

**Evaluación del efecto antioxidante del
extracto de semillas de uva y estudio de
métodos para determinar el envejecimiento
acelerado en vinos tintos**

Rosa Elvira Taco Sosapanta

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Evaluación del efecto antioxidante del extracto de semilla de uva y estudio de métodos para determinar el envejecimiento acelerado en vinos tintos

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

Rosa Elvira Taco Sosapanta

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Evaluación del efecto antioxidante del extracto de semillas de uva y estudio de métodos para determinar el envejecimiento acelerado en vinos tintos

Rosa Elvira Taco Sosapanta

Resumen. El objetivo fue evaluar la capacidad antioxidante y la evolución de color en vinos tintos al añadir extracto de semillas de uva. Así mismo, se plantea la posibilidad de que el extracto mejore la capacidad de envejecimiento de los vinos. Las semillas procedentes de subproductos de vinificación de Moscatel pueden ser aprovechadas por su contenido en compuestos fenólicos. En este estudio se evaluó el contenido de fenoles totales de extractos de semillas mediante el método Folin Ciocalteau (33.72 mg ácido gálico/g semilla) y su capacidad antioxidante por los métodos ABTS y FRAP (46.56 y 35.29 μmol de Trolox por gramo de semilla, respectivamente). Los resultados indican que estas semillas son una fuente natural de compuestos fenólicos y antioxidantes. Así mismo, se evaluó el efecto de añadir estas semillas en diferentes vinos tintos (tradicional, corto y largo), en la etapa de maceración. El comportamiento de la evolución del contenido fenólico fue diferente en los vinos con adición de extracto de semillas. El vino de maceración largo de dos meses, presentó el mayor contenido en fenoles totales (3037.9 mg/L). En cuanto a la capacidad antioxidante, el vino con adición de extracto de semillas obtuvo mejores resultados en el ensayo de FRAP (1094.9, 908.81 y 1182.2 $\mu\text{mol/L}$). En dicho método, la adición de extracto de semillas produjo en los vinos un aumento significativo de la capacidad antioxidante con respecto al vino tradicional y corto. El presente estudio forma parte del proyecto de aprovechamiento de subproductos de vinificación.

Palabras clave: Capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, subproductos, vinificación.

Abstract. The objective was to evaluate the antioxidant capacity and color evolution in red wines when grape seed extract is added. Also, the possibility that the seed extract improves the aging capacity of wine is proposed. The seeds coming from the byproducts of Moscatel vinification can be utilized for their content in phenolic compounds. The objective of this study was to evaluate the total phenolic content from seed extracts obtained with the Folin Ciocalteau method (33.72 mg galic acid/g seed) and its antioxidant capacity by the ABTS and FRAP methods (46.56 and 35.29 μmol of Trolox per gram of seed, respectively). The results indicated that these seeds are a natural source of phenolic compounds and antioxidants. The effect of adding these seeds to different red wines (traditional, short and long) during the maceration stage, was also evaluated. The behavior of the evolution of the phenolic content in the wines was different when the seed extract was added. The long maceration wine of two months, presented the highest total phenolic content (3037.9 mg/L). In regarding to the antioxidant capacity, the wine with seed extract obtained better results through the FRAP method (1094.9, 908.8 and 1182.2 $\mu\text{mol/L}$). With this method, the addition of seed extract produced a significant increase in antioxidant capacity in comparison to traditional and short wines. This study is part of a project for the utilization of vinification subproducts.

Key words: Antioxidant capacity, phenolic compounds, subproducts, vinification.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4. CONCLUSIONES.....	23
5. RECOMENDACIONES.....	24
6. LITERATURA CITADA	25
7. ANEXOS.....	31

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de vinos tintos aplicados diferentes técnicas de elaboración.....	3
2. Muestras de tratamiento de vinos tintos.....	4
3. Soluciones para preparar la curva de calibración de fenoles totales y absorbancia a 765 nm.....	5
4. Fenoles totales de vinos tintos (mg/L) por el método Folin-Ciocalteu.....	13
5. Actividad antioxidante de vinos tintos método ABTS (μ moles/L).....	15
6. Actividad antioxidante de vinos tintos método FRAP (μ moles/L).....	13
7. Relación entre vinos tintos en contenido de fenoles totales y actividad antioxidante.....	15
8. Valores de claridad (L^*) de los vinos tintos con y sin adición de extracto de semillas.....	18
9. Valores de las coordenadas cromáticas a^* en los vinos tintos con y sin adición de extractos de semillas.....	18
10. Valores de las coordenadas cromáticas b^* en los vinos tintos con y sin adición de extracto de semillas.....	19
11. Relación entre vinos tintos en valores de claridad (L^*) y las coordenadas cromáticas a^* y b^*	19
12. Valores de croma (C^*ab) de los vinos tintos con y sin adición de extracto de semillas.....	20
13. Valores de tono (hab.) de los vinos tintos con y sin adición de extracto de semillas.....	20
14. Relación entre vinos tintos en valores de croma (C^*ab) y tono (hab.).....	20
Figuras	Página
1. Recta patrón para el método ABTS en espectrofotómetro.....	6
2. Ubicación de las muestras de vino, con y sin adición de extracto de semilla, en el diagrama de color (a^*b^*).....	21
Anexos	Página
1. Estudio Preliminar de Envejecimiento Acelerado en vinos tintos.....	31
2. Reactivos de actividad antioxidante.....	40
3. Equipos e instrumentos para la actividad antioxidante.....	41
4. Separación de semillas de uva blanca variedad Moscatel de orujo.....	41

Anexos	Página
5. Extracto de compuestos fenólicos de semillas de uva blanca variedad variedad Moscatel.....	41
6. Muestras de vinos tintos (tradicional, corto y largo).....	42
7. Preparación de tratamientos de vinos tintos (tradicional, corto y largo).....	42
8. Recta patrón para el método Fenoles totales en espectrofotómetro.....	42
9. Cubetas con las disoluciones patrón a distinta concentración y el reactivo ABTS.....	43
10. Cubetas con las disoluciones patrón a distinta concentración y el reactivo FRAP.....	43
11. Resumen de la significancia estadística sobre los tratamientos en vinos vinos tintos.....	44
12. Recta de muestra para el método ABTS en espectrofotómetro.....	45
13. Envejecimiento acelerado por ultrasonido de sonda.....	45
14. Envejecimiento acelerado en baño de ultrasonidos.....	46
15. Envejecimiento acelerado por microoxigenación.....	46
16. Pruebas de envejecimiento acelerado por ultrasonido de sonda en vinos tintos....	47
17. Pruebas de envejecimiento acelerado por método baño María en vinos tintos tintos.....	48
18. Prueba en envejecimiento acelerado por método químico en vinos tintos tintos.....	49
19. Pruebas de envejecimiento acelerado por microoxigenación en vinos tintos tintos.....	49

1. INTRODUCCIÓN

En la Europa mediterránea, el vino forma parte de la cultura alimentaria (Carbajal y Ortega 2001); España es el tercer productor de vino (37.8 mhl), superado solo por Italia (48.8 mhl) y Francia (41.9 mhl) (OIV 2017). En 2015, España se ha convertido en el segundo exportador de vino. Además, es el país con mayor superficie de viñedo (1,032 mha) (Castillo y Compés 2014).

Vitis vinífera sp. es la especie idónea para la producción de vinos (Cortiella 2013), originaria de Europa y Asia (Gordillo 2012). Entre las uvas tintas más comunes están las variedades Tempranillo y Syrah, y en uva blanca, Moscatel, y Pedro-Ximénez (Sánchez 2012). La pulpa constituye el mayor volumen de la uva; las semillas se presentan en formas, número y tamaño de acuerdo a la variedad; y el hollejo es la piel de la baya.

El proceso de vinificación transforma en vino el mosto o zumo de uva, mediante prácticas tradicionales y modernas (Ortiz 2014). El mosto se somete a una maceración con las partes sólidas y simultáneamente se produce la fermentación alcohólica, que lleva a cabo la transformación de azúcares en etanol. En un nuevo depósito, se produce una segunda fermentación denominada maloláctica, que es más lenta, donde el ácido málico se transforma en ácido láctico, que confiere al vino la finura y suavidad (Gordillo 2012).

Después de la fermentación el vino pasa al envejecimiento o crianza en barricas de robles, siendo, este vino mejor para ser comercializado en el mercado, debido a una mayor calidad en color, aroma y cuerpo (Tao *et al.* 2014a). Sin embargo, la crianza tiene desventajas como son: el tiempo (3-5 meses/años), donde ocurre una pérdida de vino por evaporación, el alto costo y el espacio ocupado por las barricas de maderas. Además, en algunas ocasiones, las barricas no pueden ser reutilizadas debido a contaminación de microorganismos como los géneros de levaduras *Brettanomyces* y *Dekkera*, que pueden estar en el interior de la madera (Tao *et al.* 2014b). Por consiguiente, se han desarrollado técnicas eficientes, no peligrosas, rápidas y económicas, que simulan un envejecimiento natural en corto tiempo.

El orujo es un subproducto de la vinificación. Está formado por semillas, hollejos y restos de pulpa de la uva, productos ricos en fenoles, por lo que este subproducto se considera una fuente natural de antioxidantes. Las semillas tienen el mayor contenido fenólico; especialmente contiene flavan-3-oles, compuestos por monómeros tales como ésteres de ácido gálico, y oligómeros. El hollejo es rico en flavonoles y antocianos (Jara *et al.* 2016). Los antocianos son pigmentos de la uva tinta que aparecen en el proceso de maduración, siendo los responsables del color rojo azulado en vinos tintos (Jara *et al.* 2015).

El color es uno de los parámetros organolépticos más importantes para la industria alimentaria, está relacionado con el atractivo visual y la calidad de los alimentos, es así, que influye directamente en la decisión de compra a los consumidores (Tiwari *et al.* 2010). El color del vino es distintivo de calidad, representando el 21% de las características organolépticas, superando características como la variedad, zona de origen, marca y precio. El color del vino se debe a que entre sus componentes están los antocianos que poseen actividad antioxidante (Castillo y Compés 2014).

La actividad antioxidante se describe como la habilidad de un compuesto para reducir especies reactivas (oxidativo) con significado patológico (Somogyi *et al.* 2007). Los antioxidantes naturales son importantes en el organismo por su capacidad para proteger, eliminar o retrasar el daño oxidativo de una molécula (Halliwell 2007). El estrés oxidativo son lesiones producidas por el desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno y los sistemas de defensa antioxidantes del organismo, es decir, existe una perturbación en el balance pro-oxidante-antioxidante a beneficio del pro-oxidante, provocando un daño potencial (oxidativo). Las especies reactivas son agentes oxidantes fácilmente convertibles en radicales libres (Halliwell 2012).

Los radicales libres son moléculas que reflejan en su estructura atómica un electrón no apareado, es decir, que ocupa una órbita por sí mismo; y son muy reactivas por la inestabilidad de su configuración electrónica (Halliwell 2012). Los compuestos antioxidantes captan de forma directa, los radicales libres, produciendo una oxidación entre ellos, y formando compuestos peróxidos mediante modulación de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo (Antolovich *et al.* 2002).

En los últimos años, se ha incrementado el estudio de los alimentos con altos contenidos de antioxidantes, y la mayoría son compuestos fenólicos que presentan efectos positivos en la salud. En este sentido, el consumo moderado de vino y subproductos de vinificación han demostrado ser beneficiosos en la prevención de enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo, tales como arterioesclerosis, diabetes (González 2010), y el envejecimiento celular (Luna *et al.* 2007).

La industria vinícola genera en Europa del 56 al 67% (Ruggieri *et al.* 2009) de subproductos, que poseen compuestos fenólicos con actividad antioxidante, debido a que España destina 97.4% de uva a la vinificación (ICEX 2015), estiman que de 100 kilos de uva, 50% son piel, 25% tallos y 25% semillas (OIV 2017). Tradicionalmente, estos subproductos se envían a destilerías para la obtención de alcohol vínico, o se usan como fertilizantes, aunque, representan costos elevados y contaminación ambiental (Jara *et al.* 2014a). Por tanto, este estudio, trata del aprovechamiento de subproducto de vinificación, específicamente las semillas, y su uso como fuente de fenoles, en forma de extracto de semilla de uva. Asimismo, se plantea la posibilidad de que esos extractos mejoren la capacidad de envejecimiento de los vinos. De este modo, los objetivos del trabajo son:

- Evaluar la actividad antioxidante y color de vinos tintos adicionados con extractos de semillas de uva blanca.
- Revisión bibliográfica planteada para el desarrollo de una nueva metodología de envejecimiento acelerado en vinos tintos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio.

El estudio se realizó en el laboratorio de Color y Calidad de Alimentos del Área de Nutrición y Bromatología (Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, España).

Muestras.

Semilla. Para el estudio se utilizaron semillas con un alto grado de maduración, procedentes de subproducto (orujo) de vinificación de uva blanca variedad Moscatel, de la bodega “Finca La Aurora”, de la Denominación de Origen Montilla Moriles (Córdoba, España). Este orujo se obtuvo de estudios anteriores y se mantuvo en congelación a -20 °C hasta su uso.

Vinos tintos. Los vinos tintos utilizados fueron cedidos por la bodega Cooperativa Nuestra Señora del Socorro, de la Denominación de Origen Condado de Huelva, localizada en Rociana del Condado (Huelva, España), procedentes de ensayos en los que se habían aplicado diferentes técnicas de elaboración (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción de vinos tintos aplicados diferentes técnicas de elaboración.

Tipos	Descripción
Tradicional (T)	Vinos de elaboración en tinto tradicional, que actúa como testigo de ensayo de vinificación.
Corto (C)	Vinos elaborados mediante maceración con adición de semillas al mosto por un periodo corto de tiempo (un mes).
Largo (L)	Vinos elaborados mediante maceración con adición de semillas al mosto por un periodo largo de tiempo (dos meses).

Preparación de las muestras de semillas.

Liofilización y molienda. Del orujo congelado se separaron manualmente las semillas de los hollejos y raspones a temperatura ambiente. Las semillas se congelaron a -80 °C durante 24 horas, y posteriormente se liofilizaron en un equipo Cryodos-80 Telstar®, acoplado a una bomba Varian DS 102, por el mismo tiempo. A continuación se pulverizó cada muestra

en un molino IKA A11-B durante 10 segundos con el fin de reducir el tamaño de partículas y conseguir un nivel de homogenización adecuado. El contenido de humedad (en porcentaje) se calculó siguiendo la Ecuación 1.

$$\% \text{ Humedad} = [\text{Peso fresco} - \text{peso seco} / \text{Peso fresco}] \times 100 \quad [1]$$

Extracción de compuestos fenólicos. Se utilizaron tubos falcon de 50 mL, en los que se pesó 1 g y 2 g del polvo liofilizado de muestra, utilizando una balanza analítica de precisión, y se añadieron 5 mL de disolvente (vino sintético) a cada tubo. La mezcla obtenida se agitó durante 24 horas en un agitador magnético Vortex IKA Genios 3. Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos, en centrifuga Allegra X-12R Centrifuge, a 4000 rpm y 10 °C. Se retiró el sobrenadante (extracto líquido) con ayuda de una pipeta Pasteur con bulbo, y para conservarlo se depositó en un tubo falcon de 50 mL de capacidad. El residuo sólido se sometió al mismo proceso dos veces más, con agitación de 45 minutos. Se reunieron todos los extractos líquidos y se congeló a -20 °C para su posterior análisis. Las extracciones se realizaron por duplicado.

Preparación de tratamientos.

Se seleccionó el extracto de semilla que contenía mayor concentración fenólica (procedente de 2 g de semillas), mediante el método ABTS. Se prepararon tres tipos de muestras para poder determinar el efecto global de la adición de extracto de semilla, eliminando el efecto de dilución que se produce al añadir la cantidad de extracto al vino, así como la influencia del color que pueda aportar el extracto (Cuadro 2).

Cuadro 2. Muestras de tratamiento de vinos tintos.

Muestras	Descripción
Vino tinto sin extracto	9 mL vino tinto y 1 mL vino sintético
Vino tinto con extracto	1.8 mL vino tinto, 0.2 mL extracto
Extracto de semilla	9 mL vino sintético y 1 mL extracto

Las muestras se depositaron en tubos falcon de 10 mL y se agitaron manualmente cada una. Todas las mezclas se dejaron reposar durante 4 horas, antes de realizar los posteriores análisis, y tras ser analizadas, se congelaron a -20 °C para su conservación.

Métodos.

Determinación de fenoles totales.

Método Folin-Ciocalteu. Los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo Folín-Ciocalteu, formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{HW}_{12}\text{O}_{40}$) y fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) que se reduce en una mezcla de óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno

(Mo₈O₂₃) de coloración azul. Presenta un espectro con máximo de absorción a una longitud de onda de 765 nm, que es proporcional a la cantidad de fenoles totales.

Se llevó a cabo según el protocolo de Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Para la recta de calibrado se realizaron 6 diluciones de ácido gálico (patrón) de diferentes concentraciones (0-500 mg/L) (Cuadro 3). Se tomó 0.25 mL de cada disolución patrón, 1.25 mL de reactivo Follin-Ciocalte y 3.75 mL de disolución de carbonato sódico (Na₂CO₃) al 20%. La mezcla se homogenizó y se enrasó a un volumen de 25 mL con agua destilada.

Finalmente se dejó reposar durante 2 horas a temperatura ambiente para que la solución se estabilice. Se midió la absorbancia a 765 nm en cubeta de 10 mm de paso de luz en el Espectrofotómetro de diodos UV-Vis HP 8453. Para el análisis de muestra se preparó de manera similar a los patrones, pero con 25 µL de muestra y las mismas cantidades de reactivo (1.25 mL) y carbonato de sodio (3.75 mL).

Cuadro 3. Soluciones para preparar la curva de calibración de fenoles totales y absorbancia a 765 nm.

Concentración mg/L	Absorbancia 765 nm
0	0.06495
50	0.11318
100	0.17958
150	0.23236
250	0.38929
500	0.68095

Determinación de actividad antioxidante.

Método ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenziltiazolina) sulfónico). El método ABTS mide la capacidad de los compuestos antioxidantes para captar el radical coloreado ABTS en un medio acuoso, convirtiéndolo en un producto decolorado. Se basa en la generación del radical catiónico ABTS por la oxidación de su precursor, el ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenziltiazolina) sulfónico (ABTS), con persulfato potásico. Este radical, de coloración verde-azulada, es estable hasta 16 horas a baja temperatura y se caracteriza por su máximo de absorción a una longitud de onda de 734 nm. A este radical formado se añade el patrón antioxidante Trolox o la muestra y se mide el descenso de absorbancia producido, ya que la coloración desaparece al ser reducido el radical por los antioxidantes.

La actividad antioxidante se cuantificó mediante una modificación de la técnica espectrofotométrica desarrollada por Re *et al.* (1999). Primero se preparó una disolución de ABTS en agua desionizada hasta alcanzar una concentración de 7 mM. A continuación, se formó el catión radical con la disolución de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) 2.45 mM. Por tanto, el K₂S₂O₈ se preparó con la disolución ABTS (7 mM). La mezcla se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas antes de su uso para que se complete la reacción.

Una vez formado el radical, se preparó el reactivo de trabajo diluyendo la disolución ABTS con un tampón fosfato salino a pH 7.4 hasta obtener un valor de absorbancia a 734 nm de 0.7 ± 0.02 , medido en el espectrofotómetro de diodos UV-Vis Agilent 8453, con una cubeta de 10 mm de paso de luz.

Como blanco de referencia, se midió la absorbancia a 734 nm del reactivo de trabajo (2 mL) en cubeta de 10 mm. Posteriormente, se agregó 50 μL de muestra y se agitó en agitador de orbital digital Nahita[®] 685/2 durante 20 segundos, y se midió la absorbancia después de 4 minutos de reposo. Se analizaron 4 diluciones (1/100, 1/200, 1/400, 1/800) y todas las muestras se estudiaron por duplicado.

Para la curva de calibración se preparó una disolución madre de Trolox 1 mM. Se realizaron 5 diluciones del patrón Trolox en concentraciones crecientes (de 0.031 a 1 mM) usando tampón PBS (fosfato salino). Para la medida de actividad antioxidante de estas disoluciones se procedió de la misma manera que con las muestras.

Con las disoluciones patrón de Trolox se obtuvo la recta de calibración, representado la absorbancia frente a la concentración y se determinó la pendiente (Figura 1). De igual forma, se obtiene la recta para las disoluciones preparadas a partir de la muestra y se comparan las pendientes de ambas rectas. Los resultados se expresan como actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC: *Trolox-equivalent antioxidant capacity*): micromoles de Trolox Equivalente por gramo de semilla seca ($\mu\text{moles TE/g}$), o por litro de vino ($\mu\text{moles TE/L}$) (Jara *et al.* 2014b).

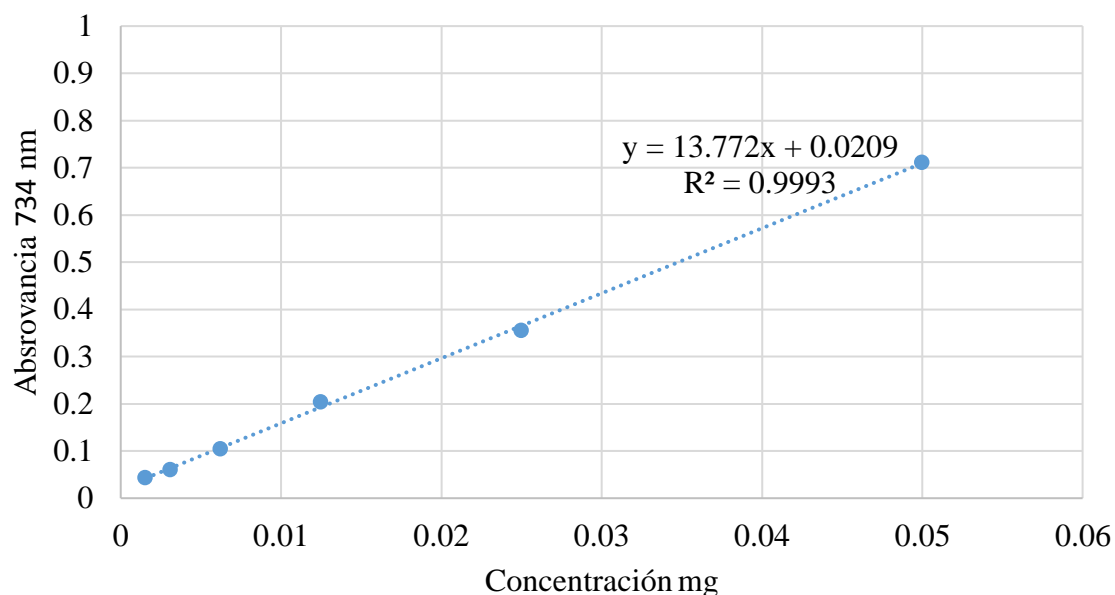


Figura 1. Recta patrón para el método ABTS en espectrofotómetro.

Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). El método FRAP se basa en la capacidad que presentan los compuestos antioxidantes para donar electrones y reducir el ion férrico a ferroso en medio acuoso. Para ello, se provoca una reacción por la adición del compuesto TPTZ (2, 4, 6 tripiridyl-s-triazina), que a pH ácido (pH=3.6), y se une al ion ferroso formando un compuesto de color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm.

Se preparó el reactivo de trabajo en una proporción 10/1/1 (v/v/v) de solución TPTZ, tricloruro férrico y tampón acetato a pH 3.6, y se midió la absorbancia a 593 nm en un espectrofotómetro de diodos UV-Vis Agilent 8453, procurando que ésta fuera menor o igual a 0.2 unidades de absorbancia.

Se midió la absorbancia a 593 nm del blanco de referencia PBS (fosfato salino) en cubeta de 10 mm. Posteriormente, se añadió 100 μ L de muestra y se agitó durante 20 segundos, después de 6 minutos de incubación se realizó la lectura en absorbancia, y a ésta se le restó el valor del blanco. Se analizaron 4 diluciones en diferentes concentraciones (1/100, 1/200, 1/400, 1/800) y todas las muestras por duplicado. La medida de actividad antioxidante con las disoluciones patrón de Trolox se realizó de la misma manera que para las muestras.

Con las disoluciones patrón de Trolox se obtuvo la recta de calibración, representado la absorbancia frente a la concentración y se determina la pendiente. De igual forma, se obtiene la recta para las disoluciones preparadas a partir de la muestra y se comparan las pendientes de ambas rectas. Los resultados se expresan como actividad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC: *Trolox-equivalent antioxidant capacity*): micromoles de Trolox Equivalente por gramo de semilla seca (μ moles TE/g), o por litro de vino (μ moles TE/L) (Jara *et al.* 2016).

Color.

Colorimetría Triestímulo. Considera los cambios espectrales en el intervalo completo de las longitudes de onda visible (380-780 nm) (Gordillo *et al.* 2010a). Permite obtener valores triestímulo, X, Y, Z, los cuales definen el color de las muestras, siendo el punto de inicio para calcular el resto de variables cromáticas del espacio de color CIE 1976 $L^*a^*b^*$ (CIELAB). Emplea coordenadas de color cilíndricas (L^* , C^*_{ab} , h_{ab}), y rectangulares (L^* , a^* , b^*) (CIE, 2004). Asimismo, es posible comparar muestras mediante el parámetro colorimétrico *diferencia de color* ΔE^*_{ab} (Jara *et al.* 2014a).

El parámetro L^* expresa la claridad, cuyos valores del eje vertical están entre 0 (negro) y 100 (blanco), el croma C^*_{ab} indica la viveza del color, mayor cuanto más se aleja del eje de coordenadas, y el tono (h_{ab}) que está definido por la posición angular del espacio cilíndrico de 0 a 360°, e indica la propiedad cualitativa que comúnmente define a un color.

Se midió el color de las muestras por espectrofotometría de transmisión en un espectrofotómetro de diodos UV-Vis HP 8453, se registraron todos los espectros visibles entre 380 nm hasta 780 nm, en una cubeta de 2 mm de paso de luz.

Para el blanco de referencia se midió agua destilada en cubeta de 2 mm. Para las muestras se tomó 1 mL con una jeringa, se filtró con filtro de fibra de vidrio de 13×0.45 mm en el portafiltros, y se lavó la cubeta con la misma muestra con el propósito de evitar la intervención de la muestra anterior. A continuación, se llenó en la cubeta con la muestra filtrada y antes de la medida, se observó que no esté en suspensión burbujas de aire que interfieran en la medida. Posteriormente se registró el espectro visible mediante espectrofotometría de transmisión.

A partir de los espectros de absorción registrados, se calcularon las coordenadas colorimétricas rectangulares (L^* , a^* , b^*) y cilíndricas (L^* , C^*ab , hab) de las muestras, las cuales permiten describir el color en cada situación y localizarlo en el espacio de color CIELAB. Los parámetros de color se obtuvieron con el programa de cálculo original CromaLab[®] (Heredia *et al.* 2004) el cual tiene en cuenta las recomendaciones de la Comisión Internacional de Iluminación (CIE 2004): Observador patrón de 10° e iluminante estándar CIE D65.

Análisis estadístico. Se realizó un diseño factorial de 3×2 : tres vinos tintos (T, C, L) y dos factores o tratamientos, siendo éstos, la concentración de extractos de semillas y la concentración de disolvente vino sintético. Los ensayos se efectuarán por triplicado. Para evaluar las diferencias significativas se utilizó una prueba Duncan, estableciendo un nivel de significancia $P < 0.05$.

Los resultados obtenidos fueron analizados por el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.3[®]), Los datos obtenidos se trataron por un análisis de varianza (ANOVA), con el fin de determinar si las diferencias observadas entre los vinos son significativas estadísticamente. De acuerdo al propósito de esta investigación las diferencias deben ser ejercidas por la adición de extractos de semillas, para encontrar diferencias significativas de medias en las variables de actividad antioxidante y la estabilidad del color.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Semilla de uva.

Fenoles totales. El contenido de fenoles totales del extracto de semilla de uva variedad Moscatel fue 33.72 mg ácido gálico/g semilla. Existen estudios que demuestran que en su mayoría son flavanoles o también llamados flavan-3-oles, pertenecientes a la familia de compuestos flavonoides que, con grado de polimerización variable dan lugar a la unión de dos o más unidades, nombrados como oligómero (proantocianidinas) y polímeros, los cuales poseen la capacidad de interactuar con proteínas y polisacáridos vegetales (Gordillo *et al.* 2012, Jara *et al.* 2016).

Jara *et al.* (2014c) obtuvieron un valor de fenoles totales de 21.94 mg/g en extractos de orujo de la variedad de uva blanca Moscatel. La diferencia en la cantidad de fenoles totales con respecto a este estudio, podría ser debido principalmente al subproducto que utilizaron, el cual fue orujo. Este está conformado por semilla, hollejos y restos de pulpa, pero la mayor proporción de contenidos fenólicos se encuentran en las semillas. Otras discrepancias son el disolvente del extracto utilizados en los ensayos; el tamaño de partícula; y la variedad de uva.

Referente al disolvente, estudios demuestran que el metanol al 75% es preferido para la extracción de contenidos en fenoles totales, tal como Jara *et al.* (2014b) utilizaron en su ensayo. El metanol facilita la extracción, esto puede deberse a que es una sustancia que aumenta la solubilidad del material orgánico con menor polaridad, permitiendo de esta manera obtener más cantidad de extracto de semilla. Aunque este no es recomendado para uso con fines alimenticios (Guntero *et al.* 2015). Caso contrario ocurre con el vino sintético ocupado en este estudio como disolvente en grado alimenticio para los ensayos.

La cantidad de fenoles totales está influenciado también por la variedad de uva, de este modo, estudios en semilla de uva blanca variedad Zalema llevados a cabo por Jara *et al.* (2014b), reportaron un contenido de fenoles totales de 65 mg/g de peso seco al emplear 5 g de muestra y 25 mL de disolvente (metanol al 75%). Jara *et al.* (2017) evaluaron con la misma variedad de uva, cantidad de muestra y disolvente, donde obtuvieron un valor de fenoles totales de 48 mg/g de peso seco. Así de esta manera se corrobora la similitud en contenido en fenoles totales con semillas de la variedad Zalema.

Del mismo modo, Martos (2016), al evaluar la semilla de variedad de uva Pedro Ximénez, encontró fenoles totales de 49.54 mg/g, siendo, similar a lo encontrado por Jara *et al.* (2016) con 55.35 mg/g. Esto indica que los valores son análogos entre las mismas variedades, pero

son distintos al ser comparadas con otras, a pesar de que estas pertenecen a uva blanca, de la misma especie *Vitis vinifera* sp.

Actividad antioxidante. Por otro lado, se evaluó la actividad antioxidante del extracto de semilla de uva variedad Moscatel. Los resultados obtenidos mediante el método ABTS fueron 46.56 $\mu\text{moles TE/g}$ semilla seca. Este valor se obtuvo a partir de las pendientes de pérdida de absorbancia de ABTS en función del volumen de la muestra utilizada, y se compararon con el Trolox obtenido. Finalmente, también se evaluó la actividad antioxidante por el método FRAP, donde se obtuvo las pendientes de ganancias de absorbancia en función del volumen de la muestra utilizada, y se compararon con el Trolox obtenido. El valor fue de 35.29 $\mu\text{moles TE/g}$ semilla seca.

Los valores de actividad antioxidante obtenidos en este estudio por el método ABTS son menores a los conseguidos por Jara *et al.* (2014c), donde su valor fue de 314.2 $\mu\text{moles TE/g}$ semilla seca, utilizando la misma variedad de uva blanca Moscatel como lo empleado en este ensayo. Aunque manejaron distinto subproducto (orujo) y disolvente (metanol) para la extracción de compuestos de la semilla.

Si bien se sabe que la actividad antioxidante está relacionada con el contenido fenólico, se habla principalmente en dicha relación de los compuestos flavanoles. Estos se reflejan como la cantidad mayoritaria (8.74 mg/g) en el orujo, los cuales son característicos de las semillas. Autores indican que el método ABTS se considera en ocasiones como la actividad antioxidante más global, debido al reactivo soluble que se utiliza en el método, en solventes acuosos y orgánicos, por lo tanto, lo hace un método apto para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica de extractos (Prior *et al.* 2005; Schlesier *et al.* 2009).

Existen estudios con otras variedades de uva, como el realizado por Jara *et al.* (2014b) con diferentes subproductos obtenidos de la variedad de uva blanca Zalema, en el cual encontraron valores de 966.4 y 386.1 $\mu\text{moles TE/g}$ de semilla seca en ABTS y FRAP, respectivamente. Martos (2016) evaluó semillas de la misma variedad (Zalema) y encontró valores similares a los obtenidos por Jara *et al.* (2016) con ABTS (498.54 $\mu\text{moles TE/g}$ de semilla seca) y FRAP (249.83 $\mu\text{moles TE/g}$ de semilla seca). Estos resultados son mayores a los datos de este estudio con variedad Moscatel.

Aunque con la variedad Pedro Ximénez, los valores en ABTS y FRAP fueron 482.4 y 226.9 $\mu\text{moles TE/g}$ de semilla seca respectivamente (Jara *et al.* 2016), estos valores siguen siendo mayores a los encontrados con semilla Moscatel en ambos métodos de actividad antioxidante. El disolvente utilizado en dichos estudios fue metanol al 75%, el cual permite un mayor rendimiento de extracción de los fenoles, reflejando, por tanto, valores más elevadas de actividad antioxidante.

No obstante, es importante destacar que la comparación de resultados es difícil, los valores no solo están relacionado con la variedad de uva, sino, con otro factor existente, que es el estado de maduración de la uva. Es así, que en un clima cálido la maduración fenólica tanto de la pulpa como la semilla no son paralelas (Gordillo 2012).

Los fenoles existentes en la semilla de uva se destacan positivamente en el vino, por consiguiente, también en la salud humana. La semilla contiene un 60% de estos compuestos (Fuentes 2014), entre los cuales destacan los monómeros como el ácido gálico, la catequina, y los oligómeros como las procianidinas. Los polifenoles extraídos de las semillas actúan como antimutagénico, agentes antivirales, presión arterial.

En la presión arterial los flavonoides de las semillas mejoran la circulación de la sangre, específicamente las procianidinas aumentan la resistencia del plasma sanguíneo contra el estrés oxidativo (Paladino 2000). Poseen características propias los compuestos fenólicos como la posibilidad de inhibir la oxidación de las lipoproteínas humanas de baja densidad (LDL) (Ahn *et al.* 2002).

En un estudio realizado por un periodo de cuatro semanas en personas con presencia de presión arterial elevada y con síndrome metabólico (factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria y diabetes tipo II), se administraron dosis de 150 mg/dL y 300 mg/dL de extracto de semillas. Los resultados mostraron que los compuestos fenólicos del extracto fueron absorbidos, debido a que manifestaron la reducción sobre la presión arterial en los participantes. Además, observaron que su capacidad antioxidante podría disminuir las concentraciones de Oxidasa- LDL en el plasma (Malik *et al.* 2004).

Posteriormente, Robinson *et al.* (2012) llevaron a cabo un ensayo similar, pero esta vez con mayor periodo de tiempo (8 semanas) y personas de entre 25 a 80 años de edad con pre-hipertensión. Se aplicó una dosis de 300 mg/día de semillas de uva. Al finalizar el tratamiento, se observó una reducción de la presión arterial conjuntamente con la concentración de LDL oxidasa. Confirmándose, de esta forma, uno de los beneficios de los compuestos fenólicos en el cuerpo humano.

Park *et al.* (2016) desarrollaron otro ensayo con personas entre 35 y 64 años de edad con pre-hipertensión. Suministraron una bebida con extracto de semilla de uva con 150 mg y 300 mg dos veces al día durante 6 semanas. El cambio fue significativo en la reducción de la presión arterial que pasó de 125 mmHg a 118 mmHg. Esto sin perjudicar el peso corporal de los participantes durante el estudio y sin ningún efecto adverso. Además, las bebidas fueron toleradas por los consumidores.

Comprobada la importancia de los compuestos fenólicos, éstos han sido considerados parte fundamental de la dieta para la prevención de enfermedades crónicas como cáncer, degeneración neuronal relacionada con la edad, diabetes, oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y enfermedades cardiovasculares (González 2010). Sin embargo, su eficiencia está dada por la biodisponibilidad y el metabolismo de dichos compuestos. En el caso de personas con obesidad y diabetes, presentan dificultad para la absorción adecuada de dichos compuestos, debido probablemente a los estados patológicos que presentan (Redan *et al.* 2016).

La biodisponibilidad fenólica y el metabolismo pueden estar relacionados con el aumento del estado inflamatorio, causado por el incremento de tejido adiposo o altas concentraciones de glucosa en el plasma. Para personas con enfermedades de obesidad y diabetes se deben considerar estrategias en la dosificación con terapias complementarias, y así mejorar la

biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, aunque en la actualidad faltan más estudios (Redan *et al.* 2016).

Vinos tintos.

Fenoles totales. Los compuestos fenólicos totales en los vinos tintos resultaron significativamente diferentes entre tratamientos ($P < 0.005$), siendo la muestra de vino largo la que reflejó un cambio mayor (3037.9 mg/L) al ser añadido el extracto de semillas de uva, seguido del vino corto y el tradicional (2861.7 mg/L y 2482.4 mg/L respectivamente) (Cuadro 4). Caso contrario no presentaron diferencias significativas entre los tipos de vinos tintos (tradicional, corto, largo) (Cuadro 7).

Los compuestos fenólicos producen una coloración azul al oxidarse con el reactivo Folín-Ciocalteu (Singleton y Rossi 1965). Se mide la absorbancia a 765 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro tras terminar la reacción (2 horas). Esto facilita a los investigadores la posibilidad de realizar muestras continuas optimizando el tiempo y reduciendo la variabilidad de los resultados al tener varias muestras. El contenido total de compuestos fenólicos en los vinos tintos con los tratamientos se muestra en el Cuadro 4.

En los vinos utilizados en el ensayo se observó la generación de color azul dependiendo del tipo de vino, distintivo de la concentración de compuestos fenólicos que poseen. Esto se debe a que el reactivo al estar formado por wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico, reacciona con los compuestos fenólicos presentes en las muestras. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido) de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que observamos y medimos su absorbancia para calcular y evaluar el contenido en polifenoles (García *et al.* 2010).

En el vino la máxima extracción de compuestos fenólicos o polifenoles se presenta en el proceso de vinificación en especial en la etapa de maceración prefermentativa (Gordillo *et al.* 2014). Estos compuestos podrían mejorar las propiedades biofuncionales y sensoriales de los vinos tintos, siendo responsables del aroma y estabilidad del color (Brossaud *et al.* 2001; Lapornik *et al.* 2005).

Los compuestos fenólicos son beneficiosos para la salud ya que actúan en la disminución de enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer, la diabetes (González *et al.* 2015), preservación de las enfermedades cardiovasculares; dentro de estas ayudan en la disminución de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), disminución del proceso inflamatorio en la placa de ateroma, inhibición de la agregación plaquetaria, estimulación de la síntesis de óxido nítrico, estabilización de las fibras de colágeno de la pared arterial, y actuación como fitoestrógenos (Creus 2004).

Cuadro 4. Fenoles totales de vinos tintos (mg/L) por el método Folin-Ciocalteu.

Tipos	Tratamientos	
	Sin extracto (media ± D.E)	Con extracto (media ± D.E)
Tradicional	1316.0 ± 360.2 ^a	2482.4 ± 133.6 ^b
Corto	1092.7 ± 304.0 ^a	2861.7 ± 258.5 ^b
Largo	1366.3 ± 220.6 ^a	3037.9 ± 266.1 ^b
C.V (%)	14.09	

Letras diferentes de izquierda a derecha indican diferencias entre tratamientos (P<0.05).

D.E.= Desviación estándar.

C.V = Coeficiente de Variación.

Cuadro 5. Actividad antioxidante de vinos tintos método FRAP (µmoles/L).

Tipos	Tratamientos	
	Sin extracto (media ± D.E)	Con extracto (media ± D.E)
Tradicional	520.74 ± 71.73 ^a	1094.9 ± 268.24 ^b
Corto	511.16 ± 67.76 ^a	908.81 ± 310.57 ^b
Largo	294.07 ± 128.68 ^a	1182.2 ± 72.49 ^b
C.V(%)	22.99	

Letras diferentes de izquierda a derecha indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).

D.E.= Desviación estándar.

C.V = Coeficiente de Variación.

Estudios previos indican que el efecto sobre el contenido fenólico del vino depende de la cantidad que se adicione de semillas, ya que en mayores concentraciones podría afectar la calidad del vino (Gordillo *et al.* 2014), percibido en la astringencia (Ferrer *et al.* 2016). Es recomendado el uso de fuentes naturales para añadir fenoles al vino, siendo una interesante alternativa inocua para mejorar la estabilidad del color y las propiedades organolépticas (Gordillo *et al.* 2015). Es por ello, que existen estudios con adición de semilla de uva blanca en la vinificación de vinos tintos para mejorar su estabilidad cromática, sobretodo en climas cálidos donde la maduración fenólica de la pulpa con la semilla no son paralelas (Gordillo 2012).

Cejudo *et al.* (2016) observaron el comportamiento colorimétrico y fenólico de vinos tintos tras la adición de un hidrolizado enzimático de semillas de uva durante la vinificación. Los resultados obtenidos son niveles inferiores de fenoles totales a los obtenidos con la adición de extractos de semilla en este estudio. Las cantidades empleadas de hidrolizado enzimático fueron de 250 g y 500 g. Después de 150 días desde la adición de los hidrolizados se observó

que el vino al que se adicionó 250 g de semillas hidrolizadas presentó mayor cantidad de compuestos polifenólicos (2735 mg/L).

Jara *et al.*(2016), en su estudio demostraron la influencia de adición de semilla de uva de la variedad Pedro Ximénez al vino en las etapas iniciales de la vinificación, utilizando cantidades de 450 y 900 g de semillas/150 kg de uva. Durante la maceración los valores más elevados tanto en compuestos fenólicos como en actividad antioxidante fueron de los vinos con la dosis simple de semilla (450 g).

Gordillo *et al.* (2014) evaluaron la adición de orujo de uva variedad Pedro Ximénez sobre vinos tintos. Los resultados mostraron que niveles apropiados (10% p/p) de orujo al inicio de la fermentación causan un impacto significativo en la concentración de compuestos fenólicos individuales. Pero en el periodo de maceración todos los vinos fueron ricos en ácidos fenólicos y flavanoles monómeros, los cuales son característicos de las semillas de uva.

Martos (2016), notificó que al analizar muestras en diferentes etapas de vinificación (descube, prefermentación maloláctica, fermentación maloláctica, vino estable y trasiego) que en la etapa maloláctica existió valores superiores de fenoles totales a diferencia de las otras etapas de vinificación. El estudio también consistió en añadir 450 y 900 g de semilla al vino tinto.

Cuadro 6. Relación entre vinos tintos en contenido de fenoles totales y actividad antioxidante.

Tipos	Folin-Ciocalteu(mg/L)	ABTS(μmoles/L).	FRAP(μmoles/L)
	(media)	(media)	(media)
Tradicional	2202.1 ^a	1585.9 ^a	807.82 ^a
Corto	1977.2 ^a	1482.3 ^a	738.14 ^a
Largo	1899.2 ^a	1286.4 ^a	709.99 ^a

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas (P<0.05).

Actividad antioxidante. Con respecto a la actividad antioxidante en vinos tintos con adición de extracto de semilla de uva, se observó un aumento para las dos cantidades adicionadas, siendo significativos (P<0.05) los resultados obtenidos con el método FRAP (Cuadro 6) entre tratamientos. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre tipos de vinos tintos (tradicional, corto, largo) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Actividad antioxidante de vinos tintos método ABTS ($\mu\text{moles/L}$).

Tipos	Tratamientos	
	Sin extracto (media \pm D.E)	Con extracto (media \pm D.E)
Tradicional	1501.78 \pm 173.59 ^a	1670.03 \pm 323.53 ^a
Corto	1193.24 \pm 152.09 ^a	1771.37 \pm 647.67 ^a
Largo	1301.88 \pm 199.99 ^a	1270.97 \pm 13.03 ^a
C.V(%)	23.26	

Letras diferentes de izquierda a derecha indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

D.E.= Desviación estándar.

C.V = Coeficiente de Variación.

Según los datos obtenidos con el método ABTS el vino tinto corto con adición de extracto de semilla tiene mayor capacidad antioxidante, a diferencia de los vinos tradicional y largo que presentaron valores menores. A pesar de esto, no se muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 5). Se ha confirmado que la actividad antioxidante en vinos tintos va acorde a la cantidad de compuestos fenólicos, aunque, éste difiere con el tipo de vino (tradicional, corto, largo) y la etapa de vinificación (Jara *et al.* 2017).

Sin embargo, con el método FRAP al presentar diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los vinos con y sin extracto. El que presentó mayor actividad antioxidante fue el vino tinto largo, seguido del tradicional y el corto (Cuadro 6). Estos cambios pueden deberse a la estabilidad de la etapa como lo menciona Jara *et al.* (2016), tras estudiar distintos momentos de vinificación.

Siguiendo con nuestro estudio el vino largo es el que se encuentra en etapa de estabilización (maceración de dos meses) el cual presenta la mayor cantidad de actividad antioxidante en ambos métodos (ABTS y FRAP). Es así, como se refieren Jara *et al.* (2016) cuando realizaron un estudio en la evolución de vinos (control, simple y doble) para analizar la actividad antioxidante por método ABTS y FRAP. Lograron observar que el vino control se mantuvo estable en todas las etapas de vinificación. Sin embargo, el vino simple y el doble cambiaron durante el proceso, ya que disminuyen durante la fermentación maloláctica en comparación con el proceso de la fermentación alcohólica (42 y 7%). Donde pudieron determinar el aumento de la actividad antioxidante fue específicamente en la etapa de estabilización que manejaron en tiempos de 2, 3 y 4 meses.

La práctica de adición de semilla permite ver modificaciones positivas en los vinos tintos, así lo manifiesta Martos (2016) en su experimento desarrollado mediante la adición de 450 g y 900 g de semillas a diferentes vinos tintos. Los vinos que fueron tratados con semillas de uva en cantidades de 450 y 900 g, mostraron aumento en su actividad antioxidante con el método ABTS, pero el de menor cantidad de semilla presentó el mayor valor (1.73 $\mu\text{mol TE/mL}$) de capacidad antioxidante. Por tanto, existió diferencia significativa entre los

diferentes vinos (testigo, 450, 900 g). Dato que difiere con este ensayo, debido a que los vinos tintos al adicionar extracto de semilla a los vinos tintos corto y largo en etapa de maceración, no mostraron diferencias significativas en el método ABTS (Cuadro 5).

Aunque al estudiar una de sus muestras (vino testigo) presentó estabilidad en la actividad antioxidante durante el proceso de vinificación. Este se puede atribuir al vino tinto tradicional en este ensayo al añadir extracto de semilla, el cual tampoco presentó diferencia significativa en el método ABTS (Cuadro 5).

En el método FRAP se aprecian mejor las diferencias significativas entre los vinos, notándose de la misma manera la tendencia con el método de ABTS. Nuevamente el vino testigo (0,70 $\mu\text{mol TE/mL}$) muestra la menor actividad antioxidante en contraste con los de adición de semilla de 450 g (0.87 $\mu\text{mol TE/mL}$) y el de 900 g (0.81 $\mu\text{mol TE/mL}$). Acorde al ensayo realizado con extracto de semilla, se puede decir, que de la misma manera se presentan diferencias significativas con respecto al método FRAP (Cuadro 6). A vista de los resultados, existe la posibilidad de aumentar la capacidad antioxidante al añadir semilla o extracto de semilla en vinos tintos.

Los flavonoides son compuestos que forman parte de la composición química del vino tinto (Naczki y Shahidi 2006). Éstos han demostrado fuerte actividad de inhibición de oxidación de las LDL, *in vitro* e *in vivo*, mediante la reducción de la agregación de las plaquetas, y se asocia con la reducción de la mortalidad por enfermedad cardiovascular. Los flavonoides son la explicación de los efectos protectores de la dieta mediterránea (rica en vegetales, frutas y vino) contra las enfermedades cardiovasculares (Ruidavets *et al.* 2000).

Los estudios sobre la actividad antioxidante han sido enfocados principalmente en uvas, en las cuales se ha verificado que inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en un nivel comparable con el vino. Los ácidos hidroxycinámicos típicamente presentes en las frutas han demostrado inhibir la oxidación en las LDL *in vitro*. Los extractos fenólicos de bayas inhiben la oxidación de las LDL humanas y la oxidación de los liposomas (Kähkönen *et al.* 1999).

Los flavonoides son la clase predominantemente descrita de los fenoles presentes en los alimentos, porque son aproximadamente 2/3 de los fenoles consumidos en la dieta humana. Los taninos son una fuente importante de antioxidantes a pesar de que no son tan deseados en el vino, por dar sensación de astringencia, ya que son capaces de unirse a las proteínas lubricantes de la saliva por puentes de hidrógeno (Creus 2004). El consumo de compuestos fenólicos diario en los humanos se encuentra en un rango de 25 mg a 1 g por día dependiendo del tipo de dieta (frutas, vegetales, granos, té, especias, vino y uva) (Hagerman *et al.* 1998; Robbins 2003). Creus (2004) menciona que el consumo de vino tinto de 200 mL al día ayuda a reducir el riesgo a un infarto de miocardio, debido a la presencia de antioxidantes fenólicos.

El contenido en polifenoles antioxidantes se encuentra en grandes cantidades en la piel y las semillas de las uvas, siendo los procesos de fermentación y maceración los encargados de liberarlos al vino. Uno de los compuestos del vino es la fibra dietética saludable, formada por polisacáridos no digeribles con polifenoles asociados en la matriz. Mediante un ensayo

se analizó su contenido en vinos blancos 0.2 g/L y en vinos tintos 1.4 g /L (Díaz y Saura 2006).

Mediante estudios se ha comprobado que el vino tinto es capaz de reducir el 39% de riesgo de padecer cálculos renales. Un estudio realizado en la Universidad de Harvard demostró, al comparar con otros 21 tipos diferentes de bebidas, el vino tinto posee la acción beneficiosa superando al resto de bebidas (Curhan *et al.* 1996).

Análisis de color. Para la evaluación del color en los vinos tintos se utilizó el espacio del color CIELAB, que considera coordenadas de color rectangulares (L^* , a^* , b^*) y cilíndricas (L^* , C^*_{ab} , h_{ab}). Éste es el espacio de color más utilizado y recomendado para medir el color de objetos, especialmente en el caso de los alimentos, debido a su uniformidad y a la mejor interpretación de los resultados y correlación con la apreciación visual (Konika 2003).

En los primeros estadios, el color del vino tinto se debe a los antocianos libres, que muestran las características propias de un vino joven, como son un tono rojo vivo con notables matices azulados. Posteriormente, a lo largo de la estabilización, los antocianos monómeros disminuyen, mientras que los pigmentos poliméricos aumentan. Así, en los vinos con crianza, más evolucionados, suelen encontrarse colores menos vivos, con tonos rojos más anaranjados.

Durante la vinificación, en el periodo de maceración fermentativa se suele producir la evolución del color del vino en el sentido de la disminución de la claridad (L^*), lo que indica el efecto positivo en la estabilidad del color (alrededor del 13% en Gordillo *et al.* 2010b). Fernández (2016) utilizó semillas de uvas pasas de variedad Pedro Ximénez adicionadas a vinos tintos, y observó una disminución rápida de la claridad durante la fermentación alcohólica, donde el mosto se mostró más oscuro debido a que se extraen, ayudados por el alcohol, los pigmentos de las partes solidas de la uva.

Este efecto o tendencia en la evolución del color también se observó en los vinos estudiados en el presente trabajo, cuando se añade el extracto de semilla a las muestras de vino tinto. En todos los casos (vino tradicional, con maceración corta y larga) se da una importante disminución de la claridad, especialmente en el caso del vino con maceración corta. En el Cuadro 8, se observa que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos (sin y con adición de extracto de semilla) en cuanto a la claridad (L^*), para los tres tipos de vino estudiados.

Cuadro 8. Valores de claridad (L*) de los vinos tintos con y sin adición de extracto de semillas.

Tipos	Tratamientos	
	Sin extracto (media \pm D.E)	Con extracto (media \pm D.E)
Tradicional	17.80 \pm 1.91 ^a	4.01 \pm 0.86 ^b
Corto	19.05 \pm 0.41 ^a	3.18 \pm 3.18 ^b
Largo	15.60 \pm 0.90 ^a	2.54 \pm 0.61 ^b
C.V(%)	16.39	

Letras diferentes de izquierda a derecha indican diferencias entre tratamientos (P<0.05).

D.E.= Desviación estándar.

C.V = Coeficiente de Variación.

La coordenada $a^* > 0$ es el eje de los rojos y la coordenada $b^* > 0$ del amarillo. Sin embargo, considerar estas coordenadas de manera independiente para la evaluación del color puede conducir a conclusiones confusas que no se corresponden con la realidad ni, por supuesto, con la apreciación visual.

En este estudio (Cuadro 9 y 10), las coordenadas de cromaticidad a^* y b^* presentaron valores positivos, por lo que las muestras se situaron en el primer cuadrante del diagrama de color (a^*b^*) (Figura 1), donde se encuentran los colores rojos netos y anaranjados. En todos los casos, los vinos presentaron diferencias significativas (P<0.05) para los parámetros a^* y b^* tras el tratamiento con adición de extracto de semillas respecto a los valores que tenían inicialmente (sin adición). Aunque entre vinos tintos no mostraron diferencia significativa (Cuadro 11).

Cuadro 9. Valores de las coordenadas cromáticas a^* en los vinos tintos con y sin adición de extracto de semillas.

Tipos	Tratamientos	
	Sin extracto (media \pm D.E)	Con extracto (media \pm D.E)
Tradicional	47.58 \pm 1.21 ^a	24.68 \pm 3.94 ^b
Corto	47.78 \pm 0.50 ^a	17.12 \pm 15.63 ^b
Largo	45.76 \pm 0.82 ^a	16.51 \pm 3.86 ^b
C.V(%)	20.08	

Letras diferentes de izquierda a derecha indican diferencias entre tratamientos (P<0.05).

D.E.= Desviación estándar.

C.V = Coeficiente de Variación.

Cuadro 10. Valores de las coordenadas cromáticas b* en los vinos tintos con y sin adición de extracto de semillas.

Tipos	Tratamientos	
	Sin extracto (media ± D.E)	Con extracto (media ± D.E)
Tradicional	27.81 ± 1.68 ^a	6.86 ± 1.47 ^b
Corto	25.78 ± 0.50 ^a	5.26 ± 5.24 ^b
Largo	24.77 ± 1.06 ^a	4.34 ± 1.04 ^b
C.V(%)	15.59	

Letras diferentes de izquierda a derecha indican diferencias entre tratamientos (P<0.05).
D.E.= Desviación estándar.
C.V = Coeficiente de Variación.

Cuadro 11. Relación entre vinos tintos en valores de claridad (L*) y las coordenadas cromáticas a* y b*.

Tipos	L*	a*	b*
	(media)	(media)	(media)
Tradicional	11.11 ^a	36.13 ^a	17.34 ^a
Corto	10.91 ^a	32.45 ^a	15.52 ^a
Largo	9.07 ^a	31.13 ^a	14.56 ^a

Letras diferentes de arriba hacia abajo indican diferencias significativas (P<0.05).

En cuanto al croma C*_{ab} de los vinos estudiados, este parámetro osciló entre 55 y 17 unidades CIELAB, observándose una importante disminución (46% en el vino tradicional y 67% en los vinos con maceración corta y larga) tras la adición de semillas, que fue significativa de ($p<0.05$) en todos los casos (Cuadro 12).

En relación al tono h_{ab} de estos vinos, su comportamiento al ser tratados con extractos de semillas se dirigió hacia una disminución, igualmente significativa (P<0.05) en todos los casos. El descenso en los valores del tono fue similar para todos los vinos, estando alrededor del 50%. (Cuadro 13). La correcta interpretación del color se debe realizar a partir de las variables angulares tono y croma (Cuadro 12 y 13). Aunque no existió diferencias significativas entre vinos tintos (Cuadro 14).

Cuadro 12. Valores de croma (C^*_{ab}) de los vinos tintos con y sin adición de extracto de semillas.

Tipos	Tratamientos	
	Sin extracto (media \pm D.E)	Con extracto (media \pm D.E)
Tradicional	55.12 \pm 1.89 ^a	25.62 \pm 4.19 ^b
Corto	54.29 \pm 0.67 ^a	17.92 \pm 16.47 ^b
Largo	52.03 \pm 1.23 ^a	17.07 \pm 3.99 ^b
C.V(%)	19.19	

Letras diferentes de izquierda a derecha indican diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$).
D.E.= Desviación estándar.
C.V = Coeficiente de Variación.

Cuadro 13. Valores de tono (h_{ab}) de los vinos tintos con y sin adición de extracto de semillas.

Tipos	Tratamientos	
	Sin extracto (media \pm D.E)	Con extracto (media \pm D.E)
Tradicional	30.29 \pm 0.87 ^a	15.44 \pm 0.78 ^b
Corto	28.35 \pm 0.22 ^a	15.93 \pm 2.09 ^b
Largo	28.43 \pm 0.59 ^a	14.72 \pm 0.07 ^b
C.V(%)	4.82	

Letras diferentes de izquierda a derecha indican diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$).
D.E.= Desviación estándar.
C.V = Coeficiente de Variación.

Cuadro 14. Relación entre vinos tintos en valores de croma (C^*_{ab}) y tono (h_{ab}).

Tipos	C^*_{ab}	h_{ab}
	(media)	(media)
Tradicional	40.37 ^a	22.87 ^a
Corto	36.11 ^a	22.14 ^a
Largo	34.55 ^a	21.58 ^a

Letras diferentes de arriba hacia abajo indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Como ya se expuso, un estudio previo (Gordillo *et al.* 2014) encontró que la adición de orujo de uva Pedro Ximénez en la vinificación produjo un aumento del croma (C^*_{ab}) y una

disminución en claridad (L^*) y tono (h_{ab}) del vino, lo que pudo ser debido a que la extracción de pigmentos en la etapa de fermentación-maceración se encuentra con una mayor concentración de fenoles procedentes de los orujos (entre los que se encuentra la semilla de la uva), volviéndose los pigmentos más estables, dado que la estabilidad del color del vino está relacionada con la composición fenólica de los pigmentos antocianícos y otros fenoles extraídos de la uva durante la maceración. El menos afectado por este tratamiento, tras la adición de semillas, fue el vino con elaboración tradicional el que presentó mayores valores medios de claridad (L^*), cromas (C^*_{ab}) y tono (h_{ab}) (4.01 unidades CIELAB, 25.62 unidades de CIELAB y 15.44° , respectivamente), indicando la menor afectación de su color.

Gráficamente se puede realizar la evaluación del efecto de la adición de extracto de semilla sobre el color de los vinos, mediante la representación de los puntos correspondientes a las muestras en el diagrama (a^*b^*) del espacio de color CIELAB y la claridad como eje perpendicular al plano (Figura 2).

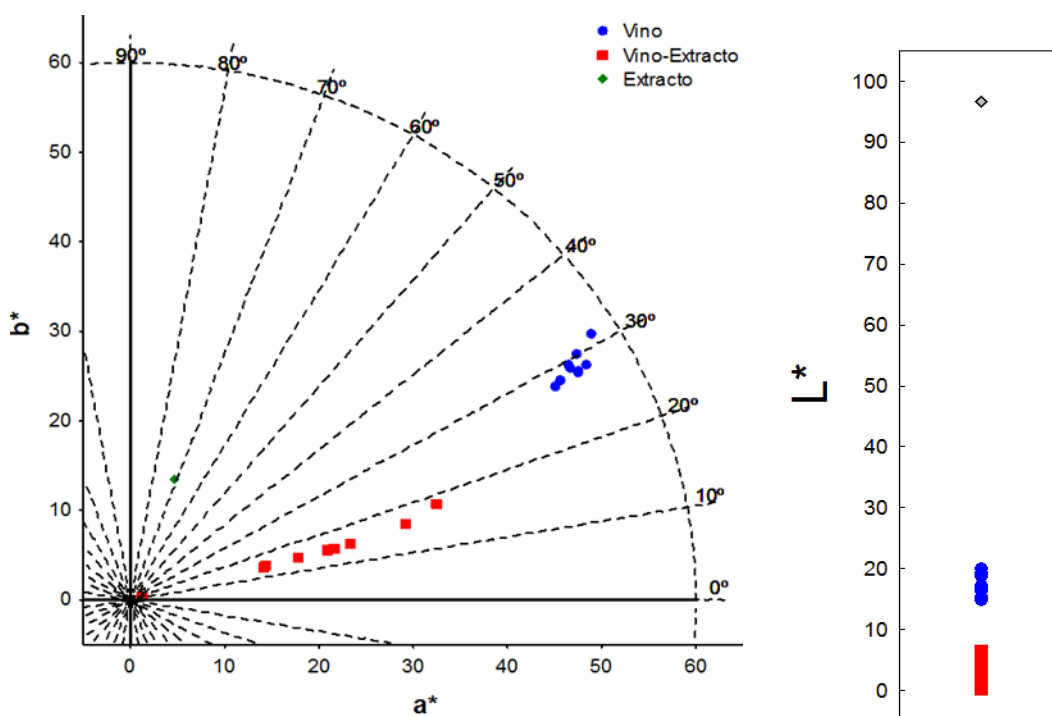


Figura 2. Ubicación de las muestras de vino, con y sin adición de extracto de semilla, en el diagrama de color (a^*b^*).

Ante todo, se pone de manifiesto la clara separación que existe entre los puntos correspondientes a cada uno de los grupos, lo que indica una total diferencia de color entre las muestras estudiadas, en función del tratamiento efectuado. Se muestra, también, el punto correspondiente a la medida del color del extracto de semilla, localizado muy cercano al origen de coordenadas en el plano (a^*b^*), con un ángulo de tono de 70° y un valor de

claridad cercano a 100 unidades, lo que se corresponde con un tono amarillento pálido, muy claro y apagado, prácticamente incoloro.

El ángulo formado respecto al eje a^* se corresponde con el tono. En este caso, en la figura se observa una disminución de los valores de este ángulo. Los vinos sin adición de extracto de semillas se encuentran en la zona de 25 a 31°. Al añadirles el extracto de semillas de uva, las muestras se posicionan en ángulos de 10 a 20°, lo que indica un efecto hacia tonos más rojos y menos anaranjados.

Se puede apreciar, también, cómo la adición del extracto produce una disminución del croma, que se manifiesta en el acercamiento hacia el origen de coordenadas que se observa de las muestras tratadas (puntos rojos) respecto a los vinos iniciales no tratados (puntos azules). Inicialmente, los vinos sin adición de extracto de semillas se encuentran muy poco dispersos, mostrando una cierta homogeneidad, y tras la adición del extracto de semilla, se distribuyen de manera más dispersa, lo que se debe a que el efecto del extracto sobre el croma afectan de forma diferente a los vinos, tal como se ha comentado anteriormente.

En resumen, y a la vista de los resultados mostrados para los parámetros de color CIELAB claridad, croma y tono, se puede afirmar que la adición de extracto de semilla a los vinos estudiados produce un efecto general que conduce a colores más oscuros (menor L^*), menos vivos (menor C^*_{ab}) y con un tono menos anaranjado o con tendencia a los tonos más azulados (menor h_{ab}), lo que se traduce en una mejora de la calidad cromática.

Finalmente se evaluó bibliografía para encontrar el método de oxidación acelerada más adecuado en vinos tintos. Se ensayaron los métodos de: ultrasonido (de sonda y baño), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y microoxigenación. Se aplicó la ciencia de la Colorimetría Triestímulo para observar de forma cualitativa y cuantitativa la variación del color que provoca el uso de estos métodos físicos. Estos se presentan como preliminares de estudio de envejecimiento acelerado en vinos tintos en este estudio.

4. CONCLUSIONES

- Las semillas procedentes de subproductos de vinificación de Moscatel son una fuente natural de compuestos fenólicos.
- Los vinos tintos de maceración larga al adicionarles extracto de semilla presentaron los mejores resultados en actividad antioxidante.
- Por medio de los métodos ABTS y FRAP el extracto de semilla Moscatel, fue buena fuente de compuestos con actividad antioxidante.
- La capacidad antioxidante evaluada por métodos espectrofotométricos varió según el tipo de vino.
- La reutilización de subproductos semilla en blanco durante el proceso de vinificación en tinto podría mejorar el valor biológico de los vinos.
- Se evaluó bibliografía correspondiente para el desarrollo de una nueva metodología de envejecimiento acelerado en vinos tintos.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de análisis sensorial con expertos catadores de vinos tintos para determinar la influencia de los compuestos fenólicos.
- Estudiar otras variedades de uva blanca como Zalema, Pedro Ximénez como fuente de extracto de semilla y evaluar su aplicación en vinos tintos.
- Evaluar la aplicación de extracto de semilla de uva en jugos u otros alimentos.
- Realizar un análisis microbiológico para corroborar la inocuidad del extracto de semilla de uva blanca y vinos tintos.
- Realizar un análisis de cromatografía líquida para los compuestos fenólicos del extracto de semillas de uva y evaluar los compuestos en mayor cantidad.

6. LITERATURA CITADA

Ahn J, Grun IU, Fernando LN. 2002. Antioxidant Properties of Natural Plant Extracts Containing Polyphenolic Compounds in Cooked Ground Beef. *J Food Science*. 67(4):1364-1369. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb10290.x.

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127(1):183-198. doi:10.1039/B009171P.

Brossaud F, Cheymier V, Noble A. 2001. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 33(1):33-39.. doi: 10.1111/j.1755-0238.2001.tb00191.x.

Carbajal A, Ortega R. 2001. La dieta mediterránea como modelo de dieta prudente y saludable. *Revista Chilena de Nutrición*. [consultado 2017 marzo 8]. 28(2):1-12. <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24CarbajalOrtegaRevChilNutr2001.pdf>.

Castillo JS, Compés R. 2014. *La economía del vino en España y en el mundo*. 2th ed. Sevilla (España). Almería: Cajamar Caja Rural. 58 p

Cejudo MJ, Rodríguez-Morgado B, Jara-Palacios MJ, Rivas-Gonzalo JC, Parrado J, Heredia FJ. 2016. Pre-fermentative addition of an enzymatic grape seed hydrolysate in warm climate winemaking. Effect on the differential colorimetry, copigmentation and polyphenolic profiles. *Food Chem*. 209:348-357. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.092.

CIE (Commission International de l'Eclairage). 2004. *Central Technical Report*. Bureau, Vienna, Austria. ISBN: 978 3 900734 07 7

Cortiella M. 2013. *Influencia de la madurez de la uva de ciertas prácticas vitivinícolas sobre el color, los compuestos fenólicos y polisacáridos del vino tinto [Tesis]*. Universidad Rovira I Virgili. Sevilla-España. 208 p.

Creus E. 2004. *Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud*. *Ámbito Farmacéutico Nutrición*. [consultado 2017 mar 20]. 23 (6):80-84. <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>.

Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Stampfer MJ. 1996. Prospective Study of Beverage Use and the Risk of Kidney Stones. *American Journal of Epidemiology*. 43(3):240-247. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a008734.

Díaz E, Saura F. 2006. Dietary fiber wine. *American Journal of Epidemiology*. [consultado 2017 mar 23]. 57(1):69-720. <http://wineserver.ucdavis.edu/pdf/attachment/25dietary%20fiber.pdf>

Fernandez A. 2016. Estabilización del color de vinos tintos de clima cálido (variedad Syrah) por adición de subproductos vitícolas. Semillas de uvas pasas de variedad Pedro Ximénez [Tesis]. Universidad de Sevilla-España. 76 p.

Ferrer R, Brás NF, García-Estévez I, Mateus N, Rivas JC, Freitas V, Escribano MT. 2016. Effect of flavonols on wine astringency and their interaction with human saliva. *Food Chem*. 209(2):358–364. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.091.

Fuentes L. 2014. Estudio de la Capacidad antioxidante de los polifenoles del vino y sus aplicaciones Biológico-Preventivas [Tesis]. Universidad Europea Laureate International Universities-España. 38 p.

García E, Segovia F, Fuentes A. 2010. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. [Tesis]. Universidad de Valencia-España 9 p.

González F, Hernández N, Cooper B, Núñez L, Reyes M. 2015. Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. Vertientes especializadas en Ciencias de la Salud. [consultado 2017 abr 25]. 18(1): 25-34. <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2015/vre151c.pdf>

González F. 2010. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chia (*Salvia hispanica* L.). Mediante electroforesis Capilar [Tesis]. Instituto Politécnico Nacional-México. 113 p.

González-Gallego J, Garcia-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Tunon MJ. 2010. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr*. 104 (3):S15-27.. doi:10.1017/S0007114510003910.

Gordillo B. 2012. Relación color-composición fenólica en vinos tintos de clima cálido. Evaluación de la copigmentación por Colorimetría Triestímulo.: Vinificación de vinos tintos en clima cálidos. [Tesis]. Universidad de Sevilla-España. 72 p.

Gordillo B, Cejudo-Bastante MJ, Rodríguez-Pulido FJ, Jara-Palacios MJ, Ramírez P, Gonzalez-Miret ML, Heredia FJ. 2014. Impact of adding white pomace to red grapes on the phenolic composition and color stability of Syrah wines from a warm climate. *J Agric Food Chem*. 62(12):2663-2671. doi:10.1021/jf405574x.

Gordillo B, González L, Heredia F. 2010a. Aplicación de la Colorimetría Triestímulo al estudio del fenómeno de copigmentación en vinos tintos. Influencia del Factor Varietal. 9. ISBN 978 84 -9717

Gordillo B, López-Infante M, Ramírez P, González ML, Heredia FJ. 2010b. Influence of prefermentative cold maceration on the color and anthocyanic copigmentation of organic

Tempranillo wines elaborated in a warm climate. *J Agric Food Chem.* 58(11):6797-6803. doi:10.1021/jf100084x.

Gordillo B, Rodríguez F, González ML, Quijada N, Rivas JC, García I, Heredia FJ, Escribano MT. 2015. Application of Differential Colorimetry to Evaluate Anthocyanin-Flavonol-Flavanol Ternary Copigmentation Interactions in Model Solutions. *J Agric Food Chem.* 63(35):7645–7653. doi:10.1021/acs.jafc.5b00181.

Guntero V, Longo M, Ciparicci S, Martini R, Andreatta A. 2015. Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola. *Journal Agric Food Chem.* [consultado 2017 abr 25]. 3(30):120–126. http://www.aaiq.org.ar/SCongresos/docs/06_029/papers/05c/05c_1775_727.pdf

Hagerman A, Riedl K, Jones G, Sovik K, Ritchard N, Hartzfeld P, Riechel T. 1998. High Molecular Weight Plant Polyphenolics Tannins as Biological Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* [consultado 2017 abr 25]. 46(5):1887–1892. doi:10.1021/jf970975b.

Halliwell B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *World Journal of Nutrition and Health.* [consultado 2017 abril 25]. <http://www.biochemsoctrans.org/content/35/5/1147.full-text.pdf>.

Halliwell B. 2012. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr Rev.* 70(5):257-265. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x.

Heredia FJ, Álvarez C, González-Miret ML, Ramírez A, inventors 2014. CromaLab, análisis de color. Sevilla (España). Sri Registro General de la Propiedad Intelectual. Patente SE-1052-04.

ICEX. (España Exportación e Importación.) 2015. El vino en cifras. Enero 2015: Situación del mercado mundial. ICEX España exportadora e inversiones. [internet]. Sevilla: ICEX. [consultado 2017 abril 24]. http://agricultura.gencat.cat/web/.content/de_departament/de02_estadistiques_observatoris/27_butlletins/02_butlletins_nd/documents_nd/ fitxers_estatics_nd/2015/0152_2015_SProductius_Vi_Espanya-Comerc-exterior.pdf.

Jara MJ, Escudero M.L ,Hernández, J., Heredia FJ, Hernanz D. 2017. Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products. *Talanta.* 165:211–215. doi:10.1016/j.talanta.2016.12.058.

Jara MJ, Gordillo B, González ML, Hernanz D, Escudero ML, Heredia FJ. 2014a. Comparative study of the enological potential of different winemaking byproducts: implications in the antioxidant activity and color expression of red wine anthocyanins in a model solution. *J Agric Food Chem.* 62(29):6975–6983. doi:10.1021/jf500978n.

Jara MJ, Hagerman A, Hernanz D, González S, Santos C, Escudero ML, Heredia FJ. 2014b. Detailed phenolic composition of white grape by-products by RRLC/MS and measurement of the antioxidant activity. *Talanta.* 125(5):125-127. doi: 10.1016/j.talanta.2014.02.065.

Jara MJ, Hernanz D, Cifuentes T, Escudero ML, Heredia FJ, Spencer JPE. 2015. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. *Food Chem.* 183:78–82. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.022.

Jara MJ, Hernanz D, Escudero ML, Heredia FJ. 2014c. Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. *Food Research International.* 66:150–157. doi:10.1016/j.foodres.2014.09.009.

Jara MJ, Hernanz D, Escudero ML, Heredia FJ. 2016. The Use of Grape Seed Byproducts Rich in Flavonoids to Improve the Antioxidant Potential of Red Wines. *Molecules.* 21(11). doi:10.3390/molecules21111526.

Kähkönen M, Hopia A, Vuorela H, Rauha J, Pihlaja K, Kujala T, Heinonen M. 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47(10):3954–3962. doi:10.1021/jf990146l.

Konika A M. 2007. Comunicación precisa de los colores: Conocimiento del color. [internet]. Japan. https://www.konicaminolta.com/instruments/knowledge/color/pdf/color_communication.pdf

Lapornik B, Prolek M, Golc Wondra A. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering.* 71(2):214–222. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036.

Luna J, Garau C, Negre A, March J, Antoni M. 2007. Introducción: Juventud e historia. *Hispania.* 67(225):11–20. doi:10.3989/hispania.2007.v67.i225.33.

Malik S, Wong N, Franklin S, Kamath T, L'Italien G, Pio J, Williams G. 2004. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation.* 110(10):1245–1250. doi:10.1161/01.CIR.0000140677.20606.0E.

Martos M. 2016. Aprovechamiento de subproductos de vinificación.: Evaluación potencial biológico de la semilla de uva. Sevilla, España: Universidad de Sevilla. 33 p.

Naczk M, Shahidi F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 41(5):1523-1542. doi:10.1016/j.jpba.2006.04.002.

OIV. (Organización Internacional de la Viña y el Vino). 2017. World wine production estimated at 259 mhl. [internet]. Sevilla: OIV; [consultado 2017 mar 22]. <http://www.oiv.int/public/medias/5009/en-communique-depresse-octobre-2016.pdf>

Ortiz JM. 2014. Nuevas tecnologías para la elaboración de vinos tintos. [Tesis]. Universidad de Rioja. España. 44 p.

- Paladino S. 2000. Actividad Antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L [Tesis]. España: Universidades Nacionales de Cuyo. 100 p.
- Park E, Edirisinghe I, Choy Y, Waterhouse A, Burton B. 2016. Effects of grape seed extract beverage on blood pressure and metabolic indices in individuals with pre-hypertension: A randomised, double-blinded, two-arm, parallel, placebo-controlled trial. *Br J Nutr.* 115(2):226–238. doi:10.1017/S0007114515004328
- Prior R, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 53(10):4290–4302. doi:10.1021/jf0502698.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Boulder Colo. [consultado 2017 abr 25]. 15(2): 285-286. http://ac.els-cdn.com/S0891584998003153/1-s2.0-S0891584998003153-main.pdf?_tid=d383c022-1540-11e7-bd71
- Redan B, Buhman K, Novotny J. 2016. Altered Transport and Metabolism of Phenolic Compounds in Obesity and Diabetes: Implications for Functional Food Development and Assessment. *Advances in Nutrition an international Review Journal.* 7 (2):1090-1096. doi: 10.3945
- Robbins RJ. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem.* 51(10):2866–2887.. doi:10.1021/jf026182t.
- Robinson M, Lu B, Edirisinghe I, Kappagoda C. 2012. Effect of Grape Seed Extract on Blood Pressure in Subjects with Pre-Hypertension. *J. Pharm. Nutr. Sci.* 2 (2):155-159. doi:10.6000/1927-5951.2012.02.02.6.
- Ruggieri L, Cadena E, Martínez-Blanco J, Gasol CM, Rieradevall J, Gabarrell X, Gea T, Sort X, Sánchez A. 2009. Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process. *Journal of Cleaner Production.* 17(9):830–838. doi:10.1016/j.jclepro.2008.12.005.
- Ruidavets J, Teissedre P, Ferrieres J, Carando S, Bougard G, Cabanis J. 2000. Catechin in the Mediterranean diet: Vegetable, fruit or wine? *Artherosclerosis.* 17 (9): 830–838. doi: 10.1016/j.jclepro.2008.12.005
- Sanchez J. 2012. Característica Agroclimáticas de la Vid (*Vitis vinifera* L. subsp. *vinifera*): Servicio de Aplicaciones Agrícolas e Hidrológicas. España. AEMet. [consultado 2017 mar 13]. <http://www.divulgameteo.es/uploads/Caracter%20C3%ADsticas-vid.pdf>
- Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. 2009. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Radical Research.* 36(2):177–187. doi:10.1080/10715760290006411.

Singleton V, Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* [consultado 2017 abr 25]. 16:144-58. <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144>

Somogyi A, Rosta K, Puzstai P, Tulassay Z, Nagy G. 2007. Antioxidant measurements. *Physiol Meas.* 28(4): R41-55. doi:10.1088/0967-3334/28/4/R01.

Tao Y, Garcia J, Sun D. 2014a. Advances in wine aging technologies for enhancing wine quality and accelerating wine aging process. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 54(6):817–835. doi:10.1080/10408398.2011.609949.

Tao Y, Zhang Z, Sun D. 2014b. Experimental and modeling studies of ultrasound-assisted release of phenolics from oak chips into model wine. *Ultrason Sonochem.* 21(5):1839-1848. doi:10.1016/j.ultsonch.2014.03.016.

Tiwari BK, Patras A, Brunton N, Cullen PJ, O'Donnell CP. 2010. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrason Sonochem.* 17(3):598-604. doi:10.1016/j.ultsonch.2009.10.009.

7. ANEXOS

Anexo 1. Estudio preliminar de envejecimiento acelerado en vinos tintos.

INTRODUCCIÓN

El vino es considerada una bebida tradicional de la dieta mediterránea, tanto en hogares como en eventos especiales (Creus 2004). El consumo de vino en Europa está representado en un volumen de mercado de 60%, seguido de América con 22%, Asia Pacífico representada con un 16%, África y Oriente Medio en un 2%. Esto ha permitido que en el mercado aparezcan diferentes estilos de vino que son producidos para el mundo, entre los que se incluyen los vinos de mesa, espumosos y vinos fortificados o generosos.

El proceso que se da para la obtención de un vino tinto consiste en varias etapas que van desde la cosecha y estrujado de uvas, la fermentación del mosto y la estabilización, el envejecimiento y el embotellado (Tao *et al.* 2014b), los cuales permiten reflejar vinos de calidad y con los requerimientos de los consumidores. El proceso de vinificación incluye la etapa de envejecimiento o crianza de los vinos tintos, es característico para que estos sean negociables en el mercado (Tao *et al.* 2014a).

El envejecimiento del vino es un proceso delicado y largo, que ofrece la posibilidad de mejorar las cualidades. Consta de dos fases: la primera es un envejecimiento oxidativo, y tradicionalmente es en barricas de madera. La segunda fase consiste en un envejecimiento reductivo en botella (Tao *et al.* 2014b). Al realizarse el almacenamiento en barricas de madera, es donde el vino es sometido a un lento y progresivo proceso de microoxigenación, que beneficia a las reacciones de polimerización, la clarificación espontánea, estabilidad cromática y mejora la estructura del vino (Gordillo 2012).

En investigaciones se refleja que, a pesar de esta importante función de la crianza, el tiempo es la mayor problemática en las industrias enológicas, debido a que requieren un plazo largo (a veces hasta 3 a 5 años de crianza) para considerarse un vino comercial. Por ello, existen estudios que demuestran que la oxidación acelerada mejora la calidad del vino disminuyendo el tiempo necesario para ello (Tao *et al.* 2014a). Entre éstos está la aplicación de ultrasonido de sonda o la micro-oxigenación, siendo estos métodos físicos aplicados en laboratorio para evaluar su funcionamiento.

El método 1, ultrasonido de sonda se desarrolla por ondas de sonicación en un medio acuoso, detallando el número de sonda, frecuencia, amplitud y cantidad de muestra. La aplicación de ondas ultrasónicas como oxidación acelerada es beneficiosa para obtener en menor tiempo un vino tinto comercial. Por primera vez en 1937 se estudiaron las ondas

ultrasónicas en una bebida natural con el propósito de simular los cambios que ocurren como bebida envejecida (García y Sun 2013). Tras este estudio la ciencia ha desarrollado técnicas con ultrasonido para dar respuestas a parámetros, como es el uso de la frecuencia, el tiempo de aplicación y el número de sonda.

Los experimentos realizados recomiendan el uso de frecuencias de 20 a 100 kHz, basado principalmente al cambio de color que tiene el vino durante el envejecimiento. Tiwari *et al.* (2010) observaron en su estudio el cambio que sufren las antocianinas en el jugo de uva, en el que disminuyó la coordenada b^* (eje amarillo-azul), y aumentaron la claridad L^* y la coordenada a^* (eje rojo-verde), esto al utilizar una frecuencia de 20 kHz, y se tomaron en cuenta el tiempo de 0-10 min y pulso de 5 segundos (Tiwari *et al.* 2010). Sin embargo, al tomar en cuenta la temperatura que permita la liberación de compuestos fenólicos, ésta debe estar en un rango de 15 a 25 °C como lo indicaron Tao *et al.* (2014) en su práctica de virutas de madera. Referente a la aplicación de número de sonda se encuentra relacionada con la cantidad de muestra utilizada, es así, que para una sonda de 6 mm la cantidad debe estar entre 5 a 50 mL con una amplitud del 40%, para una de 12 mm la cantidad de muestra va de 20-250 mL, como lo explica en su ensayo Tiwari *et al.* (2010).

El baño de Ultrasonidos permite tener mejor controlada las condiciones de temperatura sin variaciones extremas, permite presentar tiempos estables hasta 15 minutos en las muestras aplicadas, y una de sus ventajas es la reutilización de las mismas (Piñeiro y Marrufi 2015). Se aplica frecuentemente en extracción de compuestos fenólicos en madera de robles con el propósito de estudiar la influencia de éstas sobre el vino tinto. Al aplicarlo reduce el tiempo de extracción de estilbenos a solo 10 minutos, en comparación a otros métodos que supera hasta 12 horas la extracción (Piñeiro *et al.* 2016).

Heritier *et al.* (2016) demuestran en su estudio la aplicación de peróxido de hidrógeno para su cuantificación en el proceso de vinificación durante la oxidación de manera acelerada en vinos tintos. La respuesta de un vino a la oxidación es más que la suma de la respuesta de sus componentes debido a la interacción compleja de las reacciones químicas. Para obtener una comprensión más global, un enfoque popular es evaluar la resistencia de un vino a la oxidación usando ensayos antioxidantes tales como el ensayo ORAC o el ensayo de barrido de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, el empleo de H_2O_2 no puede determinar el final de la degradación de las antocianinas en el vino debido a que sigue actuando constantemente Heritier *et al.* (2016).

En el envejecimiento del vino realizado en barricas de madera ocurre una microoxigenación (aporte de pequeñas cantidades de oxígeno) de manera natural al difundir el oxígeno a través de los poros de la madera y entre las uniones de las duelas (cada una de las tablas curvadas de un barril) (Romero 2008). La microoxigenación es una metodología de mejora en el vino para las pequeñas industrias que buscan tener mejor aceptación en el mercado. Las burbujas provocadas en el vino hacen que éstas actúen en favor de las antocianinas para incrementar el color rojo azul deseados en los vinos tintos.

Para encontrar el método de oxidación acelerada más adecuado, se ensayaron los métodos de: ultrasonido (de sonda y baño), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y microoxigenación. Se aplicó la ciencia de la Colorimetría Triestímulo para observar de forma cualitativa y cuantitativa la variación del color que provoca el uso de estos métodos físicos de

envejecimiento. Es así, que el objetivo de este ensayo fue provocar los efectos oxidativos que se producen en la crianza del vino tinto, de manera acelerada, para poder evaluar la capacidad de envejecimiento de los vinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras.

Para comprobar el comportamiento de las técnicas propuestas en función del tipo de vino, se utilizaron siete vinos tintos, comerciales y experimentales, de diferente procedencia y características químicas para evaluar posibles diferencias en el comportamiento colorimétrico debidas al tratamiento. Estos últimos fueron facilitados por el equipo de Color y Calidad de los Alimentos, procedentes de ensayos en los que se aplicaron diferentes técnicas de elaboración.

Tipos de vinos tintos empleados:

Vino de elaboración tradicional (campaña 2016).

Vino elaborado con adición simple de semillas en la maceración postfermentativa.

Vino elaborado con adición doble de semillas en la maceración postfermentativa.

Vino de elaboración tradicional (campaña 2015).

Vino elaborado con adición de chip de madera durante la fermentación (2015).

Vino evolucionado por almacenamiento prolongado (Oxidado).

Vino comercial en Tetrabrik (marca Carrefour).

Ensayos.

Envejecimiento acelerado por ultrasonidos de sonda. Para los ensayos se utilizó una sonda de ultrasonidos modelo Q 500 Sonicator (Newtown, USA), con potencia de 500 W y frecuencia constante de 20 kHz. La sonda de ultrasonido se sumergió en el seno de la muestra, dejando 0.5 cm hasta el fondo del recipiente que contenía el vino. Se realizaron dos ensayos con diferentes condiciones de sonicación:

- a) Sonda de 2 mm, una amplitud de 20%, muestra en tubos falcon de 50 mL:
 - a. 20 mL de muestra, tiempos de sonicación de 5 minutos, hasta completar 20 minutos.
 - b. 40 mL de muestra, tiempos de sonicación de 10 minutos, hasta un total de 40 minutos.

En los dos ensayos se esperó 15 minutos entre cada sonicación, y en este tiempo se midió el color de la muestra por transmisión en un espectrofotómetro de diodos UV-Vis Agilent 8454 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA).

- b) Sonda de 3 mm, amplitud de 40%, y tiempos de sonicación de 10 minutos, hasta completar 120 minutos de tratamiento. 200 mL de muestra en frasco de vidrio, cubriendo el frasco con parafilm para minimizar la evaporación. La temperatura de la muestra durante la sonicación varió de 5 a 20 °C. Para evitar el calentamiento se introdujo el contenedor de la muestra (tubo o frasco) en un recipiente con hielo.

Envejecimiento acelerado en baño ultrasonidos. Se utilizó un baño ultrasonido Ultrasons de SELECTA[®], modelo 3001208, de 4 L. Se aplicó el tratamiento de ultrasonidos en intervalos de tiempo de 15 minutos. Para colocar las muestras de vino en el baño se utilizaron tubos falcon de 50 mL con tapón de rosca, ubicados en una gradilla de espuma flex pre diseñada, que los mantuvo sumergidos en el agua hasta el nivel del contenido de la muestra. Se realizó el control de la temperatura de las muestras (23-28 °C) durante todo el proceso mediante la adición de hielo al agua del baño. Se utilizaron cuatro vinos tintos en cada tratamiento, y se realizaron dos ensayos:

- a) 45 mL de vino, completando un tiempo de 120 minutos de sonicación, y se midió el color en espectrofotómetro cada 15 minutos.
- b) 50 mL de vino, con tiempo total de sonicación 240 minutos, midiendo el color de las muestras cada 120 minutos.

Envejecimiento acelerado por método químico. Para este ensayo se utilizó el carácter oxidante del agua oxigenada, realizando diluciones con vino sintético y agua destilada a distintas concentraciones. Se realizaron los siguientes ensayos:

- a) En el primer ensayo se realizó la mezcla 1:1 con peróxido de hidrógeno (7.5 mL de vino tinto con 7.5 mL de agua oxigenada), midiendo el color cada 5 minutos para controlar el cambio en un espectrofotómetro de diodos UV-Vis Agilent 8453 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA).
- b) Para la segunda concentración de utilizo 1 mL de vino tinto con 1 mL de agua oxigenada, y se enrasó con vino sintético hasta en un matraz de 10 mL. El ensayo se hizo por triplicado, se tomó en cuenta un control en una concentración de vino tinto 1 mL con agua destilada 1 mL y se enrasó a 10 mL con vino sintético. El tiempo fue medido cada 5 minutos y luego cada 30 minutos para los dos ensayos hasta 115 minutos correspondientemente.

Envejecimiento acelerado por microoxigenación. Se utilizó una bomba de inyección de aire, conectado a un difusor. Se realizaron dos ensayos, en muestras de 50 mL y 100 mL, en envases de plástico, introduciendo el difusor en el seno del vino, y se dejó actuar por diferentes tiempos (2, 4, 7, 9, y 18 horas) midiendo el color tras ese tiempo por espectrofotometría de transmisión.

RESULTADOS

Envejecimiento acelerado por ultrasonidos de sonda.

En los ensayos de envejecimiento acelerado realizados con diferentes vinos se registraron los espectros de absorción a intervalos de 10 minutos de actuación del equipo de ultrasonidos hasta un total de 60 minutos. En la Figura 3, se observa la modificación sufrida en el intervalo visible (370-770 nm) a lo largo del tiempo de ensayo.

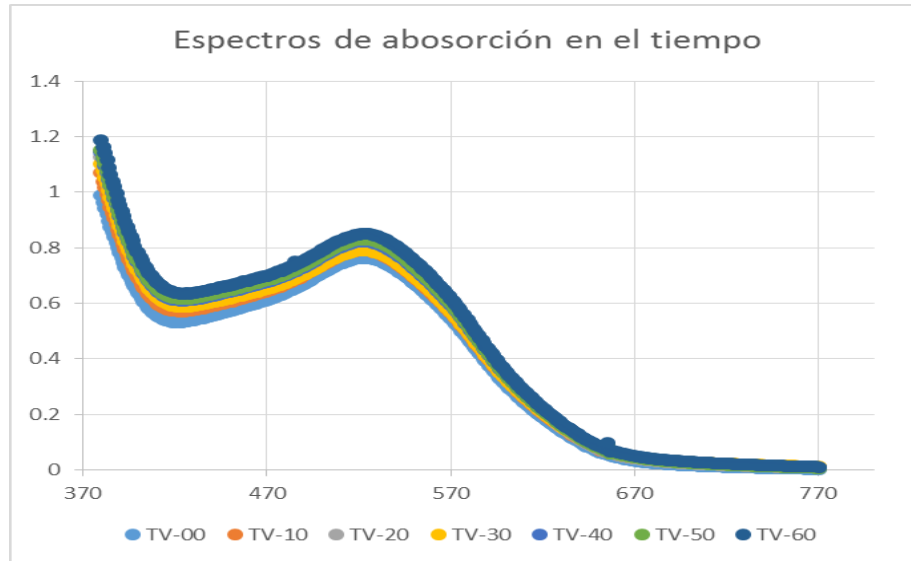


Figura 3. Evolución del espectro de absorción visible del vino sometido a ultrasonidos.

Las modificaciones en el espectro de absorción tienen como consecuencia un cambio de color en relación al color inicial de la muestra de vino, apreciable por el ojo humano ($\Delta E^*_{ab} > 3$ unidades CIELAB). Estas diferencias alcanzan valores importantes, llegando a más de 7 unidades CIELAB a lo largo de una hora de tratamiento de ultrasonidos (Figura 4).

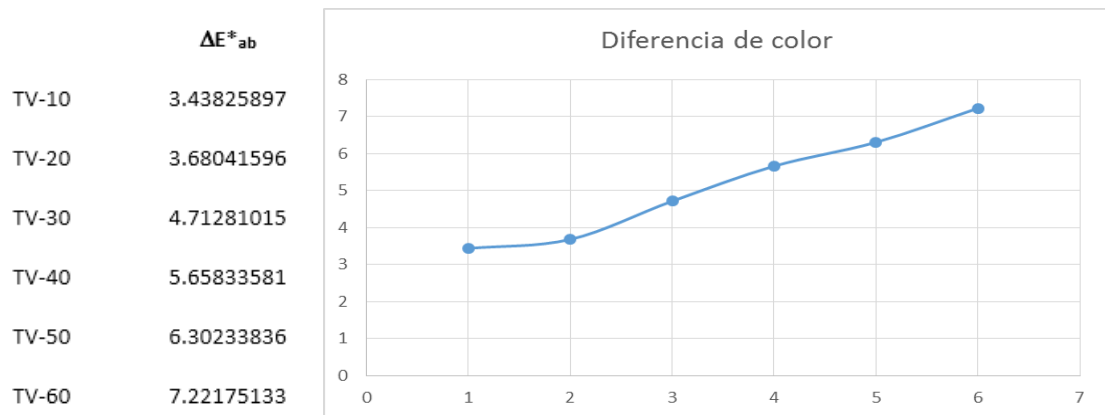


Figura 4. Diferencias de color respecto al punto inicial.

Envejecimiento acelerado en baño de ultrasonidos.

En el ensayo de envejecimiento por tratamiento en baño de ultrasonidos, se observa igualmente, una evolución del color. En este caso, se observa un comportamiento ligeramente diferente según el tipo de vino, apreciándose variaciones del color algo mayores en el caso de los vinos que fueron elaborados de manera tradicional (los denominados R y T) frente a los que se les añadió chips de madera (M) o semillas (S) durante la fase fermentativa. Estas diferencias se observan en la Figura 4, donde se aprecia

una mayor separación entre los puntos de las muestras R y T (dentro de cada grupo), mientras que los puntos de los vinos M y S se encuentran más agrupados entre sí. Esta diferencia de comportamiento puede deberse a que la adición de semillas de uva o madera produce un incremento de los compuestos fenólicos que colabore a proteger al color del vino de los cambios provocados por la oxidación.

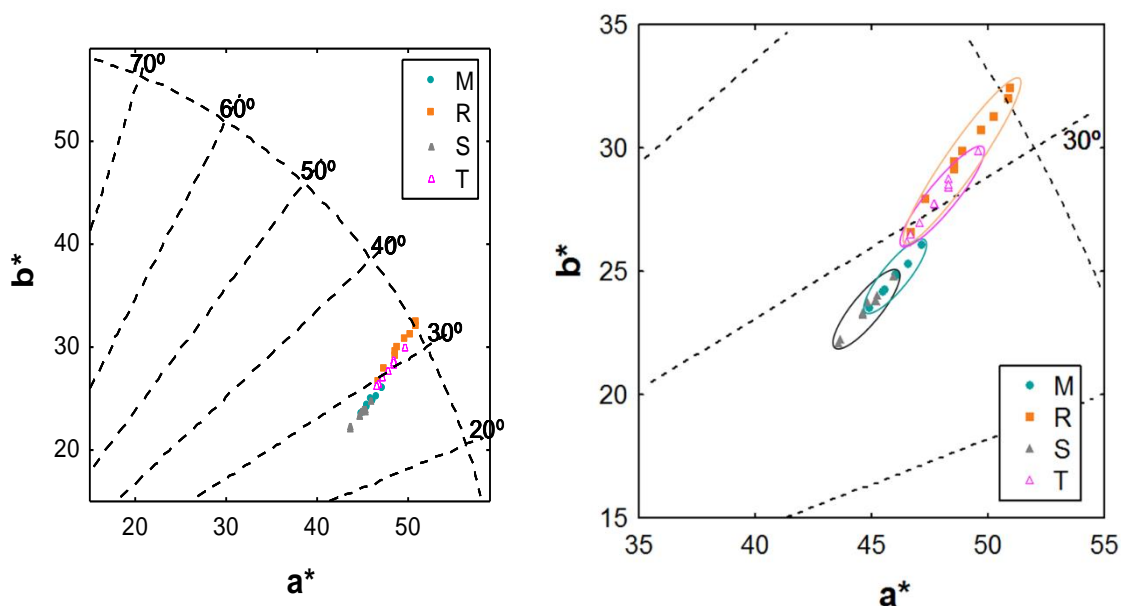


Figura 5. Evolución del color de los diferentes vinos debido al tratamiento en baño de ultrasonidos.

Este comportamiento diferenciador se observa también cuando se estudia la evolución de las coordenadas colorimétricas de manera independiente. En el caso del vino T (Figura 6a), el cambio de color se produce por un descenso de todas las coordenadas colorimétricas a lo largo del ensayo, que en algunos parámetros como el croma (C^*_{ab}) o las coordenadas a^* y b^* , es más acusado al principio del tratamiento, indicando una mayor afectación inicial de esos parámetros, y posteriormente la evolución se hace más estable, mientras que en el caso de la claridad (L^*) y el tono (h_{ab}), los cambios son mucho más moderados, lo que se observa en la menor pendiente de las correspondientes curvas de evolución. Sin embargo, en el vino S las modificaciones son mucho menores, e incluso se produce un ligero aumento de algunos parámetros, tal como puede verse en la Figura 6b.

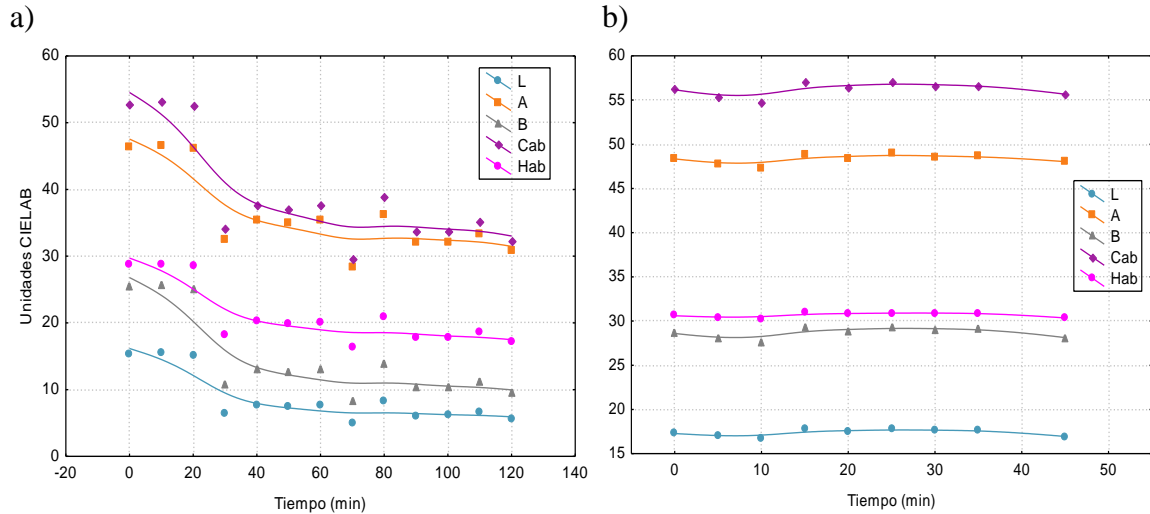


Figura 6. Evolución de los parámetros colorimétricos del espacio CIELAB de los vinos a) elaboración tradicional (T) y b) con adición de semillas en la maceración (S).

Envejecimiento acelerado por método químico. Uso de peróxido de hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un compuesto químico, altamente oxidante, que produce el blanqueamiento de los antocianos del vino, con la consecuente pérdida de color (Figura 7). Previsiblemente, un vino tinto rico en compuestos antioxidantes, como son los fenoles, presentará una mayor resistencia a la degradación del color por parte de los oxidantes. Ésta es la base del ensayo.

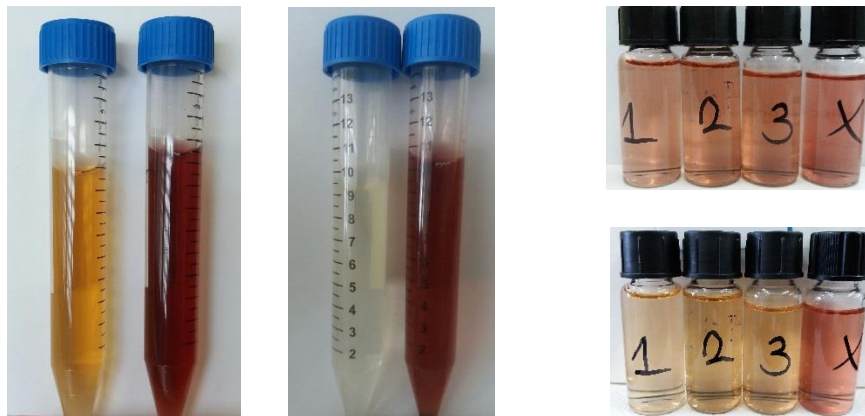


Figura 7. Degradación del color del vino tinto causada por H_2O_2 .

Se realizó una prueba preliminar para evaluar la velocidad de degradación del color, sometiendo una muestra de vino tinto a la acción del agua oxigenada. En la Figura 8 se observa como el color del vino se va modificando hacia valores más altos de tono, es decir, hacia tonos amarillos, al mismo tiempo que aumenta considerablemente la claridad.

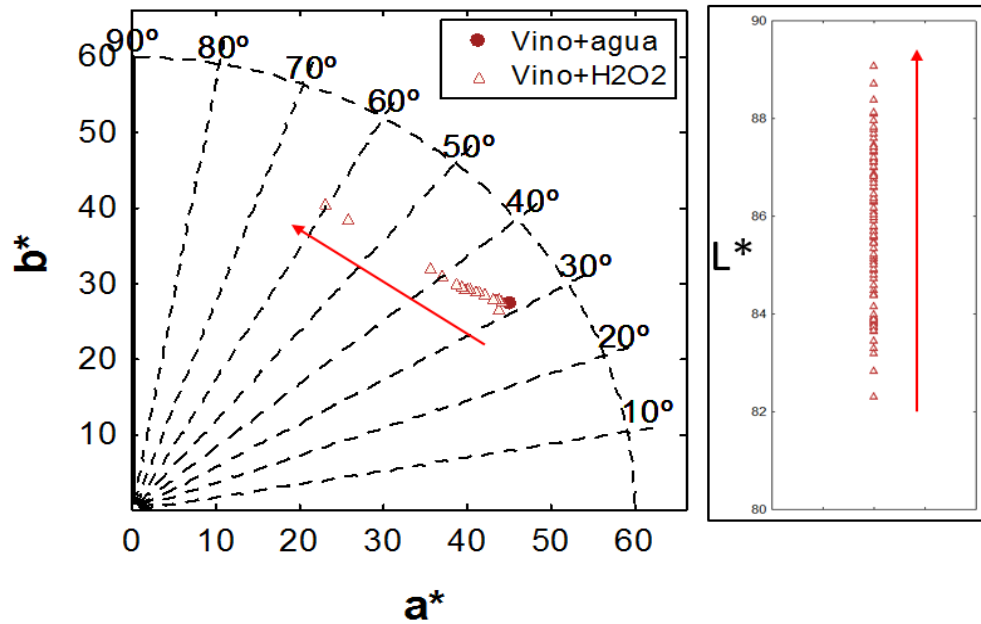


Figura 8. Evolución del color de la muestra de vino tinto por el tratamiento con peróxido de hidrógeno.

Envejecimiento acelerado por microoxigenación,

Como se observa en las gráficas de la Figura 9, correspondientes a la evolución del tono y la claridad de los vinos sometidos a microoxigenación por borboteo de aire, los resultados obtenidos son confusos y escasamente interpretables.

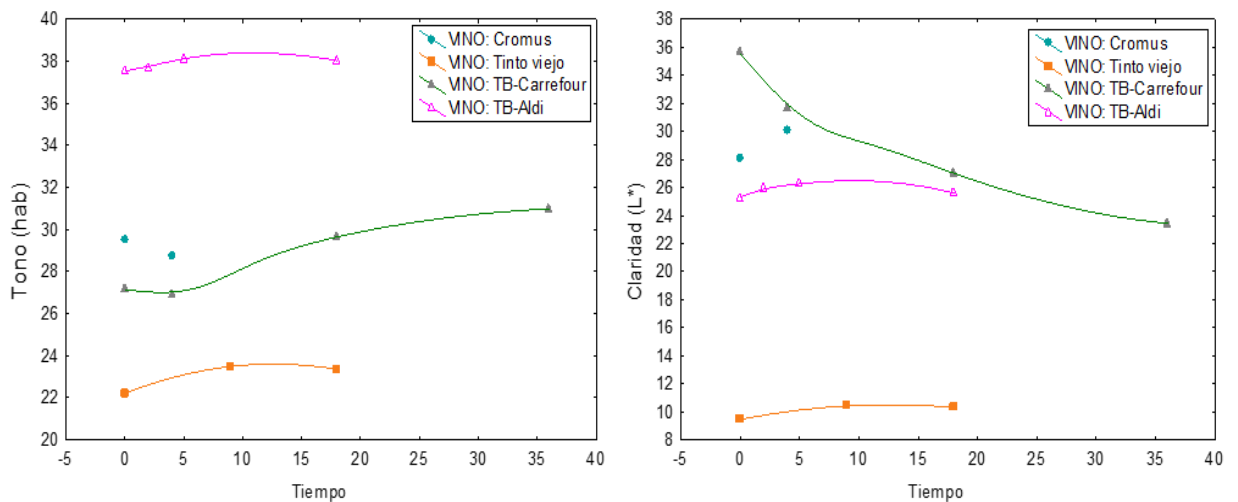


Figura 9. Evolución del tono y la claridad de los vinos sometidos a microoxigenación.

RECOMENDACIONES

- Teniendo en cuenta, ante todo, que éste ha sido un ensayo preliminar, de cuyos datos no se pueden obtener conclusiones definitivas, y que es necesario realizar un mayor número de pruebas para confirmar o desestimar los resultados, a la vista de lo obtenido se pueden realizar algunas recomendaciones.
- Los métodos empleados para la simulación de envejecimiento son económicos y rápidos.
- Se recomienda estudiar con profundidad el método de ultrasonido de sonda, especificando los diferentes parámetros de: temperatura, cantidad de muestra y tiempos.
- El baño ultrasonido, si bien es cierto que ayuda a extracciones de compuestos, con fines de oxidación en corto tiempo no realiza grandes cambios, por lo que sería necesario mayor tiempo de actuación que el sistema de ultrasonidos por sonda sumergida en el líquido.
- El peróxido de hidrogeno debido a la toxicidad de este compuesto, no sería apto para utilizarlo como sistema de envejecimiento acelerado de los vinos para uso comercial, aunque sí podría ser válido para determinar en el laboratorio la posibilidad de crianza de los mismos.
- El sistema de microoxigenación por borboteo de aire se utiliza actualmente con fines de mejora de la calidad de los vinos tintos, aunque su uso para envejecimiento no queda claro, por lo que se determina que este ensayo necesita más investigación.

LITERATURA CITADA

Creus E. 2004. Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. *Ámbito Farmacéutico Nutrición*. [consultado 2017 mar 20]. 23 (6):80-84. <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>.

García J, Sun W. 2013. Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends in Food Science & Technology*. 33(1):40–53. doi:10.1016/j.tifs.2013.06.005.

Gordillo B. 2012. Relación color-composición fenólica en vinos tintos de clima cálido. Evaluación de la copigmentación por Colorimetría Triestímulo.: Vinificación de vinos tintos en clima cálidos. [Tesis]. Universidad de Sevilla-España. 72 p.

Heritier J, Bach B, Schonenberger P, Gaillard V, Ducruet J, Segura J. 2016. Quantification of the production of hydrogen peroxide H₂O₂ during accelerated wine oxidation. *Food Chem*. 211:957-962. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.009.

Piñeiro Z, Marrufi A. 2015. Aplicación de Ultrasonidos en la Vinificación de Tintos. *Molecules*. 21 (3): 784-790. doi:10.3390

Piñeiro Z, Marrufi-Curtido A, Serrano MJ, Palma M. 2016. Ultrasound-Assisted Extraction of Stilbenes from Grape Canes. *Molecules*. [consultado 2017 abr 25]. 21(6): 3-21. <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa>.

Romero I. 2008. Extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino. Papel de los enzimas de maceración. Murcia. [Tesis]: Universidad de Murcia-España. 273 p.

Tao Y, Garcia J, Sun D. 2014a. Advances in wine aging technologies for enhancing wine quality and accelerating wine aging process. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 54(6):817-835. doi:10.1080/10408398.2011.609949.

Tao Y, Zhang Z, Sun D. 2014b. Experimental and modeling studies of ultrasound-assisted release of phenolics from oak chips into model wine. *Ultrason Sonochem*. 21(5):1839-1848. doi:10.1016/j.ultsonch.2014.03.016.

Tiwari BK, Patras A, Brunton N, Cullen PJ, O'Donnell CP. 2010. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrason Sonochem*. 17(3):598-604. doi:10.1016/j.ultsonch.2009.10.009

Anexo 2. Reactivos de actividad antioxidante.

1. Vino sintético pH 3.6: etanol 96%; ácido tartárico; sodio cloruro; disolución de ácido clorhídrico, HCl 1M.; disolución hidróxido de sodio, NaOH 1M.
2. Carbonato sódico anhidro (*Panreac*® Madrid España).
3. Patrón de referencia, ácido gálico C₇H₆O₅ (*Analyticals Carlo Elba*®).
4. Reactivo de Folin-Ciocalteu (*Panreac*®).
5. Tampón acetato sódico 300 M, pH 3.6
6. Tampón cloruro potásico 0.025 M, pH 1.0.
7. Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenziltiazolina) sulfónico (ABTS) (*Sigma*® Madrid, España).
8. Persulfato potásico, K₂S₂O₈ (*Panreac*® Madrid España).
9. Tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4.
10. HCl 40 mM.
11. Solución 2, 4, 6 tripiridyl-s-triazina (TPTZ) 10mM (*Sigma*®): pesar 0,0312 g del reactivo TPTZ y disolverlos en un matraz de 10 mL con HCl 40 mM.
12. Solución Tricloruro férrico, FeCl₃-6H₂O, 20 mM (*Panreac*® Madrid, España): disolver 0.032 g de FeCl₃-6 H₂O en un matraz de 10 mL con agua desionizada.
13. Tampón Acetato 300 mM, pH 3.6: acetato sodio trihidrato, ácido acético.
14. Agua desionizada (*Milli-Q, Millipore*®).
15. Agua destilada.

Anexo 3. Equipos e instrumentos para la actividad antioxidante.

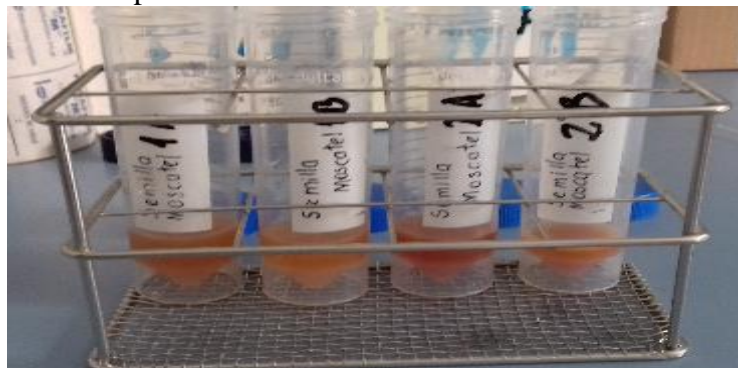
- a. Liofilizador Cryodos-80, Telstar® Varian DS 102 (Telstar Industrial, S.L., Barcelona, España).
- b. Molino IKA A11-B (IKA®, Staufen, Alemania).
- c. Balanza analítica de precisión METTLER TOLEDO AE-260 (Barcelona, España).
- d. Agitador magnético Vortex IKA Genios 3 (IKA®, Staufen, Alemania).
- e. pH-metro CRISON GLP 21 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España).
- f. Centrifuga Allegra X-12R Centrifuge (Beckman Coulter, Barcelona, España).
- g. Agitador orbital digital 685/2.
- h. Espectrofotómetro de diodos UV-Vis HP 8453 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA).
- i. Espectrofotómetro de diodos UV-Vis Agilent Technologies 8454.
- j. Jeringa, portafiltros y filtros de nylon 13 x 0.45 mm (Millipore-AP20)
- k. Cubetas de plástico de 10 mm de paso de luz y paso de luz reducido.
- l. Cubetas de vidrio de 2 mm de paso de luz.
- m. Matraces aforados de 10, 25, 50, 100, 500 y 1000 mL
- n. Micropipetas de intervalos de volumen 20-200 μ L, 100-1000 μ L y 1-10 mL

Anexo 4. Separación de semillas de uva blanca variedad Moscatel de orujo.



Fuente: Taco 2017

Anexo 5. Extracto de compuestos fenólicos de semillas de uva blanca variedad Moscatel.



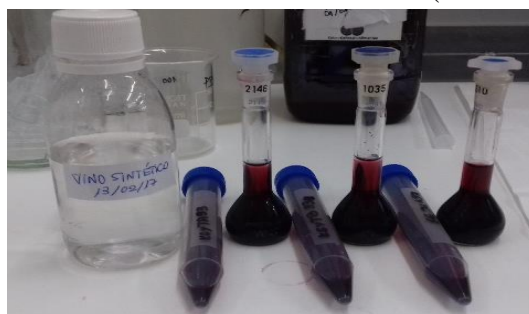
Fuente: Taco 2017

Anexo 6. Muestras de vinos tintos (tradicional, corto y largo).



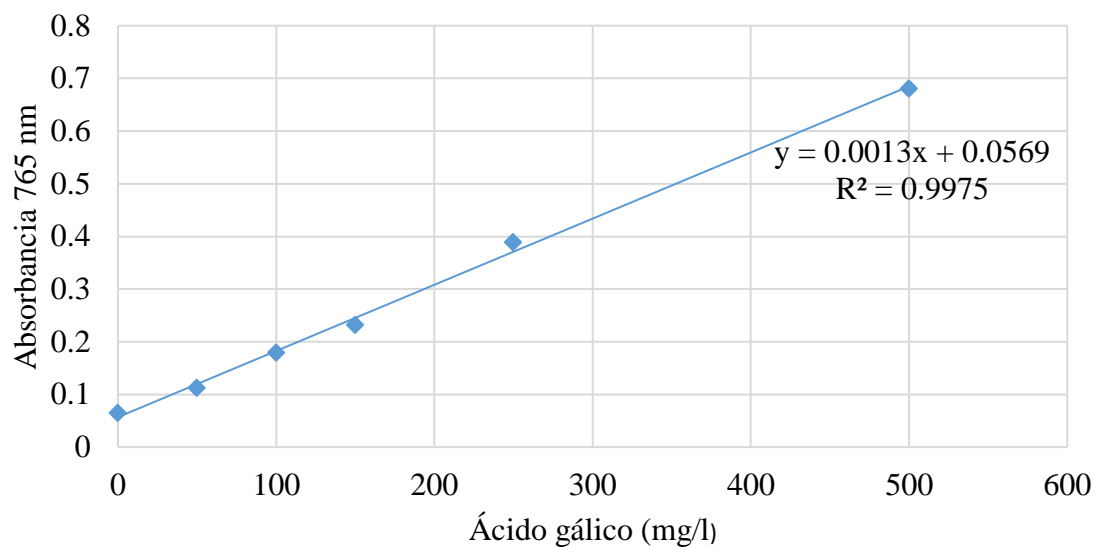
Fuente: Taco 2017

Anexo 7. Preparación de tratamientos de vinos tintos (tradicional, corto y largo).

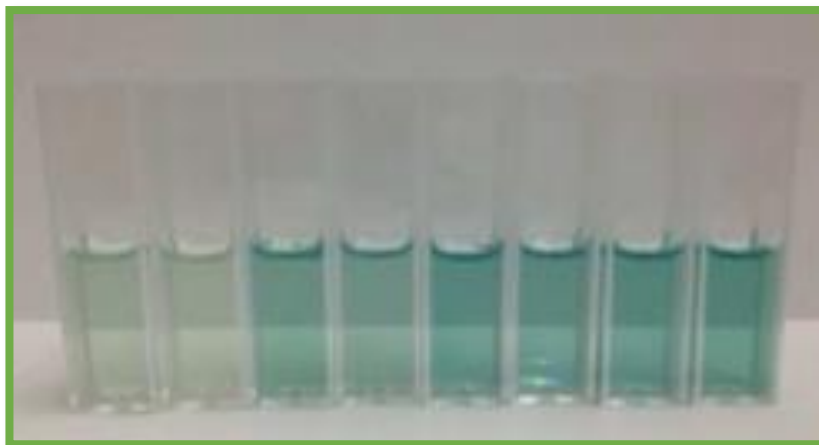


Fuente: Taco 2017

Anexo 8. Recta patrón para el método Fenoles totales en espectrofotómetro.

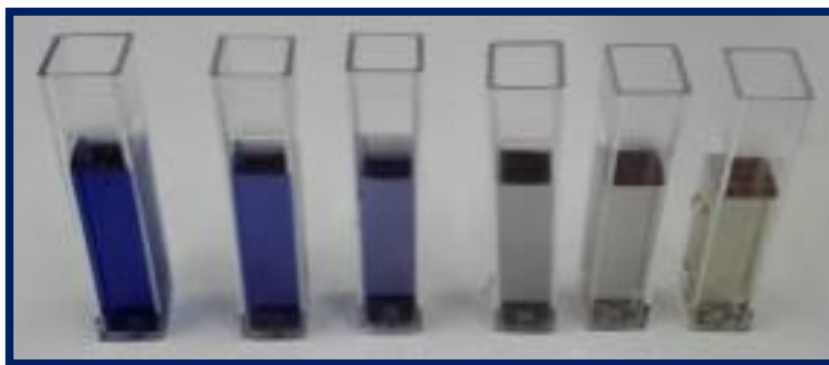


Anexo 9. Cubetas con las disoluciones patrón a distinta concentración y el reactivo ABTS.



Fuente: (Martos 2016)

Anexo 10. Cubetas con las disoluciones patrón a distinta concentración y el reactivo FRAP.



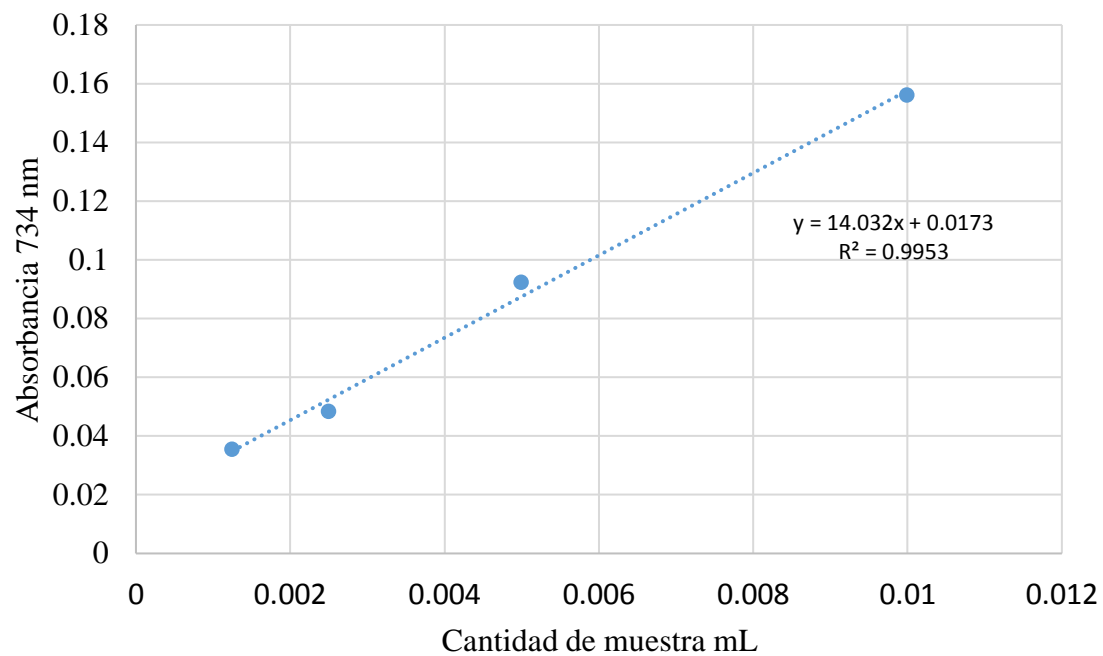
Fuente: (Martos 2016)

Anexo 11. Resumen de la significancia estadística sobre los tratamientos en vinos tintos.

Variables/ Source	Interacciones				
	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr>F
Folin-Ciocalteu					
Proceso	2	296821.98	148410.99	1.82	0.7960
Tratamiento	1	10612255.21	10612255.21	130.28	<.0001
Rep	2	38027.41	19013.70	0.23	0.7960
Proceso*Tratamiento	2	313886.43	156943.22	1.93	0.1960
ABTS					
Proceso	2	277585.1689	138792.5844	1.22	0.3364
Tratamiento	1	255948.6605	255948.6605	2.24	0.1649
Rep	2	95017.2177	47508.6089	0.42	0.6702
Proceso*Tratamiento	2	289300.0124	144650.0062	1.27	0.3228
FRAP					
Proceso	2	30441.335	15220.667	0.51	0.6157
Tratamiento	1	1729676.002	1729676.002	57.87	<.0001
Rep	2	101026.254	50513.127	1.69	0.2332
Proceso*Tratamiento	2	185151.328	92575.664	3.10	0.0898
L					
Proceso	2	15.1417000	7.5708500	2.63	0.1212
Tratamiento	1	912.4992000	912.4992000	316.43	<.0001
Rep	2	2.9494333	1.4747167	0.51	0.6145
Proceso*Tratamiento	2	6.3850333	3.1925167	1.11	0.3679
a*					
Proceso	2	80.411811	40.205906	0.90	0.4362
Tratamiento	1	3429.024089	3429.024089	76.97	<.0001
Rep	2	108.555678	54.277839	1.22	0.3361
Proceso*Tratamiento	2	51.231211	25.615606	0.57	0.5803
b*					
Proceso	2	23.852133	11.926067	1.96	0.1907
Tratamiento	1	1916.424050	1916.424050	315.71	<.0001
Rep	2	9.091733	4.545867	0.75	0.4977
Proceso*Tratamiento	2	0.236933	0.118467	0.02	0.9807
C*_{ab}					
Proceso	2	108.777744	54.388872	1.08	0.3767
Tratamiento	1	5084.352800	5084.352800	100.79	<.0001
Rep	2	116.182878	58.091439	1.15	0.3548
Proceso*Tratamiento	2	39.567033	19.783517	0.39	0.6855
h_{ab}					
Proceso	2	108.777744	2.5094889	2.19	0.1626
Tratamiento	1	5084.352800	839.2704500	732.41	<.0001
Rep	2	116.182878	0.3966056	0.35	0.7156
Proceso*Tratamiento	2	39.567033	2.2228667	1.94	0.1941

Source: fuente de variabilidad. DF: grados de libertad. Type I SS: suma de cuadrados tipo I. F Value: valor F, Pr: Probabilidad.

Anexo 12. Recta de muestra para el método ABTS en espectrofotómetro.



Anexo 13. Envejecimiento acelerado por ultrasonido de sonda.



Fuente: Taco 2017

Anexo 14. Envejecimiento acelerado en baño de ultrasonidos.



Fuente: Taco 2017

Anexo 15. Envejecimiento acelerado por microoxigenación.



Fuente: Taco 2017

Anexo 16. Pruebas de envejecimiento acelerado por ultrasonido de sonda en vinos tintos.

Fecha	Muestra	Cantidad (mL)		Tiempo (min)		T(°C)			P
		I.	F.	Interval	Repetición	I.	F.	S.	
26/1/2 017	SC	20	NO	5	4	NO	NO	2mm	20
	CC	20		5	4				
	Tetrabrik	20		5	4				
	Oxidado	20		5	4				
27/1/2 017	SC	20							
	CC	20							
	Tetrabrik	20							
	Oxidado	20							
30/1/2 017	CM	40	NO	10	4	NO	NO	2mm	20
	CS	40		10	4				
	Testigo	40		10	4				
	Rociana	40		10	4				
22/3/2 017	Testigo	19	182	10	6	6	19	3mm	40
		0				11	20		
						9	20		
						10	0		
						9	22		
						9	20		
23/3/2 017	CS	20	197	10	2	9	20	3mm	40
		0				9	19		
27/3/2 017	CS	19	180	10	12	5	16	3mm	40
		7				5	18		
						5	18		
						5	17		
						5	17		
						5	19		
						5	19		
						5	19		
						4	16		
						5	20		
				5	19				
				6	19				

I=inicial; F= final, S= sonda;SC=sin chip; CC= con chip;CM= con madera;CS=con semilla; P=parámetro; A=amplitud (%); Fre= frecuencia.

Anexo 17. Pruebas de envejecimiento acelerado por método baño María en vinos tintos.

N°	Fecha	Muestra	Cantidad(mL)		Tiempo (min)			T (°C)	
			Inicial	Final	Intervalo	Repetición	Total	Inicial	Final
1	9/2/2017	CM	45	45	15	8	120	26	28
		CS	45	45	15	8	120		
		Testigo	45	45	15	8	120		
		Rociana	45	45	15	8	120		
2	6/3/2017	CM	50	50	15	8	120	20	23
		CS	50	50				23	25
		Testigo	50	50				25	28
		Rociana	50	50				28	28
		CM	50	50				28	28
		CS	50	50				28	28
		Testigo	50	50				28	28
		Rociana	50	50				28	28
		CM	48	48	15	8	120	26	26
		CS	48	48				26	26
		Testigo	48	48				26	26
		Rociana	48	48				27	27
		CM	48	48				26	26
		CS	48	48				27	26
		Testigo	48	48				27	27
		Rociana	48	48				27	27

CM=Con madera; CS= con semilla; F=con filtro.

Anexo 18. Prueba en envejecimiento acelerado por método químico en vinos tintos.

N°	Fecha	M	Cantidad(mL)			Tiempo (min)			F	
			V.T	H2O2	A.d	V.S	Inicio	Final		Total
1	10/3/2017	1	7.5	7.5	0	0	0	5	115	si
		2	7.5	0	7.5	0	0	5	115	
2	17/3/2017	1	1	1	0	8	0	5	115	si
		2	1	1	0	8	0	5	115	
		3	1	1	0	8	0	5	115	
		4	1	0	1	8	0	5	115	

N°=número de ensayo; M=muestras; F= Colocación de filtro; V. T= Vino tinto; Ad= Agua destilada; V. S= Vino sintético.

Anexo 19. Pruebas de envejecimiento acelerado por microoxigenación en vinos tintos.

N°	Fecha	Muestras	Cantidad(mL)		Tiempo		Filtro
			Inicial	Final	Inicio	Final	
1	29/3/2017	Oxidado	50	48	0	7	Si
					7	9	
					9	18	
2	30/3/2017	Postfer	100		0	2	Si
					2	4	
					4		
3	31/3/2017	Carefur	100		0	2	Si
					2	4	
					4	6	
4	4/3/2017	Tetrabrik	100		0	4	Si
					4	4	

Postfer=postfermentativa.