



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

EVALUACIÓN DE LA MICROOXIGENACIÓN EN MICROVINIFICACIONES

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

GONZALO JULIÁN GARDUÑO GUTIÉRREZ



MÉXICO, D.F.

AÑO: 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: María del Pilar Cañizares Macías

VOCAL: PROFESOR: Francisco Ruíz Terán

SECRETARIO: Profesor: Minerva Monroy Barreto

1er. SUPLENTE: Profesor: Carolina Flores Ávila

2° SUPLENTE: Profesor: Argelia Sánchez Chinchillas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 211 DEL EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María del Pilar Cañizares Macías

SUSTENTANTE:

Gonzalo Julián Garduño Gutiérrez

Índice

1. Resumen	6
2. Introducción	8
3. Antecedentes	10
3.1 Historia	10
3.2 Composición del vino	12
3.3 Definiciones	14
3.4 Principales variedades de uva en México	15
3.5 Fermentación	17
3.6 Compuestos Fenólicos.....	19
3.6.1 Antocianinas.....	21
3.6.2 Taninos	22
3.7 Microoxigenación.....	23
3.7.1 Microoxigenación y compuestos fenólicos.	26
3.8 Color	31
3.9 Parámetros fisicoquímicos	33
3.9.1 pH	33
3.9.2 Nitrógeno Asimilable.....	33
3.9.3 Acidez Total	33
3.9.4 Acidez volátil	34
3.9.5 Grado Alcohólico	34
3.9.6 Azúcares reductores.....	34
3.9.7 Dióxido de azufre libre y combinado	35
4. Objetivos	36
4.1 General.....	36
4.2 Particulares.....	36
5. Parte experimental.....	37
5.1 Diagrama de flujo.	37
5.2 Reactivos utilizados.....	38
5.3 Microorganismos utilizados	38
5.4 Equipo.....	38

5.5 Filtros.....	38
5.6 Acondicionamiento de las uvas.....	39
5.7 Obtención del mosto.....	39
5.8 Sulfitado del mosto	39
5.9 Análisis fisicoquímicos del mosto.....	39
5.10 Microvinificación	42
5.11 Tratamiento de la bacteria <i>Oenococcus oeni</i>	43
5.12 Fermentación maloláctica.....	45
5.13 Microoxigenación.....	45
5.14 Análisis fisicoquímicos a los vinos elaborados	47
6. Resultados y Discusión.	50
6.1 Parámetros cuyos valores no fueron afectados con el proceso de microoxigenación.....	51
6.2 Parámetros cuyos valores cambiaron por el proceso de microoxigenación	56
7. Conclusiones.....	70
Anexo I.....	71
Bibliografía	72

1. Resumen

El vino es la bebida resultante de la fermentación alcohólica del mosto de las uvas *Vitis vinífera*, en la cual se desarrollan diversas reacciones químicas que darán origen a los atributos organolépticos y fisicoquímicos del vino. Los compuestos fenólicos representan un importante papel en la calidad final del vino, en el perfil de color, sabor y aroma. La estructura de estos compuestos fenólicos del vino se basa en un núcleo bencénico con varios grupos hidroxilos, los cuales son responsables de las propiedades antioxidantes que se le atribuyen en especial al vino.

La microoxigenación es una técnica desarrollada en 1991 en Madiran Francia por Ducornau y Lemaire junto con la compañía Ornov. Los primeros ensayos de aportes de oxígeno constante y controlado mostraron rápidamente sus beneficios ya que el oxígeno tiene un papel importante en la elaboración y maduración del vino porque tiene una gran influencia en la composición fenólica.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los efectos de la microoxigenación después de la fermentación maloláctica en vinos tintos sobre el contenido polifenólico total, el color, los parámetros fisicoquímicos y las diferencias entre dos tratamientos diferentes de microoxigenación. Para esto se utilizaron uvas provenientes de Viñedos La Redonda, ubicado en Ezequiel Montes, Querétaro. Las variedades de uvas utilizadas fueron Cabernet Sauvignon, y Merlot, ambas variedades se vinificaron por separado y también se realizó una mezcla de éstas (70% Cabernet Sauvignon y 30% Merlot) para hacer una tercera vinificación.

El proceso de microoxigenación se aplicó al finalizar la fermentación maloláctica. Los dos tratamientos de microoxigenación fueron: 1) Inyectando un mililitro de oxígeno por hora por litro de vino, durante cinco horas; 2) microoxigenación inyectando un mililitro de oxígeno por día por litro de vino durante cinco días. Así se inyectó un total de 5mL de oxígeno por litro de vino al finalizar cada tratamiento.

El contenido polifenólico total se determinó por el método de Follin-Ciocalteu, los parámetros de color se determinaron por espectrofotometría a cuatro longitudes de

onda (450, 520, 570 y 630nm) para posteriormente convertir las absorbancias obtenidas a parámetros Cie-Lab para su análisis. Los parámetros fisicoquímicos se analizaron conforme a lo estipulado por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV).

Los resultados obtenidos mostraron un incremento en el contenido polifenólico total y en la intensidad del color rojo característico del vino tinto en los vinos microoxigenados, esto debido a las reacciones entre antocianos y taninos, que conforman principalmente el contenido polifenólico, logrando estabilizarse después del proceso de microoxigenación.

Los parámetros fisicoquímicos no mostraron cambios después del proceso de microoxigenación con excepción del contenido de dióxido de azufre el cual disminuyó posteriormente a la microoxigenación.

Debido a que el estudio de los efectos de la microoxigenación en vinos tinto es un campo que aún no se ha estudiado mucho la elaboración de este trabajo busca dar inicio a una mayor investigación sobre los efectos de la microoxigenación en la elaboración de vinos tintos más a detalle.

2. Introducción

El vino es el resultado de la fermentación del azúcar de la uva a través de una reacción microbiológica compleja en la que se produce un desarrollo secuencial de levaduras y bacterias lácticas, sin embargo; el vino dista mucho de ser una simple solución de agua, ácidos y alcohol. A mediados del siglo XIX no se conocían las causas ni los agentes que determinaban la formación del vino, se sabía que los líquidos azucarados, una vez fermentados, contenían alcohol y dióxido de carbono. Los descubrimientos de Louis Pasteur (1822–1895) explicaron de un modo lógico muchas de las venerables prácticas procedentes de la antigua Grecia y Roma. De ahí en adelante se desarrolló el conocimiento para entender todos los mecanismos fermentativos, seguirlos, reproducirlos y dirigirlos.

El vino tinto se define como el procedente de mosto de uva tinta con proceso de maceración con sus hollejos durante la fermentación alcohólica, adquiriendo su coloración característica durante la misma, siendo obtenido exclusivamente a partir de vendimia tinta, aunque en ocasiones se permite legalmente la mezcla de una pequeña proporción de uva blanca, no excediendo generalmente el 15%. La principal característica de las vendimias tintas reside en las sustancias acumuladas durante la maduración del hollejo, especialmente los polifenoles y los aromas varietales, siendo los primeros los que diferencian los vinos tintos de los blancos, dependiendo de su concentración los hará más o menos aptos para su envejecimiento. Las variedades de uva utilizadas, junto con las condiciones de maduración, y el estado sanitario de la vendimia, determinarán la vocación y la calidad de los vinos elaborados (Hidalgo, 2003).

Existen métodos nuevos que permiten elaborar vinos de calidad con un menor costo que elaborar vinos en barricas y hacer cada vez menos perceptible su diferencia. La crianza de vinos sobre lías (las lías son microorganismos, principalmente levaduras, encargadas de realizar la fermentación alcohólica, y en menor grado bacterias, sobre todo si el vino no realizó la fermentación maloláctica, que al terminar su actividad, se mueren y se van descomponiendo, proceso conocido como autólisis), la utilización de

virutas de madera y la microoxigenación suponen alternativas para alcanzar tal fin. El uso de virutas de madera para impartir al vinos los sabores del roble, se suman la microoxigenación y la optimización de la crianza sobre lías, que permiten mejorar las propiedades sensoriales del vino y otorgarle estabilidad fisicoquímica (Parzanese M, 2014).

La microoxigenación consiste en dosificar oxígeno en cantidades pequeñas, continuas y precisas de forma controlada, a fin de reproducir el envejecimiento del vino en barricas. A lo largo de la crianza en barricas el proceso de oxigenación se desarrolla en forma natural, ya que los poros de la madera permiten que pasen, de forma lenta y continua, pequeñas cantidades de oxígeno al vino. El contacto con este gas produce una polimerización que con lleva a la estabilización de la coloración, la exaltación de aromas, la reducción de la astringencia en el producto final (Parzanese M, 2014).

La oxigenación controlada de los vinos tintos se puede aplicar en diferentes momentos de la vida del vino y con diversas finalidades como la reducción de la astringencia, la estabilización del color y la eliminación de olores a azufre. La microoxigenación es un proceso que consiste en la adición continua de pequeñas cantidades de oxígeno al vino, con lo cual se busca obtener un incremento de la intensidad colorante, la estabilización del color y la armonización de los compuestos responsables de las propiedades sensoriales en la boca.

La técnica de microoxigenación se ha extendido en la industria vitivinícola mundial, debido a sus aportes tecnológicos, sin embargo el número de referencias acerca del potencial de esta técnica en la literatura científica es muy escasa.

3. Antecedentes

3.1 Historia

Las historias de la vid y el vino están ligadas a los comienzos de la Humanidad, aunque no puede determinarse la fecha exacta de su aparición en la Tierra. Los hallazgos fósiles, que se remontan hasta la Era Terciaria y los descubrimientos hechos en construcciones lacustres (palafitos) permiten sacar la conclusión de que las formas primitivas de vid estaban difundidas por Europa, Norteamérica y Japón. Plantas semejantes a las vides actuales en esa época solo aparecen en parte de Grecia e Italia (Toscana y Piamonte).

La obtención del vino y las prácticas de viticultura tienen su origen en los valles fluviales ricos en vides silvestres de Asia menor. Allí habitaba un pueblo indogermánico que deben considerarse antecesores inmediatos del cultivo de la vid y de las prácticas viticultoras. Según imágenes de templos del antiguo Egipto y documentos asirios, la preparación del vino era ya conocida por los egipcios y asirios unos 3500 años a. de C. Al parecer los fenicios llevaron más tarde la viticultura a Grecia a mediados del siglo II a. de C. Los colonizadores griegos se encargaron de extender el cultivo de la vid a Italia y sur de Francia (Marsella), el cultivo de la vid se extendió hacia el norte de lo que actualmente hoy es Francia, prolongándose también por la orilla de río Rhin y el Mosela hacia Alemania.(Vogt y Jakob, 1984).

Testimonios en bajo relieve fechados 2500 años antes de Jesucristo, y que se encuentran en el Museo Británico, muestran escenas relacionadas con el vino. En la antigua literatura china se expone el caso de un hombre que fue castigado en el año 2285 antes de Jesucristo por mezclar el vino de uvas con vino de arroz (Aleixandre y Aleixandre 2001).

La Biblia menciona el vino más de 200 veces, queriendo transmitir el símbolo de Noé, como su creador, y el hecho de ser elegido por Jesucristo como parte importante del ritual fundamental del culto cristiano, no hace sino reflejar la gran importancia que para los judíos de aquella época tuvo el vino (Aleixandre y Aleixandre 2001).

Los griegos fueron en cierto modo los primeros innovadores en el arte de conservar el vino, al que añadían brea, resina y especias para prolongar el tiempo de conservación. En la invasión de las Galias, los romanos descubren que los celtas utilizaban barriles de madera para conservar la cerveza, dándose cuenta que eran ideales para transportar vino, más seguros y capaces que las clásicas ánforas de la época.

Durante la dominación romana, en España existían varias y florecientes zonas productoras de vino, este fue una de las principales exportaciones de la Península Ibérica durante la dominación romana. La invasión árabe supuso en España, una verdadera catástrofe para los viñedos, puesto que debido a la prohibición en el Corán del consumo del vino a sus creyentes, se abandonaron o arrasaron muchas vides en sus comienzos.

La historia del vino en México viene desde la época de la conquista española, cuando Hernán Cortes ordena a cada español plantar 10 plantas de *Vitis vinifera* por cada indígena que tuviera en su dominio. La cepa que se desarrolló en el Nuevo Mundo recibió el nombre de “criolla”. Cada nuevo establecimiento o misión que se fundaba, daba lugar a un viñedo. De ahí proviene el nombre de “misión” en algunos vinos o cepas de California.

Los viñedos mexicanos son por ende los más antiguos de América pero la tradición vinícola es secular, los progresos de la vitivinicultura han estado frenados por el clima excesivamente cálido, como por la insuficiente formación de viticultores y los enólogos. Solamente a partir de 1920 se emprendió el cultivo a gran escala y aun así los viñedos mexicanos no cubren más que 14500 Hectáreas.

Actualmente, la industria mexicana está integrada por más de 90 bodegas y productores de uva para vino, ubicados en las diferentes zonas vitivinícolas. Casi 90% de ellos en Baja California y el resto en Coahuila, Querétaro, Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes. Baja California, Coahuila y Querétaro son los tres estados más importantes en la siembra de uvas y producción de vino.

Actualmente según el Consejo Mexicano del Vino (CMV) en 2014 en México se consumieron 621,340 hectolitros de vino en México, una cifra muy pequeña si se compara contra países con mayor consumo de vino, según la Organización Internacional

de la Viña y el Vino en 2014 (OIV) los mayores consumidores de vino a nivel mundial son E.U.A. con 31 millones de hectolitros, Francia con 28 millones de hectolitros, Italia y Alemania con 20 millones de hectolitros, China con 16 millones de hectolitros, Inglaterra con 13 millones de hectolitros y España, Argentina y Rusia con 10 millones de hectolitros.

La historia de la microoxigenación de los vinos inicia a principios de la década de los años noventa en la región de Madiran, Francia y surgió como solución al problema que tenía una familia de viticultores de la región en la crianza de vinos de la variedad Tannat. Estos vinos presentaban una alta concentración en taninos y antocianos al inicio de la crianza, lo que provocaba que al final del envejecimiento exhibieran una sensación gustativa de sequedad. Como respuesta a ello comenzaron a realizar ensayos con aportes constantes y controlados de oxígeno durante la crianza. El resultado de esto fue que los vinos evolucionaban mejor, los aportes de oxígeno permitían conservar el color y la frutalidad en el producto final. De esta manera se originó la técnica de microoxigenación, la cual desde su inicio se presentó como una herramienta que permite la gestión y el control de los aportes de oxígeno en la elaboración de vinos. (Parzanese M, 2014).

3.2 Composición del vino

Los principales componentes del vino son:

Agua:

Es el principal componente y se encuentra en una proporción del 70-90%. Cuanto más maduro esté el fruto en el momento de la vendimia y mejores sean las condiciones de fermentación, mayor será la cantidad de alcohol y menor la de agua.

Alcohol etílico y otros alcoholes

El alcohol etílico se encuentra en el vino en una proporción de 8-18%. Este contribuye eficazmente en la disolución de los otros componentes del vino, pero hace insoluble el crémor tártaro que se deposita en el fondo y en las paredes de los

contenedores. Una concentración alcohólica elevada impide el desarrollo de gérmenes patógenos, causantes ocasionales de las enfermedades del vino.

La cantidad de otros alcoholes en el vino es del orden de 0.05-0.1%, pero esta pequeña cantidad es suficiente para impartir características aromáticas y sabores agradables. Los monoalcoholes son: metanol, propanoles, butanoles, pentanoles, hexanoles y heptanoles. También existen otros que tienen dos funciones alcohólicas en la molécula y, finalmente, existe una serie de polialcoholes de los que el más importante es la glicerina o propanotriol.

Ácidos

Los ácidos presentes en el vino provienen de los que se encuentran en la uva y los producidos durante la fermentación. Derivados del mosto son: ácido málico, cítrico y tartárico. El ácido cítrico es poco abundante, el ácido málico se encuentra en menor proporción en el vino que en el mosto y el ácido tartárico libre o sin sales (bitartratos) se encuentran en menor proporción por ser insolubles en el alcohol, por lo que cuanto más alcohol tenga el vino tendrá menos bitartratos.

Los ácidos láctico, succínico y acético son originados por las distintas fermentaciones que tienen lugar en el vino. El ácido succínico contribuye a darle sabor al vino y se encuentra en éste en una proporción del 0.05-0.1%. El ácido acético se produce por la oxidación del alcohol que llevan a cabo las levaduras aerobias *Acetobacter*.

Aldehídos y ésteres

Los primeros son resultantes de la oxidación intermedia de los alcoholes, y los segundos de las combinaciones de los ácidos libres con los diversos alcoholes; son reacciones lentas que suelen producirse con el tiempo y que se encuentran en pequeñas cantidades en el vino (0.0005-0.03% aldehídos y 0.05-0.15% ésteres). Ambos son productos volátiles y aromáticos que influyen mucho en la calidad del vino.

Productos fijos

Los productos fijos son: taninos, que dan consistencia pero un sabor astringente al vino; azúcares (glucosa y fructosa), en proporciones variables (en los vinos secos, entre 0.1-0.2%; en los semisecos, entre 1-3%, y en los dulces, entre 3-8%), y pectinas.

Vitaminas

En el vino sólo se encuentran vitaminas hidrosolubles, estando en mayor proporción la vitamina B₁ o tiamina; la vitamina B₂ o riboflavina, y la B₅. También son importantes el ácido ascórbico y la vitamina P (Ibar, 2001).

3.3 Definiciones

Uva de vinificación: uva fresca madura o sobremadurada en la misma planta, o soleada después de la vendimia, sin llegar a la pasificación, que haya de entrar en el proceso de elaboración del mosto o del vino.

Uva de mesa: uva de consumo directo de una serie de variedades que se agrupan en variedades preferentes y variedades autorizadas.

Dentro de la amplia variedad de vinos existentes hay diversas clasificaciones básicas como las siguientes:

- Por el color: vinos blancos, rosados y tintos
- Por el carácter: se considera a los vinos espumosos que son aquellos que presentan gas carbónico; de acuerdo al contenido de azúcar, se clasifican en vinos secos como aquellos que no contienen azúcar, semidulces o abocados y dulces, con contenido de azúcar ya de forma natural o por adición.
- Por el contenido de alcohol: son vinos de mesa refiriéndose a aquellos de graduación no superior a 14.5⁰ (Gay-Lussac). Cuando se refiere a generosos o fortalecidos su porcentaje de alcohol en volumen es aproximadamente desde 15⁰ a 23⁰ (Gay-Lussac).
- Por las características de envejecimiento: en virtud de la ley de la Viña y el Vino (Ley 24/2003 España) se puede utilizar las siguientes indicaciones comunes

relativas a las categorías de envejecimiento: a) vino noble con un envejecimiento de 18 meses en barrica de roble, b) vino añejo con un envejecimiento de 24 meses en barrica y c) vino viejo con un periodo mínimo de envejecimiento de 36 meses.

3.4 Principales variedades de uva en México

❖ Cabernet Sauvignon

Es una variedad originaria de la zona bordelesa, resultado de un posible cruce entre la Cabernet franc y la Sauvignon blanc. Se trata de una de las viníferas tintas más conocidas, con racimos pequeños y apretados de bayas esféricas con hollejos de gran espesor, produciendo unos potentes vinos con aroma a frambuesa, cassis, pimienta verde, evolucionando con el tiempo hacia matices especiados, hongos y animales; cuenta con una estructura fenólica muy elevada, posiblemente la mayor de las variedades tintas existentes, que los hace ser especialmente aptos para producir vinos de crianza (Vogt y Jakob, 1984).



❖ Merlot



Pertenece a la misma familia de las variedades Cabernet Sauvignon, Cabernet franc y Petit Verdot originarias de la zona vitícola de Burdeos, y especialmente en el Pomerol y Saint Emilion. Su nombre significa literalmente “pequeño mirlo negro” por su tamaño y color de los racimos. Produce vinos con aroma a cassis, violeta y bayas rojas, evolucionando hacia tonos de hongos, sotobosque y animales, de una estructura algo más ligera a la Cabernet Sauvignon, pero de excelente comportamiento para el envejecimiento, utilizándose a menudo como vino de mezcla con otras variedades (Vogt y Jakob, 1984).

❖ **Tempranillo**



El nombre de Tempranillo procede de su maduración temprana, produciendo cuando están bien cultivados unos vinos con una importante carga polifenólica e inconfundible aroma a frutos negros. El sabor es muy afrutado de carácter neutro y rasgos de mora. El color es rojo violáceo cuando es joven y rojo rubí en la madurez. Son vinos de una gran finura aunque no de un gran carácter, tienen un gran equilibrio

entre cuerpo y acidez (Hidalgo, 2003).

❖ **Syrah**

Es la gran cepa de la Cotes-du Rhone francesa (AOC, Appellation d'origine contrôlée, traducido como denominación de origen controlada), donde está adaptada a los suelos graníticos y climas cálidos dando vinos con mucho color, aromáticos y con tonalidades que evolucionan con el tiempo. Los vinos jóvenes tienen aromas florales y frutales, los de crianza notas de pimienta y cuero. El vino es de buena estructura y tánico, es muy resistente a la oxidación (Hidalgo, 2003).



❖ **Pinot Noir**



Se le conoce también con los nombres de Pynoz, Pinot fin, Franc pinot. Su nombre deriva de la forma de sus racimos semejanado a una piña. Es de climas fríos donde su color no es muy elevado, produce vinos tintos con colores tenues pero con una mezcla de sutiles aromas a frambuesa, violeta y caza (Hidalgo, 2003).

3.5 Fermentación

La idea básica que se tiene sobre el proceso fermentativo es que agentes microscópicos transforman azúcar en alcohol. En lo que se refiere al vino, la fermentación fue considerada durante siglos en muchas escuelas de cata y vinos como una sola entidad, como un proceso único mediante el cual el azúcar se transforma en alcohol por acción de levaduras generándose como efecto secundario dióxido de carbono (De Serdio Ernesto, 2001).

La fermentación alcohólica es un proceso complejo ya que al mismo tiempo en que esta reacción ocurre, una gran cantidad de procesos bioquímicos y químicos tienen lugar, por lo que es posible transformar el mosto en vino. La característica más importante y favorable que posee la levadura *Saccharomyces* para la fermentación alcohólica es que está catalogada como anaerobia facultativa, porque posee la capacidad de metabolizar los azúcares por vías aerobias y anaerobias (Moreno y Polo, 2009).

La levadura ocupa la glucólisis como la vía principal para el catabolismo de las hexosas y es el paso inicial de la fermentación alcohólica al obtener piruvato como producto, donde por la acción de 11 reacciones químicas se libera energía en forma de adenosina trifosfato (ATP).

La levadura transforma el piruvato en etanal y dióxido de carbono por medio de la enzima piruvato descarboxilasa a partir de ese momento la enzima alcohol deshidrogenasa reduce el etanal en etanol y sucede el reciclaje de NADH a NAD⁺. La fermentación alcohólica regenera el NAD⁺ consumida durante la glucólisis y la ruta brinda una ganancia de energía de solamente dos moléculas de ATP por hexosa metabolizada (Figura 1.)

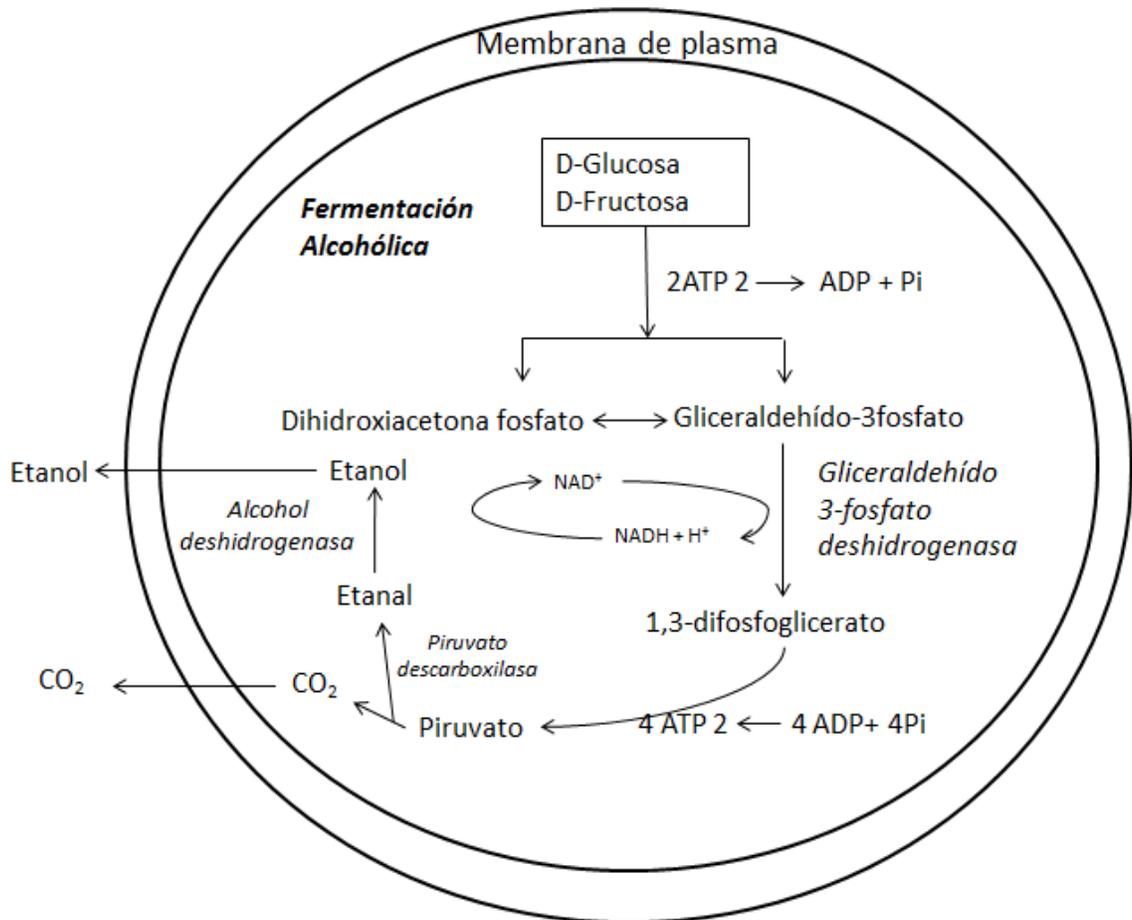


Fig1. Mecanismo bioquímico de la glucólisis (Moreno y Polo, 2009).

Para que suceda la descarboxilación del piruvato a etanal, la enzima piruvato descarboxilasa necesita magnesio y pirofosfato de tiamina como cofactores. Existen tres isoenzimas de alcohol deshidrogenasa en la *Saccharomyces cerevisiae* pero la isoenzima I es la principal responsable de la conversión de etanal en etanol, la cual utiliza zinc como cofactor (Moreno y Polo, 2009).

Actualmente el proceso de fermentación se ha ido mejorando por técnicas desde la adición de levaduras seleccionadas y cultivadas hasta la utilización de técnicas de ingeniería genética que han evolucionado para obtener características específicas y poder tener así, "levaduras a la carta" que el enólogo pueda utilizar como una herramienta para producir el vino deseado en cada proceso de vinificación.

3.6 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos entre ellos los polifenoles, son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura química grupos fenólicos.

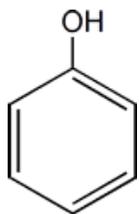


Figura 2. Estructura de un fenol

Los polifenoles juegan un papel importante en la defensa de las plantas contra microorganismos e insectos ayudando a preservar su integridad continuamente amenazada por la exposición a factores ambientales (radiaciones ultravioletas y altas temperaturas), es por eso que también son llamados antioxidantes naturales.

Los compuestos fenólicos se clasifican en ácidos fenólicos, ésteres fenólicos y flavonoides. Están conformados por una gran familia de compuestos naturales ampliamente distribuidos en alimentos vegetales. Las fuentes de polifenoles incluyen frutas (cítricos, manzanas, uvas, fresas, cerezas, peras, frambuesas y mangos), verduras (tomate, pimientos, cebollas, brócoli, etc.), también están presentes en el aceite de oliva, centeno, avena, salvado de trigo, cebada, arroz, té, chocolate negro, café y el vino (Amarowick et al, 2009).

Los niveles de estos compuestos pueden variar considerablemente dentro de la misma especie, incluso entre sus variedades, debido a factores genéticos y ambientales que condicionan la germinación, el crecimiento y calidad de los cultivos (Ferrer, 2008).

Antiguamente, algunos investigadores consideraban a los polifenoles como antinutrientes porque tenían la peculiaridad de precipitar macromoléculas como proteínas, carbohidratos y enzimas digestivas, reduciendo la digestibilidad de algunos alimentos. Sin embargo, el interés por los polifenoles aumentó debido a sus posibles efectos beneficiosos para la salud. Ya que son agentes antioxidantes que ayudan a

combatir los radicales libres y ayudan a hacer frente al estrés oxidativo. Las vitaminas C, E y los carotenoides también presentan propiedades antioxidantes.

La ingesta de antioxidantes alimenticios potencia la protección contra dichos radicales libres. Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción de los radicales libres, productos que se originan por el paso del tiempo, la exposición a la radiación solar, infecciones, contaminación ambiental y estrés, que pueden dañar a las células vivas y generar mutaciones, facilitando el desarrollo de enfermedades degenerativas asociadas a la oxidación. Los antioxidantes pueden ser de gran ayuda para mejorar la calidad de vida, ya que ayudan a retrasar el envejecimiento de las células y protegen de las mutaciones celulares (Salinas M, 2011).

Los radicales libres son moléculas que poseen un electrón desapareado en el último orbital, lo que los hace altamente reactivos pues tienden a donar ese electrón a alguna molécula vecina o bien remover un electrón de otra molécula para que su último orbital quede completo. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye células vivas. La vida biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Los radicales libres no son intrínsecamente dañinos, de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus (Salinas, 2011). Pero un exceso de estos son nocivos para la salud ya que pueden tender a la formación de células cancerígenas.

Los compuestos fenólicos son algunos de los componentes más importantes del vino, en términos de su alta concentración y también porque son clave en el papel de la determinación de las propiedades organolépticas del vino. El consumo moderado de vino tinto es una importante fuente de antioxidantes naturales principalmente los polifenoles. Entre los fenoles del vino, los antocianos y taninos son de especial importancia, ya que son los principales responsables del color, estructura y astringencia de los vinos tintos.

3.6.1 Antocianinas

Las antocianinas son los pigmentos rojos de las uvas, localizadas esencialmente en la cáscara y excepcionalmente en la pulpa, por eso las bayas son muy ricas en color. Los principales antocianos presentes en el género *Vitis Vinifera* son los glúcidos de las cinco antocianidinas, la delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, el color de estos pigmentos tiene que ver con las condiciones del medio, y depende también de la estructura molecular y del medio ambiente. La estructura general de los antocianos se muestra en la Figura 3.

Las antocianinas son los componentes más significativos, responsables del color rojo púrpura de los vinos jóvenes y son inestables. El color de estos antocianos, en el caso del vino depende principalmente del pH y la concentración de anhídrido sulfuroso.

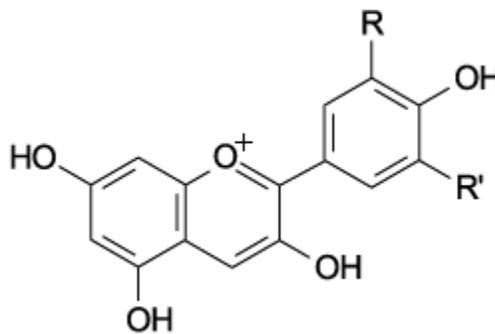


Figura 3. Formula química de un antociano

El ion flavilio es el causante del color rojo intenso que toman los antocianos en medios muy ácidos.

Las moléculas de antocianinas no son muy estables, su tenor en el vino es muy notable durante los primeros meses de crianza, posteriormente desaparecen en algunos años aunque el vino sea rojo. La estabilidad de estos pigmentos está condicionada por diferentes factores: el tipo de molécula, concentración, pH, temperatura, oxidación, luz y naturaleza de los solventes.

Los antocianos participan en varias reacciones durante la fermentación y maduración para formar pigmentos más complejos, que surgen principalmente de la

interacción entre antocianinas y otros compuestos fenólicos, especialmente flavonoles. También pueden participar en reacciones de copigmentación, éstas involucran fenómenos de formación de complejos, en general de poca energía (uniones hidrógeno e interacciones hidrófobas), entre las diferentes formas de los antocianos, o los antocianos y otros compuestos fenólicos. Estas reacciones pueden llegar a ser responsables del 50% del color de los vinos tintos jóvenes.

3.6.2 Taninos

Los taninos son moléculas fenólicas relativamente voluminosas, resultantes de la polimerización de moléculas elementales de función fenol. Se encuentran principalmente en las pepitas y la piel de la uva. En la figura 4 se muestra la forma de un tanino simple como es el ácido gálico.

Se les denomina también proantocianidinas por su capacidad de liberar antocianidinas en medios ácidos o por una fuente de calor. Tienen la propiedad de asociarse a las proteínas y a los polisacáridos, dando combinaciones estables. Estos compuestos tienen un papel importante en los vinos tintos, ya que son los principales responsables del amargor como de la astringencia y también se destacan sus efectos

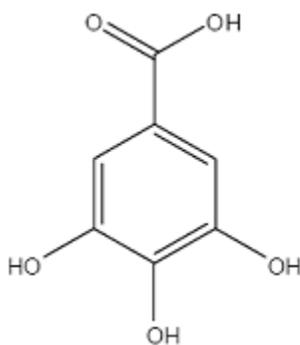


Figura 4. Ejemplo de un tanino: ácido gálico

positivos por su capacidad antioxidante.

Junto con los antocianos, son protagonistas de las reacciones químicas que conducen a la estabilización del color de los vinos, determinando su comportamiento durante su conservación y el nivel de polimerización en la que se encuentre las proantocianidinas.

Los vinos, con el paso del tiempo y la adición del oxígeno sufren reacciones entre los compuestos fenólicos, con ello cambian las características sensoriales y de color debido a que con la polimerización de estos compuestos se consigue una cierta estabilidad del vino.

3.7 Microoxigenación

La oxigenación por lo general se refiere a la exposición controlada del oxígeno con el vino e implica un impacto positivo en la calidad del vino, en las características organolépticas y en la maduración de los vinos tintos.

Hoy en día, está claro que el oxígeno desempeña un papel muy importante en el proceso de vinificación: por un lado, es responsable de la oxidación de compuestos fenólicos y volátiles y por el otro su presencia, en una dosis adecuada, mejora las características sensoriales del vino (Cano y Gómez, 2010).

La microoxigenación es el proceso de añadir oxígeno en cantidades controladas a los vinos, con el objetivo de lograr cambios deseables en color, aroma y astringencia. Los principales efectos de la microoxigenación que ocurre en los vinos son: la mejora del metabolismo de las levaduras durante la fermentación alcohólica, mejora del color, estabilidad del vino, mejora de las características organolépticas, reducción de olores a azufre y la capacidad de imitar las reacciones que se producen durante la maduración en barrica del vino (Cano M y Gómez E. 2010).

La microoxigenación se desarrolló formalmente en Francia a mediados de 1990 en un intento de reproducir las condiciones de maduración del vino, usando recipientes de acero inoxidable y cemento (Ducournau y Laplace ,1995; Lemaire, 1995).

La microoxigenación es una alternativa al uso de barricas de roble durante el periodo envejecimiento del vino. En la actualidad se ha convertido en una herramienta de gran alcance para los productores de vino para producir vinos de color estable (Cano y Gómez, 2010).

Algunos estudios demuestran que con la microoxigenación los vinos evolucionan mejor y parecen hacerlo más lentamente, además conservan más el color y los sabores frutales. (Cejudo-Bastante, 2011)

El oxígeno juega un papel muy importante en los diferentes procesos que tienen lugar durante la elaboración del vino y durante su envejecimiento ya que tienen influencia sobre la composición fenólica e indirectamente sobre algunas características sensoriales como color, aroma y astringencia que determinan la calidad del vino.

Las reacciones de condensación, polimerización y oxidación dependen del oxígeno y son las responsables de la formación de nuevos compuestos polifenólicos poliméricos que estabilizan el color del vino mediante enlaces como los puentes de etilo y condensaciones entre antocianos y taninos (Larrasoña, 2010).

Esta técnica ha sido ampliamente aplicada en los últimos años en varios países, como España, Francia, Italia, Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Chile, y finalmente fue autorizado para su uso en Europa por la Comisión Europea en 1996.

Durante la elaboración del vino el oxígeno participa en diferentes procesos:

1. En la fermentación alcohólica. Debido a que sin el oxígeno las levaduras no proliferan y las reacciones serían lentas. Una adición correcta de oxígeno puede conferir una mayor resistencia al etanol y una mayor actividad fermentativa, mientras la producción de compuestos de azufre disminuye al comienzo de la vinificación, el mosto se satura con el oxígeno ambiental y no es necesaria la adición de oxígeno pero, al final de la fase de crecimiento, la levadura todavía necesita entre 5 y 10 mg/L de oxígeno. Este es el momento correcto de la adición de oxígeno, si el oxígeno se añadió antes, la levadura lo utilizará sólo para la multiplicación y no para la formación de compuestos deseables. (Larrasoña, 2010)

2. Tras la fermentación alcohólica, y durante la crianza. El oxígeno interviene en multitud de procesos bioquímicos: entre los diferentes compuestos fenólicos favoreciendo una serie de reacciones, como las combinaciones de taninos y antocianos que estabilizan el color o como la polimerización de los taninos que disminuye la

astringencia. Algunos autores dan como preferente la realización de la microoxigenación antes de la fermentación maloláctica, debido a la presencia de mayor cantidad de acetaldehído y del pH (Larrasoña, 2010)

3. Durante el envejecimiento. La concentración en oxígeno depende del espacio entre la superficie del vino en contacto con el aire respecto al volumen del recipiente. En el envejecimiento en barrica se produce un efecto similar que la microoxigenación. Los poros de la madera permiten una entrada de oxígeno lenta pero continua al vino. Estas pequeñas dosis de oxígeno permiten favorecer las reacciones de polimerización y condensación que producen una estabilidad del color y una suavidad de la astringencia (Larrasoña, 2010)

Por otra parte es necesario controlar la presencia de oxígeno en los vinos ya que juega un papel fundamental en el fenómeno de oxidación y un exceso de oxígeno puede afectar en forma negativa al vino. La absorción de oxígeno es función de distintos factores, por ejemplo, dependiendo el grado alcohólico se absorbe oxígeno en forma distinta aunque la solubilidad del oxígeno también es dependiente de la temperatura. En la Tabla 1 se muestran la concentración de oxígeno en mg/mL a 1 atm de presión en distintas mezclas hidroalcohólicas a diferentes temperaturas.

Tabla 1. Solubilidad del oxígeno (mg/L) en función de la T y concentración de alcohol.

Alcohol%			
v/v / T°C	0%	10%	20%
0°	14.6	12.6	11.7
5°	12.8	11.3	10.6
10°	11.3	10.1	9.6
15°	10.2	9.2	8.9
20°	9.2	8.3	8.1
25°	8.4	7.7	7.5
30°	7.7	7.2	7.1

(Borden. y Searpa. 1998).

3.7.1 Microoxigenación y compuestos fenólicos.

El vino es un medio complejo que evoluciona en el curso del envejecimiento. Las reacciones de polimerización de los compuestos fenólicos, en particular de los antocianos y de los taninos condensados, juegan un papel importante en las características cromáticas y organolépticas de los vinos, dando lugar a nuevos pigmentos, entre ellos polímeros que estabilizan el color del vino y mejoran determinadas características sensoriales, como son la astringencia y el amargor. Durante la crianza se produce una cierta precipitación de parte de la materia colorante, evitando que los pigmentos inestables precipiten durante el envejecimiento en la botella.

Se ha comprobado el efecto en la desaparición de los antocianos con el mantenimiento del color rojo o incluso un aumento del color rojo. Los pigmentos formados son de estructuras complejas y poco sensibles a la variación del pH y al SO₂ que ocurre debido a la condensación de los antocianos y los taninos.

Se han propuesto y confirmado varios mecanismos para la formación de estos nuevos pigmentos de los cuales se distinguen tres tipos de reacciones de condensación de los compuestos fenólicos y su interacción con el oxígeno:

1. **Condensación Antocianos-taninos.** Las reacciones directas entre antocianinas y flavonoles.

Se trata de una reacción en la cual los antocianos bajo forma catiónica, A⁺, reaccionan sobre la cumbres negativas de las procianidinas, P, formando un flaveno incoloro, A-P; la presencia de oxígeno o de un medio oxidante es indispensable para la recoloración del flaveno, bajo las formas en equilibrio (Larrasoña, 2010).

La conservación de las soluciones de antocianos al abrigo del aire, en presencia de flavanoles y a una temperatura superior a 20°C, se acompaña por una disminución de color que puede reaparecer después de una aireación. En el caso del vino, se trata de una reacción del mismo tipo que la que interviene durante el descube final del encubado; el vino “toma color” luego de la aireación que acompaña esa operación (Larrasoña, 2010).

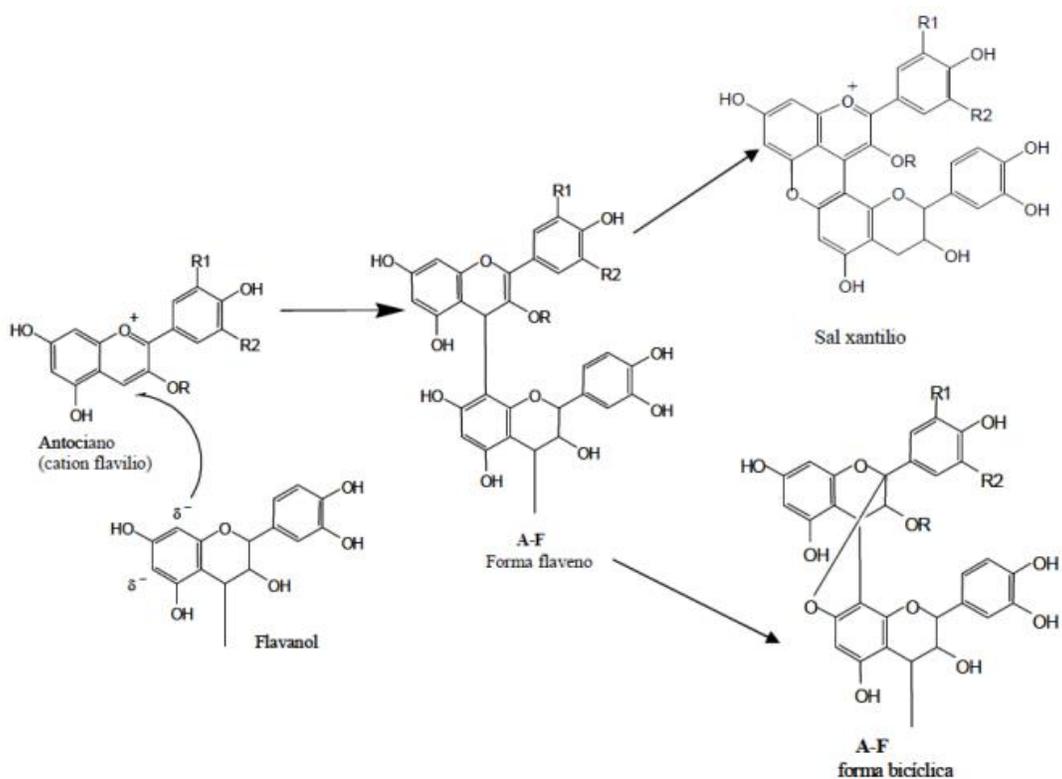


Figura 5. Mecanismo de condensación directa antociano-flavonol (Blanco D, 2013).

El mecanismo de reacción de la condensación de antocianos-flavonol o tanino (Figura 5), se produce por un ataque de las posiciones nucleofílicas C8 o C6 de un flavonol sobre la posición electrophílica C4 del cations flavilio de un antociano, esto de color amarillo inicialmente a un flaveno que puede deshidratarse y oxidarse para dar un derivado o un producto de condensación biciclica (Blanco D, 2013).

2. Condensación Taninos-antocianos. Formación de piranoantocianos a través de la reacción entre antocianinas y otros compuestos, tales como el ácido pirúvico, vinilfenoles y vinilflavanoles.

El complejo formado es incoloro y toma color rojo naranja después de la deshidratación. Es favorecida por la temperatura y depende de la cantidad de antocianos del medio. El color varía con la naturaleza del carbocatión y su grado de polimerización.

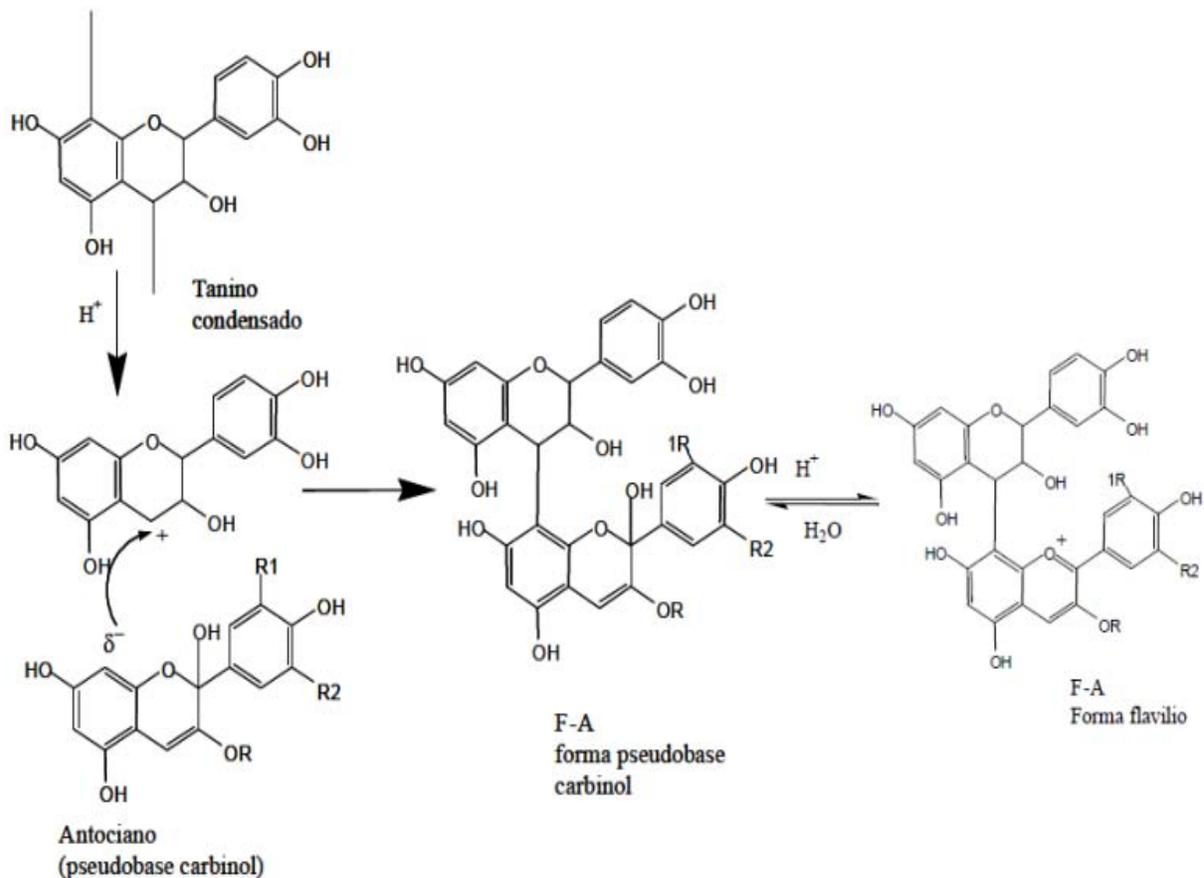


Figura 6. Mecanismo de condensación directa flavonol-antociano (Blanco D, 2013).

Los enlaces interflavánicos de las proantocianidinas condensadas se pueden romper en medio ácido, dando lugar a carbocationes que actúan como electrófilos y que pueden reaccionar con las posiciones nucleofílicas C6 o C8 de la forma carbinol de un antociano, como se muestra en la Figura 6 (Blanco D, 2013).

La conservación del vino en bodega o en botella son condiciones favorables para ese tipo de condensación. Este caso afecta únicamente a los flavanoles polímeros. Es de destacar que las reacciones de adición de estos carbocationes con los flavanoles generan nuevas moléculas de proantocianidol. Estos procesos de ruptura y de recombinación pueden conducir a un aumento del grado de polimerización por medio de los

preantocianidoles, o en caso de exceso de flavanoles monómeros en el medio, a una disminución de éste (Larrasoña. 2010).

3. Condensación con un puente etilo. Las reacciones entre antocianinas y flavonoles que implican acetaldehído para dar un producto resultante con un acetato de enlace, que puede ser protonado para formar un compuesto coloreado.

Se trata de una condensación mediada por acetaldehído, el cual en un medio ácido sufre una protonación uniéndose así a un flavanol. La mediación del acetaldehído conduce hacia tonalidad rojo-malva y a un aumento de la intensidad colorante. Estos compuestos son más estables al aumento del pH y la adición de bisulfitos. La temperatura afecta a la evolución y acumulación de estos nuevos pigmentos. A bajas temperaturas (15 °C) los polímeros se acumulan más lentamente y son más estables. Las reacciones de polimerización finalizan cuando el otro extremo del polímero está unido a un antociano.

La disponibilidad del acetaldehído en el medio influye en la formación de estos compuestos. Tiene un origen doble en los vinos, se puede dar como compuesto secundario de la fermentación alcohólica, pero también, surge por medio de la oxidación no enzimática del etanol, proceso acoplado a la autooxidación de las proantocianidinas en presencia de oxígeno. Por lo que la formación de pigmentos poliméricos mediante puentes de etilo se favorece si las condiciones de conservación implican la oxigenación del vino (Larrasoña, 2010).

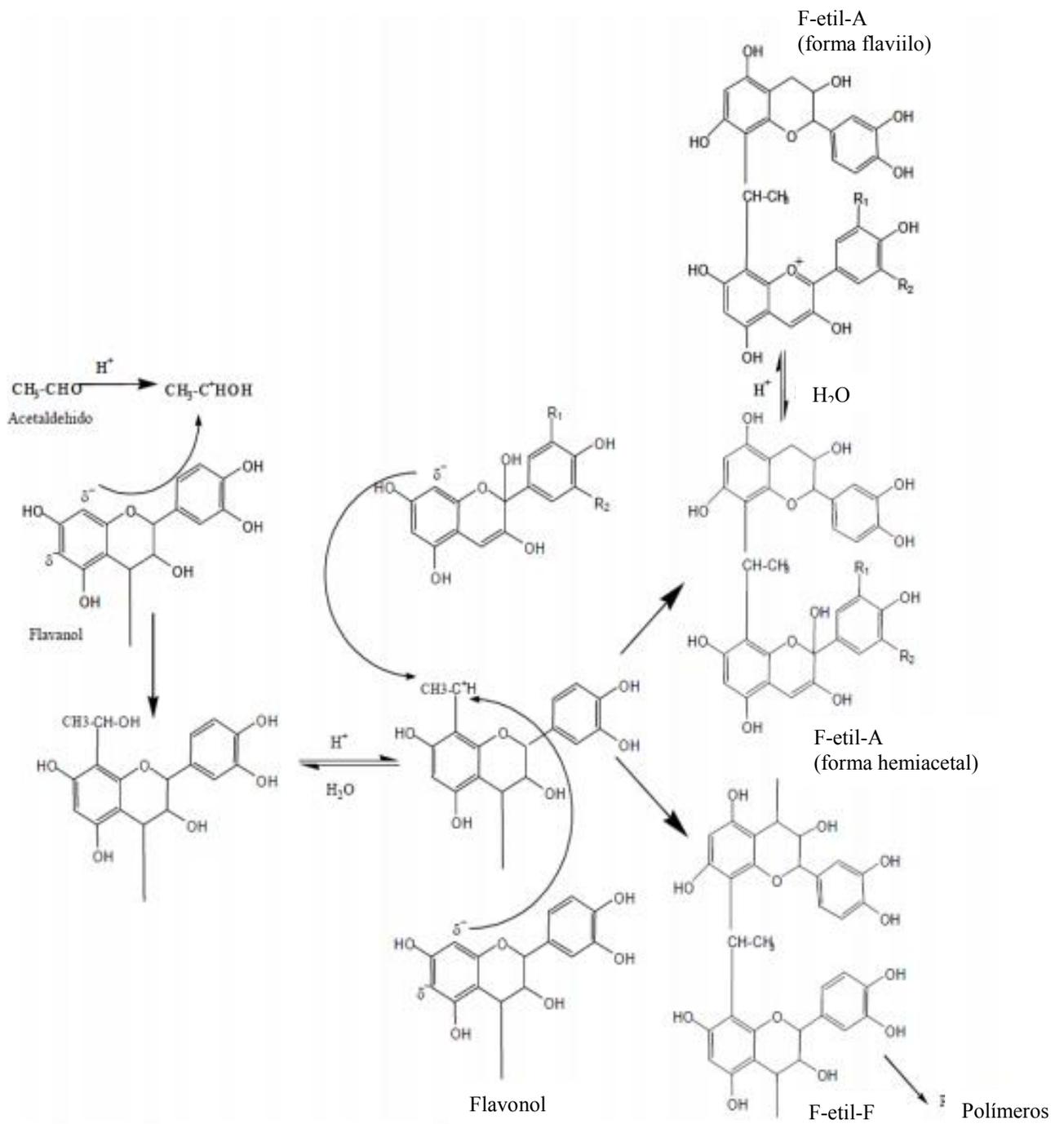


Figura 7. Mecanismo de condensación mediada por acetaldehído (Blanco D, 2013).

El mecanismo de reacción de esta condensación se muestra en la Figura 7. El acetaldehído en forma de carbocatión reacciona con el flavonol en la posición C6 o C8. Este producto flavonoacteldehído pierde una molécula de agua y da lugar a un nuevo carbocatión que puede atacar a otro flavonol o a un antociano en posición C8. La condensación entre flavonoles puede ser a través de los carbonos C6 y C8. En el caso de la reacción entre flavonoles se producen productos condensados incoloros, mientras que en la reacción con antocianos se forman pigmentos con tonos más violáceos (Blanco D, 2013).

Todos estos acontecimientos dan lugar a la formación de compuestos más estables que estabilizan el color del vino, ya que en parte se resisten a la decoloración por SO₂ y proporcionan una mejor estabilidad del color del vino.

La estructura, de los productos finales, depende de la composición inicial vino, de la presencia de los metabolitos de la levadura y la exposición al oxígeno.

Los flavanoles monoméricos y poliméricos, también conocido como taninos o proantocianidinas, son los principales responsables de las sensaciones amargas y astringentes en el vino tinto (Larrasoña, 2010).

3.8 Color

En los vinos tintos, el color es uno de los principales parámetros cualitativos. Por un lado, representa el primer factor organoléptico que percibe el degustador, y por otro, se han determinado altas correlaciones positivas entre el color y la calidad del vino. Recientemente, se ha demostrado un efecto proteico de los antocianos sobre ciertos tioles volátiles afrutados. El color del vino no solo provee información sobre posibles defectos, el tipo o el estado de evolución de éste, sino que tiene una importante influencia en la aceptabilidad (Borden E. y Searpa J, 1998).

La definición y evaluación objetiva del color del vino es un tópico complicado. El método de referencia es el propuesto en el Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos de la O.I.V. (Organización Internacional del Vino y la Viña)

aunque se ha demostrado que carece de precisión en el caso de los vinos fuertemente coloreados.

En 1986 se adoptó un nuevo sistema llamado Cie-Lab, como una medida más objetiva del color, y que define cada color a partir de unas coordenadas denominadas L^* (Luminosidad), a^* y b^* . Los parámetros C^* (croma métrico o saturación) y H (tonalidad o tono) se calculan a partir de a^* y b^* , y junto con L^* definen las coordenadas de un espacio cilíndrico que contiene los tres atributos psicofísicos básicos del color (luminosidad, saturación y tonalidad). Así cada color se representa gráficamente mediante un sólido cuyo eje central tiene un valor entre 0 y 100% (0 para el negro y 100 para el blanco ideal) y corresponde a la luminosidad. Las coordenadas a^* y b^* forman un plano horizontal dentro de ese sólido (a^* rojo, $-a^*$ verde, b^* amarillo, $-b^*$ azul) y definen las características cromáticas del color de los objetos, en este caso del vino. (Cassasa y Sari. 2006)

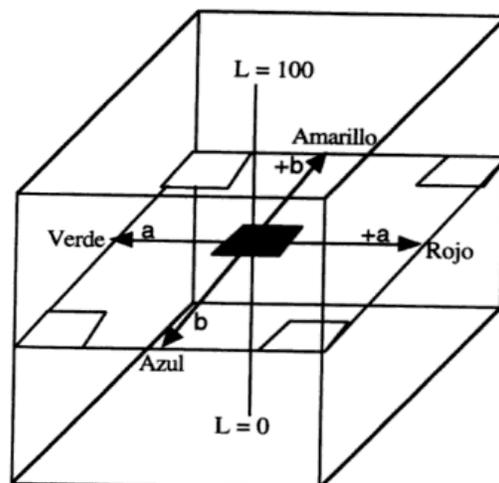


Figura 8. Coordenadas del sistema Cie-Lab.

3.9 Parámetros fisicoquímicos

3.9.1 pH

La actividad de los iones de hidrógeno se mide en términos del menos logaritmo de su concentración definido como pH. El pH es la medida del contenido de protones libres en disolución.

La concentración de iones hidrógeno desempeña un papel importante en la elaboración del vino, influyendo desde factores físico-químicos y biológicos hasta en atributos sensoriales y defectos, ya que ejerce influencia sobre la presencia de microorganismos, el sabor, potencial redox y sobre la razón dióxido de azufre libre/dióxido de azufre combinado (Zoecklein etal, 2001).

3.9.2 Nitrógeno Asimilable

Los componentes nitrogenados del mosto y el vino desempeñan un papel importante en la fermentación, clarificación y en la potencialidad microbiana. Los compuestos nitrogenados del vino incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, aminoácidos, amidas y amoniaco.

Los polipéptidos son fragmentos proteicos formados por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, constituyen una proporción significativa del contenido nitrogenado total del vino. El amonio representa la principal forma de nitrógeno disponible para el metabolismo de las levaduras siendo los aminoácidos las unidades formadoras de polipéptidos y proteínas (Zoecklein etal, 2001).

3.9.3 Acidez Total

El contenido de ácido en el vino es importante desde el punto de vista del sabor e indirectamente, por sus efectos sobre el pH, el color, la estabilidad y la vida media del producto. La acidez total puede variar entre 5 y 16 g/L, este valor depende de la variedad de uva, las condiciones climáticas, las prácticas de cultivo y de la madurez del fruto.

La acidez total depende de la concentración de los ácidos del vino así como su grado de disociación y está dada por un conjunto de ácidos fijos y volátiles (Zoecklein. et al. 2001).

3.9.4 Acidez volátil

La medición de acidez volátil se usa como un indicador del nivel de alteración microbiológica o avinagramiento del vino, generalmente se expresa como g/L de ácido acético, el cual es el mayoritario, pero incluye a todos los ácidos destilables por vapor presentes en el vino. Los compuestos que contribuyen a la acidez volátil son: el CO₂ como ácido carbónico, SO₂ como ácido sulfuroso y en menor cantidad los ácidos láctico, fórmico, butírico y propiónico.

Los límites permitidos de acidez volátil en vinos tintos por diferentes países o instituciones (g/L de ácido acético) son los siguientes: EUA 1.4, California 1.2, Chile 1.5 y O.I.V. 0.98 (Borden y Searpa, 1998).

3.9.5 Grado Alcohólico

El grado alcohólico es la cantidad de etanol contenida en el vino, esto depende de las diferentes cepas y/o especies de levaduras que se utilicen para realizar la fermentación, ya que tienen diferente capacidad para utilizar los carbohidratos del mosto y formar alcohol.

La O.I.V.(Organización Internacional de la Viña y el Vino) exige como mínimo un contenido de 8.5% (v/v) de etanol para poder considerarlo como vino, E.U.A. el 7% (v/v) y Chile 11.5% (v/v) (Borden y Searpa, 1998).

3.9.6 Azúcares reductores

Los azúcares reductores de un vino, son aquellos que en medio alcalino son capaces de formar enedíoles fuertemente reactivos y fácilmente oxidables como es el caso de la glucosa y la fructosa (Borden. y Searpa. 1998).

En las uvas la glucosa y la fructosa aparecen en concentraciones similares; después de la fermentación la fructosa se encuentra en mayor proporción debido a que la glucosa es la principal hexosa utilizada durante la fermentación para ser transformada en etanol (Borden y Searpa, 1998).

3.9.7 Dióxido de azufre libre y combinado

El dióxido de azufre del vino actúa como antioxidante y como inhibidor del crecimiento microbiano y se encuentra en dos formas: libre o combinado (ligado) siendo su suma equivalente al SO_2 total. El SO_2 combinado se refiere a los compuestos ligados entre el ion bisulfito y otras sustancias como aldehídos, antocianinas, proteínas y azúcares. La cantidad de SO_2 combinado y la tasa de unión es reversible y dependiente del pH, cuanto menor es el pH es más lenta la unión de los diferentes compuestos al ion bisulfito (Borden y Searpa, 1998). La relación entre el pH y la concentración de dióxido de azufre libre es muy importante, ya que a menor valor de pH, menor cantidad de dióxido de azufre se requiere para que la protección sea efectiva (Rankine, 1989).

La forma no disociada del dióxido de azufre libre (HSO_3^-) es el agente antimicrobiano más importante, estos iones bisulfito protegen a los vinos de las reacciones oxidativas del oscurecimiento además de eliminar el peróxido de hidrógeno que se forma en las mismas.

4. Objetivos

4.1 General

-Evaluar el efecto de la microoxigenación cuando se aplica después de la fermentación maloláctica en el contenido polifenólico total y el color en vinos tintos obtenidos por microvinificaciones.

4.2 Particulares

-Estudiar el efecto de la microoxigenación después de la fermentación maloláctica cuando se inyecta 1mL/h durante un periodo de cinco horas y cuando es inyectando 1mL/día durante un periodo de cinco días.

- Comparar el efecto de la microoxigenación entre vinificaciones para uvas: Cabernet Sauvignon, Merlot así como en una mezcla de ambas uvas con el 70% de uvas Cabernet Sauvignon y 30% de uvas Merlot.

-Estudiar el efecto de la microoxigenación sobre los parámetros fisicoquímicos, contenido polifenólico y color

-Estudiar la relación del contenido polifenólico y el color en los vinos elaborados

5. Parte experimental

5.1 Diagrama de flujo.



5.2 Reactivos utilizados.

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

- Ácido 3,5 dinitrosalicílico DNS (Sigma -Aldrich)
- Ácido sulfúrico 97.9% (Baker)
- Etanol 96% (Reactivos Monterrey)
- Formaldehído (Sigma-Aldrich)
- Fucsina básica (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de Sodio (Baker)
- Metabisulfito de potasio (Baker)
- Jugo de Tomate (Jumex)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck)
- Sacarosa (Baker)
- Glucosa (Baker)
- Peptona (Difco)
- Agar (Difco)
- Extracto de levadura (Difco)
- Sulfato de Magnesio (Sigma-Aldrich)
- Sulfato de Manganeso (Sigma-Aldrich)
- Oxígeno uso industrial (Praxair)

5.3 Microorganismos utilizados

- Bacteria *Leuconostoc oenos* (ATCC 39401)
- Levadura *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* Montrachet (Red Star)

5.4 Equipo

- Balanza analítica (Ohaus Explores) 210g x 0.1mg
- Bomba peristáltica (Gilson miniplus 3) de 4 canales
- Espectrofotómetro (Cary 1 UV-Visible) Varian
- Potenciómetro equipado con un electrodo de vidrio (Oaklon serie 5000)
- Baño de agua (Aquabath, Labline. 5L)
- Sonicador (Branson 2510. 5.6L)

5.5 Filtros

- Whatman Nylon con Polipropileno poro 0.45µm
- Whatman de Polipropileno poro 0.45µm

5.6 Acondicionamiento de las uvas

Se recibieron uvas de vinificación Cabernet Sauvignon y Merlot procedentes del viñedo de Bodegas La Redonda ubicado en Ezequiel Montes, Querétaro. Se realizó el acondicionamiento de las uvas con el despalillado eliminando las uvas podridas o de tamaño pequeño para finalmente lavar con agua y jabón las uvas adecuadas.

5.7 Obtención del mosto

Las uvas acondicionadas, se despalillaron a mano y con ayuda de un colador se estrujó manualmente.

5.8 Sulfitado del mosto

Se determinó el volumen final del mosto obtenido, para adicionar metabisulfito de potasio a una concentración de 100 mg/L de sulfitos, con esto se prevenía la oxidación del mosto.

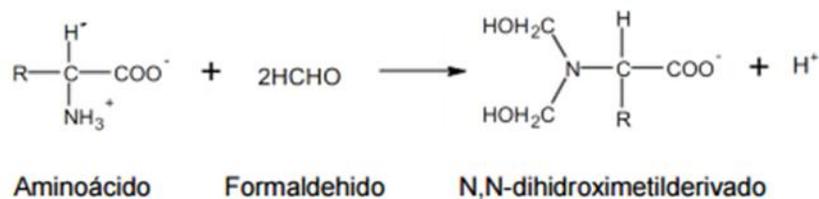
5.9 Análisis fisicoquímicos del mosto

***Determinación de pH:** Se midió, con el potenciómetro previamente calibrado con buffers de pH 4, 7 y 10. El pH se midió cuando la temperatura del mosto estaba entre 20-25⁰ C.

***Acidez total:** Se tomó una alícuota de 10mL de muestra y se valoró con NaOH 0.1M. Se midió el volumen gastado en la valoración y la acidez total de la muestra se expresó como gramos de ácido tartárico/L de muestra.

$$(\text{ml NaOH}) \times \left(\frac{\text{mol NaOH}}{1000\text{mL}} \right) \times \left(\frac{1\text{mol Ác. tartárico}}{2\text{ mol NaOH}} \right) \times \left(\frac{150\text{g Ác. tartárico}}{1\text{mol Ác. tartárico}} \right) \times \left(\frac{1}{10\text{mL}} \right) \times \left(\frac{1000\text{mL}}{1\text{L}} \right) = \frac{\text{g Ác. tartárico}}{\text{L de vino}}$$

***Nitrógeno asimilable:** Este análisis se determinó por el método de Sorensen que consistió en bloquear la función amina por adición de un exceso de metanal según la siguiente reacción:



El derivado metílico formado contiene el grupo carboxilo de los aminoácidos pero no posee el grupo básico (-NH₂), por lo tanto se produce un descenso en el pH e cual se tituló con hidróxido de sodio.

A las muestras valoradas anteriormente para acidez total, se les añadió 20mL de formaldehído ajustado a pH 7, posteriormente se valoró con NaOH 0.1M hasta la neutralidad.

$$X \text{ mL NaOH} \times \left(\frac{0.1 \text{ mol NaOH}}{1000 \text{ mL NaOH}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ mol N}}{1 \text{ mol NaOH}} \right) \times \left(\frac{14 \text{ g N}}{1 \text{ mol N}} \right) \times \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) \times \left(\frac{1}{0.01 \text{ L Muestra}} \right) = 140$$

$$\text{mL NaOH} \times 140 = \frac{\text{mgN}}{\text{L de vino}}$$

***Azúcares reductores:** El ácido 3,5 dinitrosalicílico en presencia de calor es reducido a ácido-3-amino-5-nitrosalicílico por los azúcares reductores presentes (Figura 9), desarrollando un color amarillento a café, dependiendo la concentración de azúcares reductores presentes, este cambio de color se mide en un espectrofotómetro para determinar la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra.

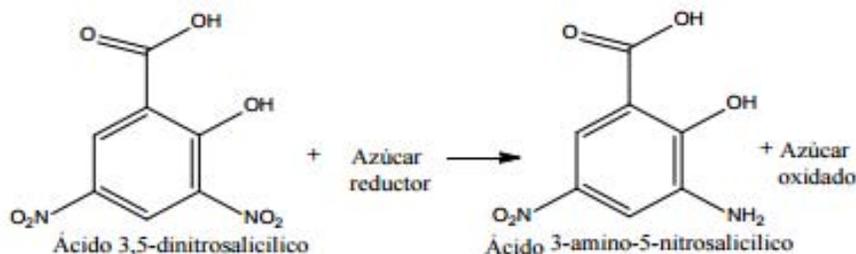


Figura 9. Reacción del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) con un azúcar reductor

Para hacer el análisis se preparó una curva patrón de glucosa con concentraciones entre 0.2 y 2 mg/mL.

Se colocaron 1mL de muestra o estándar y 1mL de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) en un tubo de ensaye y se colocó en un baño a 85 °C por 5 min. Después se añadió 8mL de agua destilada para diluir, se dejaron a temperatura ambiente para medir la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm, previamente se calibró el espectrofotómetro a cero con el blanco de reactivos, tratado igual que los estándares. Se realizaron curvas patrón con dextrosa como referencia para determinar el contenido de azúcares reductores en las muestras.

***Polifenoles totales:** Esta determinación se realizó con la técnica de análisis por inyección en flujo (FIA) por el método de Folin-Ciocalteu, este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos cromógenos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (MoO_{23}) que son de color azul intenso, estos cambios de color son medidos por un espectrofotómetro para determinar la cantidad de polifenoles presentes en la muestra analizada.

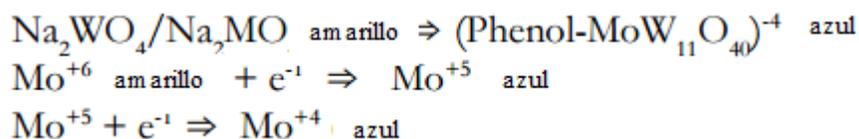
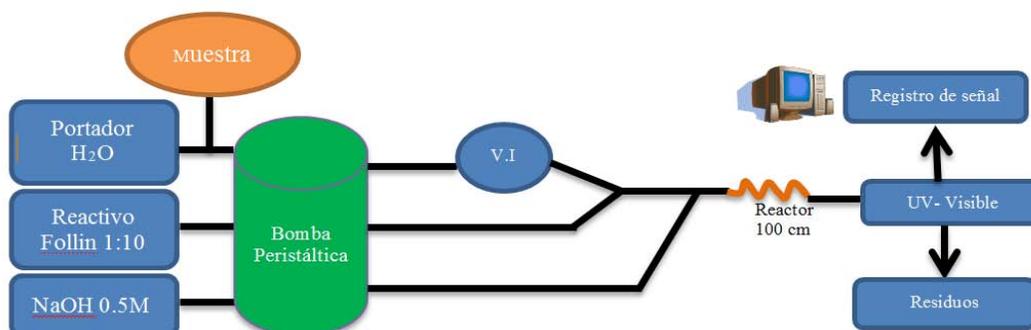


Figura 10. Reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu y los polifenoles

En la Figura 11 se muestra la configuración FIA utilizada. El espectrofotómetro se ajustó para medir a una longitud de onda de 760nm.



(V.I.): Válvula de inyección

Figura 11. Configuración de análisis por inyección de flujo continuo, para determinar polifenoles totales en los mostos y vinos preparados

Los reactivos y disoluciones se sonicaron por 15 min antes de introducirse al sistema. Las muestras de vino o mosto se diluyeron 1:10 antes de llevar a cabo la determinación. El valor de polifenoles totales de las muestras se expresó como ácido gálico/L de muestra. La curva de calibración se construyó en un intervalo de 12.5 mg/L a 150 mg/L.

5.10 Microvinificación

Para realizar el proceso de microvinificación se utilizó levadura Montrachet, *Saccharomyces cerevisiae*, marca Red Star, que es proveniente de Bélgica ya que de acuerdo a las especificaciones del proveedor era la más adecuada para la elaboración de vinos tintos.

En matraces Erlenmeyer se agregó un litro de mosto, que se obtuvo de las diferentes variedades de uva de vinificación. A estos se le añadió levadura en una cantidad de 0.2 g/L mosto, previamente activada, esta se activó añadiendo la misma cantidad de levadura y azúcar (0.2 g/L mosto) disolviéndolas en 10mL de agua purificada a 36 °C, se dejó reposar por 20 min y se añadió al mosto.

Al matraz con mosto y levadura se le agregó hollejos de la uva con la que se estaba trabajando, los hollejos se agregaron hasta donde el líquido los podía cubrir. Posteriormente se taparon los matraces con un tapón de caucho el cual contenía una

válvula de fermentación para controlar la liberación de CO₂ producido durante la fermentación.

Se pesaron los matraces cerrados ya inoculados y con hollejos para obtener el peso inicial de estos, a partir de este momento los matraces con mosto se pesaron cada 24h para monitorear la pérdida de peso hasta a peso constante indicando el fin de la fermentación. La fermentación se realizó a una temperatura de 25 °C durante un lapso promedio de 7 días.

Una vez terminada la fermentación alcohólica se retiraron los hollejos del vino y se prosiguió a realizar la fermentación maloláctica añadiendo la bacteria *Oenococcus oeni*. Se pesaron los matraces inoculados para obtener el peso inicial de estos, a partir de este momento los matraces con mosto se pesaron cada 24h para monitorear la pérdida de peso, hasta a peso constante indicando el fin de la fermentación. Esta fermentación se mantuvo a 25 °C durante un lapso de 7 días.

5.11 Tratamiento de la bacteria *Oenococcus oeni*.

1. Se preparó caldo de tomate ácido como medio de cultivo para el crecimiento de la bacteria. Para preparar el medio se necesitó de 1 g de glucosa, 1 g de peptona, 0.5 g de extracto de levadura, 0.02 g de MgSO₄, 5 mg de MnSO₄, 25 mL de jugo de tomate filtrado, y 75 mL de agua para preparar 100 mL de medio.

2. Se reactivó la cepa con el caldo de tomate ácido estéril, agregando a la cepa comercial 5 mL de caldo y se dejó incubando por siete días a 27 °C.

3. Después de la incubación, se observó inóculo en el medio, éste se centrifugó (80 rpm/10 min) y se retiró el sobrenadante. El lavado de las células se llevó a cabo con 5mL de solución salina (0.8%) y posteriormente centrifugación a 80 rpm por 10 min y se retiró el sobrenadante. Este lavado se realizó dos veces. Posteriormente a las células obtenidas se les añadió 5 mL de medio de tomate ácido con glicerol al 20%.

4. Las células obtenidas en el medio con glicerol se colocaron en criotubos, para posteriormente ultracongelar la cepa de la bacteria *Oenococcus oeni*, para mantener la cepa almacenada y utilizarla cuando fuera necesaria.

5. Se tomó un criotubo con cepa congelada, se dejó descongelar solo la parte superior y se tomó 0.1 mL de cepa que se inoculó en 25 mL de caldo de tomate ácido. Posteriormente se dejó incubando por siete días y se volvió a congelar el criotubo utilizado.

6. Se prepararon cuatro cajas de caldo de tomate ácido con 1.5 % de agar. Antes de que gelificara el medio con agar, se vació en cajas Petri estériles y finalmente se dejó enfriar hasta que gelificó completamente.

7. El inóculo obtenido en el paso 5 se sembró con un hisopo estéril por cuadrante radial en tres de las cajas petri preparadas en el paso 6 a la caja petri restante se le añadió 10 mL del medio con inóculo obtenido en el paso 5. Posteriormente se dejó incubar por siete días a 27 °C.

8. Pasados los siete días se observaron en las cajas colonias aisladas de color crema en las tres primeras cajas.

9. Se realizó un conteo en placa a la caja que anteriormente en el paso 7 se añadieron 10 mL de medio con inóculo, con el fin de determinar la cantidad de inóculo necesario para obtener 10^7 UFC/mL, que es la cantidad necesaria para poder realizar la fermentación del vino basándose con la literatura (Sánchez, 2014).

10. Se determinó que 50 mL de inóculo son los necesarios para obtener 10^7 UFC/mL.

11. Se tomó inóculo de las colonias aisladas y se inocularon en matraces con 50 mL de medio de jugo de tomate ácido. Posteriormente se dejaron incubar por siete días a 27 °C.

12. Después de los 7 días el medio con inóculo se colocaron en tubos de centrifuga estériles de 25 mL y se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y se lavaron las células de la bacteria añadiendo solución salina (0.8%) y centrifugando 10,000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y posteriormente se volvió a lavar centrifugando con solución salina, de nuevo se retiró todo el sobrenadante. A las células obtenidas se les añadió 10mL de agua purificada estéril para finalmente añadirse al vino en elaboración.

13. Para las vinificaciones posteriores se tomó cepa de un criotubo y se inoculó en matraces con 50 mL de medio caldo de tomate ácido y se incubaron por siete días.

Posteriormente se repitieron los pasos de los lavados con solución salina como anteriormente se mencionó en el paso 12.

5.12 Fermentación maloláctica

Una vez obtenida la bacteria láctica se añadió 5 % (v/v) de bacteria obtenida en el paso 12 del punto 5.11 a los matraces con mosto, posteriormente se monitoreo la pérdida de peso de los matraces con mosto cada 24 h para determinar el fin de la fermentación cuando se obtuviera un peso constante. Durante este proceso el ácido málico es metabolizado por la bacteria *Oenococcus oeni* a ácido láctico y dióxido de carbono provocando una pérdida de masa.

5.13 Microoxigenación

La microoxigenación se aplicó a los vinos una vez terminada la fermentación maloláctica de las microvinificaciones.

Se acondicionó una manguera conectada a un tanque de oxígeno de 9 m³, cuyo flujo se midió por medio de un flujometro. Los vinos estaban contenidos en matraces Erlenmeyer cerrados de 3L. El tapón que cerraba los matraces tenía dos horadaciones una de tamaño del diámetro de la manguera (1 cm) con la que se introducía el oxígeno y otra del diámetro de la válvula de fermentación (3 cm), de tal forma que el matraz quedara sellado. En la Figura 12 se muestra un esquema de la conexión del tanque de oxígeno con el matraz que contenía al vino.

Se evaluaron dos tratamientos de microoxigenación a los vinos:

1. El primer tratamiento consistió en inyectar 1mL de oxígeno cada hora a los vinos elaborados durante un periodo de cinco horas. Después de inyectar 1mL de oxígeno, se dejó reposar el vino una hora, antes de inyectar el siguiente mililitro de oxígeno se tomó una muestra de 5 mL para hacer los análisis de polifenoles totales y color.

2. El segundo tratamiento consistió en inyectar 1mL de oxígeno cada día a los vinos elaborados, durante un periodo de cinco días. Después de inyectar 1mL de

oxígeno, se dejó reposar el vino 1 día y antes de inyectar el siguiente mililitro se tomó una muestra de 5 mL para hacer los análisis de polifenoles y color.

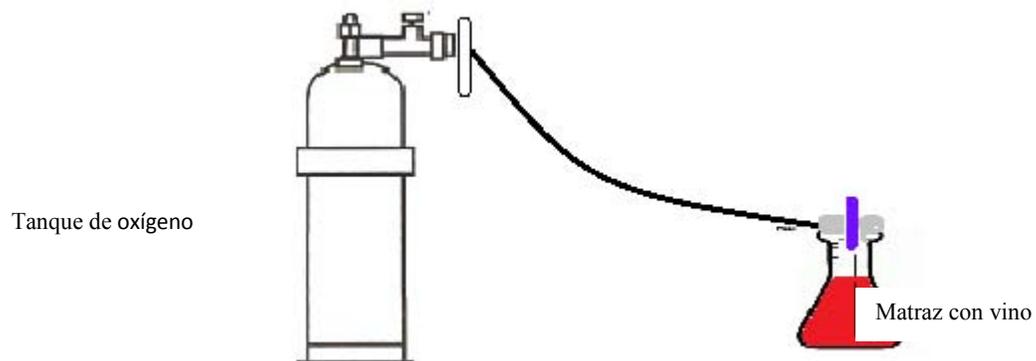


Figura. 12 Esquema de microoxigenación.

5.14 Análisis fisicoquímicos a los vinos elaborados

Se determinó pH, acidez total, polifenoles totales, azúcares reductores y nitrógeno asimilable de la misma forma que a los mostos sin embargo a los vinos elaborados también se les determinó azufre libre y combinado, acidez volátil, grado alcohólico y color.

***Determinación de azufre libre y combinado:**

Para determinar el dióxido de azufre libre y combinado se utilizó un método simple y libre de interferencias en el vino basado en la volatilización del óxido de azufre, apoyado en una técnica de flujo continuo (Mataix y Luque de Castro, 1998). En la Figura 13 se muestra la configuración de análisis por inyección en flujo (FIA) utilizada.

Los reactivos que se utilizaron fueron: una disolución de rosanilina 1 g/L en H₂SO₄ 0.432 M al 20 % (v/v) de etanol (filtrada en papel filtro, antes de utilizarse), H₂SO₄ 0.2 M, formaldehído 4 g/L en ácido sulfúrico 0.432 M y NaOH 0.2 M. Los caudales del portador y reactivos fueron de 0.5 mL/min y 1 mL/min, respectivamente.

Se realizaron curvas patrón con metabisulfito de potasio en un intervalo de 4 a 20 µg/ml

***Azufre libre**

El metabisulfito fue aspirado al sistema y confluyó con el agua que fue seleccionada por medio de la válvula de selección. Posteriormente esta mezcla se inyectó dentro de una corriente de agua para confluir posteriormente con H₂SO₄, donde se formaba SO₂ para llegar al módulo de separación. El SO₂ formado pasaba a la parte superior de la cámara, a través de una membrana hidrofóbica, donde reaccionaba con la rosanilina y formaldehído. La rosanilina se reduce por acción del dióxido de azufre formando un compuesto colorido, el cual al pasar por una celda de flujo colocada en un espectrofotómetro, es medido a una longitud de onda de 578nm.

***Azufre combinado:**

Para determinar el contenido de dióxido de azufre combinado es necesario hidrolizar la parte de éste que esté unido al acetaldehído, antocianos y azúcares. Esto se consigue utilizando una base fuerte y después acidulando (Mataix y Luque de Castro 1998). En esta reacción fue necesario utilizar el hidróxido de sodio, para lo cual la válvula de selección se colocó en la posición del hidróxido de sodio el cual era el portador. Posteriormente la reacción se llevó a cabo igual que para los sulfitos libres.

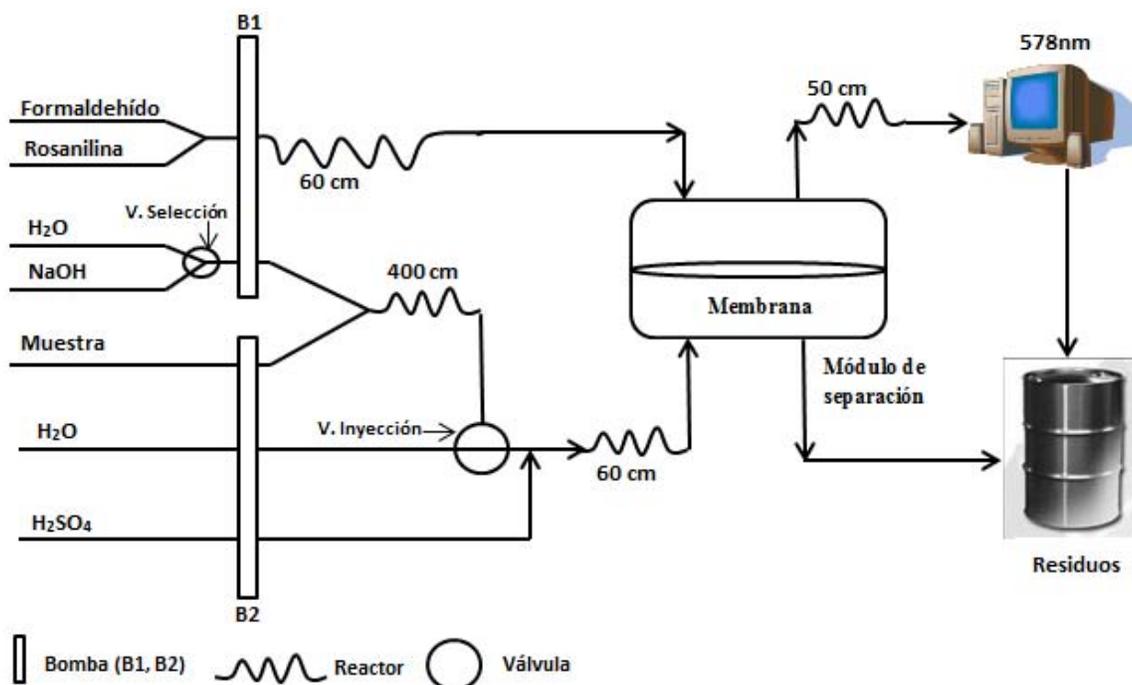


Figura 13. Configuración de análisis por inyección en flujo continuo para la determinación de azufre libre y combinado. B1= 0.5mL/min. B2= 1.0mL/min

***Acidez volátil:** Se determinó por la separación de los ácidos orgánicos volátiles por destilación simple. Se destiló 50 mL de vino, después se tomó 10 mL de destilado, se le añadió una gota de indicador fenolftaleína y se valoró con NaOH 0.1 M. El volumen gastado se utilizó para calcular la acidez con base en ácido acético. A este valor se le resta el valor obtenido de sulfitos libres debido a la presencia del anhídrido sulfuro libre en el destilado.

$$(\text{ml NaOH}) \times \left(\frac{\text{mol NaOH}}{1000 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ mol Ác. Acético}}{1 \text{ mol NaOH}} \right) \times \left(\frac{60 \text{ g Ác. acético}}{1 \text{ mol Ác. acético}} \right) \times \left(\frac{1}{10 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right) = \frac{\text{g Ác. acético}}{\text{L de vino}}$$

***Grado alcohólico:** Se realizó con un alcoholímetro (Kreuzwertheim/M) el cuál se introdujo en una probeta con 100mL de vino destilado a 20⁰C para poder realizar su lectura en grados Gay Lussac.

***Color:** Esta determinación se realizó a los vinos control y a los vinos microoxigenados los cuales se analizaron después de cada inyección de oxígeno con excepción del vino elaborado con uvas 100% Cabernet Sauvignon que se determinó al final de los tratamientos de microoxigenación.

Los parámetros de color se determinaron por medio de espectrofotometría a cuatro longitudes de onda (450, 520, 570 y 630nm), las muestras se filtraron previamente a través de filtros de 0.45 µm de tamaño de poro.

De los cinco mililitros de vino tomados de los vinos microoxigenados, se tomaron tres mililitros y se colocaron en una celda de cuarzo para realizar las mediciones de las cuatro absorbancias en el espectrofotómetro. Las absorbancias obtenidas se introdujeron en un Software de la Universidad de la Rioja llamada Método Simplificado para el Color del Vino (MSCV) para Windows. (Disponible online http://www.unizar.es/negueruela/html/grupo_color.htm), este programa convirtió las lecturas de absorbancias (450, 520, 570 y 630 nm), a los parámetros del espacio CIELAB, L*, C*, h*, a* y b*.

6. Resultados y Discusión.

La primera vinificación que se elaboró fue con uvas de la variedad Cabernet Sauvignon. Durante la elaboración de este vino se produjeron varios problemas desde el inicio del proceso de vinificación, al momento del despalillado de las uvas Cabernet Sauvignon se detectaron uvas contaminadas con algún microorganismo, ya que algunas uvas presentaban estado de descomposición y/o presencia de filamento blancos grisáceos. Por tal motivo estas uvas en mal estado se separaron de las uvas que parecían estar en buen estado. Las uvas que presentaban estar en buen estado se lavaron con agua y jabón para tratar de eliminar al microorganismo presente y evitar una contaminación en las vinificaciones que se realizaron. Desafortunadamente en la vinificación hecha con uvas 100% Cabernet Sauvignon se presentó una contaminación en los vinos por lo que debido a esto algunos parámetros fisicoquímicos se vieron afectados.

Solo se hizo una microvinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon ya que se obtuvo menor cantidad de mosto, debido a la contaminación de uvas y a que se utilizaron uvas de esta variedad para realizar la vinificación mezcla Cabernet Sauvignon-Merlot

Durante el proceso de fermentación de la vinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon estos vinos produjeron una gran cantidad de CO₂, ya que los hollejos de las uvas presentes en el mosto fueron levantados hacia la boca de los matraces y algunos llegaron a salir por las válvulas de fermentación. Posteriormente a la vinificación se llevaron a cabo los procesos de microoxigenación; durante el proceso de microoxigenación, se observó la formación de un filamento de color blanco que cubría al vino contenido en el matraz con lo cual se comprobó la existencia de una contaminación en esta vinificación.

A pesar de los problemas ocurridos durante el proceso de vinificación de las uvas Cabernet Sauvignon, los parámetros físico-químicos se encontraron dentro de los intervalos de las normas oficiales.

La segunda vinificación que se elaboró fue con uvas de la variedad Merlot, el proceso de oxigenación se realizó de igual manera que para la vinificación con uvas Cabernet Sauvignon. El proceso de vinificación se realizó por duplicado debido a que se obtuvo mayor cantidad de mosto, ya que estas uvas no presentaron ninguna contaminación.

La tercera vinificación se hizo con uvas de la variedad Cabernet Sauvignon (70%) y Merlot (30%). Posteriormente a la vinificación se realizó el proceso de microoxigenación, de igual manera que las vinificaciones anteriores.

Durante esta vinificación no se presentaron los problemas ocurridos durante la vinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon, a pesar de que se utilizaron uvas del mismo lote, probablemente a que el mosto de esta vinificación estuvo congelado por dos meses y la baja temperatura pudo inhibir al microorganismo que contaminó el vino elaborado con uvas 100% Cabernet Sauvignon.

El análisis de cada parámetro fisicoquímico, contenido polifenólico total y color se realizaron por triplicado.

6.1 Parámetros cuyos valores no fueron afectados con el proceso de microoxigenación

-pH

En la Tabla 2 se muestran los valores de pH de las tres vinificaciones elaboradas. Los vinos control y los vinos que se microoxigenaron no tienen grandes diferencias entre ellas, por lo que se puede determinar que la microoxigenación no afecta el pH de los vinos. La Organización Internacional de la Viña y el Vino (O.I.V) indica que el pH de los vinos puede estar en un rango de entre 2.8 a 4.2, por lo cual el pH de los vinos elaborados entra dentro del rango permitido.

Tabla 2. pH de los mostos y vinos de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Mezcla Merlot Cabernet Sauvignon.

pH			
Vino \ Tratamiento	Cabernet Sauvignon	Merlot	Mezcla Cabernet S.-Merlot
Mosto	3.99 ± 0.01	4.0 ± 0.02	4.04 ± 0.03
Control	3.88 ± 0.02	3.99 ± 0.05	4.12 ± 0.01
Oxi 1mL/h	3.9 ± 0.01	4.02 ± 0.03	4.12 ± 0.01
Oxi 1mL/día	3.89 ± 0.01	4.05 ± 0.12	4.13 ± 0.01

Oxi. (Microoxigenación)

-Acidez total

La acidez total de los vinos indica la presencia de ácidos orgánicos presentes en el vino tales como: ácido tartárico, málico, cítrico, acético succínico y láctico.

De acuerdo al reglamento del Consejo de la Unión Europea, el vino debe de tener un mínimo de acidez total, expresada como gramos de ácido tartárico, mínima de 3.5, la Organización Internacional de la Viña y el Vino (O.I.V.) no establece algún límite. Comparando los resultados anteriores de la Tabla 3, las tres vinificaciones cumplen con lo establecido por el reglamento de la Unión Europea y la O.I.V.

Tabla 3. Acidez total de los mostos y vinos de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Mezcla Merlot Cabernet Sauvignon.

Ácido total (g Ác. Tartárico/L)			
Vino \ Tratamiento	Cabernet Sauvignon	Merlot	Mezcla Cabernet S.-Merlot
Mosto	8.70 ± 0.15	6.04 ± 0.06	4.93 ± 0.04
Control	7.40 ± 0.04	5.41 ± 0.73	4.50 ± 0.0
Oxi 1mL/h	7.45 ± 0.04	5.14 ± 0.76	4.55 ± 0.04
Oxi 1mL/día	9.90 ± 0.20	5.62 ± 0.78	4.70 ± 0.04

Oxi. (Microoxigenación)

En la vinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon (Tabla 3) se observa un aumento de la acidez total comparando el vino microoxigenado por días con el vino control. Esto se pudo deber a la producción de ácido acético en el vino ya que las uvas estaban contaminadas. El vino microoxigenado por horas no mostró el mismo comportamiento a pesar de la contaminación, debido a que el vino microoxigenado por

días tardó cinco días más en analizarse a diferencia del tratamiento de microoxigenación por horas y el vino control que solo tardó un día en analizarse, por lo tanto al estar mayor tiempo la bacteria contaminante en contacto con el vino produjo una mayor cantidad de ácido acético.

En cuanto a las vinificaciones con uvas 100% Merlot y mezcla Cabernet Sauvignon-Merlot que no presentaron problemas de contaminación se observa que la acidez total es menor comparándola con la de la vinificación de uvas 100% Cabernet Sauvignon. Comparando la acidez total de los vinos control contra los vinos que fueron microoxigenados de las vinificaciones 100% Merlot y mezcla Cabernet Sauvignon-Merlot, no se observan mayores diferencias en cuanto a los valores de la acidez total. Por lo tanto al analizar los resultados de las tres vinificaciones se concluye que la microoxigenación no afecta a la acidez total, ya que solo en la vinificación de uvas 100% Cabernet Sauvignon hubo diferencias de resultados porque esta vinificación provenía de uvas contaminadas y esto contribuyó al incremento de metabolitos ácidos en el vino provenientes de bacterias acéticas.

-Acidez volátil

La acidez volátil es un parámetro que se utiliza como indicador del avinagramiento de los vinos se reporta como gramos de ácido acético por litro de vino aunque esto incluye todos los ácidos destilables presentes y los anhídros sulfurosos presentes, es por eso que se realiza la corrección de este parámetro restando el valor de los sulfitos libres.

En la Tabla 4 se muestra que la vinificación con uvas 100 % Cabernet Sauvignon, comparando el resultado del vino control con el vino microoxigenado 1mL/día se observa un incremento mayor de la acidez volátil a diferencia del vino microoxigenado 1mL/h. Este resultado complementa a lo anterior mencionado en la acidez total sobre la contaminación del vino con una bacteria ácido láctica ya que si este parámetro es muy elevado, puede indicar la actividad de bacterias ácido lácticas con lo cual se presentaría un deterioro del vino.

Tabla 4. Acidez volátil de los vinos de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Mezcla Merlot-Cabernet Sauvignon.

Acidez Volátil (g Ácido Acético/L)			
Vino \ Tratamiento	Cabernet Sauvignon	Merlot	Mezcla Cabernet S.-Merlot
Control	0.17 ± 0.0	0.82 ± 0.150	0.454 ± 0.000
Oxi 1mL/h	0.23 ± 0.0	0.216 ± 0.015	0.335 ± 0.001
Oxi 1mL/día	0.46 ± 0.0	0.192 ± 0.023	0.508 ± 0.003

Oxi. (Microoxigenación)

De acuerdo a la Unión Europea (Reglamento CE N^o 1493/1999) el valor máximo permitido debe ser de 1.08 g ácido acético/L de vino. Los resultados obtenidos en las vinificaciones realizadas no exceden el límite permitido por esta norma, a pesar de la contaminación en la vinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon.

Los resultados entre los vinos control y los vinos microoxigenados de las vinificaciones con uvas Merlot y mezcla de uvas Cabernet Sauvignon-Merlot que no tuvieron problemas de contaminación no muestran diferencias significativas entre estos, por lo tanto la microoxigenación no afecta este parámetro.

-Azúcares Reductores

Durante el proceso de maduración de las uvas el almidón de las uvas verdes se transforma en glucosa y fructosa siendo estos azúcares reductores. El contenido de azúcares reductores en los mostos depende del estado de maduración de las uvas, cuando las uvas se encuentren en su estado de madurez de consumo el contenido de azúcares reductores será mayor.

Tabla 5. Contenido de azúcares reductores de los mostos y vinos de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Mezcla Merlot-Cabernet Sauvignon.

Azúcares reductores (g Glucosa/L)			
Vino \ Tratamiento	Cabernet Sauvignon	Merlot	Mezcla Cabernet S.-Merlot
Mosto	288.03 ± 0.37	214.38 ± 1.55	291.61 ± 0.74
Control	2.02 ± 0.0	1.61 ± 0.83	1.73 ± 0.01
Oxi 1mL/h	1.91 ± 0.01	1.89 ± 0.27	1.79 ± 0.0
Oxi 1mL/día	1.72 ± 0.0	1.87 ± 0.16	1.59 ± 0.01

Oxi. (Microoxigenación)

En los resultados del análisis de azúcares reductores (Tabla 5.) se observó que el contenido de estos en los tres vinos control (Cabernet Sauvignon, Merlot y Mezcla) comparándolo con los mostos, disminuyó radicalmente, ya que durante el proceso de fermentación la levadura metaboliza los azúcares en etanol y CO₂. Comparando los resultados entre los vinos control y los oxigenados no se observan diferencias significativas

Los vinos elaborados, entran en la clasificación de vinos secos, debido a su bajo contenido de azúcares reductores.

-Grado alcohólico

El contenido alcohólico de las tres vinificaciones (Tabla 6) muestra resultados similares entre los vinos control y los vinos microoxigenados, por lo tanto se puede concluir que el proceso de microoxigenación no afecta el grado alcohólico de los vinos.

Tabla 6. Grado alcohólico de los vinos de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Mezcla Merlot-Cabernet Sauvignon.

Grado Alcohólico (%)			
Vino	Cabernet Sauvignon	Merlot	Mezcla Cabernet S.-Merlot
Control	9	10.000	10.000
Oxi 1mL/h	10	10.000	10.000
Oxi 1mL/día	11	10.000	11.000

Oxi. (Microoxigenación)

--Nitrógeno asimilable

El contenido de nitrógeno asimilable de los mostos disminuye después del proceso de fermentación, ya que la levadura utiliza los aminoácidos presentes como metabolitos para poder llevar a cabo la fermentación (Hidalgo, 2003)

Los resultados de las tres microvinificaciones (Tabla 7) en cuanto al nitrógeno asimilable no muestran mayores diferencias entre los vinos control y los vinos microoxigenados. Por lo tanto en este caso se observa que la microoxigenación no afecta el contenido de nitrógeno asimilable, aunque este puede intervenir en las reacciones entre antocianos y taninos,

Tabla 7. Contenido de nitrógeno asimilable de los mostos y vinos de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Mezcla Merlot-Cabernet Sauvignon.

Nitrógeno Asimilable (mg Nitrógeno/L)			
Vino \ Tratamiento	Cabernet Sauvignon	Merlot	Mezcla Cabernet S.-Merlot
Mosto	636.16 ± 7.76	650.74 ± 7.93	476.00 ± 14.0
Control	332 ± 8.72	310.85 ± 14.55	280.00 ± 0.0
Oxi 1mL/h	378 ± 14	295.58 ± 13.39	294.00 ± 0.0
Oxi 1mL/día	371.84 ± 7.76	290.58 ± 13.39	303.33 ± 8.08

Oxi. (Microoxigenación)

6.2 Parámetros cuyos valores cambiaron por el proceso de microoxigenación

-Sulfitos libres y combinados

El contenido de dióxido de azufre (SO₂) es muy importante en la elaboración de vinos ya que se añade a los mostos por sus propiedades antisépticas y antioxidantes para prevenir el crecimiento de bacterias que afecten la calidad del vino en elaboración.

El contenido máximo del dióxido de azufre está regulado en la Unión Europea en el reglamento CEN⁰ 1493/1999 en donde el límite máximo permitido es de 160mg/L. En México está regulado conforme al Acuerdo Nacional para el uso de aditivos alimentarios indicando que el límite máximo permitido es de 350 mg/L. Comparando los resultados obtenidos de las vinificaciones realizadas (Tabla 9) con la normatividad se determinó que los vinos elaborados cumplen con la normatividad establecida.

Tabla 8. Contenido de sulfitos libres de los vinos de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Mezcla Merlot-Cabernet Sauvignon.

Sulfitos Libres (g /L)			
Vino \ Tratamiento	Cabernet Sauvignon	Merlot	Mezcla Cabernet S.-Merlot
Control	N.D.	0.020 ± 0.006	0.036 ± 0.003
Oxi 1mL/h	N.D.	0.006 ± 0.001	0.035 ± 0.001
Oxi 1mL/día	N.D.	0.013 ± 0.001	0.033 ± 0.003

Oxi. (Microoxigenación) N.D. (No determinado)

Tabla 9. Contenido de sulfitos combinados de los vinos de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Mezcla Merlot-Cabernet Sauvignon.

Sulfitos Combinados (g /L)			
Vino \ Tratamiento	Cabernet Sauvignon	Merlot	Mezcla Cabernet S.-Merlot
Control	0.061 ± 0.001	0.051 ± 0.027	0.055 ± 0.009
Oxi 1mL/h	0.049 ± 0.002	0.017 ± 0.006	0.060 ± 0.011
Oxi 1mL/día	0.031 ± 0.001	0.026 ± 0.002	0.050 ± 0.006

Oxi. (Microoxigenación)

El contenido de dióxido de azufre después de las vinificaciones muestra niveles inferiores al que se agregó inicialmente al mosto. Una vez que se añade dióxido de azufre al mosto una parte de estos se combina con los azúcares, antocianos y el acetaldehído presentes en el mosto; durante la fermentación su poder antioxidante evita reacciones de oxidación con el peróxido producido por la presencia de ácido ascórbico en el vino y su capacidad bactericida previene el crecimiento de otras bacterias y levaduras diferentes al proceso de fermentación que son poco tolerantes al dióxido de azufre (Rankine, 1989). Es por esto que los niveles de dióxido de azufre libre y combinado disminuyen durante el proceso de vinificación.

Antes de realizar el proceso de microoxigenación se realizó un reajuste de sulfitos para evitar la oxidación de los vinos. Durante el proceso de microoxigenación la cantidad de dióxido de azufre en el vino tiende a disminuir ya que actúa frente al exceso de oxígeno evitando reacciones de oxidación del vino.

En la Tabla 8 se muestra que para los vinos producidos con uvas 100% Cabernet Sauvignon el cual presentó una contaminación en el vino por algún microorganismo, no se detectaron sulfitos libres, ya que los sulfitos en su forma libre tienen la acción de actuar como inhibidores de hongos, bacterias y levaduras.

Analizando los resultados y reacciones que ocurren con el dióxido de azufre durante el proceso de vinificación y microoxigenación, se concluye que este parámetro disminuye su concentración por la microoxigenación debido a su capacidad antioxidante.

-Polifenoles totales

La mayoría de los trabajos encontrados en la literatura realizan la microoxigenación antes de la fermentación maloláctica, ya que se presentan mejores condiciones para que ocurran las reacciones de polimerización entre antocianos y taninos debido a que los compuestos fenólicos se encuentran en un estado de oxidación-polimerización reducido. En este trabajo se aplicó la microoxigenación finalizada la fermentación maloláctica. Después de la fermentación maloláctica en el vino se asegura una suficiente cantidad de acetaldehído para el desarrollo de productos de condensación entre antocianos y taninos, ya que antes de esta etapa el contenido de antocianos libres es menor y se podría ver favorecida la polimerización de taninos produciendo vinos más secos provocando la sobreoxidación del vino y la pérdida del color e incluso puede surgir el riesgo de deterioro microbiano (Schmidtke, et. al 2011). El aplicar la microoxigenación después de la fermentación maloláctica es similar al que ocurre cuando el vino envejece en barrica, aunque en barrica es más lento, y lo que se pretende es obtener una disminución de la astringencia del vino. (Larrasoña, 2010)

El contenido de polifenoles totales en los vinos sin microoxigenar de las tres vinificaciones (Cabernet Sauvignon, Merlot y mezcla) varió ya que la cantidad de polifenoles de las uvas es diferente dependiendo la variedad, estado de maduración y condiciones de crecimiento. Por lo tanto los hollejos presentes durante la fermentación alcohólica, tenían diferente contenido de polifenoles aportando diferentes cantidades de polifenoles a los vinos.

En el Anexo I (Tabla I) se muestran el contenido polifenólico del mosto y el vino control, el cual no se oxigenó, y el contenido polifenólico durante los tratamientos de microoxigenación de la vinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon.

El contenido de polifenoles de la vinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon muestra una tendencia creciente, desde el inicio de la microoxigenación hasta el día tres de ésta, posteriormente se observa una disminución del contenido polifenólico en los días cuatro y cinco. Esto se ejemplifica en los Gráficos 1 y 2.



Gráfico 1. Evolución del contenido polifenólico de la vinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon durante la microoxigenación 1mL/h

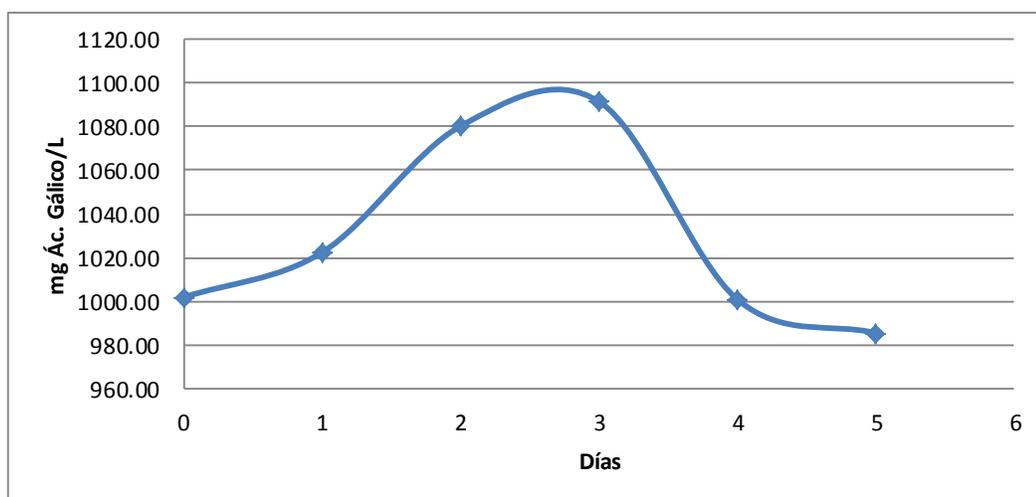


Gráfico 2. Evolución del contenido polifenólico de la vinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon durante la microoxigenación 1mL/día

El contenido polifenólico de la vinificación con uvas 100% Merlot mostró un incremento conforme el proceso de microoxigenación avanzaba. En el Anexo I (Tabla II) se muestran los resultados del contenido polifenólico total del mosto, los vinos control y los vinos microoxigeandos. Los vinos control corresponden a los vinos a los cuales no se le realizó el proceso de microoxigenación.

Comparando los resultados de los vinos control con los vinos microoxigenados se observa un contenido mayor de polifenoles totales en los vinos microoxigenados que en los vinos sin microoxigenar. En los Gráficos 3 y 4 se observa que el contenido polifenólico total es ascendente conforme se fue inyectando oxígeno en los dos diferentes tratamientos de microoxigenación a diferencia de la vinificación Cabernet Sauvignon en donde posteriormente se observa un decremento del contenido total de polifenoles.

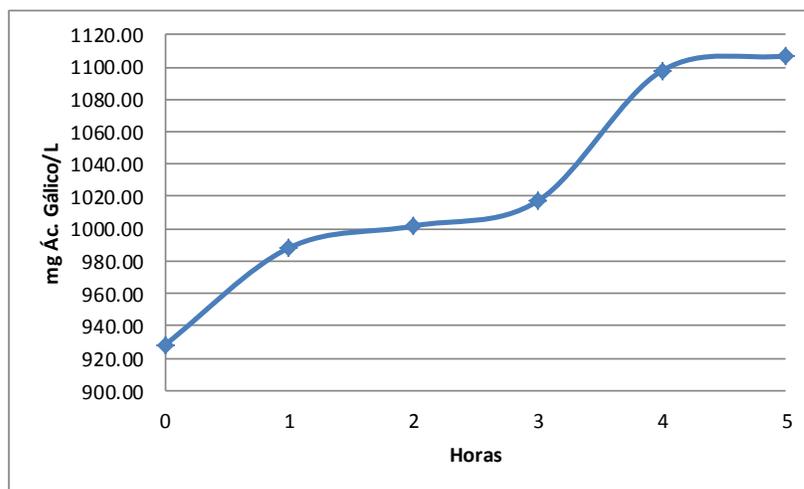


Gráfico 3. Evolución del contenido polifenólico de la vinificación con uvas 100% Merlot durante la microoxigenación 1mL/h

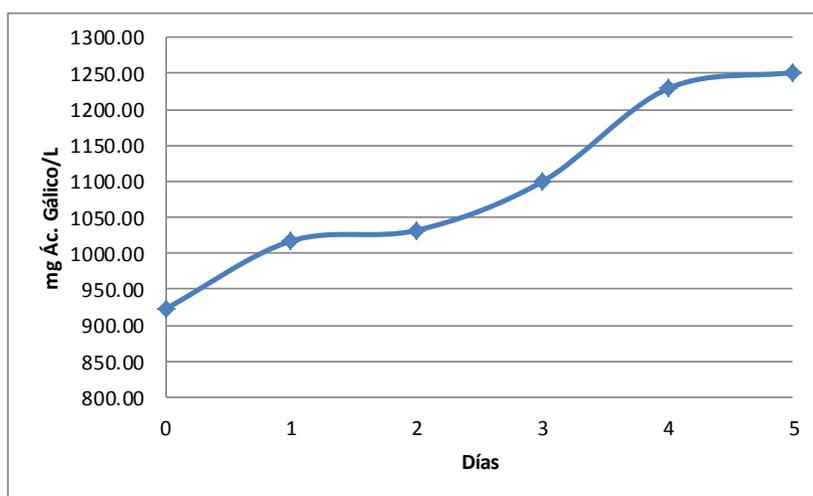


Gráfico 4. Evolución del contenido polifenólico de la vinificación con uvas 100% Merlot durante la microoxigenación 1mL/día

En el Anexo I (Tabla III) se muestran los resultados del contenido polifenólico total del mosto, del vino control, al cual no se le realizó el proceso de microoxigenación, y los vinos microoxigenados de la Mezcla Cabernet Sauvignon-Merlot (70-30) con sus dos diferentes tratamientos. En los vinos microoxigenados, se observó un incremento del contenido polifenólico en ambos tratamientos y posteriormente un decremento del contenido polifenólico total; en el caso de la microoxigenación por horas hubo un decremento al cuarto mililitro de oxígeno y en el tratamiento por días hubo un decremento al tercer día.

El incremento y decremento del contenido polifenólico total de los tratamientos de microoxigenación en la vinificación de la mezcla se ejemplifican en los Gráficos 5 y 6.

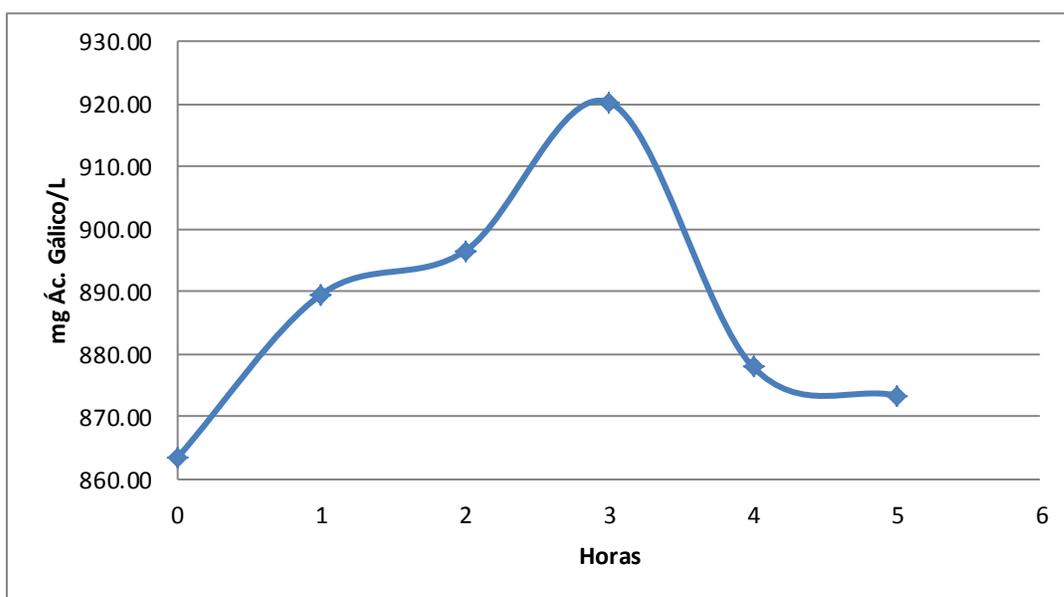


Gráfico 5. Evolución del contenido polifenólico de la vinificación de la mezcla de uvas Cabernet Sauvignon-Merlot (70:30) durante la microoxigenación 1mL/hora

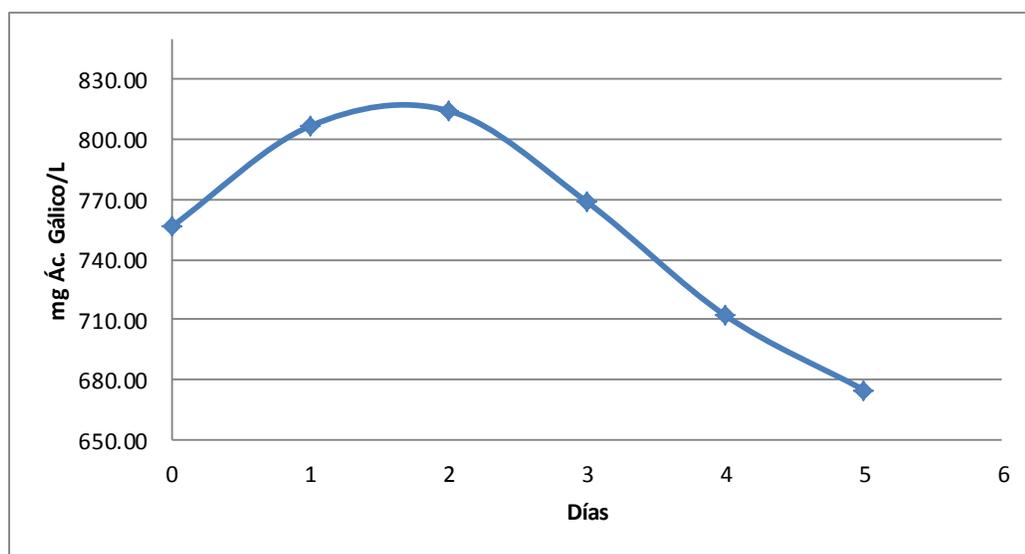


Gráfico 6. Evolución del contenido polifenólico de la vinificación de la mezcla de uvas Cabernet Sauvignon-Merlot (70:30) durante la microoxigenación 1mL/día

Comparando los resultados en cuanto al contenido polifenólico total de los vinos controles se puede observar que la vinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon presenta una concentración mayor en comparación con la vinificación con uvas 100% Merlot. Con respecto a la mezcla se observa que el contenido polifenólico de la mezcla es menor al encontrado para las otras dos vinificaciones aunque en su mayoría eran uvas Cabernet Sauvignon.

Los resultados obtenidos después de la microoxigenación de la vinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon se muestran en los Gráficos 1 y 2. Se muestra un incremento de los polifenoles totales hasta la tercera hora y tercer día (3 mL de oxígeno) de tratamiento de microoxigenación, posteriormente se observa un decremento de estos.

En la vinificación de las uvas 100% Merlot, el comportamiento es diferente ya que se observa un aumento del contenido polifenólico hasta el final de ambos tratamientos (Gráficos 3 y 4).

En la vinificación de la mezcla 70 % de uvas Cabernet Sauvignon y 30 % de uvas Merlot se observa un comportamiento similar a la vinificación con uvas 100 % Cabernet Sauvignon, ya que de igual forma, el contenido de polifenoles fue incrementado hasta la tercera inyección de oxígeno (3 mL) para ambos tratamientos.

Con los resultados de las tres vinificaciones se puede observar que la cantidad de oxígeno tolerado por cada especie de uva es diferente pero entre los tratamientos realizados no se observan grandes diferencias entre ellos.

El aumento de los polifenoles durante el proceso de microoxigenación se puede explicar debido a diferentes reacciones que ocurren entre los antocianos y taninos como la condensaciones antocianos-taninos, taninos-antocianos o la condensación por puentes de etilo durante el proceso de microoxigenación (Larrasoña, 2010). Esto va depender de la variedad de uva ya que cada variedad tiene distintas combinaciones de contenido polifenólico. Es por eso que se observan diferencias entre las vinificaciones de uvas Cabernet Sauvignon y Merlot, la vinificación Merlot en sus dos tratamientos de microoxigenación presenta un constante aumento del contenido polifenólico y la vinificación Cabernet Sauvignon a la tercer mililitro de oxígeno añadido empieza a disminuir el contenido polifenólico.

Sin embargo se observaron similitudes del comportamiento polifenólico y la microoxigenación entre las vinificaciones de las uvas Cabernet Sauvignon y mezcla, esto se pudo deber a que la mezcla se elaboró con un 70% de uvas Cabernet Sauvignon, por lo tanto los polifenoles en esta mezcla provienen principalmente de uvas Cabernet Sauvignon y muestran la misma tolerancia a la cantidad de oxígeno inyectado. La diferencia entre las vinificaciones con uvas 100% Cabernet Sauvignon y mezcla de uvas Cabernet Sauvignon-Merlot (70:30) con respecto a la vinificación con uvas 100% uvas Merlot, indica que las uvas Merlot aportaron taninos de mayor polimerización, tolerando una mayor concentración de oxígeno, ya que cuando la concentración de antocianos y taninos es equilibrada los antocianos permiten estabilizar a los taninos mediante condensación de acetaldehído bloqueando la polimerización de taninos.

Los resultados obtenidos se compararon con artículos relacionado con la microoxigenación de vinos:

Los resultados de Cano et. al. (2006) concluyen en que el periodo donde se observan ventajas de la microoxigenación es aquel comprendido entre el final de la fermentación alcohólica y el inicio de la fermentación maloláctica, momento en que los

vinos poseen alta concentración de antocianos libres y donde un exceso de acetaldehído no es un problema, puesto que éste desaparecerá durante la fermentación maloláctica. En un vino con un contenido fenólico medio-alto y suficiente cantidad de antocianos libres, la dosificación de oxígeno antes de la fermentación maloláctica, seguido de otro periodo de microoxigenación una vez finalizada la fermentación maloláctica, produce la máxima extensión de las reacciones de formación de nuevos pigmentos derivados de los antocianos y el máximo incremento del color del vino. Su estudio fue realizado con vinos de uvas Monastrell uno se microoxigenó después de la fermentación alcohólica y antes de la fermentación maloláctica y otro después de la fermentación maloláctica. Al comparar los resultados observaron un mayor índice de polifenoles totales en el vino microoxigenado antes de la fermentación maloláctica

Comparando resultados de color obtenidos en este trabajo a los obtenidos por Canoet et al. (2006) al inyectar pequeñas cantidades de oxígeno a los vinos elaborados se obtuvo un aumento del contenido polifenólico total.

Así se puede concluir que el proceso de microoxigenación después de la fermentación maloláctica ayuda a la estabilización de los compuestos polifenólicos siempre y cuando se aplique la cantidad correcta de oxígeno.

Con base en el estudio realizado por Pino, et.al (2008) se estudiaron vinos de la variedad Tempranillo en donde el contenido polifenólico total en el vino microoxigenado es mayor, las reacciones mayoritarias se asumen que son la condensación por puentes de acetilo o condensación antocianos directas debido a que analizando el contenido de antocianinas el contenido es menor y la intensidad colorante de colores rojizos azulados es mayor.

La dosis adecuada de oxígeno que debe aplicarse a cada vino va a depender de las condiciones iniciales del vino, principalmente del contenido inicial de taninos y antocianos. Además hay que tomar en cuenta que la cantidad de oxígeno disuelto en el vino tiene que ser menor a la consumida, para evitar que ocurran reacciones de oxidación indeseables.

Para posteriores experimentos sería conveniente determinar la capacidad de tolerancia de oxígeno a las diferentes variedades de uva a utilizarse, determinando la solubilidad de oxígeno en el vino y la capacidad antioxidante de cada vino elaborado.

Para futuros experimentos sería deseable analizar el contenido inicial de antocianos y taninos del vino para determinar la cantidad de oxígeno a inyectar.

-Color

El color es una de las características organolépticas del vino tinto que van a definir su calidad. Los compuestos fenólicos presentes en la piel de la uva tinta van a ser los responsables del color del vino tinto siendo los antocianos y los taninos (flavanoles polimerizados o procianidinas) los compuestos más relevantes en relación al color y estabilidad de los vinos tintos (Romero, 2008).

La determinación de los parámetros de color de la vinificación Cabernet Sauvignon se realizó al final del proceso de microoxigenación, para comparar los vinos control con los vinos microoxigenados.

En los resultados de la vinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon (Tabla 10) se observa una mayor tendencia del color rojo (a*) y una mayor intensidad del color (C*) con el tratamiento de oxigenación por horas. En la tonalidad (h*) no se observa una gran diferencia entre los resultados de ambos tratamientos.

Tabla 10. Parámetros Cie-LAB de la vinificación con uvas 100% Cabernet Suavignon

Cabernet Suavignon			
	Control	Oxi 1mL/h	Oxi 1mL/día
L*	1.67 ± 0.21	3.40 ± 0.10	2.40 ± 0.0
C*	7.58 ± 0.82	24.73 ± 0.51	17.52 ± 0.05
h*	13.66 ± 0.0	13.80 ± 0.03	13.68 ± 0.05
a*	7.32 ± 0.71	24.02 ± 0.49	17.02 ± 0.05
b*	1.86 ± 0.31	5.90 ± 0.13	4.13 ± 0.0

Oxi. (Microoxigenación)

Para esta vinificación y la siguiente vinificación con mezcla de uvas Cabernet Sauvignon-Merlot la determinación de los parámetros de color se realizó cada hora o

cada día según correspondía el experimento de microoxigenación, con el fin de poder analizar mejor resultados de color conforme avanzaba el proceso.

Tabla 11. Parámetros Cie-Lab de la vinificación con uvas 100% Merlot

Color Merlot Oxigenación 1mL/h						
	Control	1h	2h	3h	4h	5h
L*	1.2 ± 0.91	3.04 ± 0.26	3.13 ± 0.06	3.55 ± 0.26	3.20 ± 0.14	2.64 ± 0.06
C*	8.55 ± 0.52	18.32 ± 0.37	18.93 ± 0.44	23.85 ± 0.56	22.04 ± 0.28	18.74 ± 0.42
h*	14.06 ± 0.73	14.33 ± 0.16	14.04 ± 0.16	14.70 ± 0.25	14.42 ± 0.09	14.06 ± 0.06
a*	8.27 ± 2.45	17.54 ± 0.39	21.29 ± 0.38	23.05 ± 0.37	21.34 ± 0.17	20.31 ± 0.40
b*	2.14 ± 0.32	5.26 ± 0.32	5.57 ± 0.06	6.13 ± 0.29	4.76 ± 0.18	4.34 ± 0.17

En la vinificación con uvas 100% Merlot la tendencia del color rojo (a*) e intensidad del color (C*) se ve incrementada hasta los 3mL de oxígeno añadido en el tratamiento de inyección por horas (Tabla 11), posteriormente en las siguientes dos inyecciones se observa un decremento en estos valores. En cambio, en el tratamiento de inyección por días (Tabla 12) se observa una tendencia de crecimiento de estos parámetros conforme se van realizando las inyecciones de oxígeno hasta llegar al día 5. La tonalidad (h*) no muestra cambios significativos en ambos tratamientos.

Tabla 12. Parámetros Cie-LAB de la vinificación con uvas 100% Merlot

Merlot Oxigenación 1mL/día						
	Control	1 día	2 día	3 día	4 día	5 día
L*	1.2 ± 0.91	1.34 ± 0.49	1.78 ± 0.65	1.85 ± 0.10	2.25 ± 0.45	2.39 ± 0.46
C*	8.55 ± 0.52	8.94 ± 2.46	12.02 ± 0.76	13.33 ± 0.40	15.27 ± 0.84	16.74 ± 0.56
h*	14.06 ± 0.73	14.35 ± 0.24	14.67 ± 1.09	13.86 ± 0.08	14.08 ± 0.98	14.12 ± 0.84
a*	8.27 ± 2.45	8.70 ± 0.21	11.68 ± 0.65	12.95 ± 0.39	15.31 ± 1.44	16.23 ± 0.66
b*	2.14 ± 0.32	2.21 ± 0.85	2.82 ± 0.64	3.20 ± 0.015	3.85 ± 0.43	4.10 ± 0.32

En la vinificación de la mezcla de uvas Cabernet Sauvignon-Merlot (70:30) se observó un incremento en la tendencia del color rojo (a*) y la intensidad del color (C*) conforme se inyectó oxígeno en ambos tratamientos (Tablas 13 y 14). En cuanto a la tonalidad (h*) no se observan grandes diferencias conforme avanzan las inyecciones de oxígeno en ambos tratamientos.

Tabla 13. Parámetros Cie-Lab de la vinificación de la mezcla de uvas Cabernet Sauvignon-Merlot (70:30)

Microoxigenación 1mL/h						
	Control	1h	2h	3h	4h	5h
L*	2.0 ± 0.0	2.80 ± 0.0	3.20 ± 0.0	3.90 ± 0.0	4.80 ± 0.0	6.40 ± 0.0
C*	14.88 ± 0.20	17.77 ± 0.0	23.44 ± 0.0	27.33 ± 0.02	31.62 ± 0.10	37.36 ± 0.06
h*	13.76 ± 0.01	15.41 ± 0.02	13.65 ± 0.0	13.76 ± 0.0	15.17 ± 0.03	17.23 ± 0.03
a*	14.46 ± 0.19	17.10 ± 0.03	22.73 ± 0.05	26.54 ± 0.02	30.51 ± 0.09	35.68 ± 0.05
b*	3.54 ± 0.05	4.72 ± 0.0	5.52 ± 0.02	6.50 ± 0.0	8.28 ± 0.04	11.07 ± 0.04

Tabla 14. Parámetros Cie-Lab de la vinificación de la mezcla de uvas Cabernet Sauvignon-Merlot (70:30)

Microoxigenación 1mL/día						
	Control	1día	2día	3día	4día	5día
L*	2.0 ± 0.0	2.10 ± 0.0	2.20 ± 0.0	2.50 ± 0.0	2.70 ± 0.0	3.0 ± 0.0
C*	14.88 ± 0.20	14.90 ± 0.05	16.05 ± 0.02	17.97 ± 0.02	19.85 ± 0.02	21.77 ± 0.10
h*	13.76 ± 0.01	13.77 ± 0.0	13.79 ± 0.0	13.71 ± 0.0	13.65 ± 0.0	13.65 ± 0.0
a*	14.46 ± 0.19	14.47 ± 0.05	15.59 ± 0.02	17.46 ± 0.02	19.29 ± 0.02	21.16 ± 0.10
b*	3.54 ± 0.05	3.55 ± 0.01	3.82 ± 0.01	4.26 ± 0.01	4.68 ± 0.01	5.13 ± 0.03

En las tres vinificaciones realizadas se aprecia que los valores de (b*) son pequeños en comparación con los resultados (a*), ya que el principal color de los vinos tintos es el rojo lo cual es comprobado con los resultados obtenidos en las tres vinificaciones que para ambos tratamientos de microoxigenación muestran una mayor tendencia hacia el color rojo a* y una ligera tendencia hacia el amarillo b*. Estos resultados se pueden explicar debido a las reacciones que ocurren en el vino con el contacto con el oxígeno como: la condensación de antocianos y taninos en donde se forman pigmentos que son responsables del incremento del color, ya sea de forma directa o bien actuando el acetaldehído como puente de unión, así como por la cicloadición de otros compuesto como ácido glicoxílico, vinilfenoles, ácido pirúvico. También el acetaldehído con los antocianos, generan piranoantocianos (vitisinas, antocianos-vinilfenoles y antocianos-vinilflavanoles) que son moléculas que dan un mayor color rojizo. La presencia de estos pigmentos, que son más resistentes a las variaciones de pH, a la decoloración de sulfuroso y a las oxidaciones que los antocianos libres, incrementa y estabilizan el color del vino (Blanco D, 2013)

Los valores de luminosidad (L*) son valores cercanos a cero, esto indica que el vino es de un color más oscuro y que puede presentar turbiedad, ya que no se permite demasiado el paso de la luz. En las tres vinificaciones realizadas los parámetros de

luminosidad fueron aumentando ligeramente conforme si iba añadiendo oxígeno en ambos tratamientos lo cual nos indica que los vinos se hicieron ligeramente más claros perdiendo turbiedad y mejorando la calidad del color, obteniéndose colores rojizos más brillosos. Esto puede deberse a que conforme ocurrían las reacciones de polimerización de antocianos y taninos la cantidad de precipitados disminuía.

Se ha visto que la extensión de las reacciones de formación de los diversos pigmentos está influenciada por el contenido inicial de compuestos fenólicos de los vinos que se están tratando y esto tiene gran influencia en la evolución del color. Las reacciones de condensación, polimerización y oxidación dependen del oxígeno y son las responsables de la formación de nuevos pigmentos y compuestos poliméricos que estabilizan el color. Este tipo de reacciones van a depender de la temperatura y el pH del vino. (Cano, 2006).

Con base en un estudio de Geldenhuys et al. (2012) en donde se analizaron 6 tanques con vino, de los cuales 2 fueron tomados como controles, es decir no fueron microoxigenados, 2 fueron microoxigenados con un total de 16 mg/L de oxígeno en un periodo de 8 días siendo inyectados en promedio 2 mg/L de oxígeno por día y otros 2 fueron microoxigenados con un total de 32 mg/L de oxígeno en un periodo de 8 días siendo inyectados en promedio 4mg/L de oxígeno por día. La microoxigenación se realizó antes de la fermentación maloláctica. Los resultados muestran que existieron diferencias significativas en los parámetros de intensidad colorante, antocianos libres, pigmentos poliméricos y fenoles poliméricos entre los vinos controles y los vinos microoxigenados antes de la fermentación maloláctica. Antes de la fermentación maloláctica y la microoxigenación no se observan diferencias significativas en los resultados de la intensidad colorante, antocianos libres y fenoles polimerizados entre los vinos controles y los vinos microoxigenados. Comparando ambos tratamientos realizados por ellos no se observan diferencias significativas entre ambos tratamientos. Al final concluyen que la microoxigenación es benéfica en términos de desarrollo de color en el vino tinto de uvas Pinotage ya que los vinos microoxigenados mejoraron sus parámetros de color en comparación de los vinos control.

En general al finalizar el análisis de los vinos se puede observar que:

-El contenido de polifenoles totales y sus reacciones dependen del tipo de uva, de las condiciones de crecimiento, maduración y capacidad de solubilidad y tolerancia al oxígeno.

-La concentración de oxígeno necesaria para estabilizar el contenido polifenólico de un vino depende de la variedad de uva que provenga ya que depende de las condiciones de crecimiento y maduración de la uva.

-Todos los vinos elaborados cumplen con los parámetros fisicoquímicos establecidos en las normas europeas y mexicanas.

-Es importante la realización de este estudio porque no existe mucha investigación en México acerca de la microoxigenación de vinos ya que la mayoría de investigación de vinos es acerca de parámetros fisicoquímicos y parámetros volátiles de los vinos para vinificaciones convencionales.

-La microoxigenación puede ser una herramienta para ayudar en la elaboración de vinos en menor tiempo, porque reduce el tiempo de maduración de los vinos, ya que la microoxigenación sustituye el tiempo que el vino permanece en barricas.

- El que un vino cumpla con los parámetros fisicoquímicos establecidos en las normas, no significa que se obtuvo un vino de calidad ya que el vino elaborado con uvas 100% Cabernet Sauvignon presentó contaminación por un microorganismo y sus parámetros fisicoquímicos estuvieron dentro de los límites permitidos por las normas. Por lo tanto, además de los análisis fisicoquímicos es necesario realizarle a los vinos análisis microbiológicos y sensoriales para determinar su calidad.

7. Conclusiones

- Al analizar los efectos de la microoxigenación aplicada después de la fermentación maloláctica en las microvinificaciones de vinos tintos se determinó que los parámetros analizados que cambian después de la microoxigenación son el contenido de sulfitos libres y combinados, el contenido polifenólico total y el color.
 - El pH, los azúcares reductores, grado alcohólico y acidez volátil, no se ven afectados por los tratamientos de la microoxigenación.
 - Comparado los resultados de los tratamientos de microoxigenación por horas y por días no se observan muchas diferencias en cuanto al resultado del contenido de polifenoles totales.
 - Si se inyecta al vino una concentración de oxígeno mayor a la que este puede asimilar el contenido polifenólico disminuye.
 - Los vinos microoxigenados presentaron mayor intensidad de color rojizo que los vinos controles.
 - El tratamiento de microoxigenación por horas da mejores resultado en los parámetros de color rojo (a^*) y luminosidad (L^*) en cuanto a las características cromáticas de los vinos.
 - Con los resultados obtenidos del estudio realizado en las vinificaciones con uvas 100% Cabernet Sauvignon, 100% Merlot y mezcla Cabernet Sauvignon-Merlot (70:30) se concluye que el tratamiento de microoxigenación por horas presentó mejores resultados que el tratamiento de microoxigenación por días, ya que para el primer tratamiento se obtuvieron mayores resultados de la tendencia al color rojo (a^*) y luminosidad (L^*) lo cual nos dice que los vinos presentaban en color rojizo más fuerte y brillante.
 - Comparando los resultados de Geldenhuys, Oberholster y du Toit (2012) con los del estudio realizado en nuestro laboratorio se llegó a la conclusión, que la microoxigenación en condiciones adecuadas es benéfica para el desarrollo de la calidad del color de los vinos tintos y que es mejor oxigenar en períodos de tiempo menor para mejorar el color de las vinificaciones cuando se usan uvas Cabernet Sauvignon y Merlot.

Anexo I

Tabla I. Contenido polifenólico para vinificación con uvas 100% Cabernet Sauvignon

Microoxigenación														
	Mosto	Control	Tratamiento 1mL/h					Tratamiento 1mL/día						
			0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
Polifenoles mg. Ác. Gálico/L	975.38 ± 1.85	1005.47 ± 12.87	1011.88 ± 5.87	1047.74 ± 6.58	1072.25 ± 8.37	1074.37 ± 5.88	1057.99 ± 7.90	1010.76 ± 12.75	1001.78 ± 3.88	1022.42 ± 1.46	1080.35 ± 21.73	1091.53 ± 6.06	1000.69 ± 4.98	985.36 ± 3.52

Tabla II. Contenido polifenólico para vinificación con uvas 100% Merlot

Microoxigenación														
	Mosto	Control	Tratamiento 1mL/h					Tratamiento 1mL/día						
			0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
Polifenoles mg. Ác. Gálico/L	700.79 ± 6.45	929.05 ± 8.08	928.25 ± 13.54	988.27 ± 31.09	1001.68 ± 36.96	1017.14 ± 35.07	1097.71 ± 36.88	1106.96 ± 33.15	922.75 ± 16.75	1016.99 ± 10.82	1031.87 ± 12.24	1099.50 ± 12.31	1228.89 ± 11.60	1251.54 ± 14.27

Tabla III. Contenido polifenólico para vinificación de la mezcla Cabernet Sauvignon-Merlot (70:30)

Microoxigenación														
	Mosto	Control	Tratamiento 1mL/h					Tratamiento 1mL/día						
			0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
Polifenoles mg. Ác. Gálico/L	656.79 ± 4.45	750.38 ± 1.60	863.46 ± 7.09	889.58 ± 7.07	896.54 ± 6.54	920.29 ± 7.38	877.95 ± 0.87	873.40 ± 6.52	756.63 ± 3.78	806.86 ± 5.19	814.39 ± 5.22	768.72 ± 2.97	711.96 ± 5.11	674.78 ± 3.79

Bibliografía

-Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias. [En línea] (Actualización 2012).

Disponible:

en:

<http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Aditivos%20y%20coadyuvantes%20en%20alimentos/Aditivos-y-coadyuvantes-en-alimentos.aspx> [Último acceso 5 de junio de 2015]

- Aleixandre B. y Aleixandre T. (2011) *Conocimiento del vino cata y degustación*. Universidad Politécnica de Valencia, España. p.p 33-34

-Blanco D. (2013). *Formación y Evolución de Pigmentos de Tipo Piranoantociano en la elaboración de vinos Tintos Y Rosados*. Tesis doctoral. Universidad de Castilla La Mancha.

- Borden E. y Searpa J. (1998). *Análisis químico del vino*. Universidad católica de Chile, Chile. p.p. 55, 81, 87, 88, 125, 146

-Cano M., Pardo F., López J., Gómez E. (2006) *Efectos de la micro-oxigenación en vinos tintos de monastrell. Influencia de la composición polifenólica del vino y del momento de aplicación*

Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. Murcia, Spain. p.p. 2-5 [En línea]

Disponible:http://www.navarra.es/home_es/Gobierno+de+Navarra/Organigrama/Los+departamentos/Desarrollo+Rural+Industria+Empleo+y+Medio+Ambiente/Organigrama/Estructura+Organica/Evena/Publicaciones/Otras+publicaciones/Experiencias+en+enologia/Experiencias+de+microoxigenacion+en+vinos+tintos+de+Navarra.htm [Último acceso 7 de junio de 2015]

-Casassa F. y Sari S. (2006) *Aplicación del Sistema Cie-Lab a los vinos tintos. Correlación con algunos parámetros tradicionales* [versión electrónica]. Centros de estudios de enología, Revista Enológica. No. 3 Noviembre-Diciembre 2006.

- Cejudo- Bastante M.J. et. al. (2011). Effect of wine micro-oxygenation treatment and storage period on color-related phenolic, volatile composition and sensory characteristics. *LWT- Food Science and Technology* 44: 866-874.

-Consejo Mexicano Vitivinícola. *Estadísticas del vino en México*. [En línea] Disponible en: <http://www.uvayvino.org/index.php/noticias/22-economia-y-mercados> [Último acceso 14 de octubre de 2015].

- Compendio de métodos internacionales de análisis de los vinos y mostos Vol. 1 y Vol. 2. Organización Internacional de la Viña y el Vino [En línea] Disponible en: <http://www.oiv.int/oiv/info/esmethodesinternationalesvin> [Último acceso 19 de Septiembre de 2015]

-Delanoe D. et al., 2003. *El vino, de análisis a la elaboración*. Acribia. Zaragoza, España

- De Serdio Ernesto (2001) *Maloláctica: una fermentación que no es 'secundaria' en la enología moderna (I)* [En línea] p.p. 10-15

Disponible en: <http://www.verema.com/articulos/501110-malolactica-fermentacion-que-no-secundaria-enologia-moderna-i> [Último acceso 17 de Mayo de 2015].

-E. Lerm, L. Engelbrecht y M. du Toitl. (2010) *The ABC's of Malolactic Fermentation*. Department of Viticulture and Oenology, Stellenbosch University, Private Bag XI, Matieland (Stellenbosch), South Africa.

- Ferrer M. (2008). *Bioteología para principiantes*. Reverte. Barcelona, España. p.p. 2, 3, 8, 9, 10.

-Geldenhuis L. Oberholster A. y du Toit W. (2012) Monitoring the Effect of Micro-oxygenation before Malolactic Fermentation on South African Pinotage Red Wine with Different Colour and Phenolic Analyses. *South African Enologic Journal*. Vol. 33 No 2. p.p. 151, 158, 159.

- Gómez E. y Cano M. (2010) *A review on micro-oxygenation of red wines: Claims benefits and the underlying chemistry*. *Food Chemistry* 125: 1131–1140

- Hidalgo José. (2003) *Tratado de Enología*, Tomo 2, Madrid, Mundi-Prensa. p.p. 757
- Ibar Leandro, (2001). *El libro del vino*, Edit de Vecchi, Barcelona, España p.p 230
- Jobe J. et al., 1973. *El gran libro del vino*. Blume. Barcelona, España. p.p. 378
- Larrasoaña M., 2010, *Microoxigenación: Evolución polifenólica a corto-mediano plazo*. Universidad Pública de Navarra, España. p.p. 3-16
- Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino. Agencia Estatal. Boletín de Estado Gobierno de España. . [En línea] (Actualización 2015).
 Disponible: en: <http://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2003-13864> [Último acceso 10 de septiembre de 2015]
- Mataix E. y Luque de Castro M. (1998). *Determination of total and free sulfur dioxide in wine by pervaporation-flow injection*. Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, España. The analyst Vol. 123 (1547-1549)
- Moreno, M., Hernández, T., Estrella, I., Ruíz, F. (2006). *Diversidad metabólica de Oenococcus oeni y lactobacillus plantarum durante la fermentación maloláctica: efecto en la composición fenólica no antocianica de vinos tintos*. Disponible en: http://enologos2008.unicongress.org/congreso_logroo_2007/comunicaciones_presentadas. [Último acceso 17 de mayo de 2015]
- Moreno, A.M. y Polo, M. C. (2009) *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, E.U.A. p.p 3-7
- Noguez V., 2006. *El papel de la microbiología enológica y su importancia en la elaboración de vinos de calidad*. Trabajo monográfico de actualización de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino, *Codex Enológico Internacional* [En línea] (Edición 2006).
 Disponible en: www.oiv.int/oiv/files/5%20.../5%20.../5-1-12_Codex_2006_ES.pdf

Internacional [Último acceso 13 de abril de 2015].

-Organización Internacional de la Viña y el Vino, *World Vitiviniculture situation*. [En línea] (Publicado Julio 2015). Disponible en: http://www.oiv.int/oiv/info/es-Bilan_OIV_Mainz_2015. [Último acceso 14 de octubre de 2015].

-Pino C. Bartolomé B. et al.(2008) La microoxigenación en la evolución de los polifenoles, el color y las características sensoriales de un vino tinto cv Tempranillo durante su elaboración. *Enólogos Investigación y Ciencia*. 52. p.p. 42-45.

-Pérez, S., 2001. *El vino, arte que se puede beber*. Panorama, México

-Parzanese Magali, 2014. *Microoxigenación y crianza sobre lías en vinos*. Tecnologías para la industria alimentaria. Ficha N^o17 Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca Argentina. Disponible: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/sectores.php?secc=tecnologia>. [Último acceso 14 de enero de 2016]

-Rankine B. (1989) *Manual práctico de enología*. Acribia. Zaragoza España. p.p 339,340

-Romero, I. (2008). *Extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino. Papel de las enzimas de Maceración*. Tesis de Doctorado. Universidad de Murcia, Murcia, España.

-Salinas M. (2011). *Determinación de polifenoles totales y cafeína en granos de café verde y tostado*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

-Sánchez A. et al. (2014). Influence of controlled inoculation of malolactic fermentation on the sensory properties of industrial cider. *Sociedad de la industria microbiológica y biotecnología*.

-Schmidtke L. Clark A. y Scollary G. (2011) Microoxygenation of Red Wine: Techniques, Applications and outcomes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* p.p. 126-127.

- Unión Europea, Reglamento CE N^o 1493/1999 [En línea] (Edición 1999).

Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1999R1493:20060104:ES:PDF>
[Último acceso 17 de abril de 2015]

-Vogt J. y Jakob L. (1984) *El vino: Obtención, elaboración y análisis*. 9a edición. Acribia. Zaragoza, España.

-Zoecklein B. et al. (2001) *Análisis y producción de vino*. Acribia. Zaragoza España p.p. 79, 84, 112, 159, 199