

**Effect of the alcoholic and malolactic
fermentation in the physicochemical
characteristics of Black Spanish (*Vitis
labrusca*) wine**

Michelle Stefania Segovia Coronel

Zamorano, Honduras

November; 2011

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de la fermentación alcohólica y maloláctica en las características físico-químicas del vino Black Spanish (*Vitis labrusca*)

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Michelle Stefania Segovia Coronel

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2011

Efecto de la fermentación alcohólica y maloláctica en las características físico-químicas del vino Black Spanish (*Vitis labrusca*)

Presentado por:

Michelle Stefania Segovia Coronel

Aprobado:

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria Alimentaria

Flor Núñez, M.Sc.
Asesora

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

RESUMEN

Segovia, M. 2011. Efecto de la fermentación alcohólica y maloláctica en las características físico-químicas del vino Black Spanish (*Vitis labrusca*). Proyecto especial de graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Zamorano. Honduras. 22p.

Black Spanish es una de las variedades de uva más cultivadas en el sureste de Texas debido a su resistencia a enfermedades y a condiciones climáticas adversas. Sin embargo, los avances realizados en la elaboración de vino son aún limitados. La presente investigación buscó estudiar la fermentación primaria y secundaria de vinos de uvas Black Spanish sobre las propiedades antioxidantes y los perfiles fenólicos de los mismos. La investigación se dividió en dos secciones evaluando la fermentación primaria y fermentación secundaria, respectivamente. Se utilizó arreglos factoriales de 2x2x4 (Sección I) y 2x2x2 (Sección II) en un Diseño Completamente al Azar. Los vinos Black Spanish fermentados con cáscara de uva presentaron un contenido de fenoles y antocianinas totales significativamente más alto que aquellos fermentados en ausencia de la cáscara ($P < 0.05$). La temperatura cálida de fermentación (29-32°C) y la ausencia de cáscara incrementó la formación de antocianinas poliméricas (40 y 29%, respectivamente). Se observó una producción normal de etanol (12-13%) únicamente en vinos fermentados a temperatura cálida (29-32°C). En general, los valores de capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC) no fueron significativos (menor a 2 $\mu\text{mol TE/mL}$). Los vinos Black Spanish producidos por fermentación maloláctica a temperatura cálida (29-32°C), presentaron el mayor contenido de antocianinas y fenoles totales. Los resultados sugieren un impacto notable de la temperatura de fermentación y la presencia de cáscara durante la fermentación en las propiedades antioxidantes y el contenido fenólico del vino Black Spanish.

Palabras clave: Flavonoides, fitoquímica, polifenoles, vino tinto.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros y anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	2
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4 CONCLUSIONES.....	16
5 RECOMENDACIONES.....	17
6 LITERATURA CITADA.....	18
7 ANEXOS.....	22

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de los tratamientos para fermentación alcohólica	5
2. Descripción de los tratamientos para fermentación maloláctica	5
3. Contenido de fenoles totales (mg EAG/L). I.....	9
4. Contenido de antocianinas totales (mg/L). I.....	9
5. Capacidad de Absorción de Radicales Libres de Oxígeno ($\mu\text{mol TE/mL}$)	10
6. Contenido de antocianinas poliméricas (%). I.....	10
7. Contenido de etanol total (%). I.....	11
8. Valores de pH de los tratamientos evaluados. I.....	12
9. Contenido de fenoles totales (mg EAG/L). II.....	13
10. Contenido de antocianinas totales (mg/L). II	13
11. Contenido de antocianinas poliméricas (%). II.....	14
12. Contenido de etanol total (%). II	14
13. Valores de pH de los vinos Black Spanish. II	15
14. Acidez total (%) de los vinos Black Spanish.....	15
 Anexos	 Página
1. Flujo de proceso para la elaboración de vino Black Spanish	22

1. INTRODUCCIÓN

Las bebidas alcohólicas producidas por fermentación alcohólica y destilación han formado parte de la dieta humana durante miles de años, siendo probablemente los líquidos más seguros para beber antes de que el agua pura y limpia estuviera disponible para consumo humano (Hasler 2009).

En la mayoría de los países desarrollados, el alto consumo de grasas saturadas acompañado por la falta de actividad física, se relacionan con una alta mortalidad por enfermedades coronarias. Sin embargo, la situación en Francia es paradójica, ya que a pesar de ser un gran consumidor de grasas saturadas (quesos y chocolates), su tasa de mortalidad por dichas enfermedades es baja (Opie y Lecour 2007). Esta paradoja puede deberse en parte al alto consumo de vino tinto. Los estudios epidemiológicos indican que el consumo de alcohol en el nivel de consumo en Francia (20-30 g al día) puede llegar a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares en un 40% (Renaud y de Lorgeril 1992). Existen varias interpretaciones del hecho. En 1991, un programa de televisión de la cadena estadounidense CBS (60 minutos) aseguró que se debía a las propiedades del vino tinto, y eso provocó que las ventas del mismo aumentaran en un 44% en aquel país. Desde entonces se la llama "Paradoja francesa" (Renaud y de Lorgeril 1992).

A pesar de que el consumo excesivo de alcohol sea perjudicial para la salud, se ha demostrado que el beber moderadas cantidades de vino (una copa con 5 onzas por día para mujeres y dos copas para hombres) conlleva a una serie de beneficios para la salud, en su mayoría relacionados a enfermedades cardiovasculares (Klatsky 2009; Kloner y Rezkalla 2007), diabetes (Wannamethee *et al.* 2003), hipertensión (Sesso *et al.* 2008), cáncer (He *et al.* 2008) y demencia (Panza *et al.* 2009). Al mismo tiempo, el consumo de vino se ha relacionado con mecanismos de protección contra enfermedades cardiovasculares, como el incremento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), la reducción de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la disminución de su oxidación (German y Walzem 2000). Sin embargo, la hipótesis planteada acerca de si el vino es realmente más saludable que la cerveza y otros licores sigue siendo muy controversial (Lindberg y Amsterdam 2008).

El vino es una sustancia rica en compuestos polifenólicos, los cuales han despertado gran interés debido a su papel en la evaluación de la calidad del vino (color, sabor, astringencia y amargor) y su importancia desde el punto de vista médico (antioxidante y antitumoral) (Renaud y de Lorgeril 1992). Estos compuestos se pueden clasificar en dos tipos: flavonoides y no flavonoides, siendo los flavonoides (flavonoles, taninos, antocianinas) los más estudiados ya que presentan importantes beneficios de salud y actividades farmacológicas, tales como anti-inflamatorio, anti-alérgico, anti-viral (Issuree *et al.* 2009), antioxidante (Yang *et al.* 2001) y antimicrobial (Proestos *et al.* 2009). Los niveles de dichos compuestos en vinos varían según las variedades de la uva y los métodos de procesamiento utilizados para su elaboración (Corder *et al.* 2006). No obstante, numerosos estudios han demostrado que los vinos tintos presentan mayores cantidades de compuestos fenólicos que los vinos blancos debido a que su jugo es fermentado junto con la cáscara de la uva (Waterhouse 2002).

Los compuestos fenólicos son antioxidantes naturales (López-Vélez *et al.* 2003), responsables de varias características organolépticas especialmente del vino tinto, como color, amargor, astringencia y su capacidad antioxidante, convirtiéndose en un componente fundamental de la calidad del vino (Harbertson y Spayd 2006). Es por esto, que la capacidad antioxidante de las uvas se ha relacionado directamente con su composición fenólica, siendo las antocianinas los compuestos mayormente analizados.

Las antocianinas son los pigmentos responsables del color rojo de los vinos tintos, las cuales se encuentran principalmente en la cáscara y pulpa de las uvas, ofreciendo una capacidad antioxidante significativa (Muñoz-Espada *et al.* 2004). Las uvas y los vinos utilizados para estudios sobre la composición de antocianinas y la actividad antioxidante en general son de la especie *Vitis vinífera*, por ser la variedad más utilizada para la producción de vino en todo el mundo (Muñoz-Espada *et al.* 2004). Sin embargo, existen otras variedades de uvas como *Vitis rotundifolia* y *Vitis lambrusca* que han ganado importancia para el procesamiento de vinos en especial en lugares donde *Vitis vinífera* no se puede producir (Acree *et al.* 1981).

Black Spanish (*Vitis labrusca*), también conocida con el nombre de Lenoir y Jacques, es un híbrido que proviene de la especie *Vitis aestivalis*. Los taxonomistas afirman que el híbrido incluye la filiación de las tres especies, *V. aestivalis*, *V. cinérea*, *V. vinífera* (Galet 1979, Pongracz 1983, Viala y Ravaz 1903). Ésta es considerada una uva jugosa, de color negro azulado, la cual es utilizada principalmente para la elaboración de jugos, mermeladas y vinos (Stafne 2009).

Black Spanish es una de las variedades de uva más cultivadas en la región sureste de Texas debido a sus excelentes características de maduración en condiciones climáticas extremas como altas temperaturas y humedad que se presentan en esta región del país. Al mismo tiempo, la uva Black Spanish presenta resistencia a algunas enfermedades microbianas y fúngicas como la enfermedad de Pierce, Texas Root Rot y la presencia de moho (Buzombo *et al.* 2006). Por lo tanto, esta variedad ha sido cultivada para ser consumida como fruta fresca y para su procesamiento (Stafne 2009).

Sin embargo, la uva Black Spanish no es explotada de manera eficiente en la industria de elaboración del vino debido a que sus compuestos aromáticos son actualmente percibidos por sus consumidores como “atípicos”, otorgándole un perfil de sabor y aroma indeseable que lo hace único en comparación con las variedades tradicionales de *Vitis vinífera* (McEachern *et al.* 1997). No obstante, algunas evidencias sugieren que mediante alteraciones en las prácticas de producción y el cambio en ciertas condiciones, estas características indeseables pueden ser reducidas, llegando a producirse un vino de calidad que pueda ser comparado con un Merlot o Cabernet. Por ello, el departamento de Ciencia de Alimentos de la Universidad Texas A&M ha invertido una cantidad significativa de recursos para llevar a cabo proyectos relacionados con el vino elaborado a partir de dicha variedad. Algunas investigaciones se han llevado a cabo en los últimos años como la caracterización química de las uvas y vino de Black Spanish (Talcott *et al.* 2009) y las propiedades antioxidantes del vino Black Spanish (Hogan 2009).

Al mismo tiempo, la industria del vino en Texas ha presentado diversos problemas, no debido a la ausencia de frutas o la presencia de enfermedades, sino a la aparición de pequeños negocios que no tienen la experiencia suficiente y las habilidades para procesar vinos de calidad representativos de la región; es por ello, que los mercados regionales han sido llenados de vinos de baja calidad que no cumplen con las expectativas de sus consumidores. Por lo tanto, los objetivos de esta investigación fueron los siguientes:

- Evaluar las características físico-químicas del vino Black Spanish mediante el estudio de dos temperaturas de fermentación (13-14 °C y 29-32 °C, respectivamente).
- Evaluar el efecto del uso de enzimas de maceración y la presencia de la cáscara de la uva durante la fermentación en las características físico-químicas del vino Black Spanish.
- Evaluar la capacidad antioxidante y el perfil fenólico del vino Black Spanish producido por fermentación alcohólica y maloláctica.
- Evaluar la capacidad antioxidante y el perfil fenólico del vino Black Spanish al inicio y la final de la fermentación alcohólica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto fue dividido en dos estudios, fermentación alcohólica y fermentación alcohólica y maloláctica, respectivamente. Los análisis químicos realizados, fueron los mismos para ambos estudios y sus resultados fueron analizados de la misma manera.

Obtención de uvas. Las uvas Black Spanish se obtuvieron del campo experimental de la Universidad Texas A&M (College Station, TX), durante la cosecha del verano 2010. Posterior a la cosecha, las uvas fueron limpiadas y almacenadas a -20 °C hasta el momento de iniciar la elaboración del vino.

Preparación y de los vinos. Para el primer estudio, uvas previamente limpiadas (20kg) fueron presionadas manualmente para lograr la extracción del jugo y separar la cáscara, obteniendo 10 litros de jugo y aproximadamente 5 kg de cáscara. Posteriormente las cáscaras obtenidas, se dividieron en dos partes iguales; la primera parte fue tratada con enzimas comerciales de maceración, Validase Trl y 220X Crystalzyme (Megazyme company, Wicklow, Irlanda). Estas enzimas de maceración fueron utilizadas con el objetivo de maximizar la cantidad de jugo y pigmentos obtenidos a partir de la cáscara de la uva. La segunda parte fue adicionada al jugo para realizar un proceso de maceración normal.

El jugo de uva obtenido se distribuyó en dieciséis beakers de 1 litro, los cuales fueron llenados hasta alcanzar 600 ml solo con los distintos tratamientos. Para los tratamientos que contenían cáscara se usaron 225 gramos de cáscara de los 5 kg obtenidos en total. La fermentación alcohólica tuvo inicio el 24 de Febrero del 2011, usando 3g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (V1116) (Lallemand company, Canadá) por litro para cada uno de los tratamientos. Al iniciar la fermentación, los nutrientes para la levadura se agregaron a cada uno de los tratamientos, tales como fosfato diamónico (5.283kg) y ferromorcer (7920mg) (Megazyme company, Wicklow, Irlanda). Además, 43 mg de metabisulfito de potasio ($K_2O_5S_2$) fueron añadidos a cada uno de los tratamientos como antimicrobiano.

Después de dos días de haber iniciado la fermentación, la levadura entró en estado de estrés debido a la ausencia de nutrientes, por lo tanto, 5ml de fosfato diamónico fueron añadidos a cada tratamiento, seguido por un proceso de oxigenación. Al finalizar la fermentación alcohólica, tanto en los tratamientos de temperatura fría (23 de marzo del 2011), como en los tratamientos de temperatura cálida (01 de marzo del 2011), se agregó 25 mg de metabisulfito de potasio a cada tratamiento con la finalidad de evitar oxidación y daño microbiano después del proceso de clarificado.

Antes de ser refrigerados, se aplicó argón a cada una de las muestras como mecanismo de conservación y eliminación de oxígeno. En cuanto al segundo estudio, los vinos fueron preparados de la misma manera que los vinos del primer estudio, con la diferencia que algunos vinos continuaron con la fermentación maloláctica mientras que otros solo completaron la fermentación alcohólica, dependiendo del tratamiento.

Diseño experimental. Para el primer estudio, se utilizó un Diseño Completamente al Azar, con un arreglo factorial de 2x2x4. El arreglo factorial consistió en dos etapas de fermentación (inicio y final), dos temperaturas de fermentación (fría 13-14 °C y cálida 29-32 °C), cuatro tipos de vinos (vino Black Spanish sin tratamiento, jugo con cáscara tratada con enzima, jugo con cáscara sin tratar y jugo extraído de la cáscara tratada con enzima). El arreglo de los tratamientos se observa en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos para fermentación alcohólica

Tipos de vino	Fermentación			
	Inicio		Final	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
Vino Black Spanish	T1	T2	T3	T4
Cáscara+enzima	T5	T6	T7	T8
Cáscara	T9	T10	T11	T12
Jugo-cáscara+enzima	T13	T14	T15	T16

Para el segundo estudio, se utilizó un Diseño Completamente al Azar con un arreglo factorial de 2x2x2, donde se evaluaron dos tipos de fermentación (alcohólica, maloláctica), dos temperaturas de fermentación (cálida 29-32 °C, fría 13-14 °C), y la presencia o ausencia de la cáscara de uva. Se contó con un total de ocho tratamientos con tres repeticiones para un total de 24 unidades experimentales. El arreglo de los tratamientos se observa en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos para fermentación maloláctica

Cáscara de uva	Fermentación			
	Alcohólica		Maloláctica	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
Con cáscara	T1	T2	T3	T4
Sin cáscara	T5	T6	T7	T8

Contenido de fenoles totales. Para ambos estudios, el contenido de fenólicos totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Harbertson y Spayd 2006). Las muestras reaccionaron con el reactivo Folin-Ciocalteu y la solución de carbonato de sodio y fueron incubadas por dos horas para posteriormente registrar la absorbancia a 726 nm con un espectrofotómetro (BMG Labtech Inc., Durham, North Carolina). El contenido de fenoles totales se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de vino (mg EAG/L).

Cuantificación de antocianinas. El contenido de antocianinas totales para el estudio I y II se cuantificó mediante el método de pH diferencial (Jurd 1964) que mide el cambio en la absorbancia a dos diferentes valores de pH (1.0 y 4.5). La lectura de la absorbancia se realizó a 520 y 700 nm con un espectrofotómetro (BMG Labtech Inc., Durham, North Carolina). El contenido de antocianinas totales se expresó como mg de malvidina-3-glucosido equivalente por litro de vino (mg/L), con un coeficiente de extinción molar de 28.000.

Antocianinas monoméricas y poliméricas. Para ambos estudios, la proporción y tipo de antocianinas presentes en las muestras se determinó por el análisis de antocianinas monoméricas y poliméricas totales (Lee *et al.* 2005). El método se basó en la propiedad de la pérdida de color de las antocianinas monoméricas en metabisulfito de potasio, mientras que las antocianinas poliméricas retienen color. En una celda se adicionaron 20 μ L de metabisulfito de potasio junto con 200 μ L de la muestra; en otra celda se adicionaron 20 μ L de agua junto con 200 μ L de la muestra. Se llevó a cabo un barrido espectrofotométrico desde los 400 nm hasta los 700 nm. Los resultados fueron expresados como % de antocianinas monoméricas y poliméricas.

Capacidad de Absorción de Radicales Libres de Oxígeno. El ensayo se llevó a cabo con la finalidad de medir la actividad atrapadora del radical peroxilo (Moore *et al.* 2005) en cada uno de los vinos. Se utilizó la vitamina 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Trolox) como estándar. Una solución de reserva de fluoresceína en tampón fosfato fue preparada y almacenada a 4 °C, a partir de la cual se preparó una solución de fluoresceína fresca que fue añadida a cada uno de las muestras para posteriormente ser incubadas durante 20 min a 37 °C. La reacción tuvo inicio al añadir el generador del radical peroxilo, 2,2'-Azobis-2-amidinopropano (AAPH), preparado en el tampón fosfato. La fluorescencia se midió utilizando un lector de microplatos FLUOstar (485 nm de excitación y 538 nm de emisión), (BMG Labtech Inc., Durham, NC). Los estándares y las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron en μ mol TE/g (Hogan *et al.* 2009).

Contenido de etanol. La concentración de alcohol en ambos estudios, se determinó utilizando el kit de prueba de etanol de la compañía Megazyme (Wicklow, Irlanda). Se colocó 0.10 mL de muestra en una cubeta plástica junto con 0.20 mL de solución buffer de pirofosfato de potasio y solución de NAD, 0.02 mL de suspensión de aldehído deshidrogenasa y 2 mL de agua destilada. Se mezcló lo suficiente y se leyó la absorbancia de dichas muestras a 340 nm con un espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, USA). Después de dos minutos se dio inicio a la reacción añadiendo a la muestra 0.02 mL de suspensión de alcohol deshidrogenasa y se leyó nuevamente su absorbancia. Dicho proceso se repitió utilizando agua destilada como blanco. Finalmente, se determinó la diferencia de absorbancias entre la muestra y el blanco y se calculó el contenido de etanol, el cual fue expresado en [% v/v].

Acidez total y pH. Para ambos estudios, el pH se midió con un potenciómetro (AB15-Accumet, Fisher Scientific) utilizando 50 mL de muestra para cada medición. El potenciómetro se enjuagó con agua destilada entre cada muestra. Para el estudio II, se determinó la acidez titulable de acuerdo al Método de Fenolftaleína (Amerine y Ough 1976) utilizando 5 mL de muestra por medición. Para realizar este análisis, se colocó una bureta de 25 mL por encima del vaso de precipitación con la muestra, la cual fue llenada con 0.1N NaOH. El hidróxido de sodio se añadió lentamente a la muestra hasta que ésta alcanzara un pH de 8.2. Simultáneamente, se añadió 1 mL de solución de fenolftaleína a cada muestra para que actuara como indicador del cambio de pH y por ende del punto final de la titulación. La acidez titulable fue expresada como ácido tartárico (g/mL); sin embargo, los resultados fueron expresados en % de acidez total.

Análisis estadístico. Se analizaron los datos para ambos estudios, usando un modelo lineal general (GLM) y separación de medias por método Duncan y LSMeans, junto con la ayuda del programa estadístico, Statistical Analysis System (SAS[®]) versión 9.1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fermentación alcohólica. El vino Black Spanish fermentado junto con la cáscara de la uva tratada con enzimas de maceración y a una temperatura cálida mostró el contenido de fenoles totales más alto (557 mg EAG/L), seguido por el vino fermentado junto con la cáscara de la uva sin ser tratada a igualmente temperatura cálida (486 mg EAG/L). Los vinos fermentados con la ausencia de la cáscara a temperatura cálida y fría presentaron el contenido de fenoles totales más bajo, 345 y 356 mg EAG/L, respectivamente. Esta clara diferencia en los valores del contenido de fenoles totales (Cuadro 3), sugiere que la presencia de la cáscara de uva durante la fermentación genera un vino con mayor contenido de compuestos fenólicos; lo cual se debe a que los fenoles (flavonoides) se encuentran principalmente en la cáscara y las semillas de la fruta (Monagas *et al.* 2005). La fermentación tradicional debido a la larga maceración en contacto con las semillas y cáscara de la uva, extraen más compuestos fenólicos que la maceración carbónica y la termovinificación. La maceración carbónica consiste en la saturación de la atmósfera de fermentación con CO₂ para lograr desintegrar los tejidos de la uva y extraer sustancias que se difundan en el jugo y la pulpa; por otro lado, la termovinificación es un método que consiste en el calentamiento de las uvas trituradas a temperaturas de 65-75 °C para luego ser enfriadas y presionadas (Jackson 2000).

Al mismo tiempo, se logra observar que el contenido de fenoles totales en la mayoría de los tratamientos no cambia significativamente a lo largo de la fermentación y que los tratamientos fermentados a temperatura cálida presentaron mayor contenido de fenoles totales, lo cual comprueba que la maceración realizada a temperaturas elevadas aumenta la extracción de compuestos fenólicos ya que promueve su difusión de la cáscara de la uva hacia el jugo fermentado (Ribereau-Gayon *et al.* 2006).

Cuadro 3. Contenido de fenoles totales (mg EAG/L). I

Tipos de vino	Fermentación			
	Inicio		Final	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
	Media+DE ^o	Media+DE ^o	Media+DE ^o	Media+DE ^o
Vino Black Spanish	377 ± 8.41 ^{cde}	323 ± 15.4 ^e	345 ± 3.44 ^{de}	356 ± 1.13 ^{de}
Cáscara+enzima	557 ± 5.74 ^a	375 ± 6.40 ^{cde}	533 ± 11.1 ^{ab}	423 ± 9.79 ^c
Cáscara	486 ± 0.38 ^b	335 ± 47.1 ^e	418 ± 74.6 ^c	403 ± 15.8 ^{cd}
Jugo-cáscara+enzima	393 ± 24.1 ^{cd}	352 ± 7.91 ^{de}	399 ± 56.9 ^{cd}	353 ± 10.5 ^{de}

^{a-b} Medias con letras diferentes entre tratamientos indican que hubo diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

DE^o Desviación Estándar

Los vinos que fueron fermentados con la cáscara de la uva tratada con enzimas (CE) a temperatura fría y cálida presentaron el contenido de antocianinas totales más alto (53 y 43.4 mg/L, respectivamente), lo cual se debió a la mayor extracción de jugo y fenoles de la cáscara de la uva a través de las enzimas de maceración (Cuadro 4). Sin embargo, la diferencia entre el contenido de antocianinas de ambos vinos se debió al mayor tiempo en contacto con la cáscara por parte del vino fermentado a temperatura fría, ya que la duración de la fermentación fue mayor (aproximadamente tres semanas más); esto se debe a que la fermentación en contacto con la cáscara por sólo unos días muestra una pérdida en el contenido de antocianinas a lo largo del proceso (Ribereau-Gayon *et al.* 2006).

Cuadro 4. Contenido de antocianinas totales (mg/L). I

Tipos de vino	Fermentación			
	Inicio		Final	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
	Media+DE ^o	Media+DE ^o	Media+DE ^o	Media+DE ^o
Vino Black Spanish	36.5 ± 1.94 ^{ef}	37.8 ± 5.49 ^{def}	38.0 ± 1.92 ^{def}	36.2 ± 0.77 ^{ef}
Cáscara+enzima	64.4 ± 1.48 ^a	48.3 ± 1.15 ^{bc}	43.4 ± 16.6 ^{cd}	53.0 ± 1.25 ^b
Cáscara	51.7 ± 0.53 ^b	32.7 ± 2.94 ^f	21.1 ± 6.78 ^g	42.6 ± 2.37 ^{cde}
Jugo-cáscara+enzima	37.5 ± 1.96 ^{def}	39.4 ± 0.99 ^{de}	24.1 ± 3.18 ^g	40.6 ± 0.63 ^{de}

^{a-b} Medias con letras diferentes entre tratamientos indican que hubo diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

DE^o Desviación Estándar

A pesar que los vinos fermentados a una temperatura fría presentaron mayor valor ORAC que los fermentados a temperatura cálida (Cuadro 5), todos los vinos Black Spanish presentaron un valor ORAC bajo (menor a 2 $\mu\text{mol TE/mL}$, aproximadamente). No se encontró correlación estadísticamente significativa entre el contenido de fenoles totales y los valores ORAC. El ensayo ORAC se utilizó en este estudio para medir la capacidad antioxidante de los vinos contra la generación de radicales libres de oxígeno. Esto sugiere

que la capacidad antioxidante del vino no sólo depende de su contenido de fenoles totales, es probable que existan otros componentes y otras especies reactivas capaces de interactuar con los radicales libres (Hogan *et al.* 2009).

Cuadro 5. Capacidad de Absorción de Radicales Libres de Oxígeno ($\mu\text{mol TE/mL}$)

Tipos de vino	Fermentación			
	Inicio		Final	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
	Media+DE ^o	Media+DE ^o	Media+DE ^o	Media+DE ^o
Vino Black Spanish	3.77 $\pm$ 0.16 ^b	2.46 $\pm$ 0.02 ^e	1.58 $\pm$ 0.05 ^j	2.06 $\pm$ 0.00 ^{gh}
Cáscara+enzima	3.56 $\pm$ 0.23 ^c	2.63 $\pm$ 0.04 ^d	1.92 $\pm$ 0.02 ^h	2.17 $\pm$ 0.02 ^{fg}
Cáscara	3.94 $\pm$ 0.03 ^a	2.64 $\pm$ 0.07 ^d	1.75 $\pm$ 0.03 ⁱ	2.30 $\pm$ 0.02 ^{ef}
Jugo-cáscara+enzima	3.52 $\pm$ 0.09 ^c	2.40 $\pm$ 0.04 ^e	1.66 $\pm$ 0.04 ^{ij}	2.15 $\pm$ 0.04 ^{fg}

^{a-b} Medias con letras diferentes entre tratamientos indican que hubo diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

DE^o Desviación Estándar

La polimerización es importante en la estabilización del color del vino, ya que convierte a las antocianinas en moléculas más resistentes a la decoloración causada por dióxido de sulfuro o alto pH (Lee *et al.* 2005). El vino que presentó mayor contenido de antocianinas poliméricas fue el vino fermentado sin presencia de cáscara a una temperatura cálida (59.9 %); por otro lado, el vino fermentado con presencia de la cáscara de la uva a una temperatura fría presentó el valor más bajo (Cuadro 6). En general, los vinos fermentados a temperaturas cálidas presentaron mayor contenido de antocianinas poliméricas, lo cual se debe a que temperaturas mayores favorecen reacciones de polimerización y condensación de antocianinas (Jackson 2000). Sin embargo, se observó que los vinos fermentados en contacto con la cáscara de la uva presentaron un contenido menor de antocianinas poliméricas, ya que la cáscara pudo haber bloqueado el movimiento de las antocianinas retardando su polimerización.

Cuadro 6. Contenido de antocianinas poliméricas (%). I

Tipos de vino	Fermentación			
	Inicio		Final	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
	Media+DE ^o	Media+DE ^o	Media+DE ^o	Media+DE ^o
Vino Black Spanish	51.5 $\pm$ 0.46 ^b	42.5 $\pm$ 9.87 ^{cde}	59.9 $\pm$ 5.66 ^a	36.0 $\pm$ 1.39 ^{ef}
Cáscara+enzima	40.1 $\pm$ 2.14 ^{def}	38.6 $\pm$ 2.31 ^{ef}	47.7 $\pm$ 4.21 ^{bcd}	33.1 $\pm$ 0.69 ^f
Cáscara	48.1 $\pm$ 1.90 ^{bcd}	40.5 $\pm$ 4.81 ^{def}	48.6 $\pm$ 11.9 ^{bc}	37.4 $\pm$ 3.58 ^{ef}
Jugo-cáscara+enzima	49.6 $\pm$ 1.99 ^{bc}	37.6 $\pm$ 1.73 ^{ef}	42.1 $\pm$ 3.18 ^{cde}	36.1 $\pm$ 1.19 ^{ef}

^{a-b} Medias con letras diferentes entre tratamientos indican que hubo diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

DE^o Desviación Estándar

El etanol es sin duda el alcohol más importante presente en el vino. Bajo condiciones estándares de fermentación, el etanol puede acumularse en un 12-14%, aproximadamente. Los factores primordiales que controlan la producción de etanol son el contenido de azúcar, la temperatura y la tensión o estrés presentado por la levadura (Jackson 2000). El vino fermentado sin cáscara a temperatura cálida presentó el mayor valor (13.72%), lo cual se debió a una mayor fermentación a temperaturas elevadas. El contenido de azúcar de la uva juega un papel fundamental en la producción de etanol y al mismo tiempo se convierte en un punto crítico para el crecimiento y metabolismo de la levadura; por ello, en jugos obtenidos de especies como *V. labrusca* y *V. rotundifolia* es necesario la adición de azúcar para alcanzar una producción estándar de 12% de alcohol en los vinos (Jackson 2000). Los porcentajes de etanol obtenidos de los vinos fermentados a temperaturas bajas son insignificantes (Cuadro 7), lo cual pudo haber ocurrido por el estrés de la levadura causado por bajas temperaturas o por falta de azúcar para las actividades de la levadura. También se pudo observar que los tratamientos que presentaban cáscara tratada con enzimas presentaron un contenido de etanol más bajo, ya que al inicio de la fermentación las enzimas extrajeron compuestos que pudieron presentar un efecto antimicrobial, afectando o retardando las actividades normales de la levadura.

Cuadro 7. Contenido de etanol total (%). I

	Fermentación			
	Inicio		Final	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
Tipos de vino	Media+DE^a	Media+DE^a	Media+DE^a	Media+DE^a
Vino Black Spanish	13.1 ± 0.86 ^a	0.05 ± 0.00 ^f	13.1 ± 0.43 ^{ab}	0.05 ± 0.00 ^f
Cáscara+enzima	3.59 ± 2.01 ^d	0.05 ± 0.00 ^f	11.7 ± 0.09 ^c	0.04 ± 0.00 ^f
Cáscara	11.9 ± 0.28 ^{bc}	0.04 ± 0.00 ^f	12.2 ± 0.19 ^{bc}	0.05 ± 0.00 ^f
Jugo-cáscara+enzima	2.16 ± 0.30 ^e	0.05 ± 0.00 ^f	0.05 ± 0.00 ^f	0.04 ± 0.00 ^f

^{a-b} Medias con letras diferentes entre tratamientos indican que hubo diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

DE^a Desviación Estándar

En cuanto al pH de los vinos tintos, por lo general se busca un rango entre 3.3 y 3.7, ya que vinos con alto pH (>3.9) son muy susceptibles a la oxidación y pérdida de aroma; igualmente, un bajo pH facilita la hidrólisis de disacáridos, añadiendo lentamente azúcares fermentables al vino (Singleton 1987). La disminución y el control del pH de los vinos se debe al rol que desempeñan los ácidos (málico y tartárico, principalmente) en el mismo, lo cual es crucial en la estabilidad del color de los vinos tintos, ya que a medida aumenta el pH, las antocianinas se decoloran y se tornan azules. Al mismo tiempo, el bajo pH producido por ácidos presenta un efecto antimicrobial previniendo el crecimiento de bacterias y mejorando las propiedades antimicrobianas de los ácidos grasos (Doores 1983). Todos los vinos Black Spanish presentaron un pH relativamente dentro del rango deseado (Cuadro 8), lo cual puede contribuir en aspectos antes mencionados.

Cuadro 8. Valores de pH de los tratamientos evaluados. I

Tipos de vino	Fermentación			
	Inicio		Final	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°
Vino Black Spanish	3.54 ± 0.01 ^e	3.85 ± 0.01 ^a	3.61 ± 0.02 ^d	3.82 ± 0.01 ^{ab}
Cáscara+enzima	3.57 ± 0.02 ^{de}	3.82 ± 0.00 ^{ab}	3.56 ± 0.01 ^{de}	3.77 ± 0.01 ^b
Cáscara	3.56 ± 0.05 ^{de}	3.82 ± 0.02 ^{ab}	3.70 ± 0.08 ^c	3.77 ± 0.01 ^b
Jugo-cáscara+enzima	3.59 ± 0.01 ^{de}	3.82 ± 0.01 ^{ab}	3.70 ± 0.00 ^c	3.78 ± 0.01 ^{ab}

^{a-b} Medias con letras diferentes entre tratamientos indican que hubo diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

DE° Desviación Estándar

Fermentación alcohólica y maloláctica. La fermentación maloláctica o secundaria es el proceso mediante el cual el ácido málico es transformado químicamente a ácido láctico, por medio de bacterias de origen láctico. Dicha fermentación se produce gracias a las necesidades metabólicas de las bacterias que emplean el ácido málico en la generación de ATP. El efecto final de la fermentación maloláctica es disminuir el pH del entorno, lo cual es deseable en la producción de vino tinto ya que dicha acidez le brinda un carácter necesario al vino para soportar largos periodos de añejamiento, con el fin de transformar la textura del cuerpo, la densidad y el sabor del mismo (Davis *et al.* 1985). La fermentación maloláctica se produce seguidamente de la fermentación alcohólica o primaria; es por ello, que se esperaba que los vinos que sufrieron fermentación maloláctica presenten mayor cantidad de polifenoles ya que el tiempo de exposición con la cáscara fue más prolongado.

Los resultados obtenidos en los vinos que alcanzaron fermentación maloláctica fueron valores más altos en comparación con los vinos que completaron solamente la fermentación alcohólica. El vino Black Spanish fermentado malolácticamente junto con la cáscara de la uva y a una temperatura fría reveló el contenido de fenoles totales más alto a 1020 mg de EAG/L, seguido por los vinos producidos por fermentación alcohólica en contacto con la cáscara de la uva a temperaturas cálida y fría (992 y 975 mg de EAG/L, respectivamente) (Cuadro 9). Al mismo tiempo, el vino producido por fermentación secundaria junto con la cáscara de la uva a temperatura cálida presentó el contenido de antocianinas totales más alto a 15.7 mg/L, seguido por el vino producido por fermentación primaria con presencia de cáscara de uva a una temperatura fría (15.2 mg/L) (Cuadro 10), lo cual se debe a que las antocianinas se encuentran comúnmente en las vacuolas celulares de la cáscara (antocianoplastos) (Wagner 1982). La diferencia en el contenido de fenoles totales y antocianinas totales presente en los vinos producidos por fermentación maloláctica con los producidos por fermentación alcohólica se debe a la maceración prolongada que sufrieron los vinos fermentados malolácticamente, lo cual provoca un aumento en la concentración de fenoles, antocianinas y en la intensidad del color del vino (Ribereau-Gayon *et al.* 2006).

Cuadro 9. Contenido de fenoles totales (mg EAG/L). II

	Fermentación			
	Alcohólica		Maloláctica	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
Cáscara de uva	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°
Presencia de cáscara	992 ± 43.6 ^a	975 ± 42.6 ^a	1020 ± 32.5 ^a	886 ± 25.3 ^b
Ausencia de cáscara	575 ± 12.2 ^b	583 ± 39.1 ^b	590 ± 45.9 ^b	567 ± 29.0 ^b

^{a-b} Medias con letras diferentes entre tratamientos indican que hubo diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

DE° Desviación Estándar

Cuadro 10. Contenido de antocianinas totales (mg/L). II

	Fermentación			
	Alcohólica		Maloláctica	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
Cáscara de uva	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°
Presencia de cáscara	12.3 ± 1.01 ^{bc}	15.2 ± 4.76 ^b	15.7 ± 2.35 ^b	9.83 ± 1.51 ^{cd}
Ausencia de cáscara	6.27 ± 0.67 ^d	8.78 ± 2.63 ^{cd}	7.68 ± 1.35 ^d	7.67 ± 0.22 ^d

^{a-b} Medias con letras diferentes entre tratamientos indican que hubo diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

DE° Desviación Estándar

Las antocianinas se pueden encontrar polimerizadas con ellas mismas o con otros compuestos fenólicos, proteínas y polisacáridos aumentando su estabilidad frente al pH (Mazza 1995). Los pigmentos de antocianinas poliméricas no muestran un cambio pronunciado del color con los cambios de pH y temperatura, lo cual es característico de las antocianinas monoméricas (Wrolstad *et al.* 2005). Adicionalmente, el grado de polimerización de los compuestos fenólicos presenta un marcado efecto sobre la actividad antioxidante, siendo así los compuestos poliméricos más potentes como antioxidantes que los monómeros (García 2005).

En este caso, los vinos que continuaron con fermentación maloláctica presentaron un contenido de antocianinas poliméricas mayor al de los vinos que completaron únicamente la fermentación primaria (Cuadro 11), lo cual se debe a que el contenido de antocianinas monoméricas va disminuyendo durante la fermentación y añejamiento de los vinos (Tsai *et al.* 2004).

Cuadro 11. Contenido de antocianinas poliméricas (%). II

	Fermentación			
	Alcohólica		Maloláctica	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
Cáscara de uva	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°
Presencia de cáscara	57.4 ± 17.7 ^{bc}	34.5 ± 9.22 ^d	69.8 ± 2.95 ^{ab}	40.3 ± 4.04 ^{cd}
Ausencia de cáscara	72.3 ± 20.1 ^{ab}	47.9 ± 5.31 ^{cd}	84.5 ± 0.36 ^a	50.9 ± 1.01 ^{cd}

^{a-b} Medias con letras diferentes entre tratamientos indican que hubo diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

DE° Desviación Estándar

El contenido de etanol no tuvo grandes diferencias entre los vinos y sus valores se encontraron dentro de los límites (12-14%) (Jackson 2000); sin embargo, el vino fermentado malolácticamente en ausencia de cáscara de uva y a una temperatura fría presentó el contenido de etanol más alto (Cuadro 12).

Cuadro 12. Contenido de etanol total (%). II

	Fermentación			
	Alcohólica		Maloláctica	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
Cáscara de uva	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°
Presencia de cáscara	11.2 ± 0.52 ^{bc}	11.2 ± 0.94 ^{bc}	11.5 ± 0.42 ^{ac}	11.1 ± 0.38 ^c
Ausencia de cáscara	12.1 ± 0.08 ^{ab}	11.6 ± 0.20 ^{ac}	11.9 ± 0.08 ^{ac}	12.1 ± 0.47 ^a

^{a-b} Medias con letras diferentes entre tratamientos indican que hubo diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

DE° Desviación Estándar

En general, los vinos producidos por fermentación maloláctica presentaron una acidez total menor y un pH mayor al de los vinos producidos por fermentación alcohólica (Cuadro 13 y 14), logrando el efecto principal de la fermentación secundaria (reducción de acidez), para obtener vinos más suaves y con un mejor cuerpo; lo cual se debe a que el ácido málico, con características más agresivas y pronunciadas, es reemplazado por el ácido láctico. Uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas es el pH.

Dependiendo del pH las antocianinas pueden existir en cuatro especies diferentes: base quinoidal, catión flavilio, pseudobase carbinol y chalcona. En soluciones muy ácidas ($\text{pH} < 0.5$) el catión flavilio rojo es la única estructura. Con incrementos de pH la concentración del catión decrece dando lugar a la base de carbinol incolora. Entre pH 4 y 5.5 habrá poco color, ya que las dos formas coloreadas estarán en bajas concentraciones y el equilibrio se desplazará a las formas incoloras. Por lo tanto, la forma chalcona es la más susceptible a la degradación, y la forma iónica flavilio es la más estable. (Chandra *et al.* 1992). Hubo un leve incremento en el pH durante la fermentación maloláctica, en donde

la mayoría de los vinos alcanzaron un pH de 4, aproximadamente, por lo cual se esperaba que dichos vinos presenten menor color que los vinos fermentados alcohólicamente.

Cuadro 13. Valores de pH de los vinos Black Spanish. II

	Fermentación			
	Alcohólica		Maloláctica	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°
Cáscara de uva				
Presencia de cáscara	3.81 ± 0.02 ^d	3.87 ± 0.06 ^c	4.08 ± 0.01 ^a	4.05 ± 0.01 ^{ab}
Ausencia de cáscara	3.78 ± 0.01 ^{de}	3.74 ± 0.02 ^e	4.02 ± 0.03 ^b	4.02 ± 0.01 ^b

^{a-b} Medias con letras diferentes entre tratamientos indican que hubo diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

DE° Desviación Estándar

Cuadro 14. Acidez total (%) de los vinos Black Spanish

	Fermentación			
	Alcohólica		Maloláctica	
	29-32 °C	13-14 °C	29-32 °C	13-14 °C
	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°	Media+DE°
Cáscara de uva				
Presencia de cáscara	8.40 ± 0.91 ^{ab}	8.10 ± 0.60 ^{ab}	6.60 ± 1.05 ^c	5.80 ± 0.17 ^c
Ausencia de cáscara	8.85 ± 0.26 ^a	7.25 ± 1.50 ^{bc}	6.05 ± 0.09 ^c	6.05 ± 0.61 ^c

^{a-b} Medias con letras diferentes entre tratamientos indican que hubo diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$).

DE° Desviación Estándar

4. CONCLUSIONES

- Los vinos Black Spanish fermentados junto con la cáscara de la uva presentaron mayor contenido de antocianinas y fenoles totales que los vinos fermentados sin la cáscara de la piel. Sin embargo, éstos últimos presentaron el mayor contenido de antocianinas poliméricas.
- El porcentaje de etanol presente en los vinos Black Spanish fermentados a temperatura fría (13-14 °C) fue relativamente bajo, lo cual se debió probablemente al estrés de la levadura causado por las temperaturas extremas.
- La presencia de la cáscara de la uva durante la fermentación junto con una temperatura cálida de fermentación (29-32 °C), son factores que contribuyen en la elaboración de vinos Black Spanish con un mayor contenido de compuestos fenólicos y antocianinas.
- Los vinos Black Spanish fermentados malolácticamente en contacto con la cáscara de la uva presentaron mayor contenido de fenoles y antocianinas totales que los vinos que completaron únicamente la fermentación alcohólica. Al mismo tiempo, se produjo una reducción de acidez durante la fermentación secundaria.

5. RECOMENDACIONES

- Hacer un análisis sensorial de los vinos Black Spanish evaluados, utilizando un método de análisis descriptivo de Perfil de Sabor.
- Identificar los compuestos fenólicos presentes en el vino Black Spanish al finalizar la fermentación maloláctica mediante HPLC o cromatografía de gases GC.

6. LITERATURA CITADA

Acree, T. E; Braell, P. A; Butts, R. M. 1981. The presence of damascenone in cultivars of *Vitis vinifera* (Linnaeus), *rotundifolia* (Michaux), y *labruscana* (Bailey). J. Agric. Food Chem. 29: 688-690.

Amerine, M; C. Ough. 1976. Análisis de vinos y mostos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 153.

Buzombo, P; Jaimes, J; Lam, V; Cantrell, K; Harkness, M; McCullough, D; Morano, L. 2006. An American hybrid vineyard in the Texas gulf coast: analysis within a Pierce's Disease hot zone. American Journal Enol. Vitic. 53(3): 347-355.

Chandra, A; Nair, M; Lezzoni, A. 1992. Evaluation and Characterization of Anthocyanin Pigments in Tart Cherries. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 40: 867-898.

Corder, R; Mullen, W; Khan, N.Q.; Marks, S.C; Wood, E.G; Carrier, M.J; Crozier, A. 2006. Red wine procyanidins and vascular health. Nature. 444: 566.

Davis, C.R; Wibowo, R; Eschenbruch, Lee; G. H; Fleet. 1985. Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review. Am. J. Enol. Vitic (California: American Society for Enology and Viticulture). 36 (4): 290-301.

Galet, P. 1979. A Practical Ampelography Grapevine Identification. L.T. Morton, trans. Cornell University Press, Ithaca.

García, A. 2005. Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral Europea. Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Murcia, España.

German, J. B; Walzem, R.L. 2000. The health benefits of wine. Annu. Rev. Nutr. 20: 561-593.

Harbertson, J; Spayd, S. 2006. Measuring phenolics in the winery. American Journal Enol. Vitic. 57(3): 280- 288.

Hasler, C.M. 2009. Exploring the health benefits of wine. Food technology. 63(9): 21-25.

He, S; Sun, C.R; Pan, Y.J. 2008. Red wine polyphenols for cancer prevention. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 842-853.

Hogan, S; Zhang, L, Li, J, Zoecklein, B, Zhou, K. 2009. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinífera*) wine grapes. *LTW- Food Science and Technology*. 42: 1269- 1274.

Issuree, P.D; Pushparaj, P.M; Pervaiz, S; Melendez, A. 2009. Resveratrol attenuates C5a-induced inflammatory responses in vitro and in vivo by inhibiting phospholipase D and sphingosine kinase activities. *FASEB J.* 23(8): 2412- 2424.

Jackson, R.S. 2000. *Wine science: Principles, practice, perception*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego.

Jurd, L. 1964. Reactions involved in sulfite bleaching of anthocyanins. *Journal of Food Science*. 29(1): 16 – 19.

Klatsky, A. 2009. Alcohol and cardiovascular diseases. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 7: 499- 506.

Kloner, R.A; Rezkalla, S.H. 2007. To drink or not to drink? That is the question. *Circulation*. 116: 1306- 1317.

Lee, J; Durst, R.W; Wrolstad, R.E. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*. 88(5): 1269-1278.

Lindberg, M.L; Amsterdam, E.A. 2008. Alcohol, wine and cardiovascular health. *Clin. Cardiol.* 31(8): 347- 351.

López-Vélez, M; Martínez-Martínez, F; Valle-Ribes, C. 2003. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43(3): 233-244.

Mazza, G. 1995. Anthocyanins in grape and grape products. *Critical Review of Food Science and Nutrition*. 35: 341-371.

McEachern, G; Stein, L; Kamas, J. 1997. *Growing Pierce's Disease Resistant Grapes in Central, South and East Texas*. Texas A&M University.

Monagas, M; Bartolome, B; Gomez-Cordoves, C. 2005. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45: 85-118.

Muñoz- Espada, A.C; Wood, K.V; Bordelon, B; Watkins, B.A. 2004. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of concord, Norton and marechal foch grapes and wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52(22): 6779- 6786.

Opie, L.H; Lecour. 2007. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. *European Heart Journal*. 28(14): 1683-1693.

Panza, F; Capurso, C; Dilntrono, A; Colacicco, A.M; Frisardi, V; Lorusso, M; Santamato, A; Seripa, D; Pilotto, A; Scafato, E; Vendemiale, G; Capurso, A; Solfrizzi, V. 2009. Alcohol drinking, cognitive functions in older age, predementia, and dementia syndromes. *Journal Alzheimer's Dis*. 17(1): 7- 31.

Pongracz, D.P. 1983. *Rootstocks for Grapevines*. David Philip, London.

Renaud, S; De Lorgeril, M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. 339: 1523- 1526.

Ribereau-Gayon, P; Branco, J. M; Rychlewski, C. 2006. *Handbook of enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*, 2nd Edition.

Sesso, H.D; Cook, N.R; Buring, J.E; Manson, J.E; Gaiano, J.M. 2008. Alcohol consumption and the risk of hypertension in women and men. *Hypertension*. 51: 1080-1087.

Singleton, V. 1987. Oxygen with phenols and related reactions in must, wines and model systems, observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic*. 38: 69-77.

Stafne, E. 2009. *What are Cultivar Options Post-PD?*. Oklahoma State University.

Talcott, S; Del Follo, A; Talcott, S; Sipowicz, M. 2009. *Chemical Properties and Anti-Cancer Effects of Texas Wine*.

Tsai, J; Huang, H; Huang, T. 2004. Relationship Between Anthocyanin Patterns and Antioxidant Capacity in Mulberry Wine During Storage. *Journal of Food Quality*. 27: 497-505.

Viala, P; L. Ravaz. 1903. *American Vines (Resistant Stock): Their Adaptation, Culture, Grafting and Propagation*. R. Debois y E.H. Twight, trans. Freygart Lerry, San Francisco.

Wagner, GJ. 1982. Cellular and Subcellular Location in Plant Metabolism. In: Creazy L, Hrazdina G. (ed) *Recent advances in Phytochemistry*. New York, Plenum Press. 1-45.

Wannamethee, S.G; Camargo, C.A; Manson, J.E; Willet, W.C; Rimm, E.B. 2003. Alcohol drinking patterns and risk of Type 2 diabetes mellitus among younger women. *Arch. Intern. Med*. 163: 1329-1336.

Waterhouse, A. 2002. Wine phenolics. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 957: 21- 36.

Wrolstad, R.E; Durst, R.W; Lee, J. 2005. Tracking Color and Pigment Changes in Anthocynin Products. *Trends in Food Science and Technology*. 16: 423-428.

Yang, S; Shang-Tzen, C; Jyh-Horng, W; Sheng, W; Pei-Ling, K. 2001. Antioxidant Activity of Extracts from *Acacia confusa* Bark and Heartwood. *J. Agric Food Chem.* 49: 3420-3424.

7. ANEXOS

Anexo 1. Flujo de proceso para la elaboración de vino Black Spanish

