanos va a permitir que la estabilidad del color se dé antes, haciendo que la IC permanezca en valores más elevados y se mantenga durante más tiempo en esos valores. Si bien la EDA está citada como una técnica que busca lograr lo expresado anteriormente desde etapas tempranas en la vinificación (Di-Stefano y Bosso, 2002b), no mostró en el presente trabajo mayores niveles de intensidad colorante ni como se verá más adelante, mejores resultados en cuanto al nivel de color polimérico.

Los tratamientos mostraron el mismo orden jerárquico al ordenados según sus niveles de Antocianos o valores de IC. Aunque resulta claro que son parámetros correlacionados (Bosso et al. 2004a, González-Neves 2005b, Vila et al. 2005) la IC es influida por numerosos factores (principalmente pH y contenido de SO₂ Glories 1984a, 1984b, Harbertson y Spayd 2006; fenómenos de copigmentación Boulton 2001; nuevos pigmentos derivados Cheynier 2006) que pueden llevar a que menores contenidos de antocianos expresen valores superiores de IC y viceversa.

A igualdad de pH y SO₂, variaciones en el estado de asociación en que se encuentren los antocianos, pueden modificar ampliamente la IC (Boulton, 2001). En todo caso, las variables utilizadas en el presente trabajo para describir tales fenómenos (como se verá en el apartado 4.5.4) también expresaron los mayores contenidos absolutos en el tratamiento testigo.

Cuadro 37. Valores medios de IC según fecha de análisis.

	3 meses		6 meses		12 meses	
IC	12.40	b	14.15	a	12.07	b

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Cuadro 38. Evolución de la IC en el tiempo según tratamiento.

	IC		
Análisis	3 meses	6 meses	12 meses
MT	14.70	16.12	13.59
EDA	11.80	13.68	11.56
MPF	11.70	13.31	11.39
ME	11.40	13.50	11.75

Cuando se analizó el comportamiento de la IC en el tiempo se observó que a los 6 meses se obtuvo el mayor valor, diferenciándose estadísticamente del resto (lo que se da en todos los tratamientos como se observa en el cuadro No. 38). Tal comportamiento ha sido reportado en trabajos previos de diferentes autores. González-Neves et al. (2003b) muestra que la IC bajó rápidamente en los primeros meses coincidiendo con un importante descenso de antocianos libres. Luego su valor fluctuó pero sin descensos apreciables (mientras que continuaba el descenso en el contenido de antocianos), al menos hasta el mes 11 cuando finalizó el estudio. E igualmente se aprecia en el citado trabajo que la IC a los 6 meses, fue superior casi en 2 unidades respecto a la registrada a los tres meses.

Cabe señalar que en los primeros meses luego del descube se producen un conjunto muy amplio de cambios en el medio que seguramente dificultan la identificación de los fenómenos responsables de tales observaciones (contenido de CO₂, aumento del pH, precipitación de sales tartáricas, etc).

Igualmente será interesante seguir analizando en el futuro, si este hecho se corresponde con algún fenómeno temporal de asociación de los antocianos, desde que, por ejemplo, la copigmentación ha sido señalada como un estado transitorio (Vila et al. 2005, Brouillard y Dangles, citados por Catania 2006) en la evolución de dichos pigmentos, de importante participación en el color de los vinos jóvenes, y que incrementa sensiblemente la intensidad colorante generada por los antocianos originales y es también superior, a la de sus derivados más polimerizados (Boulton, 2001).

El menor valor se presentó en la última medición, al año de realizados los ensayos, aunque con registros levemente inferiores (no significativos) a los del primer muestreo.

En el cuadro No. 38 se presenta la evolución de la IC por tratamiento en el tiempo desde que las alternativas comparadas han sido asociadas como fue mencionado con procesos de estabilización del color.

Si bien no se observaron cambios relevantes, la ME fue el único tratamiento que a los 12 meses presentó un valor superior de IC respecto a los primeros análisis. Al mismo tiempo pasó de ser la técnica con menor valor de la variable inicialmente, a estar solo por debajo del testigo en las últimas determinaciones. Este resultado podría estar reflejando una mayor estabilidad del color asociado a la mayor relación flavanos/antocianos que posee dicho tratamiento.

4.5.3.2 Tonalidad

Cuadro 39. Evolución de la tonalidad en el tiempo según tratamiento.

TONALIDAD			
Análisis	3 meses	6 meses	12 meses
MT	0.64	0.66	0.71
EDA	0.82	0.74	0.79
MPF	0.68	0.70	0.72
ME	0.74	0.76	0.80

Si bien no hubo diferencias estadísticas, los tratamientos podrían dividirse en dos subgrupos respecto a esta variable, donde la MPF y MT obtuvieron los menores registros (MT el inferior, consecuencia de haber presentado los mayores porcentajes de color rojo así como los menores de amarillo) y la ME y EDA los superiores. Ésta tendencia también fue observada al analizar individualmente cada fecha de muestreo e igualmente hallada al estudiar el % de rojo y azul de los vinos (aunque sin diferencias significativas), donde la MT y la MPF aparecieron con los mayores y menores valores respectivamente.

La EDA si bien fue el tratamiento sometido a menor movimiento del mosto durante el encubado, alcanzó los mayores registros en promedio. No obstante al analizar los resultados de cada muestreo, se observó que si bien la ME mostró los mayores valores en el segundo y tercer análisis (6 y 12 meses respectivamente), a los tres meses de finalizada la vinificación la ME presentó una tonalidad 17% mayor con respecto al tratamiento testigo, mientras que la EDA lo fue en un 30%. Esto puede ser relacionado con vinos que han sufrido una mayor evolución (Glories, 1984b).

Hubiese sido esperable encontrar los menores valores en la extracción diferida de antocianos, desde que entre sus principales objetivos está proteger al mosto de fenómenos oxidativos (Di Stefano y Bosso, 2002b).

Los valores de la Tonalidad según su forma de cálculo (abs. 420/520 nm), tendrán relación con los porcentajes de rojo y amarillo del vino.

Cuadro 40. Tonalidad e importancia relativa del color rojo, amarillo y azul de los vinos según fecha de análisis.

Análisis	Tres meses		Seis meses		Doce meses	
	Valor	Letra	Valor	Letra	Valor	Letra
Tonalidad	0.72	a	0.71	a	0.76	a
% amarillo	10.09	b	9.91	b	10.99	a
% rojo	52.35	ab	52.73	a	50.68	b
% azul	37.56	a	37.36	a	38.33	a

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Tanto para el % rojo como para el % amarillo existieron diferencias significativas cuando se estudió el efecto del tiempo sobre dichas variables.

Es así que el mayor % de rojo se registró en el promedio de los tratamientos en el segundo muestreo (cuadro No. 40). Sin embargo al observar la evolución por técnica de vinificación (datos no presentados), se constató que la EDA fue el único que mostró esta tendencia mientras los restantes tratamientos siguieron un comportamiento de acuerdo a lo esperado, disminuyendo la participación porcentual del color rojo con el tiempo.

Mientras tanto el mayor porcentaje de amarillo se registró en los últimos análisis, indicando que a pesar de tratarse de vinos jóvenes existieron signos de evolución en los mismos.

Los cambios hacia mayores valores de tonalidad son utilizados para monitorear la evolución del vino, (Glories 1984b, Harbertson et al. 2005) al aumentar el componente amarillo y reducirse el rojo a medida que éste envejece. Tal cambio es consecuencia de las reacciones de los antocianos al generar nuevos pigmentos (Somers, citado por Cheynier et al., 2006) que tienen diferentes características espectrales que los antocianos libres (Somers, citado por Harbertson y Spayd, 2006).

Kennedy et al. (2006) expresan que la absorbancia a 620 nm es apreciable en un vino joven y como resultado el color aparece rojo-azul. Con el tiempo, la absorbancia a 420 nm se incrementa mientras decrece a 520 y 620 nm, y de este modo el vino se torna rojo-naranja.

Atanasova et al. (2002a) asocian el cambio de color del rojo-azulado de los vinos jóvenes al rojo-marrón de los vinos madurados a las reacciones de los antocianos con otros compuestos, particularmente flavanos. Dado que en la bibliografía (Di Stefano y Bosso, 2002b) se menciona que la EDA sería un tratamiento que favorecería este tipo de asociaciones, resulta muy interesante apreciar, que esta variable sería la única que estaría indicando que la extracción diferida podría haber favorecido asociaciones de este tipo en el presente trabajo. Más allá que los derivados del tipo antociano-aldehído-flavano son asociados con colores púrpuras, λ 528 a 540 nm (Timberlake et al. 1976, Atanasova et al. 2002a) son asociaciones inestables que pueden conducir finalmente a otros tipos de pigmentos más complejos (Fulcrand et al., 2006).

Es ampliamente señalado que la tonalidad producida por los antocianos es dependiente del pH y que los vinos añejados generalmente tienen un pH mayor al del vino joven. En el presente trabajo, si bien el pH fue levemente superior en la EDA a los tres meses, en los siguientes análisis no mostró diferencias estadísticas frente al tratamiento testigo.

Casassa et al. (2006), relacionaron bajos valores de tonalidad con alto contenido de antocianos que a su vez expresarían altos valores de IC. Los mismos autores consideraron la posibilidad, de que parte de la explicación de altos % de amarillo en un vino, esté en el menor contenido en taninos (ya que en sus ensayos los tratamientos de bajo contenido en taninos fueron los de mayores % en amarillo y tonalidades), que habrían limitado las reacciones de asociación y estabilización de los antocianos que disminuirían la oxidación de éstos e igualmente la tonalidad.

Tal observación no está de acuerdo con las citas presentadas anteriormente. Al mismo tiempo, en el presente estudio, el tratamiento MPF si bien tuvo el menor contenido en antocianos y la menor IC, se ubicó en el rango superior respecto al % de rojo e inferior respecto a la tonalidad, a su vez fue quien tuvo los menores valores de proantocianidinas, indicando que hay otros factores que intervienen en el sistema.

Es interesante resaltar que la MPF a pesar del tiempo extra de maceración, (si bien éste se desarrolló a bajas temperaturas y no en las condiciones del testigo), tuvo valores de tonalidad cercanos a la MT coincidiendo con lo expresado por Casassa et al. (2008) acerca que la maceración prefermentaria

llevada a cabo con CO_{2(s)} genera en la etapa prefermentaria un ambiente moderadamente extractivo y a la vez, protector. En el mismo trabajo este autor halló mayores valores de tonalidad respecto al testigo cuando la MPF se llevó a cabo en cámaras de frío, si bien Casassa et al. (2006) encontraron menor tonalidad aún en tales condiciones. Otros trabajos como el de Feuillat (1997) señalan mayores tonalidades que el testigo en la maceración prefermentativa cuando no se recurre al uso de un criógeno.

4.5.4 Estudio de los componentes del color

La medición de los componentes del color requiere su desarrollo para comprender las entidades consideradas dentro de cada fracción.

Las variables [C], [A], [P] corresponden a: color debido a copigmentación, color debido a antocianos y color de pigmentos poliméricos (fracción resistente al blanqueamiento por bisulfito), los que fueron calculados utilizando la técnica de Levenson y Boulton (2004).

En este método cada muestra es ajustada a pH 3.6 para eliminar las diferencias en el color debidas al pH. La copigmentación fue medida tras comparar muestras de vino diluidas y sin dilución. Una dilución de 20 a 100 veces reduce la concentración de antocianos para la mayoría de los vinos por debajo de la mínima concentración necesaria para que se produzca copigmentación y también libera antocianos que estaban previamente decolorados debido a su unión con bisulfito. Se agrega una pequeña cantidad de acetaldehído a la muestra sin dilución. Éste reacciona rápidamente con el bisulfito y libera el bisulfito unido a los antocianos, así compensando por el segundo efecto de dilución.

Los antocianos fueron calculados al comparar la muestra diluida con una muestra sin diluir adicionada de bisulfito. Esta última se tomó como medida del color polimérico. Todas las medidas son reportadas en unidades de absorbancia.

Cuadro 41. Índices de color copigmentado, polimérico y antocianos libres según tratamiento.

	MT		ME		EDA		MPF	
[A]	4.66	a	3.75	a	3.86	a	4.01	a
[C]	2.17	a	1.32	b	1.53	ab	1.31	b
[P]	2.04	a	1.88	a	1.92	a	1.90	a

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Cuadro 42. Tratamientos ordenados según el valor que presentaron de cada variable.

		1°		2°		3°		4°
[A]	<u>MT</u>	<u>a</u>	MPF	a	EDA	a	ME	a
[C]	<u>MT</u>	<u>a</u>	EDA	ab	ME	b	MPF	b
[P]	<u>MT</u>	<u>a</u>	EDA	a	MPF	a	ME	a

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

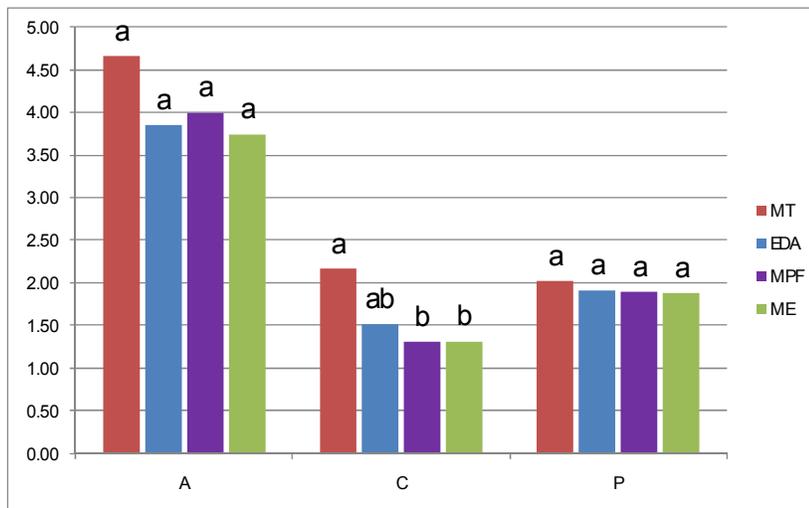


Figura 37. Valor promedio de componentes del color según tratamiento.

Respecto al color del componente A, si bien no se constataron diferencias significativas, la MT mostró el mayor valor en el promedio y en los resultados de los tres análisis en forma independiente, mientras que en la ME se registró el menor valor.

Igualmente se apreció que es el principal componente explicando el color de los vinos analizados.

Estos resultados son coincidentes con lo expresado por Versari et al. (2007) respecto a que las formas monoméricas son las responsables de la mayor parte del color rojo de los vinos jóvenes.

Para la variable C, la MT y la EDA expresaron los mayores valores diferenciándose significativamente el tratamiento testigo de la ME y MPF.

Referente a la MPF, Boulton (2001) hace mención a que si bien durante la fase prefermentaria se obtiene un alto contenido de copigmentos, en parte se pierden más tarde con el etanol generado en la fermentación.

En el presente estudio, no se realizaron mediciones de éstos parámetros durante la maceración, pero se encontró que la MPF tuvo el menor valor de C en el promedio y en las dos primeras fechas de análisis, tanto en contenido absoluto como relativo al total del color (cuadros No. 41 y 45).

Cabe investigar si el tiempo asignado a la fase prefermentativa, sería suficiente para permitir la evolución de los copigmentos formados hacia otros de mayor estabilidad, que no fuesen perturbados en igual magnitud durante la fase fermentaria. Éste no sería el caso en el presente trabajo ya que la MPF tuvo el menor valor de P en el primer análisis, a los tres meses del descube.

Versari et al. (2007) señalaron que el nivel de copigmentación, pudo ser casi completamente descrito por los niveles en pigmentos monoméricos, (con un $R^2 = 0.9464$) y no por el contenido de taninos como ha sido generalmente sugerido ($R^2 = 0.4827$). Esto podría explicar los bajos valores de C asociados en el presente trabajo a la ME.

Respecto al componente P, la MT fue una vez más, el tratamiento con los mayores registros en el promedio y en los tres momentos de análisis, si bien las diferencias no fueron estadísticas.

La ME expresó los menores valores para esta variable a pesar de haber tenido los mayores contenidos de flavanos.

Una mayor extracción de flavanos aumenta la relación flavanos/antocianos, lo que ha sido citado como un factor que incrementa los fenómenos de asociación entre ellos (Boulton 2001, Di Stefano y Bosso 2002b, Fulcrand et al. 2006).

Estudiando el componente de color polimérico, Gomez-Plaza et al. (2001) encontraron un contenido mayor luego de un año en botella en los vinos que provenían de maceraciones extendidas.

Gómez-Plaza (2002) concluye que los contenidos de pigmentos poliméricos aumentan con el tiempo de maceración asociado a una mayor extracción de flavanos.

Sacchi et al. (2005) expresan que el incremento en el contenido de taninos asociado a una maceración extendida, debería también conducir a una mayor formación de pigmentos poliméricos.

Vila et al. (2005) analizaron la variable P en vinos de nueve meses realizados con 5, 10 y 20 días de maceración. En las dos variedades estudiadas (Cabernet Sauvignon y Malbec) los autores no encontraron una asociación

clara entre la variable y el tiempo de maceración. En ambas cepas los vinos macerados 10 y 20 días tuvieron un contenido mayor de P que aquellos de 5 días. Sin embargo los vinos de 20 días de maceración mostraron valores inferiores a los de 10.

La limitante para que la ME lograra expresar un mayor contenido de color estable al blanqueamiento por bisulfito en el presente trabajo, podría estar en la menor cantidad de antocianos totales de este tratamiento respecto al testigo que fue observada en las extracciones y en los análisis realizados a los vinos.

Este último elemento ha de ser tenido en cuenta al observar los valores absolutos de los tres componentes antocínicos en todos los tratamientos comparados.

No obstante, se verá más adelante que la ME fue el método de vinificación que mostró el mayor porcentaje de su color explicado por P, factor que podría estar explicando la mejor evolución de su IC en el tiempo.

La magnitud del color rojo en los vinos es debida a diferentes factores incluyendo el tipo y concentración de antocianos, el pH, y el grado de polimerización y copigmentación (Versari et al., 2007).

Las tres alternativas a la maceración tradicional evaluadas, han sido citadas como capaces de mejorar la estabilidad de los antocianos a través de asociaciones de diferente índole.

En la EDA, debido a retardar la extracción de antocianos a un momento en que el medio tiene una mayor relación taninos/antocianos en presencia de acetaldehído. Estas condiciones son favorable para un rápido comienzo de las reacciones de condensación entre estos compuestos, con formación de pigmentos más colorantes (Bosso et al., 2004b). La formación de derivados, mediados por puente de etilo han sido citados como ser de rápida formación (Cano-López et al., 2006) y capaces de originar en sucesivas reacciones pigmentos más estables y resistentes a cambios en el medio (Cheynier et al. 2006, Fulcrand et al. 2006).

En la MPF, tal estabilidad se asociaría con una mejora en la relación entre antocianos y taninos en las etapas iniciales de la vinificación de variedades de alto potencial en antocianos pero de difícil extractibilidad (González-Neves et al., 2007) y a un aumento de la copigmentación durante la fase acuosa (Boulton, 2001). El primer elemento ha sido señalado por Fulcrand et al. (2006) como capaz de incrementar significativamente la formación de polímeros de antocianos, los que son más estables que sus precursores. Mientras que la

copigmentación se ve favorecida en ausencia de etanol, debido al debilitamiento que éste produce en las interacciones hidrofóbicas de las cuales depende su formación (Dangles y Brouillard 1992, Mirabel et al. 1999, Boulton 2001).

Finalmente para la ME el aumento en la estabilidad de los pigmentos es asociada con la mayor extracción de flavanos desde los hollejos y las semillas que incrementan los fenómenos de asociación entre estos compuestos a través del aumento de la relación flavanos/antocianos citada por Fulcrand et al. (2006) como un elemento que puede favorecer la reacción directa entre antocianos y flavanos compitiendo con la continua asociación y clivaje que sufren los taninos entre sí.

Sin embargo, al mirar los resultados obtenidos, ninguna de las alternativas comparadas con el tratamiento testigo, mostró un comportamiento superior a éste, o al menos tal comportamiento no se pudo registrar mediante el uso de las variables utilizadas.

4.5.4.1 Análisis en función del tiempo

Cuadro 43. Valores medios de los componentes del color y de los antocianos de los vinos según fecha de análisis.

	3 meses		6 meses		12 meses	
Antocianos Tot.	523	a	416	b	266	c
A	4.03	a	4.44	ab	3.74	b
C	2.39	a	1.68	b	0.68	c
P	1.80	c	1.90	b	2.11	a

Letras diferentes indican diferencias significativas. Tuckey 5%.

Al analizar el comportamiento de A, C y P en el tiempo, se observó que las tres variables sufrieron modificaciones importantes en el transcurso de los meses de evaluación.

La variable A, presentó diferencias estadísticas con el menor registro en los análisis realizados a los 12 meses de la vinificación. Al mismo tiempo resulta interesante señalar que su evolución (con un máximo en el segundo análisis) fue comparable al de la variable IC momento en que también se registro la menor tonalidad.

En referencia al componente C se apreció un descenso importante durante la guarda, al tiempo que se observó una marcada acumulación de P (figura No. 38).

La misma evolución fue observada por Casassa et al. (2006) al comparar vinos de 6 y 10 meses, mientras que Boulton (2001), Gutierrez et al., citados

por Casassa et al. (2006) observaron que la copigmentación disminuyó rápidamente en los primeros meses de añejamiento, asociando este hecho a la transformación de los antocianos en formas poliméricas.

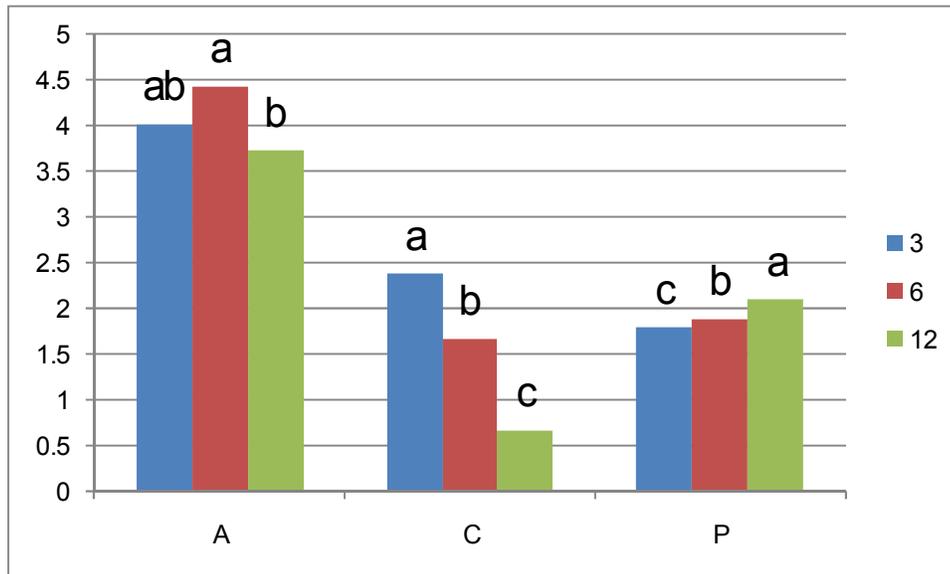


Figura 38. Evolución de los componentes del color A, C y P en función del tiempo.

Somers (1970), en su trabajo “la naturaleza polimérica de los pigmentos del vino” expresó que durante la conservación y la guarda de los vinos tintos, los antocianos de la uva, inicialmente responsables del color, son desplazados progresiva e irreversiblemente por pigmentos poliméricos más estables, lo cuales ascienden a más del 50 % de la densidad de color dentro del primer año. Así mismo exponen que estos nuevos pigmentos son mucho menos sensibles a los cambios de pH que los antocianos y son bastante resistentes a la decoloración por sulfito.

En el mismo sentido Sims y Bates (1994) encontraron mayores valores de color polimérico en el transcurso del tiempo (medido según Somers y Evans, 1977).

Ribéreau-Gayon et al., citados por Sacchi (2005) señalan que hacia el fin del primer año, de 50 a 70 % de los pigmentos habrán reaccionado para dar formas poliméricas.

Vila et al. (2005) hallaron para Cabernet Sauvignon y Merlot, un descenso en el contenido de antocianos copigmentados acompañado de un aumento proporcional en los contenidos de antocianos polimerizados ya durante la maceración. Estos autores mencionan la hipótesis que ambos fenómenos

puedan estar relacionados sin conseguir llegar a conclusiones debido al aumento del contenido de alcohol que tiene lugar en el mismo período.

Sin embargo, Boulton (2001) cita que dentro de los tenores de alcohol comúnmente encontrados en los vino, la pérdida de copigmentación debido a su presencia en el medio parecería ser de limitada importancia.

Vila et al. (2005) muestran que los vinos de nueve meses presentaban contenidos importantes de color polimérico mientras que nulos o muy bajos valores de color copigmentado.

En el presente estudio, la misma tendencia fue observada al analizar el efecto del tiempo sobre estas variables en los vinos terminados. Sin embargo como se aprecia en la figura No. 43, aún existían contenidos apreciables de C al año de finalizadas las vinificaciones. Cabe señalar que durante el período de estudio las variaciones de grado alcohólico fueron de escasa entidad.

Las últimas citas, apoyan la hipótesis que la copigmentación de los antocianos es un paso previo en su evolución hacia formas poliméricas. Brouillard y Dangles, citados por Casassa et al. (2006), postulan que la copigmentación solo es importante en el caso de los vinos jóvenes, pero representan el primer paso en la evolución de un vino hacia materia colorante estable. En tal sentido también se expresan Schwarz et al. (2005) apoyándose en sus resultados obtenidos. Igualmente dejan en claro que parte del descenso observado en la copigmentación es debido a la precipitación de la materia colorante.

4.5.4.2 Análisis del porcentaje del color debido a A, C y P según tratamiento y edad del vino

Se considera un aporte importante al estudio, analizar como estos tres componentes del color explicaron el color en cada tratamiento.

Cuadro 44. Participación porcentual de cada componentes del color según tratamiento.

	MT	ME	EDA	MPF
[A]	52.5%	54 %	52.8 %	55.5 %
[C]	24.5 %	19 %	20.9 %	18.1 %
[P]	23.0 %	27.0 %	26.3 %	26.3 %

Cuadro 45. Participación porcentual de cada componentes del color según tratamiento y edad del vino.

Edad del vino	3 meses				6 meses				12 meses			
	MT	EDA	ME	MPF	MT	EDA	ME	MPF	MT	EDA	ME	MPF
A	47.8	49.5	49.1	50.2	53.2	54.5	54.9	59.3	58.2	54.8	58.9	56.9
C	32.6	27.8	27.9	27.0	25.3	20.8	19.8	17.1	12.7	12.4	6.7	9.0
P	19.6	22.7	22.9	22.8	21.5	24.7	25.3	23.7	29.1	32.8	34.3	34.0

Cuadro 46. Evolución en el porcentaje de participación porcentual de los componentes del color con el tiempo.

Período considerado	3-6 meses				6-12 meses			
	MT	ED	ME	MPF	MT	ED	ME	MPF
A	11	10	12	18	9	1	7	-4
C	-22	-25	-29	-37	-50	-40	-66	-47
P	10	9	10	4	35	33	36	43

En el resumen de las tres fechas de análisis (cuadro No. 44), A significó el componente principal del color en todos los tratamientos.

Excepto para la MT, P fue el segundo componente en importancia explicando el color de éstos vinos, mientras que C tuvo el menor peso relativo.

Sin embargo, en el cuadro No. 45 puede ser apreciado que el aporte relativo de cada fracción al color del vino fue variable y estuvo en función de la edad de los mismos y del tratamiento considerado. Como es formulado por Boulton et al., citados por Versari et al. (2007), el color mostrado por un vino tinto continúa cambiando durante su vida y puede ser afectado por un número de prácticas de vinificación y condiciones ambientales.

A los tres meses, el componente C fue superior a P para todos los tratamientos. Esta tendencia cambió a los seis meses y se manifestó con claridad en los últimos análisis considerados.

En el cuadro No. 46 se ve la tendencia seguida por las variables, la cual explicó los resultados descritos.

A partir del cuadro No. 45 se puede resumir que en promedio para Tannat, al año del descube, el componente A del color explicó cerca del 60% del color. Al mismo tiempo se confirma la evolución de la fracción P en el tiempo (más del

30% al año) y la importancia del componente copigmentado en los primeros meses (en torno al 30% a los 3 meses).

Versari et al. (2007) analizaron 18 vinos de 11 meses y 2 vinos de 23 meses. Encontraron que el color total de los vinos fue un agregado de la suma de tres componentes: copigmentación (que varió entre 8-30%), antocianos libres (24-35%) y pigmentos poliméricos (35-63%).

Si bien se observaron diferencias en la participación relativa en el color de cada componente respecto al presente trabajo (particularmente para A), los mismos autores citan que el grado de copigmentación es particularmente dependiente del cultivar (desde que depende según Boulton (2001) en gran parte del nivel de copigmentos de la variedad) y al ser modificado su valor relativo también lo hacen las restantes fracciones.

Se observa que las tres alternativas comparadas con la MT tuvieron un mayor porcentaje de P que el testigo, siendo la ME quien presentó el mayor valor tanto en el promedio como en las tres fechas de análisis.

Resulta evidente que la variable que tuvo mayor variación en el tiempo fue C, como puede observarse en el cuadro No. 46. La misma descendió en forma importante en todos los casos al tiempo que P y A mostraron un comportamiento a la inversa.

Mientras los aumentos en los primeros 3 meses fueron comparables para A y P, los incrementos de esta última variable fue muy superiores a los de A en el segundo período considerado (cuadro No. 46). Un caso particular fue el de MPF, tratamiento que tuvo finalmente un descenso tanto a A como en C, con un aumento notable en el contenido de P. Tal aumento determinó que al año del descube la MPF se ubicase solo por detrás de la MT respecto al valor absoluto de color polimérico, aún cuando partió con contenidos de antocianos significativamente inferiores (datos no presentados).

La EDA mostró menores incrementos de la variable P que el tratamiento testigo, al tiempo que fue la técnica con menor contenido absoluto de esta variable a los 12 meses del descube (datos no presentados). Estos resultados no apoyan lo formulado en el apartado 4.4.3.2 respecto a que la mayor tonalidad encontrada en este tratamiento podría estar explicada por una mayor evolución de sus pigmentos hacia formas estables.

Se debe tener en cuenta que si bien los diferentes manejos entre tratamientos terminan al descube, las diferencias de composición transmitidas a los vinos afectan la evolución de los mismos durante la guarda. Como lo

expresan Gómez-Plaza et al. (1999) la estabilidad de un vino durante el almacenamiento depende de su composición química.

Los valores de A, C y P analizados en unidades de absorbancia (cuadro No. 41), definen los efectos de las técnicas de vinificación sobre estas variables. Tales resultados son adecuados en el análisis entre tratamientos desde que éstos determinan la composición del medio, la cual finalmente estará determinando la participación de cada uno de los componentes en el color.

Si bien las alternativas de maceración fueron más eficientes transformando las formas libres en poliméricas (cuadro No. 45), como se vio en el apartado anterior, la MT fue el tratamiento que produjo el mayor contenido de P (cuadro No. 41). Del punto de vista del producto final lo importante es el color que puede mantener un vino en el tiempo y al estar asociado éste parámetro con P lo que importa es su contenido absoluto. Al mismo tiempo la MT mantiene altos contenidos de A y C, parte de los cuales pueden contribuir a seguir incrementando el contenido de P.

Sin embargo, a partir del análisis de la participación relativa de cada fracción en el color, surge la pregunta de si podría ser esperado obtener un mayor nivel de color estable en los vinos con alguna de las técnicas alternativas, de lograr obtener con estas mejores resultados en la extracción de antocianos.

Como síntesis general de los resultados presentados, comparando los promedios de las tres fechas de análisis se observa que los vinos de la maceración tradicional alcanzaron los mayores valores de IC, % de rojo, antocianos totales, color polimérico y copigmentado. La menor tonalidad y % de amarillo (cuadros No. 35 y 41).

Al analizar estos resultados junto al de las extracciones de antocianos y polifenoles totales durante la maceración, se observa que las principales diferencias entre tratamientos encontradas al descube, fueron apreciadas en los resultados de las variables directa e indirectamente relacionadas, analizadas en los vinos en el tiempo de estudio.

Este punto es importante de señalar desde que los efectos favorables de alguna de las técnicas alternativas, podrían haber sido observados con el tiempo. Particularmente para la extracción diferida, Di Stefano y Bosso (2002b) expresan que las ventajas de aplicar esta técnica no comenzarían a manifestarse sino hasta la primavera siguiente a la vinificación.

Si bien no se desarrolló un panel de cata y un análisis estadístico de evaluación sensorial, conjuntamente con los estudios analíticos se realizó una degustación de los vinos donde la MPF destacó notoriamente por su aroma más frutado.

Este resultado está de acuerdo a lo encontrado por numerosos autores entre ellos Feuillat (1997), quien obtuvo por medio de la técnica vinos Pinot noir con menor contenido fenólico en general, pero bien valorados por su perfil más fino y de aromas más frutados.

En resumen de los ensayos realizados y más allá de los resultados puntualmente obtenidos, se cree que el haber realizado estas experiencias sienta las bases para lograr un mayor entendimiento de los efectos de las técnicas en los vinos terminados y dejan en evidencia posibilidades de mejorar el manejo de cada una de las alternativas analizadas en busca de maximizar los beneficios que éstas pueden aportar.

La falta de una respuesta unívoca a una técnica es lo comúnmente encontrado en la bibliografía. El efecto de la variedad, el terroir y la vendimia considerada, tienen una influencia muy importante sobre los resultados obtenidos. Por lo tanto es sumamente importante continuar realizando estudios que consideren estos aspectos, en años sucesivos, de forma de generar información con suficiente respaldo teórico/práctico y de aplicación local.

Finalmente en base a la experiencia realizada, y al estudio de los aspectos sobre los cuales cada una de las técnicas pretende actuar, se realizan las siguientes propuestas factibles de ser aplicadas en eventuales pruebas a nivel industrial y/o nuevos ensayos de investigación, particularmente en lo referente a la EDA y la MPF.

Para la extracción diferida, se propone que una vez formado el sombrero, se limite a mantenerlo húmedo utilizando un escaso volumen de mosto dos veces al día, en lugar de bazuqueos. Este cambio busca favorecer los procesos enzimáticos discutidos precedentemente y limitar aún más, la extracción de antocianos en las primeras etapas. Sin embargo, se deberá procurar inhibir el desarrollo microbiano en el sombrero, preferente mediante el uso de una atmósfera inertizada.

A su vez, dadas las características extractivas definidas para Tannat y la relación entre la extracción de polifenoles y el plan de remontajes empleado (González-Neves, 2005b), una vez el mosto en activa fermentación y pasado los 6 grados de alcohol, sería conveniente un mayor número de remontajes e incluso la combinación de la técnica con la practica del delestage, siempre y

cuando la capacidad de la bodega lo permita. Como fue expresado por Di Stefano y Bosso (2002b), “una vez comenzados los remontajes y hasta el fin de la fermentación el contacto del mosto con la parte sólida debe ser eficiente”. Este aspecto también atendería las consideraciones señaladas por Bosso et al. (2004b) respecto a la influencia del momento y cantidad de oxígeno aportado en el contenido de antocianos al descube e influencia en la posterior estabilidad del color. Tiene como desventaja aumentar la mano de obra durante la fermentación.

Para la MPF se considera según los resultados obtenidos y la revisión bibliográfica, que su mejor empleo sería cuando se buscan vinos jóvenes, de intenso color y aroma varietal.

En tal sentido se propone comenzar con una aplicación importante de hielo seco y posteriormente, mediante pequeños agregados, mantener el mosto entre los 10 y 15 oC.

De esta forma se pretende economizar en el empleo del criógeno utilizándolo inicialmente a mayor volumen, para afectar membranas y paredes celulares, y posteriormente en pequeñas cuotas para impedir el inicio de la fermentación, pero al mismo tiempo sin limitar excesivamente los procesos extractivos en fase acuosa. Con el mismo objetivo, se aconseja practicar intensos bazuqueos en el tiempo considerado.

Igualmente se propone acortar el tiempo de maceración a temperatura ambiente respecto al testigo, de forma de conservar los efectos de la fase prefermentaria (particularmente sobre el componente aromático) y dando lugar a una extracción de taninos que si bien permita contribuir a estabilizar la materia colorante y al perfil sensorial del vino, limite la participación de flavanos de semilla.

5 CONCLUSIONES

Las técnicas alternativas de vinificación empleadas, modificaron las extracciones de antocianos y polifenoles totales durante la maceración así como la composición de los vinos en relación al testigo.

Todos los tratamientos fueron capaces de desarrollar correctamente la fermentación de acuerdo con las densidades finales de los mostos respectivos ($\rho < 1000$).

Para las variables de rutina en los vinos, las cuatro técnicas mostraron valores que están dentro de los rangos característicos para un vino Tannat joven y ausencia de fermentación maloláctica.

La MT, con 8 días de encubado y remontajes al aire durante todo el proceso, fue la técnica con el mayor contenido de antocianos al descube.

El menor aporte de oxígeno durante las primeras jornadas de maceración en la EDA podría ser el factor que provocó que fuese el único tratamiento con un pequeño contenido de azúcares reductores residuales en los vinos (2.34 g/L, diferencias estadísticas respecto a las técnicas restantes). El menor movimiento del mosto determinó que mantuviese contenidos inferiores en antocianos que la MT, a lo largo de toda la maceración, sin embargo, difirió la extracción de polifenoles los cuales mostraron un valor máximo mayor al testigo, si bien finalizó igualmente con registros por debajo del mismo.

Por lo tanto, su principal efecto no fue el de diferir la extracción sino que el de limitarla.

Estos resultados ponen en duda la adaptación de la técnica, en la forma que fue aplicada en los presentes ensayos, a variedades como Tannat que requieren de un importante movimiento del mosto para poder explotar su potencial polifenólico.

En la MPF el agregado de $\text{CO}_{2(s)}$, determinó aportes poco significativos de antocianos y polifenoles totales al término del tratamiento de frío (inferiores a los medidos en la MT al segundo día de maceración) mientras que el efecto del hielo seco sobre los hollejos no se tradujo en una mayor extracción durante la etapa de fermentación a temperatura ambiente, siendo la técnica con menores contenidos finales para ambas variables.

En los vinos y en el promedio de las 3 fechas de análisis (3, 6 y 12 meses) la maceración tradicional con el mayor contenido en antocianos, IC, porcentaje de rojo y menor tonalidad, mostró las mejores propiedades cromáticas.

La ME determinó los mayores contenidos de polifenoles totales (3.4% > MT), proantocianidinas (4.3% > MT) y especialmente catequinas (21.4% > MT).

Sin embargo, esto no determinó finalmente un mayor valor de la variable P. Por lo tanto, el importante descenso en el contenido de antocianos que significó el tiempo extra de maceración (15% superior al registrado por el testigo) se tradujo principalmente en pérdida de color y no en la evolución de los antocianos hacia cromóforos más estables.

En la MPF se encontraron contenidos significativamente inferiores al testigo en antocianos (29%) y proantocianidinas (16 %) al tiempo que levemente mayores en catequinas (5.6%). Sin embargo sus vinos tuvieron una intensidad aromática superior al resto con notas sobresalientes a frutos rojos.

Se concluye, que el tiempo extra de maceración de la MPF (baja temperatura y medio acuoso) a diferencia del que determinó la ME, no aumentó el contenido en flavanos del vino, lo que sumado a su mejor perfil aromático permite considerarla como una alternativa interesante para producir vinos tintos jóvenes, siempre y cuando el costo del agregado de hielo seco permita su implementación.

Los vinos de la EDA aparecieron sistemáticamente inferiores al testigo tanto en la concentración de las diferentes fracciones polifenólicas (con excepción del contenido en catequinas) como en atributos de calidad relacionados al color (IC, Tonalidad, % de rojo), al tiempo que no aumentó la estabilidad del color evaluada a través de la variable P.

Los ensayos han aportado valiosa información en cuanto a la participación y evolución en el tiempo de los componentes del color A, C y P.

Mientras A mostró ser el componente de mayor importancia durante todo el tiempo de evaluación (12 meses), C tuvo una participación importante a los 3 meses del descube (explicando aproximadamente un 30% del color) descendiendo la misma con el tiempo (en el entorno del 20% del color a los 6 meses y 10% al año del descube). En tanto el componente P mostró un comportamiento claramente a la inversa de C, aumentando su participación en el color desde aproximadamente un 20 % a los 3 meses hasta un 30 % a los 12 meses.

El análisis de la participación relativa de las diferentes formas del color, mostró resultados promisorios en los tratamientos alternativos al testigo (mayor porcentaje de formas estables). Cabe seguir investigando si dichas técnicas efectivamente aumentan las fracciones estables o si éste es el resultado de la disminución del componente A.

Finalmente ninguna de las alternativas a la MT estudiadas, fue eficiente aumentando ciertos aspectos de calidad con los cuales son asociadas en la bibliografía, como ser concentración de antocianos, IC, color polimérico, color copigmentado o menor tonalidad.

Es probable que las condiciones en que se desarrolló la MT, que han sido elegidas según resultados de investigaciones previas para la vinificación de uvas Tannat (como la secuencia de remontajes y el tiempo de encubado), estén cercanas al óptimo para las condiciones de ensayo empleadas (volúmenes encubados, tipo de recipientes de maceración) y pensando en la elaboración de vinos tintos jóvenes.

Los ensayos permitieron conocer el desarrollo operativo de las alternativas evaluadas, obtener los primeros resultados de investigación nacional sobre MPF y EDA, al tiempo que aportaron elementos útiles para su futura implementación, tanto a nivel industrial como de nuevas investigaciones.

6 RESUMEN

En la vendimia 2006 se elaboraron a escala reducida vinos tintos de Tannat mediante cuatro técnicas de vinificación diferentes; la maceración tradicional que fue utilizado como tratamiento testigo, la maceración extendida, la extracción diferida de antocianos y la maceración prefermentativa en frío. En una vinificación tradicional el tiempo de maceración se corresponde aproximadamente con el de fermentación y para las condiciones de ensayo significó un período de 8 días con remontajes al aire. En la maceración extendida transcurrieron 15 días hasta la separación de los hollejos, mientras que en la extracción diferida de antocianos se procedió como en el testigo a diferencia que el inicio de los remontajes se postergó hasta que el mosto/vino alcanzó una densidad aproximada a 1050. La maceración prefermentativa en frío consistió en retardar el comienzo de la fermentación alcohólica por 5 días, manteniendo el mosto aproximadamente a 10 oC mediante la adición de hielo seco (CO_{2S}), realizando posteriormente 7 días de maceración a temperatura ambiente. Se utilizaron uvas provenientes de un viñedo comercial del sur del país. Fueron efectuadas dos vinificaciones por tratamiento, con 70 kg de uva en cada una. Se estimaron cada 24 horas los contenidos fenólicos totales y los antocianos de los mostos desde la molienda hasta el momento del descube. Los vinos fueron analizados a los 3, 6 y 12 meses de finalizada la fermentación siendo determinadas las variables de rutina, los contenidos de las principales familia fenólicas y las variables relacionadas con el color. El tratamiento testigo fue el que finalizó la maceración con el mayor contenido de antocianos mientras que la maceración extendida fue el de registro superior en polifenoles totales. Los vinos del tratamiento testigo tuvieron las mejores propiedades cromáticas (intensidad colorante, tonalidad, % de rojo) y los mayores contenidos en antocianos y componentes del color (polimérico, copigmentado y antocianos). La maceración extendida registró las mayores concentraciones de las fracciones relacionadas con los flavanos (catequinas, proantocianidinas y polifenoles totales). La extracción diferida de antocianos mostró sistemáticamente niveles inferiores al testigo de las diferentes fracciones polifenólicas a excepción de las catequinas. Respecto a los parámetros relativos a la calidad del color (IC, y % de rojo, tonalidad) la extracción diferida fue igualmente inferior al testigo. La maceración prefermentativa en frío mantuvo en el vino una menor concentración de fenoles en relación al testigo con excepción del nivel de catequinas que fue levemente superior. Igualmente mostró la menor intensidad colorante. Sin embargo fue el tratamiento mejor valorado sensorialmente a través de un aroma con destacadas notas a frutos rojos. En el estudio de la evolución de los vinos en el tiempo, se destacó el aumento del componente P del color en correspondencia con un importante descenso de la fracción C. Entre tratamientos se observó que las técnicas

alternativas a la tradicional tuvieron un % mayor del color explicado por P si bien el tratamiento testigo mantuvo un mayor contenido de esta variable y una mayor IC durante todo el período de estudio. Los ensayos aportaron importante información sobre la respuesta de Tannat al empleo de las técnicas alternativas de vinificación empleadas y sientan las bases para futuros estudios y/o aplicaciones industriales de las mismas en ésta y otras variedades.

Palabras clave: Vinos tintos; Tannat; Maceración prefermentativa en frío; Extracción diferida de antocianos; Maceración extendida; Polifenoles; Antocianos; Taninos.

7 SUMMARY

Tannat red wines were elaborated, at a reduced scale, in the vintage 2006 with four kind of vinification techniques; the traditional maceration which was taken as the control trial, the extended maceration, the delayed extraction of anthocyanin and the prefermentative cold maceration. On a traditional vinification the extent of maceration corresponds approximately to the length of fermentation which meant for the essay conditions a period of 8 days with pumping-over on air. In the extended maceration it took 15 days for skin separation, while the delayed extraction of anthocyanin was carried out like the trial control except that the beginning of pumping-over was delayed until the must/wine reached a density near 1050. The prefermentativa cold maceration consisted on delaying the setting of fermentation by 5 days, keeping de must at about 10 oC with additions of dry-ice (CO_{2s}), followed by 7 days of maceration at environmental temperature. We used grapes from a commercial vineyard of the south of Uruguay. Two vinifications by trial were carried out, using 70 kg of grape in each one. Total phenolic and anthocyanic contents of the musts were measured every 24 hours, from crushing to devatting. The wines were analyzed 3, 6 and 12 month after the end of fermentation, being determined the content of the main phenolic families and color related variables. The control trial was the one which finalized the maceration with the highest content of anthocyanins while the extended maceration was the one which had the highest phenolic richness. Control wines had the best chromatic properties (color intensity, tonality, red %) and the most important anthocyanic content and color components (polymeric, copigmented, anthocyanins). The extended maceration had the highest content of the flavanos related fractions (catechins, proanthocyanidins and phenolic richness). The delayed extraction of anthocyanins systematically showed lower levels than the control ones for the different poliphenolic fractions except for the catechines. Regarding the parameters related to color quality (IC, red %, tonality), it also showed worse properties. The prefermentative cold maceration kept in the wine a lower concentration of phenols compared to the control one, except the catechin level which was scarcely higher. It also showed the lowest color intensity. Nevertheless it was the most appreciated trial because of its intense red-fruits aroma. When the evolution of the wines through time was studied, the rise of P component of the color was brought out while the C fraction suffered an important decline. Between trials it was observed that alternatives to the traditional maceration had a higher % of color due to P nevertheless the control kept a higher quantity of this variable and a superior IC during the whole study period. This experience meant an important contribution to the knowledge of

how Tannat responds to the alternative vinifications which were tried, and it gave the bases for future studies and/or industrial applications of these techniques on Tannat and other vinestocks.

Key words: Red wines; Tannat; Prefermentative cold maceratio; Extended maceration; Delayed extraction of anthocyanins; Polyphenols; Anthocyanins; Tannins.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. ADAMS, D.O. 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 57(3): 249-256.
2. ADRIAN, M.; JEANDET, P.; BREUIL, A.; LEVITE, D.; DEBORD, S.; BESSIS, R. 2000. Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* 51 (1): 37-41.
3. ALVAREZ, I.; ALEIXANDRE, J.L.; GARCÍA, M.J.; LIZAMA, V. 2006. Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Anal. Chim. Acta.* 563: 109–115.
4. AMRANI, K.; GLORIES, Y. 1994. Étude en conditions modèles de l'extractibilité des composés phénoliques des pellicules et des pépins de raisins rouges. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 28 (4): 303-317.
5. _____; _____. 1995. Tanins et anthocyanes ; localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Rev. Franc. d'Oenol.* 153: 28-31.
6. ATANASOVA, V.; FULCRAND H.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. 2002a. Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine making. *Anal. Chim. Acta.* 458: 15-27.
7. _____; _____.; LE GUERNEVE, C.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. 2002b. Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Lett.* 43: 6151-6153.
8. AUW, J.; BLANCO, V.; O' KEEFE, S.; SIMS, C. 1996. Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin and noble wines and juices. *Am. J. Enol. Vitic.* 47 (3): 279-290.
9. BOSSO, A.; GUAITA, M.; FOLLIS, R.; DI STEFANO, R. 2002. Influenza de 6 diversi ceppi di lievito sulla composizione polifenolica di vini Barbera ottenuti con la tecnica dell'estrazione differita degli antociani. *Riv. Vitic. Enol.* 4: 25-56.

10. _____.;BORSA, D.; GUAITA,M.; DI STEFANO, R. 2003. Influence of three different techniques of red winemaking on the extraction of polyphenolic compounds. In: Symposium International d'œnologie (7ème., 2003, Bordeaux). Actualités Œnologiques. Bordeaux, TEC & DOC LAVOISIER. pp. 480-483.
11. _____.; GUAITA, M.; BALLARIO, P. 2004a. L'estrazione differita degli antociani abbinata alla tecnica del délestage nella vinificazione di uve Nebbiolo. Riv. Vitic. Enol. 1-2: 29-49.
12. _____.; _____.; M.; PANERO, L.; BORSA, D.; DI STEFANO, R. 2004b. Extraction of polyphenolic compounds and colour stabilization during ageing in different red winemaking procedures. In: Congreso Mundial de la Viña y el Vino (27o., 2004, Viena). Trabajos presentados. s.l., Office International de la Vigne et du Vin. s.p.
13. _____.; _____. 2008. Study of some factors involved in ethanal production during alcoholic fermentation. Eur. Food Res. Technol. 227 (3): 911-917.
14. BOULTON, R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine; a critical review. Am. J. Enol. Vitic. 52 (2): 67-87.
15. BROUILLARD, R.; DELAPORTE, B. 1977a. Chemistry of anthocyanin pigments. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. J. Am. Chem. Soc. 99: 8461-8468.
16. _____.; DUBOIS, J.E. 1977b. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. J. Am. Chem. Soc. 99 : 1359-1364.
17. _____.; R.; CHASSAING, S.; FOUGEROUSSE, A. 2003. Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? Phytochemistry. 64: 1179-1186.
18. BUDIC-LETO, I. ; LOURIC, T. ; VRHOVSEK, U. 2003. Influence of different maceration techniques and ageing on proanthocyanidins and anthocyanins of red wine cv. Babic (*Vitis vinifera*, L.). Food Technol. Biotechnol. 41 (4): 299–303.
19. CANO-LOPEZ, M.; PARDO- MINGUEZ, F.; LOPEZ-ROCA, J. M.; GOMEZ-PLAZA, E. 2006a. Effect of microoxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic

characteristics of red wines. *Am.J. Enol. Vitic.* 57 (2): 325 – 331.

20. CASASSA, F.; CATANIA, C. 2006. Piranoantocianos, nuevos pigmentos en los vinos tintos. *Rev. Enología* 3: 40-47.
21. _____; SARI, S.; DIAZ SAMBUEZA, M; AVAGNINA, S.; GALAT, E.; CATANIA, C. 2008. Efecto de dos variantes de maceración prefermentativa en frío (MPF) sobre la evolución cromática y organoléptica de vinos malbec. *Rev. Enología* 2: s.p.
22. CATANIA, C.; AVAGNINA, S.; SARI, S.; CASASSA, F. 2006. Influencia de distintos sistemas de maceración sobre el color, la composición polifenólica y las características organolépticas de vinos cvs. Merlot, Cabernet-Sauvignon y Sangiovese de la zona alta del Río Mendoza. Mendoza, INTA. s.p.
23. CONDE, C.; SILVA, P.; FONTES, N.; DIAS, A.; TAVARES, R.M. SOUSA, M.J.; AGASSE, A.; DELROT, S.; GERÓS, H. 2007. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food.* 1(1): 1-22.
24. COUASNON, M. (1999). Une nouvelle technique; la macération préfermentaire à froid. Extraction à la neige carbonique. 2e partie; la technologie de la neige carbonique. *Revue des Œnologues.* 93: 28-30.
25. CHEYNIER, V.; RIGAUD, J. 1986. H.P.L.C. separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *Am. J. Enol. Vitic.* 37 (4): 248-252.
26. _____; SOUQUET, J.M.; KONTEK, A.; MOUTOUNET, M. 1994. Anthocyanin degradation in oxidising grape musts. *J. Sci. Food. Agric.* 66 (3): 283-288.
27. _____; DUEÑAS-PATRON, M.; SOUQUET, M.J.; SARNI-MANCHADO, P.; FULCRAND, H. 2006. Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* 57(3): 298-305.
28. DAKORA, F. D.; PHILLIPS, D. A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient. *Plant Soil.* 245: 35-47.
29. DALLAS, C.; LAUREANO, O. 1994. Effect of SO₂ on the extraction of individual anthocyanins and colored matter of three portuguese grape varieties during winemaking. *Vitis.* 33: 41-47.

30. DANGLES, O.; BROUILLARD, R. 1992. Polyphenol interactions. The copigmentation case; thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics. Medium effect. *Can. J. Chem.* 70: 2174-2189.
31. _____; FARGEIX, G.; DUFOUR, C. 2000. Antioxidant properties of anthocyanins and tannins; a mechanistic investigation with catechin and the 3,4,7-trihydroxyflavylium ion. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*: 1653-1663.
32. DE BEER, D.; JOUBERT, E.; MARAIS, J.; MANLEY, M. 2006. Maceration before and during fermentation. Effect on Pinotage wine phenolic composition, total antioxidant capacity and objective colour parameters. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 27 (2): 137-150.
33. DELTEIL, D. 2001. Los diferentes roles del oxígeno. *Vitic. Enol. Prof.* no. 74: 35-45
34. DI STEFANO, R., CRAVERO, M. 1989. I composti fenolici e la natura del colore dei vini rossi. *L' Enotecnico.* 5: 81-87.
35. _____; BOSSO, A. 2002a. Nuove tecniche di vinificazione in rosso. *Industria delle Bevande.* 31: 357- 364.
36. _____; _____; PANERO, L.; FOLLIS, R. 2002b. Nuove tecniche di vinificazione mirate alla stabilizzazione del colore dei vini rossi. *L'Enologo.* 38: 105-112.
37. DOWNEY, M.O.; DOKOOZLIAN, N.K.; KRSTIC, P.M. 2006. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.* 57(3): 257-268.
38. ECHEVERRÍA, G. 2005. La viticultura en el Uruguay. Montevideo, Facultad de Agronomía. 80 p.
39. ESCRIBANO-BAILÓN; T.; DANGLES, O.; BROUILLARD, R. 1996. Coupling reactions between flavylium ions and catechin. *Phytochemistry* 41 (6): 1583-1592.
40. FEUILLAT, M. 1997. Vinification du Pinot noir en Bourgogne par macération préfermentaire à froid. *Revue des Oenologues.* 82: 29-31.
41. FERRER, M.; GONZÁLEZ-NEVES, G. 2002. Resultados enológicos y productivos de la aplicación de diversas alternativas de raleo

de racimos y distintas intensidades de poda invernal en *Vitis vinifera* L. cv. Tannat. *Agrociencia*. 7 (1): 53-62.

42. _____.; PEDOCCHI, R.; MICHELAZZO, M.; GONZÁLEZ NEVES, G.; CARBONNEAU, A. 2007. Delimitación y descripción de regiones vitícolas del Uruguay en base al método de clasificación climática multicriterio utilizando índices bioclimáticos adaptados a las condiciones del cultivo. *Agrociencia*. 11 (1): 47 – 56.
43. FIGUEIREDO, P.; ELHABIRI, M.; TOKI, K.; SAITO, N.; DANGLES, O.; BROUILLARD, R. 1996. New aspects of anthocyanin complexation intramolecular copigmentation as a means for colour loss. *Phytochemistry*. 41 (1): 301-308.
44. FLANZY, C. 2003. *Enología; fundamentos científicos y tecnológicos*. 2ª. ed. Madrid, Mundi-Prensa. 797 p.
45. FULCRAND, H.; DUEÑAS, M.; SALAS, E.; CHEYNIER, V. 2006. Phenolic reactions during winemaking and aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (3): 289-297.
46. GALLAR, I.; LÓPEZ, E.; NAVARRO, G.; NAVARRO, S.; VELA, N. 2006. El color de los vinos tintos de la región de Murcia. *Vitic. Enol. Prof.* no. 105: 23-30.
47. GAO, L.; GIRARD, B.; MAZZA, G.; REYNOLDS, A. 1997. Changes in anthocyanins and color characteristics of Pinot Noir wines during different vinification processes. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2003-2008.
48. GERBAUX V.; NAUDIN, R.; MEURGUES, O.; MONAMY C. 1998. Influence de different procédés de macération sur la composition phénolique, l'activité laccase et la qualité organoleptique des vins de Pinot Nor. *Rev. Franc. d'Oenol.* 166: 10-15.
49. GIL-MUÑOZ, R.; GÓMEZ-PLAZA, E.; MARTÍNEZ, A.; LÓPEZ-ROCA, J. 1999. Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation; influence of grape temperature. *J. Food Comp. Anal.* 12: 259-272.
50. GIRARD, B.; YUKSEL, D.; CLIFF, M.A.; DELAQUIS, P.; REYNOLDS, A.G.; 2001. Vinification effects on the sensory, colour and GC profiles of Pinot noir wines from British Columbia. *Food Res. Int.* 34: 483-499.

51. GLORIES, Y. 1984a. La couleur des vins rouges. 1er. Partie. Les equilibres des anthocyanes et des tannins. *Conn. Vigne Vin*. 18 (3): 195-217.
52. _____. 1984b. La couleur des vins rouges. 2e. Partie. Mesure, origine et interpretation. *Conn. Vigne Vin* 18 (4): 253-271.
53. _____.; AUGUSTIN, M. 1993. Maturité phénolique du raisin, conséquences technologiques application aux millésimes 1991 et 1992. *In: Journée Technique CIVB (1993, Bordeaux). Colloque. s.n.t. pp.56-61.*
54. _____. 1999. La maturità fenolica delle uve; primo parametro da controllare per una corretta vinificazione in rosso. *Vigne vini*. 3: 46-50.
55. GÓMEZ-MÍGUEZ, M.; GONZÁLEZ-MIRET, M.L.; HEREDIA, F.J. 2007. Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *J. Food Eng.* 79 (1): 271-278.
56. GÓMEZ-PLAZA, E.; GIL-MUÑOZ, R.; LÓPEZ-ROCA, J.; MARTÍNEZ-CUTILLAS, A.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J. 2001. Phenolic compounds and color stability of red wines; effect of skin maceration time. *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (3): 266-270.
57. _____.; _____.; _____.; _____.; _____. 2002. Maintenance of colour composition of a red wine during storage. Influence of prefermentative practices, maceration time and storage. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 35: 46-53.
58. GONZÁLEZ NEVES, G. 1999. Color y composición de vinos tintos jóvenes Tannat, Cabernet Sauvignon y Merlot de Uruguay. *Vitic. Enol. Prof.* no. 64: 43-50.
59. _____.; GIL, G.; FERRER, M. 2002. Effect of different vineyard treatments on the phenolic contents in Tannat (*Vitis vinifera* L.) grapes and their respective wines. *Food Sci. Tech. Int.* 8 (5): 315-317.
60. _____.; _____.; CARBONNEAU, A.; MOUTOUNET, M. 2003a. Adaptación de la vinificación en tinto en función del potencial polifenólico de las uvas. Experiencias realizadas en la vendimia 2001. *Agrociencia.* 7 (1): 59-67.
61. _____.; BALADO, J.; BARREIRO, L.; BOCHICCHIO, R.; GATTO, G.; GIL, G.; TESSORE, A.; FERRER, M. 2003b. Efecto de

algunas prácticas de manejo del viñedo y de la vinificación en la composición fenólica y el color de los vinos tintos. *In*: Congreso Brasileiro de Viticultura e Enologia (10º., 2003, Bentos Goncalves). Actas. s.n.t. pp. 43-54.

62. _____.; _____.; GIL, G.; FRANCO, J.; FERRER, M.; CARBONNEAU, A.; MOUTOUNET, M. 2004. Composición antociánica de uvas y vinos producidos en Uruguay con las variedades Merlot, Cabernet-Sauvignon y Tannat. *Vitic. Enol. Prof.* no. 94: 49-57.
63. _____.; BARREIRO, L.; GIL, G.; FRANCO, J.; CARBONNEAU, A.; MOUTOUNET, M. 2005a. Estudio de la composición antociánica de uvas y vinos tintos de los cv. Tannat, Cabernet-Sauvignon y Merlot; utilidad de los perfiles obtenidos para la caracterización varietal. *Bull. O.I.V.* nos. 887-888: 30-44.
64. _____. 2005b. Etude de la composition polyphénolique des raisins et des vins des cépages Merlot, Cabernet-Sauvignon et Tannat provenant de vignes conduites en lyre et en espalier dans le sud de l'Uruguay. Montpellier, Ministère de l'agriculture. Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier. p. 279
65. _____.; FERRER, M. 2005c. Evolución de los índices de estimación del potencial polifenólico durante la maduración de uvas tintas en el sur de Uruguay. *Vitic. Enol. Prof.* no. 99: 36-43.
66. _____.; FAVRE, G.; CHARAMELO, D.; BALADO, J.; BARREIRO, L.; BOCHICCHIO, R.; GATTO, G.; GIL, G.; TESSORE, A. 2007. Estudio comparativo de la extracción de polifenoles en la elaboración de vinos Tannat por técnicas alternativas. *In*: Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología (11º., 2007, Mendoza). Trabajos presentados. Mendoza, s.e. 1 disco compacto.
67. _____.; _____.; CHARAMELO, D.; BALADO, J.; BARREIRO, L.; BOCHICCHIO, R.; GATTO, G.; GIL, G.; TESSORE, A. 2008. Estudio comparado de la extracción de polifenoles en la elaboración de vinos Tannat por técnicas alternativas. *Enología.* 5 (1): 1-5.
68. GUTIÉRREZ, H.I 2007. Copigmentación y piranoantocianos; el papel de los flavonoles y los ácidos hidroxicinámicos en el color del vino tinto. *ACE Rev. Enología.* 81: sp.

69. HARBERTSON, J.F. ; KENNEDY, J.A. ; ADAMS, O. 2002. Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 54-59.
70. _____ ; PICCIOTTO, E. ; ADAMS, D. 2003. Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching. *Am. J. Enol. Vitic.* 54 (4): 3001-3006.
71. _____, J.F. ; SPAYD, S. 2006. Measuring phenolics in the winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (3): 280-288.
72. HARDIE, W.J.; T.P. O'BRIEN.; V.G.JAUDZEMS. 1996. Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape, *Vitis vinifera* L. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2: 97-142.
73. HASHIZUME, K.; SAMUTA, T. 1999. Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 194-198.
74. HRAZDINA, G. ; PARSONS, G.F. ; MATTICK, L.R. 1984. Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 35 (4): 220-227.
75. INAVI. 2008a. Exportaciones de vino mensual ; período anual 1997 – 2007. (en línea). Canelones-Uruguay. ? p. Consultado 13 set. 2008. Disponible en http://www.inavi.com.uy/sitio/home/home/index.php?menu=sub1b_1&menu2=sub2b_1&menu3=sub3b_12&t=secciones&secc=450&sub=461&sub1=461&sub2=669
76. _____. 2008b. Variedades tintas 2007. (en línea). Canelones-Uruguay. ? p. Consultado 13 set. 2008. Disponible en http://www.inavi.com.uy/sitio/home/home/index.php?Clipping=982&menu=sub1b_2&menu2=sub2b_7&menu3=sub3b_27&t=secciones&secc=451&sub=541&sub1=541&sub2=542&sub3=566
77. INIESTA ORTIZ, J.A. 2006. La microoxigenación al servicio de la enología. *Vitic. Enol. Prof.* no. 103: 35-40.
78. JEANDET, P.; BESSIS, R.; SBAGHI, M.; MEUNIER, P.; TROLLAT, P. 1995. Resveratrol content of wines of different ages; relationship with fungal diseases pressure in the vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* 46 (1): 1-4.

79. KELEBEK, H. ; CANBAS, A. ; SELLI, S. ; SAUCIER, C. ; JOURDES, M. ; GLORIES, Y. 2005. Influence of different maceration times on the anthocyanin composition of wines made from *Vitis vinifera*. L. cvs. Bogazkere and O kuzgozu. *J. Food Eng.* 77 (4): 1012-1017.
80. KENNEDY, J.A. ; HAYASAKA, Y. ; VIDAL, S. ; WATERS, E.J. ; JONES, G.P. 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.* 49 (11): 5348–5355.
81. _____.; SAUCIER, C.; GLORIES, Y. 2006. Grape and wine phenolics; history and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (3): 239-248.
82. KOES, R.E; QUATTROCCHIO, F.; MOL, J.N.M. 1994. The flavonoide biosynthetic pathway in plants; function and evolution. *BioEssays* 16: 123-132.
83. KONGA, J.M.; CHIAA, L.S.; GOHA, N.K.; CHIAA, T.F.; BROUILLARD, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry.* 64: 923–933.
84. LA ONDA® DIGITAL. 2002. El vino uruguayo llegó a la universidad; en agronomía establecieron la primera cátedra. Entrevista a la Ing. Milka Ferrer. (en línea). s.l . Consultado 31 oct. 2008. Disponible en <http://www.laondadigital.com/laonda/LaOnda/Entrevistas/Ing%20Milka%20Ferrer.htm>
85. LEA, A.G.H.; ARNOLD, G.M. 1978. The phenolics of ciders; bitterness and astringency. *J. Sci. Food Agric.* 29 (5): 478-483.
86. LLAUDY, M.C.; CANALS, R.; CABANILLAS, P.; CANALS, J.M.; ZAMORA, F. 2005. La maceración prefermentativa en frío Efectos en la extracción del color y los compuestos fenólicos, e influencia del nivel de maduración de la uva. *ACE: Rev. Enología.* 60: s.p.
87. MARAIS. J. 2003. Effect of different wine-making techniques on the composition and quality of pinotage wine. I. Low-temperature skin contact prior to fermentation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 24 (2): 70-75.
88. MIRABEL, M.; SAUCIER, C.; GUERRA, C.; GLORIES, Y. 1999. Copigmentation in model wine solutions; occurrence and relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (2): 211-218.

89. MORATA, A.; CALDERÓN, F.; GONZÁLEZ, M.C.; GÓMEZ-CORDOVÉS, M.C.; SUÁREZ, J.A. 2007. Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. *Food Chem.* 100 (3): 1144-1152.
90. NAGEL, C.; WULF, W. 1979. Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 30 (2): 111-116.
91. ORTEGA-REGULES, A.; ROMERO-CASCALES, I.; ROS-GARCÍA, J.M.; L'ÓPEZ-ROCA, J.M.; GOMEZ-PLAZA, E. 2006. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Anal. Chim. Acta.* 563: 26-32.
92. OJEDA, H.; ANDARY, C.; KRAEVA, E.; CARBONNEAU, A.; DELOIRE, A. 2002. Influence of pre-and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.* 53 (4): 261-267.
93. PARENTI, A.; GORI, C.; BLONDI BARTOLINI, A. 2006. Criomacerazione prefermentativa su uve Sangiovese; criogeni e metodiche a confronto. *Vigne Vin.* 4: 115-120.
94. PEINAUD, E. 1977. *Enología práctica, conocimiento y elaboración del vino.* Madrid, Mundi-Prensa. 416 p.
95. PEÑA-NERIA, A. s.f. *Composición fenólica de uvas y vinos. Aspectos generales.* Santiago de Chile, Universidad de Chile. GIE. sp.
96. _____. s.f. *Cambios composicionales de la baya durante el proceso de maduración y su importancia en la calidad de la uva y el vino.* Santiago de Chile, Universidad de Chile. GIE. sp.
97. _____. 2005a. En la calidad de uvas y vino los taninos y su importancia. *Vendimia.* abr.: 18-20.
98. _____. 2005b. Factores que regulan el color. I parte. *Vendimia.* dic.: 12- 14.
99. _____. 2006. El color de los vinos parte II. *Vendimia.* ene.: 24-26.
100. RIBÉREAU-GAYON, P. 1968. *Les composés phenoliques des végétaux.* Paris, Dunod. 254 p.

101. _____.; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P.; RIBÉREAU-GAYON, P. 1982. *Traité d'oenologie; science et techniques du vin*. Tome 1. Analyse et contrôle des vins. Paris, Dunod. 671 p.
102. ROMERO-CASCALES, I.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.; LÓPEZ-ROCA, J., GÓMEZ-PLAZA, E. 2005. The maceration process during winemaking extraction of anthocyanins from grape skins into wine. *Eur. Food Res. Technol.* 221: 163-167.
103. SACCHI, K.; BISSON, L.; ADAMS, D. 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 56 (3): 197-206.
104. SAUCIER, C.; LITTLE, D.; GLORIES, Y. 1997. First evidence of acetaldehyde-flavanol condensation products in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 48 (3): 370-373.
105. SCHWARZ, M.; PICAZO-BACETE, J.; WINTERHALTER, P.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. 2005. Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after addition of copigments. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8372-8381.
106. SEYMOUR, G.B.; TAYLOR, J.E.; TUCKER, G.A. 1993. *Biochemistry of fruit ripening*. London, Chapman and Hall. 454 p.
107. SIMS, C. A.; BATES, R. P. 1994. Effects of skin fermentation time on the phenols, anthocyanins, ellagic acid sediment, and sensory characteristics of a red *Vitis rotundifolia* wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45 (1): 56-62.
108. SOUQUET, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. 2000. Les proanthocyanidines du raisin. *Bulletin O.I.V.* nos. 835/836: 601-609.
109. STAFFORD, H.A. 1991. Flavonoid evolution; an enzymic approach. *Plant Physiology.* 96: 680-685.
110. TIMBERLAKE, C. BRIDLE, P. 1976. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 27 (3): 97-105.
111. TONIETTO, J. ; CARBONNEAU, A. 2004. A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide *Agric. Fort. Meto.* 124: 81-97.
112. VALLS-FONAYET, J. 2004. Composició fenòlica en varietats negres de vitis vinifera. influència de diferents factors. Tesi doctoral.

Tarragona, España. Universitat Rovira i Virgili. Departament de bioquímica i biotecnologia. Facultat d'enologia. 311 p.

113. VASSEROT, Y.; CAILLET, S.; MAUJEAN, A. 1997. Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters. *Am. J. Enol. Vitic.* 48 (4): 433-437.
114. VIDAL, S.; MEUDEC, E.; CHEYNIER, V.; SKOUROUMOUNIS, G.; HAYASAKA, Y. 2004. Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7144-7151.
115. VILA, H. 2002. Efecto del tiempo de maceración sobre el color, la composición tánica y la astringencia de vinos Cabernet Sauvignon y Malbec. Tesis Msc. Mendoza, Argentina. EEA Mendoza INTA. 62 p.
116. _____; CATANIA, C.; OJEDA, H. 2005. influencia del tiempo de maceración sobre el color, la composición tánica y la astringencia de vinos Cabernet-Sauvignon y Malbec de Argentina. *Rev. UN Cuyo. FCA.* 37 (1): 97-111.
117. VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, A.M.; TRONCOSO, M.C.; GARCÍA-PARRILLA. 2006. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chem.* 95: 394-404.
118. VRHOVSEK, U.; VANZO, A.; NEMANIC, J. 2002. Effect of red wine maceration techniques on oligomeric and polymeric proanthocyanidins in wine, cv. Blaufränkisch. *Vitis.* 41 (1): 47-51.
119. WATERHOUSE, A.L.; LAURIE, F. 2006. Oxidation of wine phenolics; a critical evaluation and hypotheses. *Am.J. Enol. Vitic.* 57 (2): 306-313.
120. WATSON, B.T.; PRICE, S.F.; VALLADAO, M. 1995. Effect of fermentation practices on anthocyanin and phenolic composition of Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 404.
121. _____; PING CHEN, H.; GOLDBERG, N.; MCDANIEL, M. 2008. Fermentation processing effects on anthocyanin and phenolic. Grape research reports 1996-97. Composition of Pinot noir wines. (en línea). Oregon, EEUU, Oregon State University. Consultado 13 set. 2008. Disponible en http://wine.oregonstate.edu/winegrape_96-97.

122. ZINNAI, A.; VENTURI, F.; CALAMITA, Y.; ANDRICH, G. 2006. La criomacerazione nella vinificazione di uve Sangiovese. In vite qualitas, in vino excellentia. Industrie Bevande. 1 (2): 63-69.