



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

*Estudio sobre la influencia de 4-etilfenol y sus
percursores, 4-vinilfenol y acido p-cumárico, en la
evolución del color de
vinos tintos*

Presentado por:

Vicente Pérez Company

Oporto febrero 2011



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

*Estudio sobre la influencia de 4-etilfenol y sus
percusores, 4-vinilfenol y acido p-cumárico, en
la evolución del color de vinos tintos*

Resumen

Es conocido los efectos negativos del *4-etilfenol* en vinos afectados por levaduras pertenecientes al género *Brettanomyces/Dekkera*. Este defecto, según ciertas concentraciones se traduce en percepciones olfativas descritas como “olor animal” o “sudor de caballo”.

La percepción olfativa de este fenol es controvertida ya que los descriptores sensoriales de tipo animal se han considerado tradicionalmente como característicos de determinados vinos de crianza en madera. En pequeñas concentraciones, contribuyen en la complejidad aromática, y en grandes concentraciones producen sensaciones desagradables.

El origen del *4-etilfenol* está relacionado con la actividad secuencial de dos enzimas, hidroxicinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa. La primera trasforma los ácidos hidroxicinámicos en hidroxiestirenos (vinifenoles) y la segunda reduce estas moléculas a etilfenoles.

En el presente trabajo se pretende estudiar los efectos del *4-etilfenol* y sus precursores *4-vinilfenol* y *ácido p cumárico* sobre el color del vino mediante el método CIELAB. Para ello se evaluó la acción de los fenoles en un periodo de 8 días. Los experimentos se realizaron en frascos esterilizados por calor (121°C, 15 min.) y las muestras fueron recogidas en condiciones asépticas para minimizar el crecimiento microbiano. Se realizaron 3 tomas de muestras Las diluyendo 5X antes de medir la absorbancia del vino utilizando un espectrofotómetro de fibras ópticas.

La adición de *4-etilfenol* tiene un efecto positivo aumentando la tonalidad. En cambio, tienen un efecto negativo disminuyendo la luminosidad. La adición de *4-vinilfenol* aumenta la luminosidad del vino, pero a su vez disminuye la tonalidad del vino. Finalmente la adición de *ácido p-cumárico* aumenta la tonalidad del vino y aumenta la luminosidad.

Índice

Capítulo I. Introducción	
1. Moléculas responsables del color del vino	2
1.1 Ácidos fenoles	2
1.2. Fenoles volátiles	3
1.2.1. Precursores del 4-etilfenol	3
1.3. Flavonoides	4
1.3.1. Flavonoles	4
1.3.2. Flavonoles y flavonas	5
1.3.3. Flavonoles	5
1.3.4. Antocianos	6
1.4. La copigmentación	7
1.5. Degradación antocianos	8
1.6. Combinaciones Antocianos-Flavonoles	9
1.7. Piranoantocianos vinilfenólicos	9
1.8. Piranoantocianos	10
1.8.1. Vitisinas	11
1.8.2. Pinotinas	12
1.8.3. Portisinas	12
2. El color del vino tinto	13
2.1. Método de medida del color del vino	15
2.1.1. Método de Glories	15
2.1.2. Método de CIE	15
2.1.3. Método de CIELAB	16
Capítulo II. Material y Métodos	
1. Vino	18
2. Reactivos	19
3. Diseño experimental	19
3.1. Preparación experimento	19
3.2. Medición de absorbancia	19
3.2.1. Espectrofotómetro	20
Capítulo III Resultados y discusión	
1. Experimento realizado con 4-etilfenol añadido al vino	22
2. Experimento realizado con 4-vinilfenol añadido al vino	25
3. Experimento realizado con ácido p-cumárico añadido al vino	28
Capítulo IV Conclusiones	31
Capítulo V Bibliografía	33

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

"Con pan y con vino se anda el camino".

Refrán popular

1. Moléculas responsables del color y su evolución

Los compuestos fenólicos, principalmente los antocianos y taninos, son los responsables del color, astringencia y estructura de los vinos, por lo que tienen una considerable incidencia en sus características organolépticas. Con el tiempo, estos compuestos experimentan importantes transformaciones que conducen a cambios notables en la composición de los vinos (Cheynier et al., 2000), por ello pueden considerarse el factor que determina su aptitud al envejecimiento.

La composición polifenólica del vino está condicionada por la calidad de la uva de partida y por el método de vinificación empleado (Auw et al., 1996). A su vez, la calidad de la uva depende de numerosos factores, entre ellos, el grado de maduración (Bautista-Ortín et al., 2004a y 2004b).

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos son caracterizados por un núcleo benzénico que contiene uno o varios grupos hidroxilos. Su clasificación está basada en la distinción entre compuestos flavonoides y ácidos fenoles. Los polifenoles incluyen también a los derivados (ésteres, metil ésteres, etc.) que resultan de las sustituciones de la estructura base. La reactividad de esta molécula es debida tanto a la presencia del fenol que, por la movilidad de su átomo de hidrogeno, presenta un carácter ácido, como al núcleo benzénico que puede sufrir sustituciones electrófilas. La uva contiene compuestos no flavonoides en la piel, pulpa, semillas y raspon. Mientras que los compuestos flavonoides se localizan principalmente en la piel, semilla y raspon. Estos últimos tienen una gran influencia en el color, sabor, cuerpo, y capacidad para la crianza.

1.1. Ácidos fenoles

Estos ácidos se pueden encontrar tanto en formas libres o esterificadas con el ácido tartárico u otros componentes del vino y carecen de color en el espectro visible. No obstante, pueden oxidarse y dar lugar al pardeamiento del mosto y del vino. Estos fenoles no afectan en importancia al color del vino aunque pueden ejercer un cierto papel como copigmentos afectando al color del vino joven mediante el fenómeno de la copigmentación.

Desde el punto de vista organoléptico no parecen tener un impacto sobre el sabor del vino. Sin embargo, su degradación da lugar a la aparición de fenoles volátiles.

Los ácidos fenoles se subdividen en ácidos benzoicos y ácidos cinámicos.

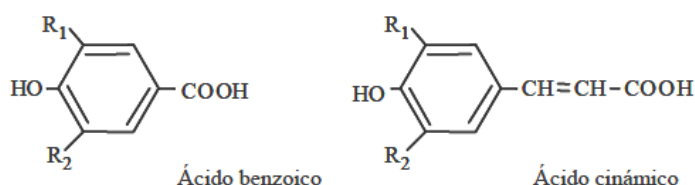


Ilustración 1: Estructura química de los ácidos fenoles (extraído Zamora, 2003).

1.2. Fenoles volátiles

Los fenoles volátiles son una amplia familia de compuestos que participa en el aroma del vino tinto. La presencia de estos fenoles en los vinos tintos se conoce desde hace más de una década (Chatonnet, 1992). Pese a ello, un gran número de vinos presentan todavía este tipo de desviación. Desde un punto de vista organoléptico, el carácter fenolado se traduce, en los casos menos graves, en una pérdida de tipicidad y de finura. Los aromas al igual que sus umbrales de percepción son variados. Así el guayacol aporta olor a tostado; el 4-metil-guayacol y el 4-etilguayacol presenta olor a madera quemada; el 4-vinilguayacol tiene un olor que recuerda al del clavel; el fenol presenta olor a tinta, el eugenol, de gran importancia organoléptica, confiere aroma a clavo de especia; el 4-vinilfenol aporta olor fenólico y farmacéutico; y finalmente el 4-etilfenol presenta un desagradable olor animal, descrito como cuero e incluso sudor a caballo. En la tabla siguiente recoge los umbrales de detención, de los principales fenoles volátiles, en vino tinto.

Fenol volátil	Umbral d detención(mgL ⁻¹)	Bibliografía
<i>guayacol</i>	0,075	(Cutzach, I. et al 1999) (Garde, T. et al 2002)
<i>4-metil-guayacol</i>	0,065	(Cutzach, I. et al 1999) (Garde, T. et al 2002)
<i>4-etilguayacol</i>	0,14 o 0,15	(Cutzach, I. et al 1999) (Garde, T. et al 2002) (Díaz-Plaza, E.M. et al 2002)
<i>4-vinilguayacol</i>	0,38	(Cutzach, I. et al 1999) (Garde, T. et al 2002)
<i>eugenol</i>	0,5	(Cutzach, I. et al 1999) (Garde, T. et al 2002)
<i>4-vinilfenol</i>	1,5	(Cutzach, I. et al 1999) (Ferreira, V., Cacho, J. 2000)
<i>4-etilfenol</i>	0,62-1,2	(Cutzach, I. et al 1999) (Garde, T. et al 2002)

Tabla 1 Umbral de detención de los fenoles volátiles

El origen de los fenoles volátiles es múltiple. Puede proceder de la uva directamente, a través de una serie de transformaciones de índole microbiológica, y del contacto del vino con la madera de roble por termólisis de las ligninas originada durante el tostado de las duelas (Chatonnet, et al 1992).

El 4-etilfenol se forma excepcionalmente durante la fermentación alcohólica produciendo una cantidad elevada y rápida de ácido acético. Un sulfitado insuficiente de la vendimia en el momento del encubado y una falta de higiene de la cuba favorecen este tipo de alteraciones (Chatonnet et al. 1993).

La aparición de etilfenoles en el trascurso de la crianza es mucho más frecuente, en particular en el caso de emplear barricas usadas. El fenómeno es favorecido por el aumento de temperatura de las bodegas y por el descenso del dióxido de azufre.

El estudio de los mecanismos de biosíntesis de los etilfenoles pone en evidencia la acción secuencial de dos enzimas, hidroxycinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa. La primera

transforma los ácidos hidroxicinámicos en hidroxiestirenos (vinifenoles) (Edlin et al, 1998) y la segunda reduce estas moléculas a etilfenoles (Días et al., 2003).

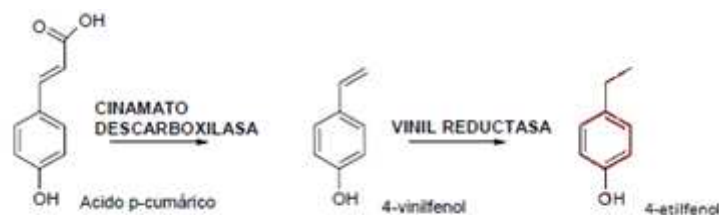


Ilustración 2: Síntesis de etilfenoles por *Brettanomyces*.

Los aislamientos de bacterias acéticas, bacterias lácticas y levaduras del género *Brettanomyces* en vino tinto, muestran que las levaduras del género *Brettanomyces* son los únicos microorganismos responsables de formar varios miligramos de etilfenoles en vino (Chatonnet et al., 1992). Aunque en la actualidad se está considerando como relevante otra molécula como el 4-etilcatecol cuyo precursor el ácido cafeico se encuentra en cantidades elevadas en algunas variedades de uva tinta como la Pinotage (Morata et al., 2006).

1.2.1. Precursores del 4-etilfenol

El ácido p-cumárico es un polifenol natural de los vinos, de la familia de los ácidos hidroxicinámicos. El proceso de maceración provoca la extracción de este ácido en el mosto a unas concentraciones medias de 60 mg/L (Chatonnet, P. et al., 1997). Tras la fermentación y el proceso de elaboración del vino, la concentración de ácido p-cumárico no suele superar los 8 mg/L (Golberg, D.M. et al., 1998). Puede encontrarse en forma libre, o combinado con otros componentes del vino como por ejemplo el ácido tartárico o con la glucosa. La actividad esterasa de las enzimas del vino libera este ácido.

El 4-vinifenol es un fenol volátil obtenido por descarboxilación de las formas libres del ácido p-cumárico debido a la acción de la enzima cinamato descarboxilasa

1.3. Los flavonoides

Los flavonoides están caracterizados por un esqueleto de base de 15 átomos de carbono (C6-C3-C6) de tipo 2- fenil benzopirona. Este gran grupo se divide en cuatro grandes familias que se distinguen por el grado de oxidación de su núcleo pirano: Los flavonoles, los flavanoles y flavonas, los flavanoles que incluyen a los taninos condensados o procianidinas.

1.3.1 Los flavonoles

Los flavonoles son los responsables del color amarillo de la piel de las uvas blancas. Se localizan en los hollejos de la uva. Los flavonoles pueden encontrarse en forma aglicona o heterósido. Su participación en el color del vino tinto es de poca importancia, si bien, influye en pequeña parte a su componente amarilla.

Los principales flavonoles que se encuentran en el vino son: kaempferol (R1=H, R2=H), Quercitina (R1=OH, R2=H), Miricetina (R1=OH, R2=OH) y Isoramnetina (R1=OCH₃, R2=H)

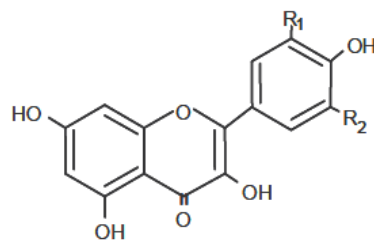


Ilustración 3: Estructura química de los flavonoles (extraído Zamora, 2003)

1.3.2. Los flavanonoles y las flavonas

Los flavanonoles y las flavonas son compuestos que presentan una estructura muy similar a la de los flavonoles. La diferencia radica en que no poseen el doble enlace del heterociclo.

1.3.3. Los flavanoles

Los flavanoles representan una compleja familia compuesta por las diferentes formas isoméricas de la catequina y sus polímeros. Estos compuestos son los responsables del sabor amargo y de la astringencia del vino, pero también de parte de la componente amarilla del color del vino, de la sensación de estructura o cuerpo del vino y de la capacidad del vino para envejecer.

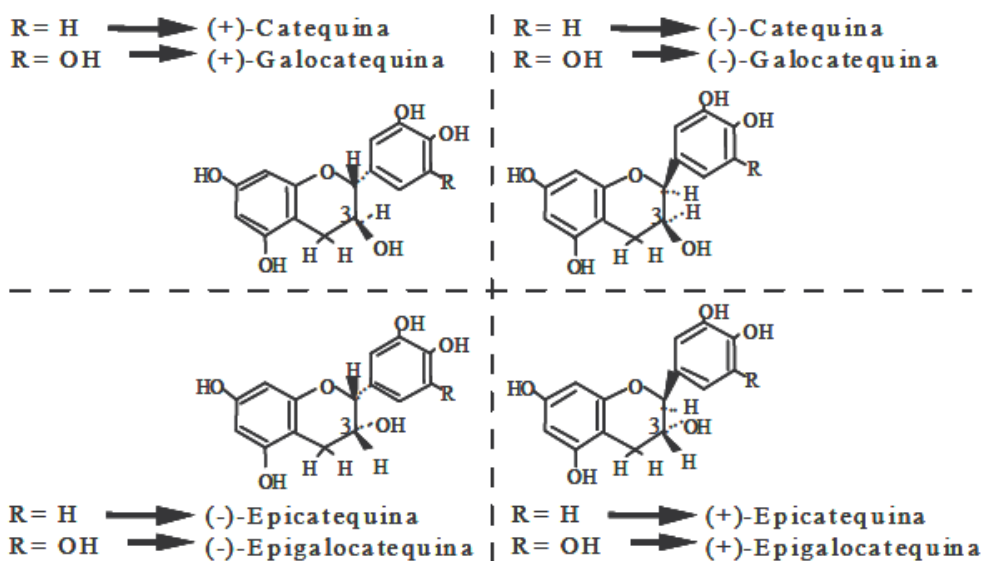


Ilustración 4: Estructura química de los monómeros de flavanol (extraído Zamora, 2003)

Los flavanoles están presentes en la uva en estado de monómeros (catequina) y bajo formas más o menos polimerizadas, los taninos condensados. La estructura básica de la catequina presenta 2 carbonos asimétricos por lo que existen 4 isómeros: (+)/(-) catequina y epicatequina. Además el anillo aromático externo puede presentar un tercer grupo OH, dando lugar a las correspondientes (+)/(-) galocatequina y epigallocatequina. Por otra parte el grupo OH en posición 3 del heterociclo puede estar esterificado con una molécula de ácido gálico dando lugar a los 3 galatos de (+)/(-) (galo) catequina y epi (galo) catequina.

En la uva los flavanoles aparecen en una pequeña proporción, ya que la mayor parte están en formas de polímeros.

Los flavanoles polimerizados reciben el nombre de taninos condensados y corresponden a cadenas de diferente número de unidades de los diversos flavanoles monómeros mediante enlaces C₄-C₈ o C₄-C₆.

Los taninos condensados también se les denominan procianidinas, debido a que en medio fuertemente ácido por hidrólisis dan lugar a cianidina. Pero si el polímero está formado por unidades de galocatequina y/o epigalocatequina se obtendría por hidrólisis ácida delphinidina, por lo que este tipo de taninos son conocidos como prodelfinidinas. Para simplificar la nomenclatura, a los taninos condensados tanto las prodelfinidinas como las procianidinas se les conoce como procianidinas indistintamente.

1.3.4. Los Antocianos

Los Antocianos (del griego *anthos* Flor y *kyanos* azul) son los responsables del color rojo azulado de la piel de las uvas tintas y naturalmente del color del vino tinto.

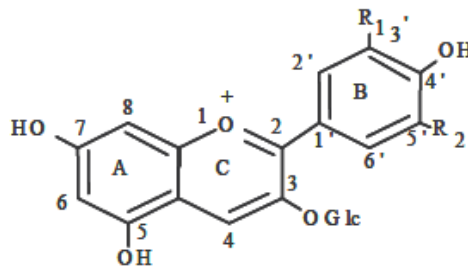


Ilustración 5: Estructura química básica de un antociano (extraído Zamora, 2003)

Los antocianos se diferencian por sus niveles de hidroxilación y de metilación, por la naturaleza, el número y la posición de las osas unidas a la molécula y también por la naturaleza y el número de ácidos que esterifican los azúcares. Se distinguen en la uva y en el vino, según los sustituyentes de R1 y R2, la estructura de los diferentes antocianos: Cianidina (R1=OH, R2=H), Peonidina (R1=OCH₃, R2=H), Delfinidina (R1=OH; R2=OH), Petunidina (R1=OCH₃, R2=OH) y Malvidina (R1=OCH₃, R2=OCH₃). Todas estas moléculas se encuentran en el género *Vitis*.

Los antocianos se localizan en los hollejos, si bien en las variedades tintoreras también están presentes en la pulpa. En *Vitis vinífera* únicamente encontramos en forma de monoglucósidos en posición 3. La glucosa puede estar esterificada en posición 6 con diferentes ácidos, principalmente acético, *p-cumárico*, y *caféico*.

Los antocianos presentan un equilibrio en función del pH entre formas químicas diferentes lo que condiciona su color.

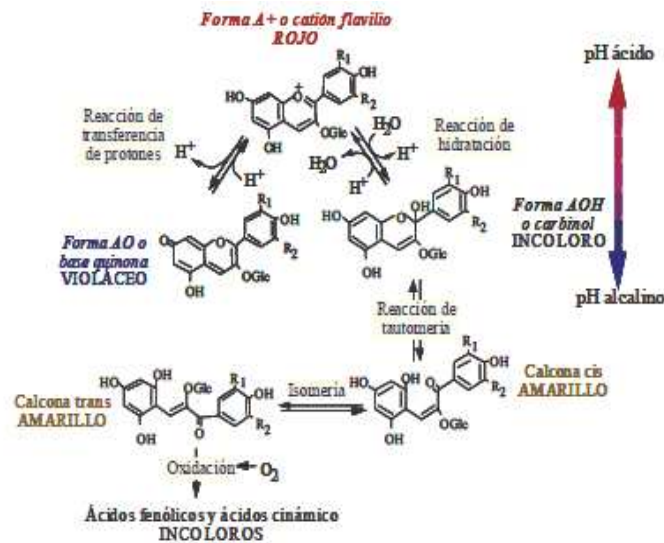


Ilustración 6: Equilibrio de los antocianos en función del pH (extraído Zamora, 2003)

A pH muy ácido la forma mayoritaria es catión flavilio o forma A⁺ presentando una coloración roja. Cuando el pH aumenta, la forma A⁺ se transforma en la base quinona o forma AO de color violáceo y en la forma AOH o carbinol que es incolora. Ambas reacciones tienen lugar simultáneamente de acuerdo con sus constantes de equilibrio. Por otra parte, la forma AOH puede transformarse en las calconas *cis* y *trans*, debido a temperaturas elevadas, presentando un ligero color amarillo. La forma *trans* puede oxidarse dando lugar a ácidos fenólicos produciendo la pérdida irreversible del color del vino.

Al pH del vino podemos considerar que existe un equilibrio entre las formas roja, azul, e incolora. Si bien cuando sea muy ácida su coloración será más intensa y predominarán las tonalidades rojas, mientras que cuando sea menos ácido, el color será menos intenso y predominarán las tonalidades azules. De hecho el pH de la mayoría de tintos está comprimido entre 3.5 y 4.1, condiciones en las que sólo el 20-30% de los antocianos contribuyen al color. Asimismo el color de los vinos envejecidos se muestra menos sensible a las variaciones del pH.

A parte del pH y temperatura la estabilidad de los antocianos depende de la estructura y concentración de los mismos, así como, de los agentes con los que combinarse (Bakowska, 2003). Básicamente hay dos fenómenos que modifican este equilibrio: la copigmentación y las combinaciones de los antocianos con los flavonoles. Estos fenómenos modificarán la intensidad y la tonalidad del vino.

1.4. La copigmentación

La copigmentación es un fenómeno que se produce típicamente en medio acuoso y que afecta a los antocianos monómeros en su forma de catión flavilio (los pigmentos), a la vez que a otros compuestos fenólicos, normalmente no pigmentados, denominados copigmentos o cofactores de copigmentación (Boulton, 2001). Desde un punto de vista molecular, el fenómeno consiste en la formación de un complejo de estequiometría 1:1, en el que un pigmento (con estructura plana) se apila con un copigmento (también necesita tener una estructura plana para ello), como si de un sándwich se tratara, estableciéndose unas débiles interacciones entre las nubes electrónicas

de los anillos aromáticos de ambos. La copigmentación se ve más influenciada por la estructura del cofactor y por el pH que por la naturaleza del antociano (Donner et al, 1989)

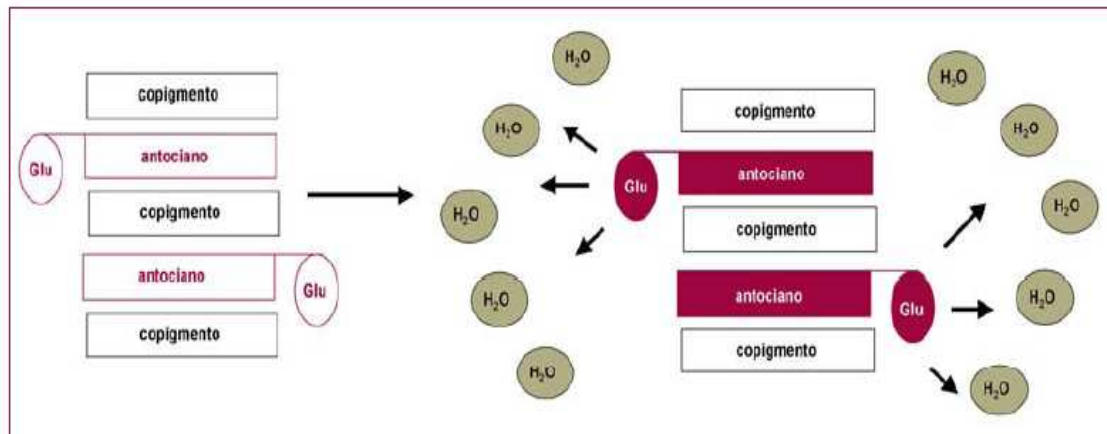


Ilustración 7: Mecanismo de copigmentación de antocianos (extraído Santos-Buelga, 2005)

La copigmentación puede, a su vez, subdividirse en tres categorías, según la naturaleza del copigmento implicado:

- 1) Copigmentación intermolecular en el cual el copigmento es una molécula de naturaleza distinta al antociano monómero, como por ejemplo una molécula de flavonol. Esto supone un aumento de la absorbancia en el espectro visible (efecto hiperacrómico) y, en ocasiones, un desplazamiento de la longitud de onda máxima de absorción (efecto batocrómico).
- 2) Copigmentación intramolecular en el cual el copigmento es una porción de la propia molécula de antociano monómero, como puede ser el caso del sustituyente cumarilo de un antociano cumarílico.
- 3) Autoasociación que en este caso el copigmento es otra molécula de antociano monómero.

Desde el punto de vista organoléptico, la copigmentación permite mayor color lo que se traduce en mayor calidad. Además se estima que la copigmentación determina entre un 25% y 50% del color en los vinos tintos jóvenes (Boulton, 2001).

1.5. Degradación de antocianos

Los antocianos son muy inestables en su forma libre. De hecho la estabilidad de los antocianos parece aumentar con el número de grupo metoxilos del anillo B y disminuye al incrementarse los grupos hidroxilo (García-Viguera, C. et al 1994), de tal manera que el antociano más estable es la malvidina. Además la presencia de azúcares formando glucósidos y la acilación de los mismos también incrementa la estabilidad de la molécula.

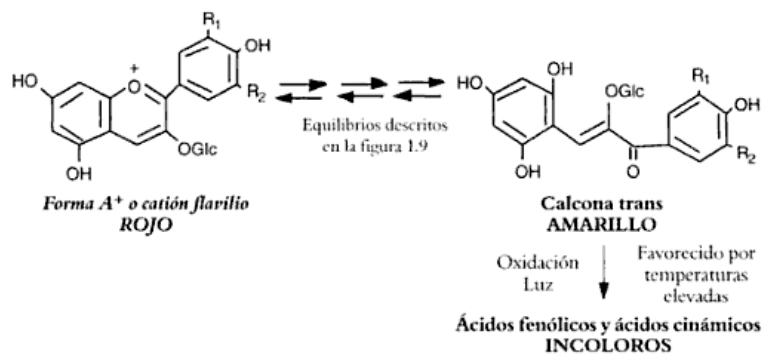


Ilustración 8: Mecanismo de degradación oxidativa de los antocianos (extraído Zamora, 2003)

La degradación puede tener lugar por efecto de la oxidación y por la acción de la luz. Parece ser que comienza por la formación de las calconas que posteriormente darían lugar a la ruptura del heterociclo previamente abierto. Además se ve favorecida por el aumento de la temperatura. Esta degradación implica la pérdida irreparable del color del vino. Por esta razón, los vinos se conservan protegidos de la luz, a temperaturas moderadas y protegidos de oxigenaciones fuertes.

1.6. Combinación entre antocianos y flavanoles

Estas combinaciones entre antocianos y flavanoles presentan un equilibrio entre las diferentes formas en función del pH. Para un mismo pH el total de formas coloreadas es mayor en el caso de las combinaciones antocianos y flavanoles que en los antocianos libres. Además estas combinaciones antociano-flavanol son más resistentes a la degradación que los antocianos libres, dando lugar a estructuras más estables proporcionando un incremento de la estabilidad del color del vino. Se describen diferentes mecanismos de unión ya sean por unión directa o mediante puentes de etilo.

Estos mecanismos darán lugar a pigmentos de color rojo-anaranjado, que son menos sensibles al efecto del pH y a la decoloración por el SO₂ que los antocianos libres.

La estabilidad de las uniones antociano-flavanol mediante la interacción del etanal es muy discutida. Algunos autores plantean que son muy estables y que es uno de los mecanismos que ayudan a la evolución del color de los vinos. Mientras que para otros autores, estas uniones no pueden justificar el color del vino añejo, ya que son inestables conduciendo a la continua reorganización.

1.7. Piranoantocianos vinilfenólicos

Estudios han mostrado la presencia en los vino de nuevos pigmentos como resultado de la condensación de los antocianos con el 4-vinifenol. Estas moléculas han sido caracterizadas como adiciones de antocianos debido a ciclaciones entre las posiciones 4-5 del antociano y la doble unión del vinifenol. Estos nuevos compuestos son anaranjados y presentan una estabilidad y una resistencia a la decoloración por los iones bisulfito, confirmando el papel de las sustituciones en C4 del antociano en el establecimiento de pigmentos estables y color (Sarni-Machado et al., 1996).

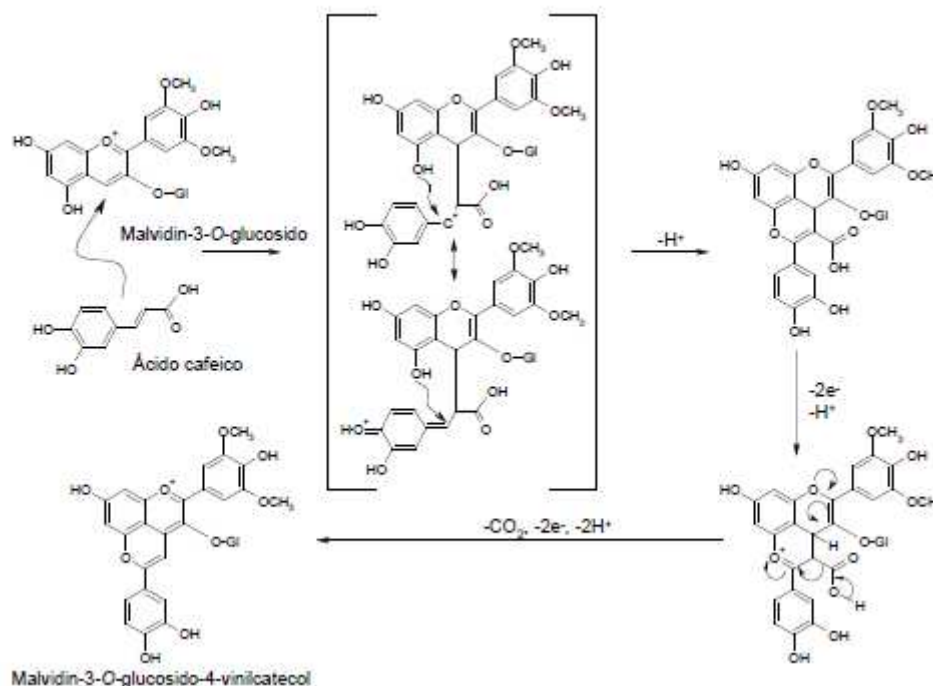


Ilustración 9: Reacciones químicas de formación de piranoantocianos vinilfenólicos a partir de antocianos de la uva y ácidos hidroxicinámicos. (extraído de Claude Flanzky, 2003)

Inicialmente se pensaba que la formación de estos pigmentos era exclusivamente química (ilustración 8) en un proceso lento a partir de ácidos hidroxicinámicos, en pequeñas cantidades. Recientemente se ha demostrado (Morata et al, 2006 y 2007) que algunas cepas de *Saccharomyces spp* seleccionadas con alta actividad hidroxicinamato descarboxilasa pueden acelerar la formación de aductos vinilfenólicos durante la fermentación.

Formación de los piranoantocianos vinilfenólicos estabiliza el vino frente a alteraciones por *Brettanomyces*, al retirar ácidos hidroxinámicos del mosto y por lo tanto evitar la presencia de precursores del etilfenoles (Suárez et al.2007). Por otra parte se ha verificado la imposibilidad por parte de *Brettanomyces* de favorecer la liberación del vinifenol y su reducción a etilfenol.

1.8. Piranoantocianos

Estos pigmentos, denominados piranoantocianos, presentan características muy particulares. Se forman por reacciones de combinación con los antocianos dando lugar a oligómeros estables a partir de sustituciones en C-4, es decir por inclusión en el antociano de un cuarto anillo pirano. No están presentes en la uva, sino que se forma durante la fermentación alcohólica y en las posteriores etapas de elaboración (Bakker,J.,2000) Su concentración es menor que la de otros pigmentos.

Estos compuestos son muy poco sensibles a los cambios de pH y la decoloración con SO₂ y son químicamente muy estables. Contribuyen al color rojo anaranjado del vino (Bakker, J. et al 1997).

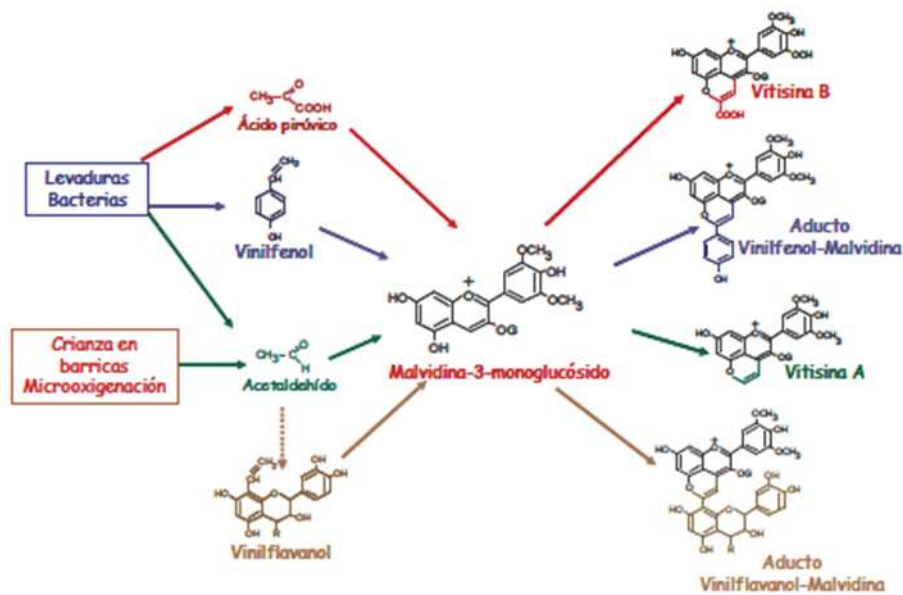


Ilustración 10 Mecanismos de formación de piranoantocianos (extraído Zamora, 2004)

1.8.1. Vitisinas

La **vitisina A** se forma por cicloadición de una molécula de ácido pirúvico sobre una molécula de antociano, y fue uno de los primeros pigmentos encontrados en el vino (Bakker, J. 1985). Se ha demostrado también su presencia en vinos de Oporto, en donde parece formarse en mayor proporción que en vinos tintos elaborados tradicionalmente (Romero, C., Bakker, J., 2000). La vitisina A se forma rápidamente y es uno de los piranoantocianos que se detecta precozmente en vinos jóvenes, aunque se puede generar constantemente a lo largo de la vida del vino, siempre y cuando existan en el medio antocianos monoméricos y ácido pirúvico (Morata et al, 2006).

La **vitisina B** se forma por cicloadición de una molécula de acetaldehído sobre una molécula de antociano. El acetaldehído reacciona preferentemente con los antocianos acetilados, y en menor medida con lo cumarilados.

La formación de ambas vitisinas parece seguir una cinética antagónica, ya que el acetaldehído podría competir con el ácido pirúvico por la molécula de antociano. Los antocianos también pueden reaccionar con los vinifenoles, procedentes de descarboxilación de los ácidos hidroxicinámicos, y con unidades de flavanol-etilo o vinil-flavanol.

1.8.2. Pinotinas

Se ha demostrado que los ácidos hidroxicinámicos por si mismos (ácido *p*-cumárico, cafeico, ferúlico o sinápico) o sus productos de descarboxilación (4-vinilfenoles), pueden reaccionar covalentemente con los antocianos, dando lugar a pigmentos de tipo piranoantocianico recientemente nombrados pinotinas (Schwarz, M. et al 2004). En las primeras investigaciones, se sugirió que la formación de aductos antocianos-vinifenoles se producía por reacción directa de la malvidina 3-glucósido con los vinifenoles exclusivamente durante la fermentación. Posteriormente en el estudio de los vinos *Pinotage*, se observó que la concentración de pinotinas

era 10 veces superior en vinos de 5 años comparado con los vinos jóvenes. Las pinotinas son potencialmente atractivas como marcadores de añejamiento en los vinos.

1.8.3. Portisinas

Análisis sobre vinos de Oporto concluyeron que los pigmentos predominantes son la vitisina A y compuestos afines. Se ha postulado además que altos contenidos de etanol podrían favorecer la síntesis de nuevos pigmentos.

A su vez, dos nuevos pigmentos formados a partir de vitisina A se han identificado en vino de Oporto. El primero, fruto de la reacción de vitisina A con el vinil-flavanol, presenta una coloración azul oscura. El segundo producto, fruto de la reacción de la vitisina a con un resto de vinilfenol, presenta unas tonalidades púrpura, alta estabilidad, y podría jugar un rol crucial como precursor a su vez de otros nuevos pigmentos (Mateus, N. et al 2006). Estos compuestos se conocen por portisinas.

2. El color del vino tinto

Entre las características que definen la calidad en general de los vinos, el color constituye un factor determinante. Sensorialmente es el primer atributo observado en la degustación. A través del mismo y en sus aspectos de intensidad y tonalidad, recibimos información de los posibles defectos y virtudes, de su cuerpo, de su edad y de su evolución en el tiempo; contribuyendo todo ello a decidir sobre la aceptación o rechazo de los mismos. Pero el color de los vinos, como el de cualquier otro alimento, es una consecuencia de los factores que concurren en su proceso de elaboración.

Como hemos nombrado anteriormente el color del vino está determinado por su composición fenólica. La intervención de los compuestos fenólicos está condicionada por numerosos factores como son la edad del vino, la copigmentación, descrito anteriormente, el pH y la utilización del dióxido de azufre.

- Edad del vino

En la figura se muestra el espectro de absorción del color de tres vinos tintos de diferentes años.

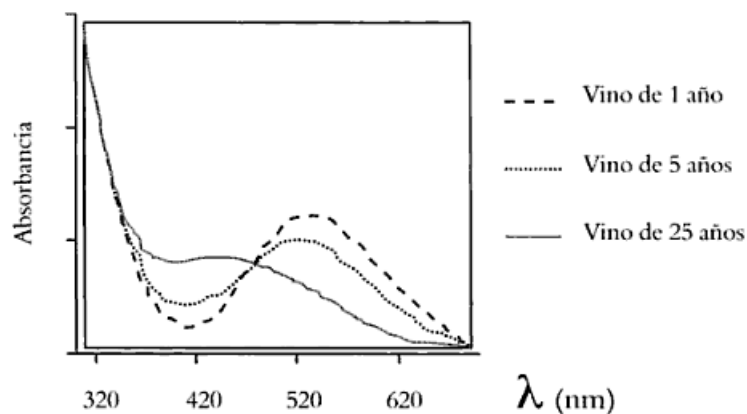


Ilustración 11: espectro de absorción del vino (extraído Zamora, 2003)

Según se puede observar en la tabla, el vino joven presenta un máximo a 520nm, correspondiente al color rojo, y unas componentes amarilla y azul relativamente importantes. Por esta razón el vino presentará un color rojo intenso con tonalidades azuladas. El vino de 5 años, presenta una componente roja menor y una componente amarilla más importante, luego presentará un color rojo teja. Por último, el vino de 25 años presentará una componente roja de color muy pequeña y una componente amarilla relativamente más alta. Por tanto su color será más bien marrón. Esta es la evolución inevitable del color de un vino. Ahora bien, la velocidad en la evolución estará determinada por las características particulares de cada vino, es decir, de su composición química. Aunque los cambios más rápidos en la composición colorante del vino tienen lugar en el primer año después de la fermentación (Alcalde et al, 2005).

- pH

El vino tinto presenta pHs comprendidos entre 3 y 4 por lo que hay un equilibrio entre las formas rojas, incoloras y azules de los antocianos. Cuanto más ácido sea un vino más predominará el color rojo, mientras que a pH más elevados el color tenderá a ser menos vivo (Heredia y Col., 1998, Ribéreau- Gayon y col., 2003).

- Utilización del dióxido de azufre

La presencia del dióxido de azufre en el vino tiene un importante papel como agente antimicrobiano, antioxidásico y antioxidante. Antioxidásico porque inhibe las enzimas polifenoloxidasas, que degradan el color del vino tinto (Saavedra-Soto y col., 1986). Y antioxidante por su capacidad de combinarse con el oxígeno protegiendo de este modo el vino (Poulton, 1970).

Al pH del vino, la mayor parte del sulfuroso libre se encuentra en forma de HSO_3^- , que se combina con los antocianos bajo la forma de catión flavilio formando un producto incoloro. Un vino equilibrado y rico en combinaciones estará mucho más protegido de la decoloración por sulfuroso (Vivas y col., 2004).

2.1. Métodos de medida del color del vino

Aunque la determinación del color del vino tinto se realiza mediante cata, no deja de ser un método subjetivo, dependiente de la capacidad del catador. Por ello con el objetivo de obtener una serie de parámetros objetivos en la medida del color la *Commmission Internationale de l'Eclairage* (CIE) ha ido desarrollando desde 1931 diferentes métodos. En enología se utilizan tres métodos para medir el color del vino. Estos métodos son el Método Glories, El método CIE, y el método CIELAB.

2.1.1. Método de Glories

Glories en 1984, a partir de trabajos previos de Sudraud (1958), desarrolló formulas simples donde, utilizando las absorbancias a 420, 520 y 620 nm del vino centrifugado y sin diluir, se podían obtener parámetros de color (Intensidad, porcentaje de rojo, azul y amarillo y tonalidad). Es necesario tener en cuenta que se ha de utilizar la cubeta de 1 mm de camino óptico y se multiplicarán por 10 los resultados.

$$\text{Intensidad colorante (IC)} = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$\text{Tonalidad (T)} = (A_{420}/A_{520}) \times 100$$

$$\% \text{Amarillo} = (A_{420}/\text{IC}) \times 100$$

$$\% \text{Rojo} = (A_{520}/\text{IC}) \times 100$$

$$\% \text{Azul} = (A_{620}/\text{IC}) \times 100$$

2.1.2. Método CIE

En 1931, CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*) desarrolló un sistema para especificar los estímulos cromáticos basándose en valores triestímulos de tres primarios imaginarios. Estos se definieron como X (rojo virtual), Y (verde virtual) y Z (azul virtual). También se definieron las características de los iluminantes y las condiciones de observación. El iluminante usado en enología es el D65 y las condiciones de observación son las de 10° de ángulo visual como se definió por la CIE en 1964.

Las coordenadas X,Y,Z representan la proporción relativa de cada color para reproducir el color concreto del objeto analizado en el ojo observador. La CIE aconseja hacer un barrido a intervalos de 10nm de la tonalidad del espectro. No obstante la OIV (*Organisation International de la Vigne et du Vin*), basándose en el método de la CIE pero intentando buscar una forma sencilla y que se ajustase a los espectrofotómetros sin barrido que se utilizan en muchas bodegas, utiliza cuatro medidas de transmisión, en cubeta de 2mm, para calcular los valores triestímulos del color y con ello las coordenadas cromáticas en el espacio CIE (Pérez- Caballero y col., 2003).

$$X = 19,7171 T_{450} + 1,884 T_{520} + 42,539 T_{570} + 32,474 T_{630} - 1,841$$

$$Y = 7,950 T_{450} + 34,764 T_{520} + 42,736 T_{570} + 15,759 T_{630} - 1,180$$

$$Z = 103,518 T_{450} + 4,190 T_{520} + 0,251 T_{570} + 1,831 T_{630} + 0,818$$

Ilustración 12: Formulas método CIE (extraído Zamora, 2003)

2.1.3 Método CIELAB

El espacio CIELAB permite especificar estímulos de color del espacio tridimensional.

El eje L^* es el claridad y va de 0 (negro) a 100 (blanco). Los otros dos ejes de coordenadas son a^* y b^* , y representan variación entre rojizo-verdoso, y amarillento-azulado, respectivamente. Aquellos casos en los que $a^* = b^* = 0$ son acromáticos; por eso el eje L^* representa la escala cromática de grises que va de blanco al negro.

Las proporciones de L^* , a^* y b^* (utilizando el iluminante D65 y 10° de ángulo visual) se obtienen de los valores triestímulos de acuerdo con las siguientes transformaciones:

$$L^* = 116(Y/100)^{1/3} - 16$$

$$a^* = 500[(X/94,825)^{1/3} - (Y/100)^{1/3}]$$

$$b^* = 200[(Y/100)^{1/3} - (Z/107,383)^{1/3}]$$

Para simplificar aún más la expresión del color y correlacionarla mejor con la respuesta visual, el CIELAB establece las coordenadas esféricas C^* (croma) y H^* (tono). Estas se calculan a partir de coordenadas a^* y b^* :

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad H^* = \arctg(b^*/a^*)$$

La diferencia de color (ΔE^*) entre dos vinos (1 y 2) se calcula utilizando la expresión:

$$\Delta E_{1,2}^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Donde, $\Delta L^* = (L^*_1 - L^*_2)$, y Δa^* y Δb^* se definen similarmente.

Se plantea que las diferencias de color entre dos copas de cristal que contienen dos vinos diferentes sólo son percibidas por el ojo humano si el $\Delta E_{1,2}^*$ tienen un valor mayor de 5 unidades (Pérez-Magariño y González-San José, 2003).

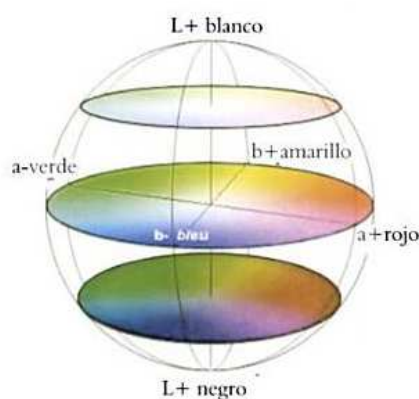


Ilustración 13: Coordenadas cromáticas. Espacio CIELAB (extraído Zamora, 2003)

CAPÍTULO II MATERIAL Y METODOS

“El vino tórnase bueno cuando resultaba nuevo, duro y áspero, pero se sostiene aquel vino que ya en el lagar era agradable”.

Seneca

1. Vino

Para la realización del trabajo se utilizó vino de mesa tinto de la marca Alandra. Vino producido y embotellado en Portugal por la empresa Esporao en Alentejo. Cada botella contiene 750 ml de vino con un grado en alcohol de un 13% vol.



Ilustración 14: Vino utilizado en los experimentos llevados a cabo

El vino ha sido esterilizado por filtración bajo un sistema de vacío utilizando una membrana estéril de celulosa de $0.45\ \mu\text{m}$ (Figura 2) (Pall Corporation, Port Washington, EE.UU.). Posteriormente, el vino ha sido recogido en un frasco previamente esterilizado por calor ($121\ ^\circ\text{C}$, 15 min.). Este procedimiento se realizó en condiciones asépticas (en el laboratorio de microbiología) con el objetivo eliminar el posible efecto del crecimiento de microorganismos del vino en la evolución de su color.



Ilustración 15: Sistema de filtrado de vino

2. Reactivos utilizados

El ácido p-cumárico (*Ácido trans-4-hidroxicinámico*) se utilizó con una pureza del 98% suministrado por la compañía Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.).

Se realizó una solución de 10 mg de ácido p-cumárico en 10 ml de etanol (1000 mg/L), que posteriormente se añadió al vino, con diferentes concentraciones, como más adelante se detalla.

El 4-vinifenol se utilizó con una pureza del 98%. Se realizó una solución de 1000 mg/L.

El 4-etilfenol se utilizó este fenol con una pureza del 99%, de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.). Se realizó una solución de 1000 mg/L.

El etanol 99.5% (v/v) utilizado para preparar soluciones era proveniente de AGA (Lisboa, Portugal).

3. Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental para cada compuesto. La duración del experimento fue de 8 días, analizando la absorbancia de cada vino tres veces por experimento. La primera toma, a las 0 horas, la segunda toma, a los 4 días de empezar el experimento y la última toma, a los 8 días del experimento.

3.1 Preparación del experimento

Se preparó 6 muestras para cada compuesto, en frascos esterilizados por calor (121°C, 15 min). Las muestras iban en aumento según la concentración del reactivo ya fuera ácido p-cumárico, 4-vinifenol o 4-etilfenol. Excepto la muestra 6 todas las demás muestras contenían el mismo volumen. El motivo fue conseguir que todas las muestras tuvieran el mismo contenido en etanol para asegurar que las modificaciones del color por etanol, fueran igual en todas las muestras, y evaluar si había un cambio de color influenciado por la cantidad de compuesto presente en la solución. En la tabla siguiente se muestra de forma más detallada el contenido de cada muestra.

	M1	M2	M3	M4	M5	Control
Vino	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
Compuesto	0,25ml	0,5ml	1,25ml	2,5ml	-	-
etanol	2,25ml	2ml	1,25ml	-	2,5ml	-

Tabla 2 Volumen añadido a las muestras

3.2 Mediciones de absorbancia

Para la realización de las mediciones se realizaron diluciones de cada muestra. Se realizó una dilución de 5X. Posteriormente, se analizaba la absorbancia del vino en el espectrofotómetro y los valores generados eran analizados con el software *Spectra Suite*. El rango de longitud de onda analizada iba desde 200 nm (ultravioleta) a 700 nm (visible).

3.2.1. Espectrofotómetro

El espectrofotómetro que se utilizó para la obtención de la absorbancia del vino era un espectrofotómetro de fibras ópticas, como se muestra en la figura 3, equipado con una célula de flujo de fluorimetría. Este equipo está formado por un detector (espectrofotómetro) USB 2000 + de Ocean Optics (Dunedin, EE.UU.) de tipo CCD (*Charge-Coupled Device*), una fuente de radiación con dos lámparas (halógeno y deuterio) DH-2000-BAL de Micropack, Inc. (Dunedin, EE.UU.), dos fibras ópticas de diferente ancho (P400 y P200), una bomba peristáltica, soporte para las células con 4 entradas para fluorimetría y la propia célula de flujo de fluorimetría.

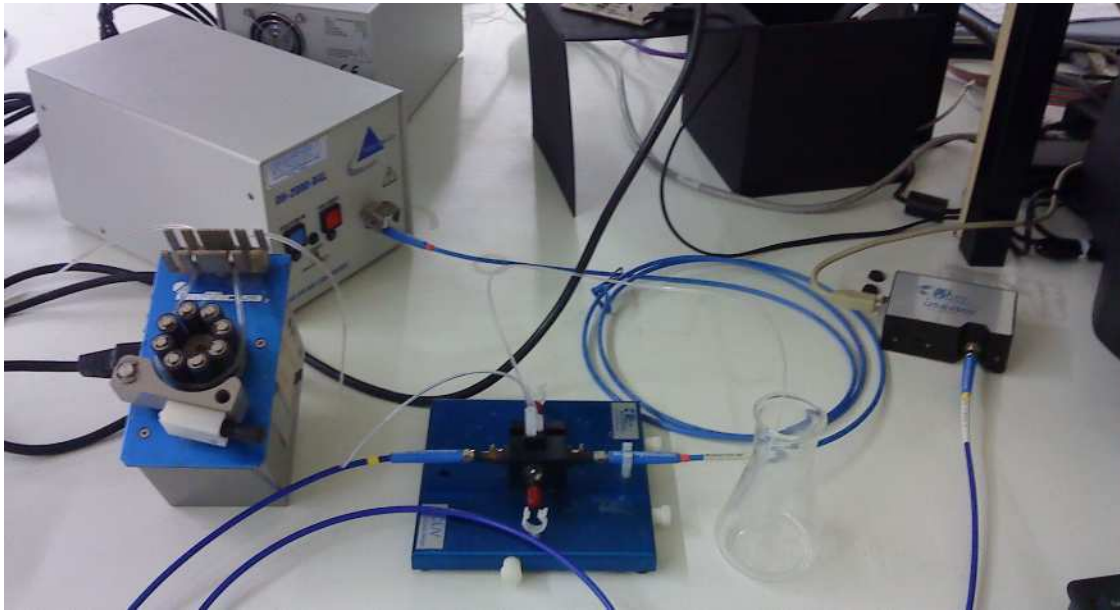


Ilustración 16: Espectrofotómetro

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“Los vinos que más se recuerdan no son necesariamente los mejores que se hayan probado. La calidad excelsa puede no gozarse tanto como aquel vino más humilde bebido en circunstancias especiales”.

H. Warren Allen

En este capítulo se ha tenido en cuenta el método CIELAB, siguiendo las indicaciones del apartado 2.1.2 y 2.1.3 correspondientes al capítulo I.

1. Experimento realizado con 4-etilfenol añadido al vino

		4-etilfenol					
		M1	M2	M3	M4	M5	control
Toma 1	L	35,620	34,817	35,900	35,298	35,792	28,243
	a*	18,143	18,291	18,495	18,500	18,758	15,915
	b*	21,951	21,400	21,983	22,137	22,543	15,671
Toma 2	L	39,433	38,982	37,622	38,746	37,612	29,087
	a*	18,601	19,304	19,165	19,349	19,112	16,221
	b*	23,621	24,123	23,552	24,112	23,909	16,792
toma 3	L	34,359	32,416	31,565	31,490	31,646	29,223
	a*	16,805	17,046	16,229	16,627	17,169	15,857
	b*	19,988	19,072	18,079	17,644	18,519	16,357

Tabla 3 Resultados de los parámetros analizados según el método CIELAB para 4-etilfenol.

En la tabla se refleja las tres tomas realizadas en el experimento (filas), donde en el apartado 3.1. y 3.2. del capítulo 2 se detalla cómo se realizan estas tomas. Para cada toma se ha anotado los parámetros L*, a* y b* correspondiente a cada muestra. Las muestras, nombradas como M1, M2, M3, M4, M5 y control, son las diferentes concentraciones de 4-etilfenol y etanol añadidos al vino. En este caso los reactivos añadidos son etanol y 4-etilfenol.

Como se muestra en la tabla 2, en el primer muestreo, se caracteriza por una homogeneidad de las muestras en los parámetros analizados. Al añadir 4-etilfenol (4-EF) y etanol se produce un aumento de los parámetros (L, a* y b*) respecto al control. Para el parámetro L, el aumento supone un acentuación de la luminosidad del vino. Para el parámetro a*, el aumento significa un pequeño aumento hacia tonalidades más rojas. Para el parámetro b* el aumento supone un desplazamiento hacia tonalidades amarillas. También se observa que la muestra M5, la que solo contiene etanol, es la que mayor aumento produce hacia tonalidades amarillas y rojas.

En el segundo muestreo, continua la homogeneidad de las muestras con etanol y 4-EF, es decir, los aumentos de los parámetros son muy similares en estas muestras. Comparando las muestras de la segunda toma con las muestras de la primera toma se produce un aumento de todos sus parámetros. Si se compara las muestras en esta segunda toma con el control, se observa que el aumento de los parámetros ha sido mayor en aquellas muestras que contienen 4-EF (M1, M2, M3, M4). Por tanto en esta segunda muestra se puede concluir 2 cosas, la primera, que las muestras que contienen etanol o 4-EF producen un aumento de L, a* y b* respecto al control, y la segunda, que se produce un aumento de los parámetros respecto a la primera toma.

Finalmente en el tercer muestreo, se produce una disminución de los parámetros analizados, al comparar con los dos anteriores muestreos. Los parámetros han disminuido, por tanto al añadir 4-EF y etanol se produce una disminución de la luminosidad del vino y un viraje hacia tonalidades menos rojas y amarillas. Hay que destacar que la muestra control se mantiene estable en los tres muestreos realizados.

La adición de 4-etilfenol tiene un efecto negativo en el color del vino (valor de L^* mayor que la muestra control).

		4-etilfenol					
		M1	M2	M3	M4	M5	control
Toma 1	C*	28,478	28,152	28,728	28,849	29,326	22,335
	H*	50,426	49,479	49,926	50,115	50,236	44,557
Toma 2	C*	30,065	30,896	30,364	30,915	30,609	22,815
	H*	51,780	51,332	50,865	51,255	51,362	45,858
toma 3	C*	26,114	25,579	24,295	24,244	25,253	22,781
	H*	49,944	48,211	48,086	46,698	47,167	45,890

Tabla 4 Tonalidad (H*) y Cromaticidad (C*) de las muestras para 4-etilfenol.

En la tabla se refleja los parámetros de cromaticidad o saturación (C*) y diferencia de tonalidad (H*) para las tres tomas realizadas en el experimento (filas). En el apartado 3.1. y 3.2. del capítulo 2 se detalla cómo se realizan estas tomas. Las muestras, nombradas como M1, M2, M3, M4, M5 y control, son las diferentes concentraciones de reactivos añadidos al vino. En este caso los reactivos añadidos son etanol y 4-etilfenol.

En la tabla 3 se muestra los parámetros de cromaticidad analizados (la magnitud derivada de las coordenadas a^* y b^*) en el cual la adición de 4-EF y etanol disminuye la cromaticidad del vino es decir, menor está definido el tono del vino o menor intensidad presenta. En cuanto al parámetro H*, representa la diferencia de tono, disminuye en el periodo analizado excepto en la muestra control.

A diferencia que para el parámetro L^* , la adición de 4-etilfenol y etanol tiene un efecto positivo sobre el color del vino. A menor concentración de 4-etilfenol, muestras M1 y M2, los vinos aumentan su tonalidad (valor de H* más elevados) más naranjas/marrones y este color más predominante se convierte (C más grande).



















	control	M1	M2	M3	M4	M5
Toma 1						
Toma 2						
Toma 3						

Tabla 5 Tonalidad más representativa de las muestras de 4-etilfenol obtenidas con el programa "Color Metric Converter"

La tabla 4 refleja la tonalidad dominante del vino al introducir los parámetros L^* , a^* y b^* en el programa *Color Metric Converter*, para las tres tomas realizadas en el experimento con 4-etilfenol

Si bien es cierto que las variaciones de los parámetros L , a^* , b^* , C^* y H^* no supone un cambio significativo en la tonalidad dominante del vino de las muestras analizadas. Como se observa en la tabla 4, todas las muestras presentan unas tonalidades muy similares, por tanto se puede concluir que al añadir que al añadir 4- EF y etanol no se aprecia una variación de la tonalidad dominante, es decir, las variaciones de la luminosidad, desplazamiento de las coordenadas amarillas y rojas, cromaticidad y diferencia de tono no afecta a la tonalidad representativa del vino. Si bien es cierto que las muestras tienden a tonalidades más oscuras, es decir, más marrones

2. Experimento realizado con 4-vinifenol añadido al vino

		4-vinifenol					
		M1	M2	M3	M4	M5	control
Toma 1	L	32,970	34,860	34,818	34,271	33,644	34,375
	a*	18,652	19,233	19,408	19,360	19,197	19,358
	b*	19,717	21,080	21,021	14,891	20,423	20,741
Toma 2	L	33,627	33,481	33,717	34,391	33,656	33,638
	a*	18,420	18,641	18,747	18,615	18,625	19,305
	b*	19,747	19,511	19,874	20,566	19,756	20,092
toma 3	L	31,314	30,755	30,653	19,558	14,818	30,119
	a*	18,745	18,722	18,751	17,524	14,032	19,324
	b*	18,285	18,219	18,198	10,564	4,360	17,979

Tabla 6 Resultados de los parámetros analizados según el método CIELAB para 4-vinilfenol.

En la tabla se refleja las tres tomas realizadas en el experimento (filas), donde en el apartado 3.1. y 3.2. del capítulo 2 se detalla cómo se realizan estas tomas. Para cada toma se ha anotado los parámetros L*, a* y b* correspondiente a cada muestra. Las muestras, nombradas como M1, M2, M3, M4, M5 y control, son las diferentes concentraciones de 4-etilfenol y etanol añadidos al vino. En este caso los reactivos añadidos son etanol y 4-vinilfenol.

Como se muestra en la tabla 5, en el primer muestreo, se caracteriza por una homogeneidad de los 3 parámetros. Para el parámetro L*, M1 y M5 son las que menos luminosidad presentan. Para la coordenada a*, M1 es la que menos tonalidad roja presenta. Para la coordenada b*, M4 es la que menos tonalidad amarilla presenta.

En el segundo muestreo, continua la homogeneidad de los parámetros, si bien es cierto que hay una pequeña disminución de los tres parámetros. Respecto al parámetro L*, la única muestra que no ha descendido ha sido la M4, que es la muestra que más 4-vinifenol contiene. Para la coordenada a*, las muestras que contienen 4-vinifenol y etanol (M1 a M5) presenta una pequeña disminución de la tonalidad amarilla. Para la coordenada b*, hay un gran aumento de M4, si en la muestra anterior era la que menos tonalidad presentaba, en este muestreo es la que mayor tonalidad presenta.

Finalmente en el tercer muestreo, continua el descenso de los parámetros L* y b*. Para la luminosidad las muestras M4 y M5 han sufrido un gran descenso en comparación a los dos anteriores muestreos. Para el parámetro a*, con respecto a la segundo muestreo se ha mantenido estable excepto en M4 y M5 que ha descendido. Para el parámetro b*, M4 y M5 han sufrido un gran descenso, el resto de muestra han descendido.

En esta experimentación M5 y M4, la muestra con más etanol y la muestra con más vinifenol respectivamente, han tenido un efecto positivo sobre el color del vino tinto al disminuir el valor de la luminosidad con respecto a la muestra control. En el caso del vinifenol este efecto se podría explicar por la formación de piranoantocianos vinilfenólicos, que son compuestos de elevada estabilidad con propiedades para la mejora del color. Para el caso del etanol, la oxidación de este genera la formación de etanal. El etanal interviene en estabilidad de las uniones antociano-flavanol. Algunos autores plantean que son muy estables y que es uno de los mecanismos que ayudan a la evolución del color de los vinos. Mientras que para otros autores, son inestables conduciendo a la continua reorganización.

		4-vinilfenol					
		M1	M2	M3	M4	M5	control
Toma 1	C*	27,142	28,536	28,610	24,425	28,029	28,371
	H*	46,591	47,624	47,284	37,566	46,773	46,975
Toma 2	C*	27,004	26,984	27,321	27,739	27,151	27,863
	H*	46,991	46,306	46,671	47,851	46,688	46,144
toma 3	C*	26,186	26,124	26,130	20,462	14,694	26,394
	H*	44,288	44,220	44,143	31,083	17,261	42,935

Tabla 7 Tonalidad (H*) y Cromaticidad (C*) de las muestras para 4-vinilfenol

En la tabla se refleja los parámetros de cromaticidad o saturación (C*) y la tonalidad (H*) para las tres tomas realizadas en el experimento (filas). En el apartado 3.1. y 3.2. del capítulo 2 se detalla cómo se realizan estas tomas. Las muestras, nombradas como M1, M2, M3, M4, M5 y control, son las diferentes concentraciones de reactivos añadidos al vino. En este caso los reactivos añadidos son etanol y 4-vinilfenol

Como se observa en la tabla 6, la cromaticidad de las muestras disminuye en el periodo analizado. Esta variación ha sido similar en todas las muestras excepto en M4 y M5. Además las muestras con menos 4-vinifanol (M1 a M3) la disminución de la diferencia de tonalidad es menor que en el control.

Para M4 en el primer muestreo es la muestra que menos C* presenta, en cambio en el segundo muestreo, a diferencia de las demás muestra con tendencia a disminuir, se produce un aumento y se equipara con las demás muestras, finalmente en el tercer muestreo se produce un descenso por debajo del valor del primer muestreo.

Para M5, muestra con etanol, en el tercer muestreo es donde se produce un gran descenso, distinto a las demás muestras. La muestra se vuelve más roja respecto al control y más oscura (descenso de L*).

En las muestras con la adición de 4-vinifanol, excepto M4, son más naranjas/marrones (valor más elevado de H*), más predominante (valor de C* más elevado) y más claros (valor de L* más elevado) que M5, muestra con etanol, particularmente a valores más bajos de concentración del compuesto fenólico, muestras M1 y M2. Puede que concentraciones más elevadas no contribuyan a la estabilidad del color, quizás por una polimerización excesiva de los pigmentos que pueda conducir a su precipitación. Sin embargo, no explica, los valores más bajos de luminosidad observados.







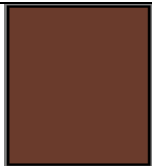









	control	M1	M2	M3	M4	M5
Toma 1						
Toma 2						
Toma 3						

Tabla 8 Tonalidad más representativa de las muestras de 4-vinilfenol obtenidas con el programa “*Color Metric Converter*”

. La tabla 7 refleja la tonalidad dominante del vino al introducir los parámetros L^* , a^* y b^* en el programa *Color Metric Converter*, para las tres tomas realizadas en el experimento con 4-vinilfenol.

Como se observa en la tabla, con el transcurso del tiempo, el color predominante del vino se vuelve más marrón. Una mayor concentración de 4-vinilfenol y etanol (M4 y M5) supone un mayor aumento del color marrón como se observa en M4.

3. Experimento con ácido *p*-cumárico añadido al vino

		ácido <i>p</i> - cumárico					
		M1	M2	M3	M4	M5	control
Toma 1	L	34,690	34,040	34,372	34,482	33,644	34,375
	a*	17,215	19,158	18,969	18,945	19,197	19,358
	b*	19,421	20,532	20,683	20,693	20,423	20,741
Toma 2	L	33,392	32,945	33,516	33,430	33,656	33,638
	a*	18,125	18,281	18,874	18,572	18,625	19,305
	b*	18,651	18,836	19,355	19,058	19,756	20,092
toma 3	L	31,059	31,088	31,466	30,609	14,818	30,119
	a*	17,247	18,235	19,179	18,313	14,032	19,324
	b*	17,111	18,124	18,529	17,829	4,360	17,979

Tabla 9 Resultados de los parámetros analizados según el método CIELAB para ácido *p*-cumárico.

En la tabla se refleja las tres tomas realizadas en el experimento (filas), donde en el apartado 3.1. y 3.2. del capítulo 2 se detalla cómo se realizan estas tomas. Para cada toma se ha anotado los parámetros L*, a* y b* correspondiente a cada muestra. Las muestras, nombradas como M1, M2, M3, M4, M5 y control, son las diferentes concentraciones de 4-etilfenol y etanol añadidos al vino. En este caso los reactivos añadidos son etanol y *ácido p-cumárico*.

Como se muestra en la tabla 8, en el primer muestreo, se caracteriza por una homogeneidad de los 3 parámetros. Para el parámetro L*, M5 es la que menos luminosidad presenta. Para la coordenada a*, M1 es la que menos tonalidad roja presenta. Para la coordenada b*, M1 vuelve a ser la que menos tonalidad amarilla presenta.

En el segundo muestreo, continua la homogeneidad de los parámetros, si bien es cierto que hay una pequeña disminución de los tres parámetros. Respecto al parámetro L, M2 es la que menos luminosidad posee. Para la coordenada a*, excepto la M1, que aumenta, las demás muestras disminuye. Para la coordenada b*, al igual que los dos anteriores parámetros también se produce una disminución.

Finalmente en el tercer muestreo, continua el descenso de los parámetros L, a* y b*. Para la luminosidad M5 ha sufrido un gran descenso en comparación a los dos anteriores muestreos. Para el parámetro a*, desciende con respecto a la segundo muestreo. Para el parámetro b*, M5 ha sufrido un gran descenso, para el resto de muestra el descenso ha sido menor.

La adición de ácido *p*-cumárico, para el parámetro L*, no tiene un efecto positivo. Si bien es cierto, que a mayor concentración de *ácido p-cumárico*, M4, mayor disminución de este parámetro. Aunque el descenso es menor en comparación con el control y con el etanol, M5.

		ácido <i>p</i> - cumárico					
		M1	M2	M3	M4	M5	control
Toma 1	C*	25,953	28,081	28,064	28,056	28,029	28,371
	H*	48,446	46,983	47,474	47,526	46,773	46,975
Toma 2	C*	26,007	26,249	27,034	26,611	27,151	27,863
	H*	45,819	45,857	45,721	45,741	46,688	46,144
toma 3	C*	24,295	25,710	26,668	25,559	14,694	26,394
	H*	44,773	44,825	44,013	44,232	17,261	42,935

Tabla 10 Tonalidad (H*) y Cromaticidad (C*) de las muestras para ácido *p*-cumárico.

En la tabla se refleja los parámetros de cromaticidad o saturación (C^*) y la tonalidad (H^*) para las tres tomas realizadas en el experimento (filas). En el apartado 3.1. y 3.2. del capítulo 2 se detalla cómo se realizan estas tomas. Las muestras, nombradas como M1, M2, M3, M4, M5 y control, son las diferentes concentraciones de reactivos añadidos al vino. En este caso los reactivos añadidos son etanol y *ácido p-cumárico*

Como se observa en la tabla 9, la cromaticidad de las muestras disminuye en el periodo analizado. Esta variación ha sido similar en todas las muestras excepto en M1 y M5. En M1 en el segundo periodo aumenta respecto al primer muestreo. En M5, al igual que para el 4-vinifenol, el descenso de los parámetros es muy significativo. Para este parámetro, la adición de este ácido no tiene un efecto positivo con referencia al control (menor valor de C^*).

Para la tonalidad del vino (H^*), en cambio tiene un efecto positivo, respecto al control y al etanol (M5). Las muestras con *ácido p-cumárico* poseen valores mayores de H^* , es decir se vuelven más naranjas/ marrones. Esto se podría explicar por la formación de piranoantocianos vinilfenólicos.

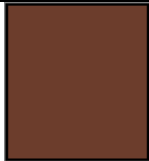
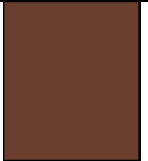

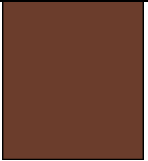





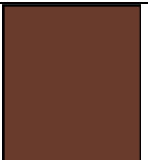





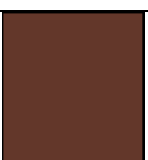


	control	M1	M2	M3	M4	M5
Toma 1						
Toma 2						
Toma 3						

Tabla 11 Tonalidad más representativa de las muestras de ácido p- cumárico obtenidas con el programa "Color Metric Converter"

La tabla 7 refleja la tonalidad dominante del vino al introducir los parámetros L^* , a^* y b^* en el programa *Color Metric Converter*, para las tres tomas realizadas en el experimento con ácido p-cumárico.

Como se observa en la tabla, con el transcurso del tiempo, el color predominante del vino se vuelve más marrón. Las muestras con *ácido p-cumárico* se vuelven más anaranjados respecto al control. La muestra M5, con adición de etanol, posee el color marrón más dominante en comparación al control.

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES

“Toma consejo en el vino, pero decide después con agua

Benjamin Franklin

1- L a adición de *4-etilfenol* tiene un efecto positivo para los parámetros C^* y H^* sobre el color del vino, aumentan su tonalidad (valor de H^* más elevados) más naranjas/marrones y este color más predominante se convierte (C más grande). En cambio, tienen un efecto negativo para el parámetro L^* , mayor luminosidad presentan.

2- La adición de *4-vinifenol* tiene un efecto positivo sobre el parámetro L^* . A mayor concentración *4-vinifenol*, menor valor de este parámetro presentan las muestras con respecto al control. Sin embargo a mayor concentración de este compuesto en las muestras tiene un efecto negativo sobre los parámetros de C^* y H^* ya que provoca la disminución de los valores de estos parámetros. En cambio, pequeñas concentraciones de *4-vinifenol* tiene un efecto positivo, ya que los valores de C^* y H^* aumentan.

3- La adición de *ácido p-cumárico* tiene un efecto positivo sobre H^* , ya que los valores son mayores. Para el parámetro C^* tiene un efecto negativo al poseer menores valores que el control. Y finalmente, para el valor L^* a pequeñas concentraciones de *ácido p-cumárico* tiene un efecto negativo mayor valores de este parámetro.

4- En la adición de etanol, existe una contrariedad, ya que para un experimento posee valores positivos de L^* , C^* y H^* y, en cambio para los otros dos experimentos posee un efecto negativo para los tres parámetros.

CAPÍTULO V BIBLIOGRAFIA

“A borracho fino, primero agua y luego vino”.

Refrán popular

- Auw, J. M., Blanco, V., & O'Keefe, S. F. (1996). Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin and Noble wines and juices. . *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 279-286.
- bakker, J. (1985). Studies on the colors and pigments of port-wines. *Dissertation, The University of Bristol*.
- Bakowska, a., Kurcharska, A., & Oszmianski, J. (2003). the effect of heating, UV irradiation and storage on stability of anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chem*, 349-355.
- Bautista-Ortín, A. B., López-Roca, J. M., & Fernández-Fernández, J. I.-P. (2004). Colour characteristics of Monastrell wines depending on the date of harvest. En: Pigments in food. More than colors, Dufosse, L. *Université de Bretagne Occidentale, Quimper, France*, 300-302.
- Bautista-Ortín, A., López-Roca, J., & Fernández-Fernández, J. y.-P. (2004a). Colour Characteristics of Monastrell wines depending on the date harvest. En: Pigments in food. More than colours, Dufosse, L. *Université de Bretagne Occidentale, Quimper,*, 300-302.
- Bautista-Ortín, A., López-Roca, J., & Fernández-Fernández, J. y.-P. (2004b). Influencia del grado de maduración de la uva en el color del vino. *Viticultura y Enología Profesional*, 25-31.
- Chatonnet, P. D. (1992). he origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric*, 60, 165-178.
- Cheyrier, V., & Remy, S. y. (2000). Mechanisms of anthocyanin and tannin changes during winemaking and aging. *The ASEV*, 337-344.
- García-Viguera, C. B. (1994). The effect of pH on the formation of coloured compounds in model solutions containing anthocyanins, catechin and acetaldehyde. *Vitis.*, 33:37-40.
- Heredia, F., & Francia-Aricha, E.-G. S.-B. (1998). Characterization of anthocyanins from red grape-I. pH effect. *Food Chemistry*, 491-498.
- Mateus, N. O.-P.-G. (2006). A new vinypranoanthocyanin pigment occurring in aged red winw. *Food Chem*, 97: 689-695.
- Morata, A. C. (2006). Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (Vitisins A and B) in red wines by the addition of piruvic acid and acetaldehyde. *Food Chem*.
- Morata, A. M. (2006). Effects of pH, temperature on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermetantion with two species of Saccharomyces. *Food Microbiol*, 106,123-129.
- Morata, A. M. (2007). Formation of vinyphenolic pyranoanthocyanims by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. *Food Microbiol*, 116,144-152.
- Poulton, J. (1970). Chemical protection of wine against oxidation. *Die Wynboer*, 22-23.

- Ribéreau-Gayon, P., & Glories, Y. (2003). Tratado de Enología. Volumen II. Química del vino, estabilización y tratamientos. Argentina: Mundiprensa.
- Romero, C. (2000). Effect of acetaldehyde and several acids on the formation of vitisin A in model wine anthocyanin composition and color in model solutions. *Food Chem*, 35: 129-140.
- Sayavedra-Soto, L. (1986). Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. *Food science*.
- Schwarz, M. T. (2003). Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *Food Chem.*, 51: 3682-3687.
- Suárez-Lepe, J. M. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. *Food. Chem.*, 102, 10-21.
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Madrid: AMV.