

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. EL MATERIAL VEGETAL

#### La plantación y el material vegetal:

La extensión de la plantación (cuya parcela pertenece al término municipal de Almagro) es de unas 13.25 has, con muy buen acceso desde la carretera Carrión-Almagro. La edad de las plantas es de 7 años y estas son de la variedad Merlot (hay 3 clones diferentes, aunque nosotros hemos utilizado 2 para el estudio) injertada sobre 110 Richter.

La variedad del portainjerto, que es 110 Richter, tiene origen híbrido de “*Berlandieri Resseguier n°2 x Rupestris Martin*” y posee unas características que le hacen el portainjerto más difundido en la viticultura española (Sotes Ruiz y col. 1989). Es capaz de adaptarse a situaciones muy variables pudiendo dar, incluso en años de sequía, cosechas importantes. Es muy potente; debido a que su sistema radicular es poco penetrante, se acomoda a suelos poco profundos, compactos, e incluso húmedos; su resistencia a la salinidad es nula.

En cuanto al sistema de conducción, es en espaldera de una altura de 1.60 m con el primer alambre a 0.70 m. El marco de plantación es 2.8 m x 1.5 m, con una densidad de plantación de 2380 cepas por ha.

El sistema de riego merece mención especial ya que es original de la plantación, consistiendo en una adaptación de un cañón de riego convencional que tiene acoplado al final un arnés con ruedas sobre el que se apoyan 10 mangueras con salida libre. En cada pasada se riegan por inundación 5 calles de cultivo, controlando que no se produzca escorrentía. Se dan de 4 a 5 pasadas anuales con el artefacto considerando la dosis de riego indicativa en torno a 2000 metros cúbicos por hectárea. A los dos días del riego se pasa cultivador de cuchillas para evitar el crecimiento de malas hierbas y la evaporación excesiva. El último riego se da entre final del mes de julio y principios del de agosto.

La vendimia se realiza de forma mecánica con vendimiadora alquilada y durante el mes de Diciembre se pasa una prepodadora para facilitar las labores posteriores de poda (el sistema de conducción de la vid es en espaldera con doble cordón horizontal con 5 pulgares a cada lado de 2 yemas cada uno). El resto de las labores se practican según los usos tradicionales en la zona.

La uva se ha vinificado durante 3 años consecutivos en Bodegas Naranjo S.L. de Carrión de Calatrava, empresa que tiene suscrito convenio marco de colaboración con la Universidad de Castilla-La Mancha.

### La variedad Merlot

La variedad de uva Merlot, conocida también como Merlot Noir, se considera en España una “variedad mejorante”. Por tradición no es característica de nuestra zona, proviene de Burdeos (Francia), y se presenta en la Península Ibérica desde finales del Siglo XIX. En la actualidad se encuentra incluida en varias Denominaciones de Origen: Alicante, Costers del Segre, La Mancha, Navarra, Plá de Bages, Ribera del Duero, Ribera del Guadiana y Utiel-Requena. En España supone aproximadamente un 8% del total de la producción de uva tinta (con una superficie en Castilla-La Mancha que ya alcanza el millar de has), superada en la cantidad de superficie cultivada por otras variedades tintas como: Cencibel con el 53%, Moravia con el 15%, Cabernet Sauvignon con el 13%, e igualada con Garnacha con un 8%.

Es una planta que se aclimata bien a suelos y microclimas diversos, de vigorosidad y de brotación medias y sarmientos de grosor normal, con entrenudos cortos, y vegetación equilibrada en su conjunto (Kerridge, 2000). Se adapta bien a las distintas formas de conducción y de poda, por lo que muchas veces se usan formas totalmente mecanizables, prefiriendo sobre todo las podas medias. El marco de plantación puede variar en función del ambiente en general y de la cantidad de nutrientes disponibles en el terreno en particular. Sus biotopos se diferencian por la fertilidad, la calidad del producto y la forma del racimo aunque este suele ser mediano, piramidal y alado.

Esta uva tiene una alta intensidad colorante por lo que los vinos que con ella se elaboran son de color intenso. Se distinguen en ellos aromas de ciruela, chocolate, naranjas amargas y balsámicos y también gusto a especias. Son tintos que envejecen bien, aunque no tanto como Cabernet Sauvignon, con la que es comparada a menudo por su similitud y porque provienen de la misma zona de Francia.

## 4.2. VISITA TÉCNICA, VENDÍMIA EN VERDE Y MUESTREO

### 4.2.1. LA VISITA TÉCNICA

En la plantación se cultiva uva de la variedad Merlot que se proporciona a Bodegas Naranjo, de Carrión de Calatrava, como ya se explicó anteriormente. Esta bodega colabora con la Escuela de Ingenieros Técnicos Agrícolas de Ciudad Real, prestando sus instalaciones y otros medios para el desarrollo de proyectos de la U.C.L.M. La explotación es visitada periódicamente por especialistas de la universidad con conocimientos en viticultura.

En líneas generales, durante estas visitas se comprobó que la explotación mostraba un estado sanitario y agronómico satisfactorio. Solo se observó algo de “polilla del racimo” (*Lobesia botrana* b.) y algo de excoriosis (*Phomosis viticola*) sin alcanzar daños apreciables, aunque convendrían ser vigilados en un futuro. En la explotación no se había realizado despunte ni aclareo. El abonado se hizo con fertilizante del tipo 15-15-15, sin fertirrigación.

En las visitas realizadas a partir del 20 de Mayo se apreció un posible exceso de carga. Como se apuntó con anterioridad, en esta explotación la poda se realiza en doble cordón horizontal con 5 pulgares a cada lado y dos yemas por pulgar, lo que nos supone una carga de 20 yemas previstas por cepa. La fertilidad del clon dominante es en torno a dos racimos por yema, lo que unido a un peso medio de 250 g por racimo, nos conduce a una producción esperada en torno a 10 kg/cepa. Esta producción es claramente excesiva para la S.F.E. (Superficie Foliar Expuesta) del sistema (Carbonneau, 1989; Smart, 1992; Jackson y Lombard, 1993), además de producir un exceso de vegetación. Se observaron brotaciones dobles y suplementarias que conducían a sobrepasar con creces los 15 brotes por metro lineal de espaldera.

El número de capas de hojas es alto (en torno a 5) lo que provoca mala aireación interior, si bien proporciona un buen sombreado a los racimos que pudiera evitar que alcanzara una temperatura excesiva los días más calurosos.

#### 4.2.2. LA VENDIMIA EN VERDE

Como consecuencia de lo explicado anteriormente se planteó un sencillo ensayo consistente en eliminar la carga que considerabamos excesiva en algunas cepas y así poder estudiar el distinto comportamiento que seguirían. Dicha operación la denominaremos como *aclareo de racimos* o también puede ser llamada *vendimia en verde*.

El 13 de Junio se marcaron en la plantación 2 grupos de 5 cepas cada uno en lugares diferentes de la parcela, y otros 2 iguales, próximos a los anteriores que sirvieran como testigos. De cada grupo, en una de las hileras de 5 cepas consecutivas se realizó el aclareo de racimos y las otras 5 de la hilera próxima se dejaron con la carga base de toda la explotación como testigo. A cada grupo nos referiremos a partir de ahora como “ME1” y “ME2”. A los tratamientos dados a las cepas les vamos a llamar “VV” haciendo referencia a la vendimia en verde, y “T” haciendo referencia al testigo, respectivamente.

En los grupos seleccionados para el aclareo se procedió a la eliminación de un racimillo de cada brote siempre que hubiera dos (consideramos esto más correcto fisiológicamente que eliminar racimos al azar que dejaría la posibilidad de que quedaran brotes con cargas muy desequilibradas). El resultado fue que en cada hilera eliminamos en torno a 80 racimillos, 16 por cepa, que considerabamos que podría ser el exceso de carga.

La pretensión inicial era reducir la cosecha a la mitad aproximadamente. Normalmente se quitó el segundo racimo por ser más accesible, por lo que es probable que se quitara el más pequeño. Se pretendía ver la influencia del exceso de carga en la calidad de la vendimia y del vino.

A lo largo del ciclo hicimos sucesivos controles sobre el desarrollo de la planta, la maduración y especialmente después del envero y hasta que llegó la fecha de la vendimia del fruto, sobre la composición de las bayas.

### 4.2.3. EL MUESTREO

A partir del envero, y hasta la madurez tecnológica, se procedió a recoger cada semana muestras de grumos de 5 a 10 uvas hasta completar unos 200 g de cada una de las repeticiones y tratamientos (4 cada vez). Los grumos se tomaron de distintas orientaciones (norte o sur) y de distintas partes del racimo (superior, media o inferior), para que fueran una muestra representativa de la maduración que se estaba dando en la vid entera.

Las muestras fueron congeladas hasta su análisis, en bolsas etiquetadas donde se especificaba el grupo, el tratamiento y la fecha de toma, siguiendo esta nomenclatura:

- El grupo:
  - ME1*- para referirnos a la zona 1 de la parcela
  - ME2*- para referirnos a la zona 2 de la parcela
  
- El tratamiento:
  - VV* - para la hilera con vendimia en verde
  - T* - para la hilera testigo
  
- Las fechas:
  - 28 de Julio (28/7)
  - 7 de Agosto (7/8)
  - 14 de Agosto (14/8)
  - 21 de Agosto (21/8)
  - 28 de Agosto (28/8)



### **4.3. VENDIMIA Y VINIFICACIÓN EN LABORATORIO**

#### **4.3.1. LA VENDIMIA**

La vendimia se llevó a cabo cuando consideramos que la uva había alcanzado la madurez tecnológica apropiada para la elaboración del vino. La fecha fue el 28 de Agosto. Los criterios que se siguieron para decidir cuándo era apropiado vendimiar fueron:

- el aspecto de las uvas según su color y tamaño (criterio de carácter fenológico)
- el análisis de los parámetros más representativos de la madurez tecnológica de la uva, que son: pH, acidez total y cantidad de azúcar (criterio de carácter analítico)

Al hacer la vendimia se contó el número de racimos obtenidos en cada cepa y los guardamos en bolsas, que posteriormente se pesaron por separado, al llegar al laboratorio.

La vendimia de la explotación para llevar uva a la bodega se realizó el 3 de Septiembre con vendimiadora mecánica.

#### **4.3.2. LA VINIFICACIÓN EN EL LABORATORIO**

##### Estrujado y despalillado:

Introducimos los racimos correspondientes a cada zona (“1” y “2”) y tratamiento (“VV” y “T”) de manera separada, en una estrujadora-despalilladora. En un barreño se recogió la pasta resultante que estaba compuesta por el mosto, el hollejo, las pepitas y una pequeña porción de los raspones. Con la mano se retiraron los restos de raspón que pudieran haber quedado. Luego la pasta se introdujo en garrafas rotuladas con su referencia.

De cada garrafa, con cuidado, se tomaron muestras de mosto que se guardaron para ser analizadas en el laboratorio.

Sulfitado del mosto:

El sulfitado consiste en un tratamiento químico que se da al mosto aprovechando las propiedades germicidas y antioxidantes que combina el dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>). También tiene la capacidad de decolorar ciertos antocianos (actúa de diferente manera en función de si se trata de antocianos monómeros, copigmentados o polimerizados) que son de color rojo en medio ácido (Rankine, 2000). El SO<sub>2</sub> se puede añadir de muchas formas, en este caso se añadió como sal de metabisulfito de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), que es muy rica en el gas. En la práctica cuando la sal se añade al mosto libera aproximadamente el 50% de su peso en SO<sub>2</sub>.

Las cantidades añadidas fueron:

Muestra	kg de pasta	g de K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
1VV	11.3	1.59
1T	15.4	2.16
2VV	23.3	3.25
2T	30.8	4.31

Análisis del mosto:

Todos los análisis que a continuación se indican fueron realizados por duplicado, y según los Métodos Oficiales de la Comunidad Europea (Reglamento CEE 2676/90).

- *pH*: se midió con un pH-metro (Crison 2002). Lo primero fue calibrarlo con las soluciones tampón de pH 4 y 7. A continuación se lavó y secó el electrodo y la sonda de temperatura y se introdujeron en un vaso de mosto, con al menos 50 ml. Cuidaremos que quede cubierta la membrana del electrodo, y que la sonda no toque el fondo del vaso. Lo estaremos agitando en círculos hasta que la pantalla deje de parpadear con el pH definitivo.
- *Acidez total*: se midió mediante una valoración ácido-base. Para ello se puso en un matraz aforado una muestra de 5 ml de mosto y se añadieron aproximadamente 50 ml



de agua destilada. La valoración se hizo con sosa 0.1 N utilizando una bureta, y con fenolftaleína como indicador.

Cálculo:

$$A.T = \left( \frac{ml(1) + ml(2)}{2} \right) * 1.5 = g / l \text{ (como ácido tartárico)}$$

donde: AT= acidez total

ml (1 ó 2)= volumen de sosa 0.1 N usado, en cada repetición

- *Contenido en azúcar*: el contenido en azúcares (glucosa y fructosa fundamentalmente) de los mostos obtenidos de las muestras de uvas, se midió empleando un refractómetro de Abbe, con compensación de temperatura en su lectura modelo Zuzi 50 305000. La expresión del resultado se hizo como “*grado alcohólico probable*” que se puede obtener de la fermentación completa del mosto, por lectura directa en la escala del aparato.

#### Corrección de la acidez del mosto:

Para que la fermentación alcohólica se lleve a cabo en condiciones adecuadas, existe un pH  $pH_{\text{óptimo}} = 3.6$ . Como el mosto difería de esta cifra, fue ajustado añadiendo ácido tartárico hasta llegar a ella. Pasadas 4-5 horas, se midió de nuevo el pH y se añadió de nuevo algo más de ácido en algunos casos .

Muestra	pH inicial	pH corregido
1VV	3.86	3.59
1T	3.78	3.58
2VV	3.59	no se corrigió
2Tp*	3.6	no se corrigió
2Tg*	3.67	3.57

\* La pasta de la hilera 2T se dividió en dos garrafas, que llamamos: 2Tg = 2T grande (tenía aproximadamente 20 kg); 2Tp = 2T pequeña (tenía aproximadamente 10 kg).

### Inoculación de levaduras:

En la piel de las uvas hay diversos microorganismos, entre ellos se encuentran las levaduras endógenas necesarias para llevar a cabo la fermentación del mosto. Estas cuando se encuentran en un medio adecuado, con nutrientes y con un pH próximo a 3.6, realizan la fermentación alcohólica, siempre que no se lo impide la temperatura o algún otro factor.

Con el fin de controlar y acelerar este proceso, se añadió el preparado de levadura comercial UCLM 5325, Fould-Springer, de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*, siguiendo las instrucciones que vienen en su etiqueta.

Después de inocular la pasta, ésta se volcó en garrafas que se llenaron tan solo un 80% de su capacidad, ya que el volumen de la pasta aumenta algo durante la fermentación debido a la emisión de CO<sub>2</sub> y además es necesario dejar hueco para el gas. Por último las garrafas se taparon con papel de aluminio para evitar una entrada de oxígeno excesiva.

### Fermentación alcohólica:

Durante los días en que se llevó a cabo la fermentación alcohólica (“FA”), se hicieron remontados cada 12 horas aproximadamente. Esto consiste en empujar la capa superior que se forma con el hollejo (“sombbrero”) hacia el fondo de la garrafa, procurando que se mezcle la pasta homogéneamente. Con eso se consigue que el hollejo entre en contacto con el mosto y ceda algunos de sus componentes, lo cual es de especial importancia en el caso de los antocianos que son los responsables del color. La causa de que se forme el sombrero en la superficie de las garrafas es que el CO<sub>2</sub> desprendido durante la fermentación empuja el hollejo hacia la superficie.

Otra de las medidas a tomar durante el transcurso de estos días, fue observar la variación del pH para controlar que fuese adecuado para la fermentación. El 5º día se apreciaba un pequeño aumento, que no necesitó ser corregido, puesto que quedaban todos en un intervalo entre 3.65 el mínimo y 3.89 el máximo. También se controló la temperatura, que permaneció estable entre 26.7 y 27°C.

### Descube:

Consiste en separar el vino del hollejo, y pepitas una vez que éste ya ha tomado las sustancias que le deben aportar. En este caso el descube se hizo el día 3 de Septiembre, a los 6 días de comenzar la fermentación alcohólica, cuando ya solo se percibían signos de que continuara fermentándose débilmente una de las garrafas.

Primero se volcó la pasta sobre un colador para que se separara el vino por decantación y luego se prensó manualmente el hollejo para extraer el líquido remanente.

La distribución del vino en las nuevas garrafas fue dividiendo cada tratamiento en dos envases distintos, para poder posteriormente hacer los análisis por duplicado.

### Trasiego:

Este proceso consiste en separar el vino de las lías. Para eso lo pasaremos a otras garrafas distintas dejando las lías que estarán en el fondo por decantación. Se llevó a cabo el 5 de Septiembre, es decir, dos días después del descube.

Para realizar la separación apropiadamente, utilizamos una bomba peristáltica *Easy-load Masterflex model 7518-00*, y un filtro de lana de vidrio acoplado al extremo succionador del tubo elástico empleado.

En este punto de la vinificación se tomaron muestras de vino para su posterior análisis. Estas se denominarán “FA”, haciendo referencia a que son tomadas tras la fermentación alcohólica.

### La fermentación maloláctica:

Esta fermentación consiste principalmente en la transformación de ácido L-málico en ácido L-láctico, pero también ocurren rutas secundarias que dan lugar a la formación de

otros compuestos cuyo interés principal viene dado por su volatilidad. El más común es el diacetilo, que desprende olor a mantequilla.

Además, en la fermentación maloláctica se dan otros fenómenos como son: un aumento del pH y una reducción de la acidez total. Esto es debido a que el ácido láctico es más débil que el ácido málico porque tiene un solo grupo carboxílico ( $-\text{COOH}$ ).

- Prueba de fermentación maloláctica por cromatografía en capa fina:

La hicimos con el fin de determinar si había comenzado la fermentación maloláctica. Consiste básicamente en hacer migrar el vino sobre una placa con una capa de celulosa y comparar las manchas que aparecen con una solución patrón para comprobar la existencia de ácido málico, láctico y tartátrico.

Es un procedimiento es muy común por lo que no nos vamos a detener en explicarlo paso a paso. Para llevarlo a cabo se utilizo el set *Vinikit* en el que vienen todos los reactivos.

La prueba de capa fina se realizó en tres ocasiones: el 5 de septiembre dio como resultado negativa, el día 25 de septiembre también dio negativa (después del resultado de la capa fina decidimos inocular la fermentación) y por último el día 16 de octubre en que se consideró que la fermentación era completa.

- Inoculación de la fermentación maloláctica:

Para iniciar la fermentación maloláctica fue necesario añadir un preparado de levadura comercial Lactobacter SP1, Laffort. Se trata de bacterias acidolácticas *Oenococcus oeni*. El preparado se rehidrata durante 15 minutos y luego se añade al vino, según indican las instrucciones de uso.

El día 16 de octubre se tomaron muestras de vino de cada una de las garrafas en botes de 250 ml de cristal de topacio, que fueron etiquetados identificando el tratamiento al que pertenecían y denominadas por “*FML*” haciendo referencia a que son muestras tomadas

posteriormente a la finalización de la fermentación maloláctica. Después se guardaron en el congelador para que mantuvieran sus cualidades hasta su análisis.

## **4.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE UVAS Y DEL MOSTO**

### **4.4.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Las muestras de uva habían sido congeladas para que conservaran sus características hasta el momento en que se realizaran los análisis. Para descongelarlas se introdujeron en un baño de agua templada, hasta que estuvieron a temperatura ambiente.

Lo primero fue separar las distintas partes de las uvas de las muestras, es decir, se separó el mosto, los hollejos y las pepitas. Este proceso se llevo a cabo manualmente como se indica a continuación:

- 1) Se tomaron de cada muestra entre 100 y 150 gramos de uvas, que se pesaron y contaron.
- 2) La separación del hollejo se hizo presionando la uva suavemente con los dedos para que saliera la pulpa entera por un lado y la piel por otro.
- 3) El mosto se obtuvo aplastando la pulpa sobre un colador que colocamos encima de un vaso donde quedaba recogido.
- 4) Las pepitas del colador fueron lavadas en un vaso para ir eliminando restos de pulpa. Usamos agua destilada, que se fue cambiando varias veces, hasta que no vimos restos. Posteriormente se escurrieron y secaron con ayuda de papel de filtro.

### **4.4.2. ANÁLISIS CONVENCIONALES REALIZADOS AL MOSTO: pH, ACIDEZ TOTAL Y GRADO ALCOHÓLICO PROBABLE**

Estos son los análisis convencionales que se realizan al mosto y al vino, y que se hacen siguiendo los Métodos Oficiales de la Comunidad Europea (Reglamento CEE 2676/90). Además ya fueron brevemente explicados en el punto 3.3.2. “La vinificación en el laboratorio”, en el epígrafe “Análisis del mosto”.

#### 4.4.3. ANÁLISIS DEL HOLLEJO

Uno de los factores que más influencia tienen en la calidad del vino serán las características de los polifenoles que se encuentran en el hollejo de la uva y que como dijimos son los principales responsables del color. Por tanto al analizar el hollejo, lo primero es conseguir la extracción de esos compuestos polifenólicos para analizarlos. Con este fin, realizamos un extracto de hollejos, como se explica a continuación:

1. El hollejo obtenido de las muestras de uva se lavó con agua destilada y se secó entre papel de filtro pasando suavemente un rodillo por encima con el fin de eliminar el posible agua remanente.
2. Se pusieron los hollejos en un vaso de batidora, y se añadieron 100 ml de una disolución de  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}-\text{HCOOH}$  (50:48.5:1.5). Batimos durante dos minutos aproximadamente hasta tener una mezcla homogénea.
3. La mezcla se volcó en un embudo con un filtro de lana de vidrio, y se dejó filtrar por su gravedad. El extracto quedó recogido en un bote de 250 ml de cristal de topacio, tapado y etiquetado, que fue refrigerado o congelado hasta que se pudo analizar.

**A) Familias de polifenoles (método espectrofotométrico): polifenoles totales, antocianos totales, flavonoles totales, y derivados del ácido hidroxicinámico totales.**

Este método que empleamos (Mazza y col., 1999) está basado en las diferentes propiedades espectroscópicas de los distintos compuestos fenólicos que están presentes en los vinos y en los hollejos. De esta forma, mientras todos los compuestos fenólicos presentan absorción en el UV a 280 nm como consecuencia del anillo fenólico que caracteriza a estos compuestos, además los antocianos son rojos y absorben a 520 nm; los flavonoles son amarillos y absorben a 360 nm; y los derivados del ácido hidroxicinámico tienen una absorción característica en el UV a 320 nm, debida a la agrupación vinil fenol.

## Material:

- Espectrofotómetro *UNICAM UV 540*
- Matraces aforados de 10 ml
- Etanol del 10% (v/v)
- Pipetas graduadas
- HCl 0.1 % en etanol del 96%
- HCl 2%

## Procedimiento:

Las muestras de extracto de hollejos, previamente centrifugadas, se diluyeron 1/10 en etanol al 10% (v/v). A un volumen de 0.50 ml de la muestra diluida se le añadieron:

- 0.5 ml de HCl al 0.1% en etanol del 95%.
- 9.1 ml de HCl al 2%.

La mezcla se homogeneizó bien y se dejó reposar durante 15 minutos. Luego se midió la absorbancia a las longitudes de onda de 280 nm (*Fenoles totales*), 320 nm (*Derivados del Ácido hidroxicinámico, "DAHC"*), 360 nm (*Flavonoles*) y 520 nm (*Antocianos*), frente a agua destilada como blanco y en una cubeta de cuarzo de 10 mm.

Para realizar los cálculos, la cuantificación se realizó a partir de rectas de calibrado obtenidas con disoluciones de diferente concentración de patrones (Sigma-Aldrich). Estos patrones fueron:

- Ácido gálico en etanol al 10% (2000 mg/l) para *fenoles totales*.
- Ácido cafeico en etanol al 10% (3000 mg/l) para *DAHC*.
- Quercetina en etanol al 95% (500 mg/l) para *flavonoles*.

Las diluciones realizadas fueron 10/100; 7.5/100; 5/100; 2.5/100; 1.25/100; y 0.5/100. En los tres casos se obtuvieron ajustes por mínimos cuadrados muy satisfactorios,



con valores de  $R^2 > 0,99$  y con ordenadas en el origen que no fueron significativamente distintas de cero.

En el caso de los antocianos es además recomendable obtener una recta de calibrado con el 3-monoglucósido de malvidina como patrón, pero al tratarse de un producto muy caro, se empleó para cuantificar su coeficiente de absorción molar a pH 1.5 suyo ( $\epsilon = 27000 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}$ ).

Las expresiones que se emplearon para cuantificar los compuestos fenólicos, derivadas de las rectas de calibrado, y teniendo en cuenta las diluciones realizadas, fueron:

- a) *Fenoles totales (mg/l ácido gálico):*  $C = 4156 \times A_{280}$
- b) *Ésteres tartáricos (mg/l ácido cafeico):*  $C = 2121 \times A_{320}$
- c) *Flavonoles (mg/l de quercetina):*  $C = 2828 \times A_{360}$
- d) *Antocianos (mg/l de 3-monoglucósido de malvidina):*  $C = 3685 \times A_{520}$

Representando C a la concentración en mg/l del compuesto representativo y A la absorbancia medida.

**B) Compuestos fenólicos individuales (método cromatográfico por HPLC): antocianos, monómeros, flavonoles, derivados del ácido hidroxicinámico, catequinas, epicatequinas y procianidinas B1, B2, Y B3.**

El material empleado en nuestro caso fue:

- Cromatógrafo de líquidos Varian equipado con un sistema de inyección automática y detector de fotodiodos
- Estación de tratamiento de datos denominada Star Chromatography Workstation (Versión 6.00).
- Equipo Mili-Q desionizador de agua.
- Jeringa de vidrio.
- Filtros de membrana de nylon de  $0.45 \mu\text{m}$  de diámetro de poro

Los compuestos fenólicos de nuestras muestras (tanto extractos de hollejos como vinos) fueron analizados con un cromatógrafo como el descrito, que nos permite trabajar tanto con los cromatogramas como con los espectros de cada compuesto. La detección se realiza en un rango de longitudes de onda comprendido entre 280 y 560 nm. Monitorizando la señal a: *520 nm para los antocianos, 360 nm para los flavonoles, 320 nm para los derivados del ácido hidroxicinámico y 280 nm para los 3-flavanoles monómeros y el ácido gálico.*

La preparación de las muestras se realizó con reactivos de calidad para análisis de HPLC. El agua utilizada es desionizada con un equipo milli-Q. Antes de su inyección en el cromatógrafo se filtraron las muestras a través de membranas de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

Hay que tener en cuenta las condiciones cromatográficas, por lo que se detallan a continuación las condiciones de trabajo:

- Columna : Spherisorb ODS 3 (250 x 4.6 mm ), con relleno de C18 de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula, con precolumna del mismo material (10 x 4.6 mm)
- Fase móvil:
  - Eluyente A:  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  50 mM; pH = 2.6
  - Eluyente B: 20% A +80% acetonitrilo
  - Eluyente C:  $\text{H}_3\text{PO}_4$  200 mM; pH= 1.5
- Gradiente:
  - 100% de A (min 0); 100% de A (min 2); 92% de A + 8% de B (min 5)
  - 14% de B + 86% de C (min 17); 18% de B + 82% de C (min 22)
  - 21.5% de B + 78.5% de C (min 62); 100% de A (min 75).
- Flujo: 0.6 ml/min
- Presión de cabeza de la columna: 2800-2900 psi
- Temperatura de la columna: 40°C
- Volumen de inyección: 10  $\mu\text{m}$
- Tiempo de análisis: 70 min

Los cromatogramas fueron registrados en el IVICAM (Tomelloso) y los datos fueron procesados en la EUITA de Ciudad Real con la estación de tratamiento de datos citada.

La determinación cuantitativa se llevó a cabo a partir de las áreas de los picos cromatográficos registrados a las longitudes de onda anteriormente citadas; empleando las rectas de calibrado que se detallan a continuación:

<i>Sustancia separada por HPLC</i>	<i>Ecuación de la recta de calibrado (C en mg/l)</i>
(+)-Catequina	$C = (\text{Área} / 11820) + 0.2691$
(-)-Epicatequina	$C = (\text{Área} / 10040) + 0.8742$
Ácido gálico	$C = \text{Área} / 48309$
Ácido cafeico	$C = \text{Área} / 119047$
Ácidos <i>c</i> - y <i>t</i> -caftárico	Como ácido cafeico
GRP	Como ácido cafeico
Ácido <i>p</i> -cumárico	$C = \text{Área} / 108695$
Ácidos <i>c</i> - y <i>t</i> -cutárico	Como ácido <i>p</i> -cumárico
Miricetina	$C = \text{Área} / 108747$
Quercetina	$C = \text{Área} / 58480$
3-Monoglucósido de miricetina	Como 3-monoglucósido de
3-Monoglucósido de quercetina	quercetina
3-Monoglucósido de kampferol	$C = \text{Área} / 61322$
3-Monoglucósido de Isoramnetina	$C = \text{Área} / 48254$
Rutina (3-ramnosilglucósido de quercetina)	$C = \text{Área} / 65350$ $C = \text{Área} / 34867$
3-Glucosilxilósido de quercetina	Como rutina
3-Glucosilarabinósido de kampferol	Como rutina
3-Monoglucósido de malvidina	$C = \text{Área} / 37190$
Resto de antocianos monómeros	Como 3-monoglucósido de malvidina

### **C) Características de los taninos: Ensayo de Taninos e Índice de Gelatina**

- *El Ensayo de Taninos.* Se utilizará como material:
  - Espectrofotómetro *UNICAM UV 540*
  - Solución de HCl al 37%
  - Etanol del 96%
  - Agua mili-Q
  - Matraces aforados de 50 ml
  - Botes de 125 ml
  - Pipetas
  - Pera
  - Guantes y gafas

Se toma 1 ml de vino en el matraz aforado, comprobando que no tenga turbidez, (en el caso contrario habría que centrifugar) y enrasamos con agua hasta 50 ml. Después ponemos en tres botes 4 ml de la solución 1/50 y 2 ml de agua. En la campana extractora añadiremos 6 ml del HCl al 37% ayudándonos de una pera.

De los tres botes, el que llamamos “*D1*” no se hierva, porque se usa como blanco. Los otros dos, que llamaremos “*D2A*” y “*D2B*”, se pondrán en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos. Luego se dejan enfriar, y por último se añadirá 1 ml de etanol al 96% a todos los botes.

Los tres botes se miden en el espectrofotómetro en cubeta de cuarzo de 10 mm a una longitud de onda de 550 nm.

- *El Índice de Gelatina.* Se utilizará el mismo material que en el ensayo de taninos, y además:
  - Gelatina soluble en frío SEPSA AUTOCLAR M
  - 1 vaso de 150 ml
  - 1 agitador magnético
  - botes de cristal topacio de 150 ml

- agua destilada

Este método está basado en la capacidad de los taninos condensados de reaccionar con las proteínas, formando combinaciones estables que precipitan. Guarda bastante relación con la astringencia determinada sensorialmente.

Se procede como se explica a continuación: a 30 ml de vino se añaden 5 ml de solución de gelatina soluble en frío (70 g/l) cuya preparación se hace siguiendo las instrucciones de la etiqueta. Después se deja reposar 4 días para que precipiten las proteínas, y a continuación se centrifuga el vino. Al sobrenadante se le realiza el ensayo de taninos como ha quedado explicado en el apartado anterior.

Una vez hechos ambos ensayos, se realizarán estos cálculos:

$$I(\text{gelatina}) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

Donde:  $C_0$  = ensayo de taninos antes de añadir la gelatina

$C_1$  = ensayo de taninos tras de añadir la gelatina

El I (gelatina) normalmente varía entre valores de 25-80:

- a) Valores altos (>60): taninos altamente reactivos, causantes de aspereza, e incluso astringencia.
- b) Valores bajos (< 35-40): indica falta de cuerpo y puede ser la causa de las sensaciones de blandura y amargor.
- c) Valores medios (40-60): los taninos son escasamente reactivos, pero los vinos pueden parecer con cuerpo y bien estructurados, o duros y ásperos.

#### 4.4.4. ANÁLISIS REALIZADOS A LAS PEPITAS

Las pepitas fueron congeladas en bolsas de aluminio etiquetadas en el momento en que se hizo la separación del resto de la uva, y se mantuvieron así hasta que se pudieron analizar. El día del análisis se atemperaron dejándolas fuera del congelador 120 minutos aproximadamente.

Para analizar los compuestos de las pepitas que tienen su repercusión en la calidad del vino, realizamos un extracto. La elaboración de este extracto se hizo como sigue:

1. Las pepitas se introducen en un bote de cristal de topacio de 125 ml con 100 ml de “líquido de extracción” que está compuesto de:  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}-\text{HCOOH}$  (50:48.5:1.5) con 1 g/l de ácido ascórbico para evitar la oxidación en los taninos.
2. Los botes se dejan en agitación suave durante 4 días, tiempo necesario para que los compuestos polifenólicos de las pepitas pasen al líquido.
3. Pasado este tiempo, se separan las pepitas del extracto con ayuda de un colador.

Una vez que tenemos el extracto de pepitas lo más interesante es analizar la composición de taninos, que son los principales compuestos que aportan al vino. Para el estudio de estos, se utilizaron los mismos métodos que antes se usaran con el extracto de hollejo (ver el epígrafe anterior), es decir:

- Ensayo de taninos
- Índice de gelatina

#### **4.5. ANÁLISIS DE LOS VINOS.**

#### 4.5.1. ANÁLISIS CONVENCIONALES

##### A) Determinación de azúcares reductores

Se trata de averiguar si la fermentación alcohólica ocurrió de forma completa, obteniéndose como resultado vinos “secos”.

Para esta determinación utilizamos el Método de Rebelein. La técnica del método se basa en las propiedades reductoras de la glucosa y la fructosa sobre una solución cupro-alcalina. En presencia de estos azúcares, el  $\text{Cu}^{2+}$  se reduce a  $\text{Cu}^+$  en medio alcalino y en ebullición, valorándose posteriormente los iones  $\text{Cu}^{2+}$  en exceso. En este método también se realiza la hidrólisis previa de la posible sacarosa presente en la muestra.

El procedimiento viene especificado en el reglamento de los Métodos Oficiales de la Comunidad Europea (Reglamento CEE 2676/90).

Según la legislación un vino tranquilo y seco tiene:  $\leq 4 \text{ g/l}$  ó  $\leq 9 \text{ g/l}$  en el caso de que los azúcares totales – acidez total sea  $\leq 2$ .

##### B) Determinación del sulfuroso libre y ligado

El método de análisis seguido es el que viene especificado en el reglamento de los Métodos Oficiales de la Comunidad Europea (Reglamento CEE 2676/90), como método rápido (Método de Ripper)

Para llevar a cabo este análisis se utilizó un equipo Toning+ Gab System, que permite detectar con gran precisión el punto final de la valoración con vinos tintos, gracias al empleo de una célula fotoeléctrica como detector.

##### C) pH

El método de análisis seguido es el que viene especificado en el reglamento de los Métodos Oficiales de la Comunidad Europea (Reglamento CEE 2676/90).

D) Acidez total

El método de análisis seguido es el que viene especificado en el reglamento de los Métodos Oficiales de la Comunidad Europea (Reglamento CEE 2676/90).

E) Grado alcohólico

El método de análisis seguido es el que viene especificado en el reglamento de los Métodos Oficiales de la Comunidad Europea (Reglamento CEE 2676/90).

#### **4.5.2. COMPUESTOS FENÓLICOS**

El análisis de los vinos se va a realizar sobre muestras tomadas antes y después de la fermentación maloláctica. Con esto pretendemos estudiar la evolución que siguen los compuestos fenólicos en las distintas etapas de vinificación, y las características que a ellos van unidas, principalmente el color.

**A) Familias de polifenoles (método espectrofotométrico): *polifenoles totales, antocianos totales, flavonoles totales y derivados del ácido hidroxicinámico totales.***

Este análisis se realizó de igual manera que antes se hiciera para el hollejo, con la única diferencia de la sustitución del extracto por el mismo volumen de vino (sin turbidez). El método de análisis queda explicado en el punto: 4.4.3. “Análisis del hollejo”, epígrafe A).

**B) Compuestos fenólicos individuales (método cromatográfico por HPLC): *antocianos monómeros, flavonoles, derivados del ácido hidroxicinámico, catequinas, epicatequinas y procianidinas B1, B2, y B3 y ácido gálico.***



El método de análisis queda explicado en el punto: 4.4.3. “Análisis del hollejo”, epígrafe B).

### **C) Características de los taninos: ensayo de taninos e índice de gelatina.**

El método de análisis queda explicado en el punto: 4.4.3. “Análisis del hollejo”, epígrafe C).

### **4.5.3. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANOS POLIMERIZADOS Y COPIGMENTADOS**

Los antocianos monómeros (acilados y no acilados) tienden a establecer interacciones hidrofóbicas con otros compuestos incoloros, provocando el proceso de copigmentación, del que ya hemos comentado algo con anterioridad, que estabilizará el color rojo-púrpura de los vinos tintos jóvenes. Estas estructuras aproximan a los antocianos y a otros compuestos fenólicos y los disponen de una manera que los permite reaccionar posteriormente, dando lugar a estructuras poliméricas.

Los antocianos monómeros, los copigmentados y los polimerizados se diferencian entre sí por su capacidad de incrementar la intensidad del color rojo en medio ácido y en su capacidad de ser decolorados por el ión bisulfito. La medida de los antocianos en un medio a pH fijo de 3.6 en diferentes condiciones (diluyendo, adicionando acetaldehído que captura el bisulfito unido a los antocianos, y en presencia de bisulfito que decolora ciertos antocianos), permite establecer las fracciones de antocianos que se encuentran en estado de monómeros, copigmentados y polimerizados.

El material empleado en esta determinación fue el enumerado a continuación:

- pH-metro CRISON 2002

- Cuatro soluciones: HCl 0.1N, HCl 1N, NaOH 0.1N y NaOH 1N
- Pipetas pasteur
- Tubos de ensayo
- Parafilm
- Pipetas automáticas
- Acetaldehído al 10% (v/v) en agua
- SO<sub>2</sub> al 5% (w/v) en agua
- Disolución de vino sintético (12% alcohol y 5g/l de ácido tartárico ajustado a pH =3.6)
- Espectrofotómetro UNICAM UV 540
- Cubetas de vidrio óptico de 10 y 2 mm

La muestra de vino, tras haber sido centrifugada, se ajustó a pH =3.6 añadiendo la cantidad necesaria de las disoluciones de HCl y NaOH según nos convenga. A una primera alícuota de 2 ml de vino a pH =3.6 se le añadieron 20 µl de acetaldehído al 10% (v/v) en agua y lo dejamos reposar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Tras esto, medimos su absorbancia en una cubeta de 2 mm frente a agua como blanco y a una longitud de onda de 520 nm. Esta absorbancia medida, multiplicada por el factor de dilución 1.01, sería la medida:  $A_{\text{acet.}}$

A una segunda alícuota de 2 ml se le añadieron 160 µl de SO<sub>2</sub> al 5% (w/v) en agua, y se midió su absorbancia de inmediato en una cubeta de 2 mm frente a agua como blanco a una longitud de onda de 520 nm. La absorbancia medida, multiplicada por el factor de dilución 1.08 sería la medida:  $A_{\text{SO}_2}$ .

En último lugar, una tercera alícuota de 2 ml de muestra se diluyó 1/20 con vino sintético, y se midió su absorbancia en cubeta de 10 mm frente a agua como blanco a una longitud de onda de 520 nm. La absorbancia medida, multiplicada por el factor de dilución y de corrección de peso óptico<sup>4</sup>, sería la medida:  $A_{\text{dil.}}$

Las diferentes fracciones de antocianos son:

- Antocianos polimerizados:  $AP = A_{\text{SO}_2}$
- Antocianos monómeros:  $AM = A_{\text{dil.}} - A_{\text{SO}_2}$

$$\text{- Antocianos totales:} \quad AT = A_{\text{dil}}$$

Mientras que el color del vino debido a la copigmentación es:

$$\text{- Color debido a la copigmentación: } CC = A_{\text{acet}} - A_{\text{dil}}$$

$$\text{- Color total a pH del vino:} \quad CT = A_{\text{acet}}$$

#### 4.5.4. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS EN LOS VINOS

##### A) Parámetros del Sistema CIELAB

Se calcularon las coordenadas que describen el color ( $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ,  $C^*$ ,  $H^*$ ) a partir de los valores triestímulo ( $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ ). Sin embargo no se emplearon las ecuaciones simplificadas propuestas por la CIE (Comisión Internacional de Iluminación) en 1931, con iluminante C y observador estándar de 2°, y aprobadas por la OIV, ya que Negueruela y Echávarri (1983) han confirmado que con dicho método se pueden cometer importantes errores en el cálculo de las coordenadas del color, especialmente en vinos de color intenso.

Además la OIV expuso (1994) la necesidad de cambiar dicho método usando el espacio CIELAB. Por ello se ha adoptado el método expuesto por Ayala y col. (1997) para vinos tintos utilizando el iluminante D65 y observador estándar de 10°, y que están en estos momentos siendo objeto de estudio por la OIV para establecerlo como método de referencia internacional.

Las ecuaciones para calcular de los valores triestímulo propuestas por estos autores:

$$X = 14.172 T_{440} + 28.583 T_{540} + 52.727 T_{610} - 0.462$$

$$Y = 9.005 T_{440} + 62.965 T_{540} + 28.168 T_{610} - 0.063$$

$$Z = 94.708 T_{440} + 15.889 T_{540} + 5.233 T_{610} + 1.777$$

El método consistirá en medir la absorbancia del vino a 440, 540 y 610 nm en cubetas de 2 mm de espesor frente a agua como blanco. Las absorbancias obtenidas se

corregirían para 10 mm de espesor, se calcularían las transmitancias y se aplicarían las expresiones anteriores para obtener los valores triestímulo.

A partir de éstos, y aplicando las ecuaciones correspondientes, se calcularían los parámetros del sistema CIELAB.

A pesar de esto, este grupo está acumulando más medidas experimentales de los parámetros CIELAB en vinos y cada cierto tiempo proponen unas nuevas longitudes de onda de medida y nuevas expresiones mejoradas para el cálculo de los valores triestímulo (Ayala y col., 1999). De esta forma, estos autores han puesto a punto un programa (Ayala y col., 2001) que permite, a partir de las absorbancia medidas a las longitudes de onda 450, 520, 570 y 630 nm, en cubetas de 2 mm para vinos tintos y rosados, y de 10 mm para vinos blancos y brandies, efectuar todos los cálculos de manera rápida, con la ayuda de un programa de ordenador. Precisamente éste será el método que empleemos, para el cual necesitaremos por tanto:

- Espectrofotómetro UNICAM UV 540.
- Cubeta de 2 mm de espesor.

## **B) Método usual de la O.I.V. Parámetros empleados en bodega**

Los vinos se filtraron a través de filtros de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y se midieron las absorbancias (A) del vino a 420, 520 y 620 nm en cubetas de 2 mm de espesor frente a agua como blanco. Los resultados de absorbancia se corrigieron para 10 mm de longitud de paso óptico y se calculó el índice de color de Glories (1984), denominado *Intensidad Colorante (IC)*, así como el índice de color propuesto por Sudraud (1958) llamado *Tonalidad (T)*.

$$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$T = A_{420} / A_{520}$$