



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DEL pH, CONCENTRACIÓN DEL
SULFUROSO, TEMPERATURA Y TIEMPO DE
AÑEJAMIENTO SOBRE LAS ANTOCIANINAS
MONO Y POLIMÉRICAS EN EL VINO TINTO
ELABORADO CON CABERNET SAUVIGNON.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)**

P R E S E N T A :

M. en C. JOSÉ RAMÓN VERDE CALVO

**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. CRISTINA PÉREZ-AMADOR BARRÓN**

MEXICO, D.F.



2006

**DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO**



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.

AGADECIMIENTOS

A la **Dra. Cristina Pérez-Amador Barrón**, por su apoyo, confianza y amable asesoría.

A todos y cada uno de los miembros del jurado que me hicieron el favor de corregir y hacer sugerencias para aumentar el valor científico de éste trabajo.

Muy particularmente a mi familia:

Mi esposa **Leticia** que con su amor y paciencia me dio ánimos para continuar.

Mis hijos **Gabriela y Adolfo**, que siempre estuvieron conmigo, dando alegría y sugerencias para continuar hasta el fin del trabajo.

ÍNDICE

Resumen	1
1.0 Introducción	2
2.0 Antecedentes	5
2.1 Antocianinas en uvas	
2.1.1 Estructura de las antocianinas	5
2.1.2 Propiedades fisicoquímicas	11
2.1.3 Presencia de antocianinas en uvas y otros frutos	12
2.1.4 Influencia de las antocianinas en vinos	13
2.2 Efectos sobre:	
2.2.1 La estabilidad del color de las antocianinas	12
2.2.2 Estructurales	14
2.2.3 La concentración	16
2.2.4 El pH	16
2.2.5 El anhídrido sulfuroso	18
2.2.6 La temperatura	19
2.2.7 El oxígeno	20
2.2.8 La luz	21
2.2.9 Las enzimas	21
2.2.10 El ácido ascórbico	22
2.2.11 Los azúcares	22
2.3 Copigmentación	23
2.3.1 Copigmentos	26
2.3.2 Copigmentación intermolecular	27
2.3.3 Copigmentación intramolecular	28
2.3.4 Semireacciones de asociación	29
2.3.5 Formación de complejos metálicos	30
2.4 Añejamiento	30
2.5 La importancia de los compuestos fenólicos a nivel industrial y fisiológico.	34
2.5.1 Tipos y fuentes de flavonoides	35
2.5.2 Dieta y flavonoides	36
2.5.3 Acción antioxidante de los flavonoides	36
2.5.4 Flavonoides y carcinogénesis	38
3. Objetivos	39

4. Método	41
4.1. Separación y caracterización de antocianinas en el hollejo	42
4.2. Elaboración del vino tinto	47
4.3 Medición del color	50
4.4. CIELAB análisis en el cambio de color de los vinos añejados	51
4.5. Análisis estadístico	53
5. Resultados y discusión	54
5.1 Separación y caracterización de antocianinas en el hollejo	54
5.2 Elaboración del vino	75
5.3 Medición de color	79
5.4 CIELab análisis en el cambio de color de los Vinos añejados	96
5.5 Análisis estadístico	99
6 Conclusiones	106
7 Bibliografía	108
8 Anexos	
8.1 Lista de abreviaturas	117
8.2 Cuadros de valores de medición de color	119

RESUMEN

Se estudió la composición de antocianinas presentes en la uva *Cabernet Sauvignon* del estado de Zacatecas, México y sobre el vino tinto elaborado con ellas, el efecto del pH, concentración del sulfuroso y temperatura sobre las antocianinas mono y poliméricas en el cambio de color del vino durante el añejamiento.

Se utilizaron técnicas cromatográficas (CLAR y CGL) para determinar las antocianinas del hollejo fresco de la uva *Cabernet Sauvignon*. Se cuantificó la concentración inicial de antocianinas y durante todo el tiempo que del proceso de añejamiento (18 meses). Se determinó la influencia del pH (3.0 y 3.5), concentración de SO₂ (30 y 50 ppm), temperatura (15 y 25° C) y tiempo de almacenamiento sobre: el color del vino, la densidad del vino, el tinte del vino, la concentración de las antocianinas mono y poliméricas y la edad del vino. Además se estudió el efecto de la fermentación maloláctica en la determinación de la edad química del vino tinto elaborado, como un método para medir el añejamiento.

Se separaron y caracterizaron 9 antocianinas. Encontrándose 5 antocianinas monoméricas y 4 antocianinas aciladas: la delfinidina 3-glucósido, la cianidina 3-glucósido, la petunidina 3-glucósido, la peonidina 3-glucósido y la malvidina 3-glucósido. De las antocianinas aciladas se encontraron: la definidina 3-glucósido acilada con ácido acético, la malvidina 3-glucósido acilada con ácido acético, la peonidina 3-glucósido acilada con ácido cumárico y la malvidina 3-glucósido acilada con ácido cumárico. La glucosa fue el único carbohidrato encontrado. Se elaboró el vino tinto y la mitad fue fermentado malolácticamente con *Lactobacillus brevis* y *Pediococcus pentosaceus*. En las dos mitades, se observaron los cambios ocurridos en los compuestos fenólicos durante el añejamiento. Se observó que la concentración de antocianinas poliméricas y la edad química aumentaron. La condición en la que se obtuvo un valor más alto de edad química fue: pH 3.0, 50 ppm de SO₂ y 25° C, encontrándose que los vinos inicialmente más ácidos y no fermentados malolácticamente, rindieron los índices más altos de edad química ($p < 0.05$). El aumento de la edad química dio una relación directamente proporcional con respecto al tiempo, por lo que es factible el tener un control en el proceso de añejamiento y obtener vinos de color estándar.

1.0 INTRODUCCIÓN

La vid en México y en particular en Zacatecas

La vid llegó a la Nueva España en 1518, con la expedición de Juan de Grijalva, posteriormente Hernán Cortés ordena a los vecinos españoles “el sembrar 1000 sarmientos por cada 100 indios que tuvieran en repartidos”. Desde entonces se inició su cultivo en gran escala con el propósito esencial de elaborar vinos y cubrir la creciente demanda interna. Pero el 24 de enero de 1545 Felipe II, prohíbe la manufactura de vinos en la Nueva España a fin de proteger la industria vitivinícola de la península Ibérica, lo cual interrumpió el auge que venía cobrando la elaboración de vinos en nuestro país (Reyes-Dorantes y Col., 1992).

Debido a esto la vitivinicultura se aletargo durante más de 4 siglos. Actualmente varios estados de la República cultivan de manera rentable la vid, entre ellos, los más importantes son Aguascalientes, Baja California, Coahuila, Durango, Zacatecas, Querétaro, Chihuahua, Guanajuato y San Luis Potosí. La producción vitícola del país tiene prácticamente tres destinos: uva para mesa, uva pasa y la que se destina para la industria. La uva para la industria vitivinícola se aprovecha para la fabricación de brandys y vinos de mesa que se distribuyen en los mercados nacional e internacional, fundamentalmente con cultivares de uvas rojas y blancas.

Los cultivares de uva rojas más demandadas son: Pinot noir, Ruby cabernet, Petite sirah, Grenache, Malber, Cabernet sauvignon, Cariagne y Zinfandel. Entre las blancas, las variedades más utilizadas son Sauvignon blanc, Palomino, Chenin blanc, San emilion, Pinot blanc y White riesling. Para el consumo en fresco, se demanda más la uva Emperador y Cardinal.

Para el presente estudio se seleccionaron uvas del estado de Zacatecas. La vitivinicultura en este estado presenta dos fases. La primera se ubica en la época de la conquista y la otra en la época colonial, en donde los que tenían la exclusividad del cultivo de la vid eran los frailes. De Zacatecas partieron varias misiones a San Diego y San Juan Capistrano. Esto ocurrió durante la época de Felipe II, cuando ordeno la quema de todos los viñedos y de todos los productos que fueran destilados.

La historia actual de la viticultura zacatecana empieza en 1970, cuando de Estados Unidos y de Europa vinieron especialistas para asesorar a los productores acerca de cuales eran las variedades más propicias para la

instalación de los viñedos. Es así que en 1979, se tenían cerca de ocho mil hectáreas plantadas. Las compañías productoras de vino en el estado son El Saucito, que elabora Carrera, Los Pioneros, Cavas del Altiplano, Cantera y Plata, y Los Cacholá.

En México se producen más de 300 000 toneladas de uva (Cuadro 1.1), las cuales no son suficientes para la producción vinícola, que se encuentra entre un millón 800 a dos millones de cajas anuales de vino. Las marcas internacionales compiten con las nacionales para surtir esa cantidad, que al prorratearse entre los productores resulta en ventas muy pequeñas. Hay dos empresas con cobertura de mercado nacional, Domecq y Cetto. Entre otras grandes están Santo Tomás y Casa Madero, que tienen buenos vinos, pero con un mercado muy reducido.

Cuadro 1.1 Comparación anual del 30 de noviembre 2004 y 2005 (SAGARPA, 2005).

Product o	Superficie (Ha)						Producción (Ton)		
	Sembrada			Cosechada			2004	2005	Var (%)
	2004	2005	Var (%)	2004	2005	Var (%)			
Uva	35960	31091	-13.54	34068	29964	-12.05	314331	330364	5.1

Var = variación

La cultura del vino en México está frenada porque nuestro desarrollo vinícola se ha enfocado a la producción de bebidas de alta graduación alcohólica y no es sino hasta los últimos años en que el consumo del vino se ha incrementado. Los grandes y pequeños productores han empezado a exportar sus productos, que han obtenido reconocimientos en los concursos anuales de cata que se realizan en el viejo mundo.

A finales del siglo pasado, se realizó en Baja California el Congreso Internacional de la Viña y el Vino. Al Dr. Jean Cuse Director del Instituto Enológico de Burdeos, le llamó mucho la atención los vinos de Zacatecas debido a su alto contenido de compuestos fenólicos, así como el color que daban las uvas zacatecanas, y además, que la zona de cultivo se encuentra sobre los 2200 m sobre el nivel del mar. Probablemente sean los viñedos más altos del mundo lo cual da una característica *sui generis*, con una riqueza extraordinaria de compuestos fenólicos, que enriquece mucho al

vino y que posteriormente le van a dar, no solo un color extraordinario, sino aromas más complejos.

México exportó en el 2004, 123 693 toneladas de uva de mesa a USA, Hong Kong, Canadá, España, Países Bajos, Belice y Guatemala que representaron recursos por 111 millones 914 mil dólares, ocupando el quinto lugar mundial como exportador de uva. El estado de Sonora produce el 70 % de la uva mexicana (SAGARPA, 2005).

En la década de los 90 se dio un auge en la investigación para encontrar un método químico de control durante el añejamiento. Diversos investigadores se dieron a la tarea de analizar los vinos tintos durante la etapa de maduración: (Somers y Evans, 1977; Ribereau-Gayon, y col., 1983; Somers y Pocok, 1990; Gao y col., 1997). El presente trabajo pretende encontrar las condiciones bajo las cuales un vino puede adquirir un color característico de vino añejado (color rojo, con tonos anaranjados-oro), en un período de tiempo relativamente corto, y que además éstas características se reflejen en un valor numérico de fácil cálculo (de edad química), utilizando fórmulas ya establecidas para la medición del color del vino.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La investigación sobre el color y el añejamiento tiene interés desde el punto de vista científico y económico, ya que actualmente el interés por los productos nutraceuticos va en aumento. El consumidor busca alternativas "más sanas", lo que ha llevado a buscar alternativas para los colorantes artificiales habiendo una tendencia a regresar al uso de colorantes de origen natural en alimentos. Las antocianinas son una buena opción ya que son abundantes y por lo tanto económicas, teniendo por supuesto como principal problema su aislamiento y estabilidad.

Desde el punto de vista enológico, uno de los principales problemas que presentan los vinos tintos nacionales es su falta de consistencia u homogeneidad en cuanto el color y el sabor. Al probar dos botellas de la misma cepa y añada se captan diferentes características sensoriales. La experiencia de otros países como Chile, Argentina y Estados Unidos demuestra que teniendo buenos controles de calidad, es posible ampliar las expectativas económicas y se pueden vender tanto regional como internacionalmente los productos vitivinícolas.

Las reacciones que ocurren durante el añejamiento aún no han sido del todo dilucidadas, el complejo sistema que conforma el vino tinto no facilita la tarea. El presente trabajo pretende ayudar a encontrar las condiciones necesarias de añejamiento en la cepa Cabernet Sauvignon para controlar la estabilidad del color en el vino tinto, aclarando cuando menos una pequeña parte de la relación color, pH, SO₂, además de conocer la composición de las antocianinas de ésta variedad de uva mexicana.

2.0 ANTECEDENTES

Características de Cabernet Sauvignon.

La variedad Cabernet Sauvignon, presenta una uva de mucho carácter: buen sabor, aromática y rica en taninos. Las uvas son pequeñas, muy semi-llosas casi esféricas y negras. Es la principal componente del Médoc y el San Emilión en Francia, también con ésta se producen los mejores vinos tintos de California, México, Australia, América del Sur y Europa Oriental (Reyes-Dorantes y col.,1992). En México se cosecha en los Estados de Sonora, Baja California y Zacatecas, entre otros.

2.1 Antocianinas en uvas

2.1.1 Estructura de las antocianinas

El termino antocianina fue propuesto inicialmente por Marcuart en 1835 denotando la pigmentación azul de las plantas de maíz (Hayashi, 1962). Las antocianinas pertenecen al grupo de los polifenoles, presentan un esqueleto $C_6C_3C_6$ típico de los compuestos flavonoides. Las antocianinas forman derivados con el catión 2-fenilbenzopirilo (Brouillard, 1982). Las antocianinas contienen grupos OH, metoxilo y carbohidratos.

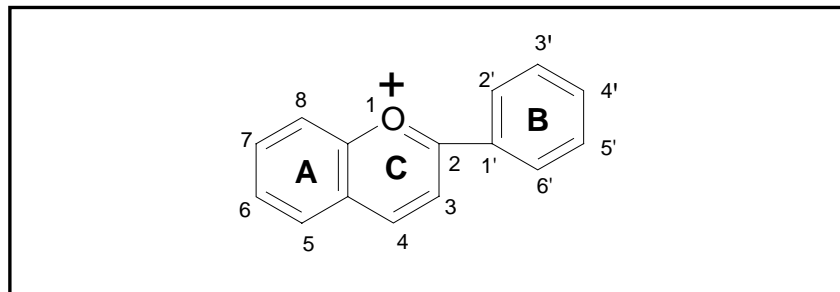


Figura 2.1 Estructura del ión flavilio o catión 2-fenilbenzopirilo

La parte principal de la antocianina es el aglicón. El catión flavilio contiene dobles enlaces conjugados responsables de la absorción de la luz alrededor de los 500 nm provocando que los pigmentos se perciban de colores rojos al ojo humano.

Las agliconas son llamadas antocianindinas, las cuales usualmente están penta (3,5,7,3',4') o hexa sustituidas (3,5,7,3',4', 5'). Se conocen actualmente 22 diferentes antocianinas (Cuadro 2.1) pero solo 6 tienen importancia desde el punto de vista alimenticio (Francis, 1989).

Las antocianidinas más importantes son: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina y petunidina. Estas agliconas difieren en el número de hidroxilos y metoxilos en el anillo B del ión flavilio (Figura 2.1).

Así, la estructura química de las antocianidinas más abundantes se representa en la Figura 2.2:

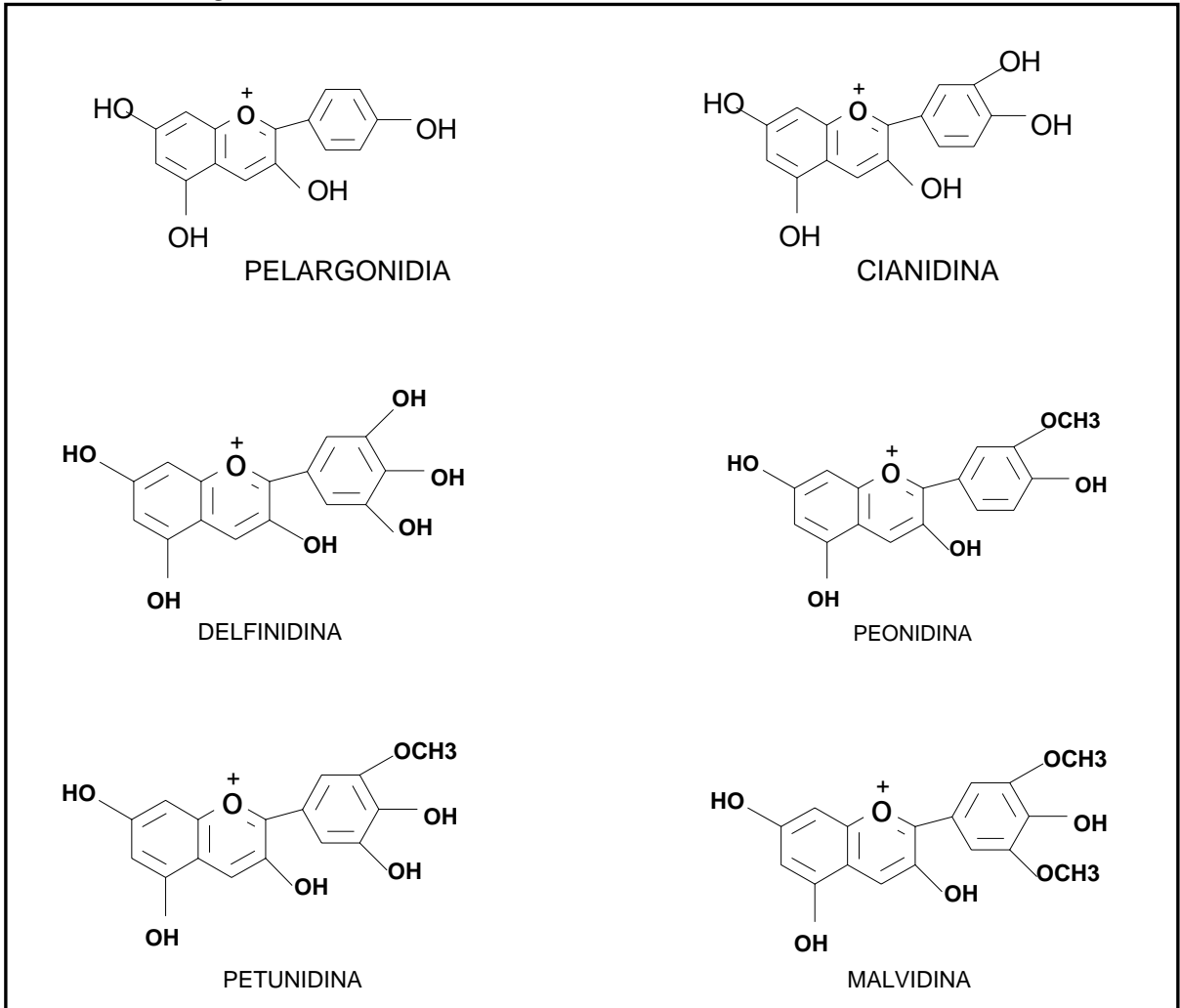


Figura 2.2 Estructura química de las principales antocianidinas (Hayashi, 1962), la carga del oxígeno tetravalente se ve neutralizada por el cloro, ya que la forma en la cual se obtiene de manera sólida es el clorhidrato de la antocianidina

Cuadro 2.1 Antocianidinas que actualmente se conocen en su estado original y sus sustituyentes en el ión flavilio

Antocianidinadina	3	5	6	7	3'	4'	5'	COLOR
Carajurina	H	H	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	-
Arrabidina	H	H	OH	OH	H	OH	OCH ₃	-
3-Hidroxiarrabidina	H	H	OH	OH	OH	OH	OCH ₃	-
Apigenina	H	OH	H	OH	H	OH	H	Naranja
Luteolina	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Naranja
Tricetinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Rojo
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Naranja
Aurantidina	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Naranja
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Rojo Naranja
5-metilcianidina	OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	H	Rojo Naranja
Peonidina	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H	Rojo
Rosinidina	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	Rojo
6-hidroxicianidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Rojo
6-hidroxielfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Rojo Azu- lado
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Rojo Azu- lado
Petunidina	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OH	Púrpura
Malvidina	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	Guinda
Pulchellidina	OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	OH	Rojo Azu- lado
Eupinidina	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OH	Rojo Azu- lado
Capensinidina	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	Rojo Azu- lado
Hirsutindina	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	Rojo Azu- lado
Riccinodina A*	OH	H	OH	OH	H	OH	H	-

Las antocianinas se encuentran en flores, frutas y bayas principalmente en su forma glicosídica (Harborne, 1967).

Una molécula de antocianina está compuesta por un aglicón (antocianidina) esterificada con uno o más azúcares. De ésta manera, las antocianinas se encuentran en la naturaleza en forma glicosídica. Los azúcares más comunes en las antocianinas monoméricas en orden de frecuencia son: glucosa, ramnosa, galactosa, arabinosa y xilosa (Figura 2.3). Los di y trisacaridos

más frecuentes son: rutinosa, soforosa, sabubiosa y la glucorutinosa (De Ancos, y col., 1999a; Kähkönen y col., 2003). Los azúcares que se esterifican con el aglicón lo hacen principalmente en la posición 3 del ión flavilio (Brouillard, 1982). Las antocianinas son mucho más solubles estables en agua que las antocianidinas debido a su enlace con la fracción azucarada (Timberlake y Bridle, 1966).

Entre las antocianinas monoglucósidas se encuentran la delphinidina, la petunidina, la malvidina, la peonidina. La malvidina es el principal componente, representa hasta el 70% del contenido total de las antocianinas.

Las antocianinas también pueden estar aciladas, los ácidos orgánicos reaccionan con la fracción azucarada formando un enlace éster, usualmente son ácidos fenólicos aromáticos o alifáticos, ácidos dicarboxílicos o una combinación de ambos. Estos ácidos se unen en la posición 6 del monosacárido, aunque también se han encontrado antocianinas aciladas en posiciones 2, 3 y 4 (Cabrita, 2000). Los ácidos fenólicos más comunes en estas acilaciones son derivados del ácido hidroxicinámico (Figura 2.4), por ejemplo: cumárico, ferúlico, caféico, sinápico y ácido hidroxibenzoico; aunque también hay ácidos alifáticos como malónico, acético, málico, succínico, oxálico (Francis, 1989; Cabrita, 2000)

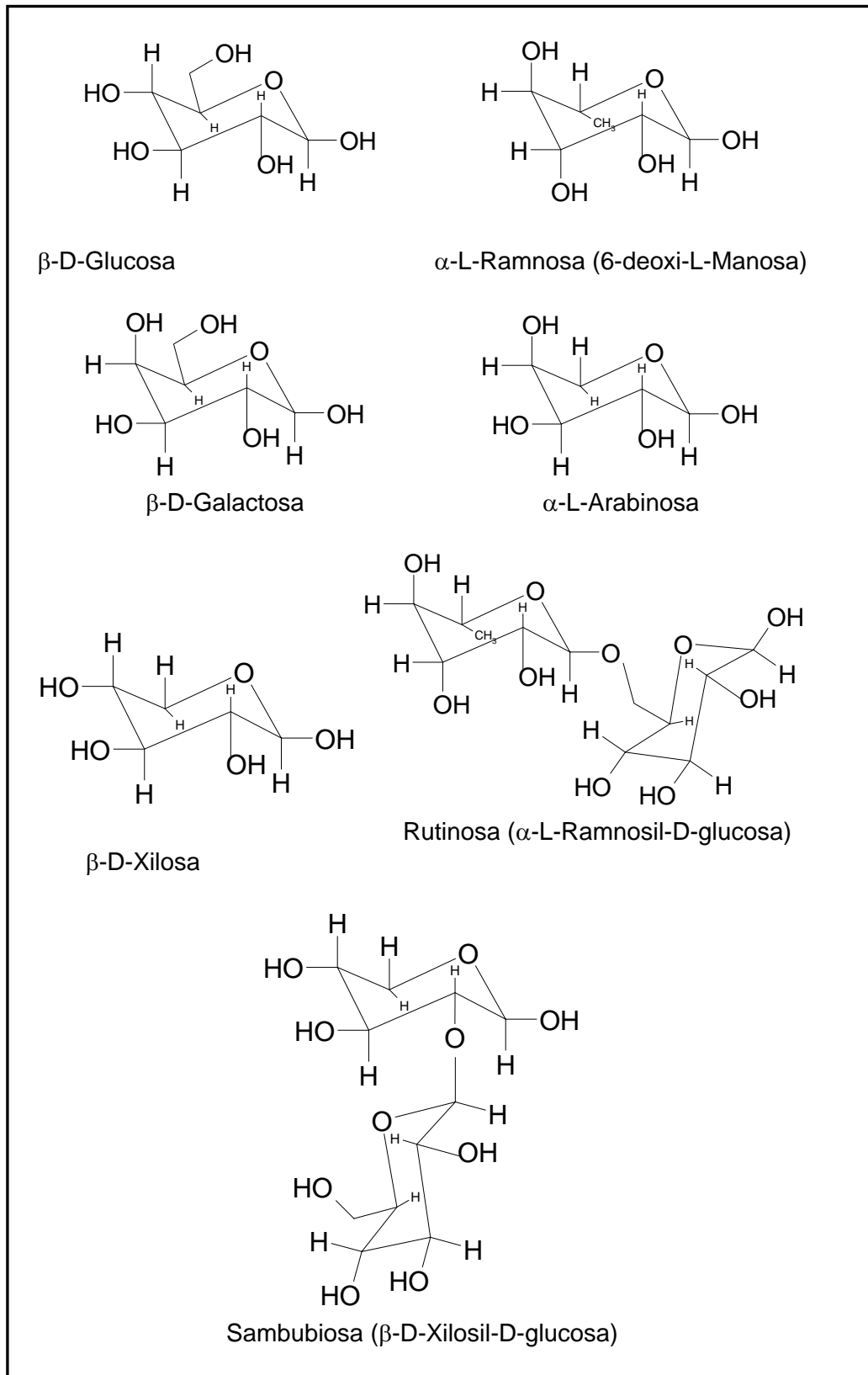


Figura 2.3. Carbohidratos más comunes en las antocianinas.

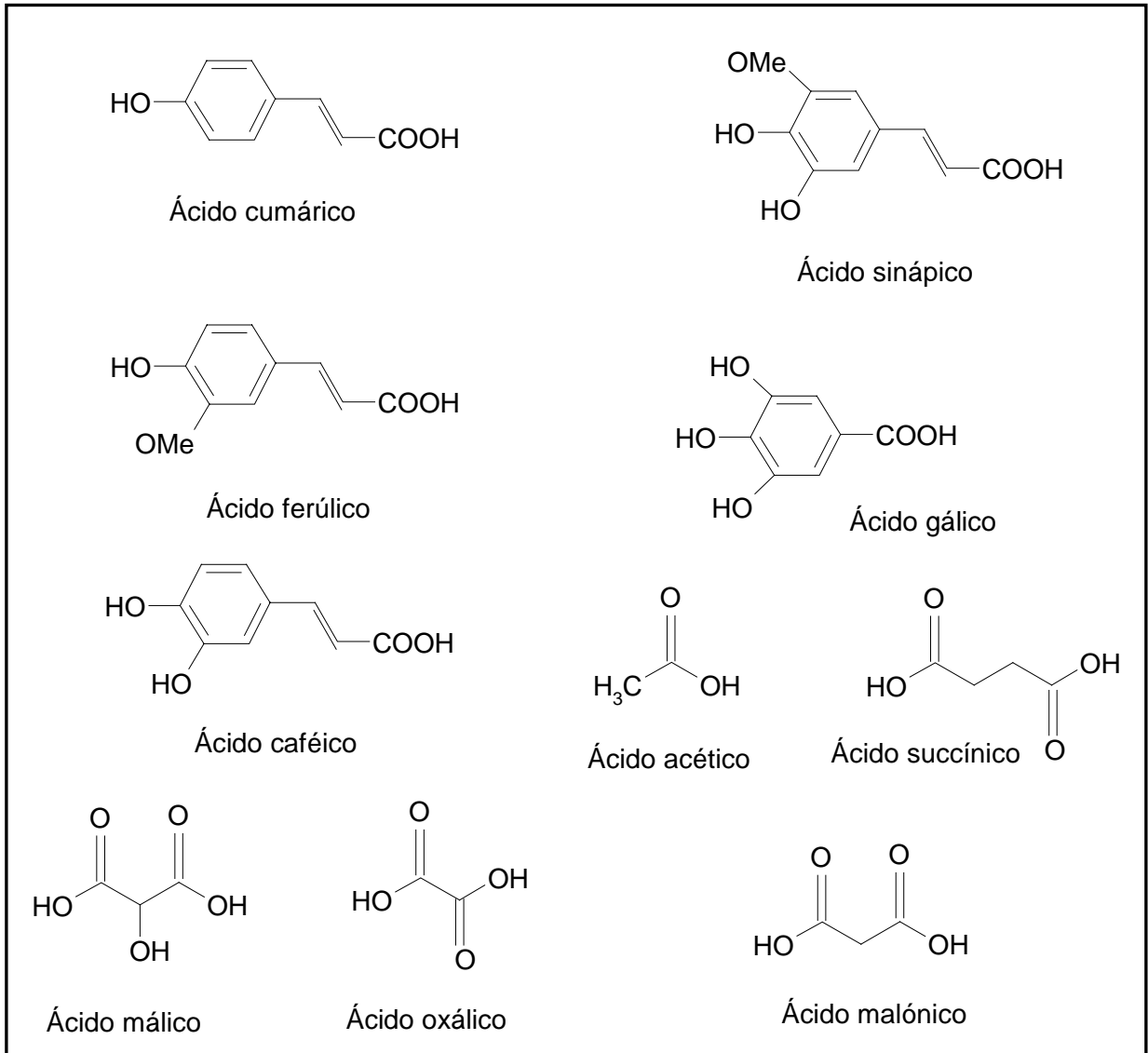


Figura 2.4. Ácidos más comúnmente acilados en las antocianinas.

Ejemplos de los diferentes sustituyentes de las antocianinas se muestran en la Figura 2.5.

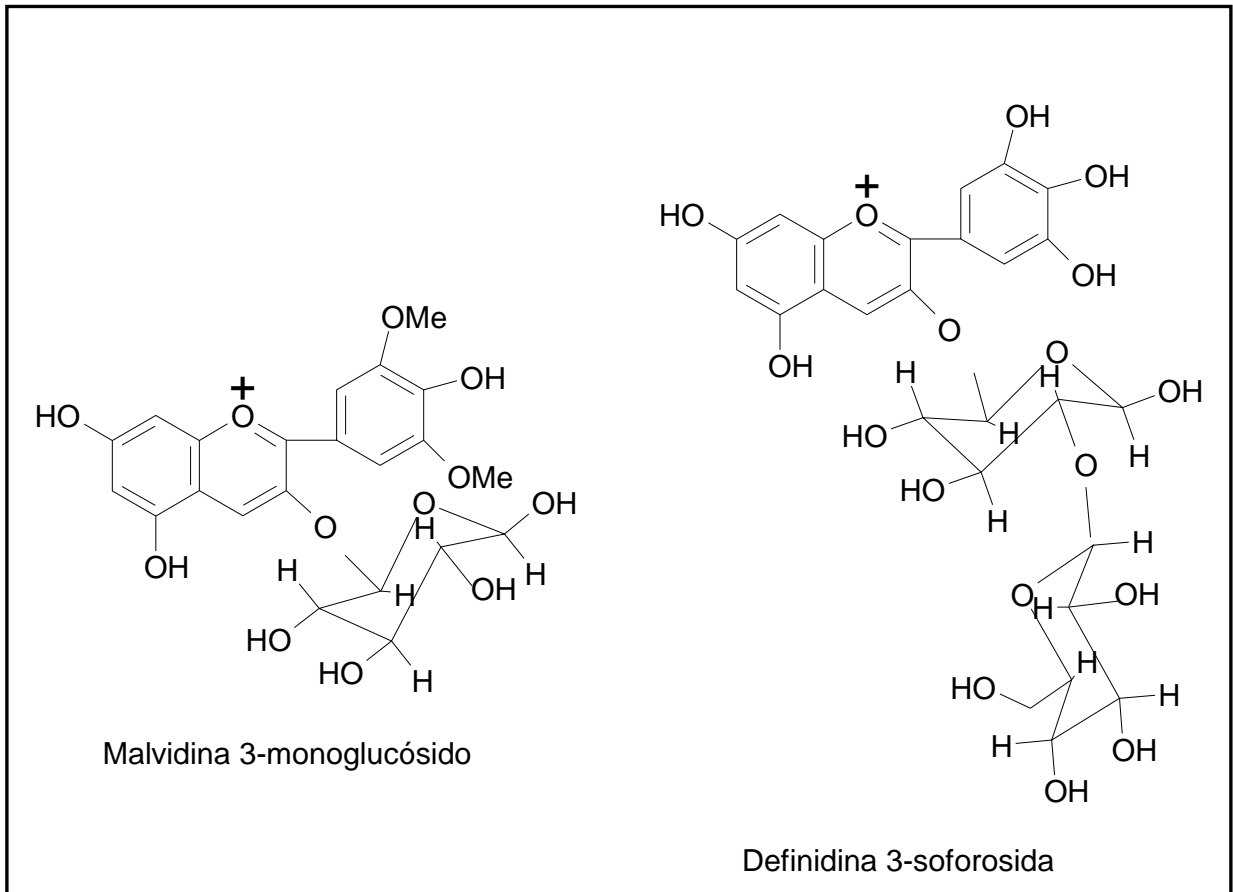


Figura 2.5. Diferentes sustituyentes en las antocianinas.

2.1.2. Propiedades Fisicoquímicas:

Todas las antocianinas son solubles en agua, pero insolubles en disolventes no hidroxílicos, como éter, cloroformo y benceno. Pueden ser completamente precipitadas en soluciones acuosas o alcohólicas en forma de agujas azules, las cuales son solubles en acético glacial dando un jarabe de color rojo oscuro.

La intensidad y posición de la $\lambda_{\text{máx}}$ absorbancia de las antocianinas cambia considerablemente dependiendo del pH y de los disolventes. La $\lambda_{\text{máx}}$ incrementa su valor dependiendo de la adición de etanol, metanol y agua, por ejemplo: la cianidina 3-ramnoglucósido tiene una $\lambda_{\text{máx}}$ de 507 nm en agua, 523 nm en metanol y 533 nm en etanol (Jurd, 1962).

La presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula puede establecerse estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al añadirle los denominados reactivos de desplazamiento: Metóxido de sodio (NaOMe), acetato de sodio (NaOAc), cloruro de aluminio (AlCl_3) con o sin HCl, y ácido bórico (H_3BO_3), con lo que se pueden comprobar los desplazamientos batocrómicos de 35-55 nm (Cuadro 2.2).

Cuadro. 2.2
Longitudes de máxima absorbanza de las antocianinas
en la región del visible (Jurd, 1962)

Pigmento	Metanol-HCl	Etanol-HCl	AlCl₃
	(nm)	(nm)	(nm)
Malvidina	542	554	0
Petunidina	543	558	24
Delfinidina	546	557	23
Peonidina	532	542	0
Cianidina	535	545	18
Pelargonidina	520	530	0

Giusti, y Wrolstad (2003), reportan las bondades antioxidantes de las antocianinas en la salud humana además de los máximos de absorbanza y el color de las antocianinas más comunes (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3 Antocianinas más comúnmente encontradas
en la naturaleza

Aglicón	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Color en el visible
Pelargonidina	494	Anaranjado
Cianidina	506	rojo-anaranjado
Peonidina	506	rojo-anaranjado
Delfinidina	508	Rojo
Petunidina	508	Rojo
Malvidina	510	Rojo-azuláceo

2.1.3 Presencia de antocianinas en uvas y otros Frutos

El genero *Vitis* al cual pertenece la especie *Vitis vinifera* de la familia de las *Vitáceas* es el más importante, ya que es la fruta que contiene la mayor cantidad de antocianinas en el mundo (Timberlake y Bridle, 1982).

La *Vitis vinifera* es la especie más utilizada para la producción de vinos tintos. Otras plantas ricas en antocianinas se encuentran en las familias *Rosaceae* y *Ericaceae*. Las vides americanas presentan grandes contenidos de antocianinas teniendo como diferencia principal, la presencia de antocianinas mono y diglucosídicas, mientras que en las variedades de *Vitis vinifera* sólo se dan en forma de monoglucósidos.

La concentración de antocianinas en alimentos derivados de frutas y bayas es mucho más pequeña que el contenido original (Cuadro 2.4). En la elaboración, se provoca una pérdida en la concentración de antocianinas y por lo tanto del color. Jugos y pulpas tratadas con pectinasas incrementan el color (Rommel, y col.,1990; Rommel, y col.1992). Durante el almacenamiento, el color de las uvas se degrada fuertemente (Gimenez y col., 2001). Es así que la selección del proceso afecta el color y por lo tanto la calidad del producto

Cuadro 2.4 Contenido de antocianinas en diferentes frutos (mg/L ó mg/100g ^{a,b})

Fruta	Producto	Antocianinas	Referencia
Arándano	Jugo	>300	Skrede y col., 2000
Grosella o pasa de Corinto black currant	Jalea	0.4	García Vigerá y col., 1997
Fresa	Jugo	110-270	Giménez y col., 2001
Fresa	Concentrado	130-210	Lundahl y col., 1989
Fresa	Puré	380	Bakker y Bridle, 1992
Fresa	Jalea	0.4-2	García Vigerá y col., 1997
Frambuesa	Jugo	580-670	Rommel y col., 1990
Frambuesa	Jalea	6	García Vigerá y col., 1997
Zarzamora	Jugo	330-640	Rommel y col., 1992
Zarzamora	Jalea	0.2-27	García Vigerá y col., 1997
Uva	Vino	~200	Liao y col., 1992; Almela y col., 1996; Mazza y col., 1999; Maribel y col, 1999; Pérez-Prieto y col., 2003

^a, Concentración de antocianinas en jugo, concentrados, puré y vinos en mg/L

^b, Concentración de antocianinas en jalea, mg/100g

2.1.4 Influencia de las antocianinas en vinos

El color de los vinos tintos, claretes y rosados se debe, fundamentalmente, a la mezcla de las tonalidades y la proporción de las distintas antocianinas, conjugadas en los equilibrios de las formas coloreadas con sus formas incoloras, regidos por el pH del vino. Las antocianinas de las uvas de *Vitis vinifera* son responsables del color inicial de los vinos. La cantidad de antocianinas presentes en las uvas rojas depende de la variedad, maduración, condiciones climáticas y de la cantidad de cultivo de la uva (Yokotzuka y Nichi-

no, 1990). En éstas han sido identificadas, dependiendo la especie de 5 a 20 diferentes antocianinas. De éstas la malvidin-3-glucósido (oeina) es la más importante pero también la cianidina, peonidina y sus derivados (Ribéreau-Gayon, 1982).

Las antocianinas aciladas son típicas del vino tinto constituyen alrededor del 20% del total de éstas (Santos, 1991). Los ácidos más comúnmente encontrados son el p-cumárico y el caféico (Ribéreau-Gayon, 1982). Se piensa que las antocianinas aciladas contribuyen a la estabilidad del color rojo durante el almacenamiento.

Las variedades utilizadas, el proceso de producción y las condiciones de almacenamiento o añejamiento influyen en el contenido de antocianinas en el vino (Pellegrini y col., 2000; Pérez-Prieto y col., 2003). Algunos vinos españoles reportan concentraciones de antocianinas entre 160 y 550 mg/L después de la fermentación y solo de 60 a 260 mg/L después del añejamiento (Almeda y col., 1996; Pérez-Prieto y col., 2003).

La concentración típica de antocianinas en vinos tintos es de alrededor de 200 mg/L. En vinos jóvenes puede ser de 500 mg/L (Liao y col., 1992). Diferentes vinos de la Columbia Británica hechos con Cabernet Franc, Merlot y Pinot Noir tienen de 220 a 280 mg/L, después de 6 a 7 meses de almacenamiento (Mazza y col., 1999).

2.2 Efectos sobre:

2.2.1. La estabilidad de color de las antocianinas

Las antocianinas son muy inestables como moléculas en un alimento. La estabilidad del color está fuertemente afectada por el pH, disolventes, temperatura, estructura y concentración de la antocianina, oxígeno, luz, enzimas y otras sustancias que las acompañan.

2.2.2 Estructurales.

La presencia de carbohidratos y de compuestos acilados le confieren una gran estabilidad a la antocianina. También la cantidad de los sustituyentes hidroxilos o metoxilos afectan la estabilidad de la molécula.

El incremento de hidroxilos en el aglicón estabiliza la antocianidina en metanol acidulado (Dao y col., 1998). Aunque existen discrepancias con relación a la estabilidad que aportan los hidroxilos. En disolución amortiguadora, a pH 3.1, la cianidina-3-monoglucósida es más estable que la pelargonidina-

3- monoglucósida. También la petunidina-3-monoglucósida con dos hidroxilos en el anillo B es más estable que la peonidin-3 monoglucósida, la cual tiene un solo OH en el mismo anillo (Cabrita y col., 2000).

Los grupos metoxilo en C-4' y C-7 decremantan la estabilidad del pigmento cuando hay grupos hidroxilo (Mazza y Brouillard, 1987). En una disolución amortiguadora la cianidina 3-monoglucósida fue más estable que la petunidina 3-monoglucósida la cual difiere por tener un metoxilo en posición 5'. También la peonidina 3-monoglucósido fue más estable que la malvidina 3-monoglucósido por que igualmente tiene un metoxilo extra en 5' (Cabritas y col., 2000).

El contenido de hidroxilos o metoxilos no solo afectan la estabilidad de las antocianinas sino también el color que cambia de rosa a azul conforme al número de OH se incrementa. El número de metoxilos que reemplacen a un hidroxilo hace que el efecto se reinvierta (Mazza y Brouillard, 1987).

Las antocianinas son más estables y solubles en disoluciones acuosas que las antocianindinas (Andersen, 1985). Por lo que las formas azucaradas son mucho más comunes en la naturaleza que los aglicones que rara vez existen en el vino.

El número de carbohidratos unidos también influye en el color, las antocianinas 3-monoglucósidas son más coloridas que las 3,5-diglucósidas (Mazza y Brouillard, 1987). El incremento en el número de glucosas aumenta el color amarillo (Giusti y col., 1999).

La acilación incrementa fuertemente la estabilidad de las antocianinas (Bassa y Francis, 1987). Los excepcionales tonos y colores estables de las flores se deben a las antocianinas aciladas, las poliaciladas son más estables que las monoaciladas en todo el intervalo de pH (Asen, 1976). Las antocianinas con sustituyentes acilo aromáticos son mucho más estables que las que solo tienen sustituyentes alifáticos (Stintzing y Carle, 2004). El tipo de ácido aromático también influye en el color y la estabilidad, el ácido caféico provoca un color más estable que el p-cumárico (Francis, 1989).

2.2.3 La concentración

El aumento en la concentración de las antocianinas provoca una mayor estabilidad en el color (Giusti y Wrolstad, 2003). Un aumento en la concentración de 10^{-4} a 10^{-2} M produce un aumento 300 veces mayor en la intensidad del color (Asen y col., 1972). El incremento en el contenido de antocianinas aumenta la estabilidad debido a los diferentes equilibrios químicos presentes (Dao y col., 1998)

2.2.4 El pH

Las antocianinas son solo estables en medios ácidos entre 3 y 6.5 y no en medios alcalinos. Desarrollan una gran variedad de colores e intensidades en función del pH. Su naturaleza iónica hace que cambie la estructura de la molécula acorde al pH del medio (Brouillard, 1982).

En medio ácido existen principalmente 4 equilibrios que denotan el comportamiento de las antocianinas (Figura 2.6) una base quinoidal (A), el catión flavilio AH^+ , el carbinol o la pseudo base (B) y la chalcona (C).

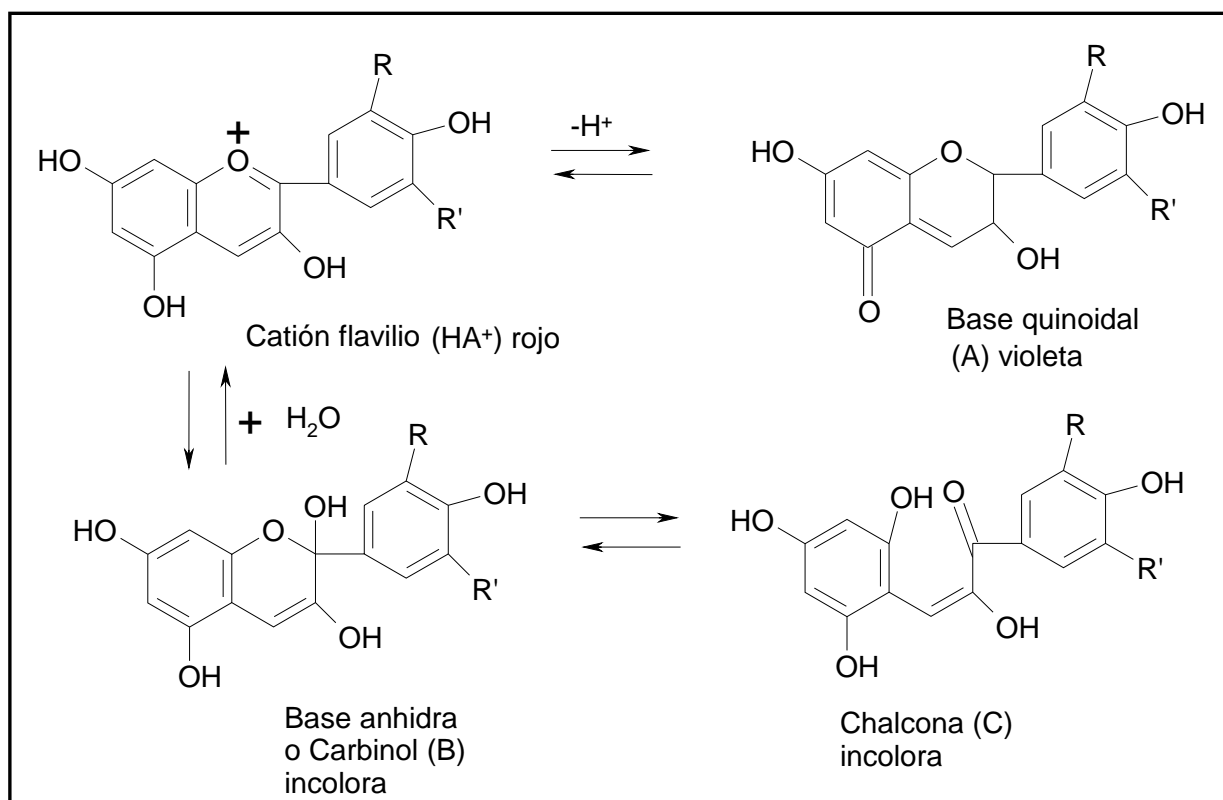


Figura 2.6. Equilibrios de antocianinas en medio acuoso.

En un medio muy ácido (pH 0.5) el catión flavilio es rojo y es la especie predominante de este equilibrio. Al ir aumentando el pH, el color decrece debido a la baja en la concentración del ión flavilio el cual se hidrata por un ataque nucleofílico del agua formándose el carbinol que es incoloro. El carbinol tiende a perder un enlace conjugado entre el anillo A y el B, haciendo que ya no absorba la luz visible (Brouillard, 1982).

Una pérdida rápida de un protón hace que el catión flavilio se transforme en una base quinoidal. Cuando el pH se incrementa fuertemente la molécula de carbinol se abre formando una chalcona que es incolora. Las concentraciones relativas en cada equilibrio dependen del pH y de la estructura particular de cada antocianina (Mazza y Brouillard, 1987). Los valores promedio de pH en los vinos se dan entre 3 y 4. En la Figura 2.7 se representa la distribución de estos cuatro equilibrios para la malvidina 3-monoglucósido. A pH entre 4 y 5.5 la molécula de carbinol (B) aporta poco color y se pone en equilibrio con la chalcona (C) que rápidamente se polimeriza dando tonos amarillos siendo estos dos compuestos las especies dominantes.

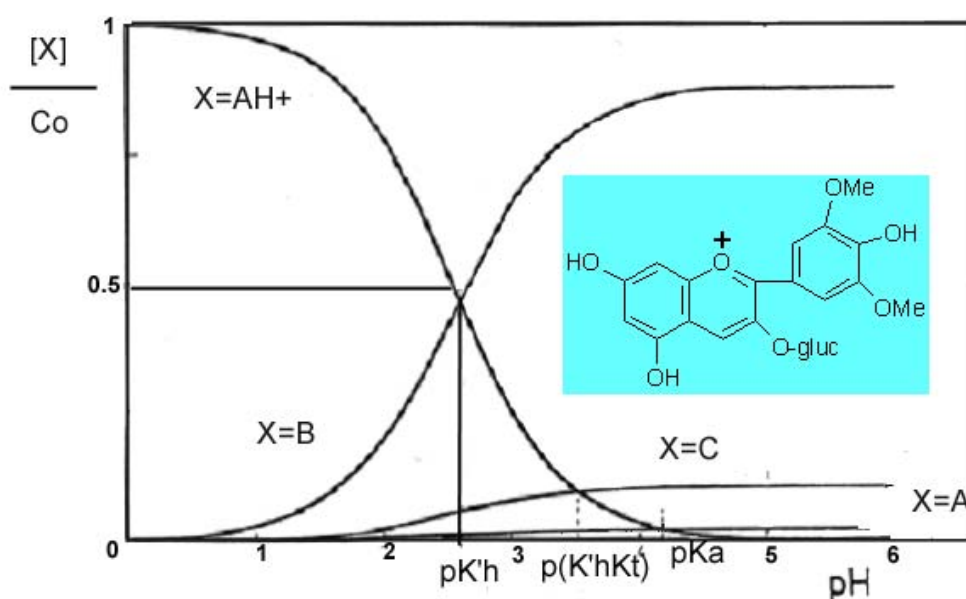


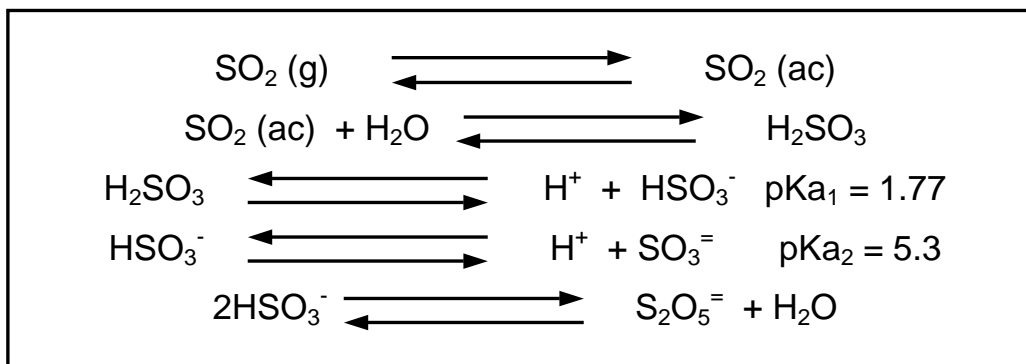
Figura 2.7. Distribución en función del pH de los diferentes equilibrios de la malvidina 3-monoglucósido. (AH⁺) ión flavilio; (A) Base quinoidal; (B) Carbinol o base anhidra; (C) Chalcona (Brouillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. En: Anthocyanins as Food Colors. Pericles Markakis (ed.), Academic Press Inc., New York, p.1-38).

La forma quinoidal es la única especie que aporta color arriba del pH 5 pero esta existe en un muy pequeño porcentaje no afectando en realidad el color de la disolución.

La pérdida de color de las antocianinas se da en función del pH. El catión flavilio AH^+ , es el más estable y la especie más colorida en medio ácido, pero en medios medianamente alcalinos se degrada rápidamente (Belitz y Grosch, 1999). La Figura 2.7, muestra claramente el cambio de color en función del pH. La intensidad aumenta de manera importante en medios ácidos, pero si el pH no favorece la presencia del ión flavilio el color rojo se pierde.

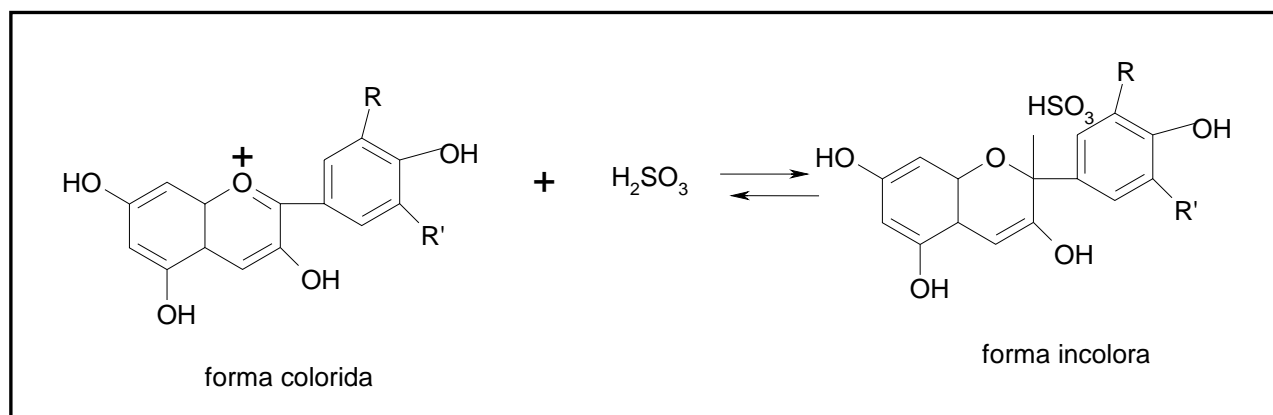
2.2.5 El anhídrido sulfuroso (SO_2)

La adición del anhídrido sulfuroso al vino se puede hacer en cualquiera de las siguientes formas: anhídrido sulfuroso gaseoso (SO_2), metabisulfito de potasio ($K_2S_2O_5$) o en disoluciones al 6 % de anhídrido sulfuroso. Este es un agente antioxidante y anti-microbiano es prácticamente universal, su efecto en el equilibrio de las antocianinas debe ser considerado. El dióxido de azufre reacciona con el agua del vino dando los siguientes equilibrios:



Las constantes de equilibrio para esta reacción son grandes (Reyes y Col., 1992), indicando que hay cantidades pequeñas de dióxido de azufre libre que pueden decolorar grandes cantidades de antocianina (Baker y Bridle 1992).

El dióxido de azufre reacciona rápidamente con las antocianinas para producir un compuesto incoloro, reaccionando 1:1. La reacción reversible puede escribirse como:



La constante de equilibrio de esta reacción es grande, lo que provoca que pequeñas cantidades de SO_2 puedan decolorar grandes cantidades de antocianina (Timberlake y Bridle, 1966). La reacción inversa es igualmente rápida si el SO_2 se elimina del sistema.

2.1.6 La temperatura

La estabilidad de las antocianinas se ve afectada por la temperatura. La degradación se incrementa durante proceso de elaboración o almacenamiento si las temperaturas se elevan (Palamidis y Markakis, 1978; Maccarone y col., 1985). Si la temperatura se incrementa a valores de pH entre 2 y 4 favorece la pérdida de la fracción azucarada de la antocianina (Adams, 1973). Esto conlleva a la pérdida extensa de color ya que los aglicones como ya se ha comentado son mucho menos estables. Se sabe que la formación de una chalcona es el primer paso en la degradación térmica de las antocianinas (Adams, 1973). La degradación térmica lleva al pardeamiento de los productos, sobre todo en presencia de oxígeno (Markakis y col., 1982). La degradación térmica de las antocianinas sigue una cinética de primer orden (Rhim, 2002). Se ha visto que a temperatura elevada junto con un pH alto causan degradación de antocianinas en la cereza, produciéndose tres derivados del ácido benzoico (Seeram y col., 2001). También el trihidrobenzaldehído se ha identificado como un producto final de degradación térmica de antocianinas (Furtado y col., 1993). La cumarina 3,5-diglucósilada también es común encontrarla como producto de degradación térmica de las antocianinas 3,5-diglucósiladas (Von Elbe y Schwartz, 1996). La Figura 2.8 muestra las rutas de degradación térmica de antocianinas.

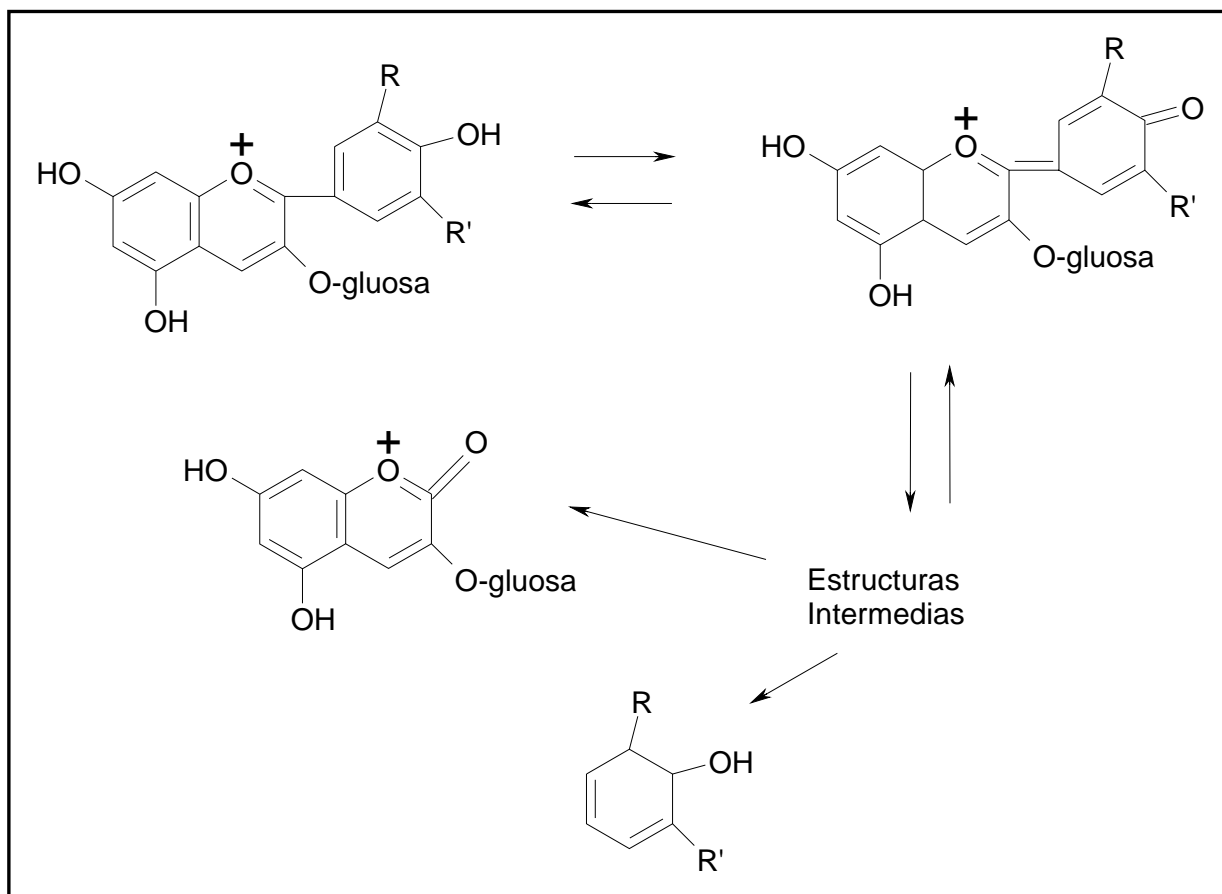


Figura 2.8 Degradación térmica de una antocianina monoglucósilada a pH 3.7

En general, los mismos factores estructurales que refuerzan la estabilidad al pH de las antocianinas también aumentan su estabilidad térmica (Von Elbe y Schwartz, 1996, Keith y Powers, 1965), probaron tres glucósidos de antocianinas, la pelargonidina 3-glucósido fue más estable a 100°C que la petunidina 3-glucósido que a su vez fue más estable que la malvidin 3-glucósido. La arabinosa de la cianidina y peonidina fueron más estables al tratamiento con calor que la galactosa correspondiente (Attoe y Von Elbe, 1981). Disminuyendo el valor del pH la degradación térmica puede impedirse.

2.1.7 El oxígeno

El oxígeno aumenta el impacto de otros procesos de degradación. La presencia de oxígeno, junto con la temperatura elevada, son las combinaciones más perjudiciales de muchos otros factores probados para disminuir el deterioro del color de jugos elaborados con diferentes antocianinas. La degradación por luz sobre las antocianinas es dependiente del oxígeno molecular (Attoe y Von Elbe, 1981; Cheynier y col., 1994). El efecto dañino del oxígeno puede ser a través de mecanismos oxidativos directos y/o a través de la

oxidación indirecta donde los componentes oxidados reaccionan con las antocianinas dando lugar a productos descoloridos o cobrizos. Las antocianinas también reaccionan con los peroxiradicales; Por lo que éstas actúan como agentes antioxidantes, siendo útil su consumo para personas con enfermedades cardiovasculares (Matsufuji y col., 2003; García-Alonso y col., 2004; Rossetto y col., 2004). También eliminando el oxígeno se puede proteger las antocianinas y por lo tanto el color (Daravingas y Caín, 1968).

2.1.8 La luz

La luz ligera afecta las antocianinas de dos maneras diferentes: La luz es esencial para su biosíntesis, pero también acelera su degradación (Markakis, 1982). Se comparó la diferencia de color después de 24 horas cuando se tuvieron las antocianinas en la luz y otras tenidas en la oscuridad a temperatura ambiente a pH 2.3. Las antocianinas conservaron su color mucho mejor cuando se guardaron en la oscuridad. El color en bebidas con antocianinas en medios carbonatados sólo perdió un 30% cuando se mantuvo en la oscuridad; y en con exposición ligera, los pigmentos decrecieron un 50%. La pérdida de antocianinas más vigorosa (70%) fue bajo la luz fluorescente con temperatura de almacenamiento ligeramente elevada (Palamidis y Markakis, 1978). Furtado y col. (1993) encontraron que los productos de degradación de antocianinas son los mismos que en la degradación térmica, sin embargo, la ruta cinética de la reacción de degradación es diferente e involucra la excitación del catión flavilio.

2.1.9 Las enzimas

La inactivación de las enzimas permite aumentar la estabilidad de las antocianinas (García-Palazon y col., 2004). Las enzimas degradantes más comunes son las glucosidasas que rompen el enlace covalente entre el azúcar y el ión flavilio de la antocianina, produciendo una antocianidina muy inestable (Huang, 1955). Las Peroxidasas y fenolasas, oxidan los compuestos fenólicos y polifenólicos, que se encuentran naturalmente en las frutas y vinos, y son las enzimas de degradación más comunes de antocianinas (Piferi y Cultrera, 1974; Kader y col., 1997). Las fenolasas pueden reaccionar directamente con las antocianinas, pero la descomposición es mucho más drástica cuando otro compuesto fenólico, como el catecol está presente (Peng y Markakis, 1963; Yokotsuka y Singleton, 1997). Sin embargo, Sarni y col. (1995) mencionaron que no se presentó ninguna degradación en la malvidina 3-glucósido por la sola acción de la polifenol oxidasa, pero la degradación se daba en presencia del ácido del caftárico. En la degradación enzimática de antocianinas, las quinonas juegan un papel importante (Sa-

kamura y col., 1966). Las enzimas oxidan primero los compuestos fenólicos formando sus correspondientes quinonas que entonces reaccionan con las antocianinas provocando su degradación y cambiando el color del medio. Esto se ha observado en muchos estudios con antocianinas puras, como la pelargonidina 3-glucósido (Kader y col., 2001) y la cianidina 3-glucósido (Kader y col., 1999), en vino en disoluciones modelo (Sarni y col., 1995), y con productos de bayas (Yokotsuka and Singleton, 1997; Skrede y col., 2000; el Kader y col., 2002). De las diferentes formas de las antocianinas, Pifferi y col. (1974) notaron que la base anhidra era la más susceptible a la oxidación enzimática. La estructura de las antocianinas afecta su estabilidad frente a la actividad de la enzima (Yokotsuka y Singleton, 1997). Los glucósidos de la malvidina son más estables que los glucósidos del delfinidina contra la acción de la polifenol oxidasa (Skrede y col., 2000).

2.1.10 El ácido ascórbico

La adición de ácido ascórbico en fruta y jugos es un método común para protegerlos contra la oxidación y aumentar el valor nutritivo de un producto comestible. Se piensa que el ácido ascórbico tiene varios papeles en la estabilidad del color de las antocianinas. Se ha observado un aumento en la estabilidad de las antocianinas aciladas en presencia de ácido ascórbico (Del Pozo-Insfran y col., 2004). También se considera que las antocianinas son protegidas por el ácido ascórbico en contra de la degradación enzimática (Talcott y col., 2003).

Por otro lado, Poeschl-Langston y Wrolstad (1981) mencionan que el ácido ascórbico favorece la formación de pigmentos poliméricos y por lo tanto hay un decremento en el color de las antocianinas monoméricas, además proponen que la degradación de las antocianinas, se efectúa por medio de la condensación directa entre el antocianinas y el ácido ascórbico. Marti y col. (2002) reportan que la descomposición de antocianinas es acelerada por la presencia del ácido ascórbico.

2.1. 11 Los azúcares

Los azúcares están presentes de forma natural en las frutas y bayas, y durante el proceso de producción de alimentos se agregan a menudo a diferentes productos, como los jugos y confituras. Daravingas y Caín (1968) probaron la sacarosa, fructosa, glucosa, y xilosa y observaron que la presencia de éstos aumentaba la degradación de las antocianinas. Según Krifi y col., (2000) de los productos de degradación de azúcar típicos, el furfural aceleró el deterioro de las antocianinas y el hidroximetil furfural fue el más activo. Además mencionaron que las reacciones de las antocianinas con los

productos de degradación de azúcares en presencia del ácido ascórbico favorecieron la formación de polímeros del pigmento de color café oscuro.

También se han encontrado azúcares protectores de antocianinas y del color. La sacarosa protege la degradación de las antocianinas durante el almacenamiento en frío, y también previene el pardeamiento, y la formación de pigmentos poliméricos debido probablemente, a la inhibición de reacciones enzimáticas (Wrolstad y col., 1990). También la baja actividad del agua por presencia de azúcares en alimentos puede proteger la degradación de las antocianinas (De Ancos y col., 1999b).

2.2 Copigmentación

El color de las antocianinas puede estabilizarse o reforzarse por las reacciones de copigmentación. El fenómeno de copigmentación se observó, desde 1916 por Willstätter y Zollinger quienes notaron el color de un pigmento de la uva: la oenina (malvidina 3-glucósido), la que cambia su color azul rojizo a café por la adición de tanino o ácido gálico. La copigmentación se estudió primero en los colores de las flores (Robinson y Robinson, 1931). Los colores de las antocianinas no son bastante vívidos en la naturaleza, sus moléculas coloridas deben estabilizarse por otros componentes naturales presentes en las flores y los frutos (Brouillard, 1982). La copigmentación puede ser una valiosa y natural herramienta para mejorar el color de las antocianinas. En los productos alimenticios ricos en color pueden estabilizarse y reforzarse por la adición de extractos de plantas ricas en copigmentos (iones metálicos, ácidos orgánicos, ferúlico caféico etc.). Ya se ha reportado que por la copigmentación el color es más intenso en los jugos de la baya que con las antocianinas purificadas de estos jugos (Wilska-Jeszka y Korzuchowska, 1996). La copigmentación puede tener lugar a través de varias interacciones (Figura 2.9). Los mecanismos más importantes son la formación de complejos intermoleculares y los intramoleculares. Las reacciones de asociación con metales también son posibles.

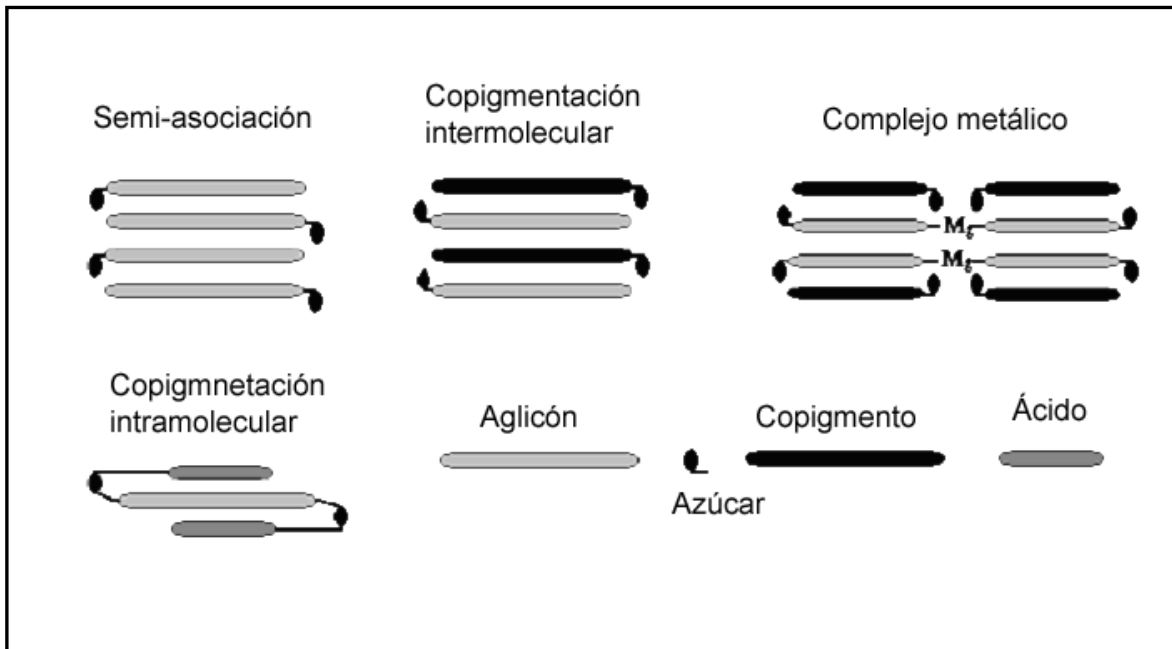


Figura 2.9 reacciones de copigmentación con antocianinas. Rein, M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Tesis Doctoral. Universidad de Helsinki, Finlandia

Se observa el fenómeno de copigmentación como un efecto batocrómico en donde se presenta un cambio en el valor de la longitud de onda de máxima absorbancia ($\Delta\lambda_{m\acute{a}x}$), provocando un ligero cambio en el tono del color que va de los rojos a los azules (Asen y col., 1972), o como un efecto hipercrómico (ΔA) en el cual la intensidad del color de las antocianinas (A) es aumentada por la copigmentación. El catión del flavilio y la base quinoidal juegan un papel importante en el cambio batocrómico, pero el efecto hipercrómico sólo se logra por la estabilización de la base quinoidal (Asen y col., 1972). La Figura 2.10 muestra el cambio en la absorción de la longitud de onda máxima (cambio batocrómico) y en la intensidad colorida (efecto hipercrómico) para la cianidina 3-glucósido copigmentada con el ácido del rosmarínico.

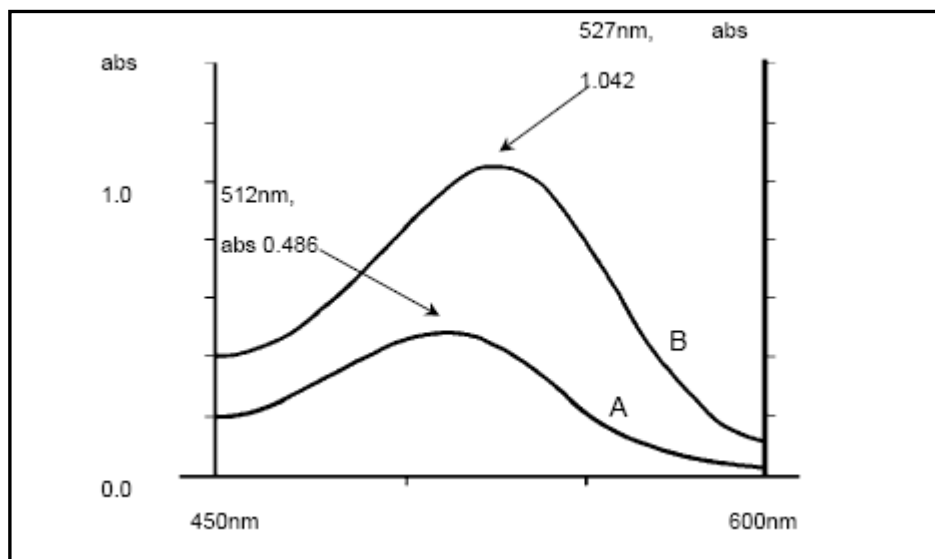


Figura 2.10 Efectos de copigmentación; cambio batocrómico y efecto hipercrómico. A) cianidina 3-glucósido, B) cianidina 3-glucósido + ácido rosmarínico. Wilska-Jeszka, J., Korzuchowska, A. 1996. Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation. Influence on the color of strawberry and chokeberry juices. Food Res, Tech, 203: 38-42.

Igual que todas las reacciones de las antocianinas son afectadas por el pH, también las reacciones de copigmentación lo son (Wilska-Jeszka y Korzuchowska, 1996), temperatura (Bakowska y col., 2003), concentraciones (Bakowska y col., 2003), didisolventes (Brouillard y col., 1989; Brouillard y col., 1991), y estructuras moleculares. Según Asen (1976), la concentración de la antocianina debe ser cuando menos de 3.5×10^{-5} M antes de que las reacciones de copigmentación sean posibles, y también la concentración del copigmento es crítica. Se ha observado que la intensidad colorida de la fresa aumentó linealmente con el aumento de la concentración del copigmento (Wilska-Jeszka y Korzuchowska, 1996). También hay un efecto de proporciones con respecto a las concentraciones de la antocianina y el copigmento, entre más elevada es la del copigmento más eficaz es el aumento de color (Asen y col., 1972). El incremento de temperatura impide el fenómeno de copigmentación (Wilska-Jeszka y Korzuchowska, 1996). A pH muy bajo en donde el catión flavilio predomina, las reacciones del copigmentación son mucho más débiles que a valores de pH entre 2 y 5 donde el equilibrio con la forma quinoidal existe (Williams y Hrazdina, 1979). También el disolvente afecta el fenómeno de copigmentación. El medio acuoso favorece la asociación molecular entre una antocianina y sus copigmento (Mazza y Brouillard, 1990). Por consiguiente, la adición de metanol, formamida o sales al disolvente reduce el efecto de copigmentación (Brouillard y col., 1989).

En los vinos, la inestabilidad y reactividad de las antocianinas, se cree que, junto con las reacciones de copigmentación, son las responsables del cambio de color durante el añejamiento de los vinos (Boulton, 2001; Darias-Martin y col., 2002; Boselli y col., 2004).

2.3.1 Copigmentos

Los copigmentos son incoloros o sólo muy ligeramente coloridos, principalmente son amarillentos, estas moléculas se encuentran naturalmente en las células de la planta junto con las antocianinas. Una gama amplia de moléculas diferentes se ha encontrado para actuar como copigmentos. Los más comunes son los flavonoides, los polifenoles, los alcaloides, los aminoácidos, y los ácidos orgánicos (Brouillard y col., 1989). El grupo más investigado de copigmentos son los flavonoides, de los cuales las flavonas, los flavonoles, las flavanonas, y flavanoles han estado bajo un profundo estudio (Asen y col., 1972; Baranac y col., 1997a; Baranac y col., 1997c). También los ácidos fenólicos, por ejemplo ácido hidroxicinámico y ácido hidroxibenzoico, han sido de interés para los investigadores de los efectos de copigmentación, y se han realizado importantes avances en la estabilización de las antocianinas (Markovic et al., 2000). De los flavonoles, la rutina es uno de los copigmentos más eficaces, también la quercetina se ha utilizado para producir la copigmentación (Williams y Hrazdina, 1979; Baranac y col., 1997b; Bakowska y col., 2003,). La rutina indujo un cambio batocrómico de 30 nm y la quercetina de 28 nm a la malvidina 3,5-diglucósida a pH 3.2 (Chen y Hrazdina, 1981). Sin embargo, a pH muy bajos (< 2.0) la copigmentación intermolecular inducida por la rutina sólo produce un cambio batocrómico y no un aumento en la intensidad del color (Williams y Hrazdina, 1979).

De los ácidos fenólicos, el ácido sinápico se conoce como el más eficiente de los copigmentos, así mismo el ácido ferúlico exhibió un fuerte desarrollo en el color, además de presentar también un cambio batocrómico (Asen y col., 1972; Markovic y col., 2000). Contrariamente los ácidos benzoicos son copigmentos débiles (Asen y col., 1972). Existen otros copigmentos como los taninos (Robinson y Robinson, 1931; Darias-Martin y col., 2002), la cafeína (Brouillard y col., 1991), y el ácido hidroxicinámico que actúan junto con el ácido clorogénico (Brouillard y col., 1989, Brouillard y col., 1991). Se han reportado a las purinas como copigmentos eficaces de la antocianina sintética 7-hidroxi-3,4'-dimetoxiflavilio (Brouillard y col., 1991). También los aminoácidos han mostrado mejorar el color, sobre todo la prolina y la arginina, pero ninguno produce un cambio batocrómico (Asen y col., 1972).

Las frutas y bayas no contienen grandes cantidades de ácidos fenólicos libres. Sin embargo, pueden considerarse como copigmentos potenciales (Gao y Mazza, 1994). El ácido clorogénico es el principal ácido fenólico libre de las bayas azules, se encuentra en grandes cantidades (200-1000 mg/kg) (Gao y Mazza, 1994; Skrede y col. 2000). En arándanos, se han encontrado pequeñas cantidades de ácido ferúlico y ácido cumárico.

2.3.2 Copigmentación intermolecular

La copigmentación molecular es un fenómeno más importante en las frutas, bayas y sus derivados que la copigmentación intramolecular debido a la falta de antocianinas aciladas en las frutas y bayas. Se pensaba primero que el mecanismo para la copigmentación intermolecular era la formación de un complejo débil (Robinson y Robinson, 1931). Posteriormente, la copigmentación intermolecular se definió como las interacciones entre un antocianina colorida y un copigmento incoloro sin la presencia de un enlace covalente entre las moléculas (Brouillard, 1982). Enlaces hidrógeno e interacciones hidrófobas se sugieren como mecanismo para la obtención de la copigmentación intermolecular, dando una relación 1:1 en la formación del complejo (Asen y col., 1972; Brouillard y col. 1989). También se ha especulado que las interacciones iónicas (electrostáticas) son posibles mecanismos para la copigmentación intermolecular. Sin embargo, Brouillard y col. (1991) informaron que la repulsión o atracción entre las antocianinas y su copigmento no son las responsables de la copigmentación.

Las interacciones intermoleculares pueden ocurrir con el catión flavilio y la base quinoidal de la antocianina (Asen y col., 1972). Ambas moléculas en el equilibrio son casi planas, y los electrones π se encuentran deslocalizados. Esto produce un traslape entre las dos moléculas (Figura 2.11A), previniendo el ataque nucleofílico del agua sobre la molécula de la antocianina. La formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo ceto de la base quinoidal y un copigmento flavonol se ha sugerido como una posible ruta para la formación del complejo (Figura 2.11B) (Williams y Hrazdina, 1979). En tal caso, los grupos ceto de la posición 7- ó 4'- de la antocianina se enlazarían con el hidrógeno 7-, 3'- ó 4'-hidroxilo de un flavonol (Williams y Hrazdina, 1979).

La formación de complejos metálicos por copigmentación intermolecular ocurre en todas las antocianidinas (Chen y Hrazdina, 1981). La estructura de las antocianinas, así como la de copigmentos, afecta la magnitud de la copigmentación. Para los 3-monoglucósidos, los complejos más estables se presentan a pH 3.5-4.2; para los 3,5-diglucósidos, a pH 3.1 y para los 3-

acilglucósidos a un pH de 4.0-4.5, (Williams y Hrazdina, 1979; Wilska-Jeszka y Korzuchowska, 1996).

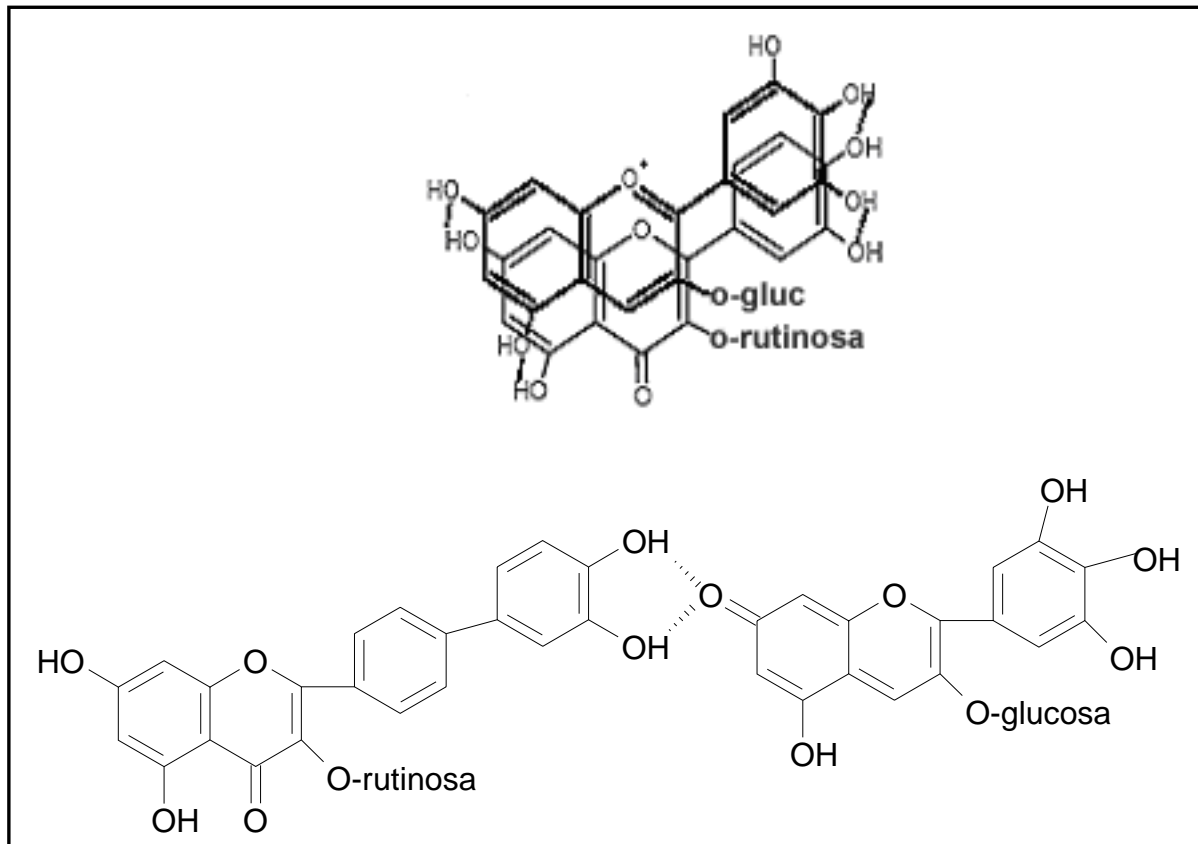


Figura 2.11. Formación de complejos a través de interacciones intermoleculares entre la delphinidina 3-glucósido y la rutina. A) Complejo traslapado o fijo; y B) Complejo paralelo (Williams, M., Hrazdina, G. 1979. Anthocyanins as food colorants: effect of pH on the formation of anthocyanin-rutin complexes. J. Food Sci. 44: 66-68.

2.3.3 Copigmentación intramolecular

En la copigmentación Intramolecular el copigmento es parte de la molécula de la antocianina (Brouillard, 1982). El enlace covalente en la acilación de la molécula de la antocianina estabiliza el pigmento (Francis, 1989). Esta acilación siempre se lleva a cabo con el glucósido de la antocianina. Se piensa que la copigmentación intramolecular es más fuerte y más eficaz estabilizando el color de la antocianina que la copigmentación intermolecular, probablemente debido a la fuerza de los enlaces (Brouillard, 1982).

La excepcional estabilidad del color de las flores cerca del pH neutro se asocia con la copigmentación intramolecular, las antocianinas de las flores a menudo están aciladas. La fracción aromática del grupo acilo de la antocianina interactúa con la carga positiva del catión flavilio para que se impida la reacción del carbono C-2 y C-4 con los reactantes nucleofílicos, como por ejemplo las moléculas de agua (Brouillard, 1982). Brouillard (1982) fue el primero en hacer notar este efecto proteccionista que se lleva a cabo en ambos lados del aglicón de la antocianina y lo llamó acomodo tipo sandwich. Él, también, declaró que las interacciones hidrófobas entre las agliconas del flavilio y los residuos aromáticos de los grupos acilo son las fuerzas que controlan este tipo de acomodo molecular.

El número de grupos acilo, su estructura, y la posición del glucósido, así como la estructura y número de sacáridos afectan la copigmentación intramolecular (Brouillard, 1982). El efecto de la copigmentación de las antocianinas monoaciladas no es tan eficaz como el de las antocianinas poliaciladas. Se cree que en el caso de una antocianina monoacilada, un lado del cromóforo queda desprotegido y el agua es capaz de atacar a la aglicona, por lo que sólo se logra una estabilización parcial (Brouillard, 1982). Los residuos del glucósido son considerados como espaciadores que permiten la reacción del grupo acilo con la aglicona. La interacción de un grupo acilo unido a un residuo del glucósido puede darse en cualquiera de las siguientes posiciones del cromóforo antocianina 3-, 5-, 7-, 3'- o 5'-, (Brouillard, 1982). Los sustituyentes acilados a C-7 y C-3' protegen completamente a la antocianina de la hidratación, produciendo la estabilidad de la antocianina en medios ligeramente ácidos o neutros (Figueiredo y col., 1999). Sin embargo, un residuo de ácido caféico esterificado con una unidad del glucósido en posición 3'- de la delphinidina produjeron un efecto de copigmentación, sin embargo cuando estaba esterificado en la posición 5- de la misma antocianina no se observó ningún efecto de copigmentación significativo (Yoshida y col., 1992).

2.3.4 Semireacciones de asociación

Asen y col. (1972) informaron que un incremento en la concentración de antocianina de 10^{-4} a 10^{-2} M causó un cambio en la longitud de máxima absorbancia de 507 a 502 nm, y un aumento de 300 veces en la absorbancia de la intensidad del color, todo esto debido a los equilibrios de las semireacciones que presentan las antocianinas en medio acuoso. El mecanismo de estas semireacciones ha sido reportado por Hoshino y col. (1980). Estos equilibrios Ribéreau-Gayon (1982) también los relaciona con los cambios de color que se dan en los vinos durante su añejamiento.

2.3.5 Formación de complejos metálicos

La formación de complejos metálicos sólo tiene interés en el área de alimentos y bebidas debido a la contaminación de estos productos por metales.

La mayoría de los metales comunes en los complejos de antocianinas son: estaño (Sn), cobre (Cu), hierro (Fe), aluminio (Al), magnesio (Mg), y potasio (K) (Starr y Francis, 1974). Sólo la cianidina, la delphinidina y la petunidina que tienen más de un grupo hidroxilo libre en el anillo B, por lo que son capaces de formar complejos metálicos (Osawa, 1982).

2.4 Añejamiento

En los últimos años a nivel internacional se han realizado un gran número de investigaciones sobre el color y el añejamiento, pero siempre por separado. En México no se han realizado estos estudios.

Existen otros factores, además del pH, que afectan el equilibrio fisicoquímico y la estructura de esos compuestos, y que son responsables de las alteraciones del color durante el almacenamiento y añejamiento, tales factores son la temperatura y la concentración de bisulfito.

El bisulfito, se usa como antioxidante y como un agente antiséptico. La reacción entre el bisulfito y las antocianinas se muestran en la Figura 2.12.

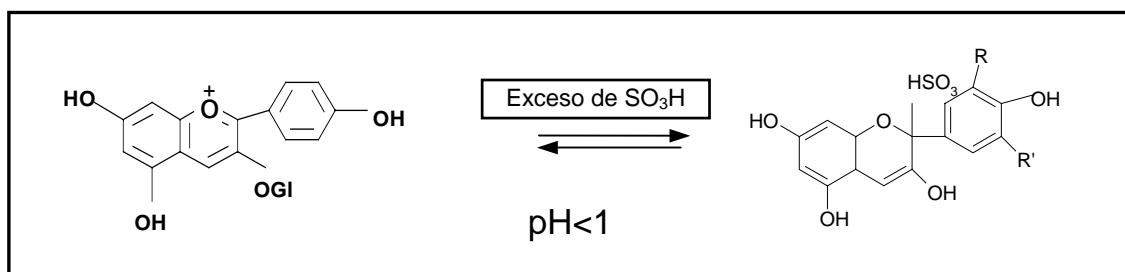


Fig. 2.12 Equilibrio entre el bisulfito con las antocianinas
Somers, T. C., Evans, M. 1977. Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "Chemical Age". J. Sci. Food Agric. 28, 279-287.

Bajo el efecto de ácido sulfuroso, los pigmentos se decoloran parcialmente. Dallas (1994) informó que la decoloración por SO₂ es menos pronunciada en altas concentraciones de antocianinas y que los pigmentos poliméricos son más resistentes a la decoloración por SO₂ que las antocianinas. En presencia de ión bisulfito los pigmentos se decoloran, debido a que reaccionan

con el C2 del ión pirilo. La reacción es reversible y pueden recobrar su color por reoxidación (Reyes-Dorantes y col. 1992), asimismo, sufren una disminución de color en presencia de anhídrido sulfuroso (Harbertson, y col., 2003).

Por otro lado de acuerdo con Somers y Evans (1979), la mayor pérdida de color durante la producción de vino tinto es atribuida al efecto del etanol sobre los pigmentos coloridos presentes en el mosto.

Bate y Smith (1954), Harbone (1958) y Roux (1957) introdujeron el proceso de cromatografía en papel, para la separación de pigmentos puros de antocianinas y otras sustancias de extractos crudos de plantas. La mayoría de las antocianinas se caracterizan por presentar su máxima absorción en la región de 500 a 550 nm, la diferencia entre cada espectro es muy sutil, y se pierde sí la antocianina no está bien aislada.

Durante el proceso de añejamiento estos compuestos participan en diversas reacciones químicas que dan como resultado pérdidas en el color (lo que se conoce como reacciones químicas degradativas, Ribéreau-Gayon, 1983). Las antocianinas son generalmente inestables y su color natural rojo o azul puede cambiar indeseablemente a café; esos cambios están determinados por varios factores tales como pH, temperatura, presencia de oxígeno, azúcares, cantidad de sulfuroso, etc. (Dallas, 1994). A medida que el vino se añeja, va cambiando de un color rojo brillante a un rojo café, lo que va acompañado de una reducción en la concentración de antocianinas y de un incremento en la producción de compuestos de alto peso molecular (2000-3000 Daltons), que son inestables en disolución y que tienden a sedimentar después de un largo almacenamiento lo que trae consigo una reducción de color (Baranowski y Nagel, 1983).

Las antocianinas son pigmentos de color rojo, azul y violeta; en condiciones ácidas, el color rojo del ión pirilio está en equilibrio con la pseudobase carbinol dando un color menos intenso. El color depende del pH del vino, siendo hasta seis veces más coloridas a pH 2.9 que a pH de 3.9. Varias investigaciones (Somers 1971, Brouillard y Dubois 1977, Brouillard y Delaporte 1977, Glories 1987 en Dallas 1994) han demostrado que el pH juega un papel importante en el equilibrio químico de las antocianinas entre las formas coloridas e incoloras. En medio ácido, las antocianinas son de color rojo, en pH neutro son violetas y en medio alcalino son azules. Así, las antocianinas coloridas (Figura 2.13; I y II) en vinos tintos, están en equilibrio con una amplia cantidad de base carbinol (III). La acidificación a $\text{pH} < 1$ convierte a ambas formas incoloras así como a la base quinoidal (II) a la forma catiónica, originando un incremento en el color (Jackson y Timberlake, 1978). En contraste, los pigmentos poliméricos son mucho menos sensibles a los cambios de

pH (Dallas, 1994). La separación de pigmentos poliméricos también da un incremento en el color en medio ácido aunque de menor intensidad. La suma de las formas I y II, pueden ser consideradas como los pigmentos totales. Los equilibrios químicos que se establecen entre las diversas formas de antocianinas se muestran en la Figura 2.13.

Por su parte, el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las antocianinas, ha demostrado que éstas se degradan por el calor. Baranowski y Nagel (1983) observaron en un sistema modelo, que la temperatura de almacenamiento afecta a la malvidina 3-glucosa degradándola y formando polímeros. A 42°C se presentó la mayor formación de polímeros, así mismo éstos fueron más estables a la degradación y precipitación a 32°C (Dallas, 1994). En otras investigaciones hechas también por Baranowski y Nagel (1983), los resultados muestran que las bajas temperaturas son más efectivas para la producción y mantenimiento del vino con un buen color y estable.

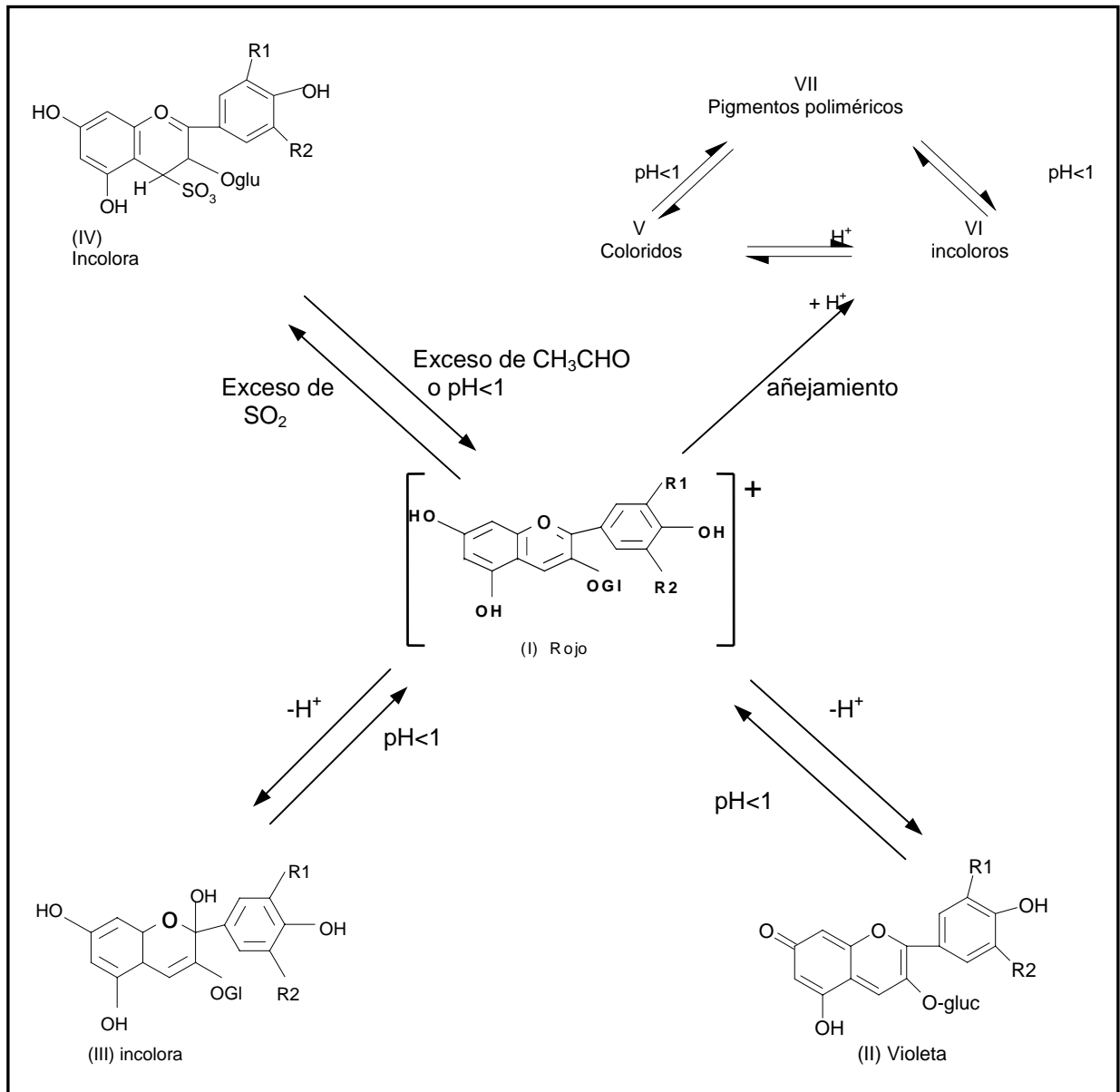


Figura 2.13 Efecto del pH sobre el color del vino.
(I) Cation flavilio (colorido), (II) Base quinoidal (colorida), (III) Base carbinol (incolora), (IV) adición de bisulfito (incolora), (V) Pigmentos poliméricos (coloridos y resistentes al bisulfito), (VI) Pigmentos poliméricos (incoloros), (VII) Pigmentos poliméricos (pH<1, coloridos).
(Jackson y Timberlake, 1978)

2.5 La importancia de los compuestos fenólicos a nivel industrial y fisiológico.

Actualmente existe mucho interés en los compuestos nutracéuticos debido a sus posibles beneficios en la salud (Giusti y Wrolstand, 2001), y las antocianinas son parte de estos compuestos. Se han hecho estudios sobre su acción sobre la reducción en los problemas coronarios del corazón (Bridle y Timberlake, 1996), el incremento sobre la agudeza visual, la actividad antioxidante (Takamura y Yamagami, 1994; Wang y col., 1997), y sobre su actividad anticancer (Kamei y col., 1995).

Debido a su uso los colorantes han sido clasificados por la FDA (Food and Drug Administration) como certificados y no certificados, siendo los certificados aquellos colorantes sintéticos y las lacas, mientras que los no certificados incluyen pigmentos derivados de fuentes naturales como vegetales, minerales o animales o bien sintéticos pero idénticos o derivados de los naturales (Fennema, 1985). A pesar de las ventajas que tienen los colorantes artificiales certificados, se ha restringido su uso debido a su toxicidad como es el caso de los colores rojos (Rojo 40). Es por eso que se han buscado nuevas alternativas para el uso de colorantes sintéticos. Como alternativa se ha propuesto a las antocianinas como unas de las principales fuentes de pigmentos rojos.

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Se han identificado más de 5000 flavonoides diferentes. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercitina el predominante con un valor medio de 16 mg/día.

En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres. Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones que favorecen la oxidación, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías.

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un eleva-

do número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Martínes-Flores, y col., 2002).

Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica. Además los flavonoides presentan otras propiedades como el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450, entre otras.

2.5.1 Tipos y fuentes de flavonoides

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soya, los que se consumen en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre.

El vino tiene un alto contenido en compuestos polifenólicos, aproximadamente se conocen unos 500, la mayoría de los cuales provienen de la uva y del proceso fermentativo. En la uva estas moléculas se localizan en la piel, especialmente en las células epidérmicas, y en las pepitas. Su cantidad y tipo depende principalmente de la variedad de la vid, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo.

Se han identificado más de 5000 flavonoides (Martínes-Flores, y col., 2002), entre los que se pueden destacar:

1. *Citroflavonoides*: quercitina, hesperidina, rutina, naranjina y limoneno. La quercitina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócoles, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones. La naranjina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno se ha aislado del limón y la lima.
2. Flavonoides de la soya o *isoflavonoides*: están presentes en los alimentos con soya tales como porotos, tofu, tempeh, leche, proteína vegetal texturizada, harina, miso. Los dos más conocidos son la *genisteína* y la *daidzeína*.

3. *Proantocianidinas* se localizan en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino.
4. *Antocianidinas*: son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas.
5. *Ácido elágico*: es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras.
6. *Catequina*: el té verde y negro son buenas fuentes.
7. *Kaemferol*: aparece en poro, brócoli, rábano, endibias y remolacha roja.

2.5.2 Dieta y flavonoides

Los flavonoides no poseen las características de las vitaminas: no son aminas y conforman otro grupo químico, pero por su acción protectora y la imposibilidad del organismo humano de producirlos merecen ser incorporados al grupo de los nutrientes esenciales.

Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día (Martínes-Flores, y col., 2002), siendo predominantes los flavonoles especialmente la quercitina. Las fuentes alimenticias principales de los flavonoles son, entre otras, el té negro, las cebollas, las manzanas, la pimienta negra que contiene cerca de 4 g/kg de quercitina, y bebidas alcohólicas como vino y cerveza.

De los alimentos, el té es una de las fuentes principales de quercitina, el vino tinto y las cebollas. La ingesta promedio de flavonoles y flavonas se sitúa entre los 20 y 26 mg/día. Excede, por tanto, a la de otros antioxidantes en la dieta, tales como el beta-caroteno (2-3 mg/día) y la vitamina E (7-10 mg/día) y es igual aproximadamente a un tercio de la vitamina C (70-100 mg/día). Los flavonoides representan, pues, una contribución importante al potencial antioxidante de la dieta humana.

La concentración total de compuestos polifenólicos en el vino varía entre 1,8 y 4,0 g/l, con un promedio de 2,57 g/l para el vino tinto y de 0,16 a 0,3 g/l, con un promedio de 0,24 g/l para el vino blanco (Martínes-Flores, y col., 2002).

2.5.3 Acción antioxidante de los flavonoides

La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos se conoció desde los años treinta; sin embargo, el mecanismo antioxidante no era conocido hasta hace poco tiempo. El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como

enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; pueden quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como Diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones vírales, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria.

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, son (Bors y col., 1990):

- Presencia en su estructura de un O-dihidroxi en el anillo B; lo que le confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C.
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

Siguiendo estos criterios, el flavonoide quercetina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante. Su capacidad antioxidante medida como Trolox es de 4,7 mM, lo que resulta 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C además de que tiene una solubilidad similar a la de la vitamina E.

La función antioxidante de la quercitina muestra efectos sinérgicos con la vitamina C. El ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercitina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo. Por otra parte, la quercitina protege de la oxidación a la vitamina E, con lo cual también presenta efectos sinergizantes. Así, se ha demostrado que el flavonoide inhibe la fotooxidación de la vitamina E en la membrana celular de las células sanguíneas en presencia de hematoporfirina como fotosensibilizador (Pace-Asciak y col. 1995).

Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células. Tiene también efectos citoprotectores. Asimismo, se ha comprobado su potente capacidad de inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas. De hecho, las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares (Martínes-Flores y col., 2002).

2.5.4 Flavonoides y carcinogénesis

Un número creciente de sustancias naturales se han identificado como moduladoras del proceso de carcinogénesis; entre ellas se encuentran los flavonoides que han demostrado poseer efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos. Diversos datos experimentales han demostrado la acción anti-proliferativa y anti- carcinogénica, así como el papel de agente quimiopreventivo de los flavonoides. Una posible explicación a estos efectos anticancerígenos podría derivarse del incremento que algunos flavonoides producen en las concentraciones intracelulares de glutatión a través de la regulación de la expresión de la enzima limitante en su síntesis. Asimismo, en lo que respecta a la prevención del cáncer de mama, podría deberse a su potente capacidad de inhibir la actividad de la aromatasa evitando de esta forma la conversión de andrógenos en estrógenos (Pouget y col., 2002).

3. OBJETIVOS

Objetivo General.

Estudiar la composición de antocianinas presentes en la uva, además de los factores que influyen en el cambio de color durante el proceso de añejamiento del vino tinto elaborado con Cabernet Sauvignon y controlando la fermentación maloláctica con un inóculo de *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus brevis*.

Objetivos Particulares:

- 1.- Separar e identificar las antocianinas del hollejo fresco del cultivar Cabernet Sauvignon del estado de Zacatecas México.
2. Determinar la composición de las antocianinas mono y poliméricas durante el añejamiento del vino tinto, realizados en condiciones controladas.
3. Determinar el efecto del pH, de la concentración de SO₂ y de la temperatura durante el añejamiento sobre el color del vino.
- 4.- Determinar el efecto de la fermentación maloláctica (FML), inducida con *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus brevis* sobre el color del vino tinto Cabernet Savignon.

Justificación

La investigación seria y metódica en el área enológica mexicana es incipiente, se ha dado de manera aislada y esporádica. Las causas son variadas, desde el factor económico, con un mercado de vinos no exigente con la calidad, hasta un marcado favoritismo en el consumo de vinos extranjeros, una diferencia de precios entre los productos nacionales e internacionales, etc. Las universidades, centros regionales de investigación y aún las industrias no invierten, o lo hacen a cuenta gotas.

La investigación sobre el color y el añejamiento tiene interés desde el punto de vista científico y económico, ya que actualmente el interés por los productos nutraceuticos va en aumento. El consumidor busca alternativas “más sanas”, lo que ha llevado a buscar alternativas para los colorantes artificiales habiendo una tendencia a regresar al uso de colorantes de origen natural en alimentos. Las antocianinas son una buena opción ya que son abun-

dantes y por lo tanto económicas, teniendo por supuesto como principal problema su aislamiento y estabilidad.

Desde el punto de vista enológico, uno de los principales problemas que presentan los vinos tintos nacionales es su falta de consistencia u homogeneidad en cuanto al color y el sabor. Al probar dos botellas de la misma cepa y añada se captan diferentes características sensoriales. La experiencia de otros países como Chile, Argentina y Estados Unidos demuestra que teniendo buenos controles de calidad, es posible ampliar las expectativas económicas y se pueden vender tanto regional como internacionalmente los productos vitivinícolas.

Las reacciones que ocurren durante el añejamiento aún no han sido del todo dilucidadas, el complejo sistema que conforma el vino tinto no facilita la tarea. El presente trabajo pretende ayudar a encontrar las condiciones necesarias de añejamiento en la cepa Cabernet Sauvignon para controlar la estabilidad del color en el vino tinto, aclarando cuando menos una pequeña parte de la relación color, pH, SO₂, además de conocer la composición de las antocianinas de ésta variedad de uva mexicana.

4. MÉTODO:

La figura 4.1 muestra el diagrama general de trabajo para desarrollar los objetivos en ésta investigación.

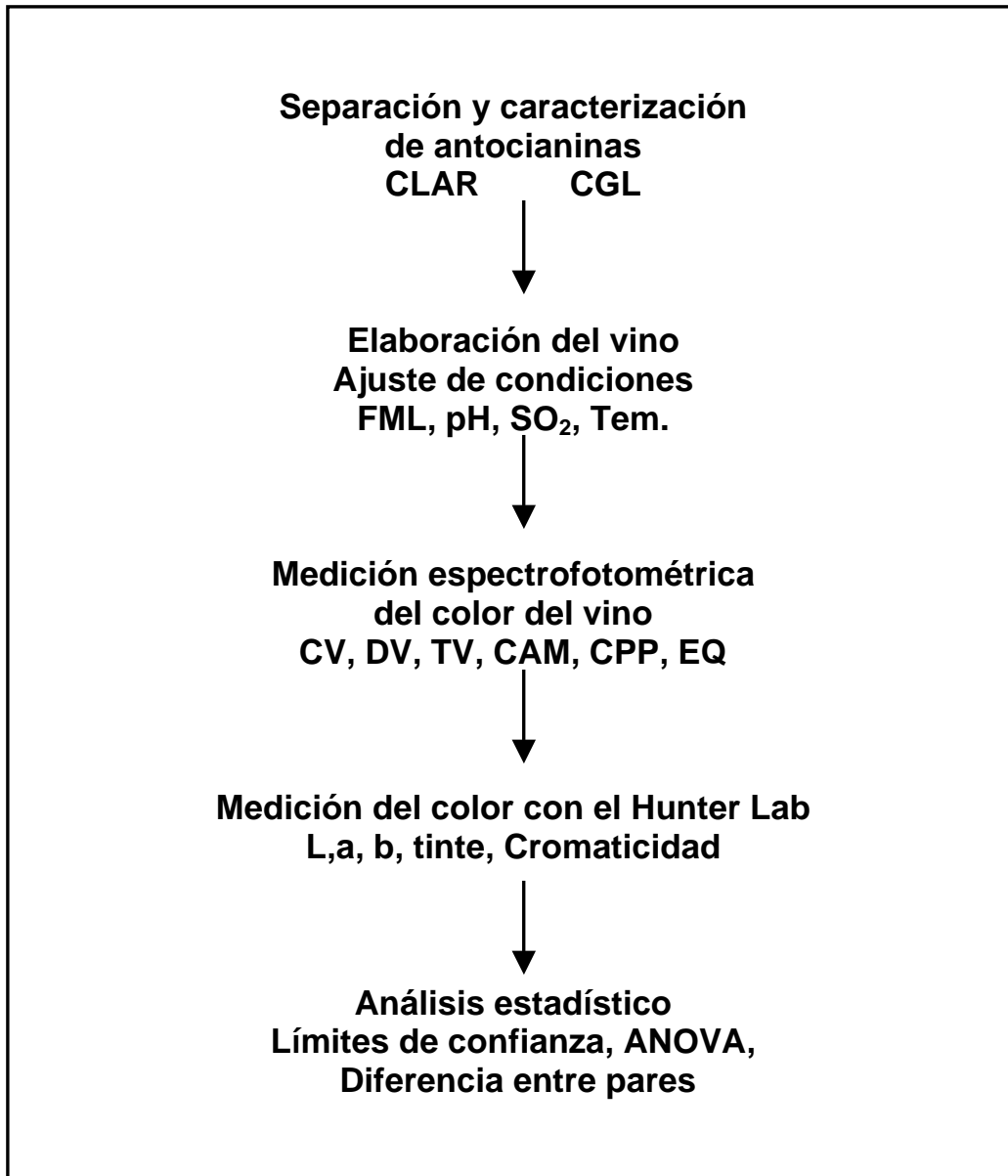


Figura 4.1. Diagrama general de trabajo para desarrollar los objetivos en ésta investigación.

4.1. Separación y caracterización de antocianinas en el hollejo.

Reactivos. Los estándares de los ácidos fenólicos se obtuvieron de fuentes comerciales: Ácido gálico, ácido vainílico, ácido caféico, ácido p-cumárico, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Las antocianidina: Delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, en su forma de clorhidrato se adquirieron en Extrasynthese (Lyon Francia).

El ácido fórmico utilizado fue de J. T: Baker, el metanol grado CLAR fue de J. T: Baker

Cromatografía

La Figura 4.2 resume el trabajo realizado para la separación e identificación de las antocianinas del hollejo de la uva Cabernet savignon.

Extracción

Para la extracción de las antocianinas se probaron las siguientes técnicas: Harbone, 1958, Yokotsuka y Nishino 1990 (cromatografía en papel), y Gao y Cahoon, 1995 (separación por CLAR), Gao y Mazza 1994, Yokotsuka y Singleton, 1997. Con base en los resultados de pruebas previas se decidió trabajar una modificación de las 2 últimas.

Se utilizaron 450 g de uva, se les retiró el hollejo y se colocaron en 150 mL de HCl metanol (3:97). Se refrigeraron a 4°C, 24 h. y posteriormente se filtró en papel Whatman No 1. Se concentró a sequedad en un rotavapor (Buchi, IKA-Labortechnik Rotavapor. Suiza) al vacío a 30°C, y se guardó en frascos viales con atmósfera de N₂ a 4°C, resguardados de la luz, dentro de un desecador con CaCl₂, al vacío.

Separación y colección por CLAR preparativa de las antocianinas

Usando la técnica propuesta por Yokotsuka y Singleton, (1997) una parte del extracto se sometió a una separación por CLAR preparativa.

Se utilizó un cromatógrafo de la serie 1100 de Agilent (USA), con una válvula de inyección Rheodyne, con un loop de 20 µL bajo las condiciones del Cuadro 4.1.

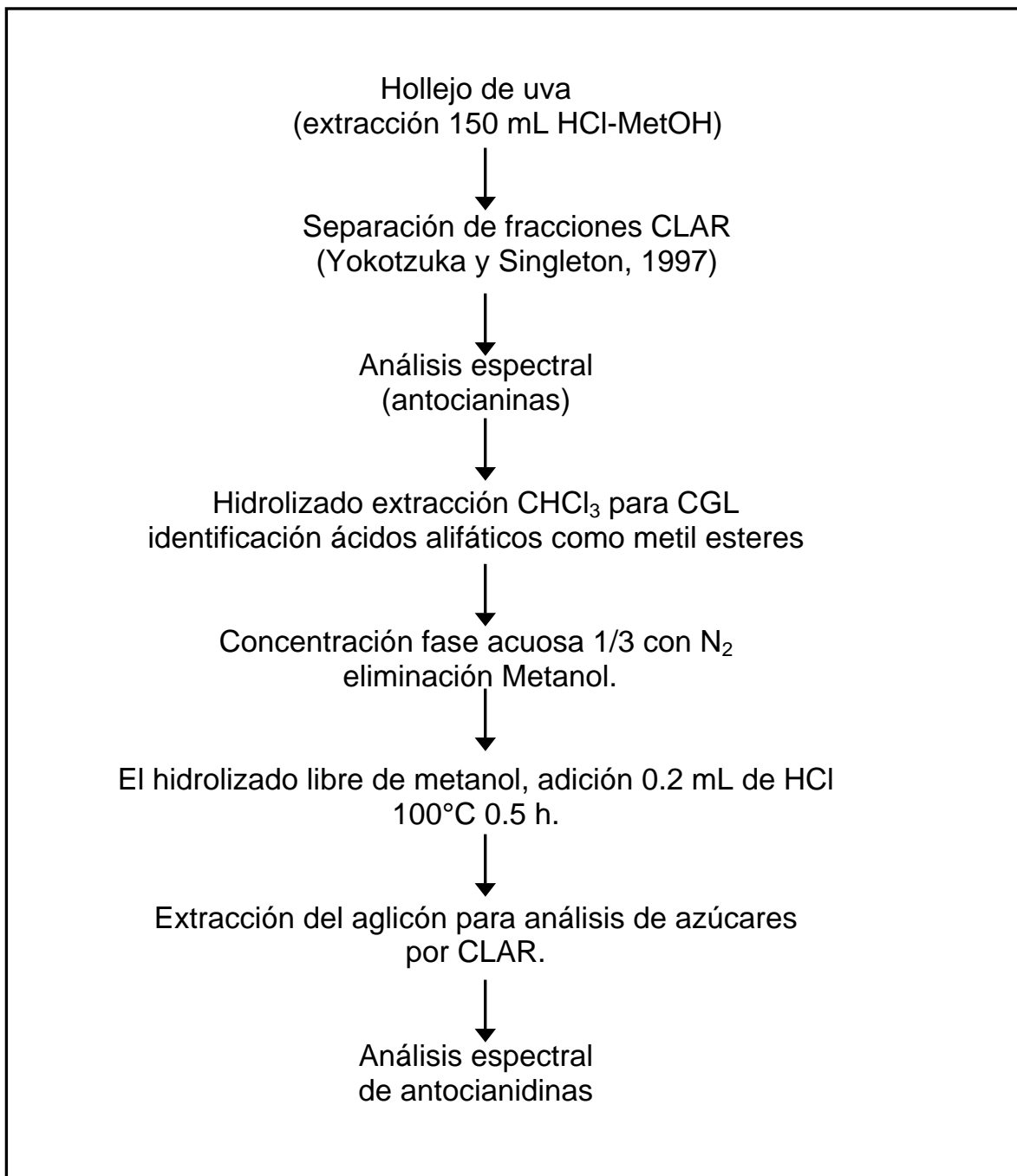


Figura 4.2 Diagrama esquemático para la completa caracterización de antocianinas por CLAR Y CGL

Se solubilizaron 0.2 mg del extracto en 0.4 mL de metanol, se filtró en membranas de nylon de 0.44 micras. Los disolventes se filtran en membranas de nylon de 0.44 micras, además de ser desgasificados. Se hicieron inyecciones de 20 μ L.

La columna se equilibró con 10 % de ácido fórmico y 20 % de metanol, 15 minutos antes de cada corrida.

Se probó la técnica informada en el artículo y posteriormente se modificó para mejorar la separación.

Cuadro 4.1 Condiciones de trabajo para la separación de antocianinas

Columna	Lichrosorb rp-18 fase reversa. 250 x 4.6 mm d. l., 5 μ m (phenomenex).
Temp. Columna	30 \pm 1°C
Disolvente A	ácido fórmico en agua al 10% v/v
Disolvente B	metanol en agua al 50 % v/v
Flujo	1.0 mL/min
Gradiente inicial*	De 0 a 10 minutos, 20% de B
Figura 5.36	De 10 a 70 minutos, 20 % a 25 % de B
	De 70 a 80 minutos, de 25 % a 45 % de B
Detector	arreglo de diodos, UV-Visible: 520 nm

*Yokotzuka y Singleton, 1997

Esta técnica se repitió varias veces para coleccionar los picos con los mismos tiempos de retención los cuales se combinaron y concentraron al vacío a 1/5 de su volumen a 40°C, para su posterior caracterización.

Identificación de las antocianinas de las uvas Cabernet Sauvignon del Edo. de Zacatecas de las fracciones hidrolizadas (Gao y Mazza, 1994; Gao y Cahoon, 1995)

Esta técnica permite la detección en una sola corrida, de las antocianinas aciladas y sus ácidos fenólicos involucrados

El análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento para los ácidos fenólicos y antocianidinas. Se llevó a cabo con un cromatógrafo Agilent de la serie 1100 (USA) provisto con un detector de arreglo de diodos. Una columna Lichrosorb RP-18 fase reversa. 250 x 4.6 mm d.i., 5 μ m.de Phenomenex (USA). Para la recolección de datos se utilizó un software Chem Station

versión 8.3 de Agilent. El Cuadro 4.2 muestra las condiciones para la separación de las antocianinas del hollejo de la uva Cabernet savignon.

Cuadro 4.2 Condiciones de trabajo para la identificación de los ácidos fenólicos y las antocianinas en una sola corrida

Columna	Lichrosorb c-18 fase reversa. 250 x 4.6 mm d.i., 5 µm.
Temp. Columna	30 ± 1°C
Disolvente A	ácido fórmico en agua al 10% v/v
Disolvente B	metanol en agua al 50 % v/v
Flujo	1.0 mL/min
Gradiente lineal* Figura 5.37	de 0 a 10 minutos, de 17-22% de B de 10 a 12 minutos, de 22-27% de B de 12 a 20 minutos, 27-31% de B de 20 a 30 minutos, de 31% de B de 30 a 40 minutos, de 31-38% de B de 40 a 44 minutos, de 38-47% de B de 44 a 46 minutos, de 47-60% de B de 46 a 54 minutos, de 60-65% de B de 54 a 55 minutos, de 65-17% de B
Detector	arreglo de diodos, UV-Visible: 280 nm y 525 nm

*Gao y Mazza, 1994

Todos los disolventes se filtraron por membranas de 0.45 µm y posteriormente se desgasificaron en un baño de ultrasonido durante 30 minutos.

Para la identificación de las antocianinas, se utilizó la misma condición del Cuadro 4.4 para correr los estándares de las antocianidinas, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (Extrasynthese, Lyon, Francia), preparando disoluciones con 0.2 mg/ml con una disolución de metanol HCl al 0.1 % v/v.

Alícuotas de 20 µL de cada hidrolizado y de los estándares se utilizaron para identificar ácidos fenólicos y antocianidinas en el CLAR.

Hidrólisis (Gao, L y Mazza, 1994). Para separar las antocianinas en antocianidinas y su azúcar correspondiente, 0.2 mg del extracto se colocaron en tubos de ensayo, con 0.2 mL de metanol al cual se le adicionaron 0.2 mL de HCl 2 N. El vial se calentó a baño María en agua hirviendo por 60 minutos y se enfrió al chorro de agua.

Para el análisis de CLAR de los ácidos fenólicos y las antocianinas, se tomó una alícuota de 20 μL del hidrolizado y se inyectó en el cromatógrafo.

Preparación de las muestras para CG para el análisis de los metil ésteres de los ácidos alifáticos.- De la muestra de antocianinas sobrante del hidrolizado, se toman 200 μL para ser extraídos con 200 μL de cloroformo. Se agitó vigorosamente después de la separación, y se tomó una alícuota de 30 μL de la fase orgánica con una micropipeta Eppendorf y se transfirió a un vial ámbar que contenía 30 mg de Na_2SO_4 . La mezcla se agitó varias veces y se inyectó una alícuota de 0.4 μL de la fracción del cloroformo al cromatógrafo de gases.

Cromatografía de gases para ácidos alifáticos. Se usó un cromatógrafo de gases 6890 plus de Agilent (USA).

El método para detectar el ácido acético y los ácidos dicarboxílicos acilados permite ver al ácido acético como acetato de metilo y el ácido acético libre y se muestran en el Cuadro 4.3.

Cuadro 4.3 Condiciones de trabajo para la identificación de los ácidos alifáticos en CGL

Columna capilar	Inowax. 30 m x 0.25 μm d.i. X 0.32 μm . (agilent)
Temp. columna	35 \pm 1 $^\circ\text{C}$ por 2 minutos
Rampa	de 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 200 $^\circ\text{C}$
Flujo	2.3 mL/min
Inyector	a 250 $^\circ\text{C}$
Split	25
Detector	Ionización de flama
Gas acarreador	Nitrógeno

Caracterización de la fracción azucarada.

Las fracciones hidrolizadas se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución en un cromatógrafo Agilent de la serie 1100 (USA) provisto con un detector de índice de refracción. Los tiempos de retención obtenidos en minutos, se compararon con los tiempos de retención de los estándares de glucosa, arabinosa, xilosa. Preparados a una concentración de 1 mg/mL, cada uno. Se inyectaron 20 μL de cada muestra. Las condiciones de trabajo se muestran en el Cuadro 4.4.

Cuadro 4.4 Condiciones de trabajo para la identificación de los azúcares de las antocianinas separadas por CLAR.

Columna	Zorbax carbohydrate, 4.6 mm d.i. X 250 mm x 5 µm.
Temp. Columna	35 ± 1°C
Disolvente A	agua
Flujo	1.4 mL/min
Condiciones	Isocrático
Detector	Índice de refracción

*instructivo de la columna Zorbax Carbohydrate

Espectrofotometría de la caracterización.

Todas las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Génesis 5 de Milton Roy (USA). Para el corrimiento de los espectros, el pigmento se redisolvió en metanol con 0.01% de HCl. Para registrar los cambios en la longitud de máxima absorbancia con tricloruro de aluminio se adicionaron tres gotas de una disolución de sal anhidra en etanol al 5% (p/v), en cada celda. Las mediciones se efectuaron de inmediato.

Se compararon los valores experimentales con los informados por Harborne (1958); Wulf, L. W. y Nagel, C. (1978); Hebrero, y col. (1989) y Yokotsuka y Nishino (1990).

4.2. Elaboración del vino tinto

La Figura 4.2 muestra el diagrama de vinificación con el que se elaboró el vino siguiendo la técnica de microvinificación (Reyes y col. 1992):

Se recolectó uva Cabernet Sauvignon del estado de Zacatecas, se colocó en cajas de 10 Kg, para evitar el deterioro de la fruta. Se trasladó a la Ciudad de México y se conservó la uva en bolsas de plástico de un Kg a -20°C, hasta su utilización.

Estrujado.- Consistió en reventar las uvas para permitir la salida del jugo que se encuentra en las pequeñas vacuolas intercelulares, favoreciéndose los fenómenos de difusión y disolución de los compuestos que caracterizan al vino tinto. El estrujado se efectuó a mano, retirando todo el raspón.

Encubado.- Esta operación consistió en introducir el mosto en los recipientes o cubas en donde se llevaron a cabo los procesos de sulfitado, maceración, fermentación, etc. Se utilizaron cubas de vidrio de 5 litros de capacidad.

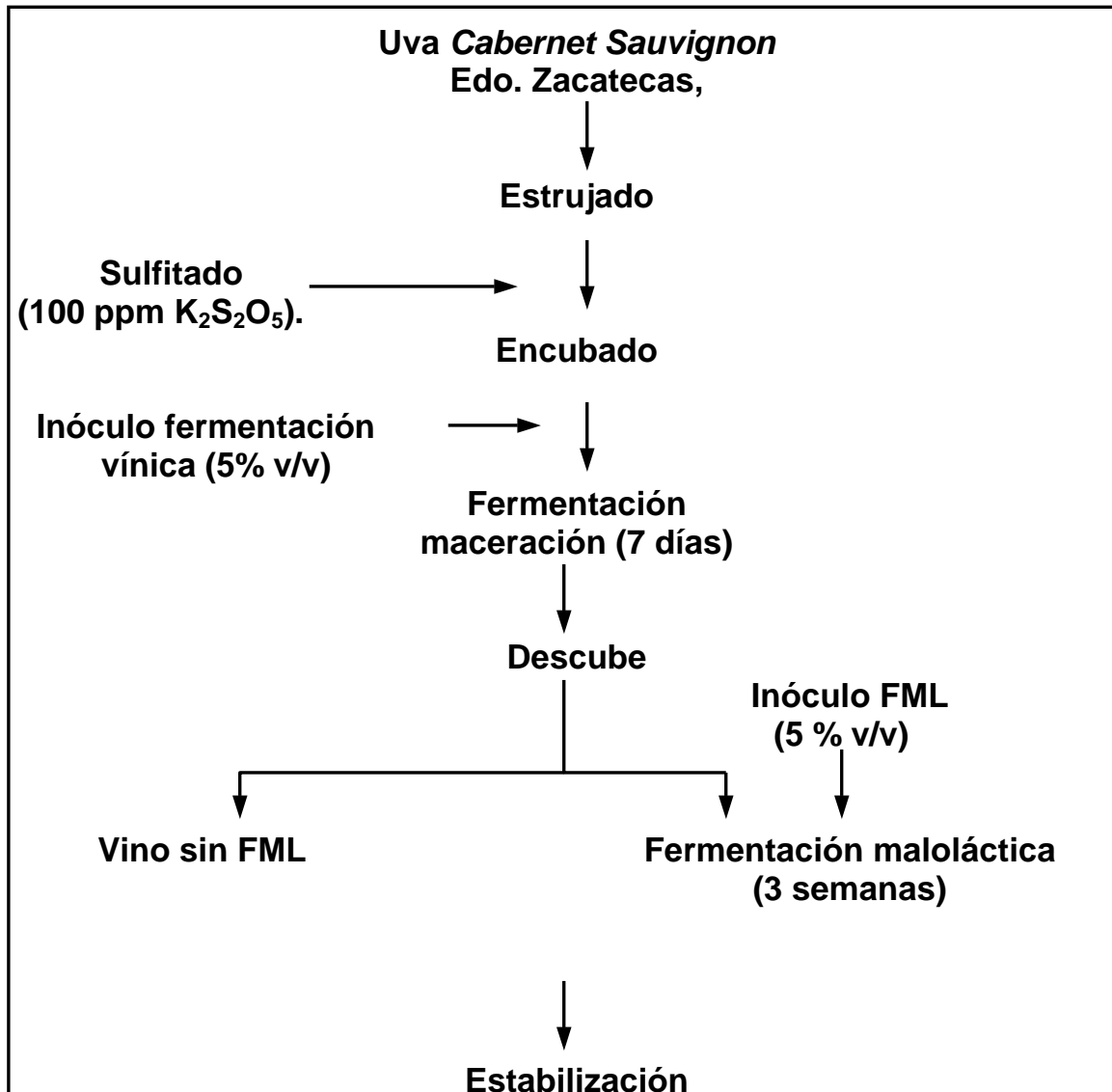


Figura 4.2 Diagrama esquemático de la vinificación por la técnica de microvinificación)

Sulfitado.- Se adicionaron 100 ppm de metabisulfito de potasio ($K_2S_2O_5$). Este agente antiséptico inhibe a las bacterias y permite la selección de las levaduras además de ayudar a la disolución de la materia colorante de la uva.

Preparación del Inoculo para la fermentación vínica.- Se utilizó un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* variedad *oviformis*, obtenido de las lías de otra cuba de fermentación vínica. A una proporción 1:1 se mezcló con mosto de uva recientemente elaborado y se mantuvo a 28 °C durante 3 días, en agitación para facilitar su reproducción

Inoculo para la fermentación vínica.- Se adicionó en condiciones asépticas, al 5% en volumen con respecto al mosto a fermentar.

Fermentación con maceración.- La maceración consistió en la permanencia durante 7 días del mosto en contacto con el hollejo, la pulpa y las pepitas de la uva, éstas cedieron parcialmente al mosto sus constituyentes. Es un proceso de extracción fraccionada en donde las antocianinas, taninos y compuestos aromáticos emigraron del hollejo. La maceración aportó al vino tinto sus cuatro características específicas: color, taninos, componentes del extracto y aroma. Con respecto al color, la concentración de antocianinas depende del cepaje, de las condiciones del suelo, del clima y de las características particulares del año en cuestión. La duración de la fermentación en las cubas fue de 7 días con temperaturas de fermentación entre 26° y 28°C. Bajo estas condiciones, los vinos obtenidos presentaron un buen color, son suaves, armónicos y sin gusto amargo.

Descube.- La separación de los orujos del mosto se efectuó pasando el mosto fermentado por un cedazo de manta de cielo, los sólidos fueron exprimidos a mano.

Preparación del Inoculo para la fermentación vínica.- A partir de cepas puras de microorganismos aislados en el laboratorio de Enología y Alimentos Fermentados de la UAMI, se seleccionaron el *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus brevis*. Se sembraron en medio basal enriquecido modificado para el crecimiento de bacterias lácticas (Verde-Calvo, 1994). Se incubaron a 30°C durante 48 horas.

Fermentación maloláctica.- En regiones frías, como en algunas zonas del estado de Zacatecas, el contenido de ácido málico de las uvas es elevado, se producen vinos verdes y ácidos, vinos con un contenido entre 8 y 10 g/L de acidez fija, reportada como ácido tartárico. En estos vinos es recomendable efectuar la fermentación maloláctica ya que esto permite que la acidez descienda a valores entre 5 y 7 g/L (reportada como ácido tartárico). La duración generalmente es de 3 semanas.

a).- **Vino con fermentación maloláctica.**- Esta fermentación se efectuó sobre la mitad del mosto, adicionando una mezcla de cultivos de bacterias lácticas: *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus brevis* en concentración 2.5×10^9 UFC/mL cada uno. El tamaño del inóculo fue de 5 % (v/v), con una relación de cepas de 1:1.

b).- **Vino sin Fermentación Maloláctica.**- La otra mitad del vino prosiguió el proceso sin someterse a esta fermentación.

Estabilización.- Los vinos en general pueden sufrir alteraciones en su limpidez y/o composición, debido a problemas microbiológicos y a cambios de temperatura y aireación. La estabilización consistió en someter al vino terminado a refrigeración durante 4 días a 8°C. Posteriormente se decantó.

Muestreo. Se realizaron análisis fisicoquímicos al mosto y a los vinos al final de las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Durante el añejamiento de 18 meses, las mediciones espectrofotométricas de los vinos se realizaron cada tercer día en los primeros dos meses, y del mes 3 al 18 se efectuaron cada 8 días. Todos los experimentos y análisis se realizaron por triplicado.

Análisis fisicoquímico.- Al mosto de uva y a los vinos se les efectuaron los análisis de: acidez, fija y volátil, etanol, azúcares reductores totales, pH, anhídrido sulfuroso total y libre (Amerine y Ough,1980). El ácido málico se midió enzimáticamente (Boehringer Mannheim No. Cat. 139 068).

Análisis microbiológico.- Durante la fermentación maloláctica se cuantificó la cuenta viable de bacterias lácticas, utilizando el medio de cultivo MRS (medio rogosa Sharpe de los Laboratorios Merk) con 0.02% de verde de bromocresol como indicador, el medio es específico para el crecimiento de las bacterias lácticas.

4.3 Medición del color:

4.2.1. Se determinaron los siguientes parámetros, con base a lo propuesto por Jackson y Timberlake (1978), se utilizó un espectrofotómetro Jenway UV-Visible modelo 6105 (Jenway LTD, Inglaterra).

1.- El color del vino (CV) se evaluó a través de la absorbancia medida en una celda de 10 mm a 520 nm, con vino no diluido.

$$CV = E_{520nm}^{10mm}$$

2.- La densidad del color (DC) se valoró por la suma de las absorbancias medidas a 420 y 520 nm, utilizando una celda de 10 mm y vino no diluido.

$$DC = E_{520nm}^{10mm} + E_{420nm}^{10mm}$$

3.- El tinte del vino (TV) fue el valor resultante de la relación de las absorbancias.

$$TV = \frac{E_{420nm}^{10mm}}{E_{520nm}^{10mm}}$$

4.- El color de los pigmentos poliméricos (CPP) se midió después de adicionada una solución de metabisulfito de potasio al 20%.

$$CPP = E_{520nm}^{10mm}(SO_2)$$

5.- El color de las antocianinas monoméricas (CAM), se obtuvo a través de midió por la relación:

$$CAM = CV - CPP$$

6.- La edad química (EQ), se cuantificó usando la siguiente razón:

$$EQ = \frac{CPP}{CV}$$

- Utilizando una microcelda de 10 mm, se midió la absorbancia del vino a 420 y 520 nm.
- Se agregó 20 μ l de metabisulfito de potasio a un mL de vino (para dar 2000 ppm). Se mezcló y se midió la absorbancia a 520 nm.

4.4. CIELAB análisis en el cambio de color de los vinos añejados

Medición de la intensidad de color por métodos colorimétricos. Se efectuaron análisis triestímulos empleando las escalas L*, a*, y b*, propuestas por la CIE (Comisión Internacional de Iluminación), con el colorímetro D25-PC2 Hunter-Lab.

El parámetro de matiz o tinte (hue o H) y cromaticidad (C), se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Hue o H} = \arctan (b^*/a^*)$$
$$\text{Cromaticidad o C} = (a^{* 2} + b^{* 2})^{0.5}$$

Se efectuaron determinaciones de los valores triestímulos, donde el parámetro L^* , es la medida de la claridad o luminosidad y se reporta de opaco (0) a completamente transparentes (100), el centro del eje L^* muestra que predomina el color gris aunque puede considerarse como neutral. a^* la medida de este valor se encuentra en un eje que va de izquierda a derecha es decir el color rojo ($+ a^*$) y el color verde ($- a^*$), el valor de b^* se encuentra a lo largo del plano es decir se mueve de ($+ b^*$) color amarillo a ($- b^*$) color azul (Sarni y col., 1996).

Se utilizaron alícuotas de 15 ml ya centrifugadas que se vertieron en celdas de 20 ml. Las determinaciones se realizaron al inicio y al final del añejamiento, para cada una de las condiciones estudiadas. Las lecturas se efectuaron por triplicado.

El valor de los puntos a^* y b^* de cada sistema al ser graficados en el plano de color, especifican el Hue (matiz) y Croma (viveza o falta de). Cuando el valor L^* (grado de luminosidad) se agrega a esta figura, se conoce el color final de cada sistema.

Para conocer las diferencias de color entre dos sistemas el CIELAB, creó la fórmula:

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0.5}$$

Añejamiento. Durante este período se evaluaron tres factores a 2 niveles diferentes: pH, SO_2 y temperatura. El diseño experimental fue factorial completo (2^3) en dos bloques con y sin fermentación maloláctica, como se muestra en los Cuadros 4.5 y 4.6. Se tomaron alícuotas de 100 mL de cada vino tinto se vertieron en frascos, por duplicado. Se ajustaron los parámetros a evaluar: el SO_2 con una disolución de metabisulfito de potasio al 1 %, y el pH con disoluciones de ácido tartárico 1M, o NaOH 1 M. El tiempo de añejamiento fue de 18 meses, durante el cual los frascos cerrados se mantuvieron en la oscuridad, a las temperaturas correspondientes.

Cuadro 4.5
Condiciones de añejamiento para el vino
sin fermentación maloláctica

pH 3.0				pH 3.5			
SO ₂ 30 ppm		SO ₂ 50 ppm		SO ₂ 30 ppm		SO ₂ 50 ppm	
T 15°	T 25°	T 15°	T 25°	T 15°	T 25°	T 15°	T 25°
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8

Cuadro 4.6
Condiciones de añejamiento para el vino
con fermentación maloláctica

pH 3.0				pH 3.5			
SO ₂ 30 ppm		SO ₂ 50 ppm		SO ₂ 30 ppm		SO ₂ 50 ppm	
T 15°	T 25°	T 15°	T 25°	T 15°	T 25°	T 15°	T 25°
F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16

4.5. Análisis estadístico.

Se aplicó un análisis de varianza a los valores de la EQ al final del añejamiento. Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics versión 4.0 (Statistical Graphics Corp. Manungistics, Inc., U.S.A.).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Separación y caracterización de antocianinas en el hollejo.

Se experimentó inicialmente el gradiente de elución de las antocianinas por CLAR realizado por Yokotsuka y Singleton (1997), la Figura 5.1 muestra el cromatograma con 9 picos, algunos como el 2 y 3, el 4 y el 5, el 6 no bien resueltos.

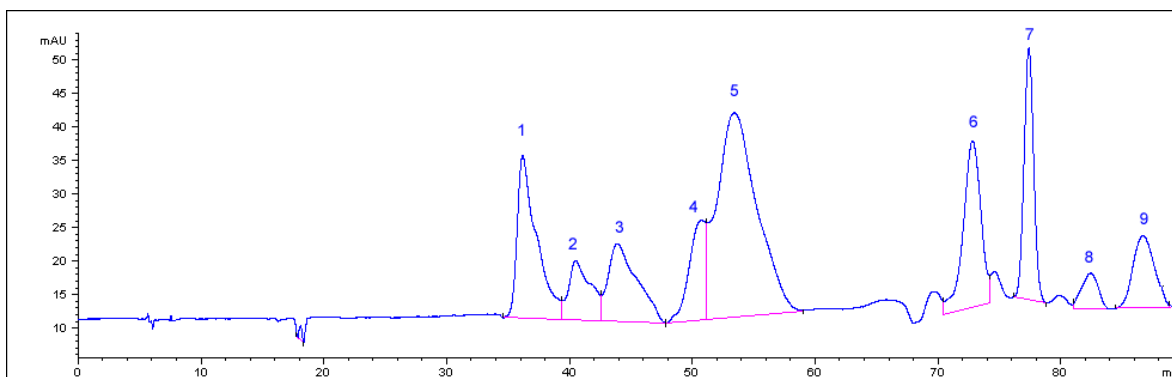


Figura 5.1 Cromatograma inicial de las antocianinas de la uva Cabernet Sauvignon. Gradiente propuesto por Yokotsuka y Singleton, (1997).

Con algunas adecuaciones a esta técnica en lo que se refiere al gradiente de elución, se logró, una mejor resolución presentada en la Figura 5.2, en donde se ven los mismos 9 picos.

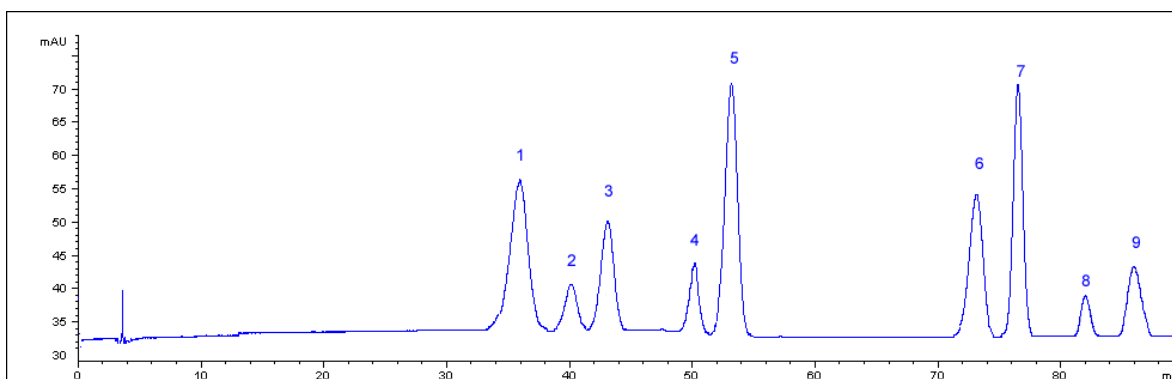


Figura 5.2 Cromatograma de las antocianinas de la uva Cabernet Sauvignon después de modificar el gradiente de Yokotsuka y Singleton, (1997). Nótese la mejor resolución que se obtiene.

Se obtienen 9 picos, 5 posibles antocianinas monoméricas y 4 aciladas. Esta conjetura se debe a su orden de elución y avalada por Wulf y Nagel, (1978), Gao y Mazza, (1994), Gao y Cahoon, (1995) y Yokotsuka y Singleton, (1997).

El orden de elución de las antocianinas en una columna C18 fase reversa esta basada en la polaridad.

- Los diglucósidos son mas polares que los monoglucósidos y por lo tanto presentan menores tiempos de retención (Hebrero, y col.,1989).
- La acilación en las antocianinas involucra pérdida de la polaridad, con respecto a las antocianinas no aciladas, por lo que esto se refleja en un incremento en sus tiempos de retención. Así a menores tiempos de retención se eluyen las antocianinas no aciladas, posteriormente las acetiladas y finalmente aquellas que presentan el ácido cumárico como agente acilante. Los derivados acilados muestran los mismos máximos de absorción que las antocianinas, además de algunos máximos debidos a los ácidos acilantes como el caféico o cumárico.
- Las antocianinas cuyo OH en C5 no esta glucosilado, muestran un hombro a 440 nm, una característica que permite diferenciar entre 3-monoglucósidos y 3,5-diglucósidos (Hebrero y col, 1988; Hebrero y col, 1988; Wulf y Nagel, 1978).
- Las antocianinas se hacen mas polares cuando tienen mas grupos hidroxilos en el anillo B. Lo mismo sucede para las antocianidinas (Hebrero y col, 1988). Por lo que el orden que se da es: delfinidina (no metilada, 3 grupos hidroxilo); cianidina (no metilada, 2 grupos hidroxilo); petunidina (1 grupo metilo, 2 grupos hidroxilo); peonidina (1 grupo metilo, 1 grupo hidroxilo); y malvidina (2 grupos metilo) (Wulf y Nagel, 1978; Gao y Mazza, 1994; Gao y Cahoon, 1995; Yokotsuka y Singleton, 1997).

Con estos tiempos de retención (Cuadro 5.1) se repitió el proceso para coleccionar cada uno de los picos en forma de fracciones con base en los siguientes intervalos:

Cuadro 5.1
Tiempos de recolección

Fracción	Tr (min)	Intervalo de tiempo (min)
1	36.14	34 a 37
2	40.44	38 a 41
3	43.84	42 a 44
4	50.68	48 a 51
5	53.37	52 a 55
6	72.75	71 a 74
7	77.35	75 a 78
8	83.33	81 a 84
9	86.19	85 a 88

Identificación de las antocianinas de las uvas Cabernet Sauvignon del Edo. de Zacatecas de las fracciones hidrolizadas (Gao y Mazza, 1994; Gao y Cahoon, 1995)

Las antocianinas se identificaron por las siguientes técnicas:

1. Comparación sistemática con estándares de antocianidinas en CLAR fase reversa.
2. Determinación de los azúcares residuales usando CLAR después de una hidrólisis completa y
3. Mediciones espectrales.

Los picos fueron identificados y el Cuadro 5.2 informa sobre la distribución de los pigmentos de las uvas Cabernet Sauvignon del estado de Zacatecas, México, determinadas por CLAR (promedio de 3 extractos frescos). La malvidina 3 mono glucósido y el derivado con ácido acético, son los dos pigmentos de mayor concentración. Los derivados de la malvidina alcanzaron un 50.26, % del total de los pigmentos: En segundo lugar se encuentran los derivados de la delfinidina con 28.1 %; seguida por los derivados de la peonidina con 5.85.

Cuadro 5.2
Distribución de las antocianinas en la uva Cabernet Sauvignon del estado de Zacatecas (intervalos de confianza al 95 %)

Antocianina	Área (%)
Delfinidina 3-monoglucósido	17.40 ± 0.11
Cianidina 3-monoglucósido	3.99 ± 0.48
Petunidina 3-monoglucósido	9.0 ± 0.10
Peonidina 3-monoglucósido	3.90 ± 0.17
Malvidina 3-monoglucósido	23.40 ± 0.47
Delfinidina 3-monoglucósido acilada con ácido acético	13.70 ± 0.09
Malvidina 3-monoglucósido ácido acético	21.72 ± 0.11
Peonidina 3-monoglucósido ácido p-cumárico	1.95 ± 0.08
Malvidina 3-monoglucósido ácido p-cumárico	5.14 ± 0.06

El Cuadro 5.3 muestra la distribución de cada antocianidina en tres diferentes clases de pigmentos. Ésta es diferente en cada caso. Los datos indican que la malvidina 3-monoglucósido se convierte más rápidamente en acetato y en un derivado del ácido p-cumárico que cualquiera de los otros cuatro pigmentos. El porcentaje del derivado acilado con acético de la malvidina es alto (61.35%), al igual que el derivado del ácido p-cumárico para la antocianidina malvidina (72.70%). La transformación del derivado acetilado de la

delfinidina es importante en magnitud y no se detectaron derivados de cianidina, petunidina o peonidina.

Cuadro 5.3
Distribución porcentual de las antocianidinas en tres clases de antocianinas en Cabernet Sauvignon

Antocianidina	3-mono Glucósido (%)	Acetato 3-monoglucósido (%)	P-cumarato 3-monoglucósido (%)
Delfinidina	30.17	38.65	
Cianidina	6.99		
Petunidina	15.64		
Peonidina	6.71		27.30
Malvidina	40.50	61.35	72.70

Determinación espectrofotométrica

Puede obtenerse información sustancial de las características espectrales de las antocianinas. Hay dos bandas distintivas de absorción, una en la región UV (260 a 280 nm) y otra en la región visible (490 a 550 nm) muestran la presencia de la antocianina. Los diferentes aglicones presentaron distintos máximos en el rango visible, siendo de 520 nm para pelargonidina, 546 nm para delfinidina. Sus monoglucósidos exhibieron su máximo en el visible, aproximadamente 10 o 15 nm por debajo (Jurd, 1962). La forma del espectro puede dar información con respecto al número y posición de sustituciones del glucósido y número de acilaciones de ácidos fenólicos.

Harborne (1967), ha observado que el grupo 5-hidroxilo puede mostrar un hombro en el pico principal de absorción entre los 410 y 450 nm. Por otro lado los 5-glucósidos y los 3,5-diglucósidos muestran una inflexión de baja intensidad en esta región. Estas diferencias se hacen mas claras cuando se calcula la relación $A_{440}/A_{m\acute{a}x}$. El porcentaje de la intensidad a 440 nm de una antocianidina 5-O-sustituida es aproximadamente la mitad que cuando se tiene el grupo 5-hidróxido libre. Esta relación es muy útil para diferenciar entre 3-glucósidos y 3,5-diglucósidos.

La aparición de derivados del ácido cinámico acilado se reveló por la presencia de una tercera banda de absorción en los 310 a 360 nm. El solvente usado para la determinación espectral afecta la posición de las bandas de absorción y por consiguiente, debe tenerse en la cuenta al comparar los da-

tos disponibles (Harborne, 1967; Hong y Wrolstad, 1990; Giusti y Wrolstad, 2001).

Cuando se utilizan los espectros para identificar antocianinas es necesario ser muy cuidadoso con la purificación de cada compuesto para evitar al máximo interferencias que modifiquen los espectros (Hebrero, 1989).

Los espectros obtenidos en disolución 0.01 % de HCl en metanol (Figuras 5.3 y 5.3) ayudaron a determinar si los pigmentos se encontraban acilados o no. La presencia de un pico extra alrededor de los 300 a 310 nm en forma de un hombro lo confirma. En los espectros de los picos 8 y 9 fue observado un ligero hombro.

Los pigmentos separados fueron expuestos a luz UV y ninguno mostró fluorescencia bajo luz, por lo que se descarto la presencia de 3, 5-diglucósidos (Yokotzuca y Nishino, 1990).

El Cuadro 5.4 muestra las características espectrales de las antocianinas aisladas de la uva Cabernet Sauvignon en su forma pura en disolución metanólica con HCl, junto con los datos obtenidos de la literatura. En todos los casos hay una buena concordancia entre los resultados experimentales y los informados en la literatura.

Los 9 picos presentaron un hombro a 440 nm, lo que se dedujo que las antocianinas involucradas eran monoglucósidos en posición 3, marcando la diferencia con los 3,5-diglucósidos.

Es bien conocido que los derivados de delfinidina, cianidina y petunidina exhiben un cambio de color hacia tonos azules al adicionarles $AlCl_3$ en etanol, ya sea las antocianinas o antocianidinas, mientras que los derivados de la peonidina o malvidina no presentan este cambio (Harborne, 1958; Bakker, y col., 1986; Hebrero y col, 1988).

Los espectros de los derivados malvidina 3-monoglucósido y la peonidina 3-monoglucósido acilados con ácido cumárico se presentan en las Figuras 5.3 y 5.4, en ellas se pueden apreciar los máximos de longitud de onda.

Cuadro 5.4
Características espectrales de las antocianinas aislada en metanol al 0.01% con HCl de las uvas Cabernet Sauvignon del Edo. de Zacatecas, México

Fracción	Antocianina	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Hombro 440 nm	$\lambda_{\text{máx}}$ re- portada (nm)**	$\Delta\lambda_{\text{máx}}$ AlCl ₃ (nm)	A ₄₄₀ /a _{máx} (%)
1	Delfinidina 3-monoglucósido	279 274 541	Si	278-9 542	+28	21
2	Cianidina 3-monoglucósido	282 280 530 508	Si	282 530	+37	22
3	Petunidina 3-monoglucósido	277 540	Si	278-80 540	+44	24
4	Peonidina 3-monoglucósido	280 528	Si	280-1 528		26
5	Malvidina 3-monoglucósido	278 538	Si	278-9 537-8		21
6	Delfinidina 3-monoglucósido ácido acético	280 542	Si	270, 281 530, 500	+28	20
7	Malvidina 3-monoglucósido ácido acético	280 271 538 532	Si	280, 538		23
8	Peonidina 3-monoglucósido ácido p-cumárico	283, 312 h* 528	Si	283, 312 h** 528		25
9	Malvidina 3-monoglucósido ácido p-cumárico	280 310h* 532	Si	284 313 h** 538		20

**Wulf, L. W. y Nagel, C. 1978. High-Pressure Liquid Chromatography Separation of Anthocyanins of *Vitis Vinifera*. Am. J. Enol. Vitic. 29, 42-48; Hebrero, E., García-Rodríguez, C., Santos-Buelga, C. y Rivas-Gonzalo, J. C. 1989. Análisis of antocyanins by high performance liquid chromatography-diode array spectroscopy in a hibrid grape variety (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* 41B). Am. J. Enol. Vitic. 40: 283-291.

*h = hombro

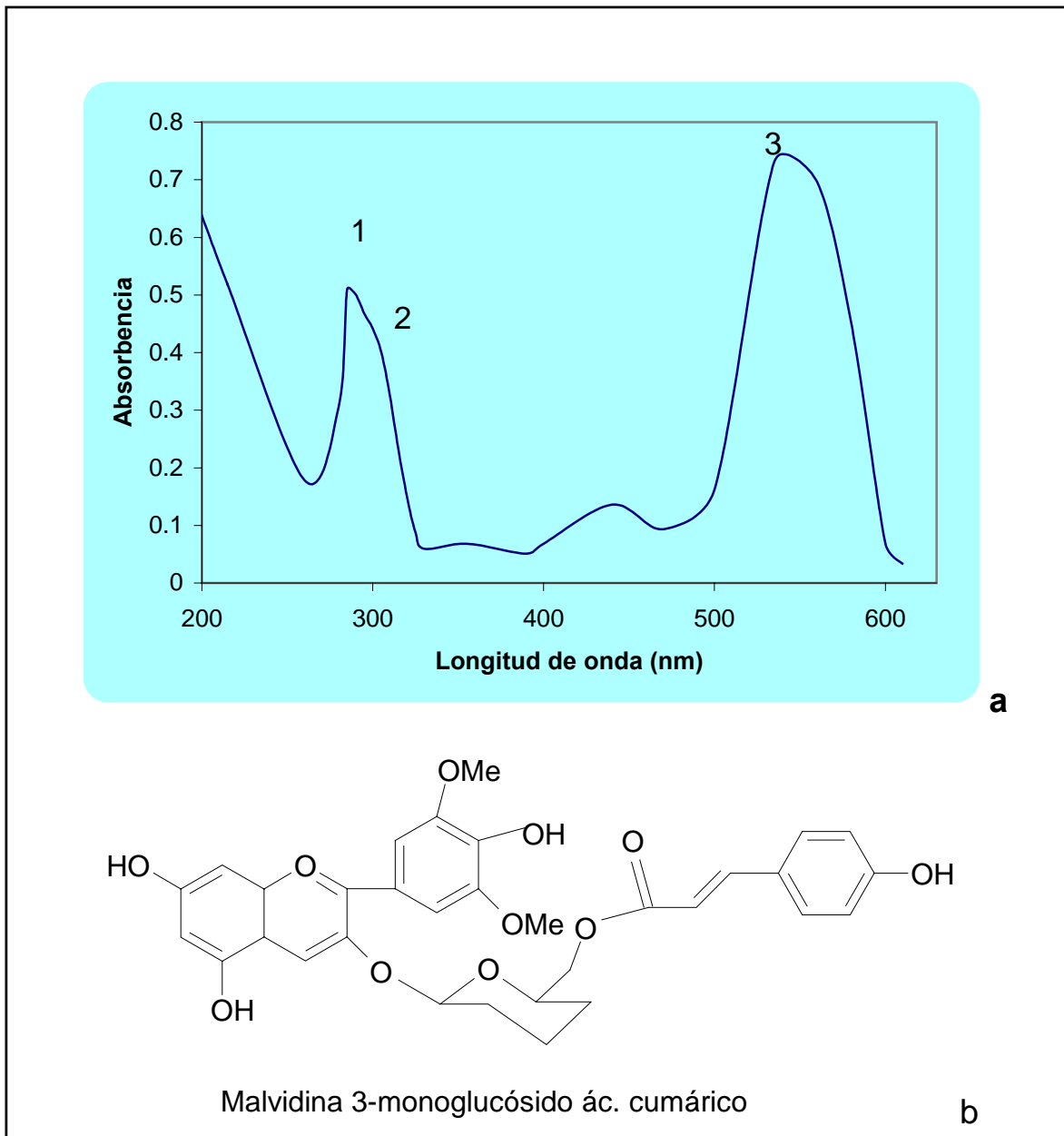


Figura 5.3, a). Espectro de la malvidina 3-monoglucósido acilada con ácido cumárico. Las longitudes de onda de máxima absorbancia se dieron a 280 nm (1), 310 nm (2) y 532 nm (3). b). Fórmula

Los 3 monoglucósidos y los 3 monoglucósidos acilados con ácido acético son indistinguibles uno del otro en cuanto a sus propiedades en el espectro de UV. Las antocianinas aciladas con ácido p-cumárico o con ácido caféico son fácilmente reconocibles por su espectro en el intervalo de los 300 - 340 nm de longitud de onda.

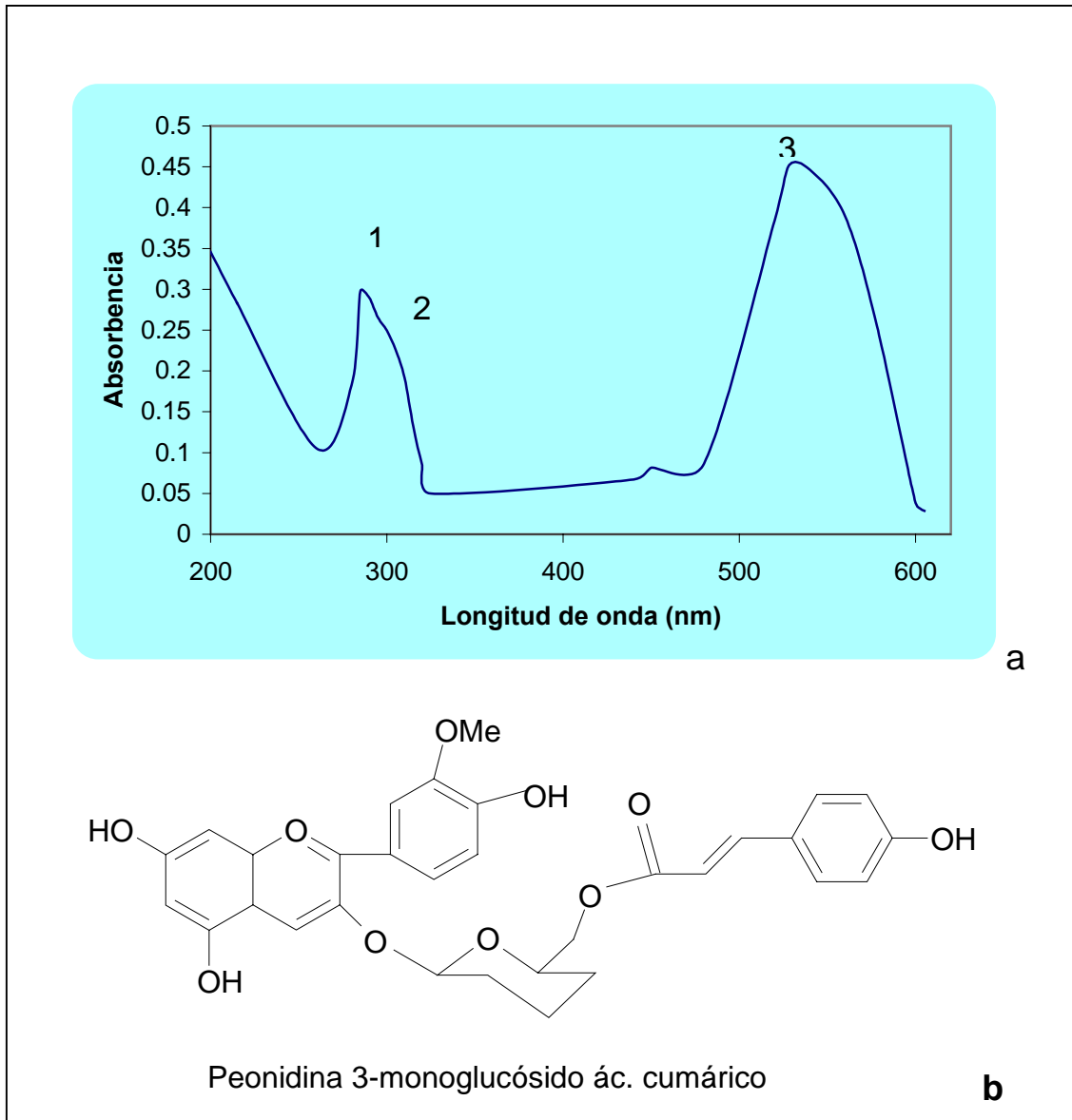


Figura 5.4, a) Espectro de la peonidina 3-monoglucósido acilada con ácido cumárico. Las longitudes de onda de máxima absorbancia se dieron a 283 nm (1), un hombro a 312 nm (2) y 528 nm (3). b) Fórmula

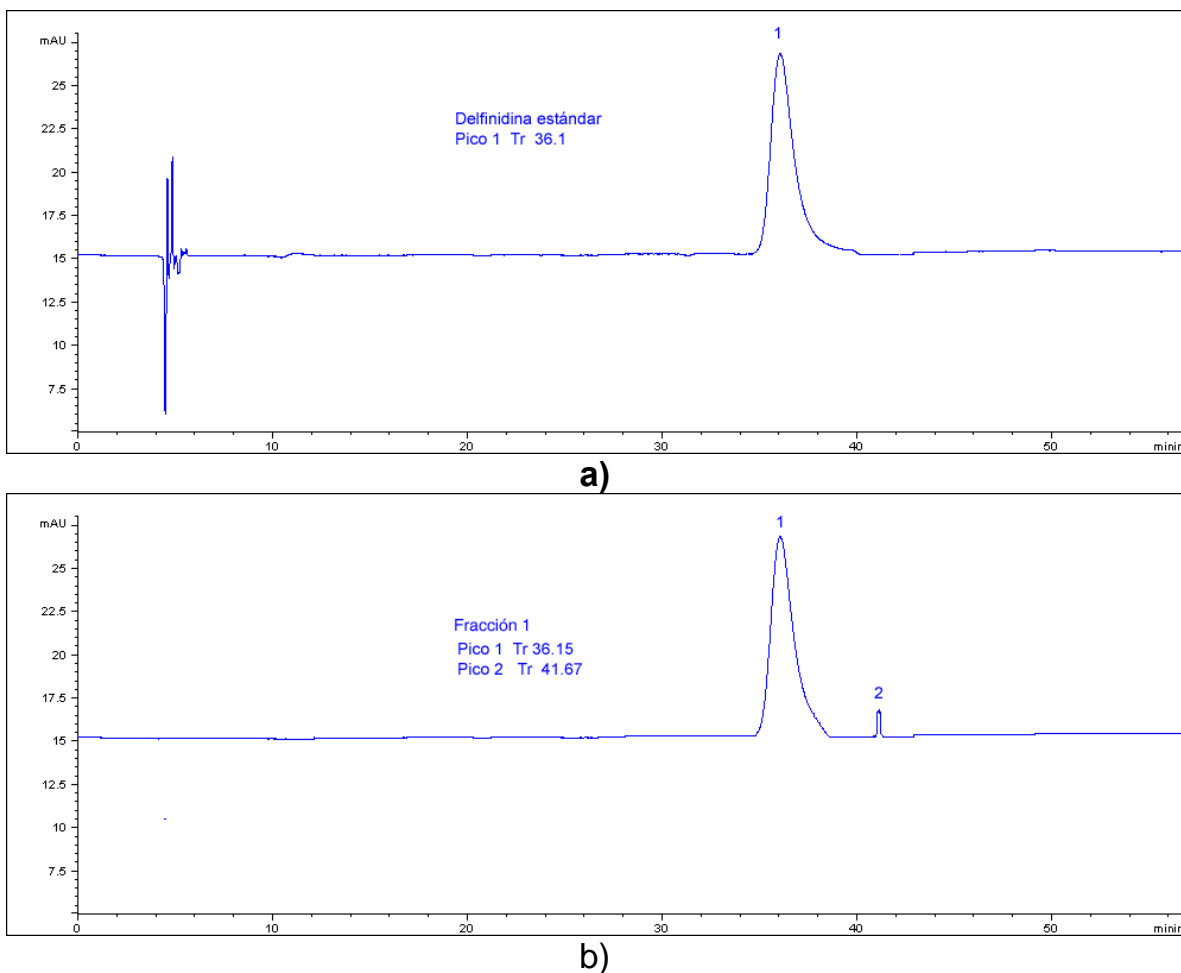
La parte del análisis espectral fue el primer método de identificación de las antocianinas presentes en el hollejo de la uva. Debido a que su confiabilidad no es al 100%, se confirmó con la separación y caracterización cromatográfica.

Identificación de antocianinas.

Con base en las 9 fracciones separadas (Cuadro 5.1), de la muestra hidrolizada del hollejo de la uva Cabernet Sauvignon, se identificaron usando estándares puros de antocianidinas a 525 nm, siguiendo la técnica de Gao y Mazza, (1994).

Fracción 1

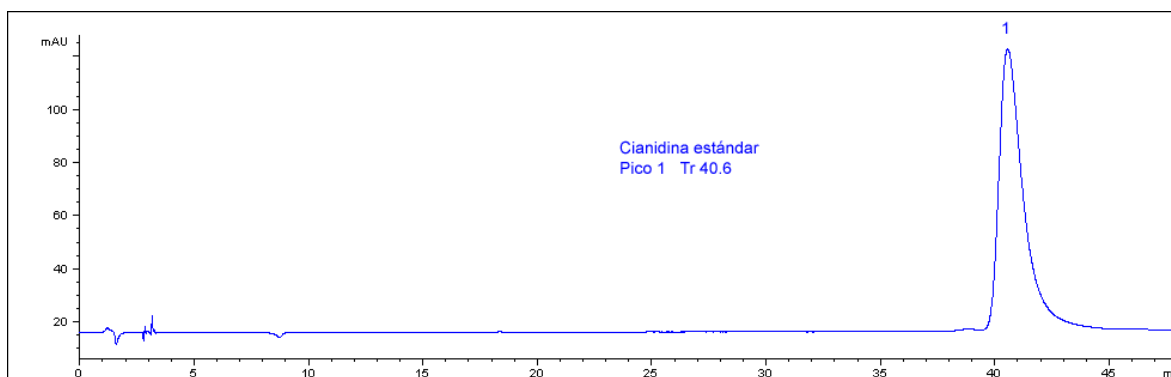
El cromatograma de la Figura 5.5 (a), muestra un pico con tiempo de retención de 36.1 minutos para el estándar de la delfinidina, al cotejarlo con el tiempo de retención del pico 1 de la fracción 1, del cromatograma (b), se aprecia que casi son iguales, por lo que la antocianina en este pico es la delfinidina. El pico 2 es pequeño y probablemente sea un contaminante de la cianidina.



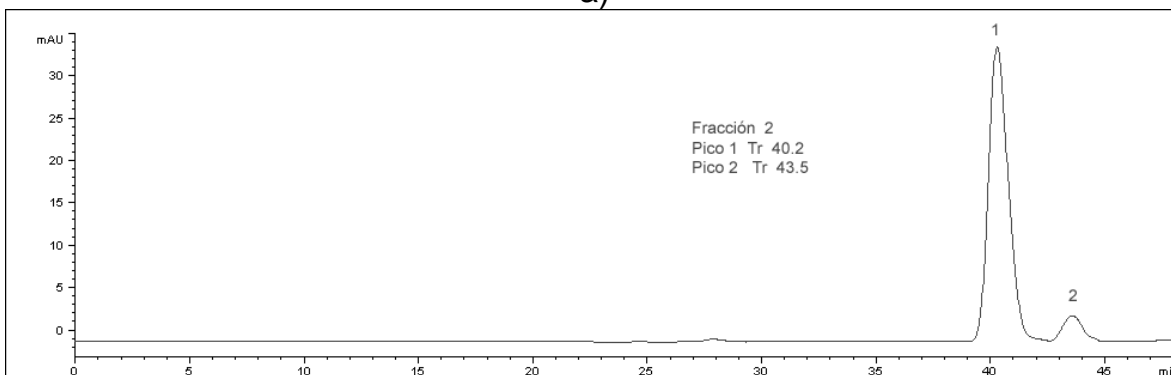
**Figura 5.5 a) Cromatograma del estándar delfinidina 0.4 mg/mL.
b) Cromatograma de la fracción 1.**

Fracción 2

En la Figura 5.6 (a), muestra el cromatograma de la antocianidina cianidina, sustancia con un tiempo de retención de 40.6 minutos. El cromatograma de la fracción 2 (Figura 5.6 b) muestra 2 picos, el primero coincide con el estándar de la cianidina con tiempo de retención de 40.2 minutos y el segundo con Tr de 43.3 minutos, que como se puede apreciar en el Cuadro 5.7 se debe a la presencia como contaminante de la petunidina. Por lo tanto, la fracción 2 es la antocianina cianidina.



a)

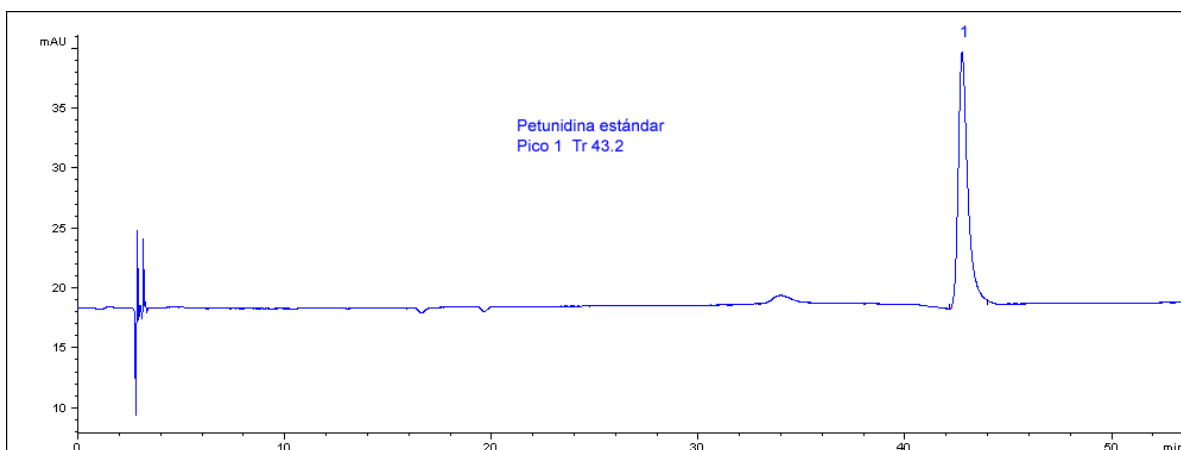


b)

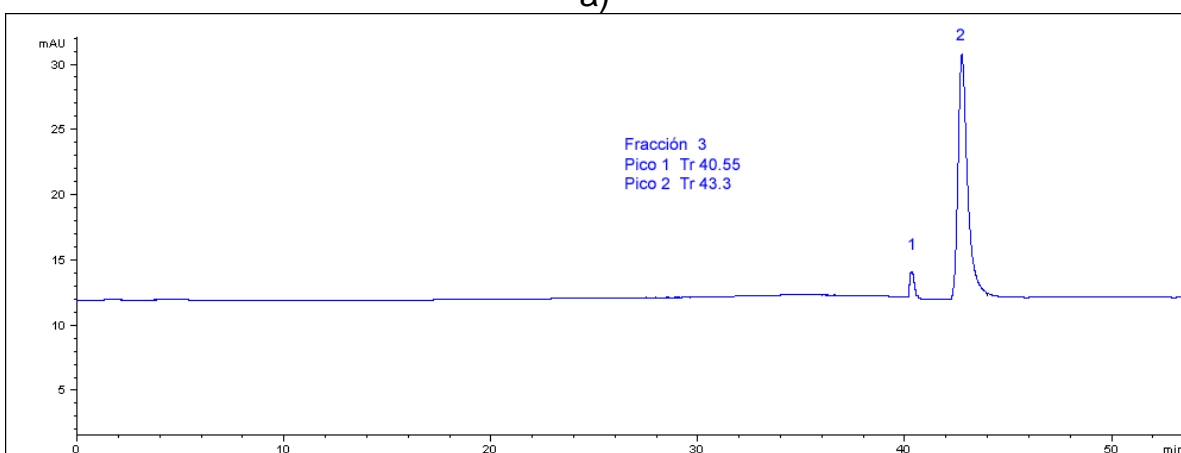
**Figura 5.6 a) Cromatograma del estándar cianidina (0.4 mg/mL).
b) Cromatograma de la fracción 2.**

Fracción 3

La Figura 5.7 (a) muestra el cromatograma de la petunidina con un Tr de 43.2 minutos, al comparar el pico 2 del comatograma (Figura 5.7 b) se aprecia que los valores en el tiempo de retención se corresponden, por lo que se puede identificar la fracción 3 como petunidina. En este mismo cromatograma se presento un pequeño pico (1) con un Tr de 40.55 minutos, que al co-tejarlo en el Cuadro 5.7 indicó la presencia de la cianidina.



a)

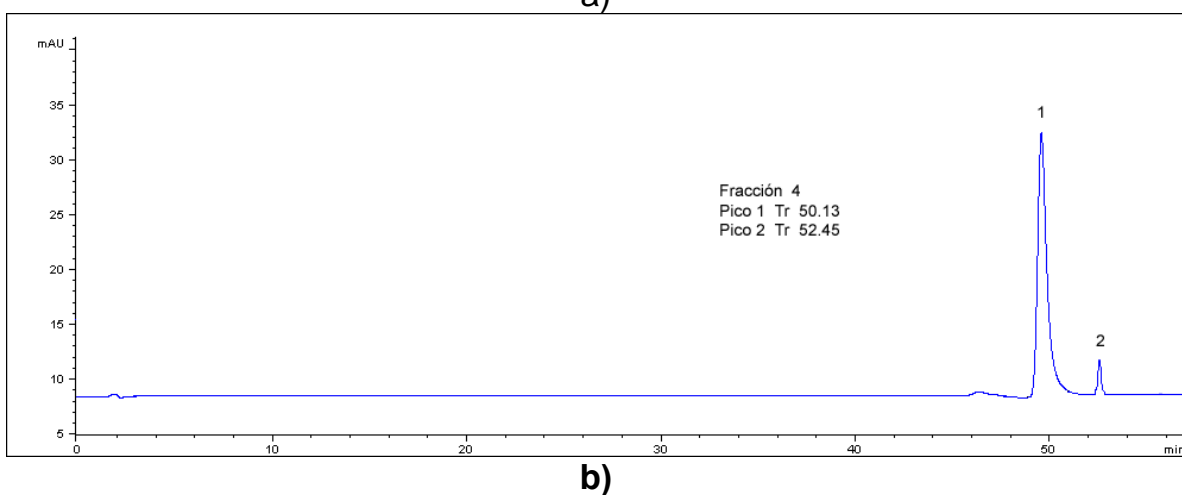
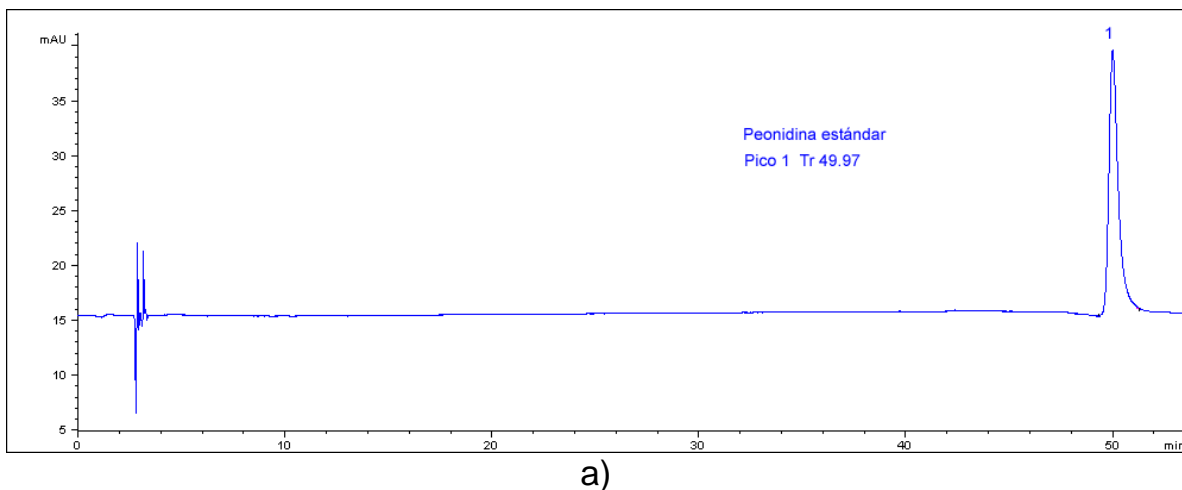


b)

**Figura 5.7 a) Cromatograma del estándar de petunidina (0.4 mg/mL).
b) Cromatograma de la fracción 3.**

Fracción 4

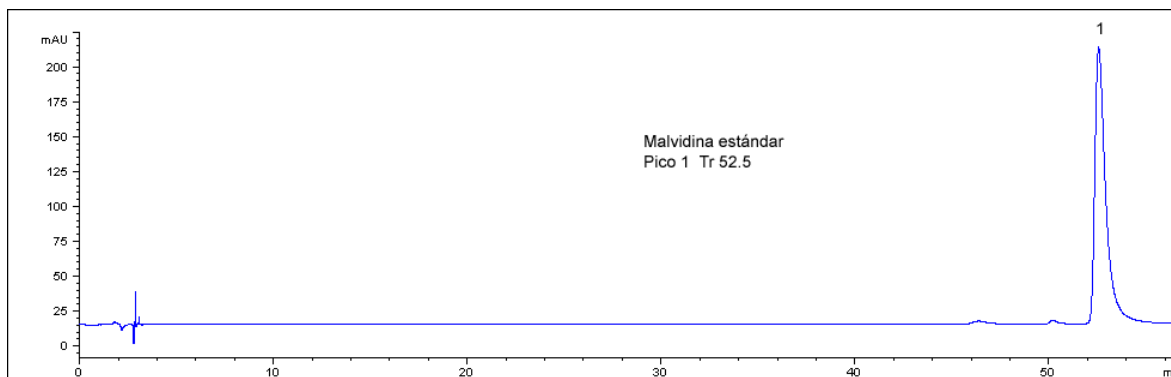
El cromatograma de la Figura 5.8 (a), es el estándar de la peonidina, que eluyó a los 49.97 minutos. El cromatograma (Figura 5.8 b) muestra el pico 1 con un tiempo de retención muy parecido. El pico 2 presentó un tiempo de 52.45 minutos por lo que corresponde a la malvidina (Cuadro 5.7).



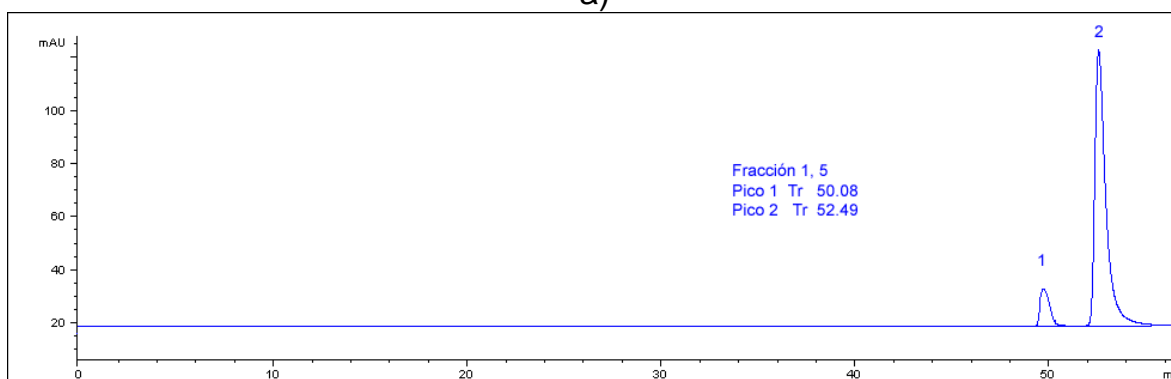
**Figura 5.8 a) Cromatograma del estándar de peonidina (0.4 mg/mL).
b) Cromatograma de la fracción 4.**

Fracción 5

El cromatograma de la Figura 5.9 (a) presenta el tiempo de retención del estándar de la malvidina a 52.5 minutos, y el cromatograma (Figura 5.9 b) muestra el pico 2 con un tiempo de retención similar al de la malvidina por lo que se deduce que la fracción 5 presenta este compuesto.



a)



b)

**Figura 5.9 a) Cromatograma del estándar de malvidina (0.4 mg/mL).
b) Cromatograma de la fracción 5.**

Fracción 6

La Figura 5.10 es el cromatograma de la fracción 6 y muestra al pico 1 con un tiempo de retención de 36.2 minutos, el cual corresponde a la delphinidina, (Cuadro 5.7). Y debido al tiempo de retención de esta fracción (72.75 minutos), se puede suponer que la antocianina se encuentra acilada.

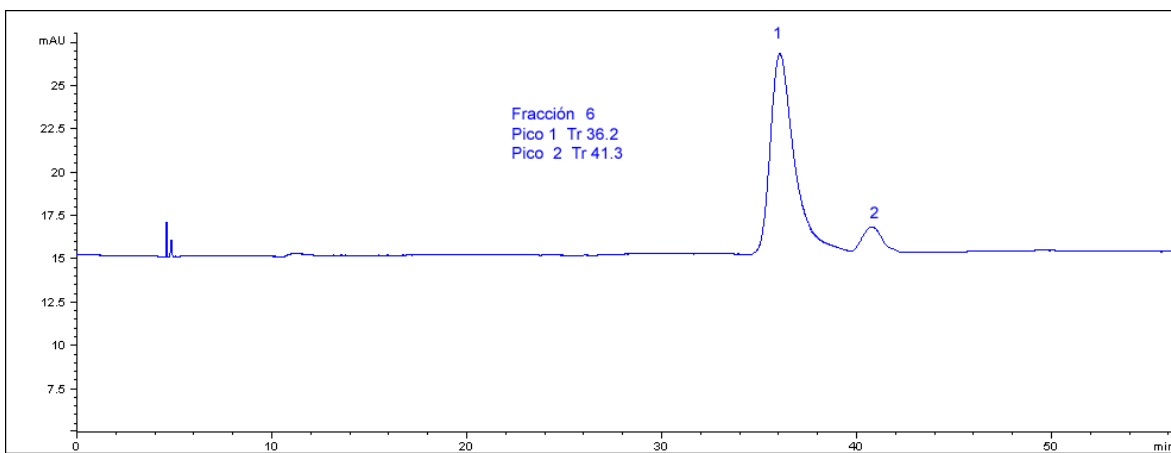


Figura 5.10 Cromatograma de la fracción 6

Fracción 7

En la Figura 5.11 se observa el cromatograma de la fracción 7, y en éste se encuentra el pico 1 que por su posición en el tiempo de retención es probable que se trate de la malvidina acilada.

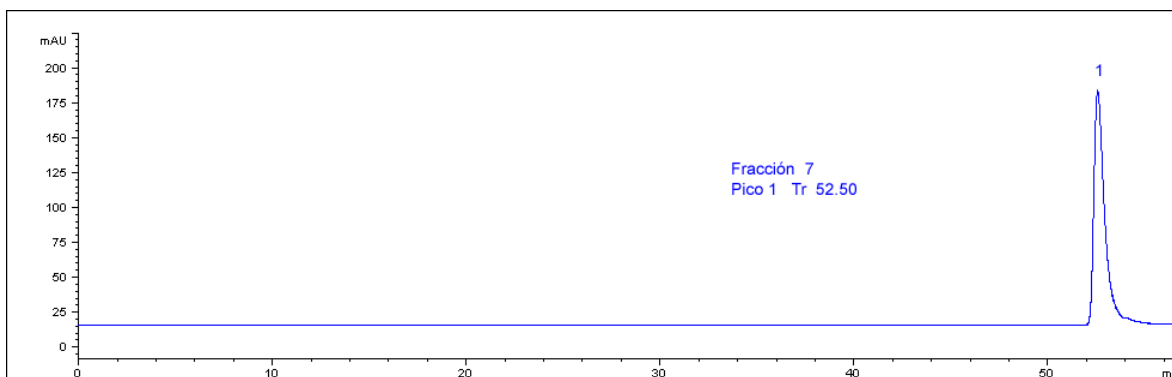


Figura 5.11 cromatograma de la fracción 7

Fracción 8

El cromatograma de la Figura 5.12, tiene un pico a 49.82 minutos, que por su posición corresponde a la peonidina (Cuadro 5.7).

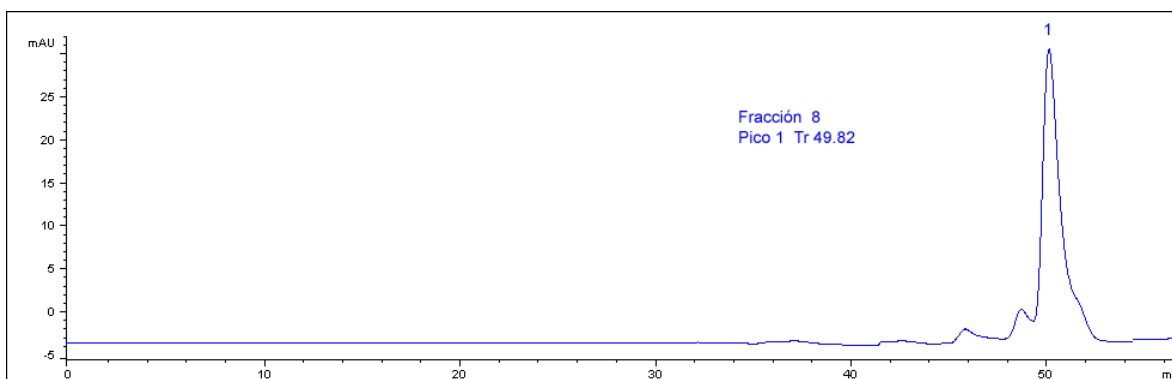


Figura 5.12 cromatograma de la fracción 8

Fracción 9

El cromatograma de la Figura 5.13 el pico 1, corresponde por el tiempo de retención de 52.55 minutos a la malvidina (Cuadro 5.7).

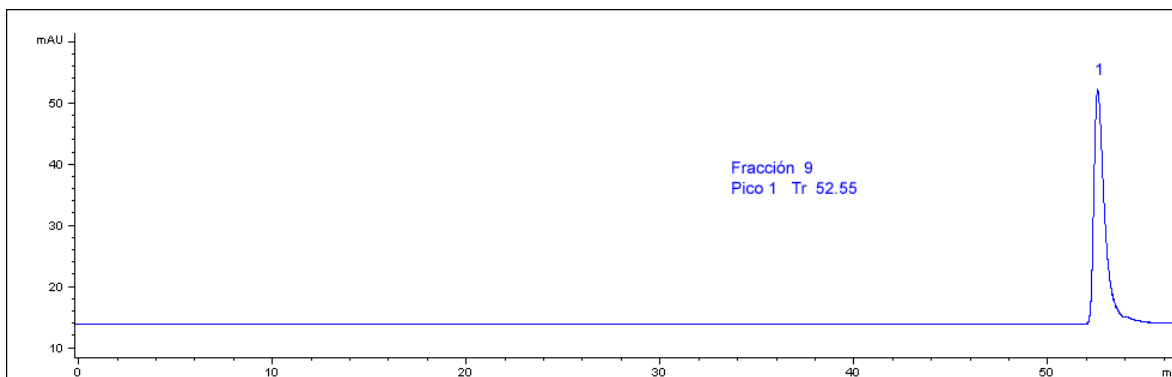


Figura 5.13 cromatograma de la fracción 9

Identificación de compuestos acilantes de las antocianinas.

Las fracciones 1 a la 5 corresponden a las antocianinas monoglucósidas no aciladas y de la 6 al 9 corresponden a antocianinas monoglucósidas aciladas. Para conocer el ácido acilante se utilizó la técnica propuesta por Gao y Mazza, (1994). con la única diferencia de que la temperatura de la columna fue de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. En las mismas condiciones cromatográficas se llevaron a cabo corridas con ácido acético, acetato de metilo y los disolventes utilizados para conocer sus tiempos de retención (Cuadro 5.5).

Cuadro 5.5

Tiempos de retención (T_R) del ácido alifático acilante de antocianinas y solventes utilizados en su caracterización

Ácido alifático	T_r (min)
Metanol	0.99
Acetato de metilo	1.26
Cloroformo	2.02
Ácido acético	3.01

Para la antocianina del pico 6 obtenido con la técnica modificada, el volumen colectado se concentró a una cuarta parte de su volumen inicial, dando una absorbancia de 0.7 a 525 nm. La Figura 5.14 es el cromatograma de la CLAR en donde se muestra que a 280 nm no hay presencia de ningún ácido fenólico, en cambio si se da la presencia del aglicón (pico 1). Con base en los tiempos de retención del pico 1 a 36.25 minutos, se puede concluir que la antocianina es la delfinidina (T_r 36.1 minutos, Cuadro 5.6).

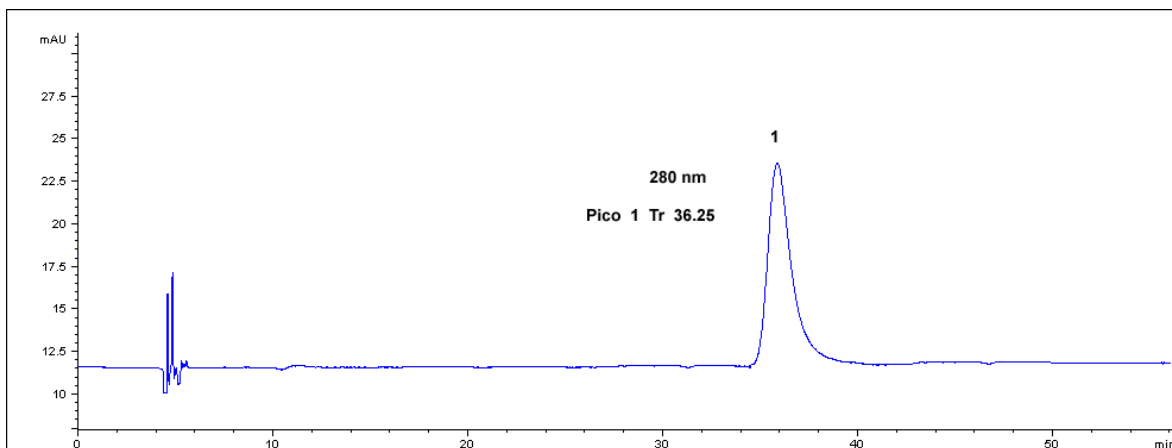


Figura 5.14 cromatograma de la fracción 6

Al no eluir un ácido fenólico, se investigó la probable presencia de un ácido alifático como acilante de la antocianina. Se realizó la esterificación de una alícuota de la fracción 6. La Figura 5.15 muestra el cromatograma por CGL, en donde se aprecia el pico del éster metílico alifático extraído con cloroformo del hidrolizado con tiempo de retención de 1.25 minutos (pico 2), el cual coincide con el tiempo de retención del acetato de metilo (Cuadro 5.5) y un pequeño pico con Tr de 3.03 minutos correspondiente al ácido acético libre (pico 4).

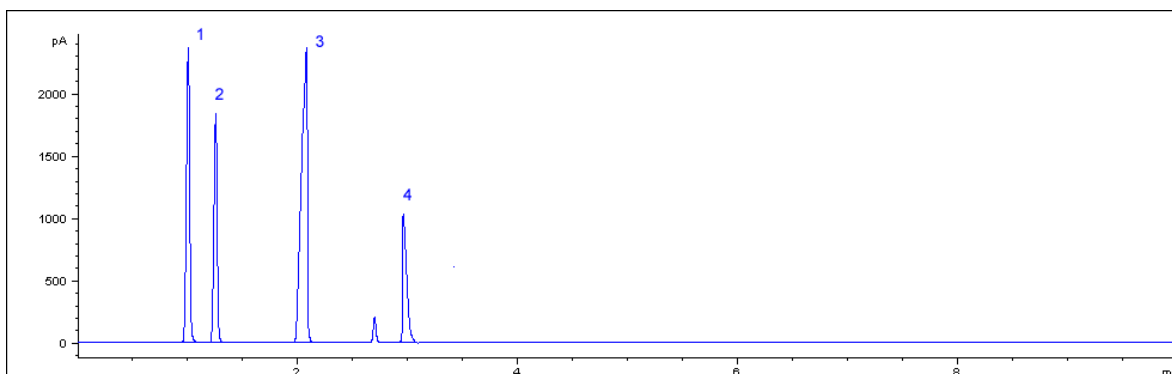


Figura 5.15 Cromatograma de CGL de la fracción 6, con la técnica propuesta por Gao y Mazza (1994). 1, Metanol; 2, Acetato metílico (Tr 1.25 min.); 3, cloroformo; 4, ácido acético libre (Tr 3.03 min.).

Estos dos últimos cromatogramas permiten identificar el pico 6 como una antocianina acilada con ácido acético.

Para la antocianina del pico 7 obtenida con la técnica modificada, el volumen colectado se concentró a un cuarto de su volumen inicial, dando una absorbancia de 0.9 a 525 nm. El cromatograma por CLAR (Figura 5.16) muestra que en los primeros minutos no eluye ningún ácido fenólico (280 nm) y la identificación de la antocianidina, se corroboró con base en los

tiempos de retención de 52.8 minutos, que le corresponden a la antocianina malvidina (Tr 52.5 minutos, Cuadro 5.7).

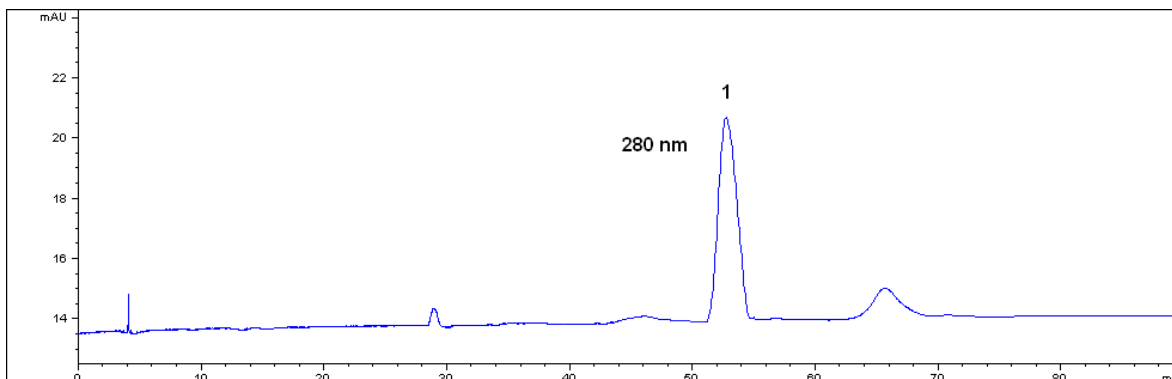


Figura 5.16 Cromatograma del pico o fracción 7, a 280 nm y 30° C con la técnica propuesta por Gao y Mazza en 1994. pico1, malvidina

La Figura 5.17 muestra el cromatograma por CGL, que es prácticamente igual al de la Figura 5.15, en donde se aprecia el acetato de metilo (pico 2) y ácido acético libre (pico 4), que se identifican al comparar sus tiempos de retención con los de los estándares del Cuadro 5.5.

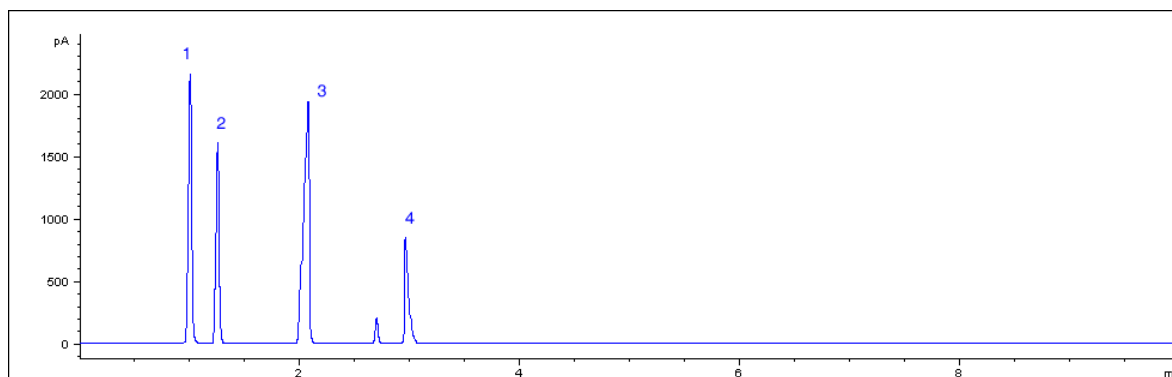


Figura 5.17 Cromatograma de la fracción 7. 1, Metanol; 2, Acetato metílico(Tr 1.28 min.); 3, cloroformo; 4, ácido acético libre(Tr 3.06 min.).

Para la caracterización de la antocianina de la uva presente en el pico 8, se procedió de la misma manera que en las antocianinas aciladas. La Figura 5.18 informa sobre la presencia del ácido cumárico (pico 1, Tr 15.85 min.) como acilante de la antocianina peonidina (pico 3, Tr 49.89 min.). Los tiempos de retención se compararon con los Cuadros 5.6 y 5.7.

Cuadro 5.6
Tiempos de retención (T_R) y UV-Vis máxima ($\lambda_{m\acute{a}x}$) detectadas en la uva Cabernet Sauvignon del Edo. de Zacatecas, México, de los ácidos fenólicos acilantes de antocianinas

Ácido fenólico	T_r (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
Ácido gálico	7.39	260
Ácido caféico	10.7	232, 290 *h, 320
Ácido siríngico	11.74	272
Ácido p-cumárico	15.91	291 *h, 305
Éster metílico del ácido cumárico	31.6	

*h = hombro

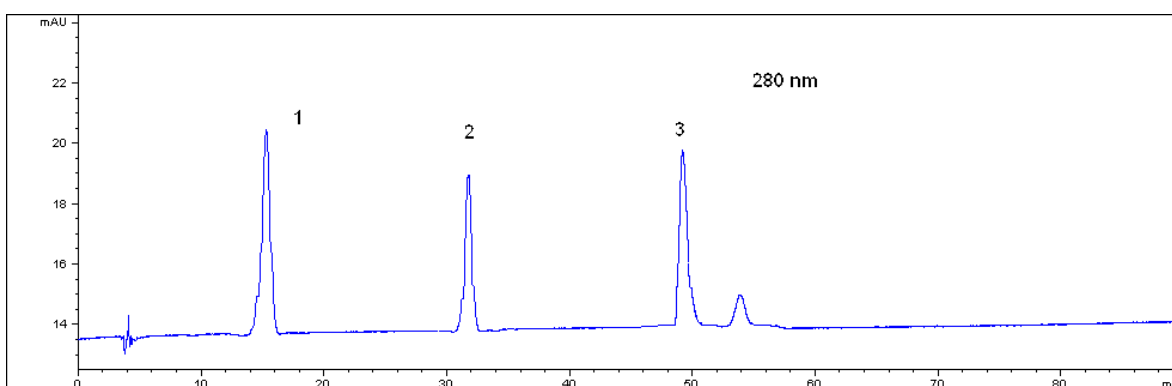


Figura 5.18 Cromatograma de la fracción 8 a 280 nm y 30° C. Pico1, ácido p-cumárico(T_r 15.85 min.); 2, éster metílico del ácido cumárico (T_r 31.84 min.); 3, peonidina(T_r 49.89 min.).

Para la caracterización de las antocianinas de la uva presentes en el pico 9, 10 corridas se separaron y colectaron por CLAR. El volumen se redujo a un cuarto del inicial en un rotavapor al vacío y presentó un valor de absorbancia de 0.8 Una alícuota de 1 mL se hidrolizó en 0.4 mL de metanol-HCl 2 N (1:1 v/v), y se analizó por CLAR.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.19. El ácido acilante identificado fue el cumárico (pico 1 T_r 15.65 min.), el éster metílico del ácido cumárico (T_r 31.61 min.) y el aglicón la malvidina (T_r 52.79 min. Cuadros 5.6 y 5.7, respectivamente).

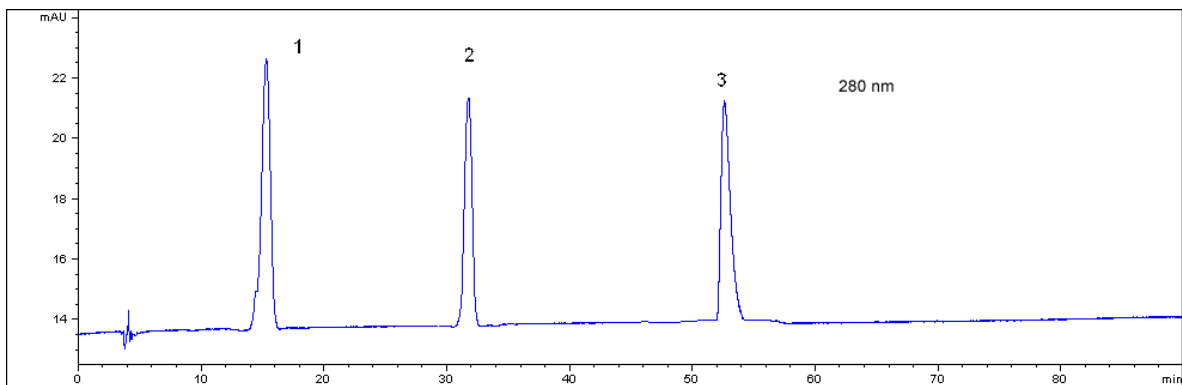


Figura 5.19. Cromatograma de la fracción 9 a 280 nm, Pico1, ácido p-cumárico (Tr 15.65 min.); 2, éster metílico del ácido cumárico (Tr 31.61 min.); 3, malvidina (Tr 52.79 min.).

Identificación de carbohidratos por CLAR

Los azúcares residuales se analizaron después de la hidrólisis completa, encontrándose solo glucosa para los 9 picos identificados Figura 5.20.

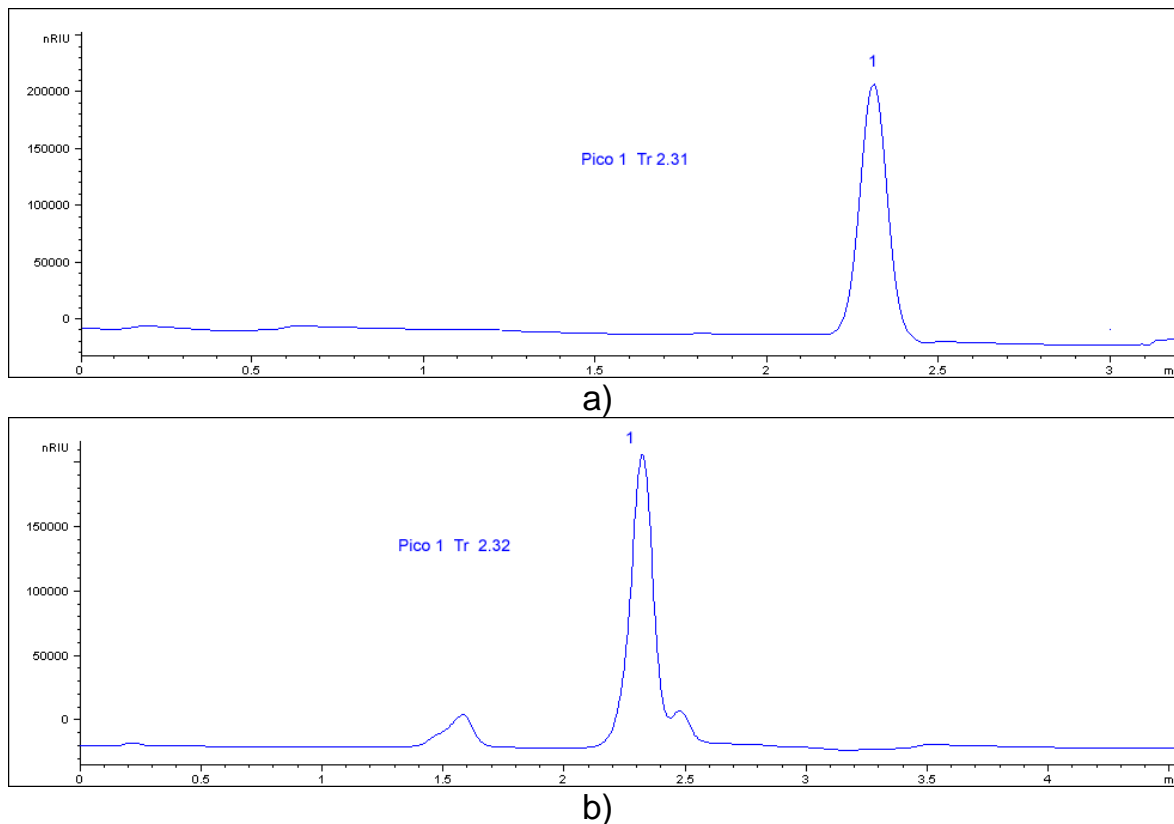


Figura 5.20. a) Cromatograma del estándar de glucosa 1 mg/mL. b) Cromatograma de la fracción acuosa, del hidrolizado de antocianinas.

En el Cuadro 5.7 se encuentra el resumen del proceso de caracterización las 9 fracciones. Las fracciones 1,2,3,4 y 5 corresponden respectivamente a las antocianinas 3 monoglucósidos de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina. Las fracciones 6 y 7 corresponden a los derivados acilados con acético de la delphinidina y malvidina 3-monoglucósido, y las fracciones 8 y 9 son los derivados del ácido cumárico de la peonidina y la malvidina 3-monoglucósido respectivamente.

Cuadro 5.7
Resultados de la caracterización de los picos de la uva Cabernet Sauvignon del Edo. de Zacatecas, México

Fracciones	Tr (min)	Tr Estándar	Antocianina identificada
1	36.14	Delfinidina 36.18	Delfinidina 3-glucósido
2	40.44	Cianidina 40.6	Cianidina 3-glucósido
3	43.84	Petunidina 43.2	Petunidina 3-glucósido
4	50.68	Peonidina 49.97	Peonidina 3-glucósido
5	53.37	Malvidina 52.5	Malvidina 3-glucósido
6	72.75	Delfinidina 36.18	Delfinidina 3-glucósido acilada con ácido acético
7	77.35	Malvidina 52.5	Malvidina 3-glucósido acilada con ácido acético
8	83.33	Peonidina 49.97	Peonidina 3-glucósido con ácido p-cumárico
9	86.19	Malvidina 52.5	Malvidina 3-glucósido acilada con ácido p-cumárico

La composición de antocianinas encontrada concuerda con lo reportado por Yokotzuca y Vernon (1997) en donde informan el haber aislado 7 antocianinas del hollejo de la uva *Cabernet Sauvignon*. Wulf y Ángel (1978), usando técnicas de CLAR separaron hasta 21 antocianinas de la misma variedad.

5.2 Elaboración del vino

Se iniciaron los trabajos con uva cosechada en agosto de 1995, con la cual se elaboró el vino que no se sometió a la fermentación maloláctica. Con la cosecha de 1996 se obtuvo el vino en el que sí tuvo un proceso controlado de fermentación maloláctica. Se analizaron los mostos, los resultados se muestran en el Cuadro 5.8. La acidez debida al ácido málico de los mostos indicaba que era recomendable la fermentación maloláctica. Tanto los valores de pH como los de acidez total cumplían la NMX-V-012-NORMEX2005. Los azúcares reductores mostraron una riqueza mayor en el mosto de 1996, probablemente debido a las condiciones climáticas. La acidez volátil debido a su bajo valor, indicó que la uva se encontraba sana, sin haberse iniciado ningún proceso importante de fermentación.

Selección de la uva. La uva que se seleccionó era uva saludable; sin ataque de insectos ni microorganismos. El desgranado manual de los racimos constituyó una gran ventaja, ya que de ésta manera el zumo se fermentó con el contacto solamente de los hollejos y semillas; separándose de esta manera la materia colorante roja de las células de los hollejos. Se evitó la presencia del raspón que con su exceso de taninos podrían enturbiar el color del vino tinto y darle sabor áspero y astringente. Además, el raspón podría absorber una cantidad importante de materia colorante haciendo que baje la intensidad y color del vino.

Estrujado. Este proceso consistió en prensar con las manos las uvas para facilitar la salida del jugo con todos sus componentes disueltos, este método presentó las siguientes ventajas: facilitó la formación del sombrero, permitió la reproducción de levaduras al incorporar grandes cantidades de O₂, y facilitó la maceración al aumentar la superficie de contacto entre el mosto y las partes sólidas de la uva.

Sulfitado. La concentración en el vino fue una de las variables del experimento. Se adicionaron 50 ppm de metabisulfito de potasio.

Fermentación-Maceración, La maceración duró 7 días, durante éste período las partes sólidas de la uva aportaron al vino tinto sus cuatro características especiales: color, taninos, componentes del extracto y el aroma. Se siguió el método de maceración tradicional en donde el proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente.

La maceración es una extracción fraccionada que debe ser cuidada, ya que debido a su solubilidad las sustancias útiles emigran del hollejo antes que las indeseables.

Del hollejo se extraen las antocianinas, enzimas y los componentes que le dan el olor característico de la variedad. De la pulpa salen los carbohidratos, pectinas y ácidos orgánicos. De las semillas se extraen los taninos. Existe una pérdida de color, debido a que los pigmentos se quedan adheridos tanto a restos de pulpa de uva, semillas, escobillón, como también en las levaduras (Medina y col., 2005).

Cuadro 5.8
Análisis del mosto y del vino

	Mosto 1995	Vino 1995	Mosto 1996	Vino 1996	Norma*
Acidez total (g/L)	8.65	8.29	8.39	7.23	3.5-8
Acidez volátil (g/L)	0.17	0.30	0.03	0.23	< 1.5
Ácido málico (g/L)	5.20	5.05	5.10	5.04	
pH	3.50	3.42	3.70	3.56	
Azúcares reductores (% p/v)	18.63	1.28	22.2	-	
Etanol (% v/v)	-	10.54	N*	13.06	8.5-15
SO₂ (ppm) total	100	26.4	100	21.3	< 350

*NMX-V-012-NORMEX2005

Fermentación maloláctica

La fermentación se dio por terminada a los 26 días, cuando el consumo de ácido málico permaneció constante. El Cuadro 5.9, registra la disminución del ácido málico en función del tiempo.

Cuadro 5.9
Consumo de ácido málico en la FML

Tiempo (días)	Ácido málico (g/l)
0	5.1
1	5.0
3	4.56
7	4.23
10	4.06
13	3.71
14	3.87
17	3.35
20	3.41
26	3.4

La Figura 5.21 reporta la cuenta viable de *Lactobacillus brevis* durante el transcurso de la fermentación, además de comparar el consumo del ácido málico. La baja de acidez debida al ácido málico no fue muy grande, el *Lactobacillus brevis* tiene ésta característica, pero además presenta la ventaja de no producir cantidades importantes de ácido acético (Verde-Calvo, 1994).

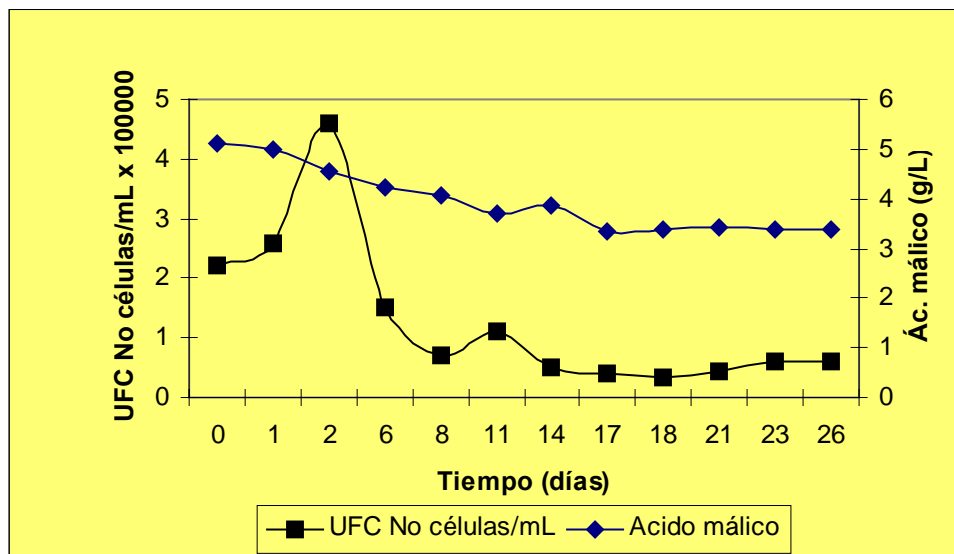


Figura 5.21 Crecimiento de *Lactobacillus brevis* durante la fermentación maloláctica

Al terminar la fermentación maloláctica se analizó el vino el Cuadro 5.8 muestra que la acidez debida al ácido málico bajó por efecto de la FML. Los valores de pH aumentaron ligeramente, los azúcares reductores en el vino del 1995, dieron un valor de 1.28 % y el del año siguiente no se detectaron. La acidez volátil después de los procesos fermentativos fueron bajos, indicando que los controles efectuados fueron bien llevados a cabo. Todos los parámetros medidos cumplen con la NMX-V-012-NORMEX-2005.

5.3 Medición del color:

Vinos no sometidos a fermentación maloláctica (F1 a F8)

Se observaron cambios en cada uno de los seis parámetros en estudio: Las fórmulas propuestas en 1978 por Jackson y Timberlake, han sido utilizadas con algunas modificaciones por: Rommel, y col., (1990), Gómez-Plaza, y col., (2001), Giusti y Wrolstad, (2001).

Color del vino (CV). Para ver cual de las condiciones presentó el mayor porcentaje de cambio en el color del vino, se calculó haciendo la diferencia entre el primer valor y los resultados obtenidos hasta el día 549 (Cuadro A4, anexo 8.2) esto, para cada una de las ocho condiciones (F1 a F8). Se tomó como 100% al valor inicial en cada condición, y los cambios se pueden ver en la Figura 5.22.

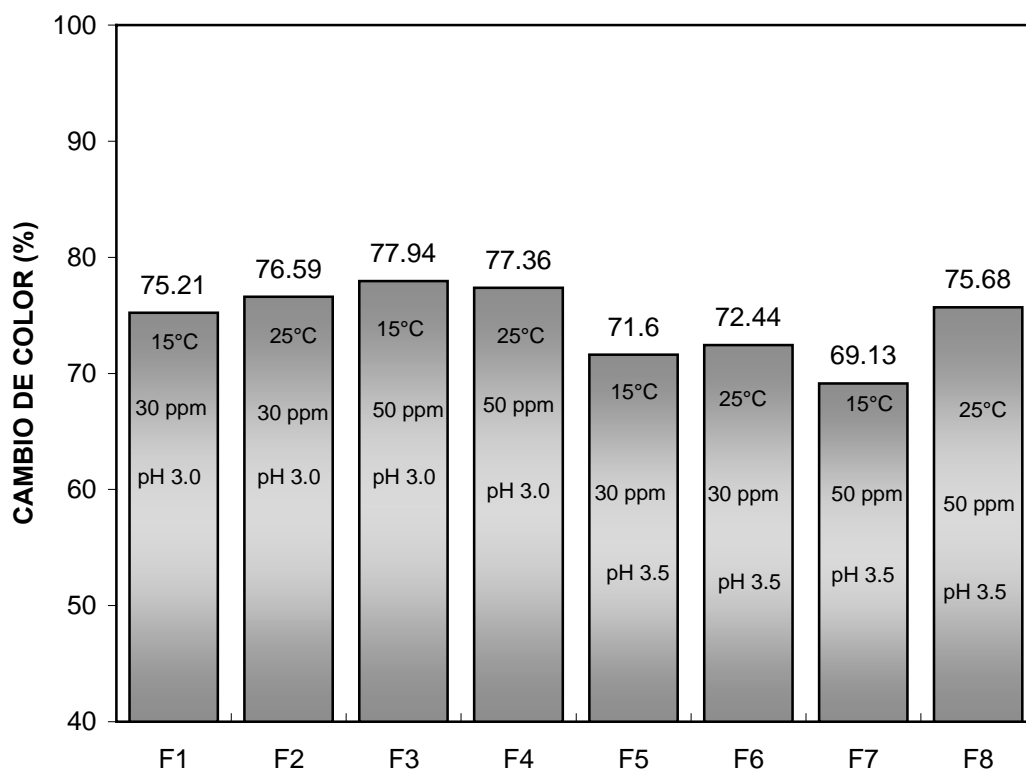


Figura 5.22. Efecto del pH, SO₂ y temperatura en el cambio de color en vino sin FML. La condición F3, es la que reportó mayor cambio en el color.

El vino F3 presentó mayor porcentaje en el cambio de color (77.94%) al compararlo con los demás vinos, esto indica que bajo las condiciones de pH 3.0, 50 ppm de SO₂ y 15°C el color del vino cambia más. Caso contrario ocurrió con F7 (pH 3.5, 50 ppm y 15°C) cuyo porcentaje de color es de 69.13%. La diferencia entre estas dos condiciones es el pH. Se encontró diferencia significativa entre el pH de 3.0 y el de 3.5 ($F 9.55 > F_{crit} 5.98$, $\alpha = 0.05$). Por lo tanto con estos resultados se puede decir que: a pH menor el CV desciende ya sea por polimerización o por oxidación de antocianinas. Nagel y Wulf (1979) informaron sobre una disminución en la concentración de antocianinas hasta de un 90 % con respecto a su valor original, en vinos con un pH de 3.30 el transcurso de 240 días, dato que no se observó en ninguna de las condiciones probadas en este trabajo.

El vino Cabernet Sauvignon estudiado, contenía antocianinas monoaciladas (peonidina y malvidina, aciladas con los ácidos acético y cumárico respectivamente) por lo que la decoloración fue menos importante. Giusti y Wrolstad (2001) encontraron que las antocianinas altamente aciladas pueden no responder igual a los cambios de pH que las antocianinas con una acilación o ninguna, y pueden no decolorarse tanto.

Eiro y Heinonen, (2002) describieron que la presencia de ácidos fenólicos sencillos en el vino como caféico y ferúlico pueden provocar aumento en el color debido a reacciones de copigmentación, que difieren dependiendo el tipo de antocianina con los que estos ácidos se ligan.

Para ver el efecto del SO₂ en el porcentaje de cambio en CV, se aprecian ligeras diferencias entre los valores de los vinos trabajados a 30 ppm y los de 50 ppm de SO₂. Pero estas diferencias no fueron suficientes para que estadísticamente fueran significativas, por lo que el color del vino no se vio influenciado por este parámetro ($p < 0.05$).

En la misma Figura 5.22, se puede ver que los valores extremos se dieron a la temperatura de 15°C. Cabe mencionar que F7 y F3, con valores extremos de (69.13% y 77.94% respectivamente) están a la misma concentración de 50 ppm de SO₂, por lo que la diferencia se debe al cambio de pH y no al cambio de temperatura, observación confirmada por no presentarse ninguna diferencia significativa entre los valores de 15 y 25°C ($p < 0.05$). En términos generales, se puede concluir que los valores en el cambio del color no dependen de la temperatura.

La densidad de color del vino (DC) es el resultado de la suma de las absorbencias a 520 y 420 nm (Cuadro B, en anexo 8.2). Las antocianinas monoméricas absorben a 520 nm lo cual hace que éste valor descienda normalmente con respecto al tiempo, ya que éstas se van polimerizando. Los cambios en la DC a 15°C, se ven en la Figura 5.23, comportamiento muy parecido en las cuatro condiciones, un decremento constante hasta los 365 días, tendiendo a estabilizar el valor posteriormente. Aunque aparentemente había una diferencia entre los valores de DC en las condiciones de pH 3.0 y pH 3.5, los resultados estadísticos indicaron que no hubo diferencia significativa entre los valores de DC obtenidos para vinos SFML ($p > 0.05$).

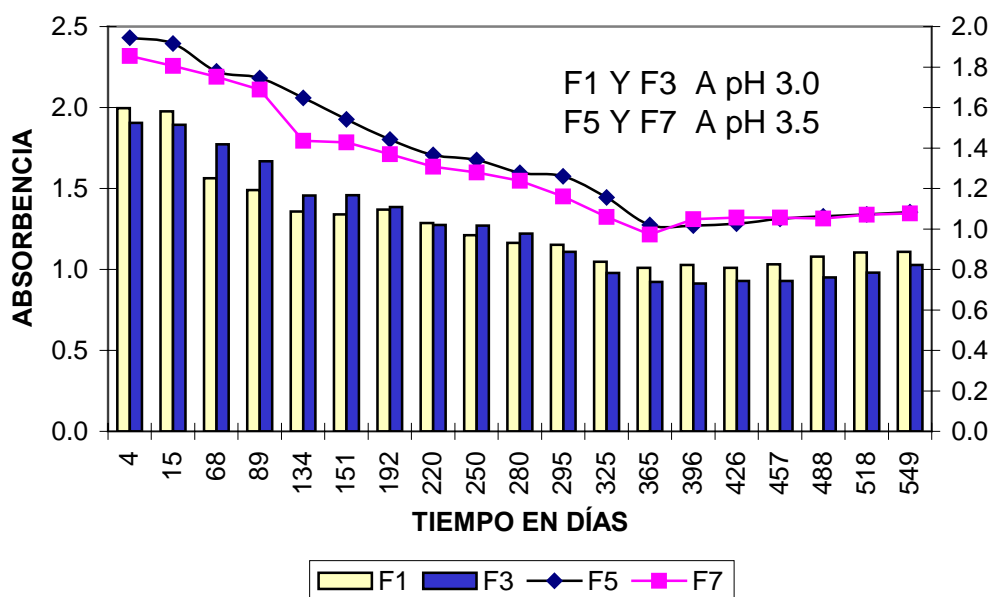


Figura 5.23. Cambios en la densidad del color en vino sin FML a 15°C en función del pH.

Un comportamiento similar se presentó a 25°C (Figura 5.24), con la diferencia que los valores finales fueron ligeramente menores que a 15°C. Con base a estas dos gráficas, se puede inferir que a temperaturas mayores de almacenamiento (25°C) el DC del vino tendería a bajar más que los vinos almacenados a 15°C (Bakker y Timberlake, 1986). Mayen y col (1994), y Nagel y Wulf (1979) informaron acerca del decremento en los valores de DC en sus vinos trabajados al igual que Rommel y col. (1990). Somers y Evans (1974) mencionan que la densidad del vino depende no solamente de la composición de la materia colorante, sino que en particular esta supeditada al equilibrio fisicoquímico del pigmento.

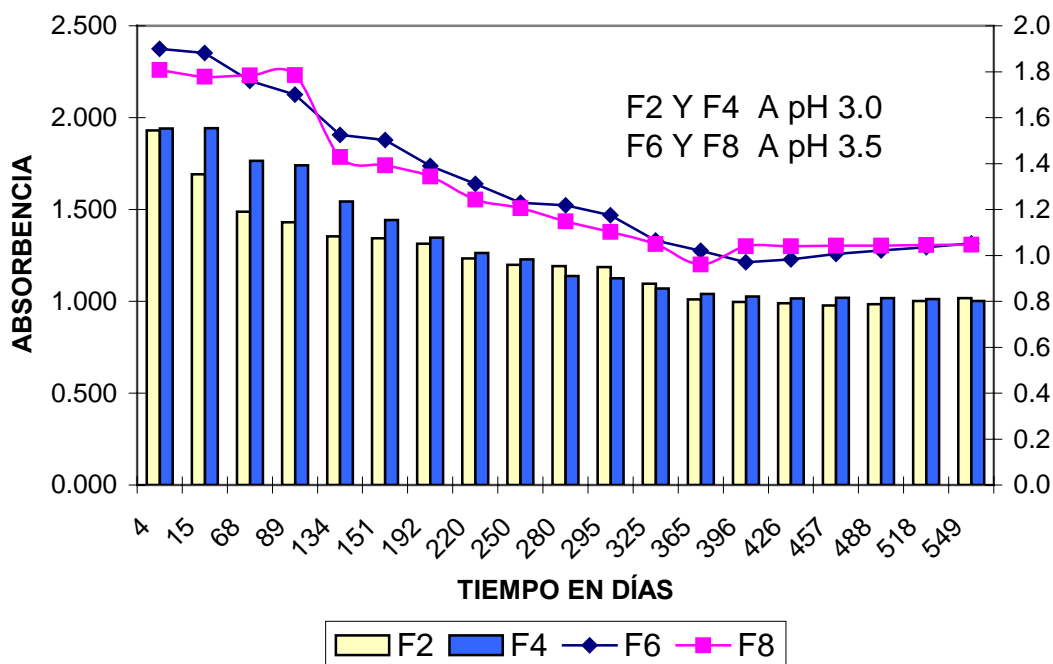


Figura 5.24. Cambios en la densidad del color en vino sin FML a 25°C en función del pH.

El tinte del vino (TV, Cuadro C en anexo 8.2) que se muestra en la Figura 5.25, indica los diferentes tonos que lo matizan, como el color rojo rubí-violeta característico de los vinos *Cabernet Sauvignon*. Pasados los 18 meses, el vino se transformó, se hizo mas limpio y brillante a 25°C, y un poco menos intenso para los mantenidos a 15°C. La Figura 5.25 denota claramente el efecto del pH sobre el tinte del vino, todas las condiciones a pH 3.0 son mayores que las que se dan a pH 3.5 ($p \leq 0.05$).

El análisis del SO_2 , muestra que los valores de TV son mayores a 50 ppm que a 30 ppm de SO_2 para condiciones similares en temperatura (F3 y F4 > F1 y F2), pero ésta diferencia es no significativa ($p > 0.05$). Hay que tomar en cuenta que transcurrido un año y medio, las antocianinas monoméricas se encontraron en menor concentración y por lo tanto, el efecto decolorante del SO_2 ya no fue tan fuerte, debido a que los compuestos poliméricos no reaccionaron con el SO_2 (Somers y Evans, 1974; Rommel y col., 1990; Sacchi, y col. 2005).

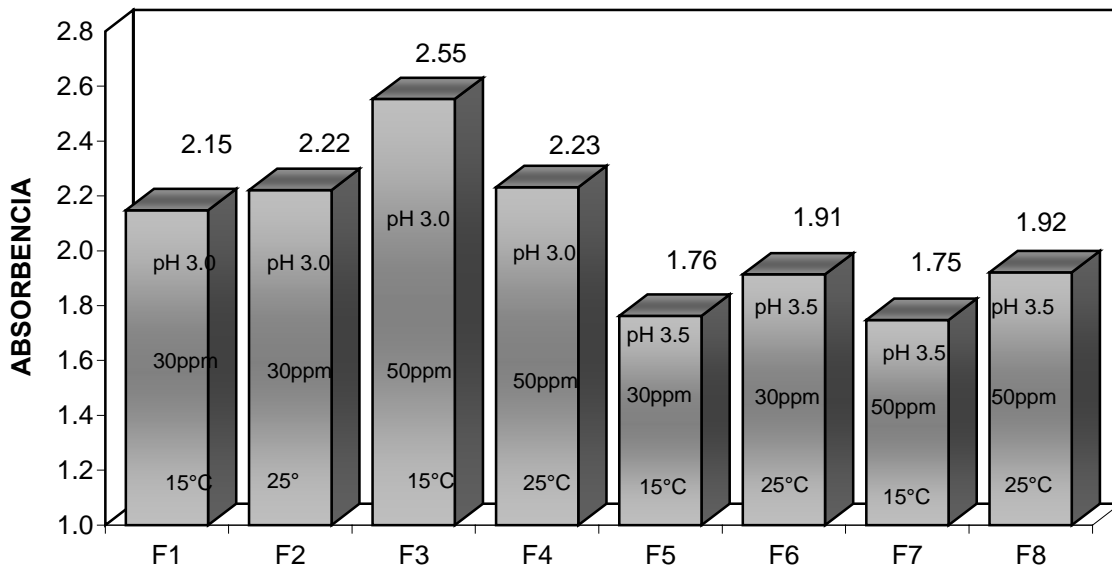


Figura 5.25. Valor final del tinte del vino sin FML en función del pH, SO₂ y Temperatura.

Cuando se estudian los resultados en función de la temperatura, no hubo diferencia significativa entre 15 y 25°C ($p > 0.05$).

Concentración de antocianinas monoméricas (CAM) y concentración de antocianinas poliméricas (CPP). Los vinos tintos al término de la fermentación alcohólica, presentaron un gradual decremento en el contenido de antocianinas monoméricas, las cuales fueron formando antocianinas poliméricas, por condensación o reacción con otros compuestos fenólicos. El cambio se caracterizó por una disminución en el valor de la absorbencia a 520 nm (tonos rojos), y el incremento de la absorbencia alrededor de los 420 nm (tonos anaranjados café). La mayoría de las reacciones de polimerización involucran otros compuestos fenólicos, especialmente los flavan 3-ol y sus polímeros, pero proteínas y polisacáridos también pueden verse involucrados (Ribereau-Gayon, y col.,1983). Los pigmentos poliméricos se afectan mucho menos que las antocianinas monoméricas por cambios en el pH, la concentración de SO₂ y la temperatura, esto ayuda a conferir estabilidad al color del vino (Somers, 1971; Eiro y Heinonen, 2002). Pasado el tiempo los polímeros comienzan a hacerse menos solubles y pueden precipitar provocando un decremento en la densidad del color del vino.

Las antocianinas monoméricas se calcularon sustrayendo el valor de las antocianinas poliméricas de CV. Las CAM decrecen de manera importante en los dos primeros meses, bajando en menor proporción posteriormente, pero siempre de manera constante (Cuadro D, en anexo 8.2). Debido a que el contenido de antocianinas monoméricas no fue el mismo para cada condición, se transformaron los valores finales a datos porcentuales: CAM + CPP = 100%, los resultados se muestran en la Figura 5.26, en donde se ve que F4 presenta las mejores condiciones para que las antocianinas se polimericen (59.67%), siguiéndole F3 (57.01%) del mismo pH y SO₂, esto concuerda con lo publicado por Jackson y col. (1978), en donde además mencionan que las antocianinas poliméricas son más resistentes al blanqueado del ión bisulfito, el cual decolora fácilmente a las antocianinas monoméricas (Harbertson, y col., 2003). Bakker y col. (1986) reportan una situación similar en vinos del Reino Unido. Para F8 (30.17%) y F7 (30.62%) se dieron las condiciones menos propicias para la polimerización. En conclusión, la mayor concentración de CPP se dio a pH 3.0, y SO₂ 50 ppm y 25°C, la menor CPP fue a 50 ppm de SO₂, y pH de 3.5 y 25°C; los resultados extremos se obtuvieron a la concentración de 50 ppm de SO₂ y a 25° C, lo que indicó que el efecto principal se debe al cambio de pH. En vinos ácidos se favorece la polimerización. Los vinos con mayor polimerización cambiaron el color rojo rubí por uno rojo con tonos dorados.

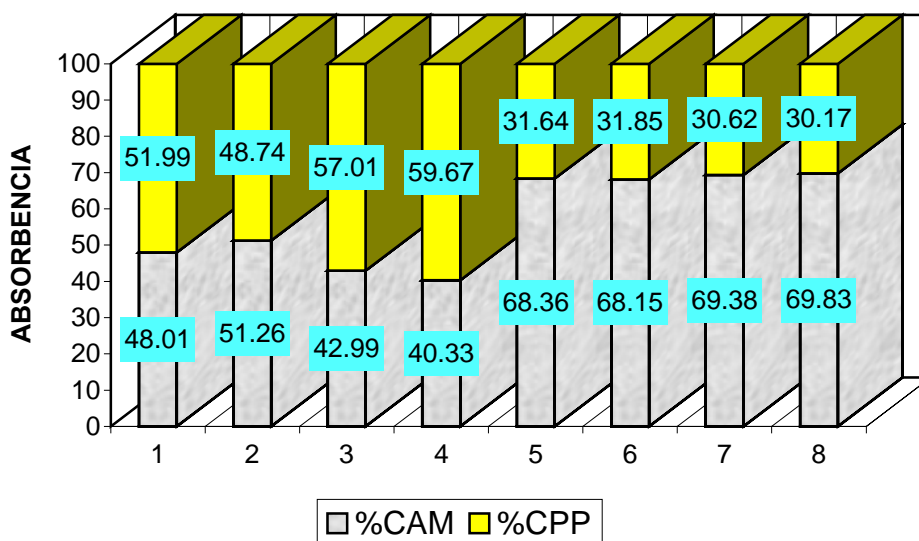


Figura 5.26. Valores porcentuales de antocianinas mono y poliméricas en vino sin FML.

La Figura 5.27 muestra la variación de las antocianinas mono y poliméricas en el transcurso del año y medio, Se observa, que el decremento en la con-

centración de antocianinas monoméricas fue proporcional al aumento de las antocianinas poliméricas, que la polimerización se favoreció ligeramente por la disminución de la temperatura y que bajo condiciones de SO_2 mas altas, este aumento no fue tan pronunciado, Rommel y col., (1990) mencionaron que las antocianinas se polimerizan más fácilmente durante la fermentación y durante el periodo de añejamiento, teniendo además una influencia directa con el aumento de la temperatura.

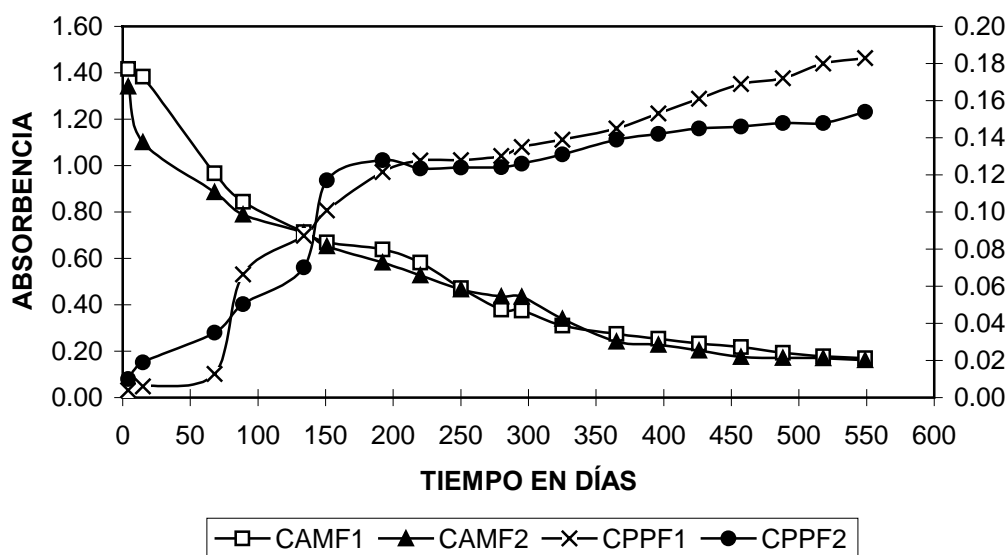


Figura 5.27. Variación de las antocianinas en el vino, F1 y F2 sin FML. F1 esta a 15°C y F2 a 25°C, ambas condiciones están a pH 3 y tienen 30 ppm de SO_2 .

Edad química (EQ).- Esta relación de los valores de CPP entre CV permitió seguir el proceso de añejamiento (Cuadro E, en anexo 8.2). Los datos aumentaron en las ocho diferentes condiciones, presentando casi una relación lineal, y las pendientes fueron mayores a pH 3.0 (Cuadro 5.10). Los resultados concuerdan con lo publicado por Sims y Morris (1985) quienes observaron la linealidad en el valor de EQ para vinos de Estados Unidos elaborados con *Cabernet Sauvignon*. Somers y Evans (1977) encontraron valores similares de EQ para vinos con un año de añejamiento.

Se determinó que el pH, dio significativo en los niveles estudiados ($F_{66.82} > F_{crit} 5.98$ con $\alpha = 0.05$). Por lo que a pH 3.0, hay una mayor facilidad de polimerización y por lo tanto una pérdida más pronunciada de antocianinas monoméricas.

Cuadro 5.10. Ecuaciones de las rectas y valores edad química obtenidas en los 16 diferentes tratamientos de añejamiento

Condición		Ecuación lineal	R ²	Eq
SFML	F1	$y = 0.0010x - 0.0244$	0.9952	0.520
SFML	F2	$y = 0.0010x - 0.0156$	0.9811	0.487
SFML	F3	$y = 0.0120x - 0.0490$	0.9706	0.571
SFML	F4	$y = 0.0010x - 0.0280$	0.9927	0.597
SFML	F5	$y = 0.0006x - 0.0101$	0.9591	0.316
SFML	F6	$y = 0.0006x + 0.0022$	0.9789	0.319
SFML	F7	$y = 0.0005x + 0.0026$	0.9849	0.306
SFML	F8	$y = 0.0007x - 0.0033$	0.9842	0.355
SFML	F9	$y = 0.0009x + 0.0020$	0.9946	0.517
CFML	F10	$y = 0.0008x + 0.0231$	0.9874	0.487
CFML	F11	$y = 0.0007x + 0.0168$	0.9786	0.478
CFML	F12	$y = 0.0008x + 0.0137$	0.9442	0.562
CFML	F13	$y = 0.0007x - 0.0159$	0.9485	0.450
CFML	F14	$y = 0.0007x - 0.0177$	0.9483	0.460
CFML	F15	$y = 0.0009x - 0.0199$	0.9654	0.422
CFML	F16	$y = 0.0009x - 0.0151$	0.9875	0.468

SFML, sin fermentación maloláctica

CFML, con fermentación maloláctica

Vinos con fermentación maloláctica (F9 a F16) y comparación del efecto de la FML sobre los factores estudiados

Color del vino.- Los valores del color del vino CFML, se dan en la Cuadro G, en el anexo 8.2. La Figura 5.28 indica los cambios porcentuales del cambio del color. El cual se calculo de la misma manera que en los vinos sin FML y en donde entre mas grande sea el porcentaje, menor es el cambio de CV. Se puede observar que a pH 3.5 los datos son menores que a pH 3.0, lo que muestra que el valor de CV tiende a bajar cuando el pH del vino es menos ácido. Resultados similares fueron obtenidos por Sims y Morris (1986). El valor mas alto fue para F12, con 74.03%, por lo que las condiciones de pH de 3.0, la concentración del SO₂ de 50 ppm y la temperatura de 25°C dieron menos cambio del color. La influencia del pH sobre el color del vino fue significativo ($F 10.68 > F_{crit} 5.98$ con $\alpha = 0.05$). McCloskey y Yengoyan (1981) informaron que las antocianinas monoméricas y poliméricas de estructura desconocida están involucradas en el color rojo del vino y que éste depende de la edad del vino, por lo que en los primeros momentos del añejamiento, los valores de CV deben de ser mas grandes que a mediados o al final del proceso. Varios son los autores que informaron sobre la importancia de pH mas ácidos en el aumento del color del vino (Williams y Hrazdina, 1979; Sims y Morris, 1985; Dallas y Laureano, 1994; Brouillard y col., 1991).

Al analizar los datos del porcentaje del cambio del color en función del SO₂, los valores extremos se dieron en concentraciones de 50 ppm F12 (74.03%) y el mas bajo se presentó en F16 (62.72%), siendo la diferencia entre éstos debida al cambio de pH. A SO₂ de 30 ppm, los valores de CV en porcentaje fueron del orden de un tercio que las de 50 ppm. Un comportamiento similar se dio con el grupo de tratamientos SFML (F1, F2, F5 y F6). La concentración del SO₂ decoloró las antocianinas, aunque este equilibrio es reversible (Sims y Morris, 1986). Sin embargo, el análisis estadístico de ANOVA indicó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con SO₂ de 30 y 50 ppm ($F 1.038 < F_{crit} 5.98$, con $\alpha = 0.05$).

El estudio del ANOVA en función de la temperatura fue no significativo ($F 0.17 < F_{crit} 5.98$ con $\alpha = 0.05$). Sims y Morris (1984, 1986), hicieron notar que los vinos almacenados en altas temperaturas incrementan rápidamente los colores café (420 nm) y que pueden adquirir colores inaceptables para un vino tinto si la temperatura es de 30°C.

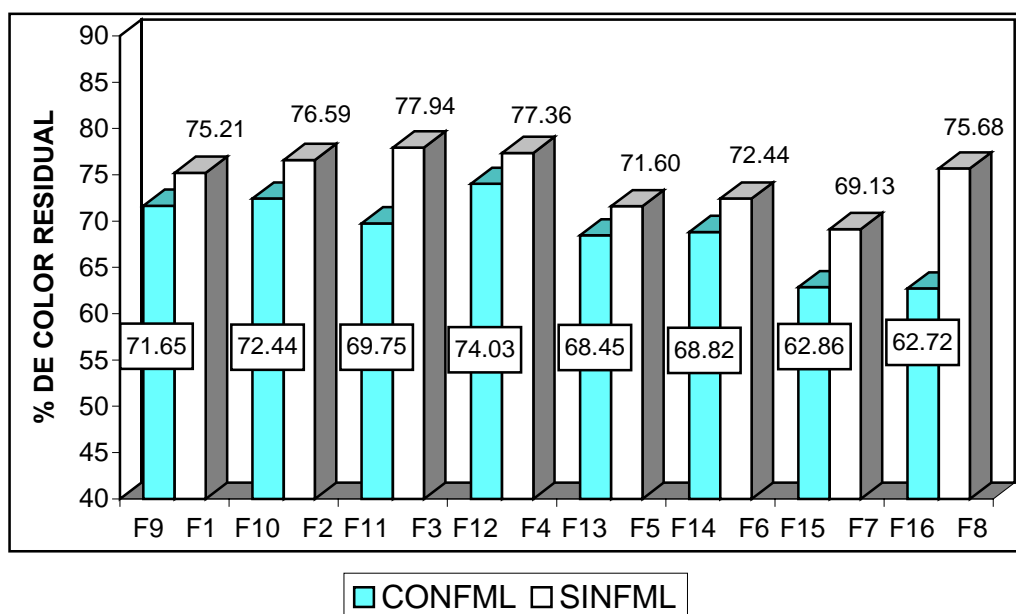


Figura 5.28 Efecto del pH en el cambio de color en vino con y sin FML después de 18 meses de añejamiento.

La Figura 5.28 muestra los porcentajes de cambio del color en los dos tipos de vinos, lo cual permite apreciar dos aspectos, El primero, es que los vinos CFML se perdió más color que los SFML. Segundo, el pH de 3.5, favoreció mas los cambios de color durante el añejamiento, para los vinos SFML fue F7 y para los vinos CFML fue F15.

Esta diferencia por efecto de la FML puede deberse a la pérdida de materia colorante durante el transcurso de la fermentación ya sea por precipitación y/o por adsorción en las bacteria lácticas (Somers y Evans, 1979). Mientras que el porcentaje de color residual del vino en SFML es del orden de 69 al 78% en las condiciones de CFML este cambio fue entre 62 y 74%. Comparando estos datos con los de McCloskey y Yengoyan (1981), ellos informaron pérdida de antocianinas del orden de 50% en vinos con tres años de edad; Ribereau-Gayon (1983), en vinos franceses encontró esta baja en un año y para vinos australianos Somers (1979) la reportó en 5 años. Como se puede apreciar no hay una relación directa en el descenso del color del vino con respecto al tiempo en las diferentes regiones vitivinícolas mencionadas.

Los vinos SFML presentaron los porcentajes mas altos de color del vino (Figura 5.28), siendo mayor la diferencia entre F8 y F16. Los resultados al

aplicar el ANOVA para los dos tipos de vinos, mostró diferencia significativa ($F 9.43 > F_{crit} 4.6; \alpha = 0.05$) indicando que la FML tiene una influencia importante en el color del vino.

Con base en los resultados se puede concluir para el color del vino que: El pH determinó los mayores cambios, a menor pH mayor porcentaje de CV, tanto para vinos CFML como para los SFML.

Densidad de color.- Los valores de DC en general descendieron de manera constante, con una pendiente ligera (Figura 5.29). Éste comportamiento concuerda con lo reportado por Somers y Evans (1979), quienes mencionan, que el decremento en la densidad del color puede deberse a vinos con valores de pH altos. Los compuestos rojo y azules de las antocianinas se asocian o participan en reacciones de co-pigmentación con compuestos fenólicos, aumentando de manera importante la estabilidad de estos complejos, ya que fácilmente forman enlaces o puentes de hidrógeno intermoleculares. Otros autores informan sobre comportamientos similares, (Mazza y Brouillard, 1990; Rommel y col., 1992; Markovic y col., 2000; Darias-Martin y col., 2001). El ANOVA, tomando en cuenta solo el efecto del pH, indicó que no había diferencia significativa entre las medias de los valores ($F 0.999 < F_{crit} 5.98$ con $\alpha = 0.05$). La comparación del efecto de la temperatura, indicó también que no tubo una influencia significativa en la densidad del color del vino CFML ($F 1.0056 < F_{crit} 5.98$ con $\alpha = 0.05$). al igual que el efecto de la concentración del SO_2 , ($F 0.087 < F_{crit} 5.98$ con $\alpha = 0.05$).

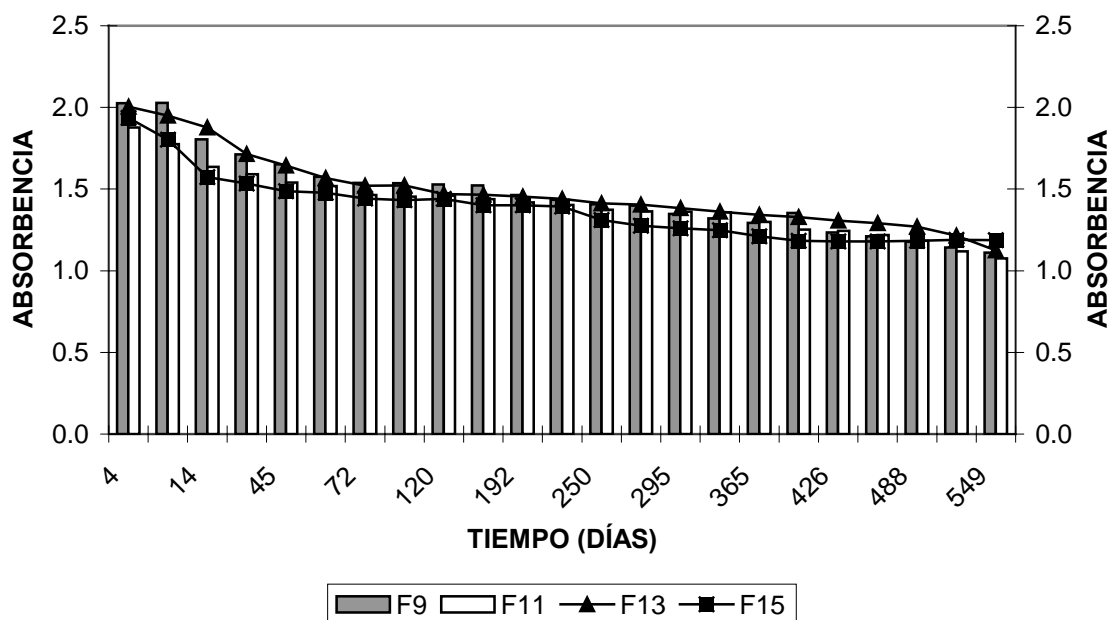


Figura 5.29. Cambios en la densidad del color en vino con FML a 15°C en función del pH.

Al analizar la influencia de la FML en la densidad del color, se hizo sobre los porcentajes de la DC del vino que quedan después de los diferentes tratamientos. Al igual del color del vino, aquí la FML incide de manera importante ya que estadísticamente se encontró que si había diferencias significativas entre las medias de los valores de densidad ($F_{cal} 5.31 > F_{crit} 4.6$; con $\alpha = 0.05$). En la Figura 5.30, se observa como el efecto del pH de 3.0 es importante para obtener vinos con porcentajes más altos sobre todo en vinos SFML.

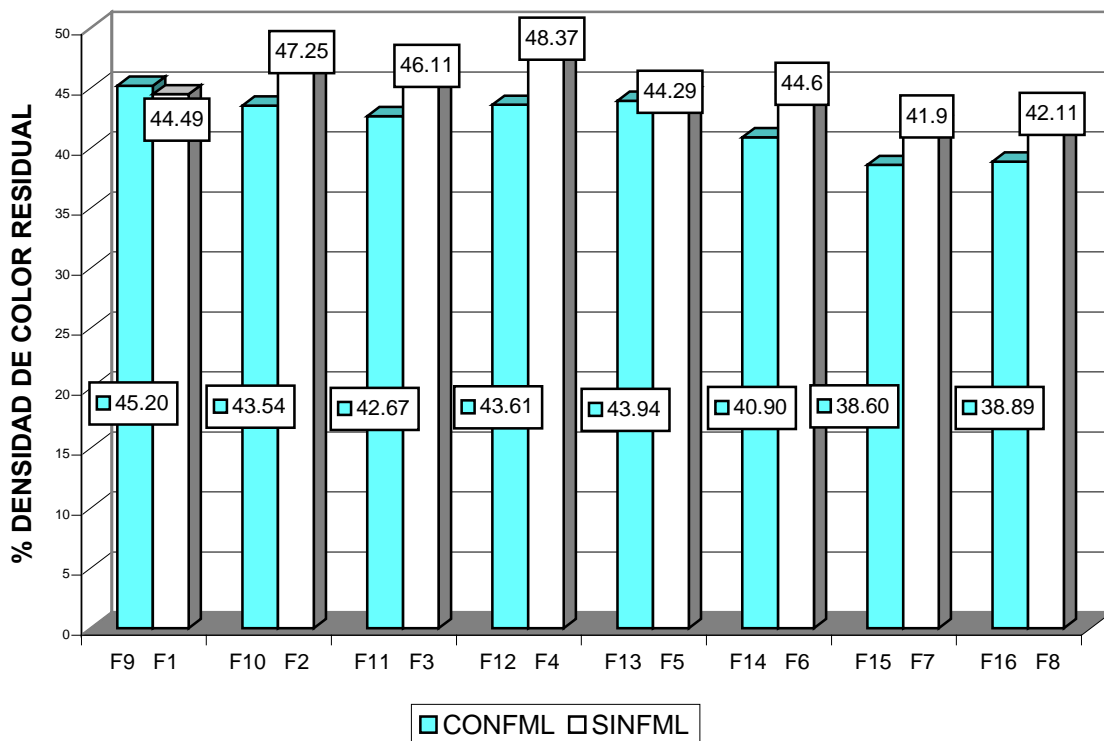


Figura 5.30. Porcentaje de densidad residual de color en vinos con y sin FML. Condiciones a pH 3.5: F5, F6, F7, F8, F13, F14, F15 y F16.

Tinte del vino.- La Figura 5.31 muestra a pH de 3.0 el valor más alto del TV para el F12 (2.29), seguido de F10 (2.05). Ambos, a 25° C. El dato más bajo se obtuvo en F15 (1.48), mantenido a pH de 3.5. El pH denotó una influencia sobre TV a pH mas ácido mayor valor.

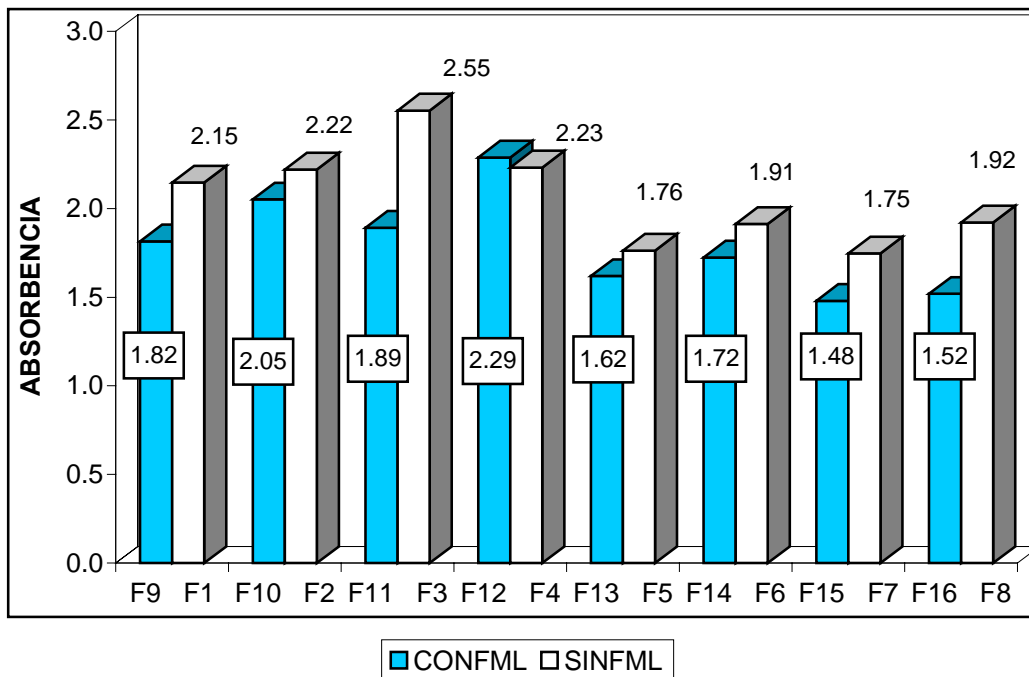


Figura 5.31, Efecto del pH en el valor final del tinte en vinos con y sin FML

Cuando se analizó el tinte del vino en función del pH (Figura 5.31), se aprecia que los vinos más ácidos desarrollaron valores más altos, debido a que los equilibrios de las antocianinas se desplazan hacia la forma del ión flavilio, el ANOVA confirma su significancia ($F 13.07 < F_{crit} 5.98$ con $\alpha = 0.05$).

El efecto del sulfuroso no afectó de una manera uniforme el tinte ya que se dieron valores altos y bajos tanto a 30 ppm como a 50 ppm, y la estadística comprobó este hecho, ya que no hubo diferencia significativa entre los valores de SO_2 ($F 0.001 < F_{crit} 5.98$ con $\alpha = 0.05$).

Al evaluar el efecto de la temperatura en los vinos CFML, el ANOVA indicó que no hubo diferencia significativa sobre TV ($F 0.99 < F_{crit} 5.98$ con $\alpha = 0.05$).

Al comparar el efecto de la FML, los valores más altos de la TV fueron para F12 (2.29) y F3 (2.55). Estos vinos tuvieron pH bajo y alta concentración de SO_2 , tanto en vinos CFML y SFML (Figura 5.31), esto como ya se comentó

es debido a que el equilibrio químico favorece la presencia del ión flavilio, el cual intensifica su color en medios más ácidos.

Concluyendo, la relación TV se ve favorecida a pH 3.0, tanto en los vinos CFML como en los SFML ($p < 0.05$).

El análisis de varianza verificó que la presencia de la FML no fue significativa sobre el valor final del tinte ($F_{cal} 3.65 < F_{crit} 4.6$; con $\alpha = 0.05$).

Concentración de antocianinas monoméricas y concentración de antocianinas poliméricas. El decremento de las antocianinas monoméricas debido a la formación de antocianinas poliméricas (Cuadros J y K, en anexo 8.2) se intensificó en F14 (pH 3.5, 30 ppm de SO_2 y $25^\circ C$), mientras que la condición de menor cambio se observó en F15 (pH 3.5, 50 ppm de SO_2 y $15^\circ C$), lo que indicó que un aumento de la temperatura aunado a un descenso de la concentración de SO_2 favorecieron la polimerización. Ribéreau-Gayon y col. (1983) mencionan también; que bajo condiciones de bodega, la auto-oxidación del etanol en presencia de compuestos fenólicos produce trazas de acetaldehído, y que éste provoca la copolimerización de antocianinas y taninos. La Figura 5.32 muestra el contenido de antocianinas mono y poliméricas para cada tipo de vino.

Por lo tanto se determinó que a menor pH, menor CPP y menor CAM para vinos CFML. Y que a mayor pH, hay mayor concentración de CPP (Figura 5.32). Mayen y col. (1994) mencionan que la uva *Cabernet Sauvignon* tiene una gran tendencia a producir polímeros durante la etapa posterior a la fermentación, provocando que los vinos sean más coloridos que los de otras variedades.

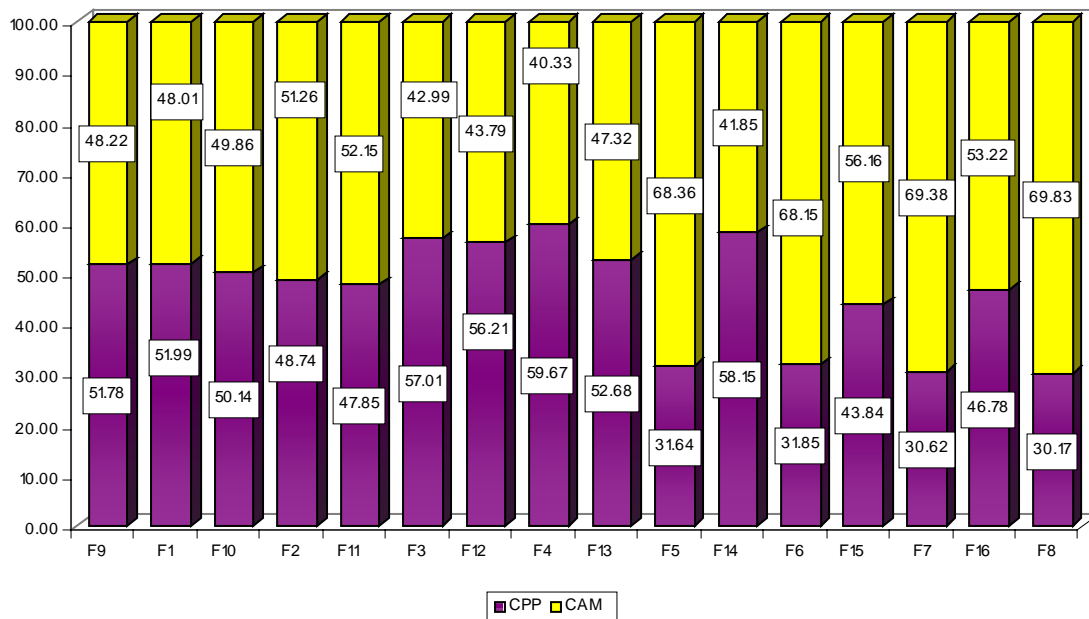


Figura 5.32 Valores finales porcentuales de antocianinas monoméricas (CAM) y poliméricas (CPP) en vinos con y sin FML

En la Figura 5.32 se puede ver el efecto de la FML en la proporción de antocianinas mono y poliméricas. Las condiciones que se efectuaron a pH 3 no dieron grandes diferencias en los dos tipos de vinos, pero cuando se trabajó a pH 3.5, la influencia de la acidez fue significativa. ($F_{17.11} > F_{crit} 5.98$ con $\alpha = 0.05$). En cambio el análisis de ANOVA indicó que la FML no tuvo inferencia en la concentración de antocianinas monoméricas ($F_{0.022} < F_{crit} 4.6$ con $\alpha = 0.05$). Con las antocianinas poliméricas se observó que, la FML dio diferencia significativa ($F_{19.38} > F_{crit} 4.6$ con $\alpha = 0.05$). Singleton y Trousdale (1992), informaron que las antocianinas pueden incrementar la solubilidad de los fenoles poliméricos; ejemplos de estos últimos son las procianidinas y los flavanoles. Sin embargo, parece ser que es necesaria la presencia del acetaldehído como cofactor para que esto ocurra (Sims y Morris, 1986). La presencia de glucósidos confiere gran solubilidad a los polímeros y las reacciones de los compuestos fenólicos oligoméricos y poliméricos con antocianinas monoméricas previenen la formación de precipitados. Hay que tomar en cuenta que los compuestos flavan 3-ol reaccionan con las catequinas de manera natural en el vino, formando procianidinas oligoméricas o poliméricas, que comúnmente en enología se les ubica como parte de los taninos (Rein, 2005).

Edad química.- El análisis de la Figura 5.33, muestra una clara diferencia entre los valores de EQ a pH 3.5 y los de 3.0, las condiciones de F9 a F12, son mas altas que las de F13 a F16. El índice de EQ varió en todos los tratamientos CFML de manera menos proporcional que los vinos SFML (Cuadro F, anexo 8.2). Los resultados concuerdan con los de Sims y Morris (1985), quienes observaron la linealidad en el valor de EQ para vinos de Estados Unidos elaborados con *Cabernet Sauvignon*. Somers y Evans (1977), encontraron valores de EQ entre 0.1 y 0.5 para vinos australianos con 8 meses de añejamiento, mientras que en éste trabajo se encontró en los vinos CFML un intervalo entre 0.422 y 0.562, y en los vinos SFML de 0.306 a 0.597 (Cuadros F y L en anexo 8.2) a los 18 meses. Por lo que se puede concluir que a menor pH, mayor EQ, y que se presentó un comportamiento casi lineal entre EQ y el tiempo, permitiendo por lo tanto, contar con una medida química para controlar el añejamiento en vinos.

Los vinos CFML a pH 3.0 presentaron mayores valores de EQ, que los de pH 3.5. Esto implica que un cambio en el pH hacia valores menores favorece la polimerización de las antocianinas ($F_{10.06} > F_{crit} 5.98$ con $\alpha = 0.05$).

La concentración de SO_2 , resultó no significativa. De la temperatura se sabe que influye generalmente de manera directa sobre el valor de EQ. De hecho Mayen y col. (1994) mencionan que el añejamiento a temperaturas más altas acelera dos o tres veces el proceso, comparando con los vinos almacenados a 13°C.

La influencia de la FML sobre la EQ del vino se muestra en la Figura 5.33, se puede apreciar que los valores altos en las condiciones F12, F14, F15 y F16, indican mayores cambios en la formación de antocianinas poliméricas, que aparentemente a pH de 3.5 se favorece este comportamiento, aunque la estadística indicó que no hubo diferencia significativa entre las medias de los vinos CFML y SFML ($F_{cal} 1.105 < F_{crit} 4.6$; $\alpha = 0.05$)

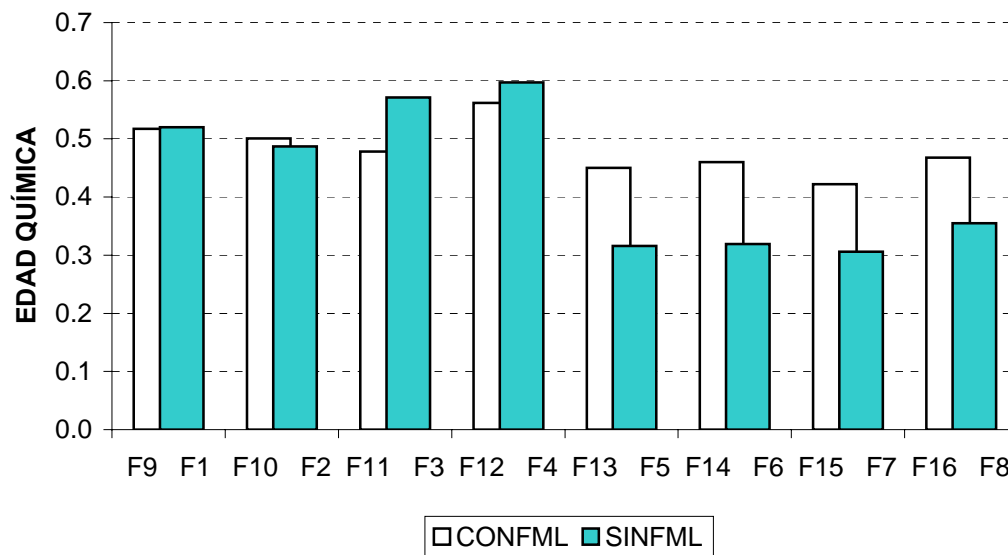


Figura 5.33 Efecto de la FML en la edad química del vino

Se concluye que a menor pH mayor es el valor EQ para los vinos SFML; además los vinos CFML dieron relaciones de EQ mayores a pH 3.5.

5.3 CIELAB análisis en el cambio de color de los vinos añejados.

A 25°C los valores del tinte aumentaron de manera importante (Cuadros 5.11 y 5.12), los tonos se fueron hacia la zona de los rojo-anaranjado, siendo mayor la tendencia en los vinos no fermentados. En cambio los vinos elaborados a 15°C, presentaron mayor cromaticidad (Figura 5.34).

Cuadro 5.11
Valores triestímulo para vino SFML

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
L*	27.25	37.18	26.99	30.47	25.43	38.69	25.84	37.96
a*	44.20	10.09	47.79	7.96	41.65	7.80	40.66	8.32
b*	10.30	15.81	10.66	12.38	9.36	17.16	9.36	15.60
Tinte (Hue)	13.11	57.45	12.57	57.26	12.66	65.55	12.96	61.92
Cromaticidad	45.38	18.75	48.96	14.71	42.69	18.85	41.73	17.68

Las Figuras 5.34 y 5.35 muestran gráficamente en donde se encuentra ubicados los vinos después de 18 meses de añejamiento, se aprecian sus diferencias en los tonos rojos y amarillos. Nótese como los vinos con temperaturas de 25° C (tratamientos pares) se oxidaron más y tienden hacia los tonos amarillos lo cual también es informado por Maribel y col., (1999).

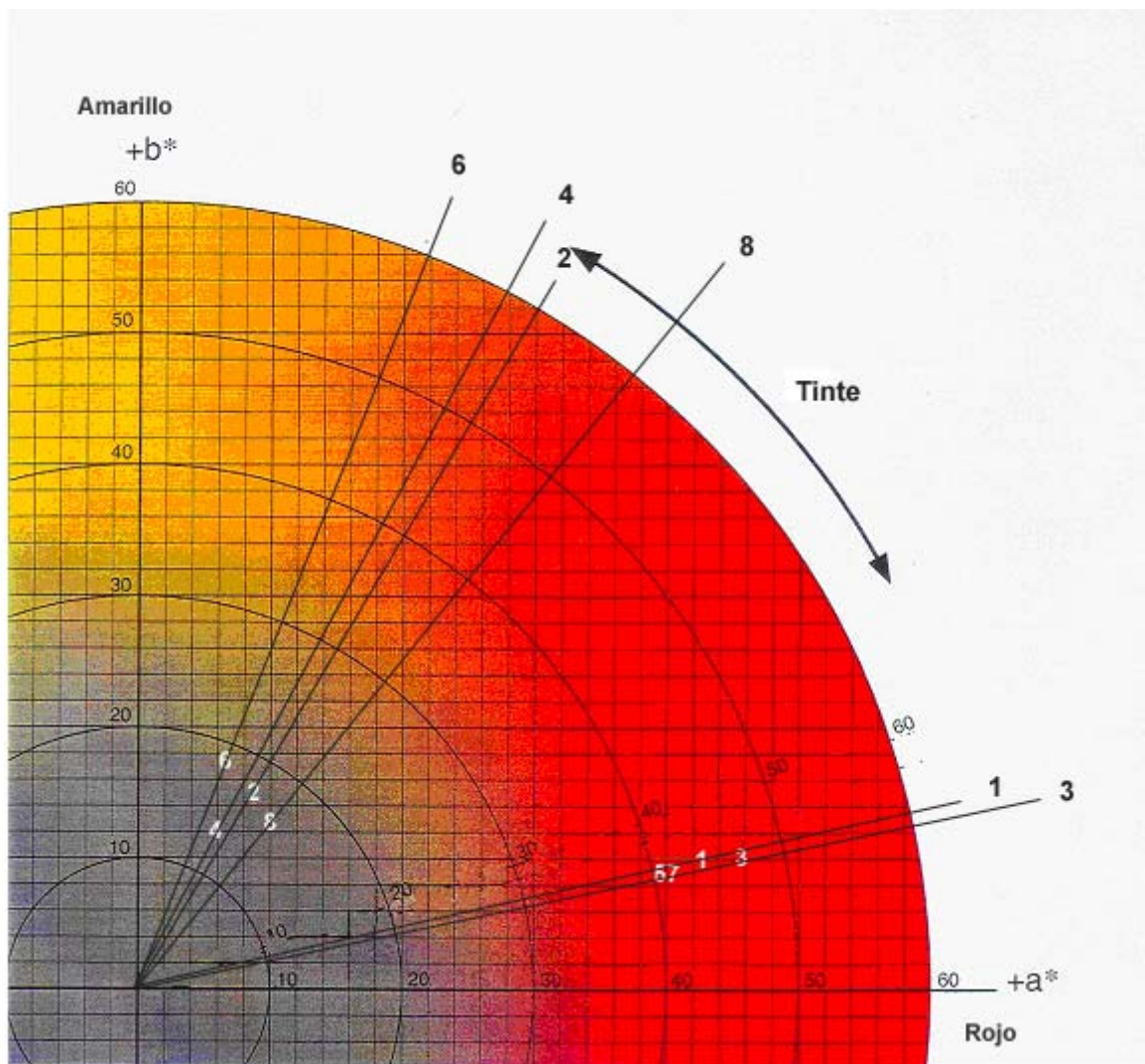


Figura 5.34, Diagrama de cromaticidad con los valores finales de a^* y b^* de los vinos SFML

Cuadro 5.12

Valores triestímulo para vino CFML

	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
L^*	43.84	49.97	39.62	45.55	40.98	51.64	42.22	44.88
a^*	26.94	19.71	28.91	16.64	31.88	15.34	30.94	13.36
b^*	13.88	19.81	14.09	14.40	10.92	21.01	10.82	13.73
Tinte (Hue)	27.26	45.15	25.98	40.88	18.91	53.86	19.27	45.76
Cromaticidad	30.30	27.94	32.16	22.01	33.69	26.01	32.78	19.16

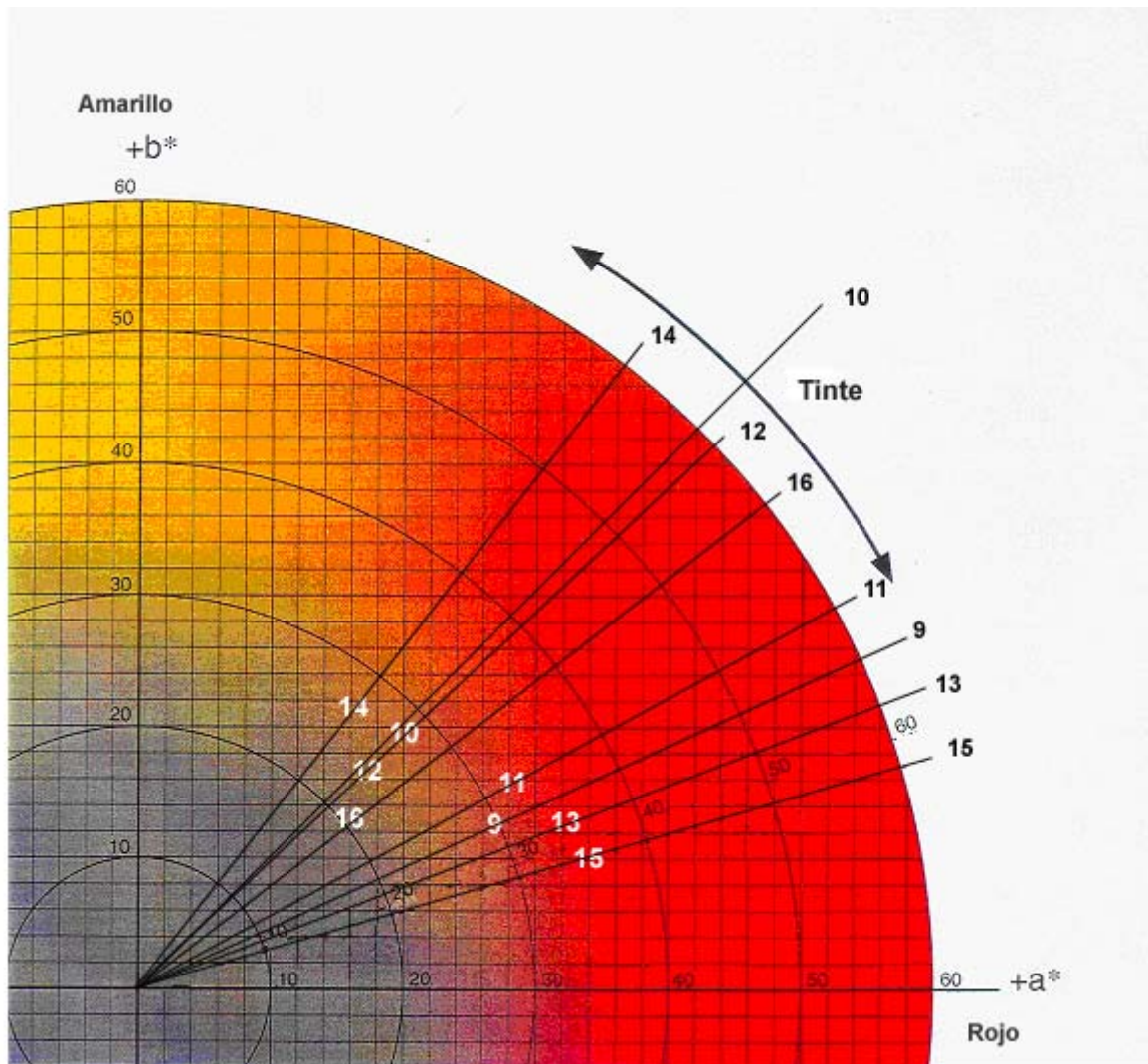


Figura 5.35 Diagrama de cromaticidad con los valores finales de a^* y b^* de los vinos CFML

Los vinos CFML presentaron mayor luminosidad (ΔL^*), los deltas en todas las condiciones fueron negativos (Cuadro 5.13). La condición de pH 3.0 , 30 ppm de SO_2 y $15^\circ C$ es la que mayor diferencia reportó ($\Delta L^* = -16.59$). La luminosidad aumentó al final del proceso debido a la polimerización de las antocianinas que alcanzaron a precipitar y dejar más limpio el vino, este efecto se notó mas en los vinos CFML (valores negativos de ΔL^*).

Cuadro 5.13
Efecto de la FML en el color del vino

	ΔL^*	ΔA^*	ΔB^*	ΔE^*
F1-F9	-16.59	17.26	-3.59	24.21
F2-F10	-12.79	-9.62	-4.00	16.50
F3-F11	-12.64	18.88	-3.43	22.97
F4-F12	-15.08	-8.68	-2.03	17.52
F5-F13	-15.55	9.78	-1.56	18.43
F6-F14	-12.95	-7.54	-3.85	15.47
F7-F15	-16.38	9.72	-1.46	19.10
F8-F16	-6.92	-5.04	1.87	8.76

Los vinos, en todos los casos perdieron color rojo (baja en el valor de a^*) y aumentaron los tonos amarillos (aumento en el valor de b^*). Los deltas de a^* , para todos los sistemas a 15°C, dieron valores mas grandes en los vinos CFML, predominando por lo tanto el color rojo. Los deltas de b^* , produjeron datos negativos, indicando nuevamente que los vinos CFML tuvieron cambios mas importantes, moviéndose mas hacia los tonos amarillos. En cuanto a los cambios de color totales, en donde mas se notó el efecto de la FML fue entre las condiciones F1 y F9 (24.21) y en las condiciones F8 y F16, el efecto fue pequeño. Maribel y col., (1999), mencionan que los cambios de color durante el añejamiento pueden asociarse a efectos hipercrómicos debidos a reacciones de copigmentación entre las antocianinas y otros compuestos fenólicos.

5.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó, para conocer si existieron diferencias significativas entre las diversas condiciones en las que el vino se añejo. Se utilizaron los valores finales de EQ, para vinos S/FML y para C/FML. Los resultados se muestran en el Cuadro 5.14.

Cuadro 5.14**Análisis factorial 2³ ANOVA para comparar los valores de edad química de vinos SFML**

Fuente	SS	DF	MS	F	P
pH	0.28974	1	0.28974	434610.5	0.0000
Temperatura	7.5×10^{-4}	1	7.5×10^{-4}	1139.06	0.0000
SO₂	1.29×10^{-2}	1	1.29×10^{-2}	19390.56	0.4718
pH x Temp	1.27×10^{-3}	1	1.27×10^{-3}	1914.06	0.0000
pH x SO₂	6.9×10^{-3}	1	6.9×10^{-3}	10353.06	0.0000
Temp. X SO₂	4.18×10^{-3}	1	4.18×10^{-3}	6280.56	0.0000
pH x SO₂ x Temp	6.33×10^{-5}	1	6.33×10^{-5}	95.06	0.0000
Bloques	1.33×10^{-6}	2	6.66×10^{-7}	1.00	0.3927
Error	9.33×10^{-6}	14	6.66×10^{-7}		

El análisis de varianza de los valores de edad química indicó que en el efecto del pH (Cuadro 5.14) existió una diferencia significativa entre los dos valores de pH de 3.0 y 3.5, por lo que la EQ si se vio afectada por la actividad del ión hidrónico en el vino ($p < 0.05$). En términos generales se puede decir que los vinos presentaron valores más altos de EQ con menores valores de pH.

El efecto del anhídrido sulfuroso, por si solo, parece no influir en el valor de EQ ($p > 0.05$), en los intervalos trabajados.

La temperatura resultó ser también significativa. Esto indica que la diferencia de 5° C, analizada como variable dependiente para los intervalos estudiados incidieron de manera directa en el valor de EQ ($p < 0.05$).

Efecto de la intersección pH, SO₂. El análisis en conjunto resultó con diferencias significativas entre las varianzas ($p < 0.05$), lo que indica que los dos factores en conjunto afectan al valor de la EQ. A menor pH y mayor concentración de SO₂ mayor EQ.

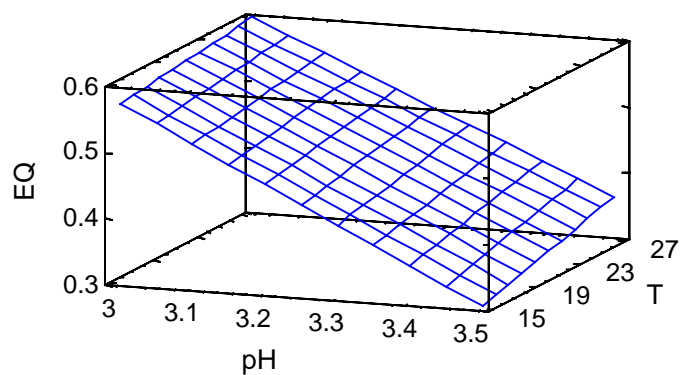
Efecto de la intersección pH, Temperatura. Muestra que influyó en el valor de EQ ($p < 0.05$).

Efecto de la intersección Temperatura SO_2 . Este arrojó diferencias significativas ($p < 0.05$), indicando que los dos factores unidos afectan al valor de la EQ. A mayor concentración de SO_2 y temperatura mayor EQ.

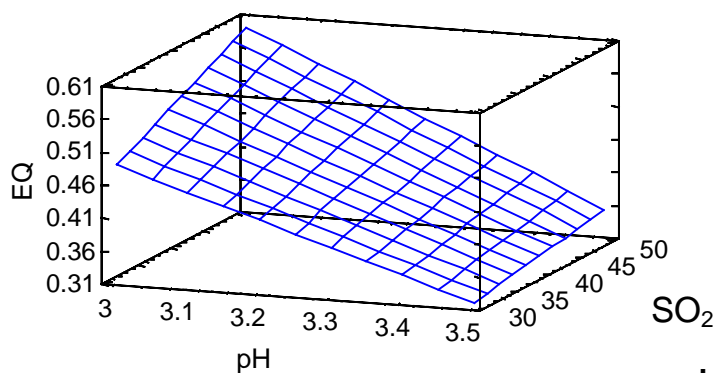
El análisis del triple efecto también dio resultados significativos ($p < 0.05$), a menor pH y mayor temperatura y mayor concentración de SO_2 el valor de EQ igualmente aumenta.

El análisis por pares de factores, usando gráficas de superficie de respuesta permitió apreciar fácilmente su influencia. En la Figura 5.36a, se observó el efecto más importante sobre la EQ, ya que sus valores tendían a un máximo mientras más descendía el pH y aumentaba la temperatura. En la Figura 5.36b, la EQ también aumentó cuando el pH fue menor y la concentración del SO_2 se incrementó. El valor de EQ aumentó ligeramente sólo cuando la temperatura y el SO_2 tenían valores elevados (Figura 5.36c).

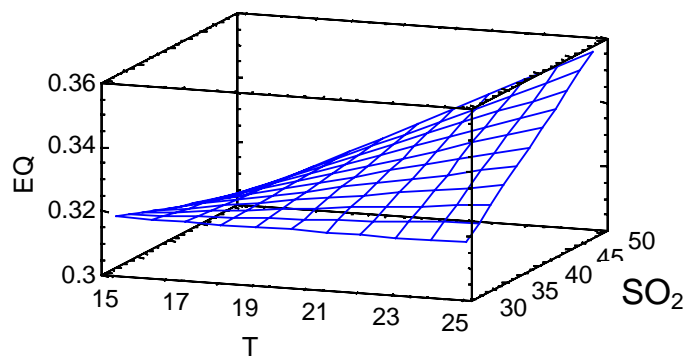
Con base en estos resultados, se deduce que el pH durante el añejamiento fue el factor que más influyó en la formación de antocianinas poliméricas, como lo informaron Dallas y Laureano (1994), en vinos tintos portugueses. La más alta proporción de formación de antocianinas poliméricas en el presente estudio se observó durante el añejamiento del tratamiento F4, a pH de 3.0.



a)



b)



c)

Figura 5.36 Superficie de respuesta de la edad química (EQ) en función se la concentración de SO_2 , temperatura y pH en vinos SFML a) $\text{SO}_2 = 50$ ppm; b) a $T = 25^\circ \text{C}$; c) a $\text{pH} = 3.5$.

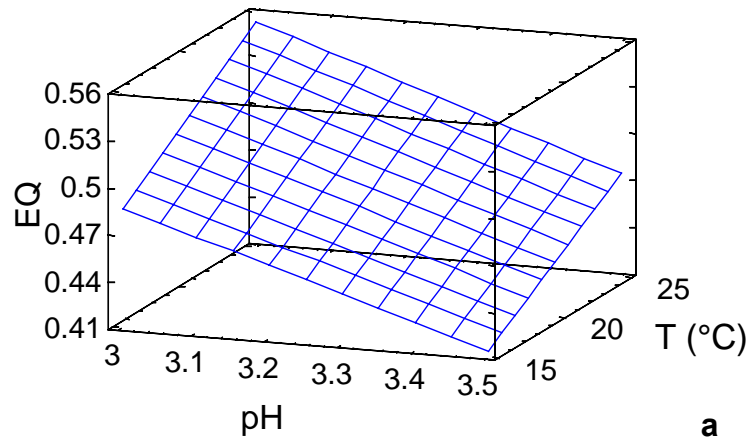
El Cuadro 5.15 muestra el ANOVA aplicado a los vinos CFML indicó que el único factor que no dio diferencias significativas fue la concentración de SO_2 ($p > 0.05$). La formación de las antocianinas poliméricas también se favoreció a pH de 3.0, como en los vinos SFML, siendo éste el factor importante en el incremento de EQ (Figura 5.37).

Cuadro 5.15
Análisis factorial 2³ ANOVA para vinos CFML

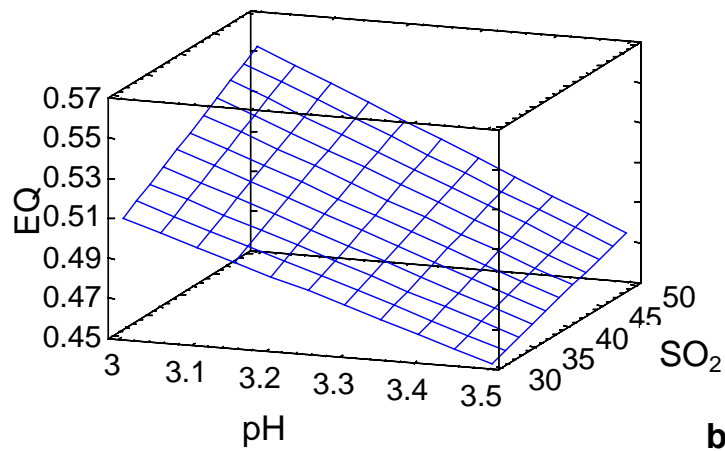
Fuente	Ss	DF	MS	F	P
pH	0.025026	1	0.025026	13138.67	0.0000
Temperatura	0.0056733	1	0.0056733	2978.52	0.0000
SO₂	1.04 x 10 ⁻⁶	1	1.04 x 10 ⁻⁶	0.55	0.4718
pHxTemp	6.33 x 10 ⁻⁵	1	6.33 x 10 ⁻⁵	33.27	0.0000
pHxSO₂	6.72 x 10 ⁻⁴	1	6.72 x 10 ⁻⁴	352.82	0.0000
TempxSO₂	6.97 x 10 ⁻³	1	6.97 x 10 ⁻³	3659.27	0.0000
pHxSO₂xTemp	1.52 x 10 ⁻³	1	1.52 x 10 ⁻³	798.02	0.0000
Bloques	5.33 x 10 ⁻⁶	2	2.66 x 10 ⁻⁶	1.40	0.2791
Error	2.66 x 10 ⁻⁵	14	1.9 x 10 ⁻⁶		

Tanto el pH como la temperatura influyeron significativamente en el EQ ($p < 0.05$). De acuerdo con Somers y Pocok (1990), la temperatura de almacenamiento es el principal factor ambiental que influye en los cambios del color en los vinos tintos durante su añejamiento.

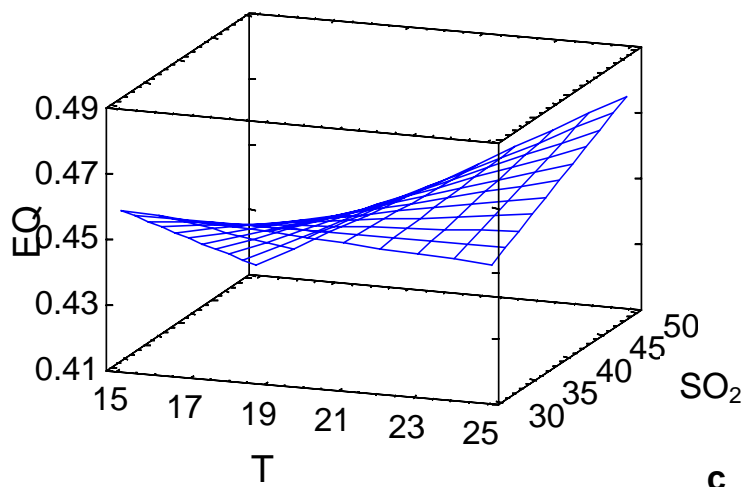
La fermentación maloláctica, parece ser un factor estabilizante de la formación de antocianinas poliméricas, ya que la diferencia entre los valores altos y bajos de los vinos CFML no fue muy grande (Cuadro L, anexo 8.2). Por ejemplo, la diferencia entre el valor más alto encontrado en el vino F12 y el más bajo en el vino F15 fue de 0.14 unidades de EQ; mientras que en los vinos SFML, la diferencia entre el vino F4 y el F7 fue más del doble (0.294).



a



b



c

Figura 5.37 Superficie de respuesta de la edad química (EQ) en función se la concentración de SO₂, temperatura y pH en vinos CFML a) a [SO₂] = 50 ppm; b) a T = 25° C; c) a pH = 3.5.

Debido a que el análisis de varianza dio como resultado una alta significancia entre las interacciones de los efectos, se decidió realizar pruebas comparativas por pares. Para verificar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes pares. Se realizó la prueba estadística de Duncan para ver cual del los 15 pares de pruebas presentaran diferencias (Montgomery, D. C. 2002). Ésta prueba permite bajar la incidencia en el error tipo II (no rechazar H_0 cuando es falsa).

Para los vinos sin fermentación maloláctica

La prueba se efectuó con un nivel de significancia del 95%. Resultando que 9 de los 15 pares de pruebas dieron diferencias significativas. Estas fueron:

pH 3 - pH 3.5
pH 3 – [SO₂] 30 ppm
pH 3 – [SO₂] 50 ppm
pH 3 – Temperatura 15°C
pH 3 – Temperatura 25°C
pH 3.5 – [SO₂] 30 ppm
pH 3.5 – [SO₂] 50 ppm
pH 3.5 – Temperatura 15°C
pH 3.5 – Temperatura 25°C

Todas coinciden en que el efecto de pH es significativo sobre el valor de la edad química para vinos no fermentados malolácticamente.

Para los vinos con fermentación maloláctica

Todas se efectuaron con un nivel de significancia del 95%. Solamente 3 de los 15 pares de pruebas dieron diferencias significativas, estas fueron:

pH 3 - pH 3.5
pH 3 – Temperatura 25°C
pH 3.5 – Temperatura 15°C

Sobre la estadística de la diferencia entre pares se puede ver que tanto para los vinos CFML como los SFML el efecto de pH queda una vez mas evidenciado.

6.0 CONCLUSIONES

- Se aislaron y caracterizaron 9 antocianinas del hollejo de la uva *Cabernet Sauvignon* usando CLAR:
 - Los 3 monoglucósidos de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina.
 - Y los derivados acilados con acético de la delphinidina y malvidina 3-monoglucósido, y los derivados del ácido cumárico de la peonidina y la malvidina 3-monoglucósido.
 - El único glucósido encontrado en las 9m antocianinas fue la glucosa.
- El color de los vinos (CV) SFML o CFML, se ve influenciado significativamente por efecto de pH. Los otros dos parámetros; Temperatura y concentración de SO₂, no influyeron significativamente en el color.
- En el cambio de la densidad del color (DC), de los vinos SFML y CFML. Ninguno de los 3 parámetros fueron significativos.
- El tinte de los vinos (TV) SFML y CFML se vio influenciado significativamente por efecto de pH. Los otros dos parámetros; Temperatura y concentración de SO₂ no influyeron en el tinte.
- En la formación de los pigmentos poliméricos (CPP) en el vino. La influencia de la FML fue significativa.
- Existe un comportamiento casi lineal entre edad química (EQ) y el tiempo de añejamiento. Permitiendo un control de calidad en la producción de vinos añejados.
- De los tres efectos estudiados de manera independiente, únicamente el pH influyó significativamente en la EQ de los vinos SFML y CFML.
- Para los vinos SFML, el efecto del pH fue significativo
- La prueba de Duncan para vinos SFML dio diferencia significativa para 9 pares de pruebas en donde el efecto de pH es el factor común en cada una de ellas.

- En cambio para los vinos CFML, la prueba, de Duncan, sólo dieron 3 pares con diferencia significativa (pH 3.0 – pH 3.5; pH 3.0 – Temperatura 25°C y pH 3.5 – Temperatura 15° C y nuevamente el pH esta presente en cada una de ellas.
- La fermentación maloláctica afectó significativamente el color del vino (CV).

Al ser el vino tinto es un sistema muy complejo los factores que pueden influir en su calidad son múltiples. El control de algunas variables, como las propuestas en este trabajo, podrían ayudar a obtener vinos de la uva *Cabernet Sauvignon* de buena calidad en cuanto a su color.

8. ANEXOS

8.1 Abreviaturas

SFML	Para los vinos no fermentados malolácticamente
CFML	Para los vinos si fermentados malolácticamente
SO₂	Para el ión bisulfito y las diferentes formas en que éste se encuentra en el vino
CV	Color del vino
DC	Densidad del vino
TV	Tinte del vino
CPP	Color de pigmentos poliméricos
CAM	Color de antocianinas monoméricas
EQ	Edad química del vino

**8.2 Tablas de los valores experimentales
obtenidos y sus Intervalos de confianza
con nivel del 95%**

Cuadro A								
COLOR DEL VINO (CV, Absorbancia $\lambda_{\text{máx}}$ 520 nm)								
DATOS SIN FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
TIEMPO (días)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
4	1.420±0.001	1.350±0.001	1.310±0.000	1.369±0.000	1.380±0.000	1.310±0.001	1.270±0.001	1.250±0.000
15	1.390±0.001	1.120±0.000	1.280±0.001	1.360±0.000	1.340±0.001	1.290±0.006	1.220±0.005	1.210±0.002
68	0.980±0.008	0.920±0.001	1.180±0.003	1.180±0.000	1.210±0.000	1.190±0.004	1.170±0.002	1.200±0.001
89	0.910±0.000	0.840±0.004	1.100±0.005	1.170±0.001	1.180±0.001	1.130±0.002	1.100±0.000	1.200±0.004
134	0.800±0.006	0.780±0.002	0.910±0.000	0.980±0.008	1.090±0.002	0.980±0.001	0.890±0.005	0.870±0.006
151	0.770±0.004	0.770±0.002	0.900±0.001	0.890±0.004	0.970±0.001	0.930±0.000	0.870±0.000	0.820±0.002
192	0.760±0.004	0.710±0.001	0.820±0.004	0.780±0.002	0.880±0.000	0.810±0.000	0.790±0.008	0.780±0.001
220	0.710±0.004	0.650±0.000	0.710±0.000	0.690±0.000	0.804±0.018	0.750±0.001	0.710±0.004	0.670±0.004
250	0.600±0.001	0.590±0.000	0.650±0.001	0.630±0.001	0.730±0.001	0.630±0.008	0.650±0.009	0.600±0.001
280	0.510±0.001	0.560±0.007	0.580±0.001	0.520±0.011	0.620±0.002	0.580±0.001	0.590±0.004	0.510±0.008
295	0.510±0.019	0.560±0.004	0.460±0.021	0.500±0.001	0.610±0.000	0.530±0.000	0.500±0.001	0.450±0.009
325	0.450±0.009	0.470±0.001	0.390±0.002	0.450±0.000	0.570±0.008	0.430±0.001	0.460±0.006	0.409±0.001
365	0.420±0.000	0.380±0.002	0.340±0.005	0.410±0.006	0.440±0.004	0.390±0.002	0.451±0.003	0.400±0.012
396	0.407±0.004	0.369±0.10	0.330±0.000	0.384±0.003	0.431±0.000	0.385±0.004	0.446±0.006	0.331±0.001
426	0.394±0.008	0.348±0.008	0.325±0.008	0.365±0.000	0.423±0.004	0.800±0.008	0.438±0.009	0.312±0.002
457	0.387±0.016	0.321±0.004	0.311±0.004	0.352±0.001	0.418±0.001	0.740±0.010	0.427±0.001	0.279±0.004
488	0.365±0.002	0.319±0.001	0.296±0.002	0.336±0.001	0.411±0.002	0.371±0.008	0.412±0.000	0.284±0.008
518	0.358±0.005	0.317±0.002	0.291±0.000	0.324±0.002	0.404±0.001	0.367±0.002	0.403±0.001	0.300±0.009
549	0.352±0.001	0.316±0.003	0.289±0.019	0.310±0.008	0.392±0.000	0.361±0.001	0.392±0.010	0.304±0.002

Cuadro B								
DENSIDAD DEL COLOR (DC)								
DATOS SIN FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
TIEMPO (días)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
4	1.996±0.001	1.930±0.000	1.906±0.001	1.941±0.000	1.944±0.002	1.899±0.001	1.854±0.001	1.807±0.000
15	1.9770±0.00	1.691±0.000	1.893±0.002	1.943±0.008	1.916±0.001	1.882±0.004	1.805±0.004	1.779±0.001
68	1.564±0.000	1.488±0.001	1.772±0.001	1.764±0.002	1.779±0.004	1.760±0.002	1.752±0.002	1.784±0.003
89	1.491±0.001	1.431±0.008	1.668±0.004	1.740±0.001	1.746±0.006	1.701±0.001	1.688±0.004	1.785±0.001
134	1.357±0.004	1.354±0.001	1.456±0.006	1.544±0.004	1.648±0.001	1.525±0.000	1.436±0.001	1.429±0.003
151	1.340±0.008	1.343±0.000	1.459±0.001	1.443±0.008	1.541±0.009	1.502±0.002	1.427±0.004	1.393±0.008
192	1.370±0.001	1.313±0.002	1.385±0.000	1.346±0.004	1.442±0.000	1.389±0.006	1.369±0.003	1.344±0.006
220	1.287±0.002	1.233±0.000	1.275±0.001	1.263±0.002	1.366±0.001	1.311±0.001	1.307±0.008	1.243±0.004
250	1.212±0.001	1.199±0.002	1.271±0.000	1.228±0.004	1.341±0.002	1.229±0.008	1.279±0.009	1.205±0.008
280	1.165±0.000	1.192±0.001	1.221±0.001	1.138±0.001	1.277±0.003	1.218±0.009	1.238±0.000	1.149±0.001
295	1.153±0.001	1.186±0.000	1.109±0.006	1.125±0.000	1.260±0.004	1.175±0.010	1.161±0.004	1.102±0.009
325	1.048±0.008	1.096±0.001	0.978±0.008	1.070±0.001	1.156±0.001	1.065±0.001	1.060±0.004	1.049±0.001
365	1.010±0.001	1.010±0.008	0.923±0.001	1.040±0.004	1.019±0.006	1.020±0.002	0.972±0.002	0.960±0.003
396	1.027±0.000	0.997±0.004	0.913±0.000	1.026±0.001	1.016±0.000	0.970±0.008	1.048±0.008	1.040±0.002
426	1.009±0.001	0.989±0.001	0.928±0.000	1.015±0.009	1.026±0.001	0.983±0.003	1.056±0.001	1.040±0.003
457	1.032±0.001	0.978±0.003	0.928±0.001	1.019±0.003	1.050±0.002	1.006±0.009	1.056±0.009	1.042±0.002
488	1.079±0.001	0.985±0.002	0.950±0.002	1.017±0.001	1.062±0.001	1.022±0.001	1.052±0.002	1.043±0.000
518	1.105±0.010	1.001±0.003	0.980±0.004	1.012±0.000	1.072±0.006	1.035±0.000	1.070±0.001	1.045±0.001
549	1.108±0.002	1.018±0.008	1.027±0.002	1.002±0.001	1.083±0.000	1.052±0.001	1.077±0.004	1.046±0.000

Cuadro C								
TINTE DEL VINO (TV)								
DATOS SIN FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
TIEMPO (días)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
4	0.406±0.001	0.430±0.002	0.455±0.002	0.418±0.002	0.409±0.001	0.450±0.000	0.460±0.002	0.446±0.001
15	0.422±0.002	0.510±0.001	0.479±0.001	0.429±0.004	0.430±0.000	0.459±0.001	0.480±0.004	0.470±0.000
68	0.596±0.001	0.617±0.003	0.502±0.002	0.495±0.004	0.470±0.003	0.479±0.001	0.497±0.002	0.487±0.002
89	0.638±0.004	0.704±0.001	0.516±0.001	0.487±0.003	0.480±0.005	0.505±0.004	0.535±0.001	0.488±0.001
134	0.696±0.008	0.736±0.005	0.600±0.004	0.576±0.004	0.512±0.002	0.556±0.001	0.613±0.000	0.643±0.008
151	0.740±0.000	0.744±0.008	0.621±0.006	0.621±0.002	0.589±0.001	0.615±0.002	0.640±0.002	0.699±0.005
192	0.803±0.001	0.849±0.000	0.689±0.008	0.726±0.000	0.639±0.001	0.715±0.000	0.733±0.008	0.723±0.001
220	0.813±0.003	0.897±0.003	0.796±0.003	0.830±0.002	0.699±0.000	0.748±0.001	0.841±0.008	0.855±0.002
250	1.020±0.004	1.032±0.006	0.955±0.001	0.949±0.002	0.837±0.002	0.951±0.001	0.968±0.002	1.008±0.001
280	1.284±0.001	1.129±0.003	1.105±0.000	1.188±0.003	1.060±0.005	1.100±0.001	1.098±0.002	1.253±0.001
295	1.261±0.006	1.118±0.001	1.411±0.000	1.250±0.001	1.066±0.006	1.217±0.002	1.322±0.003	1.449±0.000
325	1.329±0.001	1.332±0.002	1.508±0.001	1.378±0.001	1.028±0.001	1.477±0.004	1.304±0.001	1.565±0.002
365	1.405±0.008	1.658±0.001	1.715±0.002	1.537±0.004	1.316±0.001	1.615±0.002	1.627±0.001	2.097±0.006
396	1.523±0.010	1.702±0.000	1.767±0.008	1.672±0.002	1.357±0.002	1.519±0.001	1.350±0.008	1.653±0.002
426	1.561±0.004	1.842±0.000	1.855±0.009	1.781±0.009	1.426±0.001	1.587±0.004	1.411±0.002	1.701±0.002
457	1.667±0.006	2.047±0.001	1.984±0.001	1.895±0.006	1.512±0.000	1.690±0.003	1.473±0.006	1.809±0.001
488	1.956±0.003	2.088±0.001	2.209±0.12	2.027±0.003	1.584±0.017	1.755±0.009	1.553±0.004	1.873±0.001
518	2.087±0.007	2.158±0.002	2.368±0.16	2.123±0.001	1.653±0.011	1.820±0.010	1.655±0.001	1.895±0.002
549	2.148±0.002	2.222±0.008	2.554±0.001	2.232±0.001	1.763±0.002	1.914±0.000	1.747±0.014	1.922±0.006

Cuadro D								
COLOR DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS (CAM)								
DATOS SIN FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
TIEMPO (días)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
4	1.416±0.001	1.340±0.002	1.302±0.001	1.356±0.007	1.360±0.001	1.289±0.002	1.252±0.003	1.235±0.002
15	1.384±0.000	1.101±0.001	1.266±0.001	1.338±0.000	1.300±0.002	1.247±0.002	1.186±0.001	1.177±0.001
68	0.967±0.002	0.885±0.000	1.156±0.001	1.151±0.004	1.162±0.004	1.132±0.003	1.126±0.001	1.150±0.006
89	0.844±0.002	0.790±0.002	1.057±0.006	1.076±0.001	1.123±0.004	1.064±0.001	1.042±0.002	1.128±0.002
134	0.713±0.004	0.710±0.001	0.836±0.002	0.853±0.001	1.025±0.001	0.920±0.001	0.835±0.002	0.806±0.001
151	0.669±0.001	0.653±0.008	0.792±0.001	0.757±0.000	0.900±0.001	0.848±0.000	0.808±0.001	0.740±0.002
192	0.638±0.002	0.582±0.008	0.705±0.000	0.624±0.001	0.809±0.000	0.722±0.002	0.711±0.002	0.683±0.002
220	0.582±0.003	0.527±0.008	0.582±0.001	0.531±0.001	0.723±0.008	0.660±0.001	0.621±0.003	0.576±0.004
250	0.472±0.005	0.466±0.004	0.520±0.004	0.466±0.002	0.650±0.004	0.543±0.002	0.559±0.008	0.506±0.002
280	0.380±0.000	0.436±0.002	0.442±0.002	0.349±0.006	0.546±0.002	0.496±0.003	0.501±0.006	0.423±0.001
295	0.375±0.001	0.434±0.002	0.317±0.000	0.321±0.008	0.522±0.000	0.443±0.006	0.419±0.002	0.369±0.000
325	0.311±0.002	0.339±0.000	0.241±0.001	0.267±0.008	0.481±0.001	0.356±0.004	0.378±0.004	0.320±0.001
365	0.275±0.001	0.241±0.001	0.186±0.001	0.222±0.004	0.370±0.001	0.320±0.006	0.300±0.001	0.242±0.002
396	0.254±0.002	0.227±0.002	0.179±0.002	0.220±0.001	0.339±0.006	0.300±0.008	0.361±0.001	0.251±0.003
426	0.233±0.001	0.203±0.008	0.170±0.003	0.196±0.000	0.323±0.004	0.282±0.009	0.345±0.002	0.240±0.004
457	0.218±0.001	0.175±0.004	0.153±0.006	0.179±0.001	0.302±0.004	0.268±0.008	0.318±0.004	0.233±0.004
488	0.193±0.002	0.171±0.006	0.136±0.18	0.158±0.004	0.292±0.006	0.260±0.004	0.298±0.006	0.233±0.006
518	0.178±0.004	0.169±0.003	0.129±0.012	0.143±0.002	0.283±0.008	0.254±0.002	0.284±0.001	0.240±0.006
549	0.169±0.008	0.162±0.009	0.124±0.008	0.125±0.001	0.268±0.014	0.246±0.004	0.272±0.012	0.250±0.009

Cuadro E								
COLOR DE PIGMENTOS POLIMÉRICOS (CPP)								
DATOS SIN FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
TIEMPO (días)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
4	0.004±0.002	0.010±0.001	0.008±0.000	0.013±0.000	0.02±0.001	0.021±0.001	0.018±0.000	0.015±0.001
15	0.006±0.001	0.019±0.001	0.014±0.001	0.022±0.001	0.040±0.002	0.043±0.003	0.034±0.001	0.033±0.000
68	0.013±0.002	0.035±0.002	0.024±0.009	0.030±0.000	0.048±0.006	0.058±0.001	0.044±0.001	0.050±0.001
89	0.066±0.001	0.050±0.001	0.043±0.001	0.094±0.000	0.057±0.004	0.066±0.000	0.058±0.000	0.072±0.001
134	0.087±0.003	0.070±0.003	0.074±0.004	0.117±0.002	0.065±0.000	0.060±0.000	0.055±0.001	0.064±0.000
151	0.101±0.004	0.117±0.008	0.108±0.002	0.123±0.002	0.070±0.000	0.082±0.001	0.062±0.002	0.080±0.002
192	0.122±0.009	0.128±0.006	0.115±0.001	0.129±0.001	0.071±0.001	0.088±0.002	0.079±0.004	0.098±0.002
220	0.128±0.008	0.124±0.002	0.128±0.001	0.135±0.000	0.081±0.009	0.090±0.008	0.089±0.004	0.094±0.004
250	0.128±0.006	0.124±0.001	0.130±0.004	0.141±0.001	0.080±0.006	0.087±0.006	0.091±0.006	0.094±0.004
280	0.130±0.002	0.124±0.000	0.138±0.002	0.148±0.000	0.074±0.007	0.084±0.003	0.089±0.001	0.087±0.007
295	0.135±0.001	0.126±0.000	0.143±0.000	0.152±0.004	0.088±0.001	0.087±0.001	0.081±0.002	0.081±0.001
325	0.139±0.000	0.131±0.001	0.149±0.000	0.155±0.006	0.089±0.005	0.074±0.000	0.082±0.002	0.089±0.002
365	0.145±0.013	0.139±0.002	0.154±0.001	0.160±0.006	0.070±0.002	0.070±0.004	0.086±0.001	0.088±0.004
396	0.153±0.004	0.142±0.004	0.151±0.000	0.164±0.003	0.092±0.000	0.085±0.002	0.085±0.008	0.091±0.002
426	0.161±0.012	0.145±0.004	0.155±0.001	0.169±0.002	0.100±0.001	0.098±0.003	0.093±0.001	0.089±0.004
457	0.169±0.004	0.146±0.002	0.158±0.002	0.173±0.002	0.116±0.004	0.106±0.008	0.109±0.004	0.095±0.006
488	0.172±0.001	0.148±0.001	0.160±0.006	0.178±0.001	0.119±0.006	0.111±0.005	0.114±0.004	0.099±0.004
518	0.180±0.006	0.148±0.008	0.162±0.008	0.181±0.002	0.121±0.008	0.113±0.008	0.119±0.001	0.106±0.006
549	0.183±0.003	0.154±0.014	0.165±0.010	0.185±0.003	0.124±0.008	0.115±0.011	0.120±0.001	0.108±0.008

Cuadro F								
EDAD QUÍMICA (EQ)								
DATOS SIN FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
TIEMPO (días)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
4	0.003±0.000	0.007±0.004	0.006±0.001	0.009±0.000	0.014±0.001	0.016±0.001	0.014±0.000	0.012±0.000
15	0.004±0.001	0.017±0.004	0.011±0.001	0.016±0.006	0.030±0.006	0.033±0.006	0.028±0.004	0.027±0.005
68	0.013±0.005	0.038±0.002	0.020±0.002	0.025±0.000	0.040±0.007	0.049±0.000	0.038±0.007	0.042±0.002
89	0.073±0.005	0.060±0.001	0.039±0.001	0.080±0.001	0.048±0.001	0.058±0.007	0.053±0.011	0.060±0.007
134	0.109±0.021	0.090±0.001	0.081±0.001	0.119±0.001	0.060±0.000	0.061±0.001	0.062±0.001	0.073±0.001
151	0.131±0.002	0.152±0.001	0.120±0.000	0.138±0.001	0.072±0.005	0.088±0.006	0.071±0.001	0.098±0.002
192	0.160±0.005	0.180±0.000	0.140±0.005	0.165±0.007	0.081±0.007	0.109±0.006	0.100±0.002	0.125±0.004
220	0.180±0.016	0.190±0.005	0.180±0.001	0.196±0.001	0.101±0.004	0.120±0.001	0.125±0.006	0.140±0.009
250	0.213±0.000	0.210±0.003	0.200±0.001	0.224±0.005	0.110±0.001	0.138±0.006	0.140±0.004	0.156±0.004
280	0.255±0.008	0.222±0.005	0.238±0.004	0.285±0.002	0.120±0.005	0.145±0.000	0.151±0.001	0.170±0.000
295	0.265±0.013	0.225±0.001	0.311±0.001	0.304±0.000	0.145±0.001	0.165±0.000	0.162±0.006	0.181±0.006
325	0.309±0.004	0.279±0.001	0.382±0.005	0.344±0.004	0.156±0.004	0.173±0.005	0.178±0.001	0.217±0.009
365	0.345±0.012	0.366±0.000	0.453±0.004	0.390±0.001	0.160±0.001	0.180±0.007	0.190±0.018	0.220±0.004
396	0.376±0.009	0.385±0.001	0.458±0.001	0.427±0.004	0.213±0.000	0.221±0.001	0.191±0.005	0.275±0.008
426	0.409±0.004	0.417±0.002	0.477±0.005	0.463±0.007	0.236±0.004	0.258±0.005	0.212±0.001	0.285±0.001
457	0.437±0.001	0.455±0.001	0.508±0.000	0.491±0.001	0.278±0.001	0.283±0.001	0.255±0.019	0.340±0.004
488	0.471±0.006	0.464±0.005	0.541±0.002	0.530±0.004	0.290±0.008	0.299±0.001	0.277±0.000	0.348±0.000
518	0.503±0.003	0.467±0.001	0.557±0.004	0.559±0.006	0.300±0.001	0.308±0.017	0.295±0.002	0.350±0.005
549	0.520±0.00	0.487±0.000	0.571±0.001	0.597±0.002	0.316±0.001	0.319±0.000	0.306±0.004	0.355±0.003
R ²	0.9952	0.9811	0.9706	0.9927	0.9591	0.9789	0.9849	0.9842

Cuadro G								
COLOR DEL VINO (CV)								
DATOS CON FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
TIEMPO (días)	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
4	1.390±0.002	1.310±0.001	1.230±0.001	1.240±0.002	1.360±0.008	1.280±0.004	1.290±0.004	1.210±0.002
14	1.150±0.001	1.120±0.000	0.980±0.004	1.040±0.004	1.220±0.008	1.100±0.002	0.930±0.004	1.050±0.006
29	1.050±0.004	0.990±0.004	0.940±0.006	0.900±0.001	1.060±0.004	0.950±0.002	0.890±0.001	0.820±0.006
45	1.000±0.004	0.920±0.001	0.880±0.002	0.890±0.002	0.990±0.002	0.900±0.001	0.820±0.003	0.780±0.001
72	0.880±0.002	0.850±0.008	0.810±0.00	0.800±0.001	0.870±0.000	0.840±0.006	0.780±0.001	0.730±0.001
90	0.880±0.008	0.840±0.006	0.801±0.00	0.780±0.000	0.860±0.001	0.830±0.002	0.780±0.002	0.700±0.003
120	0.860±0.002	0.810±0.000	0.790±0.00	0.780±0.006	0.840±0.001	0.800±0.005	0.780±0.000	0.680±0.004
150	0.850±0.001	0.800±0.001	0.770±0.00	0.750±0.006	0.810±0.002	0.780±0.000	0.770±0.000	0.650±0.001
192	0.789±0.001	0.751±0.002	0.743±0.00	0.725±0.005	0.795±0.002	0.760±0.000	0.760±0.008	0.625±0.002
220	0.756±0.001	0.721±0.001	0.722±0.000	0.703±0.002	0.780±0.006	0.719±0.002	0.742±0.006	0.599±0.009
250	0.723±0.003	0.691±0.002	0.687±0.002	0.686±0.001	0.755±0.008	0.687±0.001	0.652±0.004	0.573±0.000
280	0.711±0.002	0.661±0.004	0.671±0.002	0.642±0.000	0.743±0.002	0.643±0.005	0.612±0.006	0.547±0.000
295	0.657±0.001	0.631±0.004	0.662±0.004	0.629±0.006	0.715±0.001	0.611±0.004	0.586±0.002	0.521±0.008
325	0.624±0.000	0.601±0.002	0.653±0.001	0.615±0.008	0.695±0.001	0.589±0.006	0.566±0.004	0.502±0.002
365	0.594±0.007	0.571±0.001	0.589±0.006	0.586±0.009	0.672±0.003	0.572±0.008	0.521±0.002	0.496±0.001
396	0.650±0.008	0.541±0.001	0.542±0.008	0.523±0.001	0.655±0.001	0.555±0.002	0.508±0.004	0.487±0.002
426	0.526±0.009	0.511±0.002	0.539±0.005	0.478±0.003	0.631±0.001	0.532±0.001	0.491±0.001	0.480±0.004
457	0.499±0.006	0.481±0.010	0.516±0.001	0.436±0.002	0.613±0.004	0.516±0.004	0.487±0.002	0.474±0.004
488	0.461±0.006	0.451±0.006	0.478±0.001	0.404±0.001	0.588±0.002	0.485±0.002	0.481±0.008	0.468±0.001
518	0.427±0.004	0.421±0.008	0.413±0.002	0.359±0.001	0.532±0.001	0.422±0.001	0.479±0.009	0.458±0.002
549	0.394±0.002	0.361±0.008	0.372±0.006	0.322±0.006	0.429±0.004	0.399±0.00	0.479±0.004	0.451±0.008

CUADRO H								
DENSIDAD DEL COLOR (DC)								
DATOS CON FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
TIEMPO (días)	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
4	2.026±0.006	1.952±0.012	1.877±0.006	1.878±0.004	2.005±0.002	1.287±0.001	1.935±0.001	1.859±0.002
9	2.028±0.008	1.957±0.010	1.776±0.004	1.747±0.004	1.950±0.004	1.839±0.002	1.802±0.001	1.781±0.002
14	1.804±0.012	1.776±0.008	1.635±0.004	1.689±0.004	1.876±0.002	1.755±0.002	1.574±0.001	1.696±0.004
29	1.713±0.006	1.638±0.008	1.590±0.003	1.557±0.010	1.715±0.002	1.592±0.002	1.534±0.002	1.478±0.003
45	1.651±0.004	1.577±0.004	1.539±0.002	1.549±0.001	1.644±0.002	1.561±0.004	1.487±0.002	1.430±0.001
55	1.575±0.004	1.562±0.004	1.518±0.008	1.469±0.012	1.568±0.001	1.553±0.004	1.477±0.009	1.411±0.006
72	1.538±0.002	1.509±0.001	1.464±0.006	1.451±0.008	1.520±0.004	1.497±0.001	1.442±0.008	1.393±0.004
90	1.537±0.008	1.497±0.004	1.453±0.006	1.417±0.006	1.522±0.006	1.494±0.001	1.432±0.002	1.350±0.004
120	1.529±0.008	1.455±0.008	1.459±0.008	1.440±0.006	1.470±0.008	1.467±0.002	1.440±0.009	1.299±0.006
150	1.522±0.009	1.452±0.012	1.438±0.004	1.419±0.004	1.466±0.002	1.441±0.002	1.400±0.008	1.265±0.002
192	1.464±0.002	1.409±0.002	1.418±0.004	1.389±0.005	1.453±0.004	1.428±0.004	1.401±0.006	1.247±0.002
220	1.435±0.001	1.383±0.006	1.403±0.002	1.370±0.003	1.440±0.004	1.391±0.008	1.394±0.004	1.234±0.002
250	1.406±0.000	1.360±0.008	1.374±0.002	1.356±0.006	1.413±0.006	1.362±0.002	1.311±0.004	1.218±0.004
280	1.398±0.004	1.335±0.007	1.364±0.001	1.315±0.008	1.405±0.002	1.322±0.006	1.276±0.001	1.196±0.004
295	1.349±0.007	1.311±0.002	1.361±0.000	1.305±0.004	1.384±0.002	1.290±0.004	1.259±0.002	1.174±0.002
325	1.320±0.014	1.286±0.002	1.358±0.002	1.293±0.001	1.362±0.001	1.271±0.002	1.249±0.001	1.160±0.001
365	1.294±0.009	1.262±0.000	1.300±0.004	1.267±0.002	1.343±0.004	1.256±0.004	1.210±0.002	1.161±0.009
396	1.354±0.005	1.237±0.001	1.251±0.002	1.207±0.002	1.329±0.006	1.236±0.006	1.183±0.004	1.147±0.008
426	1.234±0.004	1.213±0.001	1.245±0.006	1.165±0.004	1.307±0.004	1.217±0.006	1.179±0.004	1.155±0.006
457	1.211±0.006	1.188±0.004	1.218±0.006	1.129±0.006	1.292±0.002	1.205±0.004	1.180±0.006	1.153±0.004
488	1.178±0.008	1.164±0.002	1.183±0.004	1.113±0.006	1.269±0.002	1.173±0.006	1.183±0.006	1.149±0.004
518	1.142±0.008	1.139±0.002	1.118±0.004	1.083±0.002	1.216±0.001	1.109±0.006	1.189±0.008	1.142±0.006
549	1.110±0.002	1.102±0.001	1.076±0.004	1.059±0.004	1.124±0.001	1.087±0.004	1.188±0.008	1.136±0.006

Cuadro I								
TINTE DEL VINO (TV)								
DATOS CON FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
TIEMPO (días)	F91	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
4	0.458±0.004	0.490±0.000	0.526±0.002	0.515±0.001	0.474±0.001	1.005±0.002	0.500±0.001	0.536±0.001
14	0.569±0.004	0.586±0.002	0.668±0.008	0.624±0.004	0.538±0.001	0.595±0.002	0.692±0.002	0.615±0.004
29	0.631±0.004	0.655±0.002	0.691±0.008	0.730±0.004	0.618±0.004	0.676±0.002	0.724±0.002	0.802±0.002
45	0.651±0.008	0.714±0.008	0.749±0.006	0.740±0.005	0.661±0.006	0.734±0.002	0.813±0.002	0.833±0.004
72	0.748±0.002	0.775±0.006	0.807±0.004	0.814±0.001	0.747±0.002	0.782±0.002	0.849±0.006	0.908±0.002
90	0.747±0.002	0.782±0.002	0.814±0.004	0.817±0.002	0.770±0.002	0.800±0.002	0.836±0.006	0.929±0.002
120	0.778±0.001	0.796±0.002	0.847±0.002	0.846±0.002	0.750±0.002	0.834±0.001	0.846±0.006	0.910±0.004
150	0.791±0.004	0.815±0.004	0.868±0.001	0.892±0.004	0.810±0.004	0.847±0.006	0.818±0.008	0.946±0.006
192	0.856±0.004	0.876±0.004	0.909±0.014	0.916±0.004	0.828±0.004	0.879±0.004	0.843±0.004	0.995±0.004
220	0.899±0.006	0.918±0.004	0.944±0.009	0.949±0.004	0.846±0.004	0.935±0.001	0.879±0.004	1.060±0.006
250	0.945±0.006	0.968±0.001	1.000±0.001	0.976±0.002	0.872±0.004	0.983±0.001	1.011±0.001	1.126±0.009
280	0.967±0.006	1.019±0.001	1.033±0.002	1.048±0.002	0.891±0.001	1.056±0.002	1.085±0.001	1.186±0.001
295	1.052±0.012	1.076±0.001	1.056±0.001	1.074±0.001	0.936±0.012	1.111±0.002	1.148±0.004	1.253±0.002
325	1.115±0.010	1.139±0.002	1.080±0.002	1.10±0.0031	0.960±0.006	1.158±0.002	1.207±0.002	1.311±0.010
365	1.178±0.004	1.208±0.002	1.207±0.004	1.163±0.006	0.999±0.006	1.196±0.001	1.322±0.002	1.341±0.004
396	1.083±0.006	1.285±0.000	1.308±0.004	1.308±0.004	1.028±0.000	1.227±0.002	1.329±0.006	1.355±0.002
426	1.347±0.004	1.372±0.004	1.310±0.004	1.437±0.004	1.071±0.001	1.288±0.002	1.401±0.002	1.406±0.004
457	1.428±0.004	1.469±0.001	1.360±0.003	1.589±0.004	1.107±0.004	1.335±0.004	1.423±0.004	1.432±0.008
488	1.555±0.006	1.578±0.002	1.475±0.004	1.755±0.004	1.158±0.002	1.419±0.004	1.459±0.004	1.455±0.006
518	1.674±0.006	1.704±0.004	1.707±0.005	2.017±0.002	1.285±0.002	1.628±0.002	1.482±0.004	1.493±0.006
549	1.816±0.006	2.053±0.004	1.892±0.008	2.289±0.002	1.620±0.002	1.724±0.004	1.480±0.004	1.519±0.006

Cuadro J								
COLOR DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS (CAM)								
DATOS CON FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
TIEMPO (días)	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
4	1.384±0.004	1.300±0.006	1.280±0.004	1.231±0.002	1.355±0.010	0.636±0.002	1.241±0.001	1.203±0.001
9	1.236±0.006	1.187±0.001	1.100±0.002	1.076±0.006	1.300±0.010	1.178±0.002	1.140±0.002	1.111±0.001
14	1.129±0.006	1.096±0.001	0.957±0.004	1.022±0.004	1.205±0.006	1.088±0.004	0.918±0.004	1.031±0.001
29	1.013±0.002	0.950±0.002	0.903±0.002	0.870±0.006	1.043±0.006	0.931±0.008	0.872±0.006	0.802±0.003
45	0.958±0.003	0.866±0.008	0.830±0.006	0.850±0.008	0.964±0.006	0.875±0.012	0.800±0.006	0.751±0.001
55	0.869±0.004	0.832±0.006	0.798±0.004	0.757±0.010	0.873±0.001	0.849±0.009	0.792±0.002	0.722±0.008
72	0.814±0.002	0.777±0.006	0.745±0.004	0.731±0.010	0.835±0.001	0.803±0.008	0.748±0.002	0.690±0.002
90	0.805±0.004	0.743±0.006	0.722±0.006	0.700±0.000	0.815±0.001	0.784±0.008	0.746±0.001	0.659±0.002
120	0.761±0.004	0.697±0.004	0.686±0.006	0.675±0.001	0.785±0.004	0.744±0.006	0.732±0.001	0.628±0.002
150	0.738±0.002	0.664±0.002	0.657±0.000	0.641±0.002	0.745±0.002	0.714±0.003	0.711±0.001	0.592±0.002
192	0.664±0.002	0.612±0.004	0.624±0.001	0.610±0.002	0.719±0.002	0.679±0.001	0.681±0.001	0.551±0.001
220	0.617±0.001	0.576±0.004	0.600±0.001	0.581±0.004	0.692±0.008	0.634±0.000	0.649±0.001	0.514±0.002
250	0.570±0.001	0.540±0.002	0.558±0.001	0.557±0.004	0.662±0.008	0.588±0.002	0.523±0.002	0.475±0.001
280	0.543±0.002	0.503±0.006	0.533±0.001	0.509±0.004	0.636±0.001	0.538±0.001	0.473±0.000	0.431±0.001
295	0.483±0.001	0.469±0.004	0.517±0.001	0.491±0.002	0.597±0.002	0.497±0.002	0.442±0.000	0.396±0.001
325	0.443±0.000	0.434±0.001	0.501±0.002	0.468±0.004	0.576±0.004	0.465±0.002	0.398±0.002	0.363±0.000
365	0.409±0.001	0.401±0.002	0.430±0.002	0.435±0.001	0.537±0.002	0.433±0.002	0.330±0.001	0.344±0.001
396	0.461±0.002	0.368±0.001	0.380±0.001	0.367±0.002	0.505±0.004	0.407±0.004	0.299±0.000	0.318±0.001
426	0.333±0.002	0.335±0.002	0.371±0.001	0.318±0.001	0.472±0.001	0.369±0.002	0.272±0.001	0.303±0.004
457	0.301±0.001	0.304±0.001	0.346±0.001	0.269±0.002	0.445±0.001	0.341±0.001	0.260±0.001	0.285±0.002
488	0.260±0.001	0.272±0.001	0.306±0.002	0.232±0.000	0.408±0.001	0.299±0.001	0.248±0.002	0.272±0.003
518	0.222±0.001	0.241±0.001	0.238±0.002	0.180±0.000	0.337±0.001	0.228±0.001	0.232±0.002	0.252±0.004
549	0.190±0.000	0.180±0.001	0.194±0.002	0.141±0.000	0.203±0.001	0.167±0.002	0.232±0.004	0.240±0.004

CUADRO K								
COLOR DE LOS PIGMENTOS POLIMÉRICOS (CPP)								
DATOS CON FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
TIEMPO (días)	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
4	0.006±0.001	0.010±0.000	0.012±0.000	0.009±0.001	0.005±0.000	0.006±0.000	0.005±0.000	0.007±0.000
9	0.014±0.001	0.023±0.001	0.020±0.000	0.014±0.001	0.010±0.000	0.012±0.000	0.010±0.001	0.012±0.000
14	0.021±0.001	0.024±0.001	0.023±0.001	0.018±0.001	0.015±0.002	0.012±0.000	0.012±0.001	0.019±0.000
29	0.037±0.001	0.040±0.002	0.037±0.002	0.030±0.000	0.017±0.004	0.019±0.000	0.018±0.001	0.018±0.000
45	0.042±0.001	0.054±0.002	0.050±0.003	0.040±0.000	0.026±0.002	0.025±0.000	0.020±0.002	0.029±0.000
55	0.051±0.001	0.058±0.002	0.052±0.004	0.053±0.000	0.027±0.002	0.031±0.001	0.028±0.004	0.029±0.000
72	0.066±0.001	0.073±0.002	0.065±0.002	0.069±0.001	0.035±0.001	0.037±0.001	0.032±0.002	0.040±0.000
90	0.075±0.001	0.097±0.001	0.079±0.002	0.080±0.001	0.045±0.001	0.046±0.002	0.034±0.001	0.041±0.000
120	0.099±0.001	0.113±0.002	0.104±0.001	0.105±0.001	0.055±0.000	0.056±0.002	0.048±0.001	0.052±0.001
150	0.112±0.001	0.136±0.004	0.113±0.002	0.109±0.002	0.065±0.000	0.066±0.002	0.059±0.002	0.059±0.001
192	0.124±0.001	0.139±0.002	0.119±0.002	0.115±0.001	0.076±0.000	0.081±0.002	0.079±0.003	0.074±0.001
220	0.139±0.001	0.145±0.000	0.122±0.001	0.122±0.002	0.088±0.002	0.085±0.004	0.093±0.000	0.08±0.000
250	0.153±0.002	0.151±0.002	0.129±0.001	0.129±0.002	0.093±0.001	0.099±0.004	0.129±0.000	0.098±0.002
280	0.168±0.001	0.158±0.001	0.138±0.002	0.133±0.002	0.107±0.002	0.105±0.000	0.139±0.002	0.116±0.002
295	0.174±0.000	0.162±0.002	0.145±0.000	0.138±0.002	0.118±0.005	0.114±0.001	0.144±0.000	0.125±0.003
325	0.181±0.001	0.167±0.002	0.152±0.000	0.147±0.004	0.119±0.002	0.124±0.002	0.168±0.004	0.139±0.003
365	0.185±0.000	0.170±0.002	0.159±0.000	0.151±0.006	0.135±0.004	0.139±0.002	0.191±0.001	0.152±0.002
396	0.189±0.001	0.173±0.003	0.162±0.001	0.156±0.001	0.150±0.004	0.148±0.004	0.209±0.002	0.169±0.001
426	0.193±0.000	0.176±0.006	0.168±0.002	0.160±0.002	0.159±0.004	0.163±0.004	0.219±0.002	0.177±0.002
457	0.198±0.002	0.177±0.004	0.170±0.001	0.167±0.004	0.168±0.004	0.175±0.006	0.227±0.004	0.189±0.002
488	0.201±0.001	0.179±0.002	0.172±0.004	0.172±0.003	0.180±0.006	0.186±0.008	0.233±0.004	0.196±0.002
518	0.205±0.001	0.180±0.000	0.175±0.002	0.179±0.004	0.195±0.004	0.194±0.004	0.247±0.004	0.206±0.004
549	0.204±0.001	0.181±0.002	0.178±0.002	0.181±0.004	0.226±0.006	0.232±0.004	0.247±0.006	0.211±0.004

CUADRO NO L								
EDAD QUÍMICA (EQ)								
DATOS CON FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
TIEMPO (días)	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
4	0.004±0.002	0.008±0.000	0.010±0.002	0.007±0.000	0.004±0.001	0.009±0.001	0.004±0.002	0.006±0.000
14	0.018±0.006	0.021±0.000	0.023±0.000	0.028±0.002	0.012±0.000	0.011±0.004	0.013±0.001	0.018±0.004
29	0.035±0.010	0.040±0.004	0.039±0.006	0.045±0.002	0.016±0.004	0.020±0.000	0.020±0.002	0.022±0.001
45	0.042±0.000	0.059±0.005	0.057±0.002	0.061±0.000	0.026±0.000	0.028±0.004	0.024±0.004	0.037±0.004
72	0.075±0.012	0.086±0.003	0.080±0.008	0.1±0.0000	0.040±0.004	0.044±0.000	0.041±0.002	0.055±0.001
90	0.085±0.002	0.115±0.001	0.099±0.005	0.125±0.001	0.052±0.000	0.055±0.008	0.044±0.004	0.059±0.004
120	0.115±0.000	0.140±0.004	0.132±0.000	0.159±0.004	0.065±0.002	0.070±0.003	0.062±0.009	0.077±0.000
150	0.150±0.000	0.170±0.002	0.147±0.006	0.190±0.006	0.080±0.001	0.084±0.000	0.077±0.000	0.090±0.004
192	0.158±0.006	0.185±0.000	0.160±0.002	0.159±0.004	0.096±0.002	0.085±0.006	0.104±0.006	0.118±0.002
220	0.184±0.003	0.201±0.001	0.169±0.001	0.174±0.001	0.113±0.004	0.107±0.004	0.125±0.006	0.142±0.006
250	0.212±0.002	0.218±0.001	0.188±0.003	0.188±0.001	0.123±0.004	0.118±0.004	0.198±0.004	0.171±0.006
280	0.236±0.001	0.239±0.002	0.206±0.004	0.207±0.001	0.144±0.000	0.144±0.005	0.227±0.002	0.212±0.000
295	0.265±0.007	0.257±0.004	0.219±0.001	0.219±0.001	0.165±0.004	0.163±0.006	0.246±0.006	0.240±0.007
325	0.290±0.002	0.278±0.002	0.233±0.000	0.239±0.006	0.273±0.001	0.187±0.000	0.297±0.004	0.277±0.001
365	0.311±0.004	0.298±0.001	0.270±0.003	0.258±0.004	0.201±0.005	0.211±0.002	0.367±0.000	0.306±0.001
396	0.291±0.004	0.320±0.001	0.299±0.004	0.298±0.005	0.229±0.002	0.243±0.000	0.388±0.002	0.347±0.004
426	0.367±0.001	0.344±0.002	0.312±0.000	0.335±0.000	0.252±0.000	0.267±0.001	0.399±0.008	0.369±0.001
457	0.397±0.001	0.368±0.001	0.329±0.008	0.383±0.016	0.274±0.009	0.306±0.004	0.417±0.005	0.399±0.009
488	0.436±0.002	0.397±0.001	0.360±0.004	0.426±0.006	0.306±0.004	0.339±0.009	0.419±0.000	0.419±0.001
518	0.480±0.006	0.427±0.011	0.424±0.004	0.499±0.001	0.367±0.004	0.384±0.007	0.420±0.010	0.450±0.001
549	0.517±0.002	0.501±0.002	0.478±0.000	0.562±0.002	0.450±0.005	0.460±0.004	0.422±0.002	0.468±0.006

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, J. B. 1973. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100.deg. J. Sci. Food Agric. 24: 747-762.
2. Almela, L., Javaloy, S., Fernández-López, J. A, López-Roca, J. M. 1996. Varietal classification of young red wines in terms of chemical and color parameters. J. Sci. Food. Agric. 70: 173-180.
3. Amerine, M. A. y Ough, C. S. 1980. Methods of Analysis of Mosts and Wines. John Wiley and Sons, Inc. Nueva York. USA.
4. Andersen, O. M. 1985. Chromatographic separation of anthocyanins in cowberry (lingonberry) *Vaccinium vitis-idaea* L. J. Food Sci. 50: 1230-1232.
5. Asen, S. 1976. Known factors responsible for infinitive flower color variation. Acta Horticultura. 63: 217-223.
6. Asen, S., Stewart, R. N, Norris, K. H. 1972. Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. Phytochem. 11: 1139-1144.
7. Attoe, E. L, Von Elbe, J. H. 1981. Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. J. Food Sci. 46: 1934-1937.
8. Bakker, J., Bridle, P. 1992. Strawberry juice color: the effect of sulfur dioxide and EDTA on the stability of anthocyanins. J. Sci. Food Agric. 60: 477-481.
9. Bakker, J., Bridle, P., Koopman, A. 1992. Strawberry juice color: The effect of some processing variables on the stability of anthocyanins. J. Sci. Food Agric. 60: 471-476
10. Bakker, J., Preston, N. W., Timberlake, C. F. 1986. The determination of anthocyanins in aging red wines: Comparison of HPLC and spectral methods. Am. J. Enol. Vitic. 37: 121-126.
11. Bakker, J., Timberlake, C. F. 1986. The mechanism of color changes in aging port wine. Am. J. Enol. Vitic. 37: 288-292.
12. Bakowska, A., Kucharska, A. Z., Oszmianski, J. 2003. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. Food Chem. 81: 349-355.
13. Baranac, J. M., Petranovic, N. A., Dimitric-Markovic, J. M. 1997a. Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 2. Malvin and the nonglycosidized flavone quercetin. J. Agric. Food Chem. 45: 1694-1697.
14. Baranac, J. M., Petranovic, N. A., Dimitric-Markovic, J. M. 1997b. Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 3. Malvin and the nonglycosidized flavone morin. J. Agric. Food Chem. 45: 1698-1700.
15. Baranac, J. M., Petranovic, N. A., Dimitric-Markovic, J. M. 1997c. Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 4. Malvin and apigenin 7-glucoside. J. Agric. Food Chem. 45: 1701-1703.
16. Baranowski, E. S., Nagel, C. W. 1983. Kinetics of malvidin-a-glucoside. Condensation in wine model system. J. Food Sci. 48: 419-421.
17. Bassa, I. A., Francis, F. J. 1987. Stability of anthocyanins from sweet potatoes in a model beverage. J. Food Sci 52: 1753-1754.

18. Bate-Smith, E. C. 1954. Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed from Leuco-anthocyanidins in plant tissues. *Biochem.* 58:122-125.
19. Belitz, H., Grosch, W. 1999. *Food Chemistry*. 2nd ed. Springer, Berlin, p.992
20. Bors, W., Heller, W., Christa, M., 1990. Flavonoids as antioxidants: determinations of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186: 343-355
21. Boselli, E., Boulton, R. B., Thorngate, J. H., Frega, N. G. 2004. Chemical and sensory characterization of DOC red wines from Marche (Italy) related to vintage and grape cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3843-3854
22. Boulton, R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 67-87.
23. Bridle, P., Timberlake, C. F. 1996. Anthocyanins as natural food colors-selected aspects. *Food Chem.* 58:103-109.
24. Brouillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. En: *Anthocyanins as Food Colors*. Pericles Markakis (ed.), Academic Press Inc., New York, p.1-38.
25. Brouillard, R., Delaporte, B. 1977. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *J. Am. Chem. Soc.* 99:8461-8468.
26. Brouillard, R., Dubois, E. 1977. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.* 99:1359-1364.
27. Brouillard, R., Mazza, G., Saad, Z., Albrecht-Gary, A. M., Cheminat, A. 1989. The co-pigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 2604-2610.
28. Brouillard, R., Wigand, M. C., Dangles, O., Cheminat, A. 1991. The pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *J. Chem. Soc.* 1235-1241.
29. Cabrita, L., Fossen, T., Andersen, O. M. 2000. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem.* 68: 101-107.
30. Chen, L., Hrazdina, G. 1981. Structural aspects of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant color. *Phytochem.* 20: 297-303.
31. Cheynier, V., Souquet, J., Kontek, A., Moutounet, M. 1994. Anthocyanin degradation in oxidising grape. *J. Sci. Food Agric.* 66: 283-288.
32. Dallas, C., Laureano, O. 1994. Effects of pH, sulphur dioxide, alcohol content, temperature and storage time on colour composition of a young portuguese red table wine. *J. Sci. Food Agric.* 65: 477-485.
33. Dao, L.T., Takeoka, G. R., Edwards, R. H., Berrios, J. D. J. 1998. Improved method for the stabilization of anthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3564-3569.
34. Daravingas, G., Cain, R. F. 1968. Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model systems. *J. Food Sci.* 33: 138-142.
35. Darias-Martin, J., Martín-Luis, B., Carrillo-López, M., Lamuela-Raventós, R. Díaz-Romero, C., Boulton, R. 2002. Effect of caffeic acid on the color of red wine. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2062-2067.

36. De Ancos, B., Cano, M. P., Hernández, A., Monreal, M. 1999b. Effects of microwave heating on pigment composition and color of fruit purees. *J. Sci. Food Agric.* 79: 663-670.
37. De Ancos, B., González, E., Cano, M. P. 1999a. Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. *Food Res. Tech.* 208: 33-38.
38. Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C. H., Talcott, S. T. 2004. Phytochemical composition and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea Mart*). *J. Agric. Food Chem.* 52: 1539-1545.
39. Eiro, M., Heinonen, M. 2002. Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7461-7466.
40. Fennema, O. R. 1985. *Food Chemistry*. Marcel Dekker, Inc. USA.
41. Figueiredo, P., George, F., Tatsuzawa, F., Toki, K., Saito, N., Brouillard, R. 1999. New features of intramolecular copigmentation by acylated anthocyanins. *Phytochem.* 51: 125-132.
42. Francis, F. J. 1989. Food colorants: anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28: 273-314.
43. Furtado, P., Figueiredo, P., Chaves das Neves, H., Pina, F. 1993. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *J. Photochem, Photobiol, A* 75: 113-118.
44. Gao, L., Mazza, G. 1994. Rapid method for complete chemical characterization of simple and acetylated anthocyanins by high-performance liquid chromatography and capillary gas-liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 42, 118-125.
45. Gao, Y., Cahoon, G. A. 1995. high performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in the red seedless table grape reliance. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 339-345.
46. García-Alonso, M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J. C., De Pascual-Teresa, S. 2004. Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A. Studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3378-3384.
47. Garcia-Palazon, A., Suthanthangjai, W., Kajda, P., Zabetakis, I. 2004. The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria ananassa*). *Food Chem.* 88: 7-10.
48. Garcia-Vigera, C., Zafrilla, P., Tomas-Barberan, F. 1997. Determination of authenticity of fruit jams by HPLC analysis of anthocyanins. *J. Sci, Food Agric.* 73: 207-213.
49. Gimenez, J., Kajda, P., Margomenou, L., Piggott, J. R., Zabetakis, I. 2001. A study on the colour and sensory attributes of high-hydrostatic-pressure jams as compared with traditional jams. *J. Sci. Food Agric.* 81: 1228-1234
50. Giusti, M. M., Rodríguez-Saona, L. E., Wrolstad, R. E. 1999. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4631-4637.

51. Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. University of Maryland College Park, Maryland.
52. Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem. Eng. J.* 14: 217-225.
53. Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., Fernández-Fernández, J. I. 2001 *Am. J. Enol. Vitic.* 52:266-270
54. Harbertson, J. F., Picciotto, E. A., Adams, D. O. 2003. Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein Precipitation assay combined with bisulfite bleaching. *Am. J. Enol. Vitic.* 54:301-306.
55. Harborne, J. B. 1958. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.* 70, 22-28.
56. Harborne, J. B. 1967. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic, New York.
57. Hayashi, K. The Anthocyanins. Cap 9. 1962. En *The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Geissman, T. A. (Editor) The Macmillan Company. USA.
58. Hebrero, E., García-Rodríguez, C., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C. 1989. Analysis of antocyanins by high performance liquid chromatography-diode array spectroscopy in a hibrid grape variety (*Vitis vinifera x Vitis berlandieri* 41B). *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 283-291.
59. Hebrero, E., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C. 1988. High performance liquid chromatography-diode array spectroscopy identification of anthocyanins of *Vitis vinifera* variety Tempranillo. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 227-233.
60. Hong, V., Wrolstad, R. E. 1990. Use of HPLC separation/photodiode array detection for caracterization of antocyanins. *J. Agric. Food. Chem.* 38: 708-715.
61. Hoshino, T., Matsumoto, U., Goto, T. 1980. The stabilizing effect of the acyl group on the copigmentation of acylated anthocyanins with C-glucosylflavonones. *Phytochem.* 19: 663-667.
62. Huang, H. T. 1955. Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 3: 141-146.
63. Jackson, M. G., Timberlake, C. F., Bridle, P., Vallis, L. 1978. Red wine quality: correlations between colour, aroma and flavour and pigment and other parameters of young Beaujolais. *J. Sci. Fd. Agric.* 29, 715-727.
64. Jurd, L. Spectral Properties of Flavonoid Compounds. Cap 5. 1962. En *The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Geissman, T. A. (Editor) The Macmillan Company. USA.
65. Kader, F., Irmouli, M., Nicolas, J. P., Metche, M. 2001. Proposed mechanism for the degradation of pelargonidin 3-glucoside by caffeic acid o-quinone. *Food Chem.* 75: 139-144.
66. Kader, F., Irmouli, M., Nicolas, J. P., Metche, M. 2002. Involvement of blueberry peroxidase in the mechanisms of anthocyanin degradation in blueberry juice. *J. Food Sci.* 67: 910-915.

67. Kader, F., Irmouli, M., Zitouni, N., Nicolas, J., Metche, M. 1999. Degradation of cyanidin 3-glucoside by caffeic acid o-quinone. Determination of the stoichiometry and characterization of the degradation products. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4625-4630.
68. Kader, F., Rovel, B., Girardin, M., Metche, M. 1997. Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum L.*). Partial purification and characterization of blueberry polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* 73: 513-516.
69. Kähkönen, M. P., Heinämäki, J., Ollilainen, V., Heinonen, M. 2003. Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. *J. Sci. Food Agric.* 83: 1403-1411.
70. Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., Koide, T., Umeda, T., Yukawa, T., Terabe, K. 1995. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Invest.* 13:590-594
71. Keith, E. S., Powers, J. J. 1965. Polarographic measurement and thermal decomposition of anthocyanin compounds. *J. Agric. Food Chem.* 13: 577-579.
72. Krifi, B., Chouteau, F., Boudrant, J., Metche, M. 2000. Degradation of anthocyanins from blood orange juices. *Int. J. Food Sci. Techn.* 35: 275-283.
73. Liao, H., Cai, Y., Haslam, E. 1992. Polyphenol interactions. Part 6. Anthocyanins: co-pigmentation and color changes in red wines. *J. Sci. Food Agric.* 59: 299-305.
74. Lundahl, D. S., McDaniel, M. R., Wrolstad, R. E. 1989. Flavor, aroma, and compositional changes in strawberry juice concentrate stored at 20 °C. *J. Food Sci.* 54: 1255-1258.
75. Maccarone, E., Maccarrone, A., Rapisarda, P. 1985. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *J. Food Sci.* 50: 901-904.
76. Maribel, M., Saucier, C., Guerra, C., Glories, Y. 1999. Copigmentation in model wine solutions: Occurrence and relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 211-218.
77. Markakis, P. 1982. Stability of anthocyanins in foods. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis P (ed.), Academic Press Inc., New York, p.163-178.
78. Markovic, J. M. D., Petranovic, N. A., Baranac, J. M. 2000. A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5530-5536.
79. Marti, N., Pérez-Vicente, A., García-Viguera, C. 2002. Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *J. Sci. Food Agric.* 82: 217-221.
80. Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, Ma. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* XVI (6) 271-278.
81. Matsufuji, H., Otsuki, T., Takeda, T., Chino, M., Takeda, M. 2003. Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3157-3161.
82. Mayen, M., Merida, J., Medina, M. 1994. Free anthocyanins and polymeric pigments during the fermentation and post-fermentation standing of musts

- from *Cabernet Sauvignon* and *Tempranillo* grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 161-166.
83. Mazza, G., Brouillard, R. 1987. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.* 25: 207-225.
 84. Mazza, G., Brouillard, R. 1990. The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochem.* 29: 1097-1102.
 85. Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B. 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of *Cabernet Franc*, *Merlot*, and *Pinot Noir* wines from British Columbia. *J. Agric Food Chem.* 47: 4009-4017.
 86. McCloskey, L. P., Yengoyan, L. S. 1981. Analysis of anthocyanins in *Vitis vinifera* wines and red color versus aging by HPLC and spectroscopy. *A. J. Enol. Vitic.* 32:257-261.
 87. Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F. 2005. Yeast interactions with anthocyanins during red wine fermentation *Am. J. Enol. Vitic.* 56:104-109
 88. Montgomery, D. C. 2002. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Ed. Limusa. México
 89. Nagel, C. W., Wulf, L. W. 1979. Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of *Merlot* and *Cabernet Sauvignon*. *Am. J. Enol. Vitic.* 30:111-116.
 90. Osawa, Y. 1982. Copigmentation of Anthocyanins. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis P (ed.), Academic Press Inc., New York, p.41-65.
 91. Pace-Asciak, C. R., Hanh, S., Diamandis, E. P., Soleas, G., Goldberg, D.M. 1995. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta.* 245: 207-219.
 92. Palamidis, N., Markakis, P. 1978. Stability of grape anthocyanin in carbonated beverages. *Semana Vitivinícola* 33: 2633, 2635, 2637-2639.
 93. Pellegrini, N., Simonetti, P., Gardana, C., Brenna, O., Brighenti, F., Pietta, P. 2000. Polyphenol content and total antioxidant activity of *Vini novelli* (young red wines). *J. Agric. Food Chem.* 48: 732-735.
 94. Peng, C. Y., Markakis, P. 1963. Effect of phenolase on anthocyanins. *Nature* 199: 597-598.
 95. Perez-Prieto, L. J., De la Hera-Orts, M. L, López-Roca, J. M., Fernández-Fernández, J. I., Gómez-Plaza, E. 2003. Oak-matured wines: Influence of the characteristics of the barrel on wine colour and sensory characteristics. *J. Sci. Food Agric.* 83: 1445-1450.
 96. Pifferi, P. G., Cultrera, R. 1974. Enzymic degradation of anthocyanins. Role of sweet cherry polyphenol oxidase. *J. Food Sci.* 39: 786-791.
 97. Poeschl, M., Wrolstad, R. E. 1981. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavanol model system. *J. Food Sci.* 46: 1218, 1222, 1236.
 98. Pouget, C., Fagnere, C., Basly, J. P. 2002. Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones. *Pharm. Res.* 19: 286-291.
 99. Rein, M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Tesis Doctoral. Universidad de Helsinki, Finlandia.

100. Reyes-Dorantes, A. Escalilla-Hurtado, L., Verde-Calvo, J. R. 1992. Elaboración de Vinos de Mesa, Vol I, UAMI.
101. Rhim, J. 2002. Kinetics of thermal degradation of anthocyanin pigment solutions driven from red flower cabbage. *Food Sci. Biotech.* 11: 361-364.
102. Ribéreau-Gayon, P. 1982. Anthocyanins of Grapes and Wines. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis P (ed.), Academic Press Inc., New York, p.209-242.
103. Ribereau-Gayon, P., Pontallier, P., Glories, Y. 1983. Some interpretations of colour changes in young red wines during their consevation. *J. Sci. Food Agric.* 34: 505-516.
104. Robinson, G. M., Robinson, R. 1931. Survey of anthocyanins. I. *Biochem. J.* 25: 1687-1705.
105. Rommel, A., Heatherbell, D. A., Wrolstad, R. E. 1990. Red raspberry juice and wine: effect of processing and storage on anthocyanin pigment composition, color and appearance. *J. Food Sci.* 55: 1011-1017.
106. Rommel, A., Wrolstad, R. E., Heatherbell, D. A. 1992. Blackberry juice and wine: Processing and storage effects on anthocyanin composition, color and appearance. *J. Food Sci.* 57: 385-391, 410.
107. Rossetto, M., Vanzani, P., Zennaro, L., Mattivi, F., Vrhovsek, U., Scarpa, M., Rigo, A. 2004. Stable free radicals and peroxy radical trapping capacity in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6151-6155.
108. Roux, D. G. 1957. Identification of anthocyanidins, leuco-anthocyanins and 2:3-dihydroflavonols in plant tissues. *Nature.* 179: 305-306.
109. Sacchi, K., Bisson, L. B., Adams, D. O. 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines *Am. J. Enol. Vitic.* 56: 197-206
110. Sagarpa. 2005. Fuente: Servicio De Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (Siap), Con información de las delegaciones de la Sagarpa en los estados. www.sagarpa.gob.mx. 19/06/2006.
111. Sakamura, S., Shibusa, S., Obata, Y. 1966. Separation of a polyphenoloxidase for anthocyanin degradation in eggplant. *J. Food Sci.* 31: 317-319.
112. Santos, C., Muñoz, S. S., Gutiérrez, Y., Hebrero, E., Vicente, J. L., Galindo, P., Rivas, J. C. 1991. Characterization of young red wines by application of HJ biplot analysis to anthocyanin profiles. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1086-1090.
113. Sarni, P., Fulcrand, H., Souillol, V., Souquet, J., Cheynier, V. 1995. Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *J. Sci. Food Agric.* 69: 385-391.
114. Seeram, N. P., Bourquin, L. D., Nair, M. G. 2001. Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4924-4929.
115. Sims, C. A. y Morris, J. R. 1984. Effects of pH, sulfur dioxide, storage time, and temperature on the color and stability of *Red Muscadine* grape wine *Am. J. Enol. Vitic.* 35(1):35-39
116. Sims, C. A., Morris, J. R. 1985. Acomparasion of the color components and color stability of red wine from *Noble* and *Cabernet Sauvignon* at various pH levels. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 181-184.

117. Sims, C. A., Morris, J. R. 1986. Effects of acetaldehyde and tannins on the color and chemical age of red muscadine (*Vitis rotundifolia*) wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 163-165.
118. Singleton, V. L., Trousdale, E. 1983. White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC. *Am. J. Enol. Vitic.* 34, 2734.
119. Skrede, G., Wrolstad, R. E., Durst, R. W. 2000. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J. Food Sci.* 65: 357-364.
120. Somers, T. C. 1971. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochem.* 10, 2175-2186.
121. Somers, T. C., Evans, M. 1974. Wine quality: Correlations with Colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines. *J. Sci. Food Agric.* 25, 1369-1379.
122. Somers, T. C., Evans, M. 1977. Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "Chemical Age". *J. Sci. Food Agric.* 28, 279-287.
123. Somers, T. C., Evans, M. E. 1979. Grape pigment phenomena: Interpretation of major colour losses during vinification. *J. Sci. Food Agric.* 30, 623-633.
124. Somers, T. C., Pock, K. F. 1990. Evolution of red wines. III. Promotion of the maturation phase. *Vitis* 29: 109-121.
125. Starr, M. S., Francis, F. J. 1974. Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail. *J. Food Sci.* 38: 1043-1046.
126. Stintzing, F. C., Carle, R. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 19-38.
127. Takamura, H., Yamagami, A. 1994. Antioxidative activity of mono-acylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. *J. Agric. Food Chem.* 42:1612-1615.
128. Talcott, S. T., Brenes, C. H., Pires, D. M., Del Pozo-Insfran, D. 2003. Phytochemical stability and color retention of copigmented and processed muscadine grape juice. *J. Agric. Food Chem.* 51: 957-963.
129. Timberlake, C. F., Bridle, P. 1966. Effects Of Substituents On The Ionization Of Flavylum Salts And Anthocyanins And Their Reactions With Sulfur Dioxide. *Chemistry & Industry* 1965-1966.
130. Timberlake, C. F., Bridle, P. 1982. Distribution of Anthocyanins in Food Plants. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis P (ed.), Academic Press, New York, p.126-57.
131. Verde-Calvo, J. R. 1994. Cinética de la fermentación maloláctica en vinos tintos empleando como inóculo una cepa aislada y caracterizada del género *Lactobacillus*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias UNAM.
132. Von Elbe, J. H., Schwartz, S. J. 1996. Colorants. In: *Food Chemistry*. Fennema OR (ed.) 3rd ed., Marcel Dekker Inc., New York, p.651-723.
133. Wang, H., Cao, G., Prior, R. L., 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45:304-309
134. Williams, M., Hrazdina, G. 1979. Anthocyanins as food colorants: effect of pH on the formation of anthocyanin-rutin complexes. *J. Food Sci.* 44: 66-68.

135. Wilska-Jeszka, J., Korzuchowska, A. 1996. Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation. Influence on the color of strawberry and chokeberry juices. *Food Res, Tech*, 203: 38-42.
136. Wrolstad, R. E, Skrede, G., Lea, P., Enersen, G. 1990. Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. *J, Food Sci*, 55: 1064-1065, 1072.
137. Wulf, L. W., Nagel, C. 1978. High-pressure liquid chromatography separation of anthocyanins of *Vitis Vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.* 29, 42-48.
138. Yokotsuka, K., Nishino, N. 1990. Extraction of anthocyanins from muscat bailey a grape skins. *J. Ferment. Bioeng.* 69, 328-334.
139. Yokotsuka, K., Singleton, V. L. 1997. Disappearance of anthocyanins as grape juice is prepared and oxidized with PPO and PPO substrates. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 13-25.
140. Yoshida, K., Kondo, T., Goto, T. 1992. Intramolecular stacking conformation of gentiodelphin, a diacylated anthocyanin from *Gentiana makinoi*. *Tetrahedron* 48: 4313-4326.