



Relación color-composición fenólica en
vinos tintos de clima cálido.
Evaluación de la copigmentación
por Colorimetría Triestímulo.

Belén Gordillo Arrobas

Sevilla, Abril 2012

La tesis titulada “RELACIÓN COLOR-COMPOSICIÓN FENÓLICA EN VINOS TINTOS DE CLIMA CÁLIDO. EVALUACIÓN DE LA COPIGMENTACIÓN POR COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO”, presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas D^a. **Belén Gordillo Arrobas** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Área de Nutrición y bromatología del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina legal (Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla), bajo la dirección de los Doctores **D. Francisco José Heredia Mira**, Catedrático de la Universidad de Sevilla, y **D^a. M^a Lourdes González-Miret Martín**, Profesora Titular de la Universidad de Sevilla. Considerando que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos, y que el trabajo reúne los requisitos necesarios, autorizan su presentación.

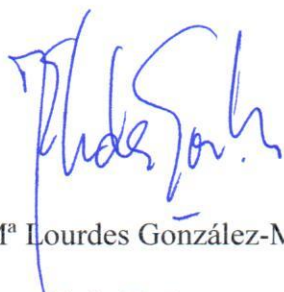
En Sevilla, a 16 de Abril de 2012



Fdo. Francisco José Heredia Mira



Fdo. Belén Gordillo Arrobas



Fdo. M^a Lourdes González-Miret Martín

Directores de la Tesis



Nutrición y Bromatología

D. Ana María Cameán Fernández, Director del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla y **D. Fernando Romero Guzmán**, Coordinador del Programa de Doctorado Interdepartamental *Estudios Avanzados en Alimentos*.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo ha sido realizado dentro del Programa de Doctorado Interdepartamental Estudios Avanzados en Alimentos por la Licenciada en Ciencias Biológicas Dña. Belén Gordillo Arrobas, siendo sus directores D. Francisco José Heredia Mira y Dña. Lourdes González-Miret Martín. Habiéndose cumplido todos los requisitos legales vigentes,

Y para que conste, se expide y firma el presente certificado en Sevilla, a 16 de Abril de 2012.



Fdo. Ana M^a Cameán Fernández



Fdo. Fernando Romero Guzmán

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincera admiración al Dr. Francisco José Heredia Mira y a la Dra. M. Lourdes González-Miret Martín, directores de esta Tesis. A ellos debo haber concluido con mucha satisfacción el difícil reto de desarrollar una tesis doctoral gracias a la excelente dirección que han realizado durante todos estos años sobre mi trayectoria científica. Un inmenso agradecimiento por la confianza que siempre han depositado en mi trabajo, la constante dedicación a él, los consejos y sugerencias en momentos clave, la orientación profesional, y la importante motivación personal que me han ofrecido en todo momento. Gracias por enseñarme a superar con humildad, paciencia y dedicación las dificultades que surgen en numerosas ocasiones. Ha sido un privilegio poder contar con vuestra guía y ayuda. Por ser un ejemplo de profesionalidad, grandes maestros y mejores personas. Incondicionalmente, GRACIAS.

Al Dr. Victor de Freitas de la Universidad de Oporto y la Dra. Anna G. Mignani del Instituto de Física Aplicada del CNR de Florencia, por sus inestimables colaboraciones científicas, gracias a los cuales he conseguido desarrollar satisfactoriamente los trabajos de investigación realizados durante mis estancias en el extranjero.

A D. Santiago Alonso y la Dra. Emilia Bejines, por compartir sus conocimientos de enología y estar siempre disponibles para resolver las dudas y problemas surgidos durante la planificación y el desarrollo de los intensos ensayos de vinificación realizados, con los que espero seguir contando y aprendiendo por mucho tiempo. Mil gracias.

A mi amiga y compañera de trabajo María Luisa Escudero Gilete, gracias por todo lo que me aportas, tu desinteresada ayuda, tus consejos, tu comprensión y tus ánimos diarios. Igualmente a Carla Stinco, gracias por tu sincera amistad, disposición y ayuda.

A todos los compañeros que forman parte del grupo Color y Calidad de Alimentos, muy especialmente a los que comparten conmigo el trabajo diario: M. Luisa, Carla, Paco, Rocío, M. José, Antonio, Fran, etc., a todos ellos les agradezco de corazón el compañerismo, los ánimos y la ayuda que me demuestran en muchas ocasiones y los muchos buenos momentos que hemos pasado juntos. Igualmente, a los compañeros del departamento de Química de la Universidad de Oporto y del Instituto de Física Aplicada del CNR de Florencia, que gracias a su ayuda en cuestiones científicas, y el cariño y la simpatía demostrada durante las estancias en el extranjero han contribuido a enriquecer mi vida en muchos aspectos.

A la Dras. Isabel Vicario y Dolores Hernanz, y a Félix Moreno, por estar siempre a disposición para resolver cualquier duda o problema que se haya podido plantear durante el desarrollo de este trabajo, mostrándome en todo momento numerosas muestras de cariño y cercanía.

A M. Luisa Hernández, gestora del departamento, por la eficiente labor realizada en cuestiones burocráticas, su constante disponibilidad, amabilidad y su amistoso trato.

A la D.O. "Condado de Huelva" y las bodegas que la integran, por fomentar y apoyar la investigación en el Condado de Huelva, mostrando una gran confianza en nuestro grupo de investigación "Color y Calidad de los Alimentos" para la realización de este trabajo y de numerosos proyectos realizados anteriormente.

Para la realización de este trabajo se ha contado con el apoyo institucional del proyecto de Excelencia de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía “MEJORA DE LAS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS Y BIOFUNCIONALES DE LA FRACCIÓN COLORANTE DE VINOS TINTOS ANDALUCES” (P07-AGR-02893), del que el Dr. D. Francisco J. Heredia Mira es investigador principal (2008-2012), y la Beca Predoctoral asociada a dicho proyecto.

“El secreto para llegar es muy sencillo; se reduce a dos palabras: trabajo y perseverancia”

Ramón y Cajal

A mi familia, muy especialmente a mis hermanos.

ÍNDICE

➤ RESUMEN / ABSTRACT

➤ AGRADECIMIENTOS

➤ INTRODUCCIÓN

1. LA VINIFICACIÓN DE VINOS TINTOS EN CLIMA CÁLIDO	
1.1. Clima y viticultura. Consecuencias del cambio climático	2
1.2. Técnicas de vinificación en tinto	5
1.2.1. Vinificación en tinto tradicional	6
1.2.2. Maceración prefermentativa a bajas temperaturas	9
1.3. Elaboración de vinos tintos en Andalucía	11
1.3.1. Denominación de Origen “Condado de Huelva”	13
1.3.2. Inclusión de variedades tintas y aplicación de nuevas estrategias de vinificación en la D.O. “Condado de Huelva”	15
2. IMPLICACIONES QUÍMICAS DEL COLOR DEL VINO	
2.1. Compuestos responsables del color	21
2.1.1. Antocianos	22
2.1.2. Flavan-3-oles	24
2.1.3. Flavonoles	26
2.1.4. Flavononoles y flavonas	27
2.1.5. Ácidos fenólicos	28
2.1.6. Estilbenos	29
2.1.7. Pigmentos derivados antociánicos de nueva formación	30
2.1.8. Pigmentos minoritarios no antociánicos	36
2.2. La química en el color del vino	36
2.2.1. Estructura química	36
2.2.2. Variación del pH	38
2.2.3. Decoloración por el ion bisulfito	39
2.2.4. Oxidación	40
2.2.5. Copigmentación	41
3. IMPLICACIONES AGRONÓMICAS Y ENOLÓGICAS DEL COLOR DEL VINO TINTO	
3.1. Variedad de uva	45

3.2. Grado de maduración de la uva.....	46
3.3. Proceso de vinificación	49
3.4. Técnica de vinificación	54
3.5. Proceso de envejecimiento.....	55
4. ANÁLISIS DEL COLOR	
4.1. Identificación y cuantificación de los fenoles del vino tinto	61
4.1.1. Métodos espectrofotométricos	62
4.1.2. Métodos cromatográficos.....	66
4.2. Medida del color	68
4.2.1. Aplicación de la Colorimetría Triestímulo al análisis del color del vino: Espacio de color CIELAB.	71
4.2.2. Técnicas de análisis	74
👉 OBJETIVOS	79
👉 MATERIAL Y MÉTODOS GENERAL	
1. MUESTRAS	
1.1. Elaboración de vinos	81
1.2. Disoluciones modelo de antocianos y de copigmentación	88
2. METODOLOGÍA	
2.1. Parámetros Físico-Químicos	91
2.2. Análisis cromatográficos de los vinos	100
2.2.1. Cuantificación de ácidos málico y láctico mediante HPLC con detección por fotodiodos.....	100
2.2.2. Cuantificación de compuestos fenólicos individuales mediante HPLC con detección por fotodiodos.....	103
2.2.3. Cuantificación de pigmentos antociánicos mayoritarios mediante HPLC con detección por fotodiodos.....	105
2.2.4. Identificación y cuantificación de pigmentos antociánicos mediante HPLC acoplado a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).	108
2.3. Medida del color por Colorimetría Triestímulo. Espacio CIELAB.	110
2.4. Medida de la copigmentación	112
2.4.1. Medida de copigmentación en vinos según Boulton (1996)	112
2.4.2. Medida de copigmentación en vinos por Colorimetría Triestímulo.....	113

2.4.3. Medida de copigmentación en disoluciones modelos antociánicas	114
2.5. Análisis estadísticos	115

➔ RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1. INFLUENCIA DE LA VARIEDAD Y EL GRADO DE MADURACIÓN DE LA UVA EN LA CALIDAD Y ESTABILIDAD CROMÁTICA DE VINOS TINTOS ELABORADOS EN CLIMA CÁLIDO. MODELOS DE PREDICCIÓN CROMÁTICA

• Antecedentes	119
• Objetivos	121
• Parte experimental	121
- Sección I. Influencia del factor varietal.....	122
- Sección II. Influencia del grado de maduración de la uva	131
• Conclusiones	136
<i>Publicación: Importance of anthocyanic copigmentation on the color expression of red wine in warm climate.</i>	

Capítulo 2. INFLUENCIA DE LA TÉCNICA DE MACERACIÓN PREFERMENTATIVA EN EL COLOR Y LA COPIGMENTACIÓN ANTOCIÁNICA EN VINOS TINTOS TEMPRANILLO ECOLÓGICOS ELABORADOS EN CLIMA CÁLIDO

• Antecedentes	139
• Objetivos	140
• Parte experimental	140
• Conclusiones	145
<i>Publicación: Influence of prefermentative cold maceration on the color and anthocyanic copigmentation of organic Tempranillo wines elaborated in a warm climate</i>	

Capítulo 3. INFLUENCIA DE LA TÉCNICA DE REFRIGERACIÓN EN EL COLOR Y LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE VINOS TINTOS SYRAH ELABORADOS EN EL CONDADO DE HUELVA OBTENIDOS POR CRIOMACERACIÓN PREFERMENTATIVA

• Antecedentes	147
• Objetivos	149
• Parte experimental	149
• Conclusiones	153

Publicación: Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of Syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration

Capítulo 4. APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y LA COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO AL ESTUDIO DE LA APTITUD PARA EL ENVEJECIMIENTO DE VINOS TINTOS SYRAH ELABORADOS EN EL CONDADO DE HUELVA

- Antecedentes155
- Objetivos156
- Parte experimental156
- Conclusiones160

Publicación: Application of LC–MS and tristimulus colorimetry to assess the ageing aptitude of Syrah wine in the Condado de Huelva D.O. (Spain), a typical warm climate region

Capítulo 5. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN NUEVO MÉTODO PARA LA EVALUACIÓN INTEGRAL DEL EFECTO DE LA COPIGMENTACIÓN ANTOCIÁNICA EN EL COLOR MEDIANTE COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO

- Antecedentes163
- Objetivos165
- Parte experimental166
 - Sección I. Interpretación colorimétrica de la copigmentación: definición de nuevas variables en el espacio de color CIELAB.167
 - Sección II. Aplicación de las variables colorimétricas de copigmentación al estudio de la copigmentación en disoluciones modelo de antocianos y vinos tintos.....170
- Conclusiones177

Publicación: Comprehensive colorimetric study of anthocyanic copigmentation in model solutions. Effects of pH and molar ratio.

- ➔ **CONCLUSIONES GENERALES / GENERAL CONCLUSIONS 179**
- ➔ **REFERENCIAS 183**
- ➔ **APÉNDICE I. COLORIMETRÍA 201**
- ➔ **APÉNDICE II. ABREVIATURAS 225**

RESUMEN

La estabilización química de los pigmentos del vino, y por tanto del color, constituye una de las líneas de investigación más importantes en el campo de la enología. El estudio y control de los factores, tanto agronómicos como enológicos, que determinan su contenido y evolución durante la vinificación ha sido y continúa siendo uno de los principales objetivos en los controles de calidad del vino.

La calidad y estabilidad del color del vino tinto está directamente relacionada con su composición fenólica, fundamentalmente con los pigmentos antociánicos y otros fenoles extraídos de la uva durante la vinificación, pero también con el grado de copigmentación y polimerización desarrollado por estos compuestos en etapas subsiguientes de la vinificación ya que ambos procesos son responsables de la estabilización del color.

En regiones de clima cálido, como es el caso de Andalucía (Suroeste de España), el cultivo de la vid y la elaboración de vinos tintos de calidad se enfrentan a serios inconvenientes relacionados con las altas temperaturas ambientales, acentuadas en las últimas décadas por los efectos del cambio climático. Particularmente en las uvas tintas, es frecuente que se produzca un desfase entre la madurez de la pulpa con respecto a la de las semillas y el hollejo, lo que dificulta que se alcance una adecuada madurez fenólica necesaria para elaborar vinos de calidad. Así, los vinos elaborados a partir de uvas de composición desequilibrada y pobres en pigmentos, suelen derivar habitualmente en vinificaciones complicadas, con notables pérdidas de color y desarrollos microbiológicos indeseables.

En la presente memoria se ha realizado un estudio exhaustivo de la incidencia de distintos factores agronómicos (variedad y grado de maduración de la uva) y enológicos (técnica de vinificación o proceso de envejecimiento) sobre las características cromáticas y las relaciones color-composición de vinos tintos elaborados en distintas regiones de Andalucía occidental. Asimismo, se ha estudiado en mayor profundidad el efecto de la copigmentación sobre el color de los pigmentos antociánicos, tanto en disoluciones modelo como en vinos tintos jóvenes de diferentes características.

Los resultados obtenidos demuestran que las variedades Syrah y Cabernet Sauvignon muestran, a priori, una mayor aptitud para la elaboración de vinos tintos jóvenes de calidad en la D.O. "Condado de Huelva", y que la calidad cromática de vinos Syrah mejora cuando se usan uvas con mayor grado de madurez. Se ha confirmado que la maceración prefermentativa representa una técnica de vinificación útil para la elaboración de vinos tintos en clima cálido, ya que produce una mejora tanto de la composición fenólica como de la calidad y estabilidad cromática, siendo más efectiva si las bajas temperaturas se aplican mediante la refrigeración previa de la uva en cámara frigorífica. Asimismo, se ha comprobado que los vinos Syrah elaborados mediante esta técnica se muestran aptos para ser sometidos a un proceso de crianza en barrica, obteniéndose mejores características cromáticas cuando se aplican periodos de envejecimiento entre 6 y 9 meses. Por último se ha comprobado que la Colorimetría Triestímulo constituye una herramienta metodológica útil para la evaluación integral del efecto cromático de la copigmentación, poniendo de manifiesto que este fenómeno induce, tanto en disoluciones modelo como en vinos tintos jóvenes, variaciones del color cuantitativas y cualitativas, las cuales son variables en función de factores como el pH, la estructura del copigmento, la ratio molar pigmento/copigmento o, en el caso del vino, de la variedad y el grado de maduración de la uva.

ABSTRACT

Chemical stabilisation of pigments in wine (and so the colour) is one of the main research areas on Enology. Studying and controlling both agronomic and enological factors which determine their content and evolution during vinification process is one of the main objectives to achieve quality wines.

The stability and quality of wine colour is directly related to its phenolic composition, mainly anthocyanic pigments and other phenols extracted from grapes during the winemaking process, and also related to the copigmentation and polymerisation level reached, responsible to the colour stabilisation.

In warm climate regions, that is the case of Andalucía (Southwestern Spain), the cultivation of the vine and the production of quality red wines are facing serious problems related to high temperatures, more accused during the last decades due to the effect of the climatic change. Usually, there is a gap between the skin and pulp and the seeds maturation, particularly in red grapes, which makes difficult to achieve the optimum phenolic maturation, deeply important to obtain high quality wines. Thus, wines obtained from grapes having unbalanced chemical composition and low pigments content usually undergo notable loss of colour and undesirable microbiological growth and development during the winemaking.

This Research Report includes an exhaustive study of the incidence of several agronomic (grape variety and maturation level) and enological (vinification technique or ageing process) factors on the chromatic characteristics and the relationships between the colour and the chemical composition of red wines elaborated in different regions of Western Andalucía. The effect of the copigmentation phenomenon on the colour of anthocyanic pigments has been also studied, both in model solutions and in young red wines having different characteristics.

Based on the results obtained, it has been demonstrated that in the *Condado de Huelva Origen Appellation* the grape varieties Syrah and Cabernet Sauvignon seems to have better conditions to elaborate high quality young red wines, and that the chromatic characteristics of Syrah wines can be improved by using high maturation level grapes. It has been confirmed that the prefermentative cold maceration is a useful winemaking technique for obtaining red wines in warm climate regions since it improves the phenolic composition as well as the quality and stability of colour. This technique is more effective when the low temperatures are reached by keeping the

grapes in refrigeration previous to be crushed. Moreover, it has been assessed that the Syrah wines obtained by applying the prefermentative cold maceration have better chromatic characteristics when they are submitted to ageing in barrels for a 6-9 months.

Finally, it has been stated that the Tristimulus Colorimetry is a useful methodological tool to assess the global colorimetric effect of the copigmentation, being highlighted, both in young red wines and model anthocyanic solutions, that this phenomenon induces quantitative and qualitative colour variations. These changes are influenced by factors such as pH, the copigment structure, the pigment/copigment ratio or, in the case of wines, the grape variety and the ripeness status.

Introducción



1. LA VINIFICACIÓN DE VINOS TINTOS EN CLIMA CÁLIDO

La vid es uno de los cultivos más antiguos que existen, y junto con la producción de vinos, ha presentado un importante desarrollo económico, geográfico y cultural a lo largo de la historia. Según la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), la producción mundial de uva ocupa aproximadamente 7.79 millones de hectáreas, representando el área de cultivo destinada en Europa a un 58.6% del total (OIV, 2007). La producción mundial de uva, que aumentó considerablemente hasta el inicio de la década de 1980, ha ido disminuyendo gradual y paralelamente a la reducción de la superficie en producción hasta principios de 1990. Aproximadamente el 71% de la producción se destina a la producción de vino, el 27% a consumo fresco y el 2% como frutos secos. La producción mundial de vino en 2007 fue aproximadamente de 265.9 millones de hL. España, después de Francia e Italia, es el tercer país productor a nivel mundial, con aproximadamente 42 millones de hL producidos (Bernabeu et al., 2008; Hussain et al., 2008).

La vid es un arbusto caducifolio perteneciente a la familia Vitácea, que comprende 14 géneros, entre los que destaca el género *Vitis*, originario de las zonas templadas del hemisferio norte (América, Europa y Asia) (Chauvet & Reynier, 1984). Dentro del g. *Vitis*, se diferencian más de 60 especies, siendo *Vitis vinifera* la que presenta mejores cualidades para la producción de vino, y por tanto es a partir de la cual se derivan las principales variedades comerciales cultivadas (Figura 1).

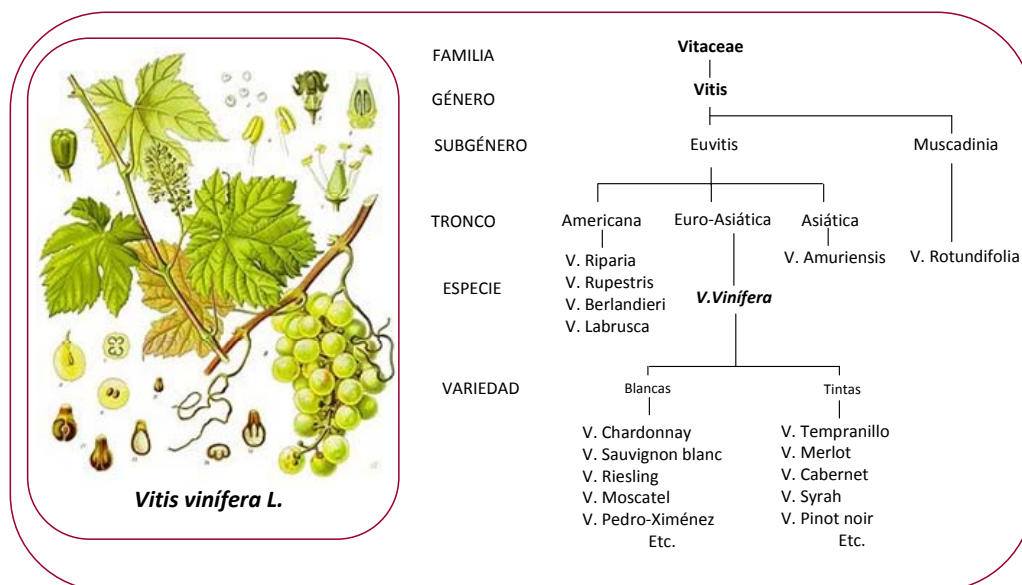


Figura 1. Clasificación botánica de las vitáceas. (Adaptado de: Chayvet y Reynier, 1984)

1.1. Clima y viticultura. Consecuencias del cambio climático

Dentro de los factores determinantes de la producción vitícola, el clima de una determinada zona geográfica es posiblemente el que más influye en el tipo de vino que se produce, ya que condiciona las variedades y la calidad de las uvas que pueden ser cultivadas (Jones & Hellman, 2003).

La vid presenta unas exigencias climáticas bien determinadas y definidas. Es una planta exigente en calor y sensible a las heladas en invierno y primavera, no sólo para su desarrollo vegetativo, sino también para la maduración de sus frutos, que precisan una iluminación y temperaturas adecuadamente altas.

Precisamente, por estas circunstancias, la vid se ha cultivado tradicionalmente en climas no extremos de tipo mediterráneo, y su área general de cultivo correspondía a las dos zonas terrestres comprendidas entre los paralelos 30° y 50° latitud Norte, y los 30° y 40° de latitud Sur, límites que en la viticultura actual se amplían suprimiendo la zona intermedia, con la aparición de la viticultura tropical (Amerine et al., 1980; Schultz & Jones, 2010).

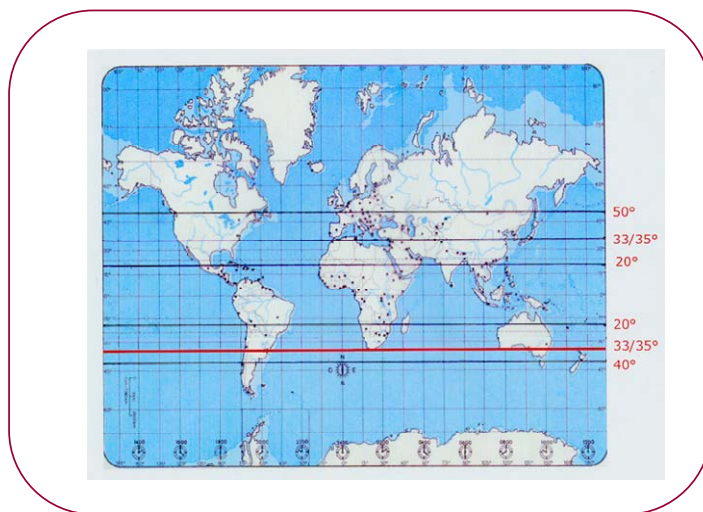


Figura 2. Distribución mundial de las zonas del cultivo de la vid.

Aunque son numerosos los factores climáticos individuales que pueden afectar el desarrollo de la uva (radiación solar, acumulación de calor, temperaturas extremas, precipitación, viento, granizo, etc.), la longitud del periodo de insolación durante la estación de crecimiento junto con la temperatura, representan aspectos críticos debido a que determinan en mayor medida la capacidad de la uva para alcanzar los

niveles óptimos de compuestos necesarios para elaborar vinos de calidad (azúcares, ácidos, compuestos fenólicos, etc.) (Jones et al., 2005).

Estudios recientes sobre el impacto del cambio climático en la agricultura en general, y en la viticultura en particular, ponen de manifiesto que las consecuencias de éste sobre las regiones de mayor producción vinícola en el mundo son de suma importancia, especialmente en la última década (Jones et al., 2005; Ramos et al., 2008; Jones & Webb, 2010; Holland & Smit, 2010; Kenny, 2001; Malheiro et al., 2010; Mira de Orduña, 2010; Ramos & Martínez-Casasnova, 2010; Schultz & Jones, 2010; Camps & Ramos, 2011; Galbreath, 2011; Tomassi et al., 2011; Webb et al., 2011). En términos generales, el cambio climático está produciendo un desplazamiento de las zonas de cultivo de la vid, por lo que algunas regiones vitivinícolas podrían verse favorecidas al poder comenzar a implantar este cultivo. Por el contrario, en las regiones de clima cálido, como es el caso de Andalucía, el cultivo de la vid y la elaboración de vinos de calidad se enfrentan a serios inconvenientes relacionados con las altas temperaturas ambientales (Kountoudakis et al., 2011).

Entre las regiones más afectadas por el incremento progresivo del calentamiento global se encuentran el Oeste de EE.UU., Australia y Europa (Jones et al., 2005; Tomassi et al., 2011; Webb et al., 2011). En el caso de la Península Ibérica, donde el aumento de las temperaturas es especialmente marcado, los efectos del cambio climático se magnifican debido a la disminución de las precipitaciones medias, afectando no solo la productividad de la vid sino, además, la calidad del vino (Ramos & Martínez-Casasnovas, 2008; 2010; Camps & Ramos, 2011).

Ante estas circunstancias, con primaveras cada vez más secas y veranos más calurosos, en regiones de clima cálido las uvas suelen sufrir una sobreexposición solar, lo cual deriva en periodos de maduración cada vez más cortos. Particularmente en las uvas tintas, la pulpa madura con rapidez, alcanzando altas concentraciones de azúcar, bajas concentraciones en ácidos y un pH elevado. Por el contrario, la acumulación de compuestos fenólicos en las semillas y los hollejos se ve afectada negativamente debido a una reducción en los reguladores endógenos de la planta. Aunque se ha descrito que la acumulación de azúcares y pigmentos en la uva está más favorecida a temperaturas altas que a bajas (óptima entre 18-33 °C, y entre 17-26 °C, respectivamente) (Iland & Gago, 2002; Sadras et al., 2007a), la síntesis de pigmentos y otros compuestos fenólicos puede llegar a inhibirse con temperaturas diurnas superiores a 30 °C o nocturnas no suficientemente bajas (Mori et al., 2007). Como consecuencia, es frecuente que se produzca un desfase entre la madurez de la pulpa

con respecto a la de las semillas y el hollejo, lo que dificulta que se alcance la correcta madurez aromática y fenólica en el momento de vendimia, necesaria para elaborar vinos de calidad. Así, en estas regiones, las uvas se caracterizan por ser pobres en pigmentos y tener poca intensidad cromática o colores irregulares (Figura 3).



Figura 3. Uvas tintas que presentan madurez fenólica insuficiente.

Los compuestos fenólicos de la uva, que pasan al mosto durante la vinificación, juegan un papel fundamental en la intensidad y estabilidad de color del vino tinto, particularmente los pigmentos antociánicos y los taninos. Además, directa o indirectamente, contribuyen a otras propiedades organolépticas como astringencia, amargor, sabor o estructura, es decir, son responsables de parámetros determinantes de la calidad (Soto-Vázquez et al., 2010). Así, los vinos elaborados en estas regiones, a partir de uvas de composición desequilibrada, suelen presentar una acidez inferior y un pH superior al deseable, derivando habitualmente en vinificaciones complejas, con notables caídas de color y desarrollos microbiológicos indeseables (Mira de Orduña, 2010; Kountoudakis et al., 2011).

Por tanto, el calentamiento global, además de tener consecuencias directas sobre la calidad de la uva y dificultar la determinación del momento óptimo de vendimia, obliga a estas regiones a replantear sus estrategias de cultivo y vinificación con el fin de mantener la calidad del vino elaborado en ellas. Estos problemas son bien conocidos por los enólogos, y ha llevado en muchas regiones a desestimar las elaboraciones de tintos, o a considerar la aplicación de técnicas más o menos avanzadas para promover la síntesis de pigmentos y otros compuestos fenólicos, su extracción durante la maceración o su estabilización durante la vinificación (Bergqvist et al., 2001).

No obstante, algunos estudios han comprobado que las distintas variedades de uva no responden de igual modo al calentamiento global. En términos generales, las variedades tintas presentan una mayor tolerancia a las altas temperaturas que las variedades blancas, y dentro de las primeras, Syrah o Cabernet Sauvignon destacan por ser menos sensibles a las condiciones extremas cálidas (Dunn, 2005; Sadras et al., 2007b). Por ello, el cultivo de variedades que presenten una mejor adaptación a las condiciones climáticas de cada zona también se encuentra entre las posibles estrategias encaminadas a minimizar los efectos negativos del cambio climático (Schultz, 2000).

Por último, otra consecuencia indirecta del cambio climático en estas regiones afecta a la regulación legal de la viticultura. En países productores de Europa, como Francia, Italia, España, Portugal o Grecia, las regiones vitivinícolas están geográficamente definidas por las denominaciones de origen. Éstas, por medio de los reglamentos de sus Consejos Reguladores, ejercen un control estricto del cultivo de las variedades de uva autorizadas y las condiciones de elaboración, garantizando así la tipicidad de los vinos que están acogidos en ésta. Por ello, para la aplicación de nuevas estrategias de cultivo y vinificación en estas regiones, se requiere que previamente se hayan producido modificaciones del marco legal y territorial que las regula (Moran, 2006). Sin embargo, estas actuaciones serán más fáciles de llevar a cabo en países como Australia y los Estados Unidos, donde las regulaciones de zonificación vitícola no son tan estrictas (Vaudour & Shaw, 2005).

1.2. Técnicas de vinificación en tinto

La elaboración del vino está regulada por la Organización Común de Mercado de la UE en el marco de la Política Agrícola Común. En su legislación, el vino se define como *“el producto obtenido exclusivamente por la fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva”* (CE nº 1493/1999).

Así, la vinificación es el conjunto de operaciones puestas en práctica para transformar en vino el zumo obtenido del estrujado de los racimos de uva. La diferenciación de las distintas variedades de uva de *Vitis vinifera* L. en tintas o blancas (con o sin pigmentos antociánicos en el hollejo) establece la primera clasificación general del vino en esos dos grandes grupos, según sean elaborados a partir de cada una de ellas.

1.2.1. Vinificación en tinto tradicional

La *vinificación en tinto clásica o tradicional* es aquella en la que el mosto de la uva se fermenta en presencia de los orujos, fundamentalmente formado por los hollejos y las semillas. La vinificación tradicional se practica desde hace siglos en la mayoría de las regiones vitivinícolas del mundo y podría clasificarse como la técnica más empleada y universal. Ésta se desarrolla en las siguientes etapas:

- *Estrujado-Despalillado*: Consiste en separar los granos de uva de las partes leñosas de la vid, conocidas como raspón. Desde la tolva de recepción, y mediante un tornillo sinfín, se arrastra la vendimia hacia la estrujadora-despalilladora, en la que se desgranán las uvas separando las bayas de los raspones o escobajos, que confieren un sabor no deseado al mosto. Los granos de las uvas pasan a la estrujadora, que los rompe pero no los muele, con lo que se libera el zumo. La mezcla de hollejos rotos, pulpa, mosto y semillas pasa a los depósitos de fermentación mediante bombas de trasiego.
- *Sulfitado*: Consiste en la adición de dióxido de azufre al mosto como agente antiséptico para evitar fermentaciones inadecuadas por parte de organismos no deseables. Es selectivo, de forma que favorece el desarrollo de levaduras alcohólicas y obstaculiza el desarrollo de bacterias y levaduras no alcohólicas. Las principales fuentes de SO₂ usadas son: metabisulfito de potasio en polvo, quemado de pastillas de azufre, disoluciones de SO₂ gaseoso en agua o en botellas a presión, o disoluciones comerciales. La adición se efectúa a la salida de la bomba de vendimia, según la dosis adecuada y en proporción al caudal del conducto de vendimia. En general, esta cantidad suele ser de 50 a 80 mg/L, para vinos tintos. Sin embargo, en el caso de vinos con denominación “ecológico”, el contenido medio permitido es aproximadamente la mitad que la de vinos no ecológicos (Tintunen & Lehtonen, 2001). Recientemente, debido al posible riesgo potencial sobre la salud de este aditivo, la UE (European Union Regulation 1991/2004) restringe el contenido máximo de sulfuroso en botella a 10 mg/L, independientemente del tipo de vino (Salaha et al., 2008).
- *Maceración-Fermentación*: En los depósitos de fermentación, el mosto se somete a una maceración con las partes sólidas para extraer de ellas los compuestos fenólicos y aromáticos; y simultáneamente, se produce la fermentación alcohólica, por la cual se transforman los azúcares de la uva en etanol. La fermentación debe llevarse a cabo a temperaturas controladas para

obtener vinos frescos o afrutados y evitar la degradación de los compuestos extraídos. El periodo de tiempo en el que se mantiene el mosto fermentando en contacto con los hollejos y semillas se denomina *encubado*. En términos generales, los encubados duran 3 o 4 días, aunque si se quieren obtener vinos con características determinadas pueden prolongarse por más tiempo.

- *Remontado*: El gas carbónico desprendido durante la fermentación empuja hacia arriba los hollejos que forman una capa superior en el depósito denominada *sombrero*. Éste debe ser remojado periódicamente con el mosto para activar la extracción de color mediante la operación que se denomina remontado.
- *Descube*: Una vez conseguido el color en la maceración-fermentación, se realiza la separación de las materias sólidas del mosto por "sangrado" o separación del mosto y la pasta sólida, pasando el líquido a otro depósito, mediante un trasiego.
- *Fermentación maloláctica*: En este nuevo depósito, mientras finaliza la fermentación alcohólica se produce un segundo proceso fermentativo más lento, la fermentación maloláctica. En ésta se transforma el ácido málico, fuerte y vegetal, en otro más suave y untuoso, el ácido láctico, que confiere al vino finura y suavidad.
- *Trasiegos*: Concluidas las fermentaciones, el vino se somete a diversos trasiegos para eliminar los restos sólidos procedentes de la fermentación que tienden a sedimentar en el fondo del depósito formando las *lías*, pues si éstas se mantienen en el depósito por mucho tiempo pueden producir olores indeseables. Posteriormente, se pueden llevar a cabo tratamientos de *clarificación* para arrastrar al fondo del recipiente los restos sólidos que todavía hayan quedado en el vino. Ésta puede llevarse a cabo mediante tratamientos físicos (refrigeración, calentamiento) o químicos (bentonita, ácido ascórbico, ácido cítrico, goma arábiga, etc.).
- *Estabilización*: Tras la clarificación se procede a la estabilización del vino con el fin de conservar la limpidez, y evitar alteraciones durante la conservación sin interrumpir la maduración natural del vino.
- *Crianza en barricas de roble*: Se realiza para los vinos de mayor calidad, a los que se les quiere someter a un proceso de envejecimiento.

- *Filtrado*: Se hace pasar el vino por un elemento poroso o una membrana, desde filtros de tierra hasta los modernos esterilizantes amicróbicos, para retener las materias en suspensión.
- *Embotellado*: El vino se embotella para su comercialización.

La Figura 4 muestra un esquema del proceso de vinificación tradicional en tintos.



Figura 4. Etapas del proceso de vinificación tradicional de vinos tintos.

En las últimas décadas, a partir del proceso clásico de vinificación, se han ido desarrollando nuevos procedimientos con el objetivo de mejorar las características finales del vino o para conseguir un vino con un carácter diferente al obtenido por vinificación tradicional: maceración carbónica, criomaceración, *delestage*, adición de enzimas o taninos, etc. (Sacchi et al., 2005; Soto-Vázquez et al., 2010). Entre ellos, cabe destacar la aplicación de bajas temperaturas de maceración-fermentación, ya que ha demostrado ser una técnica de vinificación especialmente útil en regiones de clima cálido.

1.2.2. Maceración prefermentativa a bajas temperaturas (criomaceración)

La maceración prefermentativa a bajas temperaturas, también conocida como *criomaceración* o “*cold soaking*” es una técnica de vinificación originaria de Francia (Goumy et al., 1996) diseñada para maximizar la extracción de pigmentos, taninos y compuestos responsables del aroma del vino mediante la aplicación de un tratamiento de maceración en frío, previo a la fermentación. Así, la masa de vendimia macera a baja temperatura, por debajo de 10 °C, durante un periodo variable (entre una y varias semanas), y la extracción de compuestos polifenólicos desde los hollejos al mosto tiene lugar en ausencia de etanol. Dicho proceso permite la obtención de vinos con mayor concentración de antocianos sin extraer taninos, debido a que retrasa el inicio de la fermentación y logra la extracción lenta y progresiva de la materia colorante (Zamora, 2004; Kountoudakis et al., 2009).

La maceración en frío se está convirtiendo en una técnica cada vez más utilizada, fundamentalmente con vinos tintos aunque también con vinos blancos y rosados que, en la mayoría de los casos, adquieren finalmente una mayor intensidad cromática y aromática (Gómez-Plaza et al., 2000; Salinas et al., 2005; Parenti et al., 2004; Gómez-Míguez et al., 2007a; Gómez-Míguez et al., 2007b; Koyama et al., 2007; Gil-Muñoz et al., 2009; De Santis & Frangipane, 2010; Busse-Valverde et al., 2010; 2011).

Las bajas temperaturas necesarias para aplicar la maceración no fermentativa pueden ser conseguidas mediante diferentes técnicas de refrigeración. Entre los procedimientos aplicados de mayor éxito se encuentra la refrigeración directa de la masa de vendimia mediante la adición de nieve carbónica (CO₂ en estado sólido) en el depósito de maceración, preferible al uso de nitrógeno líquido (Parenti et al., 2004). La cantidad de nieve carbónica añadida para disminuir la temperatura en 1 °C se ha estimado en 0.6 kg/hL de mosto (Couasnon, 1999). Además, la refrigeración puede conseguirse mediante el almacenamiento previo de la masa de vendimia en cámaras frigoríficas a bajas temperaturas, que posteriormente se mantienen en frío en el depósito de fermentación mediante el uso de camisas de refrigeración y/o el uso de equipos industriales de refrigeración (Gil-Muñoz et al., 2009). Estos equipos contienen agua glicolada a temperaturas muy bajas (cercas a 0 °C). A través de éstos se hace recircular el agua en un circuito cerrado y durante un tiempo determinado la masa de vendimia, que posteriormente, se mantiene en el depósito cuya temperatura se controla mediante camisas de refrigeración (Gómez-Míguez et al., 2007a). Aunque el uso de equipos industriales de refrigeración ha resultado eficaz para conseguir las

bajas temperaturas necesarias para aplicar la maceración prefermentativa en frío, implica una inversión tecnológica y económica adicional para la elaboración del vino, por ello, no se encuentra entre los procedimientos mas utilizados en enología. En este sentido, la mejora de la técnica a nivel tecnológico continua siendo objeto de estudio en la actualidad (Carrillo et al., 2011).

El efecto de la maceración prefermentativa en frío sobre la calidad final del vino es variable en función de la técnica de refrigeración aplicada (Koyama et al., 2007; Gil-Muñoz et al., 2009). En la Figura 5 se muestran diferentes sistemas de refrigeración.



Figura 5. Técnicas de refrigeración para aplicar la criomaceración.

La adición de nieve carbónica al depósito de fermentación induce un choque térmico del mosto que no sólo evita el desarrollo de la actividad microbiana, sino que además inhibe la acción de enzimas y bacterias indeseables, como por ejemplo las polifenoloxidasas, bacterias acéticas y levaduras oxidativas, permitiendo, por tanto, disminuir la dosis de SO_2 añadido durante la vinificación (Zamora, 2004; Schmid et al., 2007). Además, al ser una extracción en fase acuosa no se produce una difusión intensa de los fenoles presentes en la semilla, de mayor astringencia. El paso de la nieve carbónica a estado gaseoso satura el mosto en gas carbónico en forma de microburbujas, lo cual desplaza al oxígeno, y por tanto, evita la oxidación. No obstante, ésta técnica también favorece el desplazamiento del SO_2 , por lo que si se prolonga excesivamente, puede favorecer el crecimiento de flora indígena.

En los distintos estudios realizados con esta técnica, se ha obtenido la mejora de la composición fenólica y las características cromáticas de vinos tintos aplicando temperaturas de maceración en torno a los 15 °C (Gómez-Plaza et al., 2000). Heatherbell et al. (1996) demostraron que el uso de esta técnica en vinos Pinot Noir aumentaba el contenido fenólico y antocianico pero reducía los aromas frutales y

aumentaba el aroma a tabaco. De forma similar, Reynolds et al. (2001) recomiendan junto con la maceración prefermentativa en frío, temperaturas de fermentación próximas a 30 °C y la maceración postfermentativa prolongada para producir vinos Syrah con mayor intensidad de color y aromas varietales. Asimismo, la maceración prefermentativa en frío es una técnica que ha demostrado tener una mayor efectividad en la extracción de color cuando se aplica a vendimias con uvas de menor grado de maduración (Kountoudakis et al., 2009).

1.3. Elaboración de vinos en Andalucía

Entre las distintas regiones vitivinícolas españolas, Andalucía tiene una tradición milenaria en el cultivo de la vid y en la elaboración de vinos de gran prestigio y reconocimiento en todo el mundo. Por su topografía, geología y clima, sus suelos son muy heterogéneos, y la mayoría de ellos excelentes para la agricultura. Andalucía se encuadra en su totalidad dentro del dominio climático mediterráneo, aunque, existe una gran diversidad microclimática en las diferentes zonas. El viñedo ocupa una extensión aproximada de 40.000 hectáreas y se cultiva en las ocho provincias.

Más del 70% de los viñedos de Andalucía están amparados por alguna de las siete denominaciones de origen establecidas: Condado de Huelva, Jerez, Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda, Montilla-Moriles, Sierras de Málaga y Vino Naranja del Condado de Huelva (Figura 6).

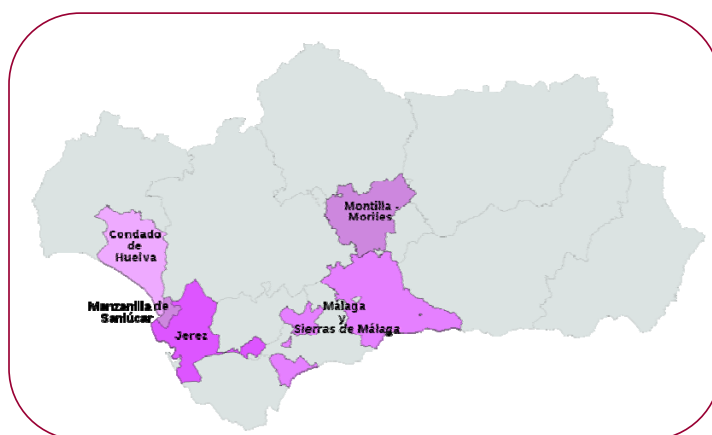


Figura 6. Regiones vinícolas andaluzas con denominación de origen.

El sector vitícola andaluz se orienta hacia la producción de vinos de calidad. Tradicionalmente, los más característicos han sido los vinos generosos, elaborados por procesos de criaderas y soleras. Su enorme diversidad, dentro de un estilo propio, es

una de las características actuales en su producción: finos y manzanillas, amontillados, olorosos, palo cortado, dulces y moscateles, etc. (Figura 7)

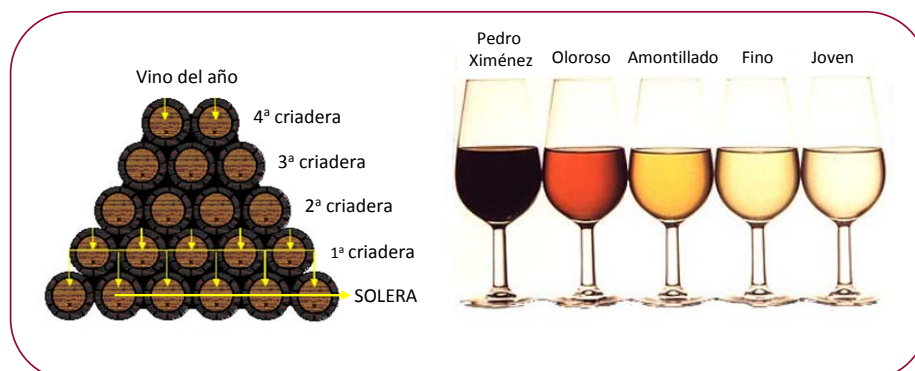


Figura 7. Distintas clases de vinos generosos tradicionales de Andalucía.

Sin embargo, hasta hace poco, en Andalucía eran escasas las experiencias de elaboración de vinos a partir de variedades de uva tinta, existiendo pocas referencias históricas, y dándose éstas en zonas muy concretas: vinos tipo generoso elaborados a partir de la uva "Tintilla de Rota" (Cádiz), vinos tintos elaborados con mezclas de uva de procedencia incierta (Sierra Norte y Los Palacios, ambos de Sevilla), ó claretes elaborados con mezclas de uvas blancas y tintas (Alpujarra granadina).

A partir de los años 90, debido a la continua evolución del gusto de los consumidores se ha promovido la modernización y diversificación de la producción de vinos, tales como blancos y tintos jóvenes o con crianza en madera (*Programa de "Introducción de nuevas variedades de uva para la obtención de vinos de calidad". Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, 1995*). Bajo este programa, se estudia la adaptación al terreno andaluz y la aptitud enológica de diferentes variedades de uva, tanto blancas (Moscatel, Macabeo, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Colombard, o Zalema) como tintas (Syrah, Tempranillo, Merlot, Cabernet Sauvignon o Cabernet Franc).

1.3.1. Denominación de Origen "Condado de Huelva"

La Denominación de Origen "*Condado de Huelva*", de la que existe constancia documental desde 1933, comprende una amplia comarca situada al sureste de Andalucía, en la provincia de Huelva, que limita al norte con la comarca de El

Andévalo, al sur con el océano Atlántico. al este con las provincias de Cádiz y Sevilla, y al oeste con la capital onubense (Figura 8).

El control estricto del cultivo de las variedades de uva autorizadas, así como las condiciones de elaboración de los vinos amparados en la D.O., está reglamentada por su *Consejo Regulador*, constituido y aprobado por Orden de 10 de mayo de 1962 (Boletín Oficial del Estado nº 132, de 2 de junio de 1962).



Figura 8. D.O. “Condado de Huelva y Vinagre del Condado de Huelva”.

La zona vitivinícola que actualmente ampara esta D.O. abarca a 18 términos municipales: Almonte, Bollullos Par del Condado, Beas, Bonares, Chucena, Gibraleón, Hinojos, La Palma del Condado, Lucena del Puerto, Manzanilla, Moguer, Niebla, Palos de la Frontera, Rociana del Condado, San Juan del Puerto, Trigueros, Villalba del Alcor y Villarrasa. Según el Consejo Regulador, todos estos municipios son aptos para la producción de uva de las variedades autorizadas, aunque la mayor parte del viñedo se encuentra en los municipios de Almonte, Bollullos Par del Condado y Rociana del Condado. Por otra parte, la zona de crianza y envejecimiento de los vinos amparados comprende tan sólo los términos de Almonte, Bollullos Par del Condado, Chucena, La Palma del Condado, Manzanilla, Moguer, Rociana del Condado, San Juan del Puerto y Villalba del Alcor. El número total de bodegas acogidas a la D.O. Condado de Huelva, a fecha de 18 de Enero de 2011, es de 31.

Actualmente, según los datos proporcionados por el Consejo Regulador de la D.O. (enero de 2011), la superficie protegida es de aproximadamente 3.000 ha con una producción media de 27 millones de kg de uva, equivalente a unos 22.128.073 L de mosto, de los cuales, el 80% se ha transformado en vino. De la producción total, aproximadamente el 50% del vino ha sido calificado con D.O.

El clima de la comarca del Condado de Huelva es mediterráneo con clara influencia atlántica, debido a su proximidad al océano Atlántico. En general, goza de

unas condiciones idóneas para el cultivo de la vid: inviernos y primaveras suaves, y veranos cálidos, con una temperatura media anual de 18 °C. Las temperaturas mínimas se alcanzan en el mes de enero (6-16 °C) y las máximas en julio, periodo en el que es frecuente superar 40 °C. La luminosidad de la zona es muy elevada (entorno a 3000 horas sol/año), la humedad relativa oscila entre el 60% y el 80%, y el nivel medio de precipitaciones es de 600 mm anuales, siendo más intensas durante los meses de diciembre y enero.

El viñedo de la zona se extiende sobre terrenos llanos o ligeramente ondulados. En general, son suelos neutros o ligeramente básicos, francos y de fertilidad media, con zonas de insuperable calidad para el cultivo de la vid. La altitud media de los viñedos es de 25 metros, los suelos son arenosos con alto contenido en cal.

Los vinos amparados en la actualidad son blancos jóvenes afrutados, generosos, generosos de licor, vinos de licor, y tintos jóvenes o con crianza. Las variedades de uva cultivadas en esta comarca y autorizadas originalmente por la D.O. son Zalema, Palomino Fino, Listán de Huelva, Garrido Fino, Moscatel de Alejandría y Pedro Ximénez. Entre todas ellas, la variedad blanca Zalema, es la que predomina en los viñedos de la zona con un 86% del total plantado, siendo autóctona del Condado de Huelva. Desde el año 2009 se han incorporado a la D.O. nuevas variedades de uvas blancas para la elaboración de vinos blancos jóvenes afrutados del Condado (Colombard, Sauvignon Blanc y Chardonnay), además de las variedades de uvas tintas para la elaboración de vinos jóvenes o de crianza (Syrah, Tempranillo, Merlot, Cabernet Sauvignon y Cabernet Franc).

1.3.2. Inclusión de variedades tintas y aplicación de nuevas estrategias de vinificación en la D.O. “Condado de Huelva”.

El Condado de Huelva ha sido una zona poco estudiada desde el punto de vista enológico y la bibliografía existente se refería casi exclusivamente a los vinos generosos, producción tradicional de la zona.

A partir de los años 90, aparecen las primeras aportaciones sobre la caracterización de los vinos blancos de mesa monovarietales de Zalema, y los vinos tintos de reciente implantación. Sin embargo, la producción de vinos tintos no está tan desarrollada como la de vinos blancos; por ello, en los últimos años se ha despertado

un interés por el estudio de estos vinos tintos con el fin de fomentar su consumo y expandir su mercado.

En la elaboración de vinos de calidad, se buscan variedades con características especiales, que, además de un adecuado contenido en azúcares y ácidos, posean niveles apropiados de otros componentes como por ejemplo compuestos fenólicos (Pérez-Magariño & González-San José, 2006).

Concretamente, para la elaboración de vinos tintos de calidad en el Condado de Huelva, promovido por el Consejo Regulador de la D.O., se han ido incorporando nuevas variedades tintas con características especiales. En la Tabla 1 se muestran las distintas variedades de uvas tintas ensayadas en el Condado de Huelva.

El conocimiento del potencial enológico de las distintas variedades permite definir los tipos de vino que pueden elaborarse a partir de ellas y permite conducir las vinificaciones de una manera más adecuada (González-Neves et al., 2006). Por tanto, los primeros estudios llevados a cabo en el Condado de Huelva fueron realizados con el fin de conocer el comportamiento agronómico de las diferentes variedades de uva tinta durante la fase de maduración, así como el comportamiento enológico de los vinos elaborados, fundamentalmente durante las fases más iniciales de la vinificación. Entre las distintas variedades de uva tinta recientemente autorizadas por la D.O., destaca mayoritariamente el cultivo de la variedad Syrah por su buena adaptación al clima del Condado de Huelva, seguido de la variedad Tempranillo; hasta el punto de que algunas bodegas de la zona comercializan estos vinos tintos con gran éxito.

Tabla 1. Principales variedades tintas cultivadas en el Condado de Huelva.

VARIEDAD	ORIGEN	ZONA CULTIVO	CARACTERÍSTICAS
Cabernet Sauvignon 	Burdeos	Ampliamente distribuida en España	Es la uva más internacional por su adaptación a toda clase de climas. Sola o asociada con uvas locales, especialmente Tempranillo, es muy adecuada para vinos de crianza.
Cabernet Franc 	Burdeos	Cataluña, Galicia, Castilla	Suele dar vinos más suaves que Cabernet Sauvignon. Por ello, en muchos casos se ensamblan ambas variedades para conjugar la agresividad y el color intenso del Sauvignon, con la suavidad cromática y tánica de la variedad Cabernet Franc.
Merlot 	Burdeos	Cataluña, Navarra, Ribera del Duero, Huesca, Alicante, Murcia	Origen de vinos muy aromáticos y finos.
Syrah 	Centro y Sur de Francia	La Mancha, Murcia	Uva del Ródano ideal en climas cálidos. Da vinos estructurados que pueden aguantar muy bien la crianza en madera
Tempranillo 	España	Extendida por toda España	Su sabor es muy afrutado y posee un color rubí característico, apreciable en los vinos jóvenes, y presenta excelentes aptitudes para la crianza.

La variedad Tempranillo es una cepa tinta, tradicionalmente cultivada en España. Aunque su origen se encuentra en la zona del Ebro (Rioja y Aragón), su cultivo se ha extendido actualmente por el resto de regiones españolas, siendo una variedad de producción media-alta, que se adapta a cualquier suelo y bastante resistente a enfermedades. En cuanto a su comportamiento agronómico, resulta fácil de cultivar,

dando lugar a vinos de mucha calidad, con escaso poder oxidativo, bien equilibrados y aromáticos, de acidez y graduación medias y de característico color rojo-rubí (Liu et al., 2006). Por su composición y su escaso nivel de oxidasas, presenta una buena aptitud tanto para la elaboración de vinos jóvenes como sometidos a envejecimiento. Sin embargo, aún está poco extendida por el sur de España debido a las condiciones climáticas de esta región, con inviernos poco fríos y bastante secos y veranos muy calurosos, que hacen su cultivo algo más problemático.

La variedad Syrah está ampliamente implantada en el centro y el sur de Francia, y debido a su buena adaptación a diferentes condiciones agro-climáticas, en las últimas décadas su cultivo se está extendiendo a otras regiones vitivinícolas por todo el mundo, especialmente en regiones de clima cálido. En términos agronómicos, es una variedad de uva robusta, fácil de cultivar y poco vulnerable a las enfermedades, desarrollándose adecuadamente en suelos graníticos y calcáreos. Los vinos elaborados a partir de ésta se caracterizan por presentar una acentuada intensidad de color, con gran cantidad de pigmentos, taninos, aromas y sabores más especiados que afrutados, así como con una gran aptitud para el envejecimiento (Robinson, 1996). Desde hace unos años, su cultivo está cobrando importancia en España, especialmente en la región levantina donde las experiencias de cruzamiento con la variedad Monastrell están ofreciendo interesantes expectativas para la mejora de la extractabilidad de compuestos fenólicos y por tanto en la estabilidad cromática de los vinos en esta región (Hernández-Jiménez et al., 2009).

Uno de los principales problemas con los que sigue enfrentándose el sector enológico en Andalucía es la inestabilidad del color de los vinos, especialmente los tintos. La razón más probable es que los vinos elaborados a partir de uvas con bajas concentraciones de pigmentos y otros compuestos fenólicos no son capaces de formar correctamente complejos de copigmentación en las primeras etapas de la vinificación (Boulton, 2001), y en consecuencia, la estabilización posterior del color ocurre con dificultad. Sin embargo, es conocido que la concentración y la estabilidad de estos compuestos pueden ser modificadas aplicando determinadas prácticas enológicas que ejercen una importante influencia, tanto en la intensidad como en la estabilidad del color del vino.

En la última década, en el “Condado de Huelva” se han aplicado técnicas enológicas encaminadas a la mejora de la calidad del color de sus vinos, entre las que se encuentra la aplicación de bajas temperaturas de maceración previa a la fermentación. La investigación se ha centrado en el conocimiento de los procesos de

extracción y desarrollo del color en vinificaciones experimentales e industriales a partir de variedades como Syrah y Tempranillo. En este sentido, se ha estudiado el efecto sobre el color de diferentes técnicas y condiciones de aplicación (tiempo y temperatura) de criomaceración prefermentativa. El proceso se lleva a cabo por un procedimiento dinámico original patentado internacionalmente por la Universidad de Sevilla (Patente WO/2008/074904: Heredia et al., 2008).

Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que esta técnica produce notables mejoras en las características aromáticas y cromáticas de los vinos tintos (Gómez-Míguez et al., 2007a; Gómez-Míguez et al., 2007b; Hernanz et al., 2007). A pesar de los excelentes resultados prácticos, aún no está bien esclarecido el proceso de estabilización del color de los vinos del Condado de Huelva desde el punto de vista químico, lo que ha impulsado a estudiar en mayor profundidad las relaciones color-composición en los vinos jóvenes monovarietales, y a plantear estudios de crianza en bodega con las variedades de mayor potencial fenólico. Así, en la actualidad, la influencia de la copigmentación sobre el color de los vinos tintos jóvenes, así como en la calidad y estabilidad cromática de éstos durante la crianza en madera, está recibiendo una especial atención.

En otras regiones vitivinícolas, con el fin de obtener características cromáticas más acordes con las nuevas demandas del mercado, se han ensayado otras prácticas enológicas entre las que destacan la adición suplementaria de semillas procedentes del orujo durante la fermentación o la adición pre- o post-fermentativa de fenoles, tanto los compuestos puros, como en forma de extractos de las diferentes partes de la uva (Kovac et al., 1992; Kovac et al., 1995; Schwarz et al., 2005; Álvarez et al., 2009). Sin embargo, los ensayos realizados con la adición de hollejos procedentes de uva blanca en vinificaciones tintas son realmente escasos, a pesar de ser los hollejos blancos una fuente natural rica en compuestos fenólicos con un elevado potencial estabilizador del color del vino, especialmente los flavonoles (Lamikanra & Garlick, 1987; Revilla et al., 1998). En regiones vitivinícolas de clima cálido como es el Condado de Huelva, esta práctica, además de representar una interesante alternativa tecnológica a la vinificación tradicional, supone un aprovechamiento útil de los subproductos obtenidos en la elaboración de vinos blancos, mayoritarios en la zona. En ese sentido, entre las futuras estrategias de vinificación en la D.O. "Condado de Huelva", parece interesante considerar la aplicación de estas prácticas enológicas.

2. IMPLICACIONES QUÍMICAS DEL COLOR DEL VINO TINTO

2.1. Compuestos responsables del color

El color del vino se debe a que entre sus componentes figuran compuestos químicos denominados pigmentos en cuya estructura poseen un grupo molecular cromóforo que absorbe selectivamente la luz a determinadas longitudes de ondas de la región visible del espectro (360-780 nm).

En el caso de los pigmentos mayoritarios del vino tinto, los antocianos, el grupo cromóforo está constituido por un sistema de dobles enlaces conjugados, formado concretamente por 2 anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado, también conocido como anillo central piránico (Figura 9), lo que los incluye en el grupo de los *pigmentos flavonoides* (Delgado-Vargas et al., 2000).

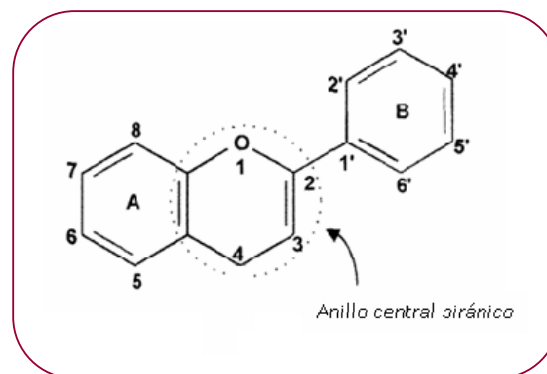


Figura 9. Grupo cromóforo común de los pigmentos flavonoides.

Además de los pigmentos antocínicos presentes en los hollejos, en el color del vino están implicados una gran variedad de compuestos fenólicos procedentes de distintas partes de la uva. Se clasifican en 2 grupos: flavonoides y no flavonoides, según sean o no derivados de la estructura básica presentada en la Figura 9. En las uvas tintas de la especie *Vitis vinifera* L., los principales grupos de flavonoides son los *antocianos*, los *flavan-3-oles*, y *flavonoles*; y en menor medida los *flavanonoles* y las *flavonas*. Entre los compuestos no flavonoides, se encuentran los *ácidos fenólicos* y los *estilbenos* (Monagas et al., 2005).

Asimismo, aparte de los antocianos procedentes de la uva, durante la vinificación se forman otros pigmentos que derivan de las interacciones de los

primeros con el resto de los constituyentes del vino, incluyendo los compuestos fenólicos de la uva, metabolitos secundarios del proceso de fermentación o ciertos compuestos presentes en la madera que se extraen en vino durante el envejecimiento (Gambutí et al., 2010). Estos pigmentos de nueva formación, o *pigmentos antociánicos derivados*, aunque se consideran compuestos minoritarios, presentan características químicas y espectroscópicas que justifican su importancia sensorial, especialmente en etapas más avanzadas de la vinificación (De Freitas & Mateus, 2011).

La Figura 10 muestra una clasificación de los distintos compuestos implicados en el color de los vinos tintos, fundamentada en su procedencia y estructura química.

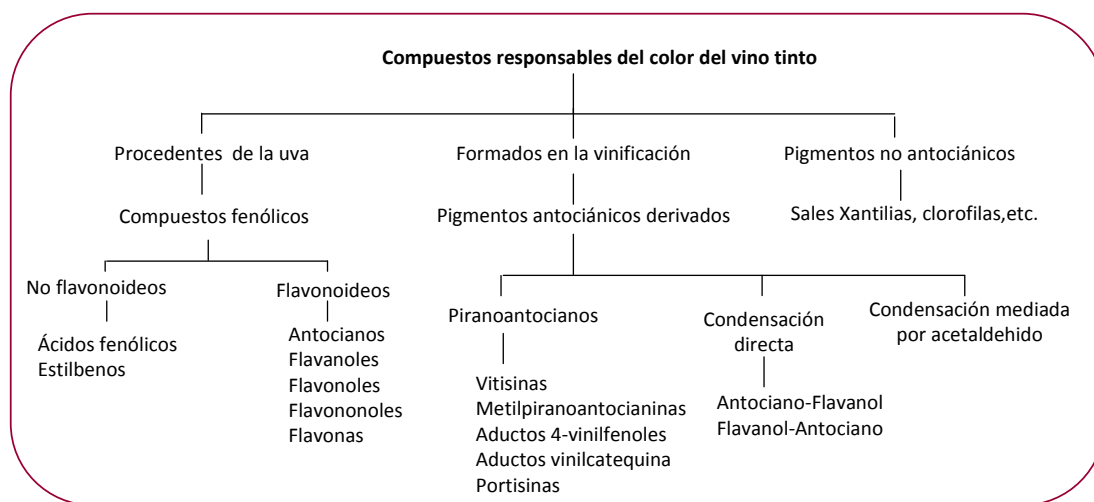


Figura 10. Clasificación de los compuestos implicados en el color del vino tinto.

2.1.1. Antocianos

Los pigmentos antociánicos son compuestos flavonoideos responsables de los colores anaranjados, rojos, azules, y violetas de los tejidos vegetales donde se acumulan (Castañeda-Ovando et al., 2009). En los vinos tintos, los antocianos son los pigmentos flavonoides que más influyen en el color y se encuentran localizados en los hollejos de las uvas tintas, y además en la pulpa de las cepas tintoreras (*Vitis vinifera* var. Alicante Bouschet, var. Gamay freáux).

Los antocianos son compuestos solubles en agua, etanol y metanol, e insolubles en disolventes lipídicos. Su estructura consta de un esqueleto con dos anillos bencénicos unidos por una cadena de tres átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado, insaturado y catiónico, denominado catión flavilio (antocianidina). Las distintas antocianidinas se diferencian entre sí según el número de grupos hidroxilos y grupos metilos que presentan como sustituyentes en el anillo

bencénico B. En las variedades tintas de *Vitis vinifera*, se han encontrado 5 antocianidinas diferentes: cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina y petunidina (Figura 11).

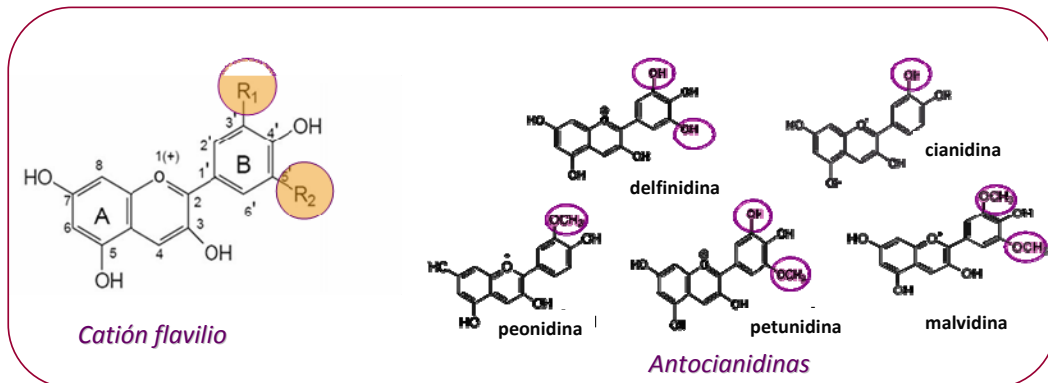


Figura 11. (a) Estructura general del catión flavilio; (b) Antocianidinas de las uvas tintas.

Una de las características de la especie *Vitis vinifera* es la glucosilación en posición 3 de las antocianidinas formando las antocianinas o monoglucósidos no acilados. Los azúcares más comunes son los 3-monoglucósidos, siendo la malvidina 3-*O*-glucósido el compuesto mayoritario. En los últimos años, se ha confirmado la presencia de 3,5 o 3,7-diglucósidos en uvas y vinos tintos mediante técnicas de espectrometría de masas (Baldi et al., 2005; Alcalde-Eón et al., 2006a; García-Marino et al., 2010). Además, las antocianinas pueden encontrarse unidas a través de la posición 6 del azúcar a ácidos orgánicos, en mayor medida al ácido acético, cumárico o cafeico formando los derivados antociánicos acilados. Entre los distintos antocianos acilados identificados en vinos, los derivados acetilados y cumaroilados de la malvidina 3-*O*-glucósido son los mayoritarios, cuyas estructuras químicas se presentan en la Figura 12.

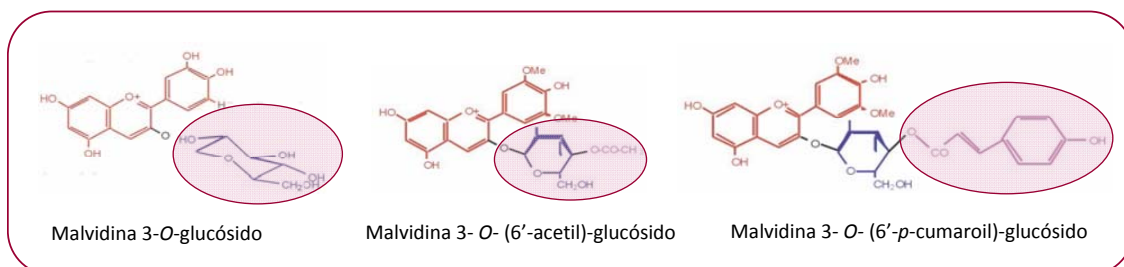


Figura 12. Estructura de los antocianos monoglucósidos y los que presentan acilación.

El color exhibido por los antocianos, debido a la estructura resonante del catión flavilio, fue explicado por Pauling (1940). Los flavonoides muestran una absorción intensa en el rango espectral UV de 250-270 nm; y particularmente, los antocianos

absorben además en el rango espectral visible de 520-560 nm ($\lambda_{\text{máx}}=520$ nm), lo cual explica su color rojo. En la Figura 13 se muestra el espectro de absorción de disoluciones antociánicas.

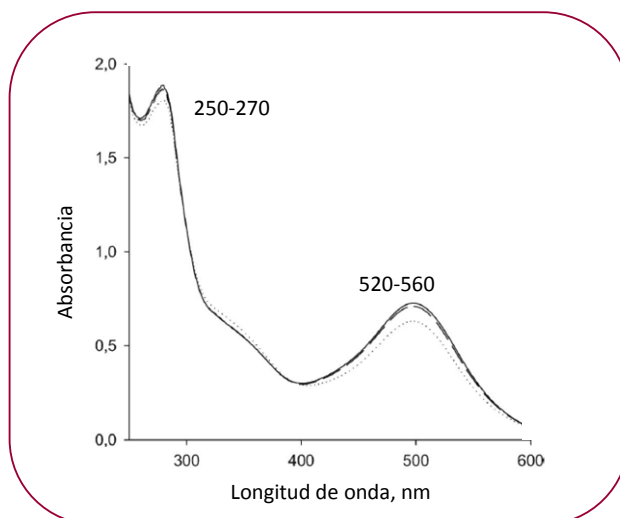


Figura 13. Espectro de absorción de disoluciones antociánicas (Adaptado de: Castañeda-Ovando et al., 2009)

El perfil antociánico está determinado genéticamente y por tanto es diferente según la variedad de uva; pero además, está influido significativamente por numerosos factores como la zona de producción, climatología, técnica de vinificación, etc. Por ello, la composición antociánica ha sido utilizada como criterio de diferenciación y clasificación varietal de uvas y vinos tintos (González-San José et al., 1990; Arozarena et al., 2000; González-Neves et al., 2006; Mattivi et al., 2006).

2.1.2. Flavan-3-oles

Los flavan-3-oles, o en general flavanoles, son la familia más abundante de los flavonoides de la uva y del vino. En las uvas, se localizan principalmente en las semillas, aunque se han detectado también en los hollejos en menores cantidades, y a nivel de trazas en la pulpa (Bourzeix et al., 1986; Ricardo Da Silva et al., 1991). Los flavanoles están presentes en forma de monómeros, oligómeros (proantocianidinas) y polímeros (taninos condensados).

La estructura monomérica de los flavanoles está formada por dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado saturado (Figura 14). Los monómeros de flavan-3-ol en *Vitis vinifera* incluyen a la (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, y (-)-epigalocatequina (Su & Singleton, 1969; Czochanska et al.,

1979). Los principales flavanoles monómeros de la uva son la (+)-catequina y su isómero (-)-epicatequina.

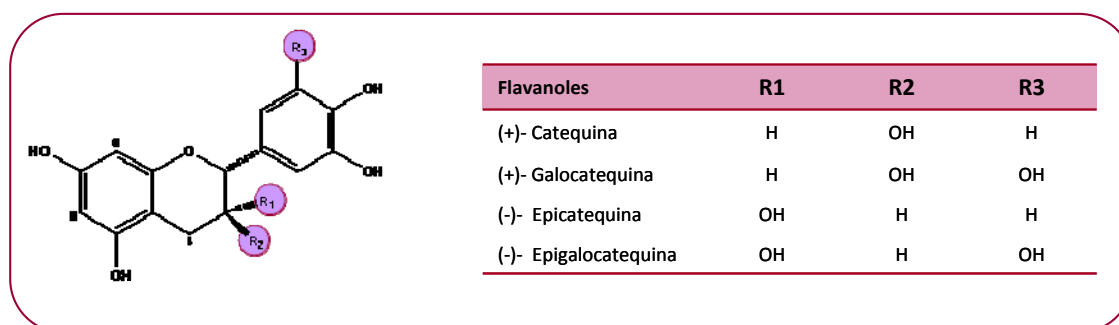


Figura 14. Estructura de los principales flavanoles monoméricos presentes en uvas y vinos.

Las formas poliméricas de los flavanoles poseen la propiedad de liberar antocianidinas cuando son sometidos a calor en medio ácido, mediante la ruptura de las uniones intermonoméricas (Porter et al., 1986). Por ello, estos compuestos también son conocidos como proantocianidinas. En las uvas *Vitis vinifera* se distinguen dos grupos de proantocianidinas dependiendo de la naturaleza de la antocianidina liberada: las procianidinas liberan cianidina y están compuestas por (+)-catequina y (-)-epicatequina, y las prodelfinidinas liberan delfinidina y se componen de (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina. Las semillas sólo contienen procianidinas mientras que los hollejos tanto procianidinas como prodelfinidinas (Monagas et al., 2005).

Los flavanoles, debido a su capacidad de precipitar las proteínas, son las principales sustancias responsables de la astringencia y el amargor de los vinos, siendo los flavanoles monómeros los más amargos y astringentes, mientras que los polímeros de elevado peso molecular, formados durante el envejecimiento, se suavizan al perder el carácter amargo (Singleton & Trouslade, 1992).

Los taninos en el vino son muy reactivos y con el tiempo se producen reacciones de polimerización con incremento progresivo del tamaño de la molécula y disminución de su solubilidad, por lo que en periodos de envejecimiento prolongados tienden a precipitar. Además, también participan en las reacciones de copigmentación con los antocianos, en las que actúan protegiendo su color (Berké & De Freitas, 2007; González-Manzano et al., 2009).

2.1.3. Flavonoles

Los flavonoles son compuestos flavonoides que se encuentran en los hollejos de las uvas *Vitis vinifera*. Con respecto a su estructura química, los flavonoles en las uvas existen únicamente conjugados con azúcares en posición 3, derivados de cuatro agluconas principales: miricetina, quercetina, kaempferol e isoramnetina (Figura 15). Sin embargo, debido a las diferentes formas glicosiladas y metoxiladas posibles, se han descrito numerosos flavonoles en diferentes variedades de uvas tintas de *Vitis vinifera* (Castillo-Muñoz et al., 2007). Por el contrario, en los vinos también pueden encontrarse en estado libre, debido a la hidrólisis ácida. El azúcar más común que se encuentra unido a ellos es la glucosa, aunque también puede existir ácido glucurónico o ramnosa.

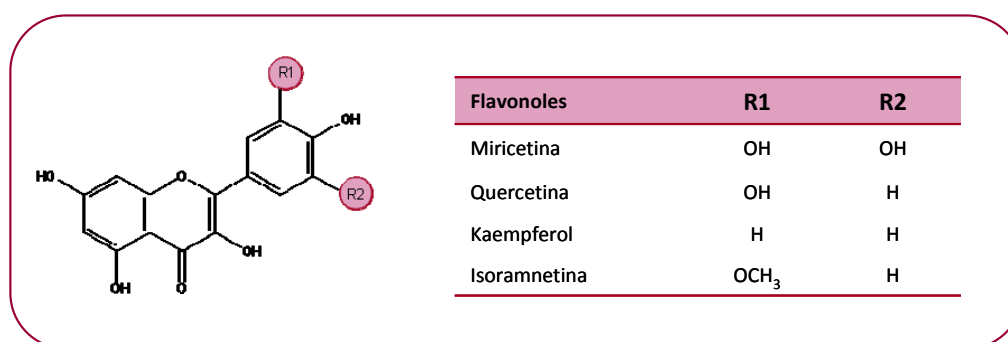


Figura 15. Estructura química de flavonoles de las uvas y vinos (forma aglicona).

Estos compuestos se producen durante todo el crecimiento de la uva, y la protegen de la radiación ultravioleta debido a su elevada absorción en las longitudes de onda UV-A (325-400 nm) y UV-B (280-325 nm).

Según el estudio realizado por Mattivi et al. (2006), el perfil de los flavonoles varía en primer lugar según el tipo de uva. Así, se describe la quercetina como el principal flavonol en uvas tintas, seguido de miricetina, kaempferol, laricitina, isoramnetina y siringetina. Además, la acumulación de los flavonoles en las uvas está fuertemente influenciada por factores medioambientales como la insolación, el estrés hídrico, o el grado de madurez de la uva (Downey et al., 2004; Spayd et al., 2002).

En vinos tintos, se asume que el contenido de flavonoles es mucho más bajo que el de flavanoles. Sin embargo, algunos autores coinciden en que los compuestos que proceden de los hollejos se extraen con mayor rapidez y facilidad que los procedentes de las semillas, y afirman que la mayor contribución a la composición fenólica del vino proviene principalmente de la piel (Gómez-Míguez et al., 2007a; González-Manzano et al., 2004).

Otros autores describen que el contenido de estos compuestos parece estar también muy relacionado con la relación hollejo/pulpa característica de cada tipo de uva. Así, el contenido de flavonoles en vinos tintos procedentes de uvas con hollejos finos (baja relación hollejo/pulpa) es menor que en los elaborados con uvas de hollejos gruesos (elevada relación hollejo/pulpa) (McDonald et al., 1998).

Los flavonoles son pigmentos amarillos que contribuyen directamente el color de los vinos blancos, pero en los vinos tintos su color está enmascarado por el color rojo de los pigmentos antocianicos. Sin embargo, los flavonoles son uno de los compuestos fenólicos que mejor participan en el fenómeno de copigmentation en los vinos tintos, por tanto, juegan un papel fundamental en su color (Gómez-Míguez et al., 2006).

2.1.4. Flavanonoles y flavonas

La presencia de flavanonoles y flavonas se ha confirmado en hollejos y raspones tanto de uvas tintas como blancas, así como en los vinos elaborados a partir de éstas. Entre los flavanonoles identificados se encuentran diversos dihidroflavonoles, algunos de ellos glucosilados en posición 3 con glucosa, ramnosa o xilosa, siendo los más destacados la astilbina (dihidroquercetina 3-O-ramnósido), y la engeletina (dihidrokaempferol 3-O-ramnósido). Con respecto a las flavonas, las más frecuentes son apigenina y luteolina, y sus derivados 7-glucósidos (Souquet et al., 2000; Vitrac et al., 2001; Vitrac et al., 2002; Monagas et al., 2007). La estructura química de alguno de ellos se muestra en la Figura 16.

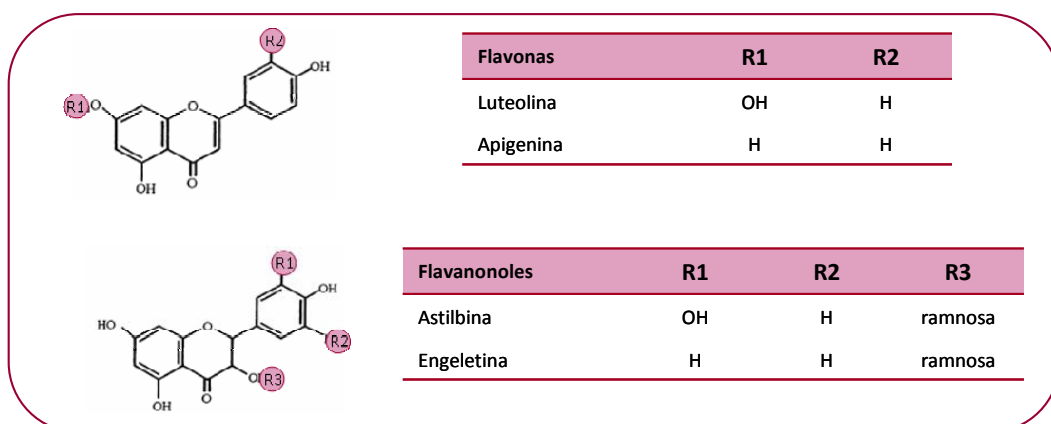


Figura 16. Estructura química de los principales flavanonoles y flavonas de las uvas y vinos.

El interés de estos compuestos radica en que actúan como potentes antioxidantes, lo que ha sido recientemente demostrado, aunque su implicación en el color del vino aún no se ha evaluado en profundidad. Sin embargo, debido a sus estructuras planas, se ha demostrado que participan en reacciones de copigmentación (Baranac et al., 1997a; 1997b), muy importantes para comprender la química del color del vino en su totalidad.

2.1.5. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos constituyen, junto con los estilbenos, las dos familias de compuestos fenólicos no flavonoides. Estos fenoles se caracterizan por tener una estructura constituida por un solo anillo bencénico, clasificándose como hidroxicinámicos (gálico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, etc.) o benzoicos (*p*-hidroxibenzoico, ácido vainílico, ácido protocatéquico, ácido sirínico, ácido salicílico, ácido gentsílico, ácido eláxico, etc.) según sean las sustituciones en los anillos bencénicos, tal y como se puede apreciar en la Figura 17.



Figura 17. Estructura química de los principales ácidos fenólicos de las uvas y vinos.

En las uvas, fundamentalmente en la pulpa, los ácidos hidroxicinámicos suelen encontrarse esterificados principalmente con tartárico (caftárico, cutárico, fertárico, etc.) mientras que los ácidos benzoicos suelen estar en forma de glucósidos, en ésteres o en forma libre (Ramos et al., 1999). Durante la vinificación sufren una lenta hidrólisis, por lo que en el vino se encuentran en forma libre y combinada, cuya concentración

varía desde 100 a 200 mg/L en los tintos (Ho et al., 2001; Kennedy et al., 2000; Lamuela-Raventós et al., 1994).

Todos estos compuestos son incoloros o ligeramente amarillentos si se oxidan, y no tienen ningún aroma o sabor definido. Sin embargo, intervienen en las reacciones de copigmentación favoreciendo la estabilidad del color del vino, principalmente los ácidos *p*-cumárico y cafeico (Davies & Mazza, 1993; Darías-Martín et al., 2002; Eiro & Heinonen, 2002; Álvarez et al., 2008).

2.1.6. Estilbenos

Por último, hay que destacar la presencia en la uva y en el vino de otros compuestos fenólicos como el resveratrol y su derivado glucosilado, el palidol (Waterhouse & Lamuela-Raventós, 1994; Vitrac et al., 2002). Su estructura está formada por 2 anillos benzénicos unidos por un grupo etilénico (Figura 18).

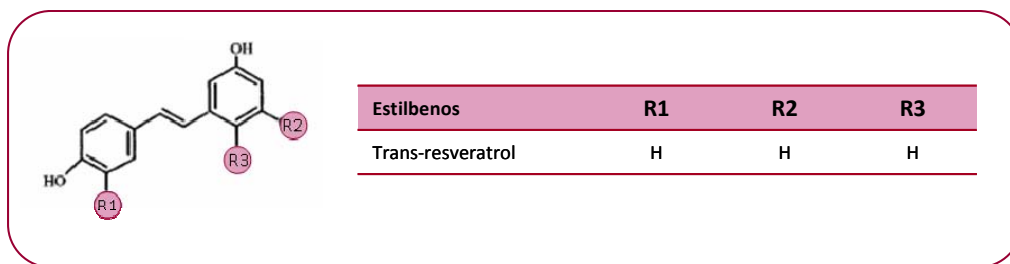


Figura 18. Estructura química del estilbeno trans-resveratrol.

En general, el contenido de estilbenos en los vinos tintos es mayor que en los vinos blancos independientemente de la técnica enológica empleada, siendo la maceración con semillas y hollejos durante la fermentación el principal factor que determina dicha concentración (Vitrac et al., 2002). Su implicación en el color del vino actualmente no ha sido constatada.

2.1.7. Pigmentos derivados antociánicos de nueva formación

Recientemente, gracias al desarrollo de nuevas técnicas analíticas (espectroscopía HPLC/UV-Vis, espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear, fundamentalmente) se han aislado e identificado en vinos tintos diferentes grupos de pigmentos derivados antociánicos, tales como *piranoantocianos*, *productos de condensación directa antociano-flavanol* o *mediados por acetaldehído*, entre otros.

(Vivar-Quintana et al., 2002; Mateus et al., 2002a; Monagas et al., 2003; De Villiers et al., 2004; Alcalde-Eón et al., 2006a; García-Marino et al., 2010, Quijada-Morín et al., 2010).

Una característica común de estos compuestos es la mayor resistencia que presentan a reacciones de degradación con respecto a los antocianos libres (Gómez-Cordovés et al., 1995; Pérez-Prieto et al., 2003; Berké y De Freitas, 2007). Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la formación de estos pigmentos y la estabilización del color, entre los cuales se encuentran los procesos de copigmentación, el pardeamiento de flavanoles, la condensación directa antociano-flavanol o las reacciones entre antocianos y/o flavanoles con productos de menor peso molecular, como acetaldehído, ácido pirúvico, etc. (Escribano-Bailón et al., 1996; Bakker et al., 1997; Fulcrand et al., 1996; Schwarz et al., 2003; He et al., 2006; Cruz et al., 2008; Oliveira et al., 2007; Nave et al., 2010).

Todos estos procesos se pueden dar en el vino en mayor o menor extensión, en función de su composición fenólica cualitativa y cuantitativa y factores como pH, temperatura, contenido de SO₂ o disponibilidad de acetaldehído y O₂. La variedad de elementos que pueden influir hace muy difícil el estudio directamente en el vino, por lo que es habitual recurrir a la realización de ensayos modelo, en los cuales se combinan diferentes sustancias y condiciones de reacción, con el objeto de evaluar la importancia de cada factor por separado. La Figura 19 muestra un esquema general de las distintas familias de pigmentos derivados antociánicos encontrados en vinos.

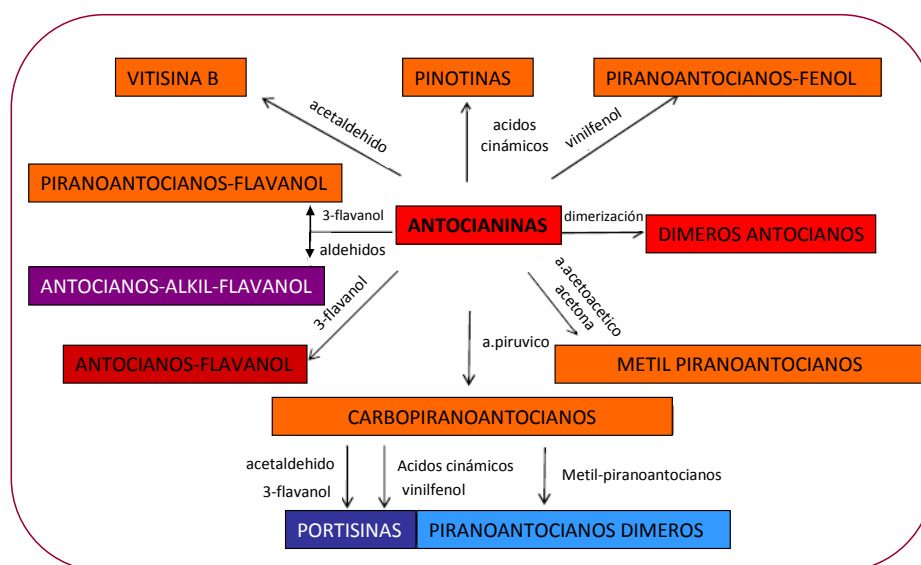


Figura 19. Pigmentos derivados antociánicos presentes en vinos tintos. (Adaptado de: De Freitas y Mateus, 2011)

- **Piranoantocianos**

Los piranoantocianos son los pigmentos derivados antociánicos mayoritarios en vinos tintos. En esta familia de pigmentos está incluida una gran variedad de compuestos más o menos complejos cuya característica común es poseer un anillo piránico D adicional, formado entre el grupo OH del C-5 y el C-4 del catión flavilio del antociano original, el cual puede presentar diferentes sustituyentes en la posición 10 (Figura 20). La sustitución en el C-4 del anillo piránico C es el origen de la mayor estabilidad del grupo cromóforo frente a variaciones de pH, SO₂, degradación oxidativa o incluso de temperatura, con respecto a sus pigmentos precursores (De Freitas & Mateus, 2010). En ese sentido, la contribución de éstos al color total del vino podría ser mayor que la resultante directa de su concentración.

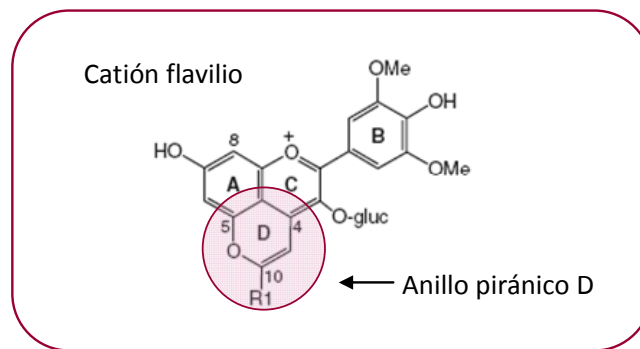


Figura 20. Estructura general de los piranoantocianos.

En cuanto a sus propiedades espectrales, al pH del vino estos pigmentos presentan un desplazamiento hipercrómico e hipsocrómico con respecto a los antocianos originales, es decir, una mayor absortividad (ϵ) y menor $\lambda_{\text{máx}}$ (495-520 nm), lo cual les confiere una mayor intensidad cromática y tonalidad roja-anaranjada.

Según su estructura química, se diferencian varios grupos: vitisinas y sus productos derivados, metilpiranoantocianinas, aductos antociano-vinilfenol, aductos antociano-vinilcatequina, portisinas, etc. De las distintas subfamilias, destacan los pigmentos derivados de la condensación de los antocianos libres y los metabolitos liberados por las levaduras durante la fermentación, como por ejemplo, el ácido pirúvico, el acetaldehído y el ácido diacético (acetoacético) (De Freitas & Mateus, 2011).

Las *carboxipiranoantocianinas*, derivadas de la cicloadición de los antocianos con el ácido pirúvico, destacan por ser mayoritarias en los vinos (Morata et al., 2007). Se ha confirmado que los antocianos libres y acilados presentan igual reactividad con la forma etanólica del ácido pirúvico (Romero & Bakker, 1999). Sin embargo, al ser la

malvidina 3-*O*-glucósido el antociano predominante en vinos, el aducto formado con ella, la *vitisina A*, es el más frecuente (Morata et al., 2003).

Otro grupo de piranoantocianos muy relacionados estructuralmente con las vitisinas de tipo A son los aductos formados entre los antocianos y el acetaldehído o *vitisinas de tipo B*. Su compuesto mayoritario resulta de la interacción entre la malvidina 3-*O*-glucósido y el acetaldehído, conocido como *vitisina B* (Morata et al., 2003).

A diferencia de otros piranoantocianos, las vitisinas son pigmentos más característicos de las fases iniciales de la vinificación, que se forman durante la fermentación, siendo las vitisinas A de formación más rápida que las vitisinas B (Asenstorfer et al., 2003).

Recientemente, se ha confirmado la presencia en vinos de los oligómeros catequina-(4-6/8)-vitisina A y catequina-(4-6/8)-vitisina B, derivados de la cicloadición de las vitisinas A y B con flavanoles, al igual que la formación de piranonas antociánicas neutras, también denominadas *oxovitisinas*, producidas por el ataque nucleofílico del agua sobre la vitisina A, que exhibe color amarillo en medio ácido ($\lambda_{\text{máx}}=373$ nm a pH=2).

Otro grupo de piranoantocianos son las *metilpiroantocianinas* derivadas de la cicloadición de los antocianos con el ácido diacético (He et al., 2006), los cuales son de color amarillo-anaranjado en medio ácido ($\lambda_{\text{máx}}=478$ nm).

Además, los antocianos también pueden reaccionar con los ácidos hidroxicinámicos (*p*-cumárico, ferúlico, cafeico, sinápico, etc.) o con sus productos de descarboxilación, los 4-vinilfenoles (4-vinilfenol, 4-vinilcatecol, 4-vinilguaiacol, etc.) formando los *aductos antociano-vinilfenol*, también denominados *pinotinas* (Schwarz et al., 2003). Entre ellos, destaca la *pinotina A* (Malvidina 3-*O*- glucósido-4-vinilcatecol), aislada por primera vez de vinos de la variedad Pinotage, y que ha sido descrita como marcador de vinos envejecidos, ya que su formación es mucho más lenta que las vitisinas, generándose tras largos periodos de crianza del vino (Schwarz et al., 2004).

Otro grupo importante de pigmentos de color rojo-anaranjado perteneciente a esta familia corresponde a *piranoantocianos unidos a flavanoles mediada por acetaldehído*, como es la malvidina 3-*O*-glucósido-4-vinilcatequina (Francia-Aricha et al., 1997; Cruz et al., 2008). Su formación surge a través de un mecanismo muy parecido al propuesto por Fulcrand et al. (1996) para los antocianos-vinilfenoles. Sobre

éstos se ha destacado la importancia de la presencia de una o más unidades de flavanol en la estructura química, ya que podría interferir mediante copigmentación intermolecular en las propiedades espectrales del grupo cromóforo del antociano, siendo por tanto responsable en parte del color exhibido por estos pigmentos (De Freitas & Mateus, 2010). Asimismo, se han identificado en vinos piranoantocianos con un mayor grado de polimerización unidos con hasta 4 unidades de flavanoles (Asenstorfer et al., 2001).

Recientemente se ha descrito una nueva clase de piranoantocianos (vinilpiranoantocianina-flavanoles) denominadas *portisinas* ya que fueron identificados en vinos de Oporto (Mateus et al., 2003; Oliveira et al., 2007). Estos pigmentos exhiben color azul en medio ácido ($\lambda_{\text{máx}}=570$ nm) y una intensidad cromática mucho más elevada que los antocianos de los que proceden.

La Figura 21 se muestra las estructuras químicas de algunos piranoantocianos identificados en vinos.

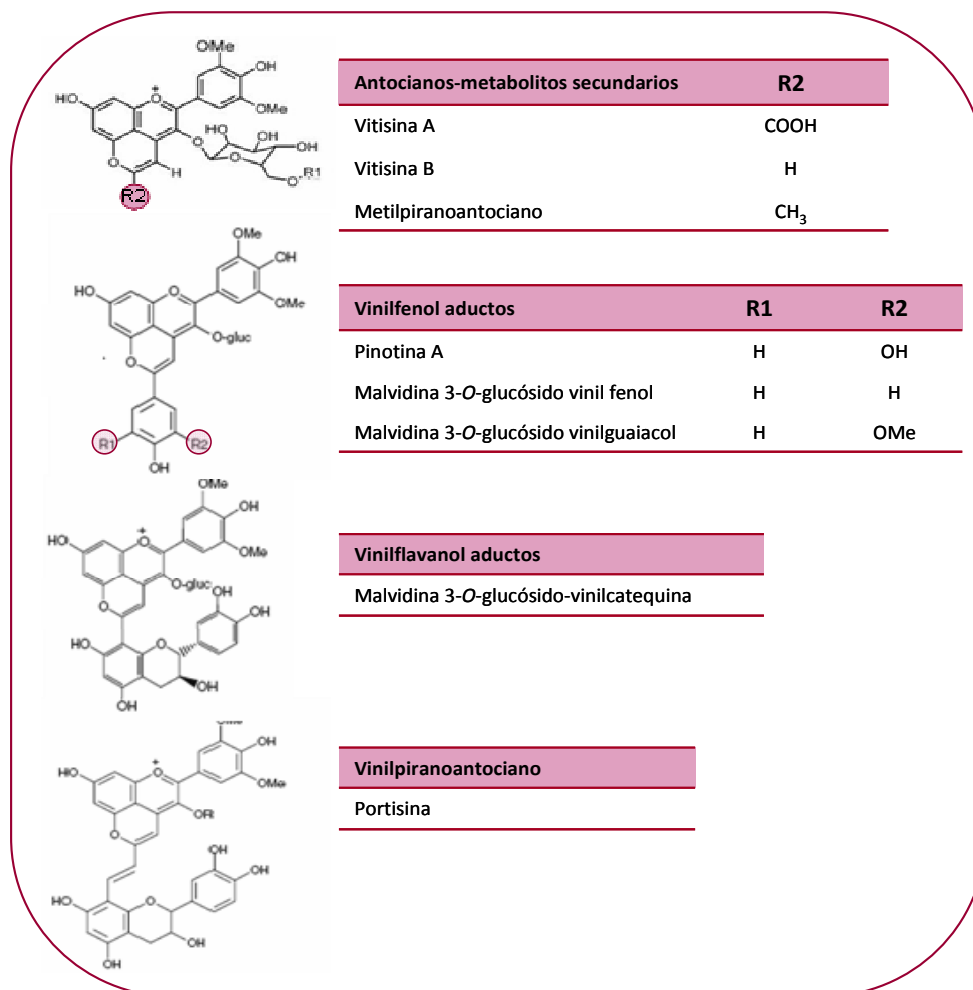


Figura 21. Estructura química de piranoantocianos presentes en vinos.

- **Derivados antociano-flavanol por condensación directa**

Esta familia de pigmentos poliméricos integra aquellos compuestos formados por la interacción directa de los antocianos (A^+) con flavanoles (F), los cuales se diferencian en dos tipos dependiendo del mecanismo de reacción: aductos antocianos-flavanol (A^+-F) y flavanol-antocianos ($F-A^+$)

Los aductos antocianos-flavanol se forman por el ataque nucleofílico del flavanol sobre el catión flavilio, que actúa como electrófilo. Como consecuencia, se forma un primer aducto antociano-flavanol incoloro, que posteriormente se transforma en la forma flavilio combinada (A^+-F) por oxidación, de color rojo.

Los aductos flavanol-antocianos son el resultado de la condensación directa entre los antocianos y las proantocianidinas (taninos condensados) (Figura 22). La ocurrencia de estos pigmentos en el vino se produce en fases avanzadas del envejecimiento del vino ya que el mecanismo de formación propuesto para éstos requiere la catalización ácida de la unión interflavánica (De Freitas & Mateus, 2010).

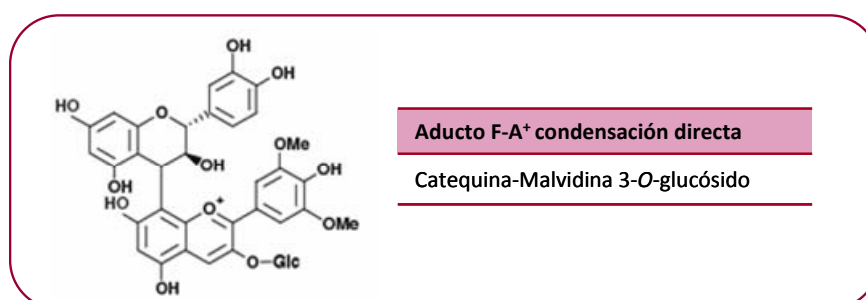


Figura 22. Estructura de un derivado antociano-flavanol por condensación directa

En comparación con sus precursores antociánicos, se ha demostrado que estos pigmentos presentan propiedades colorimétricas diferentes (desplazamiento batocrómico en la $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 10 nm), pero una estabilidad química similar frente a la hidratación y a la decoloración por SO_2 (Salas et al., 2004).

Aunque el mecanismo de formación de estos pigmentos continúa estudiándose en la actualidad, fundamentalmente en disoluciones modelo (Nave et al., 2010), su presencia en vinos está siendo confirmada cada vez por más autores (De Villiers et al., 2004; Alcade-Eón, 2006; 2006b; 2007; Chinnici et al., 2009; García-Marino et al., 2010).

- **Derivados antociano-flavanol mediados por acetaldehído**

Entre los primeros pigmentos antociánicos derivados descritos en vinos tintos se encuentran los obtenidos en las reacciones de polimerización entre antocianos y flavanoles (catequinas y taninos condensados) mediados por acetaldehído (Timberlake & Bridle, 1976), cuya estructura se presenta en la Figura 23.

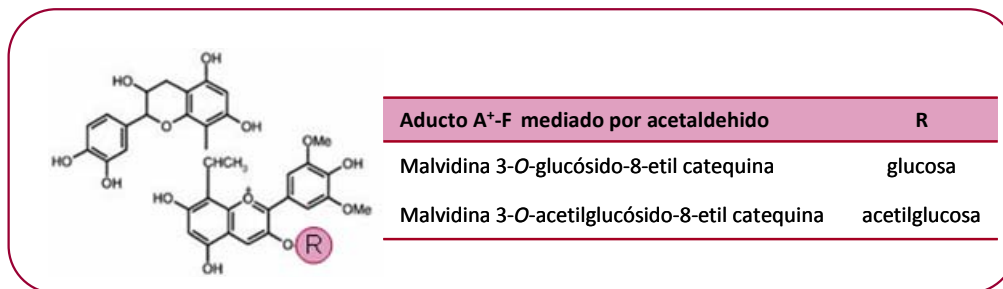


Figura 23. Estructura de un derivado antociano-flavanol mediado por acetaldehído.

El etanal o acetaldehído es un compuesto natural del vino cuyo origen es tanto microbiano como oxidativo, cuya formación se ve favorecida tanto por la presencia de oxígeno como por la de elagitaninos de la madera del roble (Llaudy et al., 2002). Determinadas prácticas enológicas como la microoxigenación pueden favorecer su contenido, y por tanto, las reacciones en las cuales interviene.

La $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción de estos pigmentos está batocrómicamente desplazada con respecto al antociano original, siendo cercana a 540 nm, lo que le otorga tonalidades azuladas. Esta tonalidad ha sido atribuida por algunos autores a un fenómeno de copigmentación intermolecular (Escribano-Bailón et al., 1996).

2.1.8. Pigmentos minoritarios no antociánicos

En los vinos tintos, aunque el color está determinado fundamentalmente por los antocianos y sus derivados, es probable que estén presentes otros pigmentos no flavonoideos que también contribuirían a éste (De Freitas & Mateus, 2010). Por ejemplo, según sus moléculas precursoras que sí están presentes en los vinos, se diferencian las sales xantílicas de color amarillo ($\lambda_{\text{máx}}=500$ nm), los carotenoides de color anaranjado o derivados de clorofilas.

2.2. La química en el color del vino

Los pigmentos responsables del color del vino, debido a su carácter resonante, son compuestos químicos muy reactivos y por tanto, muy inestables y sensibles a reacciones de degradación o de modificación de su color (Giusti & Wrolstad, 2003). Aunque son numerosos los factores que afectan a la estabilidad de los pigmentos del vino, el primero que les confiere intrínsecamente una mayor o menor estabilidad es su propia estructura química. No obstante, otros factores extrínsecos como el pH, el SO₂, el O₂, o la asociación con otras moléculas son también determinantes en su estabilidad.

2.2.1. Estructura química

La aplicación de la Colorimetría Triestímulo a la caracterización de disoluciones de antocianos puros extraídos de la uva puso de manifiesto las diferencias de color que existen entre ellos debido a la estructura química (Heredia et al., 1998). Así, es posible diferenciar las distintas antocianinas ya que su color varía según las metilaciones, glicosilaciones o acilaciones, produciendo ligeros desplazamientos hipsocrómicos o batocrómicos en torno a la $\lambda_{\text{máx}}$.

En medio ácido, las antocianinas con dos sustituyentes en el anillo aromático B (peonidina y cianidina) presentan una $\lambda_{\text{máx}}$ ligeramente desplazada hacia valores menores, cercanos a 512 nm, y las antocianinas con tres sustituyentes (delfinidina, petunidina y malvidina) presentan $\lambda_{\text{máx}}$ entre 518 y 520 nm. Según los valores de claridad (L*), croma (C*_{ab}) y tono (h_{ab}) de los extractos, los antocianos están situados en el 1^{er} y 2^o cuadrante del diagrama de color (a*b*), en torno a los 0° de tono, es decir, en la zona de los rojos, pudiendo tener ligeros matices anaranjados o azulados. Mientras que peonidina y cianidina exhiben un color rojo-anaranjado, delfinidina, petunidina y malvidina son rojo-azuladas (Figura 24).

Además, cuanto mayor es el número de grupos hidroxilo y metilo en la molécula, menor es la estabilidad del pigmento (Delgado-Vargas et al., 2000). Por tanto, de las antocianinas presentes en el vino tinto, cianidina y peonidina, con menor número de sustituyentes en el anillo aromático B, son las más estables.

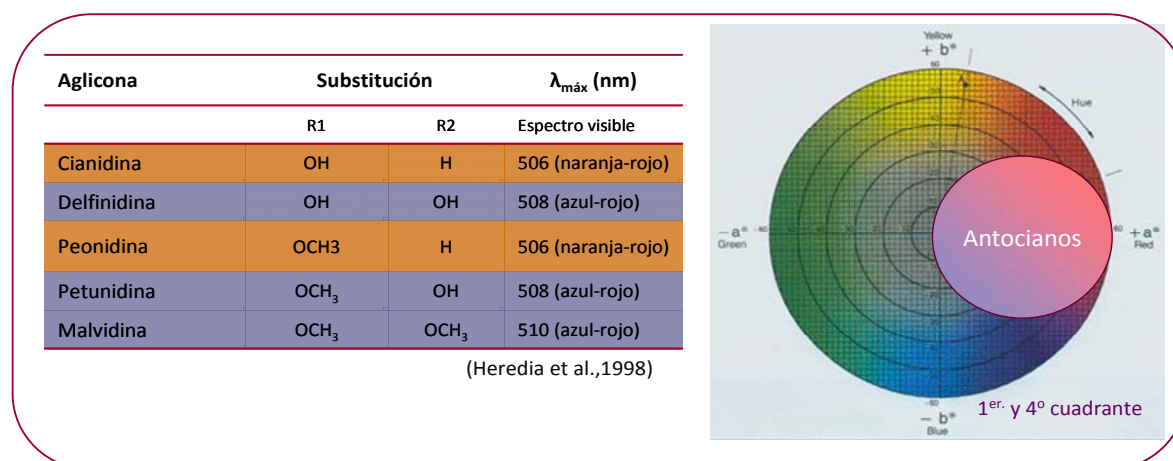


Figura 24. Diferenciación colorimétrica de las antocianinas de las uvas y el vino.

El nivel de glicosilación también ha demostrado tener un claro efecto en la estabilidad; en este sentido, los antocianos diglucósidos son más estables que los monoglucósidos, pero los primeros muestran una mayor tendencia al pardeamiento por la presencia adicional de azúcares.

De la misma manera, las acilaciones de los antocianos, particularmente con ácidos cinámicos, incrementa su estabilidad (Wrolstad et al., 2005). La acilación del grupo cromóforo dificulta la hidrólisis del catión flavilio, manteniendo más intensidad de color a valores de pH elevados que sus correspondientes formas no aciladas, y además presentan mayor estabilidad a otros factores como el calentamiento, la luz o el SO₂. Además, los grupos de acilación permiten al antociano adoptar una conformación plegada que lo protege contra los factores de degradación, además de facilitar su intervención en reacciones de copigmentación.

Una característica común de los pigmentos antociánicos derivados es la mayor resistencia que presentan a reacciones de degradación con respecto a los antocianos libres, especialmente aquellos que tienen las posiciones C-2 y C-4 del grupo cromóforo protegida con sustituyentes de distinta naturaleza (Gómez-Cordovés et al., 1995; Pérez-Prieto et al., 2003; Berké & De Freitas, 2007).

2.2.2. Variación del pH

El color y estabilidad de los antocianos está fuertemente influenciado por el pH del medio. En disolución acuosa, los antocianos se encuentran en diversas formas químicas con distintas propiedades cromáticas cuyo equilibrio depende directamente del pH (Heredia et al., 1998). A pH muy ácido (1-2) predominan los cationes flavilio, de

color rojo. Entre pH 2 y 4, la especie predominante es la anhidrobase quinónica, de color azul. Entre pH 5 y 6, predominan dos especies, la pseudobase carbinol y la chalcona, ambas incoloras. A valores de pH superiores a 7, los antocianos son degradados dependiendo de su estructura química, mostrándose de color amarillo o pardo (Figura 25).

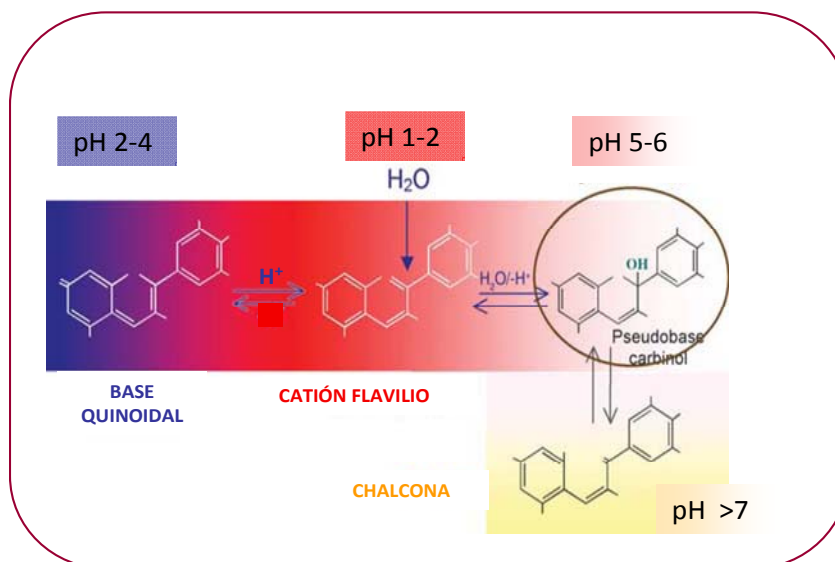


Figura 25. Equilibrio químico antociánico en función del pH.

En una solución hidroalcohólica, como es el vino tinto, con valores medios de pH comprendidos entre 3 y 4, aproximadamente el 80% de los antocianos se encuentran en forma hidratada incolora, excepto si tienen lugar algún tipo de mecanismo químico estabilizador del color, como son las reacciones de copigmentación, que se explican con mayor detalle en un apartado posterior de esta Memoria.

Con respecto a los pigmentos poliméricos, como por ejemplo algunos pigmentos antociánicos derivados, las sustituciones en posición C-4 y C-5 en su estructura química les otorgan una mayor estabilidad frente al ataque nucleofílico del agua que la que presentan los antocianos libres (Oliveira et al., 2006; De Freitas & Mateus, 2010). Somers & Evans (1971) confirmaron la mayor dependencia de la estabilidad de los antocianos libres frente a variaciones de pH con respecto a los pigmentos poliméricos. Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, determinados pigmentos derivados como las vitisininas B, reaccionan lenta pero irreversiblemente con el agua hacia formas neutras incoloras, las oxovitisinas.

2.2.3. Decoloración por el ión bisulfito (HSO_3^-)

Los antocianos libres en su forma catión flavilio también reaccionan con el anión bisulfito (HSO_3^-) dando lugar a compuestos incoloros (Berké et al., 1998). Esta reacción explica la decoloración de los vinos tintos tras el sulfitado (Datzberger et al., 1992; Bakker et al., 1998), aunque, debido a la reversibilidad de la combinación, el color reaparece al ir disminuyendo los iones bisulfito de forma natural en el vino (Figura 26).

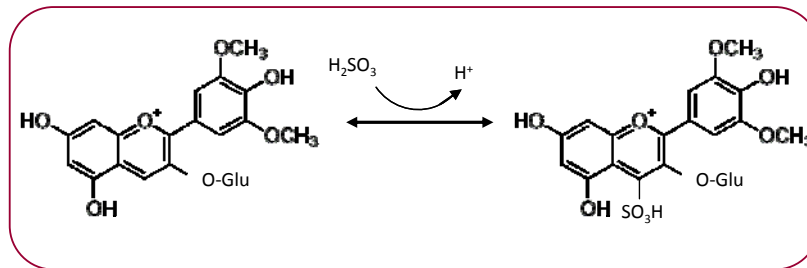


Figura 26. Formación de aductos incoloros antociano-iones bisulfito.

Al igual que ocurre con las variaciones de pH, algunos pigmentos antociánicos derivados presentan mayor estabilidad a la decoloración por el anión bisulfito que los antocianos libres (Francia-Aricha et al., 1997; Escribano-Bailón et al., 2001; Oliveira et al., 2006). En la estructura del antociano, la adición nucleofílica del bisulfito aniónico se puede producir en la posición C-2 cargada positivamente, menos favorecida, y preferentemente en la posición C-4. En los piranoantocianos, la posición C-4 queda protegida frente al ataque nucleofílico por la presencia del anillo adicional D, lo cual los hace más estables.

2.2.4. Oxidación

Los compuestos fenólicos son susceptibles de oxidarse dando lugar a modificaciones de color (pardeamiento) y de sabor (pérdida o aumento de astringencia). Esta oxidación puede ocurrir por la acción de enzimas de diversa naturaleza, como por ejemplo las polifenoloxidasas, y además por un proceso químico de autooxidación.

En el proceso de elaboración del vino, la oxidación enzimática predomina más en los mostos, en los que existe una intensa actividad polifenoloxidasa, ya que la enzima es liberada con el estrujado y prensado de las uvas. Los sustratos fenólicos preferentes de la polifenoloxidasa son los ácidos hidroxicinámicos, principalmente el ácido caftárico que por acción de la enzima se transforma en la o-quinona

correspondiente. Las quinonas son especies muy inestables y reactivas, capaces de oxidar a otros compuestos del mosto como el ácido ascórbico o los sulfitos (Rigaud et al., 1991).

Además de las polifenoloxidasas, otras enzimas capaces de degradar los polifenoles durante la vinificación son: hidrolasas (pectinasas, β -glucosidasas, tanasas, etc.), procedentes de la microflora de la uva o de preparaciones enzimáticas exógenas, y cinamato descarboxilasas, presentes en las levaduras de la vinificación.

La degradación de los antocianos también tiene lugar por oxidación química, por acción de la luz o por elevadas temperaturas, reacciones que adquieren más relevancia durante la conservación y el envejecimiento del vino, cuando las enzimas están inactivas. Comienza por la formación de las chalconas que posteriormente darían lugar a la ruptura del heterociclo (anillo C) previamente abierto (Zamora, 2003). Evidentemente, la degradación de los antocianos comporta una pérdida irreparable del color del vino y por tanto ha de limitarse para favorecer la estabilización de la materia colorante. Por estas razones, los vinos se conservan protegidos de luz y de oxigenaciones fuertes, a temperaturas moderadas.

2.2.5. Copigmentación

A pesar de los numerosos factores que afectan negativamente a la estabilidad de los antocianos, generalmente, éstos se encuentran en asociación con otras moléculas que intervienen protegiéndolos de su degradación, gracias a reacciones de copigmentación. El fenómeno de copigmentación es un mecanismo de protección asociado exclusivamente a la familia de los pigmentos antociánicos, que ocurre típicamente en medio acuoso y ampliamente extendido en la naturaleza (Delgado-Vargas et al., 2000; Cavalcanti et al., 2011).

La copigmentación es un equilibrio que implica la asociación preferencial y no covalente de las formas coloreadas de los antocianos con un grupo de compuestos, generalmente incoloros, que se denominan copigmentos o cofactores de copigmentación (Mazza & Bruillard, 1990).

Desde el punto de vista molecular, la copigmentación consiste en la formación de un complejo de estequiometría 1:1, en el que un pigmento se apila con un copigmento, estableciéndose unas débiles interacciones entre las nubes electrónicas de los anillos aromáticos de ambos. Como copigmentos, pueden actuar sustancias muy distintas: polisacáridos, compuestos fenólicos, alcaloides, aminoácidos, ácidos

orgánicos, incluso los mismos antocianos asociados entre sí. El único requisito que deben cumplir estas moléculas es poseer o adoptar una configuración estructural espacial plana para poder formar complejos de apilamiento vertical (Figura 27).

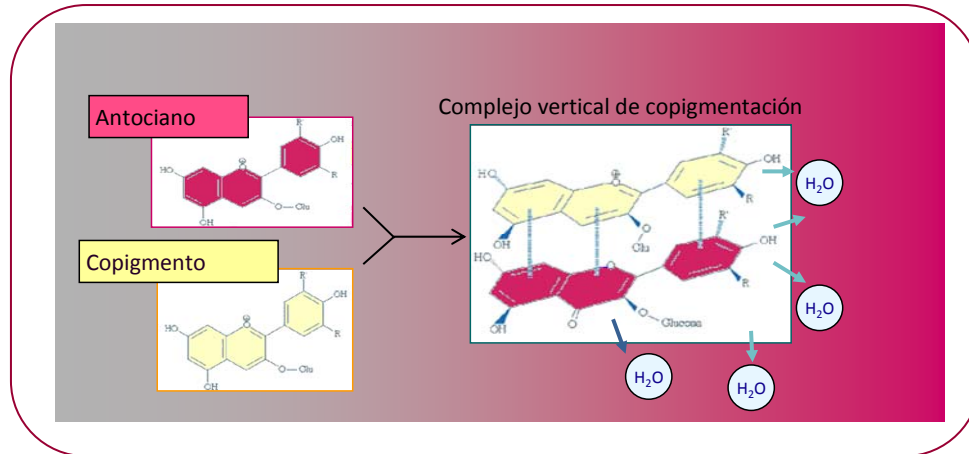


Figura 27. Formación de complejos de copigmentación

Aunque el catión flavilio es la forma antociánica que participa principalmente en las reacciones de copigmentación, la forma hemiacetal también puede formar estos complejos, pero de manera minoritaria (Asen et al., 1972). La copigmentación puede, a su vez, subdividirse en tres categorías, según la naturaleza del copigmento implicado (Figura 28): autoasociación (antocianos entre sí), copigmentación intramolecular (entre el grupo acilado y el grupo cromóforo del mismo antociano) y copigmentación intermolecular (entre antocianos y otras moléculas incoloras).

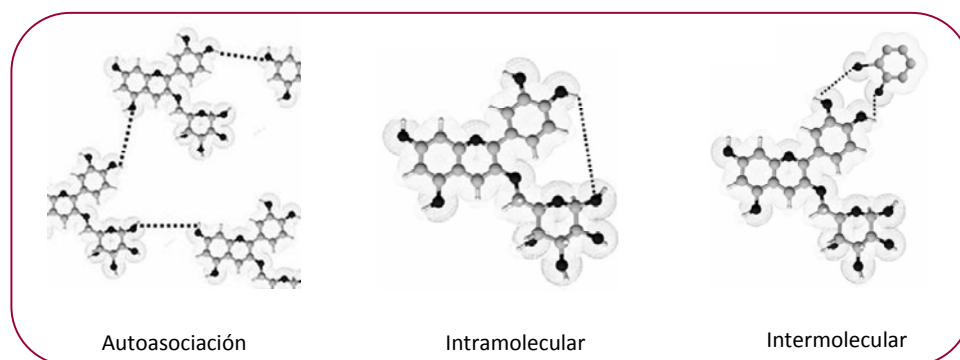


Figura 28. Distintos tipos de copigmentación (Fuente: Castañeda-Ovando et al., 2009)

El resultado global del fenómeno de copigmentación se caracteriza por tener dos efectos positivos sobre el color del antociano: 1) la modificación de sus propiedades espectrales originales, consistentes en un incremento de la absorptividad (efecto hiperocrómico, ΔA) y generalmente un desplazamiento en la $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción

hacia valores superiores (efecto batocrómico, $\Delta\lambda$); y 2) la estabilización del antociano en su forma coloreada catión flavilio (Dangles & Brouillard, 1992). De esta manera, se explica la intensidad de color y variedad de matices que presentan los antocianos a valores de pH donde son normalmente incoloros.

En los últimos años, los estudios realizados en disoluciones modelo han demostrado que la eficacia y la intensidad de la copigmentación depende de distintos factores, incluyendo las concentraciones de los pigmentos y los copigmentos, sus estructuras químicas, la relación molar pigmento/copigmento, el pH del medio, o la temperatura (Mazza & Brouillard, 1990; Gómez-Míguez et al., 2006; González-Manzano et al., 2009; Cruz et al., 2010). En cuanto a la estructura química de los antocianos, la malvidina copigmenta mejor que la cianidina (Mazza & Brouillard, 1990) y el efecto es más pronunciado para los 3,5-diglucósidos que para los monoglucósidos, ya que se ve aumentado con el grado de glucosilación (Scheffledt & Hrazdina, 1978). Además, los antocianos que contienen grupos acil-aromáticos forman complejos de copigmentación mucho más estables que los antocianos no acilados (Goto & Kondo, 1991).

Asimismo, algunos autores han descrito el fenómeno *anticopigmento*, que tiene lugar cuando la interacción con otras moléculas estabiliza las formas incoloras de los antocianos, causando así una pérdida del color (Dangles et al., 1992). Este efecto se debe a la inclusión preferencial de las formas incoloras del antociano, chalcona fundamentalmente, en las estructuras macrocíclicas de determinados compuestos, como por ejemplo las ciclodextrinas.

3. IMPLICACIONES AGRONÓMICAS Y ENOLÓGICAS DEL COLOR DEL VINO TINTO

La estabilización química de los pigmentos del vino, y por tanto del color, constituye una de las líneas de investigación más importante en el campo de la enología. El estudio y control de los factores, tanto agronómicos como enológicos, que determinan su contenido y evolución durante la vinificación ha sido y continúa siendo uno de los principales objetivos en los controles de calidad del vino. Entre los factores que ejercen una influencia más significativa en el perfil y contenido de los pigmentos del vino destacan la variedad y el grado de madurez de la uva, el propio proceso de vinificación, la técnica de vinificación aplicada o el proceso de envejecimiento.

3.1. Variedad de uva

La incidencia de los factores genéticos en la composición de la uva determina que cada variedad tenga un potencial fenólico característico. Algunas variedades contienen cantidades elevadas de compuestos fenólicos y otras son deficientes, por lo que la asociación de variedades, en muchos casos, puede ser positiva (Escudero-Gilete et al., 2010).

En concreto, la distribución y la concentración de los compuestos antociánicos en la uva es específica de cada variedad, por ello se les ha considerado marcadores químicos de gran utilidad para la diferenciación varietal (Mazza, 1995; García Beneytez et al., 2002; Mattivi et al., 2006). Así, por ejemplo, la mayor acumulación relativa de peonidina en los hollejos de Merlot procede de una menor actividad flavonoide-hidroxilasa en esta variedad, mientras que las elevadas proporciones de malvidina en Cabernet Sauvignon indican una fuerte actividad flavonoide hidroxilasa y metil transferasa (González-Neves et al., 2007). Además, el factor genético también ha dado lugar a ciertas particularidades, como por ejemplo la variedad Pinot Noir, que no sintetiza antocianinas aciladas (Boss et al., 1996; Mazza et al., 1999) o las cepas tintoreras (*Vitis vinifera* var. Alicante Bouschet, var. Gamay freáux), que además de acumular pigmentos antociánicos en el hollejo, los contienen también en la pulpa. Recientemente, Gonzalez-Manzano et al. (2009) han encontrado diferencias en el perfil antociánico de uvas de las variedades Graciano y Tempranillo de Rioja: mientras que Graciano presenta un mayor porcentaje de peonidina y malvidina, Tempranillo es más rica en delfinidina y antocianos acilados.

Además, se ha demostrado que el factor varietal no sólo determina el perfil y el contenido antociánico, sino también la extractabilidad de los compuestos fenólicos, debido a diferencias en la estructura celular de la uva. Romero-Cascales et al. (2005) describen a las variedades Merlot, Cabernet Sauvignon y Syrah de fácil extractabilidad, con lo que los vinos correspondientes muestran la mayor intensidad cromática. Por el contrario, la variedad Monastrell, a pesar de tener un mayor contenido antociánico, presenta estructuras celulares más rígidas que dificultan su extractabilidad, dando como resultado vinos tintos con intensidad cromática menor a la esperada según su composición.

Aun así, hay que tener en cuenta que el comportamiento agronómico de la variedad de vid está estrechamente relacionado con el medio vitícola en el que se encuentra. Por ello, aunque el perfil antociánico de la uva está determinado genéticamente, puede variar apreciablemente dependiendo de las condiciones medioambientales y agronómicas en las que se desarrolla. Numerosos estudios han demostrado que una misma variedad con similar grado de maduración, cultivada en dos zonas distintas o bajo condiciones de cultivo diferentes, puede dar lugar a vinos con un contenido antociánico distinto. Ryan & Revilla (2003) encontraron menores contenidos de delphinidina y petunidina en las uvas de Cabernet Sauvignon y Tempranillo procedentes de una zona de clima cálido con respecto a las mismas cultivadas en climas más fríos. Por tanto, la combinación de los factores climáticos, edafológicos y agronómicos, difíciles de separar debido a las interacciones existentes entre ellos, es en lo que se fundamenta el concepto de “*terroir*”, para el que la zona de cultivo imprime un sello distintivo a los vinos producidos (Reyero et al., 2005).

3.2. Grado de maduración de la uva

La liberación de los constituyentes de la uva en el mosto y en el vino es esencialmente un proceso de extracción-difusión y la extensión de la misma está influenciada por la naturaleza del compuesto, su concentración y su localización en la baya. Obviamente, esta extracción requiere la degradación de la pared celular y la ruptura de la cutícula, por tanto, el estado de maduración de la uva en el momento de vendimia va a influir de manera muy acusada en este proceso.

Durante el proceso de maduración, en la uva ocurren numerosos cambios fisicoquímicos y bioquímicos que se inician en la etapa de envero y concluyen con la madurez del fruto. Estos cambios son responsables de la acumulación de azúcares en

la pulpa y de compuestos fenólicos en los hollejos y las semillas, y consecuentemente determinan la calidad global de la uva en el momento de vendimia (Pérez-Magariño & González-San José, 2006). Sin embargo, la síntesis y acumulación de estos compuestos en las distintas partes de la uva no ocurren simultáneamente durante la maduración, y además están influidos por factores genéticos, edáficos, climáticos y agronómicos. En la Figura 29 se muestra la evolución del color y la apariencia de hollejos y las semillas de uva durante la etapa de maduración.



Figura 29. Evolución del color de distintas partes de la uva durante la maduración.

En el transcurso de la maduración, la concentración de antocianos aumenta hasta alcanzar un valor máximo, tras el cual tiende a disminuir ligeramente (Figura 30). Por su parte, los fenoles de los hollejos aumentan durante el proceso de maduración, mientras que los de las semillas disminuyen (Marquette et al., 1999).

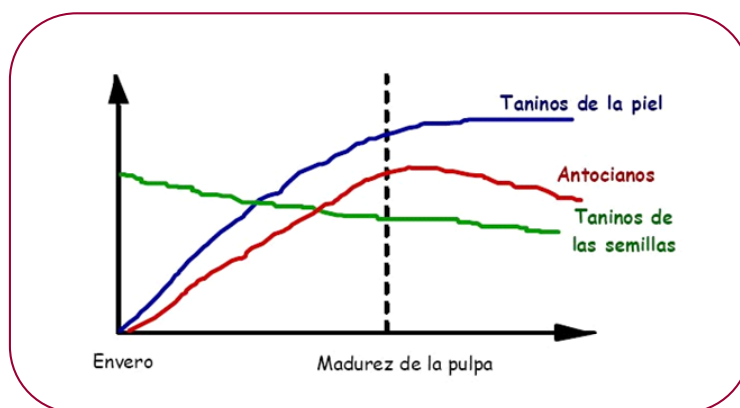


Figura 30. Evolución de los compuestos fenólicos de la uva durante la maduración (De Zamora, 2003).

En su conjunto, la uva menos madura presenta un contenido fenólico total menor que la uva más madura pero, en cambio, la contribución relativa de los taninos de las semillas es mayor, y por tanto, su astringencia también (Kountoudakis et al., 2009). La razón por la cual los taninos de las semillas son más astringentes que los de

los hollejos está relacionada con su composición química, ya que los taninos de los hollejos son ricos en prodelphinidinas y apenas poseen fenoles galoilados, mientras que los de las semillas son especialmente ricos en galato de epicatequina, que les confiere su mayor astringencia (Zamora, 2002).

En correspondencia con su localización, la extractabilidad de los antocianos está fuertemente condicionada por la degradación de las paredes celulares de las células del hollejo, mientras que la de los taninos, al encontrarse localizados fundamentalmente en las semillas, depende menos de este factor (Saint-Cricq et al., 1998). La piel de la uva está recubierta por una capa impermeable denominada pruína. Al comienzo de la fase de maceración, el medio es acuoso y la temperatura es, por lo general, baja. En estas condiciones, la pruína actúa impidiendo la solubilización de sustancias por la cara externa de la piel. Así, la solubilización de los antocianos únicamente puede tener lugar por la cara interna del hollejo. No obstante, a medida que la fermentación avanza, se libera etanol y la temperatura aumenta, lo cual provoca la solubilización de la pruína y hace posible que el intercambio también tenga lugar por la cara externa. Por otra parte, la cara interna del hollejo está cubierta por una capa de células más o menos gruesa en función del grado de madurez de la uva. En uvas poco maduras, esta capa es muy gruesa y dificulta la solubilidad de los antocianos, mientras que es más fina en uvas maduras y su extracción es más fácil. Los taninos de las semillas no son extraíbles si no disuelve el recubrimiento lipídico, y son más o menos solubles según su grado de polimerización, que va aumentando durante la maduración, lo que los hace menos extraíbles.

Por tanto, resumiendo todo lo expuesto, la uva menos madura posee una baja concentración de antocianos que, además, son de difícil extracción. Asimismo, presenta una gran concentración de taninos de las semillas que aportan mayor astringencia. Por el contrario, la uva madura tiene una alta concentración de antocianos fácilmente extraíbles y taninos menos astringentes (Zamora, 2003; Kountoudakis et al., 2011).

Según el estudio realizado por Pérez-Magariño & González-San José (2006), el estado de maduración de la uva influye en la calidad del color de vinos tintos, mejorando cuando fueron elaborados con uvas vendimiadas en fecha posterior a la tradicional. Así, se describe que estos vinos, con mayor intensidad cromática y tonos azulados, procedían de uvas con mayor cantidad de copigmentos (menor relación antocianos/proantocianidinas).

Por ello, la determinación del momento óptimo de vendimia con un criterio adecuado debe considerar la evaluación del estado de los compuestos fenólicos en la uva (madurez fenólica), además del de otros compuestos evaluados tradicionalmente, tales como el contenido en azúcar, el pH, y la acidez del mosto (madurez tecnológica). Mientras que los parámetros tradicionales informan sobre la madurez de la pulpa, el contenido en antocianos y otros fenoles, y el índice de extractabilidad de éstos, informan sobre la madurez de los hollejos y las semillas. Recientemente, la aplicación de técnicas ópticas como el análisis de imagen digital ha demostrado representar una herramienta rápida y útil para la evaluación del estado de madurez de la uva (Rodríguez-Pulido et al., 2012).

3.3. Proceso de vinificación

Los pigmentos antociánicos y otros fenoles son cedidos al mosto/vino durante el proceso de elaboración. Sin embargo, es prácticamente imposible predecir la intensidad y el tono del color de un vino teniendo en cuenta sólo la composición antociánica de las uvas de partida, ya que el propio proceso de vinificación influye significativamente en la cinética de extracción y posterior evolución de los distintos compuestos (García-Beneytez et al., 2002; Romero-Cascales et al., 2005; Manfra et al., 2011).

En general, durante la vinificación pueden diferenciarse dos fases que claramente determinan la evolución del color del vino: la maceración, durante la cual se extraen los compuestos responsables del color desde las partes sólidas de la uva, y la conservación y/o envejecimiento, en la que los compuestos extraídos se ven implicados en numerosas reacciones enzimáticas y/o químicas que tienen como resultado la degradación parcial de éstos, así como la formación de nuevos pigmentos (Gómez-Plaza et al., 2000; 2001).

El fenómeno de extracción/difusión de los antocianos y otros compuestos fenólicos se produce durante el “encubado”, cuya duración e intensidad varía según la técnica de vinificación empleada. Durante este periodo, se pueden distinguir dos fases: la maceración prefermentativa (desde el estrujado de la uva hasta el inicio de la fermentación alcohólica), en la que la extracción ocurre en ausencia de etanol, y la maceración fermentativa o maceración activa (simultánea a la fermentación alcohólica) en la que la extracción ocurre en presencia de etanol.

La naturaleza química de los compuestos que van a ser extraídos y su solubilidad, así como su localización en las diferentes partes de la uva determina la cinética de extracción. Así, los taninos y los antocianos presentan cinéticas de extracción diferentes. Los antocianos, más solubles en medio acuoso, comienzan a extraerse con mayor rapidez desde la fase prefermentativa. La máxima extracción de antocianos tiene lugar en pocos días, para después observarse una tendencia a la disminución, debido a que desde este momento pueden verse implicados en diferentes reacciones químicas (Brouillard, 1982; Cuiner, 1997). Los taninos, al ser más solubles en medio alcohólico, se solubilizan más lentamente; durante la maceración prefermentativa, sin etanol en el medio y a temperaturas bajas, su extracción es más limitada. Posteriormente, la aparición de etanol y el aumento de la temperatura, supone un aumento del poder extractante del líquido, y una mayor degradación celular (González-San José, 2005). Es necesario distinguir entre los taninos de la piel y los de las semillas, ya que su cinética de extracción es también diferente. Los taninos de la piel comienzan a solubilizarse conjuntamente con los antocianos, si bien su extracción se prolonga más tiempo. Por el contrario, los taninos de las semillas no se solubilizarán hasta la mitad de la fermentación, cuando el alcohol haya disuelto la cutícula (Ribéreau-Gayón et al., 1999).

Los niveles medios de compuestos fenólicos en el vino tinto oscilan entre 1000-5000 mg/L. Al término de la maceración, el vino presenta un contenido en antocianos entre 100 y 500 mg/L. No obstante, estos valores son muy variables dependiendo básicamente de la madurez fenólica de la uva en el momento de su procesado, como de las condiciones de vinificación, entre las que tienen especial influencia el contenido en alcohol, en SO₂, y la temperatura. En la Tabla 2 se muestra la composición media de distintos compuestos fenólicos en vinos tinto.

Tabla 2. Composición media de compuestos fenólicos en vinos tintos.

Familia fenólica	Concentración (mg/L)
Ácidos benzóicos	50-100
Ácidos cinámicos	50-200
Flavonoles	15
Antocianos	20-500
Flavanoles monómeros	150-200
Polifenoles Totales	1500-5000

Una vez finalizada la fase de maceración y los procesos fermentativos, los compuestos responsables del color sufren cambios progresivos durante su conservación y envejecimiento. Entre las distintas reacciones en las que están

implicados los fenoles pueden diferenciarse la oxidación, hidrólisis, el efecto del pH, decoloración por SO_2 , copigmentación, oxidación química, polimerización, precipitación, etc., las cuales conducen tanto a compuestos químicos no coloreados como a otros cuyo color es diferente al original de los antocianos. En términos generales, estos procesos se producen con mayor intensidad durante el primer año. El conjunto de estas reacciones tienen lugar simultáneamente en el seno del vino, y por tanto son competitivas entre sí. El predominio de unas frente a las demás condicionará en cada vino en particular la evolución del color, además de otros aspectos relacionados con sus características organolépticas.

Como ya se ha mencionado, en los vinos tintos, las reacciones de copigmentación consisten en asociaciones entre los antocianos originales de la uva entre sí, o con una gran variedad de componentes incoloros del vino, fundamentalmente otros compuestos fenólicos. Se ha descrito que intensificación de color debido a este fenómeno justifica entre el 30-50% del color total de los vinos tintos, principalmente en vinos jóvenes (Boulton, 2001). Durante las primeras etapas de la vinificación, los complejos de copigmentación se transforman gradualmente en pigmentos más complejos y estables. Así, con el paso del tiempo, el color debido a la copigmentación y a la presencia de antocianinas libres disminuye, y la contribución de los pigmentos poliméricos aumenta (Hermosín-Gutiérrez et al., 2005). Esta transformación química permite la evolución y la estabilización del color del vino, que cambia desde los característicos tonos rojos-azulados de vinos jóvenes hacia tonos rojo-anaranjados y de menor intensidad propios de vinos envejecidos (Figura 31).



Figura 31. Evolución del color del vino tinto debido a la copigmentación

Por tanto, en enología, la evaluación del fenómeno de copigmentación es de crucial importancia para poder entender la relación entre la composición de la uva y el color de los vinos jóvenes, así como significa el primer paso hacia la formación de

nuevos pigmentos más estables responsables del color de los vinos envejecidos (Boulton, 2001; Brouillard & Dangles, 1994).

Los estudios realizados en vinos han demostrado que la eficacia y la magnitud de la copigmentación y su evolución durante la vinificación puede ser muy variable de acuerdo a prácticas agronómicas o enológicas (Boulton, 2001; Hermosín-Gutiérrez et al., 2003; 2005; Darías-Martín et al., 2007; Guadalupe & Ayestarán, 2008). Debido a la complejidad y la diversidad de interacciones que tienen lugar entre los antocianos y el resto de los constituyentes en el seno del vino tinto, se han llevado a cabo numerosos estudios en disoluciones modelo con el objetivo de describir los mecanismos que explican los distintos tipos de interacciones, caracterizar química y cromáticamente los productos resultantes de éstas y determinar cuáles son los factores enológicos que tienen una mayor influencia (Mirabel et al., 1999; Escribano-Bailón et al., 1996; 2001; Berké & De Freitas, 2007; Oliveira et al., 2007; Sun et al., 2007; Cruz et al., 2008; González-Manzano et al., 2008; Nave et al., 2010).

Entre los distintos compuestos fenólicos del vino, los flavonoles y sus ácidos hidroxicinámicos parecen ser los compuestos con una mayor capacidad para actuar como copigmentos, debido a sus núcleos polifenólicos planos que facilitan el acoplamiento con la estructura también plana de los antocianos (Baranac et al., 1996; Baranac et al., 1997). Sobre el efecto colorimétrico de la copigmentación antociano-flavonol, se ha descrito un incremento en la absorptividad entre el 44 y el 55% además de producir un desplazamiento significativo de la $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción, para los complejos formados a partir de miricitina y quercetina (Gómez-Míguez et al., 2006).

En los últimos años, se ha producido un avance importante en el conocimiento del fenómeno de copigmentación como resultado de diversos estudios sobre la influencia que ejercen otros componentes del vino, especialmente compuestos no fenólicos. En ese sentido, algunas macromoléculas tales como polisacáridos, péptidos, azúcares, ácido tartárico o metales iónicos, han sido particularmente sometidos a estudio debido a que su concentración es elevada en algunos tipos de vinos, y por tanto podrían interferir significativamente en las reacciones de copigmentación, ejerciendo un efecto aditivo, sinérgico o supresivo (Riou et al., 2002; Mazzaracchio et al., 2004; Guadalupe et al., 2007; Sun et al., 2008; Bindon et al., 2010).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios de copigmentación que se han llevado a cabo en disoluciones modelo se basan en ensayos individuales pigmento/copigmento, y con una relación molar mucho mayor de

las que realmente se encuentran en los vinos, lo cual dificulta la extrapolación de resultados. Por ello, son necesarios estudios de copigmentación que reproduzcan con una mayor exactitud las situaciones reales en que estos compuestos se encuentran y se relacionan en el seno del vino tinto para seguir avanzando en el conocimiento del fenómeno que determina la estabilización del color del vino.

Junto con la copigmentación, la polimerización es uno de los procesos predominantes en la fase de conservación del vino. Los flavonoles monómeros y sus polímeros, los taninos condensados o procianidinas, presentan una clara tendencia a polimerizar entre ellos o con los antocianos, de forma directa (formando los aductos condensados A^+-T o $T-A^+$), o bien con mediación de etanal.

La velocidad de las reacciones de adición entre los antocianos y los flavanoles, tanto en ausencia como en presencia de etanal, aumenta con el grado de polimerización de estos últimos (Dallas et al., 1996a), de tal forma que los productos de adición coloreados formados en los vinos deben presentar masas moleculares elevadas. Mientras que el color de las combinaciones antocianos-taninos es rojo-anaranjado, más intenso y menos sensible al efecto del pH y del SO_2 que el de los antocianos libres, el color de los productos generados por reacción de los antocianos con los flavanoles en presencia de etanal es rojo-violeta (Timberlake & Bridle, 1976; Dallas et al., 1996b). Este fenómeno ha sido interpretado como un efecto de copigmentación intermolecular (Escribano-Bailon et al., 1996).

La polimerización dará lugar a moléculas cada vez más grandes, lo que se traducirá inicialmente en una disminución del sabor amargo y en un incremento de tonos pardos del vino. No obstante, si se alcanza cierto grado de polimerización, las moléculas se vuelven insolubles y tienden a precipitar. Por ello, en fases avanzadas de la vinificación, y especialmente en vinos sometidos a crianza, parte de la materia colorante del vino se pierde de manera natural por la precipitación de compuestos coloreados de elevado peso molecular.

3.4. Técnica de vinificación

El incremento en la demanda del mercado de vinos de calidad supone una modificación de los sistemas tradicionales de vinificación, para poder obtener vinos tintos jóvenes con características particulares y con un contenido elevado en polifenoles que puedan soportar las condiciones de un proceso de envejecimiento. La

técnica de vinificación condiciona la extracción de los fenoles de las diferentes partes de la uva y por tanto las reacciones posteriores entre estos compuestos (Sacchi et al., 2005; Soto-Vázquez et al., 2010; González-Neves et al., 2010). Pueden utilizarse diferentes técnicas para conseguir este objetivo.

El tiempo de maceración es, sin lugar a dudas, fundamental para conseguir un grado de extracción adecuado. Si lo que se desea es elaborar vinos jóvenes, la maceración deberá ser relativamente corta. De este modo se consigue una correcta extracción del color (alto contenido en antocianos) y de los aromas afrutados, y se evita obtener vinos muy tánicos (Zamora, 2003). Por el contrario, la prolongación del tiempo de maceración se aplica habitualmente para obtener vinos con más cuerpo y una estructura química más compleja que permita someter a éste a un proceso de envejecimiento sin perder calidad, ya que con esta práctica se espera incrementar la extracción de fenoles (antocianos, flavanoles, flavonoles, taninos, etc.). Diversos autores han confirmado que mayores tiempos de maceración dan lugar a vinos con un contenido fenólico total más elevado que aquellos sometidos a un menor tiempo de maceración (Auw et al. 1996; Kudo & Sodeyama 2002; Gómez-Plaza et al., 2006). Sin embargo, se comprobó que las maceraciones intensas (superiores a 10 días) favorecían particularmente mayores concentraciones de determinados fenoles, como los flavanoles, ácidos fenólicos y pigmentos poliméricos.

Los tratamientos que causan la destrucción de las células epidérmicas (SO_2 , alcohol, temperatura) favorecen la extracción (Bakker et al., 1998; Sacchi et al., 2005). Sin embargo, temperaturas muy elevadas (superior a 35 °C) y/o concentraciones excesivas de SO_2 , pueden provocar una disminución de antocianos, tanto por decoloración, por adsorción de estos compuestos por microorganismos, como por reacciones de degradación y condensación con taninos.

La maceración del mosto con los hollejos a temperatura controlada, tanto a altas como bajas temperaturas, se ha estudiado por su efecto en el color, en la cantidad de fenoles del vino y en la capacidad aromática de éstos (Koyama et al., 2007). Con frecuencia, se han usado temperaturas de fermentación elevadas en el caso de variedades para las que la extracción de color es problemática (tal es el caso de Pinot Noir), viéndose que fermentaciones superiores a 30 °C conducían a vinos con un mayor contenido en compuestos fenólicos que fermentaciones de entre 10-15 °C (Girard et al. 1997; 2001). Se han realizado ensayos similares con uvas Syrah, de mayor potencial fenólico, poniéndose de manifiesto, igualmente, un aumento en la extracción de color y taninos (Reynolds et al., 2001).

Además, como ya se ha comentado, en los últimos años también se está investigando la aplicación de bajas temperaturas de maceración prefermentativa en la elaboración de vinos, teniendo en la mayoría de los casos una influencia significativa positiva sobre la calidad colorimétrica y aromática de éstos (Gómez-Plaza et al., 2000; Salinas et al., 2003; Parenti et al., 2004; Zinnai et al., 2006; Gómez-Míguez et al., 2007; Koyama et al., 2007; Gil-Muñoz et al., 2009; De Santis y Frangipane, 2010; Busse-Valverde et al., 2010; 2011).

Entre las prácticas enológicas orientadas a la elaboración de vinos destinados a envejecimiento, se ha confirmado que la adición prefermentativa o postfermentativa de enzimas y taninos (compuestos puros o extractos de semillas) durante la vinificación da lugar a vinos con un mayor contenido en pigmentos poliméricos (Kovac et al., 1992; Kovac et al., 1995; Schwarz et al., 2005; Alvarez et al., 2009; Soto-Vázquez et al., 2010).

3.5. Proceso de envejecimiento

Mediante el proceso de crianza, tradicionalmente realizado en barrica de roble, se somete a los vinos a un lento y progresivo proceso de microoxigenación que, en términos generales, favorece las reacciones de polimerización así como la estabilidad cromática, la clarificación espontánea y proporciona una mejor estructura del vino (Cano-López et al., 2010). Según Nevares & Del Álamo (2008) el flujo medio de difusión de oxígeno a través de barricas nuevas de roble francés se encuentra entre 1.66 y 2.55 mL/L·mes, y es algo inferior en las de roble americano. No obstante, diversos autores han confirmado que las condiciones particulares en que se lleva a cabo el proceso de envejecimiento determinan diferencias significativas en la calidad final de vino. Así, se han encontrado diferencias en la composición y el color de vinos envejecidos en barricas de madera de diferentes orígenes geográficos y/o especies de roble, así como con diferentes grados de tostado, o sometidos a distintos periodos de envejecimiento (Fernández de Simón et al., 2003; Pérez-Prieto et al., 2002, 2003; Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2010; Ortega-Heras et al., 2010).

Además, la industria vitivinícola ha evolucionado progresivamente hacia un mejor conocimiento de los fenómenos implicados en el envejecimiento tradicional de los vinos. Debido a que el proceso de envejecimiento en barrica requiere periodos de tiempo prolongados y un coste económico adicional para las bodegas, recientemente han surgido diferentes procedimientos alternativos que se aplican con éxito para

conseguir una crianza acelerada y vinos con características similares en un menor tiempo. Entre estos procedimientos se encuentra la aplicación de *microoxigenación controlada* o el uso de *chips* para la crianza del vino, fundamentalmente en depósito (Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2010; Gómez-Plaza & Cano-López, 2011).

La microoxigenación controlada (Boulet & Moutounet, 2003) consiste en simular el proceso natural de oxigenación que sufre el vino al envejecer en barrica, aplicando un tratamiento de cantidades pequeñas y controladas de oxígeno durante periodos más o menos cortos de tiempo. Mientras que el proceso de envejecimiento en barrica requiere por lo general periodos de tiempo superiores a 6 meses, la microoxigenación suele aplicarse fundamentalmente en el depósito y durante un periodo de tiempo que no suele ser superior a los 4 meses (Cano-López et al., 2010).

La formación de microburbujas de oxígeno en el seno del vino se consigue mediante la inyección de oxígeno gaseoso, que en la mayoría de los casos se aplica con un equipo industrial de microoxigenación constituido por un dispensador de oxígeno, un sistema de dosificación y un microdifusor (Figura 32). Recientemente, entre los procedimientos tecnológicos desarrollados con el fin de mejorar la precisión de la técnica se encuentran la aplicación de microoxigenación mediante el uso de membranas y/o tanques permeables, así como la microoxigenación electroquímica.

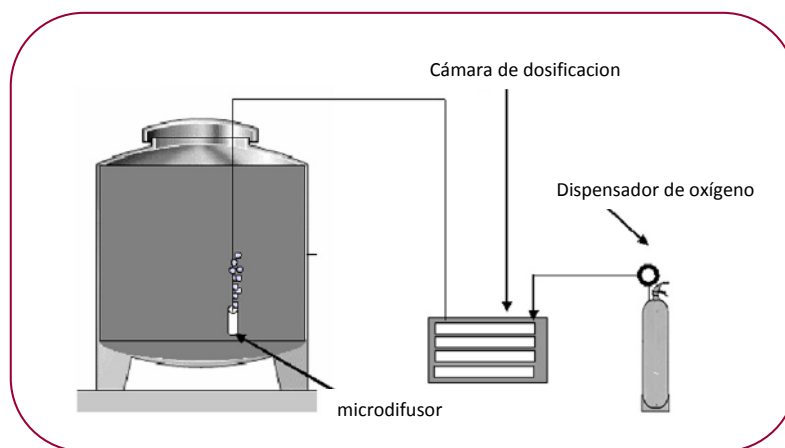


Figura 32. Representación esquemática de un sistema de microoxigenación (Adaptado de Gómez-Plaza y Cano-Lopez, 2011)

Con respecto a la dosis de oxígeno suministrada, en términos generales se aplican flujos de 10-30 mL/L-mes previa a la fermentación maloláctica, y 1-5 mL/L-mes posterior a ésta, durante un periodo de uno a cuatro meses. No obstante, la dosis óptima de oxígeno depende fundamentalmente del contenido total de fenoles del

vino, así como de la relación antocianos/taninos, lo cual es variable según factores agronómicos, varietales, o enológicos.

Aunque en la mayoría de los casos se ha confirmado que la aplicación de la microoxigenación produce una mejora de la estructura del vino, además de favorecer el proceso de polimerización y una mayor intensidad y estabilidad cromática, así como una ligera reducción de aromas indeseables (Parish et al., 2000; Cano-López et al., 2006; 2010; Nguyen et al., 2010; Cejudo-Bastante et al., 2011a; 2011b), también es importante tener en cuenta que una microoxigenación prolongada puede dar lugar a una excesiva polimerización, pérdida de color, desarrollo de aromas de oxidación, o de microorganismos aeróbicos indeseables como las bacterias acéticas (Gómez-Plaza & Cano-López, 2011).

Otra de las prácticas enológicas alternativas al envejecimiento en barrica, recientemente aprobada por la UE (CE nº 1507/2006), es la crianza acelerada del vino mediante la adición de trozos de madera (*chips*). Con ésta práctica, al estar la madera sumergida en el seno del vino, la superficie de contacto con éste es mayor, por lo que se consigue una extracción de compuestos mas intensa en un menor tiempo. Así, se pretende mejorar la estructura del vino, favorecer las combinaciones entre los antocianos y otros fenoles, incrementar la estabilidad cromática, así como los aromas típicos de la madera (derivados de compuestos como la vainillina, lactonas, etc.), sin necesidad de someterlo a un periodo prolongado de envejecimiento.

Aunque el proceso se lleva a cabo fundamentalmente en depósito, también puede aplicarse en barricas usadas que han perdido la capacidad de ceder compuestos fenólicos y aromáticos al vino.

Entre los distintos factores que influyen en la calidad del vino obtenido al aplicar esta práctica enológica se encuentran el origen de la madera (roble francés, americano, húngaro, etc.), el tamaño de la madera (pulverizada, en virutas, en forma de cubo, astillas, granulados, duelas, etc.), el grado de tostado (sin tostar, tostado ligero, medio, etc.), la cantidad de chips añadida (entre 5 y 15 g/L de vino) o el tiempo de crianza (entre 1 y 4 meses). En la Figura 33 se muestran algunos de los distintos tipos de chips comerciales que se encuentran actualmente en el mercado.



Figura 33. Distintos tipos de chips para la crianza del vino

Además, teniendo en cuenta que lo que se pretende es reproducir los procesos que ocurren naturalmente durante el envejecimiento en barrica, cada vez es más frecuente aplicar simultáneamente a la crianza con chips, la microoxigenación controlada (Perez-Magariño et al., 2009).

Según diversos autores, los vinos sometidos a crianza con chips desarrollan un mayor grado de polimerización en menor tiempo y poseen una mayor intensidad cromática y astringencia que los que son envejecidos en barrica, sin embargo, también experimentan una mayor pérdida de pigmentos, por lo que éstos últimos presentan una mejor estructura y cuerpo (Del Álamo et al., 2004; 2008; Del Álamo & Nevares, 2006).

4. ANÁLISIS DEL COLOR

Entre las características que definen la calidad de los vinos, el color es el primer atributo apreciado en la evaluación sensorial o cata. El color proporciona información de la estructura química del vino, la edad y su estado de evolución en el tiempo, y además es el reflejo de posibles alteraciones que el consumidor detecta en primer lugar, influyendo significativamente en la aceptación o rechazo del producto por parte de éste; de ahí la importancia de su estudio (Martínez et al., 2001).

En la industria alimentaria, para evaluar la calidad del color de los alimentos de una manera sistemática es necesario conocer la concentración y el perfil de los pigmentos que los componen, así como medir objetivamente su color. El contenido y variabilidad de los pigmentos tienen la responsabilidad directa del color observado, mientras que los parámetros colorimétricos definen el aspecto visual del producto (McDougall, 2002). En ese sentido, el desarrollo de métodos analíticos que sean objetivos, simples, rápidos y de fácil acceso es decisivo, ya que permite la definición, diferenciación y clasificación de productos, y además establecer controles de calidad y trazabilidad, prevención de fraudes, etc. (Mignani et al., 2003; 2005; 2011a; 2011b; González-Miret et al., 2007a; Ciaccheri & Mignani, 2008; Escudero-Gilete et al., 2009; Fernández-Vázquez et al., 2010; Gordillo et al., 2011). Particularmente en el campo de la enología, ha permitido definir índices o parámetros que considerados de manera conjunta evalúan el contenido de los pigmentos y la calidad del color.

Además, la aplicación de diferentes técnicas estadísticas al conjunto de las características químicas y colorimétricas de un alimento permite estudiar con mayor profundidad las relaciones color-composición, se pueden establecer diferencias y/o clasificaciones del alimento en función de distintos factores que afectan a su calidad, o predecir el comportamiento colorimétrico a partir de su composición química (González-Miret et al., 2005; Hernanz et al., 2008).

4.1. Identificación y cuantificación de los fenoles del vino tinto

Con el objetivo de identificar y cuantificar los compuestos fenólicos responsables del color del vino, se han desarrollado diferentes tipos de métodos entre los que destacan los espectrofotométricos y los cromatográficos. Cada uno de ellos presenta ventajas e inconvenientes, por ello, la utilidad de su aplicación dependerá de los objetivos planteados en cada estudio en particular (Versari et al., 2008).

La espectrofotometría UV-Vis permite estimar cuantitativamente distintos grupos de fenoles que poseen en su estructura molecular características químicas comunes; sin embargo, no permite la cuantificación individual de los compuestos. Por el contrario, el desarrollo de la cromatografía ha proporcionado las claves para la separación, identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos a nivel individual.

4.1.1. Métodos espectrofotométricos

Los métodos espectrofotométricos, a partir de medidas simples y rápidas de absorbancia en una o varias longitudes de onda, han demostrado ser muy útiles para la estimación del contenido de distintos grupos de polifenoles en el vino, como por ejemplo los fenoles totales, fenoles no flavonoides, proantocianidinas, taninos condensados, flavanoles totales, antocianos totales, pigmentos poliméricos totales, antocianinas ionizadas etc.; así como también conocer la contribución relativa de antocianos libres, antocianos copigmentados y pigmentos poliméricos al color total del vino (Folin-Ciocalteu, 1927; Kramling & Singleton, 1969; Ribereau-Gayon & Stonestreet, 1965; Peri & Pompei, 1971; Somers & Evans, 1977; Di Stefano et al., 1989; Vivas, 1994; Boulton, 1996; Giusti & Worlsted, 2001; Harbertson et al., 2002; 2003; Wrolsted et al., 2005).

Entre los numerosos métodos espectrofotométricos propuestos por distintos autores, en este capítulo se describe en profundidad el fundamento de aquellos aplicados en este estudio: determinación de fenoles totales según Folin-Ciocalteu (1927), índices antociánicos y pigmentos poliméricos según Somers & Evans (1977), y la contribución relativa de antocianos libres y copigmentados al color total del vino según Boulton (1996).

La determinación del contenido en fenoles totales según el método de *Folin-Ciocalteu* es un procedimiento generalmente utilizado en material vegetal y, en particular, presenta un gran interés en enología debido al papel fundamental de estas sustancias en las características organolépticas y en la estabilidad de los vinos. El método tuvo su origen en un artículo publicado por Folin & Denis (1912), y en su modificación posterior por Folin & Ciocalteu (1927) es utilizado en la actualidad (Amerine & Ough, 1980; AOAC, 1990). La reacción se basa en la reducción de los fenoles totales que se encuentran en mostos y vinos por una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, lo que conduce a una mezcla de óxido de tungsteno (W_8O_{23}) y de óxido de molibdeno (Mo_8O_{23}), de color azul, tal y como se muestra en la

Figura 34. Esta coloración ofrece un espectro de absorción con $\lambda_{\text{máx}}$ a 765 nm, proporcional al contenido de compuestos fenólicos presentes en la muestra, que se expresa en mg/L de ácido gálico.

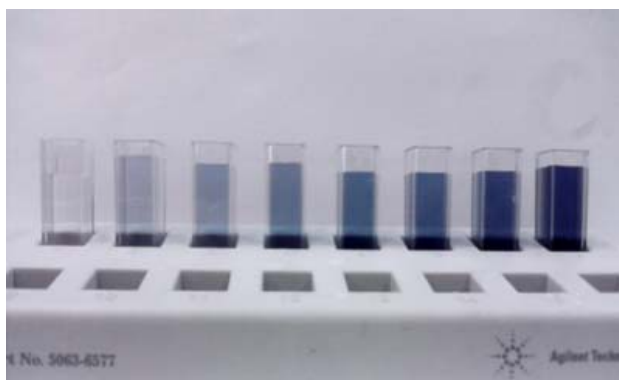


Figura 34. Determinación de fenoles totales en vino por el método Folin-Ciocalteu.

Entre las particularidades del método que hay que considerar en la interpretación de los resultados destacan que el reactivo de Folin-Ciocalteu no es totalmente específico y, por tanto, reacciona con todos los grupos fenólicos encontrados en la muestra, incluyendo los de las proteínas, además de la posible interferencia de otras sustancias reductoras tales como el ácido ascórbico.

El color global del vino tinto se debe a la contribución relativa de dos tipos de pigmentos: antocianos monoméricos (en estado libre y copigmentados) y pigmentos poliméricos. Debido a que estos pigmentos coexisten simultáneamente en el seno del vino, no es posible una determinación espectrofotométrica directa de cada fracción. Sin embargo, debido a que cada compuesto presenta cualidades fisicoquímicas particulares, pueden llegar a cuantificarse tras someter la muestra de vino a distintos tratamientos, como puede ser la variación del pH, el efecto de la adición de SO_2 o de acetaldehído, o tras diluirlos en una disolución determinada.

Así, el método de los *índices antociánicos* propuesto por Somers y Evans (1977) determina diversas fracciones polifenólicas en el mosto y/o vino, así como algunas características físicoquímicas ligadas al color. El fundamento del método se basa en someter al vino a determinados tratamientos, según las siguientes premisas:

1) Al pH del vino, la mayor parte del anhídrido sulfuroso libre se encuentra bajo la forma de anión bisulfito, que reacciona con los antocianos libres dando lugar a compuestos combinados incoloros. Sin embargo, se sabe que el acetaldehído presenta una mayor afinidad por el SO_2 que las antocianinas del vino. Por ello, se asume que la adición de un exceso de acetaldehído a la muestra, produce una reactivación de la

absorbancia del vino a 520 nm porque las antocianinas unidas al SO₂ han quedado liberadas.

2) A pH ácido, el equilibrio antociánico se encuentra desplazado en su totalidad hacia la forma coloreada catión flavilio. Por tanto, se asume que la dilución de la muestra de vino en una disolución ácida hasta bajar el pH por debajo de 1 unidad provocará un incremento de la densidad óptica del vino.

3) Al pH del vino, los antocianos en estado libre se decoloran instantáneamente en presencia de SO₂. Por tanto, se asume que la adición de un exceso de SO₂ a la muestra de vino produce una decoloración de la totalidad los compuestos antociánicos en estado libre, mientras que el color residual es debido a los pigmentos poliméricos, que son más estables y no se ven afectados por este aditivo.

A partir de medidas simples de absorbancia a 280, 420 y 520 nm se obtienen índices sobre la situación de los compuestos antociánicos en el vino, basados en medidas espectrales (U.A.: unidades de absorbancia): Intensidad Colorante (al pH del vino, U.A.), Color del Vino Ácido (U.A.), Color de Pigmentos Poliméricos (U.A.), Color Antociánico (U.A.), Color Antociánico Ácido (U.A.), Antocianinas No Coloreadas (U.A.), Anhídrido Sulfuroso Libre (mg/L), Fenoles Totales (U.A.), Antocianinas Totales (mg/L), Grado de Ionización de Antocianinas (α), Grado de Ionización de Antocianinas sin efecto del SO₂ (α'), Antocianinas Ionizadas (mg/L), e Índices de Edad Química.

A pesar de la utilidad de éstos índices, el método de Somers y Evans presenta algunas limitaciones. En general, se asume que la estimación del color debido a pigmentos poliméricos está ligeramente sobrevalorada con respecto a la calculada según métodos cromatográficos (Versari et al., 2008), debido a que la adición de SO₂ en exceso no decolora únicamente a los antocianos monoméricos en forma libre, sino también a algunos pigmentos poliméricos (Harbertson et al., 2003).

La contribución de la copigmentación al color del vino se viene investigando desde hace algún tiempo por Boulton (Boulton, 1996). Se ha desarrollado un método espectrofotométrico que supone un avance con respecto al método propuesto por Somers y Evans pues, además de evaluar los antocianos libres y los pigmentos poliméricos, determina el contenido en antocianos copigmentados. Esta metodología añade un nuevo punto de vista al conocimiento de la química del color de los vinos tintos (Darias-Martín et al., 2007).

Según el *método de Boulton (1996)*, la magnitud de la copigmentación en vinos tintos se estima a partir de los cambios específicos producidos en la $\lambda_{\text{máx}}$ (520 nm) después de diluir la muestra de vino 20 veces con vino sintético, a la que previamente se fija el pH a 3.6 u., para evitar variaciones en el equilibrio antociánico y poder así comparar diferentes vinos entre sí. Debido a que los complejos de copigmentación se forman mediante enlaces no covalentes, se asume que la dilución aplicada es suficiente para provocar la disociación de éstos y por tanto eliminar completamente los efectos producidos por la copigmentación en el color de vinos tintos jóvenes, mientras que el color de los antocianos libres y pigmentos poliméricos permanece.

A partir de este método se ha observado que la eliminación del fenómeno de copigmentación produce una pérdida de absorbancia del espectro del vino una vez reconstituido, así como frecuentemente un ligero desplazamiento hipsocrómico de la longitud de onda de máxima absorbancia. Este efecto es descrito como una desviación de la ley de Lambert-Beer (o comportamiento no lineal del color en vinos tintos) ya que la aplicación del factor de dilución sobre el espectro del vino diluido no produce la recuperación total de la absorbancia del vino de partida (Figura 35). De esta manera, se demuestra que una fracción del color total de un vino tinto no es debida únicamente a la concentración antociánica que posee.

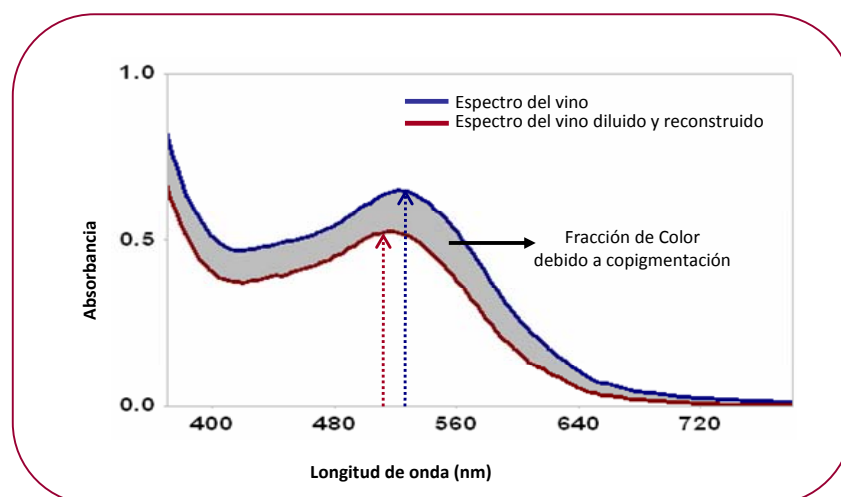


Figura 35. Espectro de absorción de un vino tinto, antes y después de ser diluido, según el método de Boulton (1996).

Además, el método de Boulton, al estar basado en las premisas de Somers y Evans, permite estimar la contribución relativa de antocianos libres, copigmentados y pigmentos poliméricos al color total del vino, a partir de las medidas de absorbancia a 520 nm tras someter a éste a los distintos tratamientos (adición de acetaldehído, SO_2 , y dilución con vino sintético). Versari & colaboradores (2008) confirmaron una buena

correlación entre los índices de Boulton y estos mismos parámetros analizados por técnicas cromatográficas.

4.1.2. Métodos cromatográficos

Entre las distintas técnicas cromatográficas, la *cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)* es ampliamente utilizada para la separación y cuantificación de los compuestos fenólicos. Tras la separación, la detección e identificación estructural de éstos se consigue mediante la combinación de HPLC con el uso de *fotodiodos UV-Vis*, detección electroquímica (DE) o más recientemente, con la *espectrometría de masas* (Merken & Beecher, 2000; Flamini, 2003; Kozminski & Brett, 2006). Además, la identificación también se puede realizar con otras técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) (Mateus et al., 2004; Salas et al., 2004; Oliveira et al., 2007).

Actualmente, las técnicas HPLC son las más utilizadas para la separación y cuantificación de compuestos fenólicos. Existen columnas con diferentes fases estacionarias (especialmente de fase reversa) que, combinadas con distintas fases móviles, permiten el análisis de antocianos, procianidinas, flavononas y flavonoles, flavan-3-oles, flavonas y ácidos fenólicos (Figura 36). Los detectores más utilizados son los de matriz de diodos UV-Vis y fluorescencia.

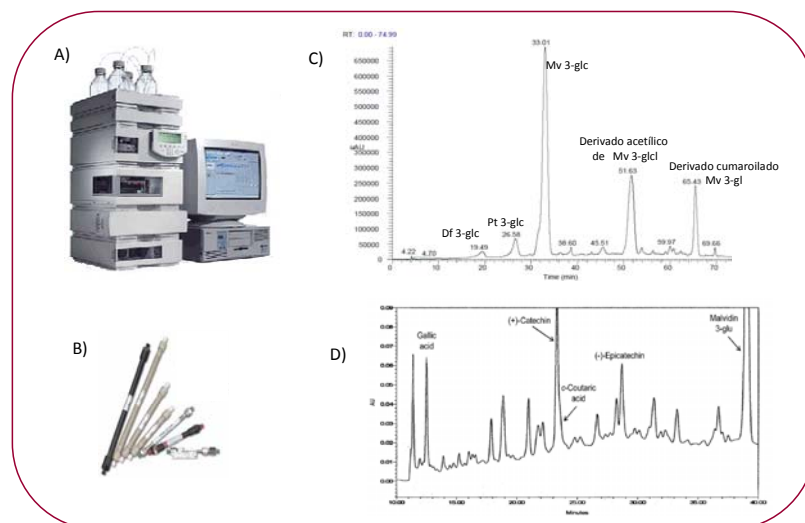


Figura 36. A) Cromatógrafo de líquido de alta resolución (HPLC), B) Columnas de separación cromatográfica, C) Cromatogramas de pigmentos antocianicos, D) Cromatograma de flavanoles monómeros.

La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (tándem HPLC-MS) (Figura 37) es la técnica más utilizada para la caracterización estructural de compuestos fenólicos. El espectrómetro de masas permite analizar con gran precisión y sensibilidad la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa/carga (m/z). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. En la identificación de compuestos por espectrometría de masas se pueden diferenciar las siguientes etapas: 1) generación de moléculas, y fragmentos moleculares y/o átomos, en fase gaseosa, 2) ionización de éstos, 3) separación de iones en función de su carga/masa (m/z), 4) detección de iones, 5) almacenamiento y procesamiento de espectros de masas.

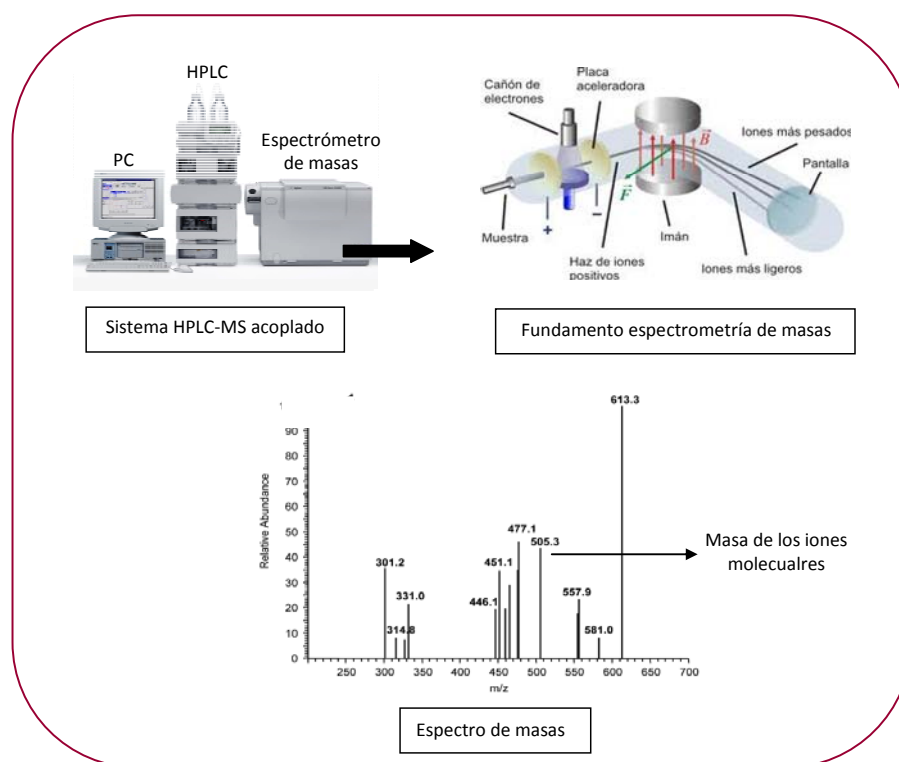


Figura 37. Sistema de HPLC acoplado a un espectrómetro de masas.

La espectrometría de masas ha sido usada para la confirmación estructural de compuestos fenólicos en uvas y vinos, y especialmente la de pigmentos antocianícos derivados, que debido a la complejidad de sus estructuras y a que se encuentran en cantidades muy pequeñas, requieren de técnicas más sensibles para una correcta identificación (Revilla et al., 1999; Hayasaka & Asenstorferm, 2002; Mateus et al., 2002a; 2002b; Schwarz et al., 2003; De Villiers et al., 2004; Alcalde-Eón, 2006a; 2006b;

2007; Sun et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Cruz et al., 2008; Chinnici et al., 2009; Huang et al., 2009; Nave et al., 2010; García-Marino et al., 2010; Rentzsch et al., 2010)

4.2. Medida del color

El *color* se define como la respuesta mental al estímulo que una radiación luminosa visible (360-760 nm) produce en la retina y que el nervio óptico transmite al cerebro. Se considera como un concepto psicofísico, relacionado al mismo tiempo con la psicología del observador, la fisiología de la visión y con la energía radiante espectral de una fuente luminosa.

La luz que incide en la retina (estímulo cromático) desencadena una serie de procesos químicos y eléctricos que se traducen en impulsos nerviosos transmitidos a través del nervio óptico hacia el cerebro, donde se interpreta la señal recibida y, finalmente, se produce la sensación de color. Por tanto, el color no es una característica intrínseca de los objetos que reflejan o transmiten la radiación luminosa, pues basta con cambiar la fuente para modificar el estímulo producido: es una propiedad de la luz. Además, debido a que el proceso por el cual se genera la sensación de color depende del sistema ocular y de la interpretación realizada por el cerebro en cada observador, la percepción visual del color es una sensación subjetiva.

En la retina, tejido sensible a la luz situado en la superficie interior del ojo, las células fotorreceptoras son los conos y los bastones. Mientras que los conos son poco sensibles a la intensidad de la luz y proporcionan la visión fotocópica (visión a niveles elevados), los bastones son muy sensibles a ésta, siendo capaces de detectar la energía de un sólo fotón, y por tanto hacen posible la visión en condiciones de poca luminosidad (visión escotópica), como por ejemplo la visión nocturna. Por el contrario, bajo condiciones de luminosidad elevada se saturan y por tanto no son sensibles al estímulo cromático. Esta diferente sensibilidad a la intensidad luminosa determina que los conos sean directamente las células responsables de la visión del color, mientras que los bastones no lo detectan sino que aportan a la visión de éste aspectos como el brillo y el tono.

En la especie humana, en la retina existen tres tipos diferentes de conos, cada uno de ellos sensible de forma selectiva a la luz de una longitud de onda determinada: roja ($\lambda \sim 650$ nm), verde ($\lambda \sim 530$ nm), y azul ($\lambda \sim 430$ nm). A partir de la información individual que los tres tipos de conos envían simultáneamente al cerebro cuando son

estimulados por un estímulo cromático, éste es capaz de interpretar todos los colores, lo cual confiere a la percepción del color su carácter tridimensional. Esta consideración tridimensional es el fundamento de la Teoría Tricromática del color, cuyo desarrollo se recoge en el Apéndice I.

La *Colorimetría Triestímulo* es la rama de la ciencia que estudia la especificación numérica del color de un estímulo visual. Las leyes que rigen la generalización tricromática se pueden expresar de forma geométrica, considerando un espacio vectorial de tres dimensiones denominado *Espacio Triestímulo*, en el que cada estímulo de color (Q) viene representado por un vector, expresión de las cantidades proporcionales de cada uno de los estímulos primarios rojo (R), verde (G) y azul (A).

De acuerdo con esto, un estímulo dado Q podría expresarse como la mezcla aditiva de determinadas cantidades de los tres estímulos primarios fijados, RGB:

$$Q = R_Q \cdot R + G_Q \cdot G + B_Q \cdot B$$

Los factores escalares R_Q , G_Q y B_Q , asignados a los estímulos primarios, se denominan valores triestímulo de Q. Esta ecuación vectorial tiene una sencilla interpretación geométrica en el espacio tridimensional mostrado en la Figura 38.

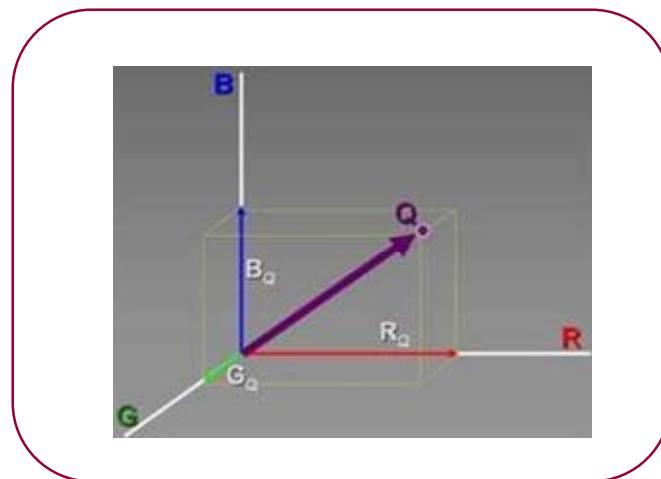


Figura 38. Representación pseudovectorial del color

Los vectores unitarios R, G, B, que representan los estímulos primarios, definen el espacio, tienen un origen común y se sitúan en tres direcciones arbitrariamente elegidas. Las tres componentes que definen el vector Q se sitúan a lo largo de los ejes definidos por R, G, B, y tienen longitudes respectivamente iguales a R_Q , G_Q y B_Q .

valores triestímulo de Q. De esta manera, en el espacio triestímulo- (R, G, B), el estímulo cromático Q se define como un vector triestímulo (R_Q, G_Q, B_Q).

Sin embargo, la dificultad en el cálculo de los valores triestímulo R, G, B según las ecuaciones colorimétricas básicas desarrolladas inicialmente (Teoría Tricromática del color), indujo a la CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) a la adopción de otro sistema tricromático, basado en unas "Especificaciones sobre observadores estándares en colorimetría" y unas "Recomendaciones sobre cuestiones relacionadas" (CIE, 1932).

Este sistema se basa en los experimentos que realizaron Guid (1931) y Wright (1928) con observadores reales, en los que establecieron las magnitudes de los primarios que igualaban los colores espectrales. Así, mediante una transformación matricial, a partir de los primarios R, G, B se definen los nuevos valores triestímulo X, Y, Z. Se trata de estímulos imaginarios y no igualables con los espectros visibles, pero que aseguran que las coordenadas de cromaticidad x, y, z no adopten valores negativos, cuyo significado físico podría resultar confuso en su aplicación a la medida del color de materiales coloreados. Asimismo, se definen las "funciones de igualación de color" como las propiedades del Observador Estándar CIE-1931 (u Observador de 2°), en el rango de longitudes de onda de la zona visible del espectro.

Así, mediante la integración del espectro, y de acuerdo con las condiciones de referencia elegidas (iluminante y observador), se obtienen los componentes del vector o valores triestímulos (X, Y, Z), a partir de los cuales la Comisión Internacional de Iluminación posteriormente define diferentes sistemas colorimétricos (CIE, 1986): espacios de color y diagramas cromáticos asociados. En ellos es posible la caracterización de los puntos de color y su interpretación mediante el cálculo de parámetros psicofísicos relacionados (tono, claridad, croma o saturación). Entre los sistemas tricromáticos más utilizados se encuentran CIE 1964-(x,y) (no uniforme, conocido como CIEXYZ) y los espacios considerados uniformes CIE 1976-($L^*u^*v^*$) (CIELUV) y CIE 1976-($L^*a^*b^*$) (CIELAB).

Por tanto, a partir del desarrollo de la Teoría Tricromática del color, cualquier estímulo cromático que llega a la retina está compuesto por tres sensaciones o atributos bien diferenciados: tono, luminosidad y pureza, y definen a su vez, cualquier color.

4.2.1. Aplicación de la Colorimetría Triestímulo al análisis del color del vino: Espacio de color CIELAB.

En 1976 la CIE recomienda internacionalmente el sistema de especificación del color CIE 1976-(L*a*b*) (CIELAB), como el más apropiado para la especificación del color en la industria alimentaria, debido a su uniformidad, precisión y exactitud. En el espacio CIELAB se definen unas magnitudes colorimétricas, que se derivan matemáticamente de los valores triestímulo, y pueden considerarse una respuesta de los observadores patrones a un estímulo luminoso. Tratando de imitar a los observadores reales, estas respuestas se hacen depender del tipo de estímulo y del blanco de referencia.

El espacio de color CIELAB es un sistema coordenado cartesiano definido por tres *coordenadas rectangulares* colorimétricas L*, a*, b* magnitudes adimensionales. La coordenada L* recibe el nombre de *claridad* y puede tomar valores entre 0, correspondiente al negro, y 100, para el blanco. Las coordenadas colorimétricas a* y b* forman un plano perpendicular a la claridad. La coordenada a* define la desviación del punto acromático, correspondiente a la claridad, hacia el rojo si a* > 0, y hacia el verde si a* < 0. Análogamente la coordenada b* define la desviación hacia el amarillo si b* > 0, y hacia el azul si b* < 0, como muestra la Figura 39.

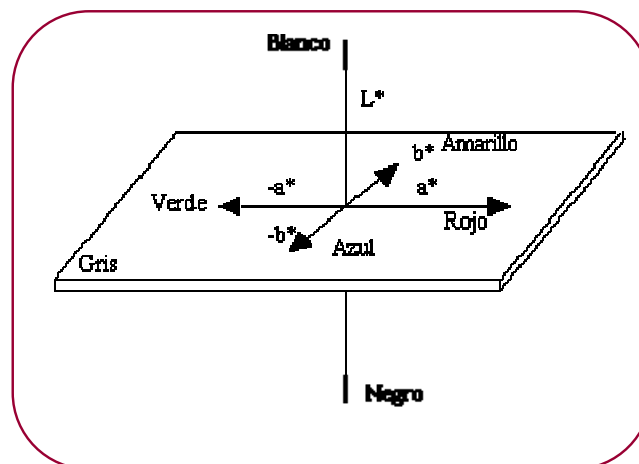


Figura 39. Coordenadas del espacio de color CIELAB

El conjunto a*, b* junto con la claridad L* definen el color de un estímulo. A partir de ellas se definen dos magnitudes colorimétricas nuevas, *croma* y *tono*, mediante las siguientes expresiones:

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$h_{ab} = \arctg(b^*/a^*)$$

El *croma*, C^*_{ab} , es el atributo de la percepción visual conforme al que un área parece saturada respecto a un determinado color o tonalidad. Tiene valor 0 para estímulos acromáticos y, por lo general, no pasa de 150 aunque puede superar ese valor para estímulos monocromáticos.

El *tono*, h_{ab} , es el color básico de un objeto (azul, amarillo, etc.) definido por su posición angular en un espacio de color cilíndrico. Los valores, por tanto, varían entre 0° y 360° , y para estímulos acromáticos ($a^*=0$, $b^*=0$) es una magnitud no definida.

Ambos términos también definen la cromaticidad del color del estímulo, y junto con la claridad determinan las *coordenadas cilíndricas* del espacio CIELAB (L^* , C_{ab} , h_{ab}) (Figura 40).

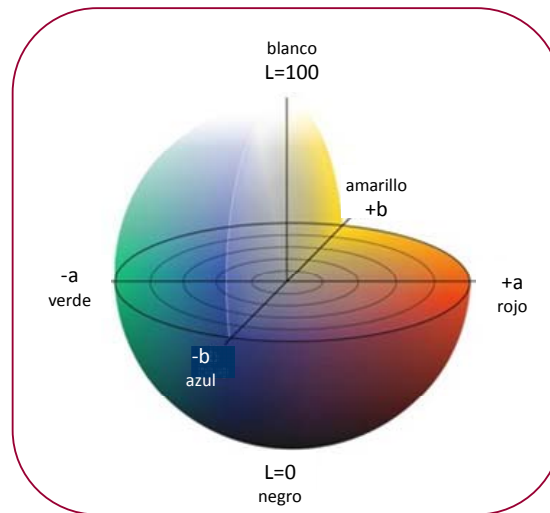


Figura 40. Espacio de color CIELAB

El espacio de color CIELAB tiene la misma configuración que el Munsell pero presenta dos ventajas importantes: 1) el cálculo de las coordenadas es mucho más simple, y 2) las unidades de las escalas entre las magnitudes CIELAB son prácticamente iguales, por lo que se considera un espacio de color uniforme.

A partir de los parámetros que permiten la definición de cualquier color (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h_{ab}), el estudio y desarrollo de la *colorimetría diferencial* ha experimentado un gran interés en la industria, especialmente en las tres últimas décadas. La diferencia cromática entre dos estímulos dentro del espacio del color CIELAB se mide como la distancia euclídea existente entre dos puntos en el espacio tridimensional, denominada *diferencia de color* y calculada según el parámetro ΔE^*_{ab} :

$$\Delta E^*_{ab} = ((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)^{1/2}$$

Así, el parámetro diferencia de color (ΔE^*_{ab}), junto con los *índices colorimétricos de claridad* (ΔL^*), *croma* (ΔC^*_{ab}), y *tono* (Δh_{ab}) han demostrado ser muy útiles en el seguimiento de los cambios de color. Por ello, las fórmulas basadas en CIELAB son las de mayor uso o interés en la actualidad desde el punto de vista industrial, y parten, más que de los valores triestímulo de las muestras, de sus correspondientes coordenadas en el sistema CIELAB, introduciendo factores de ponderación apropiados sobre las diferencias CIELAB de claridad, croma y tono (Melgosa et al., 2001). El amplio uso del sistema y de la fórmula de color CIELAB en las aplicaciones industriales, ha hecho que se constituya en punto de partida de toda una nueva generación de fórmulas de diferencia de color aplicadas a la industria.

La investigación sobre evaluación industrial de diferencias de color ha experimentado un progreso significativo en los últimos años. Se conocen muchos antecedentes sobre la aplicación de la colorimetría en diferentes campos de la industria tales como la reproducción del color en productos manufacturados y en sistemas de comunicación, o estudios sobre la degradación del color en obras de arte y alimentos, o los cambios de color que experimentan algunas frutas y hortalizas durante su maduración (Melgosa et al., 1997; Pointer & Attridge, 1997; Gay & Hirschler, 2001; Luo et al., 2001; Luo, 2002; Sanz et al., 2004; Solli, et al., 2005; Habekost, 2007; Melgosa et al., 2009; Oleari et al., 2011; Rodríguez-Pulido et al., 2012; Liu et al., 2012; Zheng et al., 2012).

Por tanto, dado que el color es un fenómeno psicológico, su medición e interpretación deben basarse en la percepción humana de éste (Mc Douglas, 2002). En ese sentido, el espacio de color CIELAB, a partir de las coordenadas rectangulares (L^* , a^* , b^*) y cilíndricas (L^* , C^*_{ab} y h_{ab}), y con su correspondiente fórmula de diferencia de color asociada (ΔE^*_{ab}), proporciona una útil representación tridimensional de los estímulos perceptuales del color. En primer lugar, las coordenadas cilíndricas representan los parámetros de color más relacionadas con los tres atributos clásicos de color percibidos visualmente (luminosidad, saturación y tono, respectivamente). En segundo lugar, el parámetro *diferencia de color* (ΔE^*_{ab}), permite medir la diferencia cromática entre dos estímulos. Además, al ser este espacio “considerado uniforme”, las diferencias calculadas se corresponden con grados de percepción visual similares.

La aplicación de la colorimetría triestímulo, particularmente en el campo de la enología, ha demostrado en numerosas ocasiones la utilidad de la evaluación del color como herramienta para el control de la calidad del vino, así como para el estudio de los numerosos factores que influyen en éste (Heredia & Guzmán, 1988; 1991; 1992;

Alamela et al., 1995; Heredia et al., 1997; Bakker et al., 1998; Ayala et al., 1999; Larrauri et al., 1999; Gómez-Plaza et al., 2000; 2002; Pérez-Magariño & González-San José, 2002; 2006; Tsanova-Savova et al., 2002; Gómez-Míguez & Heredia, 2004; García-Puentes et al., 2006; Gómez-Míguez et al., 2007a, Gómez-Míguez et al., 2007b; Gómez-Míguez et al., 2007c; González-Miret et al., 2007b; Recamales et al., 2007; Canals et al., 2008; Herranz et al., 2009; Escudero-Gilete et al., 2010; Kontoudakis et al., 2011b).

Existen algunos trabajos que han abordado el estudio del color de pigmentos antociánicos en disolución (Heredia et al., 1998; Gómez-Míguez et al., 2006; Berké y De Freitas, 2007; González-Manzano et al., 2009). Sin embargo, no existe información previa sobre la aplicación de la colorimetría diferencial al estudio del fenómeno de copigmentación. Por ello, en esta Memoria, se propone un método de evaluación integral del efecto de la copigmentación sobre el color basado en la Colorimetría Triestímulo, particularmente mediante la aplicación del espacio de color CIELAB, tanto en disoluciones modelo de copigmentación basadas en mezclas binarias, como directamente en vinos tintos.

4.2.2. Técnicas de análisis

En la industria, la medida de color en los alimentos se incluye dentro del análisis de las propiedades organolépticas, y puede hacerse mediante evaluación visual del color o evaluación instrumental (Wei et al., 2012).

Al igual que el color percibido de un estímulo no es algo absoluto, sino que depende de las circunstancias que le rodean, el resultado de la medida del color de un estímulo depende de las condiciones en las que se realiza la medida. Como el objetivo de cualquier medida es que sea única y repetible, se han definido condiciones estándar para aquellos parámetros que influyen en el resultado de la medida, como son el observador, el iluminante, la geometría de iluminación-observación, el ancho de banda o el intervalo de medida (Hutchings, 2002; Montes et al., 2004).

El *análisis visual* del color de los alimentos se encuentra incluido dentro de la cata o examen organoléptico, que consiste en la apreciación por la vista, el olfato y el gusto de las cualidades de un alimento. Su uso está muy extendido en el campo de la enología, aunque tienen carácter subjetivo y requiere del entrenamiento de los jueces para obtener resultados fiables (Martínez et al., 2001; Hernández et al., 2008) Dentro de la cata de vinos, las sensaciones visuales se refieren fundamentalmente a la

limpidez y el color, y juegan un papel importante porque pueden condicionar otras características del vino: cuerpo, edad y estado del vino. Otra forma de medir visualmente el color es usando escalas de color, atlas, diccionarios o colecciones de colores. Estas colecciones de referencia se usan en numerosas industrias (pintura, tejidos, alimentación, etc.) Entre los principales sistemas usados para el análisis visual destacan el Sistema Munsell, el Sistema Ostwald, el Sistema DIN, y el Sistema OSA-UCS.

El color es, probablemente, el único atributo sensorial del que se dispone de métodos analíticos objetivos y con la suficiente precisión como para poder sustituir la medida visual. En el *análisis instrumental del color*, el color de los objetos se expresa mediante las coordenadas de color que se obtienen a partir de los valores triestímulo (Apéndice I). Existen dos tipos de instrumentos que miden el color de un objeto: aquellos que miden directamente los valores triestímulo, llamados colorímetros, y los que miden la magnitud radiométrica o fotométrica que caracteriza a la fuente o al objeto a partir de la cual se calculan los valores triestímulo (espectrofotómetros y espectrorradiómetros).

Los *colorímetros* (Figura 41) miden el color de fuentes de radiación primarias (que emiten luz propia) y secundarias (que reflejan o transmiten luz externa), obteniendo directamente los valores triestímulo X, Y, Z de forma óptica, no matemática. El colorímetro reproduce la respuesta de sólo un observador patrón y un iluminante estándar preestablecidos.

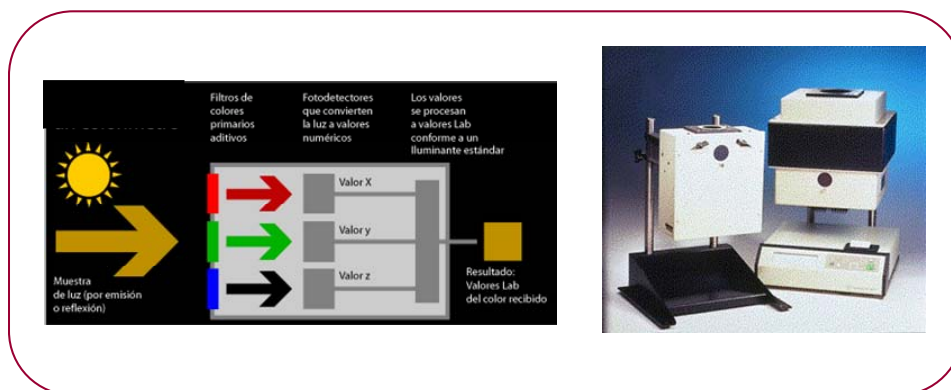


Figura 41. Fundamento de un colorímetro

Los *espectrofotómetros* (Figura 42) miden la distribución espectral, de transmitancia o reflectancia, de un objeto a partir de la cual se puede calcular el color bajo distintas condiciones. Tanto la transmitancia como la reflectancia son propiedades intrínsecas del objeto que no se modifican con la iluminación recibida ni con el observador. La medida de la transmitancia es el cociente entre la respuesta del

instrumento en presencia de muestra y cuando la muestra no está en el camino óptico. La reflectancia es el cociente entre la respuesta del instrumento a la muestra y la respuesta a un patrón conocido (normalmente blanco), multiplicado por la reflectancia intrínseca del patrón.

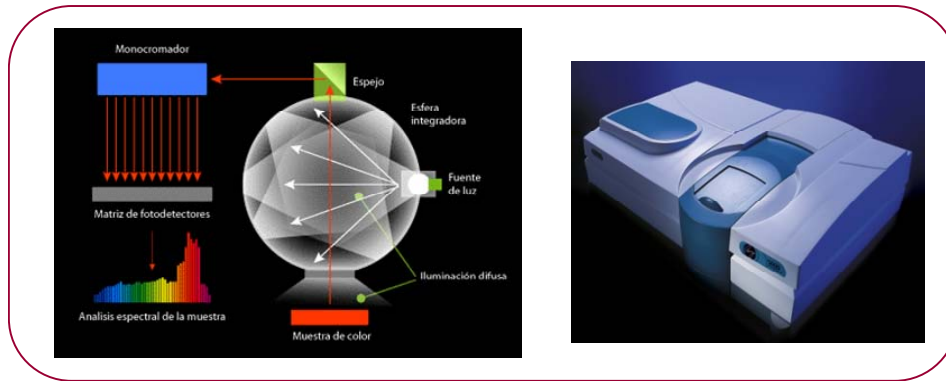


Figura 42. Esquema de un espectrofotómetro de reflectancia difusa.

Los *espectrorradiómetros* (Figura 43) tienen como objetivo obtener la medida radiométrica de la distribución espectral de una fuente de radiación (primaria o secundaria). Con un fundamento igual que el anterior, mediante las ecuaciones iniciales se calculan, matemáticamente, los valores tristímulo. El espectrorradiómetro tiene los mismos componentes que el espectrofotómetro con la excepción de la fuente de luz que, en este caso, es externa al instrumento y, por tanto, variable. Aunque no es su uso específico, se utilizan también para la medida de la transmitancia o reflectancia de una muestra, modificando la posición relativa de la fuente de iluminación.

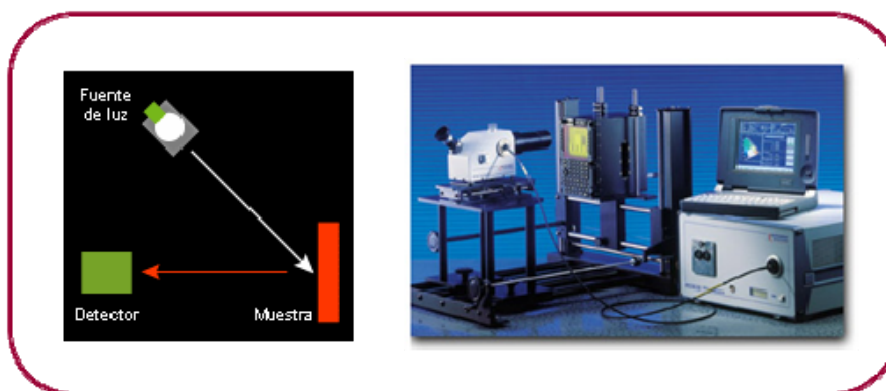


Figura 43. Esquema de un espectrorradiómetro

Objetivos



OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el conocimiento del color y la composición como determinantes de la calidad de vinos tintos elaborados en clima cálido, así como evaluar la influencia de factores agronómicos y tecnológicos.

Se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la influencia de la variedad y del grado de maduración de la uva sobre la composición fenólica, el desarrollo de los procesos de copigmentación y polimerización, y el color de vinos tintos monovarietales elaborados en clima cálido.
- Evaluar la influencia de la maceración prefermentativa a bajas temperaturas para mejorar la calidad de vinos tintos ecológicos de la variedad Tempranillo, en función del efecto en la composición fenólica, el proceso de copigmentación, y el color.
- Evaluar la influencia de la técnica de refrigeración en la maceración prefermentativa sobre el color y la composición fenólica de vinos tintos de la variedad Syrah.
- Evaluar la aptitud para el envejecimiento en barrica de vinos tintos de la variedad Syrah de la D.O. "Condado de Huelva", elaborados mediante maceración prefermentativa en frío.
- Aplicar la Colorimetría Triestímulo a la evaluación integral del efecto de la copigmentación sobre el color de los pigmentos antocianicos, tanto en disoluciones modelo como en vinos tintos jóvenes de diferentes características.

Material y Métodos



1. MUESTRAS

Los estudios llevados a cabo en esta Memoria se han centrado en ensayos de vinificación con vinos tintos monovarietales de las variedades de uva Tempranillo, Syrah y Cabernet Sauvignon, tanto jóvenes como sometidos a crianza en bodega, elaborados en clima cálido (Andalucía), correspondientes a las campañas de vendimia 2006, 2007 y 2008. La elaboración de los vinos se realizó en distintas bodegas amparadas por la D.O. "Condado de Huelva", así como en la bodega experimental del centro de investigación "Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica" (IFAPA) de Cabra (Córdoba).

A modo de resumen se indica que para llevar a cabo los estudios que se exponen en esta Memoria se han elaborado 32 vinos, analizándose un total de 804 muestras. Y, como factores que afectan a la estabilidad química y cromática de los vinos, se han tenido en cuenta la variedad de uva (Tempranillo, Syrah y Cabernet Sauvignon), el grado de maduración de la uva (12.5 °Bé y 14.0 °Bé), la técnica de maceración (maceración tradicional y maceración prefermentativa en frío), la técnica de refrigeración aplicada en la maceración prefermentativa (con nieve carbónica y mediante una cámara frigorífica de almacenamiento), y el tiempo de envejecimiento en bodega (3, 6, 9 y 12 meses).

Para los estudios realizados con disoluciones modelo de antocianos y copigmentos, se han ensayado diferentes combinaciones de compuestos fenólicos y condiciones de reacción. Como antociano se ha utilizado la malvidina 3-glucósido, y como copigmentos fenólicos, los flavanoles catequina y epicatequina, y además, el ácido cafeico. Las condiciones de reacción estudiadas fueron distintos valores de pH (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, y 5.0) y distintas ratios molar pigmento/copigmento (1:1, 1:2, 1:5, y 1:7). El número de disoluciones preparadas para el ensayo del pH fue de 45, y para el ensayo de la ratio molar, 30. Por lo tanto, se analizó un total de 72 disoluciones de copigmentación.

Todas las muestras, tanto de vinos como de disoluciones modelo, se analizaron por triplicado.

1.1. Elaboración de vinos tintos

En distintas bodegas de la D.O. “Condado de Huelva” (Suroeste de Andalucía) se han elaborado vinos tintos a escala industrial a partir de las variedades de uva Tempranillo, Syrah y Cabernet Sauvignon, por distintas técnicas de vinificación. Las cooperativas y bodegas que han participado en la elaboración de los vinos fueron “Vinícola del Condado S.C.A” (Bollullos Par del Condado), “Bodegas Doñana S.L. (Bollullos Par del Condado), Coop. Ntra. Sra. Del Socorro S.C.A. (Rociana del Condado), y Agroalimentaria Virgen del Rocío S.C.A. (Almonte). Además, algunos ensayos de vinificación han sido realizados en una bodega experimental para la elaboración de vinos mediante maceración prefermentativa a bajas temperaturas, ubicada en la cooperativa “Vinícola del Condado S.C.A”.

El grupo de investigación “Color y Calidad de Alimentos” (AGR225, Universidad de Sevilla), viene realizando colaboraciones en diversos trabajos de investigación con el Consejo Regulador de la D.O. “Condado de Huelva” con quien mantiene una relación contractual (arts. 68 y 83 L.O.U.) desde 1993, así como con distintas bodegas acogidas a la D.O. Además, los proyectos de investigación de financiación, tanto pública como privada (contratos Universidad-Empresa, proyectos I+D del Plan Nacional y del Plan Andaluz de Investigación) que el grupo AGR225 ha desarrollado en el Condado de Huelva sobre la mejora de la calidad de los vinos de esta denominación de origen, han cubierto, hasta la fecha, una buena parte de las etapas de la producción y elaboración de uvas y vinos, y han tenido una importante repercusión en la zona, lo que ha supuesto la implantación de nuevas técnicas o modificación sustancial de las actuales, así como un importante avance en la metodología de control enológico basado en medidas rápidas, objetivas y no destructivas.

En el centro de investigación del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) de Cabra (Córdoba), se han elaborado vinos tintos a partir de la variedad de uva Tempranillo, cultivada en una parcela experimental de acuerdo a criterios ecológicos situada en la región enológica de Montilla-Moriles (Córdoba). El Centro IFAPA de Cabra se encuentra situado en el sudeste de la provincia de Córdoba, en el centro geográfico de Andalucía. En dicho centro se desarrolla un amplio programa de investigación, transferencia y formación, siendo la optimización del proceso de vinificación ecológica adoptando métodos de elaboración respetuosos con el medio ambiente y que garanticen la calidad al consumidor, una de sus principales líneas de actuación. Dentro del marco de la política científica y tecnológica contenida en el plan Andaluz de

Investigación y Formación Profesional, el IFAPA de Cabra mantiene una estrecha colaboración con diferentes Centros Universitarios, entre los que se encuentra la Universidad de Sevilla. Entre los distintos proyectos que se llevan a cabo en el IFAPA de Cabra, se plantea el estudio secuenciado de la elaboración, y consiguiente control analítico, de vinos tintos mediante técnicas de vinificación ecológica contempladas en el Reglamento CEE N° 2092/91 sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. Para el desarrollo de este proyecto, el centro de investigación cuenta con una bodega experimental para la elaboración de vinos a escala piloto.

Según el trabajo experimental planteado, se han empleado los siguientes grupos de muestras, clasificadas según el factor de estudio considerado:

- **Influencia de la variedad de uva.**

Se elaboraron 9 vinos tintos jóvenes monovarietales de las variedades de uva Cabernet Sauvignon (n=2), Tempranillo (n=4) y Syrah (n=3), cultivadas en distintas parcelas amparadas en la D.O. "Condado de Huelva", correspondientes a la campaña 2008. Las uvas fueron recolectadas manualmente en el momento óptimo de vendimia (13-14 °Bé), presentando un buen estado higiénico-sanitario. Los vinos fueron elaborados a escala industrial en distintas bodegas de la D.O. "Condado de Huelva": Coop. Vinícola del Condado (Bollullos Par del Condado), Bodegas Doñana (Bollullos Par del Condado), Coop. Ntra. Sra. Del Socorro (Rociana del Condado), y Coop. Agroalimentaria Virgen del Rocío (Almonte), siguiendo el proceso de vinificación en tinto tradicional, y procurando que las condiciones de vinificación (acidez, sulfuroso, temperatura, etc.) fueran similares en todos los vinos. En todos los casos, el proceso de vinificación se llevó a cabo en depósitos de acero inoxidable de 10.000, 20.000 y 50.000 L, provistos de camisa de refrigeración. La maceración fermentativa tradicional se llevó a cabo durante 6 días a temperatura controlada (20-25 °C), tras la cual se procedió al descube. Una vez finalizados los procesos fermentativos, los vinos se trasegaron a depósitos de acero inoxidable, donde se mantuvieron en fase de estabilización en depósito durante 5 meses.

Para cada vino elaborado, las muestras (100 mL) se tomaron por triplicado, quincenalmente, durante 5 meses de estabilización en depósito hasta el momento de su embotellado. En total se analizaron 270 muestras correspondientes a 90 vinos sometidos a estudio. Los resultados obtenidos del seguimiento analítico de este

ensayo se describen en la sección de Resultados y Discusión, Capítulos 1 y 5 de la presente Memoria.

- **Influencia del grado de maduración de la uva**

El estudio considera 6 vinos tintos jóvenes monovarietales elaborados con la variedad de uva Syrah, cultivada en régimen de secano, en distintas parcelas amparadas en la D.O. "Condado de Huelva", correspondientes a la campaña 2008. Para este ensayo, se seleccionaron dos partidas de uvas con distinto grado de maduración en el momento de vendimia, determinado mediante el análisis tradicional de madurez tecnológica, es decir, según el contenido en azúcares, la acidez y el pH: SyA (12.5° Bé, 6.10 g/L acidez tartárica y pH 3.58) y SyB (14.0 °Bé, 6.53 g/L acidez tartárica y pH 3.48). Las uvas fueron recolectadas manualmente, presentando un buen estado higiénico-sanitario. De cada partida de uva, se elaboraron tres replicados de vinos.

Los vinos fueron elaborados en una bodega experimental situada en la Coop. Vinícola del Condado (Bollullos Par del Condado, Huelva), siguiendo un proceso de vinificación por maceración prefermentativa a bajas temperaturas. Para conseguir la temperatura deseada, se mantuvo la uva vendimiada a 0 °C en cámara frigorífica durante 24 horas antes de comenzar el proceso de elaboración. La vinificación se llevó a cabo en depósitos de acero inoxidable de 1000 y 2000 L, provistos de camisa de refrigeración. La maceración prefermentativa en depósito se aplicó durante 10 días con temperaturas entre 5-8 °C. Dichas condiciones se mantuvieron mediante un equipo industrial de refrigeración (HITSA-TOPAIR, mod. RAE-101, Madrid, España) a partir del cual se recirculaba líquido refrigerante (agua:glicerol, a 2-7 °C) a través de las camisas de los depósitos. Una vez concluida la etapa pre-fermentativa, la temperatura de los depósitos se llevó hasta 20 °C para favorecer el comienzo de la fermentación alcohólica, desarrollándose durante 10 días a temperatura controlada (20-25 °C), tras la cual se procedió al descube. Una vez finalizados los procesos fermentativos, los vinos se trasegaron a depósitos de acero inoxidable de 500 L, procurando que las condiciones de vinificación (acidez, sulfuroso, temperatura, etc.) fueran similares en todos los casos. Los vinos se mantuvieron en fase de estabilización en depósito durante 6 meses.

Para cada vino elaborado, se tomaron muestras (100 mL) por triplicado, durante 6 meses de estabilización en depósito, en diferentes momentos de la vinificación, hasta el momento de su embotellado. Estos momentos se correspondieron con: el final de la maceración prefermentativa, tras el descube, y

quincenalmente durante la fase estabilización en depósito. En total se analizaron 252 muestras correspondientes a 84 vinos sometidos a estudio. Los resultados obtenidos del seguimiento analítico de este ensayo se describen en la sección de Resultados y Discusión, Capítulos 1 y 5 de la presente Memoria.

- **Influencia del tipo de maceración en la producción de vinos ecológicos**

En el estudio se utilizaron 8 vinos tintos jóvenes monovarietales de la variedad de uva Tempranillo, cultivada en una parcela experimental en la que se produce de acuerdo a criterios ecológicos, perteneciente al centro de investigación IFAPA de Cabra (Córdoba) y correspondientes a la campaña 2006. Las uvas fueron recolectadas manualmente en el momento óptimo de vendimia (12.0 °Bé), presentando un buen estado higiénico-sanitario. Los vinos fueron elaborados a escala piloto en una bodega experimental situada en las instalaciones del centro de investigación IFAPA de Cabra. En la elaboración de los vinos, se ensayaron dos técnicas distintas de maceración: maceración fermentativa tradicional y maceración prefermentativa a bajas temperaturas (criomaceración). Para cada ensayo, se realizaron cuatro replicados, procesando aproximadamente entre 42-43 kg de uva por depósito. El proceso de vinificación se llevó a cabo en depósitos de acero inoxidable de 50 L, provistos de camisa de refrigeración.

La maceración fermentativa tradicional se llevó a cabo durante 6 días a temperatura controlada (20-25 °C), tras la cual se procedió al descube. La maceración prefermentativa a bajas temperaturas se llevó a cabo aplicando temperaturas entre 5-8 °C durante 8 días, mediante un equipo industrial de refrigeración (REVINSA mod. minifrico C-18, Arganda del Rey, Madrid) a partir del cual se recirculaba un líquido refrigerante (agua:glicerol, a 2-7 °C) a través de las camisas de refrigeración de los depósitos. Una vez concluida la etapa prefermentativa, la temperatura de los depósitos se llevó hasta 20 °C para favorecer el comienzo de la fermentación alcohólica, desarrollándose durante 6 días a temperatura controlada (20-25 °C), tras la cual se procedió al descube. En ambos ensayos, una vez finalizados los procesos fermentativos, los vinos se trasegaron a depósitos de acero inoxidable de 50 L, procurando que las condiciones de vinificación (acidez, sulfuroso, temperatura, etc.) fueran similares en todos los casos. Los vinos se mantuvieron en fase de estabilización en depósito durante aproximadamente 2 meses.

Para cada vino elaborado, las muestras (100 mL) se tomaron por triplicado, en distintos momentos de la vinificación durante 5 meses de estabilización en depósito

hasta el momento de su embotellado. Estos momentos se correspondieron con: el inicio y en el intermedio de la fermentación alcohólica, tras el descube, y a los 15 y 45 días posteriores a éste. El número de vinos sometidos a estudio fue 40, y el número total de muestras analizadas 120. Los resultados obtenidos del seguimiento analítico de este ensayo se describen en la sección de Resultados y Discusión, Capítulo 2 de la presente Memoria.

- **Influencia de la técnica de refrigeración**

Este ensayo incluye 6 vinos tintos jóvenes monovarietales de la variedad de uva Syrah, cultivada en régimen de secano, en distintas parcelas amparadas en la D.O. "Condado de Huelva", correspondientes a la campaña 2006. Las uvas fueron recolectadas manualmente en el momento óptimo de vendimia (13.3 °Bé), presentando un buen estado higiénico-sanitario. Los vinos fueron elaborados en una bodega experimental situada en la Coop. Vinícola del Condado (Bollullos Par del Condado, Huelva), siguiendo un proceso de vinificación por criomaceración prefermentativa (10 días con temperatura inferior a 10 °C). En la elaboración de los vinos, se ensayaron dos técnicas distintas de refrigeración de la masa de vendimia: refrigeración directa por adición de nieve carbónica en el depósito de maceración/fermentación y refrigeración previa a la vinificación, manteniendo la uva vendimiada en cámara frigorífica de almacenamiento a 0 °C durante 24 horas. Para cada ensayo, las elaboraciones se realizaron por triplicado, procesando aproximadamente 1500 kg de uva por depósito. El proceso de vinificación se llevó a cabo en depósitos de acero inoxidable de 1000 L, provistos de camisa de refrigeración. Las condiciones de maceración prefermentativa en el ensayo por refrigeración directa fueron de 10 días entre 5-10 °C, y en el de refrigeración previa de 10 días entre 3-8 °C. En ambos casos, la temperatura estuvo controlada mediante un equipo industrial de refrigeración (HITSA-TOPAIR, mod. RAE-101, Madrid, España) a partir del cual se hace recircular líquido refrigerante (agua:glicerol, a 2-7 °C) a través de las camisas de los depósitos. Una vez concluida la etapa prefermentativa, la temperatura de los depósitos se llevó hasta 20 °C para favorecer el comienzo de la fermentación alcohólica, desarrollándose durante 4 días a temperatura controlada (20-23 °C), tras la cual se procedió al descube. Una vez finalizados los procesos fermentativos, los vinos se trasegaron a depósitos de acero inoxidable de 500 L, procurando que las condiciones de vinificación (acidez, sulfuroso, temperatura, etc.) fueran similares en todos los casos. Los vinos se mantuvieron en fase de estabilización en depósito durante 5 meses.

Para cada vino elaborado, las muestras (100 mL) se tomaron por triplicado, en distintos momentos de la vinificación durante 5 meses de estabilización en depósito, hasta el momento de su embotellado. Estos momentos se correspondieron con: el primer día de encubado, en el inicio de la fermentación alcohólica, tras el descube, y a los 15, 30, 60 y 90 días posteriores a éste. El número de vinos sometidos a estudio fue 42, y el número total de muestras analizadas 126. Los resultados obtenidos del seguimiento analítico de este ensayo se describen en la sección de Resultados y Discusión, Capítulo 3 de la presente Memoria.

- **Influencia del tiempo de envejecimiento en barrica**

Para el estudio se elaboró un vino tinto de variedad Syrah, con aplicación de criomaceración prefermentativa, en la D.O. "Condado de Huelva" (campaña 2007), sometido a un proceso de envejecimiento en barrica durante un año. Las uvas, cultivadas en régimen de secano, procedían de distintas parcelas amparadas por esta D.O., y fueron recolectadas manualmente en el momento óptimo de vendimia (13.0 °Bé), presentando un buen estado higiénico-sanitario.

El vino fue elaborado en una bodega experimental situada en la Coop. Vinícola del Condado (Bollullos Par del Condado, Huelva), siguiendo un proceso de vinificación por maceración prefermentativa a bajas temperaturas, llevada a cabo mediante refrigeración previa de la uva vendimiada en cámara frigorífica de almacenamiento a 0 °C durante 24 horas. El proceso de vinificación se llevó a cabo en depósitos de acero inoxidable de 1000 y 2000 L, provistos de camisa de refrigeración. La maceración prefermentativa en depósito se aplicó durante 11 días con temperaturas entre 5-8 °C. Dichas condiciones se mantuvieron mediante un equipo industrial de refrigeración (HITSA-TOPAIR, mod. RAE-101, Madrid, España) a partir del cual se recirculaba un líquido refrigerante (agua:glicerol, a 2-7 °C) a través de las camisas de los depósitos. Una vez concluida la etapa pre-fermentativa, la temperatura de los depósitos se llevó hasta 20 °C para favorecer el comienzo de la fermentación alcohólica, desarrollándose durante 15 días a temperatura controlada (20-25 °C), tras la cual se procedió al descube. Una vez finalizados los procesos fermentativos, el vino se trasegó a depósitos de acero inoxidable de 500 L. Una vez finalizado el periodo de estabilización en depósito (5 meses), el vino elaborado se distribuyó en 3 barricas de roble americano (225 L, tostado medio) y se mantuvo en ellas durante un periodo de un año de crianza.

Para cada barrica, las muestras (200 mL) se tomaron por triplicado, en distintos momentos del proceso de envejecimiento. Estos momentos se correspondieron con: 3,

6, 9, y 12 meses de crianza en barrica. El número de vinos sometidos a estudio fue 12, y el número total de muestras analizadas 36. Los resultados obtenidos del seguimiento analítico de este ensayo se describen en la sección de Resultados y Discusión, Capítulo 4 de la presente Memoria.

1.2. Disoluciones de antocianos y de copigmentación

Se prepararon disoluciones modelo de antocianos y de copigmentación entre el principal antociano monoglucósido de vinos, la malvidina-3-*O*-glucósido, y dos de los principales flavanoles presentes en las semillas de uva, catequina y epicatequina, así como con el ácido cafeico.

- **Obtención de patrones y preparación de disoluciones madre de pigmentos y copigmentos**

El pigmento malvidina 3-*O*-glucósido fue aislado en el laboratorio a partir del hollejo de uva *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo con metanol acidificado con HCl 1 N (95:5, v/v) y posterior purificación mediante HPLC semipreparativa, usando una columna de fase reversa y según el método propuesto por Heredia et al. (1998). Los copigmentos catequina, epicatequina, y el ácido cafeico fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Todas las disoluciones madre de antocianos puros y las correspondientes de copigmentación se prepararon por triplicado, en vino sintético (5 g/L de ácido tartárico en 12% de etanol y fuerza iónica 0.2M) con pH ajustado a 3.6. El procedimiento de elaboración del vino sintético queda descrito en la sección Metodología, apartado 2.4.1 (Medida de la copigmentación en vinos, Boulton, 1996) de esta Memoria.

Teniendo en cuenta el peso molecular de los patrones descritos, se prepararon, en vino sintético, las siguientes disoluciones madre:

- 1) Malvidina 3-*O*-glucósido: 10^{-3} M (500 mg/L, PM=529)
- 2) Catequina: 5×10^{-3} M (1541 mg/L, PM=308.3)
- 3) Epicatequina: 5×10^{-3} M (1450 mg/L, PM= 209)
- 4) Ácido cafeico: 5×10^{-3} M (900 mg/L, PM= 180)

- **Preparación de disoluciones de copigmentación**

A partir de las disoluciones madres anteriormente descritas, se prepararon distintas disoluciones de copigmentación (1.5 mL) mezclando un volumen fijo de disolución madre de pigmento y una alícuota variable de disolución madre de cada copigmento, y enrasando con vino sintético hasta el volumen total indicado cuando fuese necesario, obteniéndose así distintas ratios molares pigmento/copigmento. En todos los ensayos, las disoluciones de referencia (malvidina 3-*O*-glucósido) contenían una concentración del pigmento puro de 200 mg/L (0.41 mM).

Con el objetivo de estudiar el efecto del pH en el fenómeno de copigmentación, se prepararon tres disoluciones de copigmentación: malvidina 3-*O*-glucósido:catequina (MC), malvidina 3-*O*-glucósido:epicatequina (ME), y malvidina 3-*O*-glucósido:ácido cafeico (MF), a diferentes valores de pH: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, y 5.0. Las distintas disoluciones de copigmentación presentaban una ratio molar 1:5, similar a lo descrito en la bibliografía para provocar un efecto de copigmentación notable.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la concentración del copigmento, se prepararon dos disoluciones distintas de copigmentación: malvidina 3-*O*-glucósido:catequina (MC) y malvidina 3-*O*-glucósido:epicatequina (ME), a las ratios molares pigmento/copigmento 1:0, 1:1, 1:2, 1:5, y 1:7.

Todas las disoluciones preparadas se mantuvieron en viales cerrados, durante 2 horas en oscuridad a 25 °C, asegurando así la consecución y estabilización del fenómeno de copigmentación.

Los resultados obtenidos del seguimiento analítico de este ensayo se describen en la sección de Resultados y Discusión, Capítulo 5 de la presente Memoria.

2. METODOLOGÍA

2.1. Parámetros Físico-Químicos

En las muestras de mosto y vino se realizó un análisis fisicoquímico general, incluyendo los siguientes parámetros: densidad, azúcares reductores, acidez total, pH, anhídrido sulfuroso total, acidez volátil y fenoles totales. Todos los análisis se realizaron por triplicado, expresando el resultado como la media aritmética y desviación estándar.

- **Densidad relativa (CEE, 1990; OIV, 1990)**

La densidad relativa de un mosto o vino a 20 °C es la relación entre su masa volúmica y la del agua a esa misma temperatura. Su símbolo es d_{20}^{20} .

La medida directa de la densidad relativa se realizó por el método aerométrico. El fundamento de la aerometría se basa en el principio de Arquímedes para la determinación de la masa volúmica de líquidos en función de la flotabilidad que presenta en ellos un cuerpo de peso constante.



Figura 44. Densímetro

El instrumento analítico con el que se realiza la medida directa de la densidad relativa es el densímetro o aerómetro formado por un cuerpo cilíndrico central hueco, de vidrio, que presenta en su extremo inferior un bulbo pesado (generalmente con perdigones de plomo) que le permite flotar en posición vertical y en su extremo superior una escala graduada en unidades de masa volúmica a 20 °C (Figura 44).

En enología, la medida directa de la densidad relativa de mosto y vino permite conocer la cantidad de azúcares totales que contienen, expresados en grados Baumé (°Bé) o g/L, empleando tablas específicas de conversión existentes en bibliografía. Específicamente, el tipo de densímetro que se usa en enología se denomina mostómetro.

MaterialAparatos:

Probeta 250 mL

Mostómetro PROTON 10119, GAB SISTEMATICA ANALITICA SL (Barcelona, España),
calibrado a 20 °C, escala densidad: 0.999-1.130

Termómetro OPAL -10+35 °C, con apreciación de 0.5 °C, GAB SISTEMATICA ANALITICA
SL (Barcelona, España)

Procedimiento analítico

Si el mosto o vino contienen cantidades importantes de CO₂, se debe eliminar por agitación o ultrasonido. Llenar una probeta de 250 mL con mosto o vino. Introducir el termómetro en la probeta y realizar la lectura al cabo de 1 minuto. Retirar el termómetro e introducir el mostómetro en la probeta, con un movimiento giratorio y dejar reposar. Una vez en reposo, leer en la escala la densidad (adimensional).

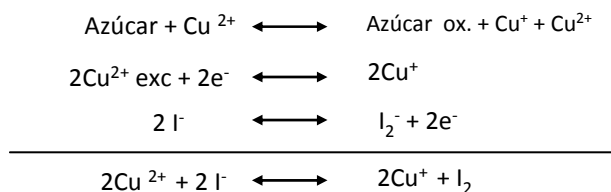
Cálculos

La densidad se mide por triplicado, y se hace la media aritmética con las 3 densidades obtenidas. El dato de azúcares totales, expresado en grados Baumé o g/L, se obtiene de tablas específicas de conversión existentes en bibliografía, que relaciona la densidad relativa (adimensional) con el contenido total de azúcares.

- **Azúcares reductores (Rebelein, 1973; CEE, 1990; OIV, 1990)**

Esta determinación tiene por objeto conocer la concentración de azúcar residual que presenta el vino una vez finalizada la fermentación alcohólica. En términos generales, se considera que un contenido en azúcares reductores ≤ 2 g/L es indicativo de que la fermentación alcohólica ha finalizado.

La cantidad de azúcares reductores se determinó según el método de Rebelein (1973). El fundamento del método se basa en las propiedades reductoras de glucosa y fructosa sobre las sales cúpricas. Estos azúcares son oxidados a la temperatura de ebullición por un exceso de solución alcalina de Cu²⁺ que contiene tartrato para mantener el metal en solución. El Cu²⁺ es reducido a Cu⁺ y el Cu²⁺ en exceso se puede determinar por yodometría después de adicionar exceso de KI y acidular. Las reacciones que tiene lugar son las siguientes:



MaterialAparatos:

Balanza analítica ST-510 (Gram Precision, Barcelona, España)
Placa calefactora Agimatic (Selecta, Barcelona, España)
Matraz aforado 100 mL
Erlenmeyer de 50, 100, y 250 mL
Vidrio de reloj
Piedra pómez
Embudo
Bureta graduada de 50 mL
Pipetas graduadas de 0.5, 2, 5, 10 mL

Reactivos:

Acetato neutro de plomo (Merck, Darmstadt, Germany)
Carbonato sódico anhidro (Panreac, Barcelona, España)
Hidróxido sódico 0.1M (Panreac, Barcelona, España)
Carbonato de calcio (Panreac, Barcelona, España)
Kit de REBELEIN VINIKIT (Panreac, Barcelona, España), compuesto por:
Disolución cupro-alcalina, 0.168 M
Disolución alcalina de potasio sodio tartrato, 0.886 M
Piedra pómez en gránulos QP
Disolución de yoduro de potasio al 30% (p/v)
Disolución de ácido sulfúrico al 16% (v/v)
Disolución de almidón al 2%
Tiosulfato de sodio, solución 0.0551 M
Agua destilada

Procedimiento analíticoEliminación de polifenoles

Antes de valorar es necesario eliminar los polifenoles ya que también son compuestos reductores, por lo que su presencia podría interferir en los resultados, ofreciendo valores superiores al real. Para ello, realizar una defecación previa de la muestra con acetato de plomo, mediante los siguientes pasos:

Preparar una disolución al 50% de acetato de plomo en caliente (125 mg en 250 mL de agua destilada). En un matraz de 100 mL, mezclar: 50 mL de vino, 2.5 mL de la disolución de acetato de plomo, y 0.5 g de carbonato sódico anhidro. Esperar a que se enfríe y enrasar. Filtrar.

Análisis de la muestra

Poner en un erlenmeyer 10 mL de disolución cúprica, 5 mL de disolución alcalina (potasio sodio tartrato) y 2 mL de la muestra a analizar. Añadir unos granos de piedra pómez para evitar salpicaduras, tapar con un vidrio de reloj y ponerlo en una placa calefactora hasta que comience a hervir. Cuando haya hervido un minuto y medio exacto, esperar a que se enfríe. Añadir 10 mL de la disolución de yoduro de potasio, 10 mL de almidón al 2% y 10 mL de ácido sulfúrico. Valorar la muestra con la disolución de tiosulfato sódico, hasta coloración crema. Anotar el volumen de tiosulfato gastado.

Análisis del blanco

Realizar el mismo procedimiento que la muestra de mosto/vino, pero tomando como muestra 2 mL de agua destilada.

Cálculos

$$\text{Azúcares reductores (g/L)} = V - V'$$

Siendo:

V= Volumen tiosulfato (blanco)

V' = Volumen tiosulfato (muestra)

- **Acidez Total (CEE, 1990; OIV, 1990)**

La acidez total es la suma de los ácidos valorables cuando se lleva el pH a 7.00 añadiendo una disolución alcalina valorada. Se determina, por tanto, mediante una volumetría ácido-base con detección potenciométrica del punto final.

Los ácidos más frecuentes del vino son el tartárico, el málico y el láctico. Otros ácidos presentes en el vino, aunque de forma minoritaria, son el cítrico, acético, glucónico ascórbico, succínico, etc. Siguiendo la recomendación de la OIV, la acidez total se expresa en g/L de ácido tartárico, puesto que, en general, la acidez de los vinos es debida mayoritariamente a este ácido orgánico y a sus sales ácidas.

Material

Aparatos:

Bureta graduada de 50 mL

Pipeta graduada de 10 mL

Vaso de precipitado 50 mL

pH-metro Hanna pHep[®]3 (Hanna Instrument, Guipuzkoa, España)

Electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl

Reactivos:

Disolución tampón de pH 4.00 (Merck, Darmstadt, Germany)

Disolución tampón de pH 7.00 (Merck, Darmstadt, Germany)

Disolución para mantener el electrodo del pH-metro (Merck, Darmstadt, Germany)

Disolución de hidróxido sódico 0.1 N (Panreac, Barcelona, España)

Procedimiento analítico

Calibrar el pH-metro con las disoluciones tampón de pH 4.00 y 7.00. Una vez estandarizado, introducir el electrodo en un vaso de precipitado que contiene 10 mL de mosto o vino al que previamente, bajo agitación, se le habrá eliminado el dióxido de carbono. Desde la bureta, previamente enrasada, se van añadiendo gotas de la disolución de hidróxido sódico 0.1 N, agitando constantemente la muestra, hasta que el pH-metro marque el valor de 7.00. Anotar el volumen de de hidróxido sódico 0.1 N gastado en la valoración.

Cálculos

Se calcula la acidez total, expresada en g/L de ácido tartárico según la siguiente expresión:

$$\text{Acidez Total (g/L ácido tartárico)} = (V \times N \times P_m) / (2 \times V')$$

Siendo:

V = Volumen (mL) de hidróxido sódico consumidos en la valoración.

N = Normalidad del hidróxido sódico

P_m = Peso molecular del ácido tartárico (150.09).

2 = Valencia del ácido tartárico
V' = Volumen (mL) de muestra analizada (10 mL).

- **pH (CEE, 1990; OIV, 1990)**

La medida del pH se realizó mediante un pH-metro Hanna pHep®3. Su fundamento se basa en la medida de la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en la muestra de mosto o vino. Uno de estos electrodos tiene un potencial definido en función de la actividad del ión hidrógeno de la muestra; el otro electrodo tiene un potencial fijo y conocido, y constituye el electrodo de referencia. El pH se determina con un error inferior a ± 0.05 unidades.

Material

Aparatos:

pH-metro Hanna pHep®3 (Hanna Instrument, Guipuzkoa, España)
Electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl

Reactivos:

Disolución tampón de pH 4.00 (Merck, Darmstadt, Germany)
Disolución tampón de pH 7.00 (Merck, Darmstadt, Germany)
Disolución para mantener el electrodo del pH-metro (Merck, Darmstadt, Germany)

Procedimiento analítico

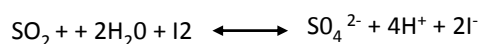
Calibrar el pH-metro con las disoluciones tampón de pH 7.0 y 4.0. Una vez calibrado, realizar la medida del pH sumergiendo el electrodo en el vino durante unos 15 segundos a una temperatura lo más cercana a 20 °C, ya que el pH está influenciado por la temperatura. La lectura del pH es directa y se expresa con dos decimales.

Cálculos

Se efectúan 3 determinaciones de cada muestra, tomando como resultado la media aritmética de las mismas.

- **Anhídrido Sulfuroso Libre y Total (CEE, 1990; OIV, 1990)**

La determinación del anhídrido sulfuroso libre y total se realizó por volumetría, mediante una valoración de oxidación-reducción con yodo (I_2) como reactivo valorante, en medio ácido y en presencia de almidón como indicador; según la siguiente reacción:



En la determinación del anhídrido sulfuroso libre se acidula el vino para minimizar la oxidación de los fenoles por el yodo, y después se valora con yodo hasta el punto final, utilizando almidón como indicador. Para determinar el anhídrido

sulfuroso total es necesario hidrolizar el sulfuroso de sus uniones mediante la adición de una base fuerte y después acidular y valorar directamente con yodo (Amerine y Ough, 1976).

Material

Aparatos e instrumentación:

Bureta graduada de 10 mL
Matraces Erlenmeyer de 100 mL
Pipetas graduadas de 10 y 20 mL

Reactivos:

Disolución acuosa de ácido sulfúrico 1/3 (v/v)
Disolución de hidróxido sódico 1 N (Panreac, Barcelona, España)
Disolución de yodo 0.02 N (Panreac, Barcelona, España)
Disolución de almidón al 2% (Panreac, Barcelona, España)

Procedimiento analítico

Determinación de dióxido de azufre libre

Tomar 10 mL de muestra de vino y llevar a un matraz erlenmeyer. Añadir 5 mL de ácido sulfúrico 1/3 y unas gotas de la disolución de almidón al 2%. Valorar con yodo 0.02N hasta la aparición de coloración azul que debe persistir durante 10-15 s. Anotar el volumen de yodo gastado.

Determinación de dióxido de azufre total

Tomar 20 mL de muestra de vino, llevar a un matraz erlenmeyer y añadir 10 mL de hidróxido sódico 1N. Tapar, agitar y dejar en reposo durante 15 minutos. Pasado ese tiempo, añadir 5 mL de una disolución de ácido sulfúrico 1/3 y unas gotas de la disolución de almidón al 2%. Valorar con una disolución de yodo 0.02N hasta la aparición de coloración azul que debe persistir durante 10-15 s. Anotar el volumen de yodo gastado.

Cálculos

Se calcula el anhídrido sulfuroso libre y total expresado en mg/L según la siguiente expresión:

$$\text{SO}_2 \text{ libre (mg/L)} = (V \times N \times \text{Eq} \times 1000) / V' = V \times 64$$

$$\text{SO}_2 \text{ total (mg/L)} = (V \times N \times \text{Eq} \times 1000) / V' = V \times 32$$

Siendo:

V = Volumen (mL) de la disolución de yodo 0.02N consumidos en la valoración.

N = Normalidad de la disolución de yodo usado en la valoración (0.02N).

Eq= Equivalentes de SO₂ (PM del SO₂ (64) / n^º e- que se intercambian (2).

V'= Volumen (mL) de muestra analizada, 10 y 20 mL en cada caso.

- **Acidez volátil (García, 1990; CEE, 1990; OIV, 1990)**

La acidez volátil es el conjunto de ácidos grasos de la serie acética que se hallan en el vino, libres o combinados formando sales, siendo el mayoritario el ácido acético.

Para determinar la acidez volátil de los vinos se aplicó el método García Tena (1990), basado en una destilación fraccionada del vino, una vez eliminado el dióxido de carbono y una posterior valoración ácido-base de la segunda fracción del destilado (Amerine y Ough, 1980). Una imagen del destilador García-Tena se muestra en la Figura 45.



Figura 45. Destilador de García Tena.

Todos los métodos basados en la destilación directa son aproximados, cuya exactitud es discutible ya que en ninguno de los casos se consigue destilar el 100% de los ácidos volátiles y, además, no se tienen en cuenta las posibles interferencias de los ácidos láctico y sulfuroso, que también pueden hallarse presentes en el destilado. Pero, por el contrario, presentan la gran ventaja de su sencillez y rapidez.

Material

Aparatos e instrumentación:

Microdestilador (Nahita, Navarra, España) compuesto por:
Matraz esférico 50 mL
Puente de unión
Refrigerante
Mechero Bunsen
Probetas de 5.1 mL y 3.2 mL
Matraz Erlenmeyer 50 mL
Bureta de 10 mL
Pipeta volumétrica de 11 mL

Reactivos:

Disolución de hidróxido sódico 0.02 N (Panreac, Barcelona, España)
Fenolftaleína 1 % en etanol (p/v)

Procedimiento analítico

Colocar en el matraz de destilación 11 mL de vino desprovisto de dióxido de carbono y conectar al aparato de destilación. A la salida del refrigerante, colocar una probeta de 5.1 mL y proceder a la destilación. Cuando el destilado alcanza el trazo superior de la probeta, sustituir por una de

3.2 mL, dándose por terminada la destilación cuando se alcanza ese volumen. Verter el destilado recogido en la probeta de 3.2 mL en un erlenmeyer de 50 mL y valorar con la disolución de hidróxido sódico 0.02 N, en presencia de unas gotas de fenolftaleína 1%, hasta obtener un color ligeramente rosado.

Cálculos

La acidez volátil se expresa en g/L de ácido acético, con dos decimales:

$$\text{Acidez Volátil (g/L)} = 0.366 \times V$$

Siendo:

V = mL de hidróxido sódico 0.02 N consumidos en la valoración.

- **Fenoles Totales**

Para la evaluación del contenido fenólico total se han utilizado dos métodos:

Método Folin-Ciocalteu (Amerine y Ough, 1976; AOAC, 1990)

La determinación del contenido en fenoles totales se realizó según el método de Folin y Ciocalteu (1927), que es el recomendado en la actualidad (Amerine y Ough, 1976; AOAC, 1990).

La reacción se basa en la reducción de los fenoles totales que se encuentran en mostos y vinos por una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, lo que conduce a una mezcla de óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y de óxido de molibdeno (Mo_8O_{23}), de color azul. Esta coloración ofrece un espectro de absorción con $\lambda_{\text{máx}}$ a 765 nm, proporcional al contenido de compuestos fenólicos. Por tanto, a partir de la componente de calibrado puede conocerse la cantidad de fenoles totales presentes en la muestra, que se expresa en mg/L de ácido gálico.

Material

Aparatos e instrumentación:

Espectrofotómetro UV-Vis HP 8452 (Palo Alto, CA, USA)
Cubeta de vidrio de 10 mm
Pipetas graduadas de 1, 5, 10 y 25 mL
Matraces aforados de 100 mL
Balanza analítica de precisión METTLER TOLEDO AE-260 (Barcelona, España)

Reactivos:

Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germany)
Disolución de carbonato sódico al 20% (m/v)
Ácido gálico (St. Louis, MO, USA)

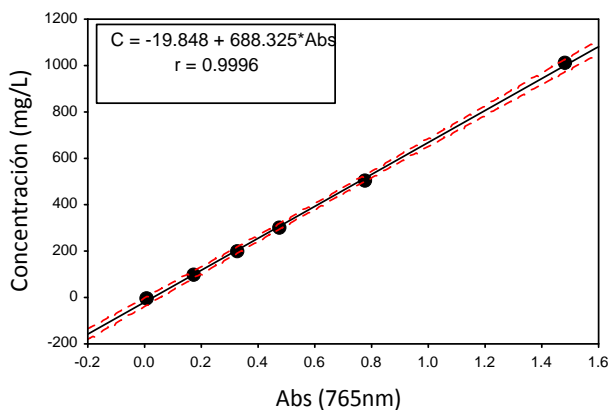
Procedimiento analítico

Recta de calibrado

Disolución madre de ácido gálico (5 g/L): Pesar con exactitud 0.5 g de ácido gálico desecado, llevarlo a un matraz aforado de 100 mL y enrasar con agua destilada.

A partir de la disolución madre, preparar seis disoluciones patrón de 0, 50, 100, 150, 250 y 500 mg/L, respectivamente.

De cada una de estas disoluciones, tomar 1 mL y llevar a un matraz aforado de 100 mL. Añadir una pequeña cantidad de agua destilada (60 mL aproximadamente) y agitar. Añadir 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y mezclar. Después de 30 segundos y antes de 8 minutos, añadir 15 mL de carbonato sódico al 20%. Mezclar y diluir con agua destilada hasta enrasar. Mantener las disoluciones durante 2 horas a 24 °C y posteriormente medir la absorbancia de cada disolución frente al blanco (agua destilada), a 765 nm en cubetas de 10 mm. Representar la absorbancia frente a la concentración para obtener la recta de calibrado.



Análisis de la muestra

Tomar 1 mL de la muestra de mosto o vino tinto (previamente diluida al 10%) y llevar a un matraz de 100 mL. Añadir una pequeña cantidad de agua destilada (60 mL aproximadamente) y 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de 30 segundos y antes de 8 minutos, añadir 15 mL de la disolución de carbonato de sodio al 20%. Mezclar bien y enrasar con agua hasta 100 mL. Agitar el matraz para homogeneizar. Mantener las disoluciones durante dos horas a 25 °C y posteriormente medir la absorbancia a 765 nm en cubeta de 10 mm de paso de luz.

Cálculos

Llevar el valor de A_{765} obtenido a la recta de calibrado y calcular la concentración de fenoles totales, expresada en mg de ácido gálico por litro. Aplicar el factor e dilución a la concentración obtenida:

$$C = -19.848 + 688.325 * Abs \quad r^* = 0.9996$$

$$\text{Fenoles Totales (mg/L)} = 10 \times C$$

Siendo:

Abs: la absorbancia medida en el espectrofotómetro.

C: la concentración obtenida en la recta de calibrado

Índice de Polifenoles Totales (CEE, 1990; OIV, 1990)

La medida de los fenoles totales se determinó también según el Índice de Polifenoles Totales (IPT), a partir de la medida de absorbancia del vino a 280 nm (UV), ya que el núcleo bencénico característico de los compuestos bencénicos tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de onda.

MaterialAparatos e instrumentación:

Espectrofotómetro UV-Vis HP 8452 (Palo Alto, CA, USA)
Cubeta de cuarzo de 10 mm
Pipeta graduada de 1 mL
Matraz aforado de 100 mL

Procedimiento analítico

Diluir una muestra de vino 100 veces con agua destilada. Medir en espectrofotómetro la absorbancia a 280 nm, en cubeta de cuarzo y usando agua destilada como blanco de referencia.

Cálculos

$$\text{IPT (UA)} = A_{280} \times 100$$

2.2. Análisis cromatográfico de los vinos**2.2.1. Cuantificación de ácidos málico y láctico mediante HPLC con detección por fotodiodos (García y Muñoz, 1993)**

La separación, identificación y cuantificación de los ácidos málico y láctico individuales en las muestras se llevó a cabo según una modificación del método descrito por García y Muñoz (1993).

Para ello se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent Technologies 1100 Series (Palo Alto, CA, USA), equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador de vacío, compartimento termostatzado para la columna, inyector automático, detector de diodos y software ChemStation.

Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa Zorbax SB-C18 de 250 x 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil utilizada fue Tampón fosfato KH_2PO_4 / H_3PO_4 con metanol al 1.5% (v/v), ajustado a pH 2.0 con ácido ortofosfórico. El volumen de inyección fue de 20 µl, el flujo se mantuvo constante a 0.70 mL/min. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 20 °C.

El método empleado presenta suficiente selectividad y sensibilidad para permitir el análisis del mosto/vino con inyección directa, previa filtración de la muestra por filtros de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro.

La identificación y cuantificación de los compuestos individuales se llevó a cabo usando patrones externos puros, comparando los espectros de absorbancia y los tiempos de retención entre los compuestos. Los espectros se registraron entre 200 y

700 nm, con un ancho de banda de 2.4 nm. La longitud de onda de detección fue de 215 nm.

Material

Aparatos e instrumentación:

Cromatógrafo líquido Agilent Technologies HP 1100, equipado con:
Bomba cuaternaria (G1313A)
Desgasificador de vacío (G1379A)
Compartimento termostatzado para columna (G1316A)
Inyector automático (G1313A)
Detector de diodos (G1315B)
Columna Zorbax SB-C18 (5 μm , 250 mm x 4.6 mm)
Software ChemStation

Equipo de filtración a vacío Millipore (Billerica, MA, USA)
Filtros para fases móviles HN, 0.45 μm Millipore (Billerica, MA, USA)
Filtros de jeringa de nylon, 13 mm x 0.45 μm Millipore (Billerica, MA, USA)
Microviales 2 mL Agilent Technologies
Balanza analítica de precisión METTLER TOLEDO AE-260 (Barcelona, España)

Reactivos:

Metanol calidad HPLC (Merck, Darmstadt, Germany)
Dihidrogenofosfato de potasio P.A (Panreac, Barcelona, España)
Ácido Ortofosfórico 85% P.A. (Panreac, Barcelona, España)
Ácido málico purísimo (DL).PRS (Panreac, Barcelona, España)
Ácido láctico 90% (MerMerck, Darmstadt, Germany)
Agua Milli-Q

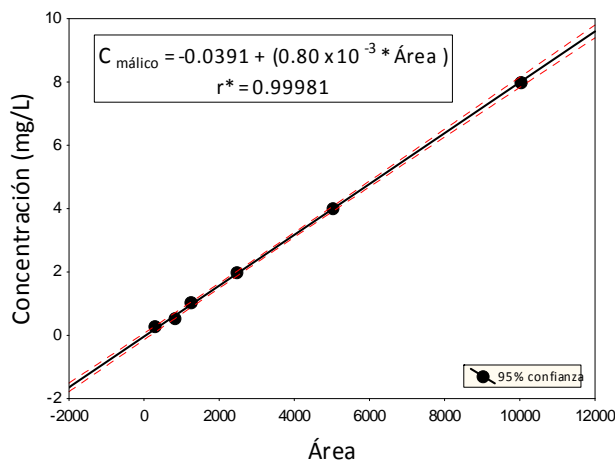
Procedimiento analítico

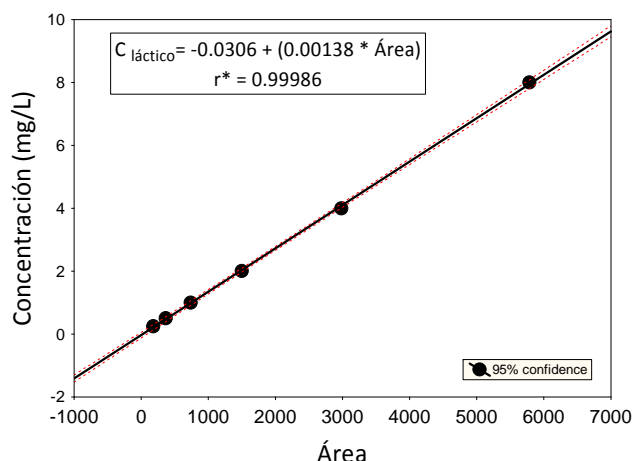
Rectas de calibrado

Disolución madre de ácido málico y láctico (8 g/L): Pesar con exactitud 0.8 g de ácido málico, llevarlo a un matraz aforado de 100 mL y enrasar con agua destilada. Operar de igual manera con el ácido láctico.

A partir de cada disolución madre de málico y láctico, preparar 6 disoluciones patrón de 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0 g/L, y analizar mediante HPLC, por triplicado.

Representar el área obtenida para cada disolución patrón frente a la concentración correspondiente para obtener la recta de calibrado.





Análisis de la muestra

Filtrar la muestra de vino por filtros de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro y analizar mediante HPLC.

Cálculos

Llevar el valor de área obtenido en el análisis cromatográfico a la recta de calibrado y calcular la concentración de ácido málico y láctico fenoles, expresadas en g/L:

$$C_{\text{málico}} \text{ (g/L)} = -0.0391 + (0.80 \times 10^{-3} * \text{Área}) \quad r^* = 0.999$$

$$C_{\text{láctico}} \text{ (g/L)} = -0.0306 + (0.00138 * \text{Área}) \quad r^* = 0.999$$

2.2.2. Cuantificación de compuestos fenólicos individuales mediante HPLC con detección por fotodiodos (Hernanz et al., 2007)

La separación, identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos individuales en las muestras se llevó a cabo según el método descrito por Hernanz et al. (2007).

Para ello se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent Technologies 1100 Series (Palo Alto, CA, USA), equipado con bomba cuaternaria, desgasificador de vacío, compartimento termostatzado para la columna, inyector automático, detector de diodos y software ChemStation. Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa Nova-pack C18 (30 cm x 3.9 mm ID) y tamaño de partícula de 5 μm . Las fases móviles utilizadas fueron:

Fase móvil A Agua con ácido acético glacial al 2%

Fase móvil B Agua / acetonitrilo / ácido acético glacial (58:40:2; v:v:v)

Para conseguir la separación de los distintos compuestos se utilizaron las condiciones cromatográficas que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones del análisis cromatográfico

Fase Movil A	Agua con ácido acético glacial al 2%	
Fase Movil B	Agua / acetonitrilo/ ácido acético (58:40:2)	
Tª	20 °C	
Flujo	1.0 mL/min	
Volumen inj.	100 µl	
Gradiente		
	Fase móvil A	Fase móvil B
0-60 min	100%	0%
60-70 min	55%	45%
70-75 min	55%	45%
75-100 min	20%	80%
100-105 min	100%	0%

El método empleado presenta suficiente selectividad y sensibilidad para permitir el análisis del mosto/vino con inyección directa, previa filtración de la muestra por filtros de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro.

La identificación y cuantificación de los compuestos individuales se llevó a cabo usando patrones externos puros, comparando los espectros de absorbancia y los tiempos de retención entre los compuestos. Los espectros se registraron entre 200 y 700 nm, con un ancho de banda de 2.4 nm. La longitud de onda de detección fue de 280 nm para los ácidos benzoicos y el tirosol, 320 nm para los ácidos cinámicos y sus esteres tartáricos, y 260 nm para los flavonoles. Los patrones fueron proporcionados por la casa comercial Merck (Darmstadt, Germany), Fluka (Buch, Switzerland) y Sigma (St. Louis, MO, USA). La identificación de los compuestos fenólicos de los cuales no se dispuso de patrones puros comerciales en el mercado, fue realizada por comparación de su tiempo de retención y características espectrales con datos disponibles en bibliografía. Para estos compuestos, se ha asumido una absorptividad molar igual a la de la molécula del patrón comercial.

Material

Aparatos e instrumentación:

Cromatógrafo líquido Agilent Technologies HP 1100, equipado con:

Bomba cuaternaria (G1313A)

Desgasificador de vacío (G1379A)

Compartimento termostatzado para columna (G1316A)

Inyector automático (G1313A)

Detector de diodos (G1315B)

Columna Zorbax SB-C18 (5 µm, 250 mm x 4.6 mm)

Software ChemStation

Equipo de filtración a vacío Millipore (Billerica, MA, USA)
Filtros HN-0.45 µm Millipore (Billerica, MA, USA)
Filtros de jeringa de nylon 13 mm x 0.45 µm Millipore (Billerica, MA, USA)
Microviales 2 mL Agilent Technologies
Balanza analítica de precisión METTLER TOLEDO AE-260 (Barcelona, España)

Reactivos:

Acetonitrilo calidad HPLC (Merck, Darmstadt, Germany)
Ácido acético glacial calidad HPLC (J.T.Baker, Deventer, Netherlands)
Patrones fenólicos individuales (Merck, Fluka y Sigma)
Agua Milli-Q

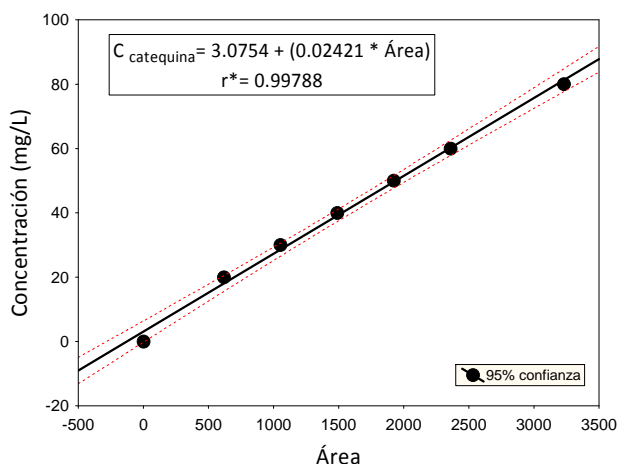
Procedimiento analítico

Recta de calibrado

Como ejemplo representativo de la recta de calibrado de los distintos patrones fenólicos, se muestra el procedimiento correspondiente a la catequina.

Disolución madre de catequina (1 g/L): Pesar con exactitud 0.1 g de patrón de catequina, llevarlo a un matraz aforado de 100 mL y enrasar con la fase móvil A.

A partir de la disolución madre, preparar 7 disoluciones patrón de 0, 20, 30, 40, 50, 60, y 70 mg/L, y analizar mediante HPLC, por triplicado.



Análisis de la muestra

Filtrar la muestra de vino por filtros de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro y analizar mediante HPLC.

Cálculos

Llevar el valor de área obtenido en el análisis cromatográfico a la recta de calibrado y calcular la concentración de catequina, expresada en mg/L:

$$C_{\text{catequina}} \text{ (mg/L)} = 3.0754 + (0.002421 * \text{Área}) \quad r^* = 0.998$$

2.2.3. Cuantificación de pigmentos antociánicos mayoritarios mediante HPLC con detección por fotodiodos (Gómez-Míguez et al., 2004)

La separación, identificación y cuantificación de los pigmentos antociánicos mayoritarias en las muestras se llevó a cabo según una modificación del método descrito por Gómez-Míguez et al. (2004).

Para ello se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent Technologies 1100 Series (Palo Alto, CA, USA), equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador de vacío, compartimento termostatzado para la columna, inyector automático, detector de diodos y software ChemStation. Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa Zorbax SB-C18 de 250 x 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 µm. Las fases móviles utilizadas fueron:

Fase móvil A	Acetonitrilo / ácido fórmico / agua (3:10:87; v:v:v)
Fase móvil B	Acetonitrilo / ácido fórmico / agua (50:10:40; v:v:v)
Fase móvil C	Acetonitrilo / agua (50:50; v:v)

Las fases móviles A y B se usaron en la elución de la muestra. La fase C se usó para la limpieza y estabilización de la columna.

Para conseguir la separación de los distintos antocianos se utilizaron las condiciones cromatográficas que se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones del análisis cromatográfico

Fase Movil A	Acetonitrilo/ácido fórmico/agua (3:10:87)	
Fase Movil B	Acetonitrilo/ácido fórmico /agua (50:10:40)	
Tª	38 °C	
Flujo	0.8 mL/min	
Volumen inj.	50 µL	
Gradiente		
	Fase móvil A	Fase móvil B
0-10 min	94%	6%
10-15 min	70%	30%
15-25 min	60%	40%
25-35 min	55%	45%
35-40 min	50%	50%
40-42 min	40%	60%
42-43 min	94%	6%

La identificación de los antocianos se realizó en base a los tiempos de retención y espectros UV-Vis, por comparación de los datos con la bibliografía existente (Revilla y

Ryan, 2000; Vivar-Quintana et al., 2002). Los espectros se registran entre 250 y 780 nm, con un ancho de banda de 2.4 nm. Para la cuantificación de los compuestos antociánicos en vinos tintos, la falta de disponibilidad de patrones puros comerciales y la dificultad de aislar y purificar cada uno de ellos en el laboratorio, hace que el procedimiento más extendido sea cuantificarlos todos como malvidina-3-*O*-glucósido, antociano mayoritario en los vinos tintos, usado como patrón externo.

Material

Aparatos e instrumentación:

Cromatógrafo líquido Agilent Technologies HP 1100, equipado con:
Bomba cuaternaria (G1313A)
Desgasificador de vacío (G1379A)
Compartimento termostatzado para la columna (G1316A)
Inyector automático (G1313A)
Detector de diodos (G1315B)
Columna Zorbax SB-C18 (5 µm, 250 mm x 4.6 mm)
Software ChemStation

Equipo de filtración para fases móviles Millipore (Billerica, MA, USA)
Filtros para fases móviles HN-0.45 µm Millipore (Billerica, MA, USA)
Filtros de jeringa de nylon 13 mm x 0.45 µm Millipore (Billerica, MA, USA)
Microviales 2 mL Agilent Technologies
Balanza analítica de precisión METTLER TOLEDO AE-260 (Barcelona, España)

Reactivos:

Acetonitrilo calidad HPLC (Merck, Darmstadt, Germany)
Ácido fórmico 98% calidad HPLC (Merck, Darmstadt, Germany)
Malvidina-3-*O*-glucósido Extrasynthese (Genay, France)
Agua Milli-Q

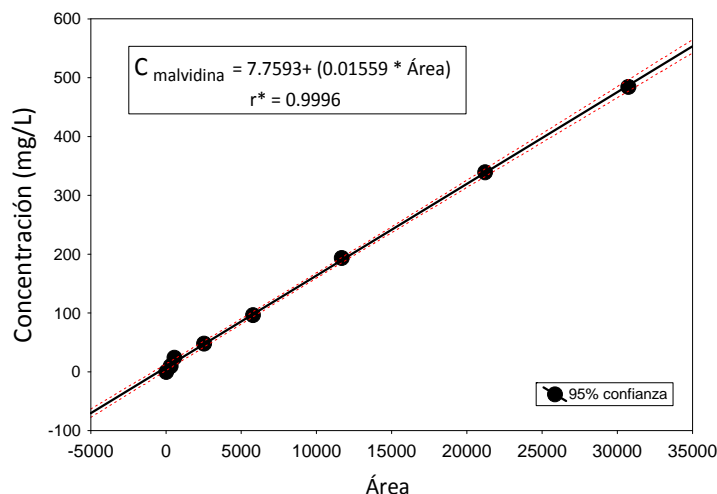
Procedimiento analítico

Recta de calibrado

Disolución madre de malvidina-3-*O*-glucósido (500 mg/L): Pesar con exactitud 0.05 g de malvidina-3-*O*-glucósido, llevarlo a un matraz aforado de 100 mL y enrasar con agua ácida (ajustando el pH a 1.5 con HCl).

A partir de la disolución madre, preparar 7 disoluciones patrón de 10, 25, 50, 100, 200, 350 y 500 mg/L, y analizar mediante HPLC, por triplicado.

Representar el área obtenida para cada disolución patrón frente a la concentración correspondiente para obtener la recta de calibrado.



Análisis de la muestra

Filtrar la muestra de vino por filtros de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro y analizar mediante HPLC.

Cálculos

Llevar el valor de área obtenido en el análisis cromatográfico a la recta de calibrado y calcular la concentración de los pigmentos antociánicos, expresada en mg/L:

$$C_{\text{malvidina}} = 7.7593 + (0.01559 * \text{Área}) \quad r^* = 0.998$$

2.2.4. Identificación y cuantificación de pigmentos antociánicos mediante HPLC acoplado a Espectrometría de Masas (HPLC-ESI-MS)

La separación, identificación y cuantificación de los pigmentos antociánicos, tanto mayoritarios como pigmentos antociánicos derivados, en muestras de vino sometidos a envejecimiento, se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a espectrometría de masas.

Para ello se utilizó un cromatógrafo líquido LaChrom ELITE, equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador de vacío, inyector automático, detector de diodos y software ChemStation. Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa MERK - C18 250 mm x 4 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 µm. Las fases móviles utilizadas fueron:

Fase móvil A	Agua en ácido fórmico al 10%
Fase móvil B	Agua / ácido fórmico / acetonitrilo (6:1:3; v:v:v)
Fase móvil C	Acetonitrilo

Las fases móviles A y B se usaron en la elución de la muestra. La fase C se usó para la limpieza y estabilización de la columna. Para conseguir la separación de los distintos antocianos se utilizaron las condiciones cromatográficas que se muestra en la Tabla 5. Los espectros se registraron entre 200 y 700 nm, con un ancho de banda de 2.4 nm. La longitud de onda de detección fue de 280 y 520 nm.

Tabla 5. Condiciones del análisis cromatográfico

Fase Movil A	Agua en ácido fórmico al 10%
Fase Movil B	Agua / ácido fórmico / acetonitrilo (6:1:3)
Flujo	1 mL/min
Volumen inj.	20 µL

	Gradiente		
	Fase móvil A	Fase móvil B	Fase móvil C
0-50 min	80%	20%	0%
50-60 min	34%	66%	0%
60-70 min	0%	100%	0%
70-80 min	0%	100%	0%
80-87 min	0%	0%	100%
87-102 min	80%	20%	0%

El análisis por ESI-MS se llevó a cabo usando un detector de masas Finigan™ LCQ (Thermoquest, San José, CA) equipado con una fuente de ionización a presión atmosférica (API) por electrospray (ESI), acoplado a una estación de tratamiento de datos X-calibur™ (versión 1.2). El sistema HPLC fue conectado al espectrómetro de masas a través de la salida del detector UV. El gas envolvente y auxiliar fue nitrógeno. Las condiciones de masas utilizadas en la identificación de los disintos pigmentos antocianicos se recogen en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones del método del ESI-MS

Parámetros ESI-ITMS	
Flujo del gas envolvente (L min ⁻¹)	1.2
Flujo del gas auxiliar (L min ⁻¹)	6
Fuente de voltaje (kV)	4.5
Voltaje del capilar (V)	26
Temperatura del capilar (°C)	195
Polaridad	+

Los espectros fueron adquiridos en modo positivo entre m/z 150 y 2000. El espectrofotómetro se programó para realizar varios barridos consecutivos: uno del espectro total de masas entre 150 y 2000 uma (full scan), otro correspondiente al espectro total de masas generada tras la ruptura del ión mayoritario del primer barrido por aplicación de una energía de colisión del 45% (MS²), y el tercero correspondiente al espectro de masas generado tras la ruptura del fragmento mayoritario obtenido en el MS², por aplicación de la misma energía de colisión (MS³).

Material

Aparatos:

Cromatógrafo líquido ELITE LaChrom, equipado con:
 Bomba cuaternaria (L-2130)
 Inyector automático (L-2200)
 Detector de diodos (L-2455)
 Columna MERK - C18 (5 µm, 250 mm x 4.6 mm)
 Detector de masas Finigan™ LCQ (Thermoquest, San José, CA)
 Softwar X-calibur™ (versión 1.2)
 Equipo de filtración para fases móviles Millipore (Billerica, MA, USA)

Filtros para fases móviles HN-0.45 μm Millipore (Billerica, MA, USA)
Filtros de jeringa de nylon 13 mm x 0.45 μm Millipore (Billerica, MA, USA)
Microviales 2 mL (Agilent)

Reactivos:

Acetonitrilo calidad HPLC (Merck, Darmstadt, Germany)
Ácido fórmico 98% calidad HPLC (Merck, Darmstadt, Germany)
Patrón de Malvidina-3-O-glucósido (Genay, France)
Agua Milli-Q

Procedimiento analítico

Análisis de la muestra

El análisis de pigmentos antocianicos se realizó por inyección directa, previa filtración de la muestra por filtros de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro.

Cálculos

La identificación de los pigmentos individuales se realizó por comparación del tiempo de retención, $\lambda_{\text{máx}}$ absorción, y la masa molecular del ión principal y los fragmentos obtenidos en el análisis, con datos descritos previamente en bibliografía (Mateus et al., 2002; Alcalde-Eón et al., 2006; García-Marino et al 2010; De Villiers et al., 2004). La cuantificación de los antocianos se realizó utilizando la malvidina-3-monoglucósido como patrón externo, expresándose la concentración en mg/L.

2.3. Medida del color por Colorimetría Triestímulo. Espacio CIELAB.

La medida del color de las muestras de mostos y vinos se ha realizado por Colorimetría Triestímulo, a partir de medidas espectrofotométricas de transmisión, empleando un espectrofotómetro UV-Visible de fotodiodos, Hewlett Packard 8452 (Palo Alto, CA, USA), dentro de del espectro de la radiación electromagnética visible (380-780 nm).

Material

Aparatos e instrumentación:

Espectrofotómetro UV-Vis HP 8452 (Palo Alto, CA, USA)
Conjunto de filtración de muestras Millipore (Billerica, MA, USA), constituido por jeringa, portafiltro y filtros AP20 de 13 mm de diámetro
Cubetas de vidrio de 2 mm de paso de luz
Centrífuga Orto Alresa (Madrid, España)
Tubos de centrífuga

Procedimiento analítico

Antes de realizar la medida de color es necesario centrifugar el mosto o el vino, durante 5 minutos en centrífuga a 3500 rpm, y filtrar el sobrenadante a través de un filtro Millipore AP20 de 13 mm de diámetro. Además, cuando las muestras se toman en plena fermentación puede ser necesario desgasificar en el baño de ultrasonido para eliminar burbujas que interfieren en la medida. Cuando el vino está muy limpio puede ser suficiente con filtrar.

Para la medida de color del mosto o vino, llenar una cubeta de vidrio de 2 mm de paso de luz con la muestra previamente filtrada, y registrar el espectro de absorción en la región visible

(380-780 nm) por espectrofotometría, frente a agua destilada como blanco de referencia, a intervalos constantes de 2 nm.

Cálculos

Los espectros se integran utilizando el programa de cálculo original CromaLab[®] (Heredia et al., 2004), que tiene en cuenta las recomendaciones de la Comisión Internacional de Iluminación (CIE, 1986). Se ha considerado el espacio uniforme CIE 1976-(L*a*b*) (CIELAB), cuyo desarrollo se encuentra en el Apéndice I de esta Memoria.

Tal como indica el método de ordenadas ponderadas, el espectro de transmisión visible de la muestra se pondera en intervalos constantes de 2 nm, según los factores característicos de las condiciones visuales de referencia elegidas (Wyszecki y Stiles, 1982): Observador Patrón de 10° e Iluminante Estándar D65, que se corresponde con la luz de día natural.

Según las ecuaciones del Apéndice I, se obtienen los valores triestímulo X, Y, Z, que definen el color de la muestra y que son el punto de partida para calcular el resto de las variables cromáticas del espacio de color CIELAB (L*, a*, b*, C*_{ab}, y h_{ab}) y el parámetro colorimétrico diferencia de color ΔE*_{ab}.

La coordenada L* recibe el nombre de *claridad* y puede tomar valores entre 0, correspondiente al negro, y 100, para el blanco. Las coordenadas colorimétricas a* y b* forman un plano perpendicular a la claridad. La *coordenada a** define la desviación del punto acromático correspondiente a la claridad, hacia el rojo si a* > 0, hacia el verde si a* < 0. Análogamente la *coordenada b** define la desviación hacia el amarillo si b* > 0, hacia el azul si b* < 0. A partir de ellas se definen dos magnitudes colorimétricas nuevas mediante las expresiones siguientes:

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$h_{ab} = \arctg(b^*/a^*)$$

El *croma*, C*_{ab}, es el atributo de la percepción visual conforme al que un área parece saturada respecto a un determinado color o tonalidad. Tiene valor 0 para estímulos acromáticos y, por lo general, no pasa de 150 aunque puede superar ese valor para estímulos monocromáticos. El *tono*, h_{ab}, es el color básico de un objeto (azul, amarillo, etc.) definido por su posición angular en un espacio de color cilíndrico. Los valores, por tanto, varían entre 0° y 360°, y para estímulos no cromáticos (a*=0, b*=0) es una magnitud no definida.

El parámetro colorimétrico *diferencia de color* (ΔE*_{ab}), se calculado como la distancia Euclídea entre dos puntos en el espacio tridimensional definido por L*, a*, y b*: ΔE*_{ab} = ((a*)² + (b*)²)^{1/2}.

2.4. Medida de la copigmentación

2.4.1. Medida de la copigmentación en vinos (Boulton, 1996)

La contribución los antocianos libres, copigmentados y pigmentos poliméricos al color total del vino se determinó mediante espectrofotometría por el método de Boulton (1996).

Material

Aparatos:

Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
Vaso precipitado 50 mL
Matraz aforado de 1L
Varilla cristal
Cuchara de pesado
Balanza analítica ST-510 (Gram Precision, Barcelona, España)
Micropipetas Nichiryo 5000F de 10, 20 y 100 μ L
Viales de 5 mL
pH-metro Hanna pHep[®]3 (Hanna Instrument, Guipuzkoa, España)
Electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl
Espectrofotómetro UV-Vis HP 8452 (Palo Alto, CA, USA)
Cubetas de vidrio de 2 mm
Conjunto de filtración de muestras Millipore (Billerica, MA, USA), constituido por jeringa, portafiltro y filtros AP20 de 13 mm de diámetro

Reactivos:

Disolución hidróxido sódico 0.1 N (Panreac, Barcelona, España)
Disolución ácido clorhídrico 0.5N (Panreac, Barcelona, España)
Disolución tampón de pH 4.00 (Merck, Darmstadt, Germany)
Disolución tampón de pH 7.00 (Merck, Darmstadt, Germany)
Disolución para mantener el electrodo del pH-metro (Merck, Darmstadt, Germany)
Sodio disulfito (Panreac, Barcelona, España)
Acetaldehído puro (Merck, Darmstadt, Germany)
Disolución acuosa de acetaldehído al 10% (v/v)
Acido tartárico (L+) PRS (Panreac, Barcelona, España)
Etanol 96%. (J.T.Baker, Deventer, Netherlands)
Cloruro Sódico (Merck, Darmstadt, Germany)

Procedimiento analítico

Ajuste del pH del vino

Calibrar el pH-metro con las disoluciones tampón de pH 7.0 y 4.0. Una vez calibrado, tomar un volumen aproximado de 20 mL de vino y ajustar el pH a 3.6 unidades, añadiendo gota a gota ácido clorhídrico 0.5N o hidróxido sódico 0.1N.

Preparación de vino sintético (12% de etanol, pH 3.60)

Disolver 5 g de ácido tartárico en 120 mL de etanol (96%) y enrasar hasta 1 L con agua destilada en el matraz de 1 L. Ajustar el pH a 3.60 añadiendo ácido clorhídrico 0.5N o hidróxido sódico 0.1N y la fuerza iónica añadiendo 11.68 g. de cloruro sódico (0.2 mol/L, PM= 58.44). Confirmar el pH a 3.60

Preparación de metabisulfito sódico al 20% (m/v)

Disolver 2 g de metabisulfito sódico (también puede utilizarse metabisulfito potásico) en 100 mL de agua destilada.

Preparación de acetaldehído al 10% (v/v)

Disolver 2.55 mL de acetaldehído puro en 18 mL de agua destilada.

Tratamiento con metabisulfito sódico al 20%

Llenar una cubeta de vidrio de 2mm con la muestra de vino (pH 3.60), aproximadamente 0.5 mL, y añadir 10 µL de metabisulfito sódico al 20%. Agitar la cubeta, esperar 1 minuto y medir la absorbancia a 520 nm (A_{520-S}) por espectrofotometría.

Tratamiento con acetaldehído al 10%

Tomar 2 mL de muestra de vino (pH 3.60) y añadir 20 µL de acetaldehído al 10%. Mantener 45 minutos a 25 °C en un vial cerrado, filtrar la muestra y medir la absorbancia a 520 nm (A_{520-A}) por espectrofotometría.

Tratamiento de dilución con vino sintético

Tomar 100 µL de vino (pH 3.60) y diluir con 1900 µL de vino sintético. Mantener 45 minutos a 25 °C en un vial cerrado y medir la absorbancia a 520 nm (A_{520-D})

Cálculos

A partir de los valores de absorbancia a 520 nm medidos (A_{520-A} , A_{520-D} , y A_{520-S}) se calculan los siguientes índices: contribución de los antocianos copigmentados (%AC), pigmentos poliméricos (%PP), y antocianos libres (%AL) al color total del vino, según las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned} \% AC &= ((A_{520-A} - (A_{520-D} \times 20)) / A_{520-A}) \times 100 \\ \% PP &= (A_{520-S} / A_{520-A}) \times 100 \\ \% AL &= (A_{520-A} - (A_{520-S} + (A_{520-D} \times 20))) / A_{520-A} \times 100 \end{aligned}$$

2.4.2. Medida de la copigmentación en vinos por Colorimetría Triestímulo

Siguiendo las premisas del método de Boulton (1996), la magnitud de copigmentación se evaluó también por Colorimetría Triestímulo, aplicando específicamente el espacio de color CIELAB; es decir, por comparación del color del vino, antes y después de ser diluido 1:20 con vino sintético.

Material

Para la medida de la copigmentación por colorimetría se utilizan los mismos aparatos y reactivos que los descritos para el método de Boulton (1996).

Procedimiento analítico

Seguir el mismo procedimiento analítico de la medida de la copigmentación según el método Boulton (1996).

Tras aplicar cada tratamiento, registrar el espectro del vino (380-780 nm) por espectrofotometría frente a agua destilada como blanco de referencia, usando cubeta de vidrio de 2 mm.

Cálculos

El color del vino con efecto de la copigmentación se calcula a partir del espectro del vino que contiene acetaldehído. El color del vino sin efecto de la copigmentación, se calcula a partir del espectro registrado del vino diluido, una vez multiplicado por el factor de dilución (20).

A partir de ambos espectros, real y recalculado, se obtienen los parámetros CIELAB del vino (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h_{ab}) con y sin efecto de la copigmentación, utilizando el programa de cálculo original CromaLab® (Heredia et al., 2004).

2.4.3. Medida de la copigmentación en disoluciones modelo

La contribución de la copigmentación al color de disoluciones modelo de antocianos se evaluó por espectrofotometría y por Colorimetría Triestímulo.

Material

Aparatos e instrumentación:

Espectrofotómetro UV-Vis HP 8452 (Palo Alto, CA, USA)

Cubetas de vidrio de 2 mm

Procedimiento analítico

Registrar el espectro de absorción (380-780 nm) por espectrofotometría de las disoluciones puras de antocianos y sus correspondientes de copigmentación pigmento/copigmento, usando cubeta de vidrio de 2 mm, frente a agua destilada como blanco de referencia.

Cálculos

Determinación espectrofotométrica

La contribución de la copigmentación al color de la disolución de antociano (% copigmentación) se calculó por comparación de la absorbancia a 520 nm de la disolución del pigmento puro (A_0) y de sus correspondientes que contenían distintos copigmentos (A), según la siguiente expresión:

$$\% \text{ copigmentación} = (A - A_0 / A_0) \times 100$$

Determinación por Colorimetría Triestímulo

A partir de los espectros registrados, se obtienen los parámetros CIELAB del vino (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h_{ab}) con y sin efecto de la copigmentación, utilizando el programa de cálculo original CromaLab® (Heredia et al., 2004).

A partir de los parámetros colorimétricos de la disolución pura del pigmento y los de las distintas disoluciones de copigmentación, por comparación se evalúa la contribución cuantitativa y cualitativa de la copigmentación al color de la disolución del antociano,

2.5. Métodos estadísticos

Para el análisis de los datos obtenidos se ha empleado el programa Statistica® vs. 8.0. (StatSoft Inc.: Tulsa, OK, 2007).

- **Análisis descriptivo y exploratorio**

La estadística descriptiva tiene como objetivo la descripción del colectivo estudiado, que puede ser toda la población (censo) o una parte de la misma (muestra). Cuando en una población dada se selecciona adecuadamente un grupo de individuos (muestra), la descripción de éstos es el objetivo de la estadística descriptiva (Martín, 2001). El análisis descriptivo de los datos da una visión general, complementaria a la posterior confirmación mediante el uso de técnicas estadísticas multivariantes.

Los elementos utilizados para el análisis descriptivo de los datos en este estudio son la Media aritmética (\bar{X}) y desviación estándar (DS), y representaciones gráficas tales como diagramas de barras, gráficos de líneas (para comparar dos variables) o “scatter plot” (para estudiar la relación entre dos variables).

- **Modelo Lineal General. Análisis de la Varianza (ANOVA)**

En general, el propósito del Análisis de la Varianza (ANOVA) es encontrar diferencias significativas entre medias, mediante la comparación de las varianzas, entre los grupos formados (Norman & Streiner, 1996).

ANOVA es el análisis estadístico paramétrico de modelos lineales en los que la variable dependiente (respuesta) es numérica y las variables independientes (factores) son cualitativas. Los factores actúan así como criterios de clasificación de los datos. Los distintos valores que puede tomar un factor se denominan niveles. De este modo se forman grupos que se desean comparar (Martín, 2001).

El ANOVA es un análisis univariante (para una sola variable) y MANOVA es multivariante (tiene en cuenta el efecto de más de una variable dependiente, simultáneamente). El porcentaje de variabilidad explicada por un efecto nos da una medida adecuada de la influencia de dicho efecto en la respuesta.

El valor del nivel de *significación estadística p* representa un índice de descenso de la fiabilidad del resultado, de manera que cuanto mayor es su valor menos se puede confiar que la relación observada entre las variables en la muestra es un indicador fiable de la relación entre las respectivas variables en la población. El valor *p* representa la probabilidad de error que implica aceptar como válido el resultado observado, es decir, representativo de la población.

En la aplicación del ANOVA se asume que las variables incluidas en la comparación presentan una distribución normal. Cuando los datos de la variable no se ajustan a una distribución normal, existen alternativas al ANOVA, como el test de *Kruskal-Wallis* para comparar diferencias entre grupos de muestras independientes, y el *test de Friedman* cuando se quiere comparar variables medidas en la misma muestra (Martín, 2001).

- **Técnicas de clasificación**

El *Análisis por Funciones Discriminantes* (DA) tiene como objetivo determinar hasta qué punto es posible separar dos o más grupos de muestras previamente establecidos, y qué variables son las que mejor discriminan entre ellos (Tabachnick & Fidel, 1983; Johnson, 2000).

Para la ejecución del DA es necesario una variables cualitativa (variable dependiente) y un conjunto de variables cuantitativas y/o cualitativas dicotómicas (variables independientes). Su objetivo es estimar mediante funciones lineales, funciones discriminantes, de las variables independientes, la probabilidad de que cada uno de los individuos pertenezca a cada uno de los grupos ya definidos por las categorías de la variable dependiente. Esta clasificación se hará mediante unos criterios o propiedades comunes de los individuos dados por las variables independientes.

La función discriminante representa la mejor separación estadística entre los puntos, es decir, la máxima cantidad de varianza residual.

El método más común dentro del es el procedimiento iterativo: las variables son añadidas (“hacia delante”, forward) o eliminadas (“hacia atrás”, backward) de las funciones discriminantes una a una, realizando un estudio de discriminación después de cada paso (SDA). En el caso del método forward, cada inclusión viene determinada por el valor del estadístico F, que indica, para cada variable, su significación en la discriminación entre los grupos, de tal manera que se incluyen las variables que poseen un valor F superior al establecido en el análisis. De esta forma, el proceso concluye cuando no se da una discriminación significativamente mejor que la anterior.

En resumen, a partir de las variables originales, se establecen funciones que discriminan entre grupos previamente establecidos. Posteriormente, estas funciones pueden ser utilizadas en la clasificación de muestras de origen desconocido asumiendo el error correspondiente, que viene expresado por los propios porcentajes de

clasificación correcta, o porcentajes de acierto, de las muestras utilizadas inicialmente en la obtención de las ecuaciones.

La correlación canónica es el valor atribuido a cada una de las funciones discriminantes extraídas. Ésta mide las desviaciones de las puntuaciones discriminantes entre grupos respecto a las desviaciones totales sin distinguir grupos. Si su valor es grande, próximo a 1, la dispersión será debida a la diferencia entre grupos y, por tanto, la función discriminará mucho (Martín, 2001).

- **Técnicas de regresión**

La regresión es un análisis estadístico que se utiliza cuando el objetivo es predecir o explicar el valor de una variable a partir de los valores de otras.

La *Regresión Múltiple* permite valorar la relación (de forma predictiva) entre una variable dependiente y otras variables independientes, que pueden estar o no correlacionadas. El propósito general de la regresión múltiple es estudiar la dependencia de una variable criterio o respuesta cuantitativa respecto a un conjunto de otras variables predictoras o explicativas, valoradas también cuantitativamente. Permite la predicción de valores para la variable dependiente en cada muestra, a partir de la combinación lineal de variables seleccionadas. El objetivo es encontrar los coeficientes de esta combinación que minimizan la suma de cuadrados residuales entre el valor predicho y el observado. El resultado de la aplicación de estas técnicas es una ecuación que representa la mejor recta de ajuste (la máxima correlación posible) entre las variables estudiadas, de la siguiente forma general:

$$Y = B_1V_1 + B_2V_2 + \dots + B_nV_n + \epsilon$$

Siendo:

Y = valor predictivo de la variable dependiente

B = coeficientes de regresión de cada una de las variables independientes

V = variables independientes

ϵ = constante que representa la predicción cuando las variables independientes son cero

Resultados y Discusión



Capítulo 1. INFLUENCIA DE LA VARIEDAD Y EL GRADO DE MADURACIÓN DE LA UVA EN LA CALIDAD Y ESTABILIDAD CROMÁTICA DE VINOS TINTOS ELABORADOS EN CLIMA CÁLIDO. MODELOS DE PREDICCIÓN CROMÁTICA.

Antecedentes

La calidad y estabilidad del color del vino tinto está directamente relacionada con su composición fenólica, fundamentalmente con los pigmentos antociánicos y otros fenoles extraídos de la uva en la fase de maceración; pero también con el grado de copigmentación y polimerización desarrollado por estos compuestos en etapas subsiguientes de la vinificación (Pérez-Lamela et al., 2007). Las condiciones climáticas particulares en regiones de clima cálido, acentuadas en las últimas décadas por el cambio climático, tienen consecuencias directas sobre el perfil y la concentración de la uva, lo cual afecta a su calidad y además dificulta la determinación del momento óptimo de vendimia. Por ello, en estas regiones, la elaboración de vinos se enfrenta a serios inconvenientes relacionados con las altas temperaturas ambientales, afectando especialmente a la estabilidad cromática de los vinos tintos (Jones et al., 2005; Zamora et al., 2005; Kountoudakis et al., 2011).

Entre las posibles estrategias encaminadas a minimizar estos efectos negativos se encuentra el cultivo de variedades de uva que presenten un mayor potencial fenólico y una mejor adaptación a las condiciones climáticas de cada zona (Schultz y Jones, 2010). En primer lugar, la incidencia de los factores genéticos en la composición de la uva determina que cada variedad tenga una composición fenólica particular y característica. Mientras que algunas variedades contienen cantidades elevadas de compuestos fenólicos, otras son más deficientes en ellos (Mattivi et al., 2006; Fanzone et al., 2012). Igualmente, se ha demostrado que la variedad de uva determina la extractabilidad de estos compuestos debido a diferencias en la estructura celular del fruto (Romero-Cascales et al. (2005). Además, la composición de la uva está significativamente influenciada por el proceso de maduración (Ryan & Revilla, 2003; Pérez-Magariño & González-San José, 2006). Durante éste, se producen numerosos cambios fisicoquímicos y bioquímicos responsables de la acumulación de azúcares en la pulpa y de compuestos fenólicos en los hollejos y las semillas. Por tanto, la variedad y el grado de madurez son los factores que en mayor medida determinan la calidad de la uva en el momento de vendimia, y consecuentemente, la distribución y la concentración de compuestos fenólicos en el vino tinto.

Junto con los factores agronómicos, la técnica de vinificación condiciona el grado de extracción de los fenoles de las diferentes partes de la uva y las reacciones posteriores entre éstos durante la vinificación (González-Neves et al., 2010). Por ello, particularmente en regiones de clima cálido, la aplicación de técnicas enológicas que favorezcan la extracción de estos compuestos durante la maceración, o su estabilización durante la vinificación, representan una interesante alternativa tecnológica a la vinificación tradicional para minimizar las pérdidas de color. En los últimos años, en la D.O. “Condado de Huelva”, se viene constatando que la aplicación de bajas temperaturas durante la maceración es una técnica de vinificación especialmente útil para la elaboración de vinos con una mejor calidad y estabilidad cromática (Gómez-Míguez et al., 2007a; Gómez-Míguez et al., 2007b; Hernanz et al., 2007). A pesar de los excelentes resultados prácticos obtenidos hasta el momento con las variedades mayoritarias de la zona, Syrah (tinta) o Zalema (blanca), el proceso de estabilización del color de los vinos tintos del “Condado de Huelva” aún no está bien esclarecido.

Estas circunstancias han impulsado a estudiar en mayor profundidad el potencial enológico de las principales variedades tintas cultivadas en el “Condado de Huelva” (*Vitis vinifera* var. Syrah, Tempranillo y Cabernet Sauvignon), en función de las características cromáticas y las relaciones color-composición de los vinos elaborados mediante vinificación tradicional. Asimismo, el estudio de la influencia del grado de maduración de la uva en la calidad cromática de los vinos Syrah, particularmente elaborados mediante criomaceración prefermentativa, es de especial interés ya que esta variedad representa el cultivo de uva tinta mayoritario en la zona.

El conocimiento de la influencia de ambos factores en la composición química y el color permitirá definir los tipos de vino que pueden elaborarse a partir de cada variedad, o a partir de uvas con distinto grado de maduración; y por tanto, conducir las vinificaciones en la D.O. “Condado de Huelva” de una manera más adecuada.

Objetivos

El objetivo general es determinar la influencia de la variedad y del grado de maduración de la uva sobre la calidad de vinos tintos monovarietales elaborados en clima cálido, principalmente sobre la composición fenólica y el color. Los objetivos específicos han sido:

- Establecer, mediante el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), diferencias cualitativas y cuantitativas en el perfil antociánico entre vinos procedentes de distintas variedades tintas, o de uvas con diferente grado de maduración.
- Determinar la influencia de la variedad y el grado de maduración de la uva sobre el desarrollo de los procesos de copigmentación y polimerización, implicados en la estabilización del color del vino.
- Aplicar la Colorimetría Triestímulo en el seguimiento de la evolución del color durante la elaboración de los vinos, para establecer diferencias en la calidad y estabilidad cromática entre éstos.
- Aplicar técnicas estadísticas de clasificación para evaluar cuales son las variables químicas y colorimétricas que mejor contribuyen a la diferenciación de los vinos, en función de la variedad y el grado de maduración de la uva.
- Estudiar las relaciones color-composición en los vinos tintos mediante técnicas estadísticas de regresión múltiple con el fin de obtener modelos matemáticos que permitan predecir, de acuerdo con la variedad y el grado de maduración de la uva, el color del vino en función de su composición antociánica.

Parte experimental

Para el desarrollo del presente estudio se elaboraron 15 vinos tintos monovarietales a partir de diferentes variedades de uva *Vitis vinifera* cultivadas en la D.O. "Condado de Huelva", correspondientes a la campaña 2008. Para evaluar la influencia de cada factor por separado (variedad y el grado de maduración de la uva) se consideraron 2 grupos de muestras:

a) *Influencia del factor varietal*: 9 vinos tintos jóvenes a partir de las variedades Cabernet Sauvignon (CS, n=2), Tempranillo (TE, n=4) y Syrah (SY, n=3). Los vinos se elaboraron a escala industrial siguiendo el proceso de vinificación en tinto tradicional. La maceración fermentativa se llevo a cabo durante 6 días a temperatura controlada (20-25 °C). Para cada vino elaborado, las muestras se tomaron por triplicado, quincenalmente, durante 5 meses de estabilización en depósito, desde el final de los procesos fermentativos hasta el momento de su embotellado.

b) *Influencia del grado de maduración de la uva*: 6 vinos tintos jóvenes monovarietales de la variedad Syrah elaborados mediante *criomaceración prefermentativa*. Para este ensayo, se seleccionaron dos partidas de uvas con distinto grado de maduración en el momento de vendimia: 12.5 y 14.0 °Bé. A partir de cada partida de uva, se elaboraron tres replicados de vinos. La maceración prefermentativa en frío se llevo a cabo mediante el almacenamiento previo de la uva en cámaras frigoríficas (0 °C durante 24 horas), tras el cual se procesó la masa de vendimia, manteniéndose en depósito mediante el uso de equipos industriales de refrigeración (10 días, entre 5 y 8 °C). La maceración fermentativa se llevo a cabo durante 10 días a temperatura controlada (20-25 °C). Para cada vino elaborado, las muestras (100 mL) se tomaron por triplicado, en distintos momentos de la vinificación durante 6 meses de estabilización en depósito hasta el momento de su embotellado. Estos momentos se correspondieron con: el final de la maceración prefermentativa, tras el descube, y quincenalmente durante la fase estabilización en depósito.

El perfil antociánico de los vinos se analizó por HPLC (Gómez-Míguez et al., 2004). La medida de los fenoles totales se determinó según Folin-Ciocalteu (1927). El grado de copigmentación (%AC) y polimerización (%PP) se determinaron según el método de Boulton (1996). El color se analizó mediante espectrofotometría de transmisión, y se obtuvieron las coordenadas de color CIELAB con el software CromaLab® (Heredia et al., 2004). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica® ver. 8.0. (StatSoft Inc., 2007).

Sección I: Influencia de la variedad de uva

El estudio comparativo del perfil antociánico y el contenido fenólico mediante el análisis de la varianza (ANOVA) permitió establecer diferencias significativas ($p < 0.05$) en la composición fenólica entre los vinos según la variedad.

Durante la fase de estabilización en depósito, se observó que las diferencias más importantes se produjeron al finalizar los procesos fermentativos. En este momento, los vinos SY y TE presentaron un contenido total antociánico significativamente ($p < 0.05$) superior al del vino CS (Antocianos Totales= 196.6 y 200.7 vs. 146.2 mg/L, respectivamente). Estas diferencias fueron debidas especialmente a una mayor concentración de antocianos monoglucósidos en el vino TE, y en antocianos acetilados y *p*-cumaroilados en el vino SY. En relación al contenido total fenólico, los vinos CS y TE destacaron por presentar mayores concentraciones que el vino SY, siendo la diferencia significativa ($p < 0.05$) (Fenoles Totales= 2666.5 y 2503.1 vs. 1842.6). Por tanto se puede concluir que la extracción de compuestos fenólicos procedentes de distintas partes de la uva estuvo influida por la variedad. Así, TE y SY fueron las variedades que mostraron una mayor intensidad de extracción de pigmentos antociánicos, procedentes del hollejo. Por el contrario, la variedad CS, seguida de TE, mostró una mayor intensidad de extracción de otros compuestos fenólicos, ya que su contenido fenólico total fue mayor.

Posteriormente, debido al propio proceso de vinificación, todos los vinos experimentaron una disminución progresiva en el contenido total antociánico, siendo mucho más acusada durante los dos primeros meses de estabilización y afectando especialmente a los monoglucósidos (40-50% de pérdida). A partir de los 2 meses de estabilización, el contenido antociánico se mantuvo prácticamente estable en todos los vinos. No obstante, se encontraron algunas diferencias en la evolución de las fracciones antociánicas acetiladas y *p*-cumaroiladas según la variedad. El vino TE destacó por una pérdida más intensa en antocianos *p*-cumaroilados, el vino CS en acetilados, y el vino SY sufrió pérdidas en ambas fracciones. La evolución particular de cada fracción según la variedad determinó que las diferencias en el contenido total de antocianos entre los vinos se hicieran progresivamente menores en las etapas finales de la fase de estabilización. Con respecto a la evolución del contenido total fenólico fue similar en los tres vinos. En los primeros meses de estabilización se observó un ligero incremento, tras el cual se produjo una ligera disminución, por lo que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al contenido inicial extraído, para ninguna de las variedades.

Con el objeto de conocer las diferencias globales que existen entre los perfiles antociánicos y evaluar las implicaciones que tienen sobre el color final del vino, se aplicó el análisis de la varianza al conjunto de datos cuando la composición antociánica se consideró prácticamente estabilizada, es decir, a partir del segundo mes de

estabilización en depósito.

Considerando los compuestos antociánicos independientemente, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los vinos para el antociano mayoritario, la Mv 3-gl, aunque el contenido fue ligeramente superior en el vino CS con respecto a TE y SY (55.8 vs. 46.7 y 42.4 mg/L, respectivamente). Por el contrario, los antocianos Df 3-gl y Pt 3-gl sí presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), destacando el vino TE por ser más rico en estos pigmentos (5.1 y 8.3 mg/L). Los vinos CS y SY se caracterizaron por presentar cantidades similares de los distintos antocianos monoglucósidos. No obstante, una concentración notablemente superior de Pt 3-gl en el vino SY permitió una diferenciación significativa ($p < 0.05$) entre ambos (6.5 vs. 3.9 mg/L, respectivamente).

Con respecto a los distintos antocianos acetilados, el vino TE presentó las menores cantidades en todos los compuestos identificados de esta familia. Por el contrario, el vino SY destacó por ser el más rico en ellos, presentando un contenido significativamente ($p < 0.05$) mayor en el derivado acetilado de Pt 3-gl y Pn 3-gl que el vino CS (2.1 vs. 1.3; 4.4 vs. 1.6, respectivamente), mientras que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) para el contenido en el derivado acetilado de Mv 3-gl entre ambos (23.9 y 25.8 mg/L).

El vino SY fue además significativamente ($p < 0.05$) más rico en todos los antocianos *p*-cumaroilados que los vinos CS y TE, especialmente para los derivados cumaroilados de Pn 3-gl y Mv 3-gl (3.1 vs. 0.4 y 0.9; 8.5 vs. 6.2 y 6.1 mg/L, respectivamente).

Si se analiza el contenido total antociánico, se observa que en términos globales, los vinos SY y CS presentaron una concentración superior al de TE (98.5 y 95.3 vs. 70.8 mg/L), debiéndose la diferencia especialmente a los antocianos acetilados (30.4 y 28.7 vs. 7.1, respectivamente). Por tanto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto una menor estabilidad química en el vino TE, a pesar de haber presentado una mayor intensidad de extracción de pigmentos en la fase inicial de la vinificación.

Además, la variedad de uva influyó significativamente en los procesos de copigmentación y polimerización. En términos generales, el vino SY presentó un grado de copigmentación significativamente superior ($p < 0.05$) al de TE y CS (26.8% vs. 15.9% y 11.2%), coincidiendo con una mayor concentración de pigmentos antociánicos en

éste, especialmente antocianos acetilados y *p*-cumaroilados, cuyas características químicas favorecen que se acoplen mejor en reacciones de copigmentación (Davies y Mazza, 1993; Hermosín et al., 2005). Sin embargo, los vinos TE y CS finalmente desarrollaron un mayor grado de polimerización, probablemente debido al mayor contenido fenólico total (45.5% y 42.90% vs. 35.4%). Estos resultados ponen de manifiesto, en esta variedad, una mayor dificultad en la transformación de los complejos de copigmentación en pigmentos más estables.

En cuanto a la evaluación del color por Colorimetría Triestímulo, al finalizar los procesos fermentativos los vinos SY y TE fueron los más oscuros y de mayor intensidad colorimétrica, debido a la mayor extracción de pigmentos en estas variedades ($L^* = 68.3$ y 72.3% ; $C^*_{ab} = 31.7$ y 34.6 , respectivamente). Por el contrario, la menor extracción experimentada por CS, dio lugar a vinos más claros y de un color menos intenso ($L^* = 75.4\%$ y $C^*_{ab} = 28.5$). Además, el vino SY destacó por presentar los valores más negativos de tono, es decir, una tonalidad roja con matices azulados más notables ($h_{ab} = -8.7^\circ$ vs. -5.5 y -5.3° , con respecto a TE y CS).

Posteriormente, cuando la composición fenólica se consideró estabilizada, los vinos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para el croma (C^*_{ab}) y el tono (h_{ab}) según la variedad, aunque no para la claridad (L^*). La variedad SY dio lugar a vinos con una mayor intensidad cromática y una clara tonalidad rojo-azulada ($C^*_{ab} = 24.5$, $h_{ab} = -2.5^\circ$), lo cual es coherente con la mayor concentración de pigmentos y grado de copigmentación desarrollado. El vino CS, con una concentración de pigmentos similar al vino SY pero un menor grado de copigmentación, destacó por ser el vino más oscuro y de intensidad cromática semejante al de SY ($L^* = 75.5\%$, $C^*_{ab} = 24.01$), aunque presentó una tonalidad roja más neta ($h_{ab} = +2.9^\circ$). Por último, el vino TE, que presentó la menor concentración de pigmentos y un mayor grado de polimerización, dio lugar a los vinos de menor intensidad cromática ($C^*_{ab} = 19.8$) y una tonalidad roja con ligeros matices anaranjados ($h_{ab} = +9.7^\circ$). Por tanto, aunque no se han podido establecer diferencias significativas ($p < 0.05$) para todos los parámetros cromáticos entre los vinos, se puede concluir que el perfil cromático de éstos fue notablemente distinto según la variedad de uva con la que fueron elaborados.

El estudio de las diferencias de color (ΔE^*_{ab}) entre el inicio y el final de la fase de estabilización (entre 1 y 5 meses) permitió evaluar la estabilidad del color de los vinos. Además, para comparar el sentido de la modificación del color se han calculado los incrementos de claridad ($\Delta L = L_n - L_{n-1}$), croma ($\Delta C = C^*_{ab(n)} - C^*_{ab(n-1)}$) y tono ($\Delta h = h_{ab(n)} - h_{ab(n-1)}$) en esas mismas etapas.

El mayor valor obtenido para este parámetro en el vino SY frente a TE y CS ($\Delta E^*_{ab} = 13.3$ vs. 10.7 y 4.6, respectivamente) indicó una mayor variación de color en el primero. En esta etapa, el sentido de la modificación de los parámetros colorimétricos (L^* , C^*_{ab} , y h_{ab}) fue similar en todos los vinos independientemente de la variedad de uva. Particularmente se obtuvieron valores positivos en los incrementos de claridad y tono (ΔL y Δh) pero negativos en el incremento de croma (ΔC), es decir, todos los vinos incrementan su claridad, tienden a perder los matices azulados y disminuyen su intensidad cromática. Por tanto, la variación de color observada (ΔE^*_{ab}) es debida a una pérdida de color en los vinos, lo cual es coherente con la evolución de los pigmentos extraídos. Particularmente, en el vino TE, la mayor variación del color obtenida es indicativa de una menor estabilidad cromática, siendo coherente con un menor grado de polimerización al final de la estabilización. Estos resultados ponen de manifiesto que el vino SY, aun habiendo presentado una mayor concentración de pigmentos antociánicos y un mayor grado de copigmentación, presenta una mayor dificultad en la transformación de los complejos de copigmentación en pigmentos más estables, debido probablemente al menor contenido en otros compuestos fenólicos, los cuales son necesarios para la estabilización química y cromática del vino tinto.

La aplicación del análisis estadístico discriminante a la información química y colorimétrica obtenida permitió una clara diferenciación de los vinos según la variedad. Los dos primeros componentes principales, con autovalores superiores a 1, explicaron el 100% de la varianza. Para la correcta clasificación de las muestras, el modelo incluyó diversos pigmentos antociánicos, parámetros de color y el grado de copigmentación y polimerización; entre los cuales, los derivados antociánicos acetilados y *p*-cumaroilados; la claridad (L^*) y el croma (C^*_{ab}), y el grado de polimerización tuvieron una mayor significación ($p < 0.05$).

Las relaciones color-pigmentos se realizaron mediante el análisis de regresión lineal múltiple aplicado al conjunto de datos de los vinos de las tres variedades. En este sentido, los datos colorimétricos se han relacionado con la concentración de los antocianos agrupados de distintas formas, para comparar el peso de cada una de las fracciones antociánicas sobre cada variedad, a través de modelos de predicción de color. Aquí se han mostrado únicamente los resultados más significativos ($p < 0.05$). Las variables dependientes estudiadas fueron los parámetros colorimétricos claridad (L^*), croma (C^*_{ab}) y tono (h_{ab}), y como variables independientes se han considerado los distintos antocianos agrupado el grupo sustituyente: (monoglucósidos),

(monoglucósidos + derivados acetilados) y (monoglucósidos + derivados acetilados + derivados *p*-cumaroilados).

En el primer caso, considerando en el análisis predictivo únicamente los distintos antocianos monoglucósidos, se obtuvieron los mayores valores de correlación múltiple (R) en las ecuaciones para la el vino TE ($R \sim 0.9$), mientras que para los vinos SY y CS las correlaciones fueron menores ($R < 0.80$). En el caso del vino TE, los valores más altos se obtuvieron para las variables dependientes C^*_{ab} y h_{ab} ($R = 0.92$). Las ecuaciones obtenidas permiten predecir el peso de cada una de las antocianinas consideradas sobre los parámetros colorimétricos en esta variedad. En estas ecuaciones se observa que la antocianidina que tiene un mayor peso sobre los parámetros colorimétricos es la Df 3-gl, que está relacionada positivamente con el croma (C^*_{ab}) y negativamente con el tono (h_{ab}); es decir, el incremento en esta antocianina produce un incremento de la intensidad colorimétrica y una disminución del tono del color del vino TE.

Vino TE:

$$C^*_{ab} = +1.23 [Df \text{ 3-gl}] + 0.19 [Pt \text{ 3-gl}] + 0.06 [Pn \text{ 3-gl}] - 0.58 [Mv \text{ 3-gl}]$$

$$h_{ab} = - 1.01 [Df \text{ gl-3gl}] + 0.25 [Pt \text{ 3-gl}] - 0.05 [Pn \text{ 3-gl}] - 0.13 [Mv \text{ 3-gl}]$$

Cuando se consideró en la ecuación de regresión la información aportada por los derivados acetilados (monoglucósidos+derivados acetilados), el coeficiente de correlación (R) aumentó en todos los parámetros colorimétricos para todos los vinos. Por tanto, la inclusión de esta fracción antociánica permitió un mejor ajuste en la predicción del color de las tres variedades, especialmente para los vinos SY y CS. Los mejores valores obtenidos fueron para la claridad en el vino SY ($R=0.85$) y para el tono en el CS ($R= 0.89$). En el caso de TE, el peso relativo de los antocianos acetilados sobre la predicción del color parece ser menor que en los vinos SY y CS, ya que el hecho de haber considerado este grupo produjo en TE un menor incremento del ajuste de la relación color-composición ($R= 0.93-0.94$). Las ecuaciones que proporcionaban las mejores correlaciones para los vinos SY y CS se presentan a continuación. Como se puede observar, para el vino SY, el derivado acetilado que más peso tuvo sobre la claridad fue el de Mv 3-gl. En cuanto al vino CS, el de Pt 3-gl tuvo una mayor influencia en el tono.

Vino SY:

$$L^* = -0.66 [\text{Df 3-gl}] + 0.06 [\text{Pt 3-gl}] + 0.64 [\text{Pn 3-gl}] - 0.61 [\text{Mv 3-gl}] - 0.02 [\text{AcPt}] + 0.05 [\text{AcPn}] - 0.23 [\text{AcMv}]$$

Vino CS:

$$h_{ab} = -0.28 [\text{Df 3-gl}] - 1.3 [\text{Pt 3-gl}] - 2.40 [\text{Pn 3-gl}] + 2.41 [\text{Mv 3-gl}] + 0.64 [\text{AcPt}] + 0.18 [\text{AcPn}] + 0.37 [\text{AcMv}]$$

Por último, se comprobó la importancia del grupo de los antocianos *p*-cumaroilados sobre las variables colorimétricas. Para ello, la información aportada por éstos se incluyó en la ecuación de regresión además de las antocianinas monoglucósidos y los derivados acetilados. Independientemente de la variedad, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de esta fracción antociánica en la predicción del color de todas las variables dependientes, siendo especialmente significativa en los vinos TE y CS ($R > 0.97$). Sin embargo, la inclusión de los antocianos *p*-cumaroilados únicamente tuvo un efecto notable para la predicción del croma en el vino SY, observándose un aumento significativo del coeficiente de correlación ($R = 0.9$).

Se han encontrado diferencias entre las variedades en cuanto al antociano *p*-cumaroilado que tiene un mayor peso sobre las características cromáticas. En el vino TE, para todas las variables colorimétricas, los derivados cumaroilados de Mv 3-gl y Pn 3-gl tuvieron un mayor peso en la predicción, siendo particularmente significativa ($p < 0.05$) para la claridad y el croma. Por otro lado, en el vino CS fue el derivado de Pn 3-gl el que más influyó sobre las tres variables dependientes, seguido del derivado de Mv 3-gl. Por último, en el vino SY, el derivado de Mv 3-gl ejerció una mayor influencia en la predicción del croma. Las ecuaciones obtenidas en las mejores correlaciones han sido:

Vino TE:

$$L^* = -2.31 [\text{Df 3-gl}] + 0.65 [\text{Pt 3-gl}] + 0.11 [\text{Pn 3-gl}] + 0.39 [\text{Mv 3-gl}] - 0.36 [\text{AcPt}] - 0.47 [\text{AcPn}] + 1.27 [\text{AcMv}] - 0.99 [\text{CumPt}] - 0.41 [\text{CumPn}] + 1.00 [\text{CumMv}]$$

$$C^*_{ab} = +1.66 [\text{Df 3-gl}] - 0.82 [\text{Pt 3-gl}] - 0.07 [\text{Pn 3-gl}] + 0.06 [\text{Mv 3-gl}] + 0.14 [\text{AcPt}] + 0.97 [\text{AcPn}] - 0.37 [\text{AcMv}] + 0.82 [\text{CumPt}] + 0.31 [\text{CumPn}] - 1.00 [\text{CumMv}]$$

$$h_{ab} = - 1.11 [Df \text{ 3-gl}] + 1.07 [Pt \text{ 3-gl}] + 0.02 [Pn \text{ 3-gl}] - 0.85 [Mv \text{ 3-gl}] + 0.08 [AcPt] - 0.72 [AcPn] - 0.01 [AcMv] - 0.47 [CumPt] - 0.37 [CumPn] + 0.77 [CumMv]$$

Vino CS:

$$L^* = - 5.51 [Df \text{ 3-gl}] - 2.31 [Pt \text{ 3-gl}] - 3.22 [Pn \text{ 3-gl}] + 21.2 [Mv \text{ 3-gl}] - 1.11 [AcPt] + 6.38 [AcPn] - 3.61 [AcMv] - 0.29 [CumPt] - 8.04 [CumPn] - 1.83 [CumMv]$$

$$C^*_{ab} = + 4.96 [Df \text{ 3-gl}] + 3.10 [Pt \text{ 3-gl}] + 2.80 [Pn \text{ 3-gl}] - 22.1 [Mv \text{ 3-gl}] + 1.64 [AcPt] - 6.93 [AcPn] + 4.13 [AcMv] - 0.19 [CumPt] + 8.94 [CumPn] + 1.47 [CumMv]$$

$$h_{ab} = + 0.27 [Df \text{ 3-gl}] - 5.92 [Pt \text{ 3-gl}] - 1.92 [Pn \text{ 3-gl}] + 9.84 [Mv \text{ 3-gl}] - 2.33 [AcPt] + 2.37 [AcPn] - 2.32 [AcMv] + 0.51 [CumPt] - 3.73 [CumPn] + 2.79 [CumMv]$$

Vino SY

$$C^*_{ab} = + 1.60 [Df \text{ 3-gl}] - 0.56 [Pt \text{ 3-gl}] + 0.93 [Pn \text{ 3-gl}] + 0.61 [Mv \text{ 3-gl}] + 0.41 [AcPt] - 0.18 [AcPn] + 0.06 [AcMv] - 0.90 [CumPt] + 1.51 [CumPn] - 2.73 [CumMv]$$

En resumen, los resultados obtenidos muestran que la variedad de uva influye notablemente en la predicción del color del vino. Así, a partir de los antocianos monoglucósidos se puede obtener una buena predicción del croma y del tono del vino TE, siendo la Df 3-gl el compuesto que tienen un mayor peso sobre el color. Sin embargo, es necesario incluir el grupo de antocianos acetilados y *p*-cumaroilados para obtener un ajuste más adecuado en la predicción del color de los vinos CS y SY. En el caso de CS, teniendo en cuenta esta información química, se consigue una buena predicción de todos los parámetros cromáticos, mientras que para el vino SY, la relación mejora fundamentalmente para el croma.

Conclusiones

Las principales conclusiones extraídas en este estudio son las siguientes:

1. El estudio comparativo del perfil antociánico mediante el análisis de la varianza ha permitido establecer diferencias significativas ($p < 0.05$) en la

composición fenólica entre los vinos según la variedad. Entre los antocianos con mayor capacidad discriminadora están la Df 3-gl y Pt 3-gl para los vinos de TE, y el derivado acetilado de Pt 3-gl y Pn 3-gl además de los derivados *p*-cumaroilados en el vino SY.

2. La variedad de uva influyó notablemente en los procesos de copigmentación y polimerización. El vino SY presentó el mayor grado de copigmentación pero el menor desarrollo de polimerización, poniendo de manifiesto una mayor dificultad en la transformación de los complejos de copigmentación en pigmentos más estables. Por el contrario, los vinos TE y CS, con un mayor contenido en fenoles totales, desarrollaron un mayor grado de polimerización.
3. El estudio del perfil cromático de los vinos ha puesto de manifiesto que SY y CS, con mayores concentración de pigmentos, produjeron los vinos de mayor intensidad de color; mientras que por el contrario, el vino de TE fue el menos intenso. Aunque todos los vinos presentan tonalidades en el área de los rojos, SY contiene matices más azulados, mientras que TE muestra una ligera tendencia a los rojo-anaranjados.
4. Teniendo en cuenta tanto la composición fenólica como las características colorimétricas, cabe destacar que TE y SY fueron las variedades donde se produjo la mayor extracción de pigmentos y color, pero presentaron una menor estabilidad química, por lo que experimentaron mayores modificaciones del color (ΔE^*_{ab}) a lo largo del proceso de vinificación.
5. La aplicación del análisis discriminante a la información química y colorimétrica obtenida permitió una clara diferenciación de los vinos según la variedad. Los antocianos acetilados y *p*-cumaroilados; así como la claridad, el croma, y el grado de polimerización fueron las variables con mayor significación en la diferenciación.
6. El análisis por regresión lineal múltiple para el estudio de las relaciones color-composición conduce a ecuaciones que permiten predecir el color final de los vinos a partir de su composición antociánica. Se han conseguido las mejores correlaciones para las variedades TE y CS.

Sección II: Influencia del grado de madurez de la uva

Con el objetivo de evaluar la influencia del grado de madurez de la uva en el proceso de extracción, se comparó el contenido antociánico y fenólico los vinos una vez que finalizó la etapa de maceración. En este momento, el vino SyB presentó una concentración antociánica total significativamente superior ($p < 0.05$) al del vino SyA (AT= 290.4 vs. 215.3 mg/L, respectivamente). Igualmente, su contenido total fenólico fue mayor, aunque en este caso la diferencia entre los vinos no fue significativa ($p < 0.05$) (FT= 1682.1 vs. 1542.1 mg/L). Por tanto, la elaboración de vinos Syrah a partir de uvas más maduras dio lugar a una extracción más intensa, tanto de pigmentos antociánicos del hollejo como de otros fenoles procedentes de otras partes de la uva. Según Kountoudakis et al. (2011), en términos generales, la uva menos madura posee un contenido antociánico menor que suele ser de más difícil extracción, mientras que en la uva más madura este contenido es mayor y además fácilmente extraíble, lo cual explica las diferencias encontradas.

Tal y como era esperado, durante la fase de estabilización en depósito se produjo una disminución del contenido antociánico y fenólico en los dos tipos de vinos, aunque la mayor extracción conseguida por las uvas más maduras determinó que las diferencias establecidas inicialmente se mantuvieran durante todo el proceso de vinificación. Así, al final del estudio, los vinos elaborados a partir de uvas más maduras (SyB) presentaron un contenido antociánico y fenólico mayor (AT= 204 vs. 149 mg/L; Fenoles Totales= 1900 mg/L vs. 1850 mg/L). Además, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración de la mayoría de los antocianos individuales entre los dos tipos de vino. El vino elaborado a partir de uvas más maduras (SyB) destacó por ser más rico en antocianos monoglucósidos y derivados acetilados, y entre éstos, particularmente en Mv 3-gl, Pt 3-gl y los derivados correspondientes de estas antocianinas.

En relación al desarrollo de los procesos de copigmentación y polimerización, se comprobó que la contribución relativa de cada grupo de pigmentos al color total fue diferente en cada tipo de vino. En las etapas iniciales de la estabilización, el vino elaborado con uva menos madura (SyA) presentó un mayor grado de copigmentación (25%), aunque posteriormente, este porcentaje disminuyó significativamente (10%). Por el contrario, el vino elaborado con uva más madura (SyA), inicialmente presentó un menor grado de copigmentación (17%) pero experimentó un mejor desarrollo de

este proceso, el cual continuó incrementando ligeramente en etapas más avanzadas de la vinificación (20%).

Independientemente del tipo de uva, durante la etapa de estabilización se observó un incremento progresivo de la contribución de pigmentos poliméricos para ambos vinos. Sin embargo, al final de la vinificación el vino SyB alcanzó un mayor grado de polimerización que el vino SyA (49% vs. 37%), lo cual indica que la proporción de pigmentos más estables en este vino fue superior. El mayor contenido fenólico extraído junto con un desarrollo más adecuado de la copigmentación justifica la evolución más rápida e intensa del proceso de polimerización en el vino procedente de uvas más maduras (SyB).

Para la evaluación del color, se ha considerado diferencia de color (ΔE^*_{ab}) como índice de modificación del color a lo largo de las dos etapas de la vinificación: 1) la maceración y 2) la estabilización. Mediante el estudio de las diferencias de color entre el inicio y el final de estas etapas para cada vino ($\Delta E1$ y $\Delta E2$), se han evaluado las implicaciones cromáticas de ambos procesos y la influencia del grado de maduración de la uva en ellos. Además, para comparar el sentido de la modificación del color se han calculado los incrementos de claridad, croma y tono (ΔL , ΔC , y Δh) en esas mismas etapas.

Durante la fase de maceración (entre el final de la maceración prefermentativa y el descube), se comprobó que el vino SyB experimentó una mayor modificación del color que el vino SyA ($\Delta E1= 12.3$ vs. 2.9 , respectivamente). Particularmente, en estos vinos se produjo un mayor descenso de la claridad ($\Delta L1= -8.5$ vs. -2.3%) e incremento del croma ($\Delta C1= +7.7$ vs. $+2.3$), es decir, un mayor oscurecimiento e incremento de la intensidad colorimétrica. Como consecuencia, al final de la etapa de maceración, el vino SyB presentó un color más oscuro e intenso que el vino SyA ($L^*= 70.6$ vs. 78.1% , $C^*_{ab}= 34.8$ vs. 28.6). Por tanto, la evaluación conjunta de los parámetros colorimétricos indicó que la extracción de color fue más intensa cuando el vino se elaboró a partir de uva más madura, coincidiendo con la mayor extracción en pigmentos conseguida. Sin embargo, en esta etapa inicial de la vinificación, el grado de maduración de la uva tuvo una menor influencia sobre la variación del tono (h_{ab}), ya que en los dos tipos de vino los valores alcanzados en este parámetro fueron similares ($h_{ab}= -9.1^\circ$ vs. -10.6°). Los valores negativos obtenidos indican una tonalidad roja con notables matices azulados, propia de etapas iniciales de la vinificación.

Durante la fase de estabilización (entre 1 y 6 meses de estabilización), la diferencia de color obtenida para el vino SyB fue de menor magnitud que para el vino SyA ($\Delta E_2 = 6.4$ vs. 9.4), indicando una menor variación de color en el vino elaborado con uvas más maduras y por tanto una mayor estabilidad cromática. En esta etapa, independientemente del grado de maduración de la uva, el sentido de la modificación de todos los parámetros colorimétricos fue contrario al de la fase de maceración. Particularmente se obtuvieron valores positivos en los incrementos de claridad y tono (ΔL_2 y Δh_2) pero negativos en el incremento de croma (ΔC_2), es decir, todos los vinos incrementan su claridad, tienden a perder los matices azulados y disminuyen su intensidad cromática. Por tanto, la modificación del color durante la fase de estabilización no solo se debió a una pérdida cuantitativa (L^* y C^*_{ab}), lo cual es coherente con la disminución del contenido antocianico y fenólico observada en ambos casos; sino también debida a una importante evolución cualitativa (h_{ab}), debida al desarrollo de los procesos de copigmentación y el incremento de la polimerización. La comparación de la magnitud de la variación de cada parámetro puso de manifiesto que los incrementos de la claridad fueron similares entre los vinos ($\Delta L_2 = +4.9$ vs. $+4.3\%$), aunque el vino SyB fue el que experimentó una menor pérdida de intensidad de color ($\Delta C_2 = -3.7$ vs. -8.3) y un mayor incremento del tono ($\Delta h = +4.1^\circ$ vs. $+2.9^\circ$). Cabe destacar que aunque durante este periodo las modificaciones del color fueron tanto de carácter cuantitativo como cualitativo, en el vino elaborado con uva menos madura (SyA) estuvieron afectados en mayor medida los atributos de color cuantitativos, y entre éstos, fundamentalmente el croma (C^*_{ab}).

Como era de esperar, las diferencias encontradas entre los vinos en cuanto a su composición fenólica y en el desarrollo de la copigmentación y polimerización se reflejó en las características cromáticas de éstos. Al final de la vinificación, los dos vinos presentaron un perfil cromático significativamente ($p < 0.05$) distinto. El vino Syrah, elaborado a partir de uva más madura (SyB), con un mayor contenido antocianico y un mayor desarrollo de la polimerización presentó un color significativamente ($p < 0.05$) más oscuro y de mayor intensidad ($L^* = 71.7$ vs. 79.8% ; $C^*_{ab} = 32.5$ vs. 22.5), aunque de una tonalidad roja más neta ($h_{ab} = +0.1^\circ$ vs. -3.5°). La diferencia de color calculada entre los vinos al final de la vinificación fue de 10.1 u. Teniendo en cuenta que el umbral de discriminación de un observador normal es de 3 unidades CIELAB aproximadamente (Martínez et al., 2001), se puede afirmar que las diferencias en el grado de maduración de la uva con la que se elaboró el vino Syrah, produjeron diferencias de color claramente apreciables.

Además, con el objetivo de comprobar cuales fueron las variables que más contribuyeron a diferenciar los vinos según el grado de maduración de la uva, se aplicó el Análisis de Componentes Principales a la información química y colorimétrica obtenida durante la fase de estabilización ($n= 30$ para cada vino). Cuando se consideró en el análisis estadístico únicamente a la composición antociánica, los dos primeros componentes principales extraídos (CP1 y CP2), con un autovalor mayor a la unidad, lograban explicar el 77.2% de la varianza total (CP1= 66.2% y CP2= 11.2%). Se observó que las variables más correlacionadas con estos CP fueron: Mv 3-gl, derivados acetílicos de Mv 3-gl y Pt 3-gl, y el derivado *p*-cumaroilado de Pn 3-gl con el CP1; y la Df 3-gl con el CP2. Sin embargo, cuando se consideraron en el análisis los parámetros de color, se obtuvo que los dos primeros componentes principales, con un autovalor mayor a la unidad, lograban explicar hasta el 98.9% de la varianza total (CP1= 76.4% y CP2=22.5%), poniendo de manifiesto el mayor peso de la información colorimétrica en la clasificación de los vinos según el grado de maduración de la uva. En éste caso, las variables más correlacionadas con el CP1 fueron el croma y la claridad (C^*_{ab} y L^*) y la coordenada a^* , mientras que con el CP2 fue el tono (h_{ab}).

Por último, de la misma manera que se hizo con los vinos tintos jóvenes elaborados a partir de diferentes variedades de uva, se estudiaron las relaciones color-composición mediante el análisis de regresión lineal múltiple aplicada al conjunto de datos de los vinos, en este caso según el grado de madurez de la uva y durante la fase de estabilización (entre 1 y 6 meses). De nuevo, las variables dependientes fueron los parámetros colorimétricos claridad (L^*), croma (C^*_{ab}) y tono (h_{ab}), y como variables independientes los distintos antocianos agrupados según el grupo sustituyente: (monoglucósidos), (monoglucósidos+derivados acetilados), (monoglucósidos+derivados acetilados+derivados *p*-cumaroilados).

En el análisis predictivo, la consideración los distintos antocianos monoglucósidos produjo coeficientes de correlación inferiores a 0.85 en ambos tipos de vino. No fue posible, por tanto, una buena predicción de los distintos parámetros colorimétricos si se tenía en cuenta únicamente la información aportada por esta fracción antociánica.

La inclusión de los derivados acetilados dio lugar a un incremento el coeficiente de correlación (R) en todos los parámetros colorimétricos para todos los vinos. Sin embargo, únicamente se obtuvieron coeficientes de correlación superiores 0.90 para la predicción de la claridad (L^*) en el vino SyB ($R= 0.93$), y del tono en el vino SyA ($R= 0.90$). Las ecuaciones obtenidas en estas variables para cada vino se presentan a

continuación. Como se puede observar, para el vino SyB, el derivado acetilado que más peso tuvo sobre la claridad fue el de Mv 3-gl, estando ambos parámetros relacionados positivamente; mientras que para el vino SyA, fueron tanto el de Pt 3-gl como el de Mv 3-gl.

Vino SyB:

$$L^* = - 1.01 [Df\ 3-gl] - 1.01 [Pt\ 3-gl] - 0.26 [Pn\ 3-gl] + 0.05 [Mv\ 3-gl] + 0.68 [AcPt] + 0.49 [AcPn] + 0.93 [AcMv]$$

Vino SyA:

$$h_{ab} = - 0.27 [Df\ 3-gl] + 0.35 [Pt\ 3-gl] - 0.96 [Pn\ 3-gl] + 1.42 [Mv\ 3-gl] + 1.21 [AcPt] - 0.28 [AcPn] - 1.8 [AcMv]$$

Igual que en el estudio de los vinos elaborados con distintas variedades de uva, se confirmó que las mejores correlaciones se obtenían para ambos vinos al considerar en el análisis la información aportada por el grupo de los derivados *p*-cumarilados y especialmente en los vinos SyB, ya que en éstos se obtuvieron valores de $R > 0.95$ para todos los parámetros colorimétricos. Los mejores valores de correlación en el vino SyB se obtuvieron para L^* , C^*_{ab} y h_{ab} ($R = 0.97$, 0.97 y 0.96 , respectivamente), y en el vino SyA para L^* y h_{ab} ($R = 0.93$ y 0.94); cuyas ecuaciones se presentan a continuación. Cabe destacar el distinto comportamiento de correlación que se ha encontrado para algunos de los antocianos con mayor significación en el vino Syrah según el grado de maduración de la uva. En el primer caso (SyB), con una mayor significación ($p < 0.05$), incrementos en Df 3-gl, Pt 3-gl, Pn 3-gl y el derivado *p*-cumarilados de Pn 3-gl producen un oscurecimiento del vino y un incremento de la intensidad de color. Con respecto al tono, incrementos en el derivado *p*-cumarilado de Pt 3-gl inducen un incremento del tono. En el caso del vino SyA, los incrementos en Pt 3-gl, y el derivado acetilado de Mv 3-gl y *p*-cumarilado de Pn 3-gl están relacionados positivamente con la claridad y el tono.

Vino SyB:

$$L^* = - 1.32 [Df\ 3-gl] - 2.12 [Pt\ 3-gl] + 2.99 [Pn\ 3-gl] + 0.47 [Mv\ 3-gl] + 0.89 [AcPt] - 0.80 [AcPn] + 0.43 [AcMv] - 0.34 [CumPt] - 1.13 [CumPn] + 0.28 [CumMv]$$

$$C^*_{ab} = +1.37 [Df\ 3-gl] + 2.13 [Pt\ 3-gl] - 2.84 [Pn\ 3-gl] - 0.36 [Mv\ 3-gl] - 1.21 [AcPt] + 0.53 [AcPn] - 0.29 [AcMv] + 0.17 [CumPt] + 1.45 [CumPn] - 0.59 [CumMv]$$

$$h_{ab} = + 0.75 [Df \text{ 3-gl}] - 0.83 [Pt \text{ 3-gl}] - 0.88 [Pn \text{ 3-gl}] + 0.27 [Mv \text{ 3-gl}] + 0.42 [AcPt] - 0.48 [AcPn] - 0.09 [Ac \text{ Mv}] + 1.14 [CumPt] + 0.43 [CumPn] + 0.13 [CumMv]$$

Vino SyA:

$$L^* = - 0.29 [Df \text{ 3-gl}] + 0.86 [Pt \text{ 3-gl}] + 1.13 [Pn \text{ 3-gl}] - 5.32 [Mv \text{ 3-gl}] + 0.44 [AcPt] + 0.54 [AcPn] + 2.81 [AcMv] + 0.75 [CumPt] + 2.33 [CumPn] - 0.73 [CumMv]$$

$$h_{ab} = - 0.39 [Df \text{ 3-gl}] + 0.86 [Pt \text{ 3-gl}] + 0.72 [Pn \text{ 3-gl}] - 2.93 [Mv \text{ 3-gl}] + 1.59 [AcPt] + 0.44 [AcPn] + 0.79 [Ac \text{ Mv}] + 0.79 [CumPt] + 2.99 [CumPn] - 1.12 [CumMv]$$

Por tanto, en las relaciones color-composición parece existir una cierta influencia del grado de maduración de la uva en la predicción del color del vino, siendo la predicción más significativa cuando éstos se elaboraron con uvas más maduras.

Conclusiones

Las principales conclusiones que se extraen de los resultados obtenidos son las siguientes:

1. El estudio comparativo del perfil antociánico mediante el análisis de la varianza ha permitido establecer diferencias importantes en la composición fenólica entre los vinos según el grado de maduración de la uva. Entre los antocianos con mayor capacidad discriminadora están los antocianos monoglucósidos y sus derivados acetilados, fundamentalmente de Mv 3-gl, y Pt 3-gl.
2. El grado de maduración de la uva influyó significativamente en los procesos de copigmentación y polimerización. El vino elaborado con uva más madura presentó un desarrollo más adecuado de la copigmentación dando lugar a un mayor grado de polimerización, poniendo de manifiesto una mayor facilidad en la transformación de los complejos de copigmentación en pigmentos más estables.
3. El estudio del perfil cromático de los vinos ha puesto de manifiesto que el vino Syrah elaborado a partir de uva más madura, con un mayor contenido antociánico y un mayor desarrollo de la polimerización, presentó un color

significativamente más oscuro, de mayor intensidad y de una tonalidad roja más neta

4. Teniendo en cuenta tanto la composición fenólica como las características colorimétricas, cabe destacar que el vino Syrah elaborado a partir de uvas más maduras dio lugar a una extracción más intensa, tanto de pigmentos antociánicos como de color, y que además presentó una mayor estabilidad cromática durante la fase de estabilización.
5. La aplicación del análisis de componentes principales a la información química y colorimétrica permitió una clara diferenciación de los vinos según el grado de maduración de la uva, aunque la información colorimétrica tuvo un mayor peso en la clasificación de los vinos.
6. El análisis por regresión lineal múltiple de las relaciones color-composición conduce a ecuaciones que permiten predecir el color final de los vinos cuando se considera la información de todas las fracciones antociánicas. Se han conseguido mejores correlaciones más para el vino Syrah elaborado con uva más madura.

COLOR IN FOOD

Technological and Psychophysical Aspects

Edited by

José Luis Caivano

María del Pilar Buera



CRC Press

Taylor & Francis Group

Boca Raton London New York

CRC Press is an imprint of the
Taylor & Francis Group, an **informa** business

MATLAB® and Simulink® are trademarks of The MathWorks, Inc. and are used with permission. The MathWorks does not warrant the accuracy of the text or exercises in this book. This book's use or discussion of MATLAB® and Simulink® software or related products does not constitute endorsement or sponsorship by The MathWorks of a particular pedagogical approach or particular use of the MATLAB® and Simulink® software.

CRC Press
Taylor & Francis Group
6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300
Boca Raton, FL 33487-2742

© 2012 by Taylor & Francis Group, LLC
CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, an Informa business

No claim to original U.S. Government works

Printed in the United States of America on acid-free paper
Version Date: 20120221

International Standard Book Number: 978-1-4398-7693-0 (Hardback)

This book contains information obtained from authentic and highly regarded sources. Reasonable efforts have been made to publish reliable data and information, but the author and publisher cannot assume responsibility for the validity of all materials or the consequences of their use. The authors and publishers have attempted to trace the copyright holders of all material reproduced in this publication and apologize to copyright holders if permission to publish in this form has not been obtained. If any copyright material has not been acknowledged please write and let us know so we may rectify in any future reprint.

Except as permitted under U.S. Copyright Law, no part of this book may be reprinted, reproduced, transmitted, or utilized in any form by any electronic, mechanical, or other means, now known or hereafter invented, including photocopying, microfilming, and recording, or in any information storage or retrieval system, without written permission from the publishers.

For permission to photocopy or use material electronically from this work, please access www.copyright.com (<http://www.copyright.com/>) or contact the Copyright Clearance Center, Inc. (CCC), 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, 978-750-8400. CCC is a not-for-profit organization that provides licenses and registration for a variety of users. For organizations that have been granted a photocopy license by the CCC, a separate system of payment has been arranged.

Trademark Notice: Product or corporate names may be trademarks or registered trademarks, and are used only for identification and explanation without intent to infringe.

Visit the Taylor & Francis Web site at
<http://www.taylorandfrancis.com>

and the CRC Press Web site at
<http://www.crcpress.com>

Importance of Anthocyanic Copigmentation on the Color Expression of Red Wine in Warm Climate

BELÉN GORDILLO, M. LOURDES GONZÁLEZ-MIRET, and FRANCISCO J. HEREDIA

Contents

33.1 Introduction	315
33.2 Variation in Copigmentation regarding Grape Variety	316
33.3 Variation in Copigmentation regarding Ripeness Grade	318
33.4 Variation in Copigmentation regarding Vinification Technique in Organic Wines	321
33.5 Final Remarks	326
Acknowledgments	327
References	327

33.1 Introduction

The expression of the color in red wines depends not only on the anthocyanin concentration and their derived pigments but also on physicochemical phenomena known as copigmentation, which is described to stabilize wine color (Boulton 2001). In red wines, copigmentation reactions consist of noncovalent interactions between original grape anthocyanins among themselves (self-association) or with a wide variety of colorless wine constituents named copigments or cofactors (flavonoids, amino acids, organic acids, polysaccharides, etc.). The global result of copigmentation is based on two positive effects on color (Dangles and Brouillard 1992): (1) changes in the spectral properties of the chromophore group, that is, an increase of absorptivity and frequently a shift of the visible λ_{\max} toward higher wavelengths, and (2) the

stabilization of the flavylum cation reducing the formation of the other colorless forms of anthocyanins. For these reasons, copigmented anthocyanin solutions show higher chroma values than theoretically could be expected according to the pH value of the media (Goto and Kondo 1991). Additionally, in the next few months of aging, the earlier copigmentation complexes trend to be progressively transformed into polymeric pigments by covalent links (Bakker and Timberlake 1997). This conversion yields to the evolution and stabilization of the wine color, which changes from the initial purple-red hue to red-orange hue, and shows less saturated color. Thus, in enology, the assessment of the copigmentation process is of critical importance in understanding the relationship between grape composition and color in young red wines, and it could also act as a first stage in the formation of more stable pigments that determine the color of aged red wines. Most of the studies about copigmentation in model solutions have shown that the effectiveness and the intensity of the copigmentation effect is dependent upon several factors including the concentrations of pigments and cofactors, their chemical structures, the cofactor/pigment molar ratio, the pH of the medium, or the temperature (Brouillard et al. 1989, González-Manzano et al. 2009). In the same way, an extensive review of studies of copigmentation over the past 30 years in wines from several wineries (Boulton 2001) confirms that the control of these factors during winemaking can exert an important influence on the color chroma and saturation and on the higher or lower stability of color of the red wine. In particular, the production of red wines in winemaking regions that have produced traditionally fortified and young white wines (warm climate) has grown in the last decades in order to diversify the offer in the market. Nowadays, the advance in the knowledge about the repercussion that copigmentation exerts over the final color of these wines has received much attention. In these areas, the production of high-quality red wines, with highly saturated and stable color, is greatly limited due to the stressful climate conditions that do not enable the grapes to reach optimum phenolic maturity at harvest (Mira de Orduña 2010). The most likely reason for this fact is that wines made from grapes low in pigments and cofactors are not able to form much copigmentation at the first steps of the winemaking process (Boulton 2001). Consequently, their color stabilization might not occur correctly, resulting in the so-called “color fall,” or color loss. However, it has been recently demonstrated that the magnitude of copigmentation and its effect on the color quality and stability in these red wines are extremely variable and can be affected in a discriminated way by specific factors such as the characteristics of the grape, the winemaking process, or the viticulture practices.

33.2 Variation in Copigmentation regarding Grape Variety

The grape variety used in the elaboration of the red wine affects the concentration and composition of wine anthocyanins and therefore the copigmentation

process. In this sense, an exhaustive follow-up of the copigmentation phenomena according to the grape variety has permitted to evaluate the impact of the copigmentation to the color of red wines elaborated in warm climate and its development during the vinification. Wines elaborated in 2008 by conventional vinification in “Condado de Huelva” region (southwest Spain) were submitted to study. The cultivars assayed were Tempranillo (TE), traditionally grown in Spain, and the most commonly introduced varieties in this zone: Syrah (SY) and Cabernet Sauvignon (CS). The measurement of the copigmentation phenomena was carried out using the traditional method developed by Boulton (1996). Analysis of variance was performed to compare the differences in the contribution of each component of the total color: copigmented anthocyanins (%CA), free anthocyanins (%FA), and polymeric pigments (%PP), as well as the anthocyanin composition and color between the wines. Table 33.1 summarizes the results of the anthocyanin concentration (grouped by the substituent) and Boulton’s parameters, while Figure 33.1 shows the location of the wines in the (a^*b^*) color diagram.

Considering the whole set of data, it can be seen that the wines were markedly different and that the variety affected significantly both the phenolic composition and the magnitude of copigmentation. SY wines showed significantly higher values for %CA than TE and CS wines, which was in agreement with the highest contents of total monomeric anthocyanin. Moreover, each type of wine had a distinctive anthocyanic pattern. Specifically, significant differences on delphinidin, malvidin, and peonidin acetates and coumarilic derivatives were also found between the wines.

As far as the color was concerned, the wines also showed a clear difference in hue (h_{ab}) and chroma (C_{ab}^*) according to the variety. SY wines resulted in final bluish red hues (0° – 350°) and greater color chroma ($C_{ab}^* = 24.04$), which is consistent with a higher concentration of anthocyanin and magnitude of copigmentation. On the contrary, lower values of the %CA and pigment concentration in the TE and CS wines produced less saturated, lighter, and less purple colors ($C_{ab}^* = 21.63$ and 20.23 , respectively, and $h_{ab} = 0^\circ$ – 10°).

Table 33.1 Average Values of the Different Group of Anthocyanins and Percentage of Boulton’s Parameters according to the Variety

	TE ($n=3$)	SY ($n=3$)	CS ($n=2$)
Σ Gl (mg/L)	84.91 ± 21.48 a	72.47 ± 21.59 a	71.81 ± 17.99 a
Σ Ac (mg/L)	9.84 ± 4.30 a	35.68 ± 12.96 b	35.15 ± 8.92 b
Σ Cum (mg/L)	11.06 ± 5.40 a	16.54 ± 7.04 a	8.60 ± 1.95 b
AT (mg/L)	105.83 ± 30.24 a	124.70 ± 26.89 a	115.56 ± 28.65 a
%CA	16.32 ± 4.17 a	25.72 ± 9.48 b	15.02 ± 7.22 a
%PP	48.72 ± 5.32 a	33.54 ± 6.31 b	43.42 ± 1.24 c
%FA	36.68 ± 3.35 a	40.77 ± 5.67 a	41.54 ± 2.08 a

Different letters within the same row mean significant differences ($p < 0.05$).

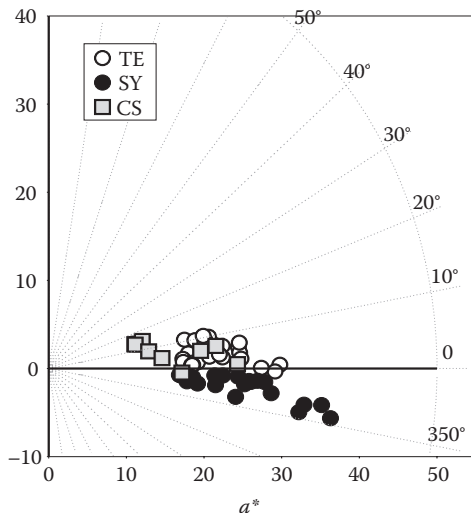


Figure 33.1 Location of wines in the (a^*b^*) color diagram.

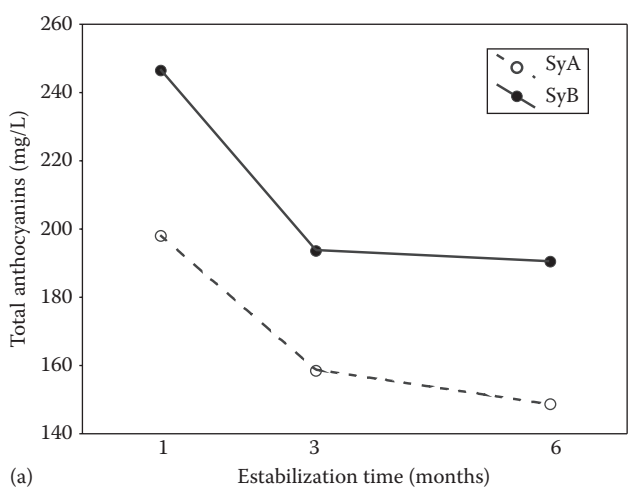
The assessment of the color differences (ΔE_{ab}^*) between the beginning and the end of the stabilization period allowed us to evaluate the color stability of the different wines considered. Higher color variation obtained for SY wines ($\Delta E_{ab}^* = 13.34$) compared to TE ($\Delta E_{ab}^* = 10.72$) and CS ($\Delta E_{ab}^* = 4.66$) indicated a lower color stability, being consistent with a lower degree of polymerization at the end of the stabilization (PP = 34% vs. 49% and 43%, respectively). Therefore, this fact reflects a greater difficulty in SY wines to convert the copigmented complexes into more stable pigment.

33.3 Variation in Copigmentation regarding Ripeness Grade

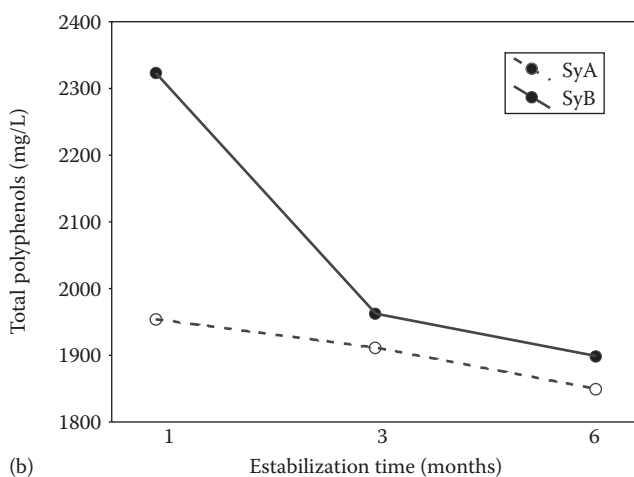
The process of ripening is another factor that influences the quality of the grape because the changes that take place during ripening do not occur simultaneously. The date for harvesting has been traditionally estimated considering only the classical criteria based on “technological maturity” of the grapes, which is the sugar content. However, it is well known that the difference between “technological” and “phenolic” maturity of the grapes in warm climate regions is particularly remarkable due to the sun overexposure during the ripening that inhibits the anthocyanins formation in the grapes (Mori et al. 2005). In this context, one of the most significant advances in warm climate vinifications has been the investments in technology and the application of novel procedures such as low maceration temperatures (5°C–15°C) prior to fermentation, intended to enhance the extraction of the grape components accounting for the color of the wine (Gómez-Míguez et al. 2007, Heredia et al. 2010). In fact, the positive repercussion of the prefermentative cold maceration (CM) on

the copigmentation evolution and the color changes of red wines elaborated in warm climate from grapes with different ripeness grade have also been confirmed. In this experience, the wines submitted to study were elaborated in duplicate from *Vitis vinifera* cv. SY grapes in 2008 from two vineyards grown in “Condado de Huelva” region: SyA (12.5°Bé) and SyB (14.0°Bé).

Quantitatively, an important influence of the maturity grade of the grape on the pigment content of the wines was observed. SyA wines, which were elaborated from less matured grapes, showed a significant lower anthocyanic and phenolic content than SyB wines, made from more matured grapes (total anthocyanins [TAs] 149 vs. 204 mg/L; total polyphenols [TPs], 1850 vs. 1900 mg/L) (Figure 33.2). In general, the phenolic content and the



(a)



(b)

Figure 33.2 Evolution of TAs (a) and TPs (b) of wines during vinification.

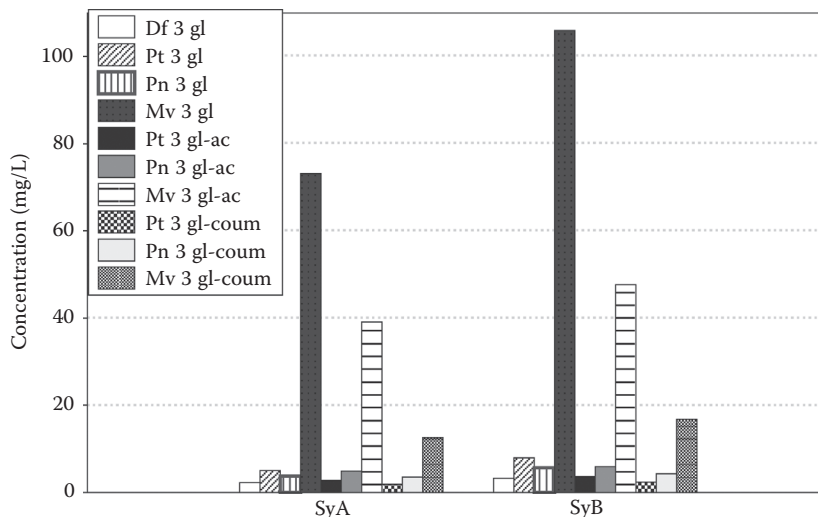


Figure 33.3 Anthocyanic profile of SyA and SyB wines, corresponding to 6 months of stabilization.

extractability index of grape increase throughout ripening process, which explain the results obtained. However, the intensive maceration conditions applied during prefermentative phase favored that SyA wines presented adequate phenolic potential and pigment stability.

It was confirmed that the ripeness grade of the grape also influenced qualitatively the anthocyanic profile (Figure 33.3), since significant differences ($p < 0.05$) were found for the most individual anthocyanins between the two SY wines elaborated (except for peonidin acetate and petunidin coumarate). An accurate differentiation and classification of the wines into each respective group was obtained by applying a discriminant analysis, being petunidin, petunidin acetate, and TPs, the variables which make possible the differentiation according to the ripeness grade of grapes. Considering only these variables, a 100% correct classification was achieved.

Furthermore, the relative contribution of each group of pigments to the total color of wines was also different (Figure 33.4), which determined particular colorimetric changes of the wines studied. During the storage period (6 months), the %PP increased in all wines; however, the %CA was quite variable. Despite the pigment degradation, SyB wines reached the highest polymerization grade values (49% vs. 37% in SyA wines), indicating a higher proportion of more stable pigment in those wines. The increase of the %CA experimented in SyB wines (approx. 20%) favored a more intense development of the polymerization process, which evidences a better cofactor/pigment ratio than SyA wines.

As a consequence of a better phenolic potential, SyB wines experimented optimum development of copigmentation simultaneously to

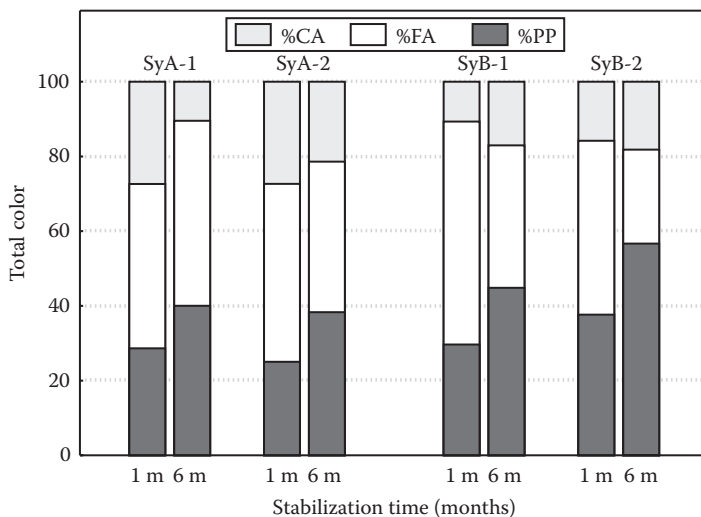


Figure 33.4 Evolution of the %CA, %FA, and %PP during the vinification.

Table 33.2 Colorimetric Parameters of SyA and SyB Wines during Vinification

	SyA-1		SyA-2		SyB-1		SyB-2	
	1 Month	6 Months	1 Month	6 Months	1 Month	6 Months	1 Month	6 Months
L^*	74.1	78.4	76.9	81.3	68.8	72.5	65.3	70.8
C_{ab}^*	32.5	24.2	29.1	20.9	34.9	31.2	37.2	33.5
h_{ab}	-6.4	-3.8	-6.6	-3.3	-5.9	-2.5	-2.4	2.4
s_{uv}^*	0.6	0.5	0.5	0.4	0.8	0.6	0.8	0.7

intensive polymerization process; hence, finally, red wines elaborated with more matured grapes exhibited darker, highly saturated color, with red hue (Table 33.2). However, the application of low maceration temperatures prior to fermentation confirmed to be an interesting strategy to improve and protect the phenolic potential as well as the color of red wines made from less matured grapes.

33.4 Variation in Copigmentation regarding Vinification Technique in Organic Wines

Among the agronomical practices, the organic viticulture constitutes an interesting strategy to improve the phenolic potential of red grapes in warm climate regions since organic vineyards usually have higher natural resistance to the weather inclemency. Since no fungicides are used, microbes are more abundant, which lead to an increase in the synthesis of phenolic compounds

acting as antioxidants (Zafrilla et al. 2003). As it was previously commented, although the application of prefermentative CM implies an important investment in technology, one of the main advantages of this vinification technique compared to traditional vinification is the rapid cooling down of the must. This fact inhibits the activity of some enzymes such as polyphenol oxidase and microorganism development, which protect pigments and other aromatic compounds from degradation in a nontoxic way (Gil-Muñoz et al. 2009). Additionally, the excessive traditional chemical treatments which may produce losses of pigments as well as potential health problems are avoided. However, there are no previous studies about the application of this vinification technique to organic wines as a useful practice to increase the extraction of phenolic compounds as well as the safety of the product, environment, and consumer. Thus, the phenolic composition, magnitude of copigmentation, and colorimetric characteristics of organic wines obtained by CM were compared to control wines produced by traditional maceration (TM) to assess the impact of the winemaking technique (Gordillo et al. 2010). In this experience, the TE cv. grapes were grown in a vineyard located in southeastern Spain. The samples of the wines were specifically selected during the first few months of storage since the short shelf life of red wines produced in warm climates requires careful control of their color characteristics when the main mechanism of the stabilization of color occurs.

Evolution of TAs and TPs in the two vinification protocols, as well as for the different anthocyanin fractions, is shown in [Figure 33.5](#). It might be stated that CM wines were richer for both kinds of compounds than TM wines during the whole vinification process. As expected, the concentration of monomeric anthocyanins decreased from skin removal to the moment of bottling in both kinds of wines studied, being especially remarkable for TM wines (77% vs. 38%, in CM wines). These observations confirm that red wines produced in warm climate regions easily suffer a considerable loss of pigment during the first stage of vinification, especially by traditional vinification. In this sense, the application of prefermentative CM represented an effective enological alternative to prevent an excessive pigment loss, improving the global quality of these wines. At the moment of bottling, both types of wines could be statistically differentiated regarding their chemical composition, with higher level of significance ($p < 0.01$) for malvidin (384.68 vs. 311.44 mg/L), delphinidin (61.16 vs. 40.28 mg/L), and petunidin (81.00 vs. 56.64 mg/L). An interesting observation is that the CM technique seemed to protect to a larger extent the presence of methylated anthocyanins (malvidin, petunidin, and peonidin) and acylated anthocyanins which chemical characteristics have a great effect on the copigmentation phenomenon. Therefore, cold prefermentative maceration increased not only the extraction of anthocyanins but also their initial stability in the organic wines.

At the end of the maceration period (day 6), the high polyphenol content reached by low-temperature treatment caused CM wines to have a higher

grade of copigmentation and polymerization than TM wines (31% vs. 27% and 30% vs. 21%, respectively) (Figure 33.6). Despite the pigment degradation, at the end of malolactic fermentation, CM wines showed the highest percent of copigmentation values (18% vs. 10.5% in TM wines). The highest copigmentation degree observed in CM wines evidences that they presented a better cofactor/pigment ratio than TM probably due to the lower loss of pigment experienced. During the last stage of the maturation phase (15–45 days), an important decrease of %CA was produced, which was near zero at the moment of bottling (2%–4%). The gradual formation of new and more stable pigments during this period in the two kinds of wines was confirmed by a notable increase of the %PP, which was slightly higher in TM wines (46% vs. 42%, in CM wines), although this difference was not significant.

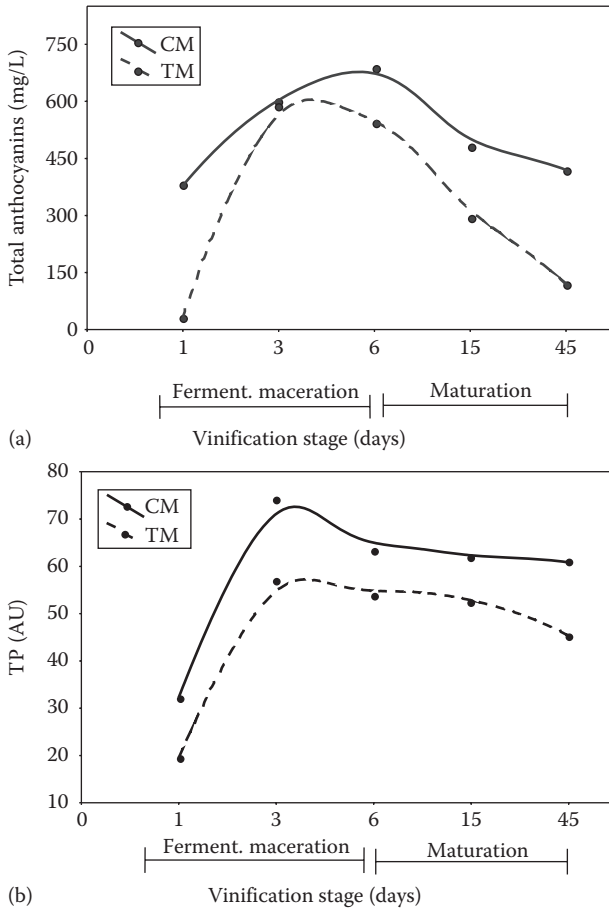
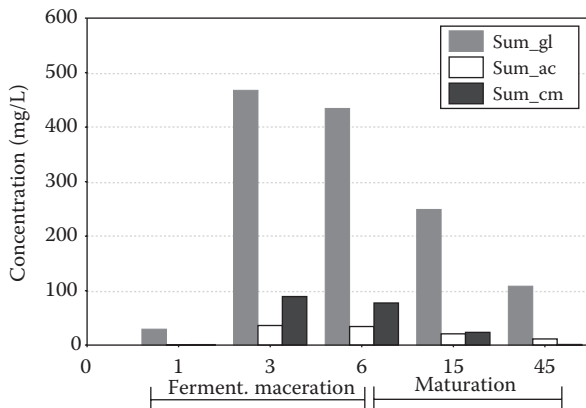
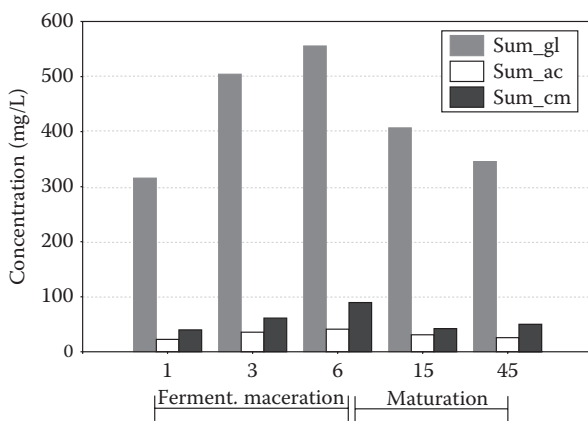


Figure 33.5 Evolution of TAs (a) and TPs (b) during vinification in CM wines and TM wines. Evolution of the anthocyanin fractions (mg/L) during vinification for both TM (c) and CM (d) wines.

(continued)



(c) Vinification stage (days)



(d) Vinification stage (days)

Figure 33.5 (continued)

Considering the evolution of CIELAB (L^* , C_{ab}^* , and h_{ab}) and CIELUV (s_{uv}^*) psychometric color parameters in the course of the two vinification protocols (Figure 33.7), it is observed that CM wines tended to show higher colorimetric stability than TM wines. It was confirmed that the application of a more intensive maceration, achieved by CM technique, induced higher color extraction in CM wines at the end of the alcoholic fermentation. At the moment of bottling, although higher grade of polymerization was obtained in TM wines, lighter and less saturated wines were finally obtained by this technique ($L^* = 83.52$ and $s_{uv}^* = 0.29$) vs. ($L^* = 76.36$ and $s_{uv}^* = 0.44$) CIELUV units, respectively, being these differences statistically significant ($p < 0.05$). In relation to the qualitative attribute of color (h_{ab}), due to a less intense evolution, CM wines kept their bluer tonalities for a longer time than the TM wines ($h_{ab} = -5.9^\circ$ vs. -1.5° , respectively). The higher amount in bluish forms

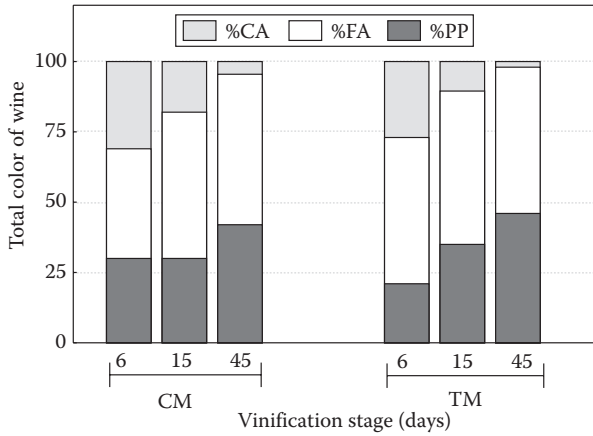


Figure 33.6 Evolution of the %CA, %FA, and %PP during the two vinification techniques.

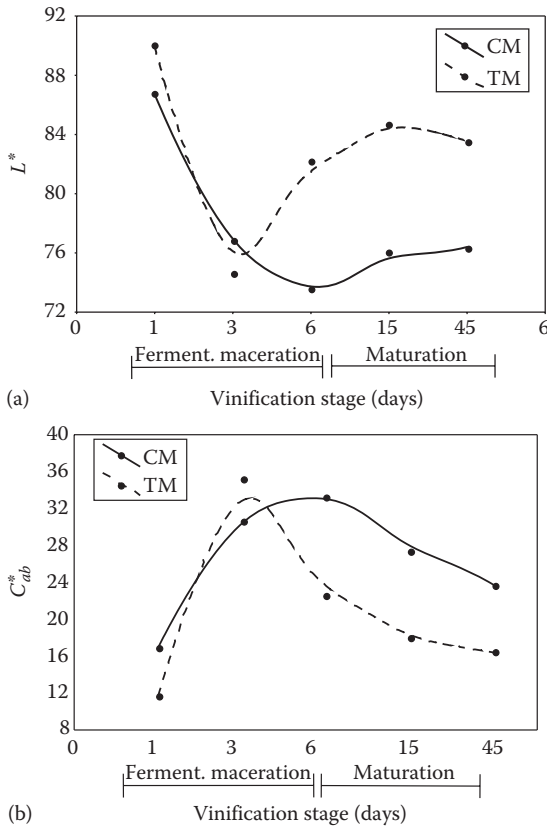
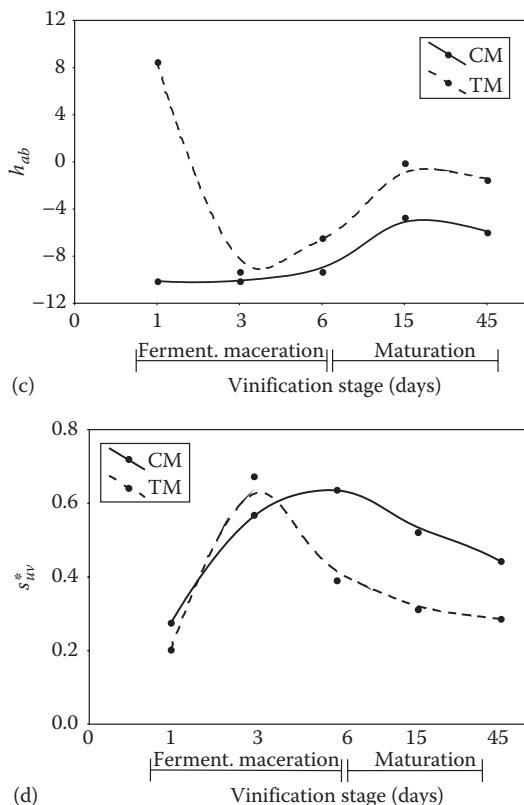


Figure 33.7 Evolution of color parameters: (a) L^* (lightness), (b) C_{ab}^* (chroma), (c) h_{ab} (hue angle), and (d) s_{uv}^* (saturation) during vinification. CM vs. TM wines.

(continued)

**Figure 33.7 (continued)**

of anthocyanins (malvidin, petunidin, and delphinidin) and the higher %CA could explain this finding (Heredia et al. 1998). The mean value of the color differences (ΔE_{ab}^*) calculated between the final wines was 9.6 CIELAB units, that is, perceptible by the human eye (Martínez et al. 2001). The differences of lightness (ΔL^*), chroma (ΔC_{ab}^*), and hue (Δh_{ab}) calculated among them showed that CM yields to darker, more saturated, and with more bluish color wines than those submitted to TM.

33.5 Final Remarks

The results obtained from the full set of observations confirmed the importance of both the quantitative and qualitative phenolic composition of grapes to achieve an effective magnitude and development of the copigmentation, which is required to produce high-quality red wines in warm climate, especially in terms of color. In general, it has been shown that SY wines reached better chemical and sensory characteristics than the other two grape varieties

studied (TE and CS), but they show a greater difficulty to convert the copigmented complexes into more stable pigment. Concerning agronomical practices and vinification techniques, the copigmentation and the quality and stability of color were improved in SY wines made from more matured grapes and TE wines made from organic grapes, both of them elaborated by CM. These studies have practical interest for wineries, but an interesting observation is that the copigmentation measurement as an evaluation of changes at a unique wavelength does not show the integral color behavior of this phenomena.

Acknowledgments

We are indebted to Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía, Spain) for the financial support (P07-AGR-02893 Research Project).

References

- Bakker, J. and C. F. Timberlake. 1997. Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 35–43.
- Boulton, R. B. 1996. A method for the assessment of copigmentation in red wines. In *The 47th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture*, Reno, NV, June 1996.
- Boulton, R. B. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 67–87.
- Brouillard, R., G. Mazza, Z. Saad, A. M. Albrecht-Gary, and A. Cheminatt. 1989. The copigmentation reaction of anthocyanins: A microprobe for the structural study of aqueous solutions. *Journal of the American Chemical Society* 111: 2604–2610.
- Dangles, O. and R. Brouillard. 1992. Polyphenol interactions. The copigmentation case: Thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics. Medium effect. *Canadian Journal of Chemistry* 70 (8): 2174–2189.
- Gil-Muñoz, R., A. Moreno-Pérez, J. I. Fernández-Fernández, A. Martínez-Cutillas, and E. Gómez-Plaza. 2009. Influence of low temperature prefermentative techniques on chromatic and phenolic characteristics of Syrah and Cabernet Sauvignon wines. *European Food Research and Technology* 228: 777–788.
- Gómez-Míguez, M., M. L. González-Miret, and F. J. Heredia. 2007. Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *Journal of Food Engineering* 79: 271–278.
- González-Manzano, S., M. Dueñas, J. Rivas-Gonzalo, M. T. Escribano-Bailón, and C. Santos-Buelga. 2009. Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chemistry* 114 (2): 649–656.
- Gordillo, B., M. I. López-Infante, P. Ramírez-Pérez, M. L. González-Miret, and F. J. Heredia. 2010. Influence of prefermentative cold maceration on the color and anthocyanic copigmentation of organic tempranillo wines elaborated in a warm climate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (11): 6797–6803.

- Goto, T. and T. Kondo. 1991. Structure and molecular stacking of anthocyanins—Flower color variation. *Angewandte Chemie International English Edition* 30: 17–33.
- Heredia, F. J., M. L. Escudero-Gilete, D. Hernanz, B. Gordillo, A. J. Meléndez-Martínez, I. M. Vicario, and M. L. González-Miret. 2010. Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. *Food Chemistry* 118: 377–383.
- Heredia, F. J., E. M. Francia-Aricha, J. C. Rivas-Gonzalo, I. M. Vicario, and C. Santos-Buelga. 1998. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes—I. pH effect. *Food Chemistry* 63: 491–498.
- Martínez, J. A., M. Melgosa, M. Pérez, E. Hita, and A. I. Negueruela. 2001. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Science and Technology International* 7: 439–444.
- Mira de Orduña, R. 2010. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International* 43: 1844–1855.
- Mori, K., S. Suyaga, and H. Gemma. 2005. Decrease anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* 5: 319–330.
- Zafrilla, P., J. Morillas, J. Mulero, J. M. Cayuela, A. Martínez-Cachá, F. Pardo, and J. M. López Nicolás. 2003. Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4694–4700.

Capítulo 2. INFLUENCIA DE LA TÉCNICA DE MACERACIÓN PREFERMENTATIVA EN EL COLOR Y LA COPIGMENTACIÓN ANTOCIÁNICA EN VINOS TINTOS TEMPRANILLO ECOLÓGICOS ELABORADOS EN CLIMA CÁLIDO

Antecedentes

La estabilización del color del vino tinto por el fenómeno de copigmentación es un proceso crucial que no siempre se desarrolla adecuadamente durante las primeras etapas de la vinificación, especialmente en vinos tintos producidos en clima cálido (Mori et al., 2005; López et al., 2007). La razón más probable es que los vinos elaborados a partir de uvas con bajas concentraciones de pigmentos antociánicos y otros compuestos fenólicos no son capaces de formar correctamente complejos de copigmentación en las primeras etapas de la vinificación (Boulton, 2001), y en consecuencia, la estabilización posterior del color ocurre con mayor dificultad. Sin embargo, la extracción y la estabilidad de los compuestos fenólicos responsables del color de las uvas y de los vinos, puede favorecerse mediante determinadas prácticas agronómicas y enológicas. Con respecto a las prácticas agronómicas, el desarrollo de la viticultura ecológica constituye una interesante estrategia en estas áreas para mejorar el potencial fenólico de las uvas. Por lo general, al no someter al cultivo a tratamientos químicos agresivos, éste desarrolla de manera natural mecanismos de adaptación a las condiciones ambientales; y además, al no aplicar fungidas, la síntesis de fenoles en la planta está favorecida (Zafrilla et al., 2003). En relación a las prácticas enológicas, se ha demostrado que la maceración prefermentativa a bajas temperaturas tiene una influencia positiva tanto en la intensidad como en la mayor estabilidad del color del vino (Gómez-Míguez et al., 2007, Gil-Muñoz et al., 2009). Además, el mantenimiento de temperaturas relativamente bajas a lo largo de la fermentación inhibe el desarrollo microbiológico indeseable, disminuyendo la necesidad de una adición excesiva de conservantes tales como el anhídrido sulfuroso, producto que hasta el momento se considera imprescindible en una vinificación industrial estándar (Zamora, 2004; Schmid et al., 2007). Sin embargo, hasta el momento, no existen evidencias de la aplicación de la maceración prefermentativa en frío para la elaboración de vinos tintos ecológicos, en los que la aplicación de técnicas respetuosas con el medio ambiente y que garanticen la calidad al consumidor es prioritario.

Objetivos

Como objetivo general se evalúa la aplicación de la maceración prefermentativa a bajas temperaturas como técnica alternativa a la maceración tradicional para la mejora de la calidad de vinos tintos ecológicos de la variedad Tempranillo, en función del efecto en la composición fenólica, el proceso de copigmentación, y el color. Como objetivos concretos se han planteado:

- Establecer, mediante el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), diferencias cualitativas y cuantitativas entre los vinos elaborados en cuanto al perfil antociánico y su evolución.
- Determinar la influencia de la técnica de maceración sobre el desarrollo de los procesos de copigmentación y polimerización, responsables de la estabilización del color del vino.
- Aplicar la Colorimetría Triestímulo al análisis del color durante la elaboración de los vinos para definir las etapas clave en su evolución y establecer las condiciones óptimas de vinificación.
- Determinar la influencia que ejerce el proceso de maceración en la calidad y la estabilidad del color entre los vinos mediante la aplicación de la colorimetría diferencial.
- Evaluar la utilidad de la Colorimetría Triestímulo para la evaluación integral de efecto de la copigmentación en el color de vinos tintos jóvenes, así como establecer diferencias en ésta según la técnica de maceración aplicada.

Parte experimental

Se ha realizado el estudio comparativo de 8 ensayos de vinificación a escala experimental, con la variedad Tempranillo cultivada según criterios ecológicos, en la campaña 2006: 4 ensayos de maceración prefermentativa en frío (a 5-8 °C durante 8 días), y 4 ensayos de maceración tradicional (a 20-25 °C durante 6 días). Los vinos fueron elaborados con un contenido reducido en anhídrido sulfuroso (40 mg/L). Las muestras se tomaron por triplicado en distintas etapas de la vinificación: inicio e intermedio de la fermentación alcohólica, tras el descube, y a los 15 y 45 días posteriores a éste. Las etapas de la vinificación seleccionadas corresponden a tres periodos clave en el color del vino: 1) al finalizar la etapa de maceración

prefermentativa, durante la cual se produce la extracción de compuestos responsables del color, en ausencia de etanol y a baja temperatura; 2) al final de la maceración activa, durante la cual se siguen extrayendo de los hollejos los compuestos responsables del color, en presencia de etanol y a temperatura más elevada; y 3) la estabilización del vino, durante la cual ocurren reacciones de copigmentación, que favorece la estabilidad del color del vino.

El perfil antociánico de los vinos se analizó por HPLC (Gómez-Míguez et al., 2004). La medida de los fenoles totales se determinó según el Índice de polifenoles totales a partir de la medida de absorbancia del vino a 280 nm (CEE, 1990). El grado de copigmentación (%AC) y polimerización (%PP) se determinaron según el método de Boulton (1996). El efecto de la copigmentación en el color de los vinos se analizó por Colorimetría Triestímulo. El color se analizó mediante espectrofotometría de transmisión, y se obtuvieron las coordenadas de color CIELAB con el software Cromalab[®] (Heredia et al., 2004). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica[®] ver. 8.0. (StatSoft Inc., 2007).

Los resultados mostraron que la técnica de maceración aplicada no influyó en el perfil antociánico de los vinos desde el punto de vista cualitativo. Sin embargo, si influyó notablemente en el grado de extracción de antocianos y otros fenoles, determinando diferencias cuantitativas para estos compuestos entre los vinos elaborados. Específicamente, la aplicación de bajas temperaturas previa a la fermentación alcohólica favoreció que el mosto comenzase este proceso con un contenido significativamente mayor ($p < 0.05$) de compuestos fenólicos que al aplicar la maceración tradicional. Además, se comprobó que la técnica de maceración aplicada determinó una evolución diferente de los compuestos extraídos, durante la etapa fermentativa. En los vinos elaborados por maceración prefermentativa en frío, se produjo un incremento progresivo del contenido total antociánico durante toda la fase fermentativa. Destacan la Mv 3-gl, Df 3-gl, y Pt 3-gl por ser los antocianos que más contribuyen al aumento en el contenido total. En cambio, en los vinos elaborados por maceración tradicional, se observó un incremento acusado de compuestos antociánicos entre el 1^{er} y el 3^{er} día de maceración, a partir del cual se produjo una ligera disminución en todas las fracciones antociánicas produciendo una pérdida en el contenido total de pigmentos al final de ésta. Por tanto, una vez finalizada la etapa de maceración, los vinos elaborados mediante maceración prefermentativa en frío presentaron un contenido en antocianos totales significativamente ($p < 0.05$) mayor que los elaborados mediante maceración tradicional (686.3 vs. 546.4 mg/L).

Durante la fase de estabilización en depósito se observó una disminución del contenido total antociánico en ambos tipos de vino. Entre las distintas antocianinas, la Mv 3-gl es el pigmento que mayor pérdida mostró durante la estabilización, debido a que es el que se encuentra en mayor concentración absoluta. La disminución progresiva del contenido total antociánico durante el periodo de estabilización del vino es un proceso natural debido a la alta reactividad de estos compuestos fenólicos, y por tanto es habitualmente descrito en bibliografía (Gómez-Plaza et al., 2000; Hermosín et al., 2005). Bakker et al. (1993), en ensayos con disoluciones modelos de antocianos, confirmaron una disminución logarítmica de la concentración en antocianos en función del tiempo de almacenamiento. Sin embargo, la disminución global fue más notable en los vinos elaborados mediante maceración tradicional (77% vs. 38%, en maceración en frío), confirmando que los vinos tintos elaborados en clima cálido son susceptibles de sufrir importantes pérdidas de pigmentos durante las etapas iniciales de la vinificación y que la aplicación de bajas temperaturas durante la maceración favorece no sólo la extracción de compuestos responsables del color sino además su estabilidad (Gomez-Míguez et al., 2007). Como consecuencia, en el momento de embotellado, los dos tipos de vino pudieron ser claramente diferenciados en cuanto a su contenido antociánico, que fue significativamente ($p < 0.05$) mayor en aquéllos elaborados por maceración prefermentativa en frío (421.5 vs. 120.83 mg/L, en maceración tradicional). Además, se observó que la aplicación de esta técnica favoreció particularmente la estabilidad de las antocianinas aciladas (Mv 3-gl, Pt 3-gl y Pn 3-gl) y los derivados *p*-cumaroilados.

Con respecto al desarrollo del proceso de copigmentación durante las primeras etapas de la vinificación, los vinos elaborados por maceración prefermentativa presentaron mayor magnitud de este fenómeno que los elaborados mediante vinificación tradicional (%AC= 18.5% vs. 10.5%, respectivamente). Posteriormente, en las últimas etapas de la vinificación, la magnitud de copigmentación disminuyó notablemente en ambos tipos de vinos, lo que ocurrió simultáneamente a un incremento del grado de polimerización.

En cuanto al estudio colorimétrico, se observó una influencia significativa de la técnica de maceración sobre la extracción del color del vino tinto, lo cual determinó diferencias en la calidad y estabilidad de éste durante la etapa de estabilización en depósito. Los vinos sometidos a criomaceración prefermentativa experimentaron una extracción progresiva del color durante la fase de maceración fermentativa, que afectó en mayor medida a la claridad (L^*), al croma (C^*_{ab}) y a la saturación (s^*_{uv}). El color de

estos vinos evolucionó oscureciéndose e incrementando su intensidad y saturación, y manteniendo además una tonalidad roja-azulada (tonos en torno a / por debajo de...). En los vinos elaborados mediante maceración tradicional, de acuerdo con la evolución de los pigmentos, la mayor extracción del color ocurrió entre el 1.^{er} y 3.^{er} día de maceración fermentativa, periodo en el que el color visiblemente se oscureció, incrementó su intensidad y saturación, y mostró una tendencia definida hacia tonalidades rojas con matices azulados (desde +8.9° de tono hacia -9.3°). No obstante, la disminución de pigmentos producida durante los últimos días del proceso de maceración, determinó una pérdida global del color (incremento de la claridad y disminución del croma y saturación). Por tanto, tras la fermentación alcohólica, los vinos presentaron diferencias colorimétricas significativas, siendo los sometidos a maceración prefermentativa en frío los que mostraron mayores valores de croma (C^*_{ab}), saturación (s^*_{uv}) y menor claridad (L^*) y tono (h_{ab}). Esto indica vinos más oscuros, con mayor intensidad de color y tonalidades más azuladas que aquellos sometidos a maceración tradicional. Aunque se ha descrito que la aplicación de temperaturas más elevadas y la adición de una mayor cantidad de SO_2 durante la maceración favorecen la solubilidad de los pigmentos y la extracción del color, dichas prácticas enológicas pueden afectar negativamente el desarrollo del proceso de copigmentación (Baranac et al., 1996; Boulton, 2001). Por el contrario, la aplicación de frío inhibe naturalmente el desarrollo de determinadas enzimas (por ejemplo, las polifenoxidasas) así como la proliferación microbiológica indeseable, favoreciendo la protección de los pigmentos extraídos aun cuando se alcanzan mayores temperaturas durante la fase de maceración fermentativa (Zamora, 2004; Schmid et al., 2007; Kountoudakis et al., 2009).

Posteriormente, durante la fase de estabilización en depósito, la modificación del color fue menos acusada y en ambos casos se produjo un incremento de la claridad e disminución de la intensidad cromática, siendo acorde con la evolución de antocianos anteriormente descrita. Con respecto al tono, aunque se observó una tendencia general hacia un color rojo más neto, los vinos elaborados por maceración en frío conservaron durante más tiempo las tonalidades rojo-azuladas. Esta diferencia puede ser debida al mayor contenido en antocianinas azuladas en estos vinos (Mv 3-gl, Pt 3-gl y Df 3-gl) y el mayor grado de copigmentación desarrollado (Heredia et al., 1998, Boulton, 2001).

Se ha considerado la diferencia de color (ΔE^*_{ab}) como índice de modificación del color en las etapas de la vinificación estudiadas (extracción durante la maceración y la estabilización en depósito). Así, para evaluar el sentido de esta modificación se han calculado los incrementos de claridad, croma y tono (ΔL^* , ΔC , Δh) entre esas mismas etapas. Los resultados obtenidos mostraron una marcada modificación del color en la etapa de maceración fermentativa para ambos vinos, siendo notablemente más acusada en los vinos elaborados por criomaceración ($\Delta E^*_{ab} = 20.8$ vs. 14.1), confirmando un mayor grado de extracción de pigmentos en éstos. Durante esta etapa, los cambios de color fueron diferentes según el tipo de maceración aplicada. En los vinos elaborados mediante maceración en frío, los cambios fueron debidos, fundamentalmente, a modificaciones de la claridad y croma ($\Delta L = -13.2\%$, $\Delta C = +16.2$), variando muy poco el tono ($\Delta h = +0.9^\circ$). En los vinos elaborados mediante maceración tradicional, destacan especialmente los cambios debidos al tono y el croma ($\Delta h = -14.9^\circ$, $\Delta C = +10.8$), y en menor medida a la claridad ($\Delta L = -7.9\%$). Posteriormente, durante la fase de estabilización, los vinos experimentan cambios colorimétricos menos acusados, siendo dicha variación ligeramente mayor en los vinos elaborados por maceración prefermentativa en frío ($\Delta E^*_{ab} = 8.5$ vs. 5.4). Estos cambios afectaron en mayor medida al croma en los vinos elaborados por criomaceración ($\Delta L = -2.8\%$, $\Delta C = -9.3$ y $\Delta h = +3.3^\circ$), y tanto al croma como al tono en los elaborados por maceración tradicional ($\Delta L = +1.3\%$, $\Delta C = -4.0$ y $\Delta h = +5.0^\circ$).

Aunque los vinos elaborados mediante maceración tradicional experimentaron una menor modificación del color y un mayor desarrollo del proceso de polimerización durante la etapa de estabilización, finalmente presentaron un color significativamente más claro y de una menor intensidad en el momento del embotellado, debido al menor grado de extracción y estabilidad de los pigmentos. La diferencia de color calculada entre los vinos al final de la vinificación fue de 9.6 u. Por tanto, se puede afirmar que los ensayos de maceración prefermentativa en frío, con respecto a los de maceración tradicional, producen diferencias claramente apreciables (Martínez et al., 2001).

Por último, se aplicó la Colorimetría Triestímulo al estudio integral del efecto de la copigmentación en el color de vinos tintos jóvenes, ya que para obtener una definición integral de la variación de color inducido por este fenómeno es necesario considerar los cambios que se producen en el espectro visible completo (380-770 nm) (Gómez-Míguez, 2006). Para ello, se comparó el color del vino con y sin efecto de la copigmentación, es decir, antes y después de diluir éste 1:20 con vino sintético. Los

resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la copigmentación indujo importantes modificaciones de color en los vinos, independientemente de la técnica de maceración aplicada. Además, se calculó la diferencia de color absoluta entre el color del vino con y sin el efecto de la copigmentación, para cada ensayo de vinificación. El valor de ΔE^*_{ab} obtenido fue siempre mayor a 3 unidades (entre 4 y 31), confirmándose que la contribución de la copigmentación al color del vino superó ampliamente el umbral de apreciación visual. En ambos casos, la copigmentación produjo colores más oscuros, más vivos y de tonalidad más azulada. Sin embargo, se obtuvo un mayor efecto de la copigmentación sobre el color del vino cuando se aplicó la maceración prefermentativa ($\Delta E^*_{ab} = 8.3$ vs. 3.2), lo cual fue coherente con el mayor grado de copigmentación experimentado.

Conclusiones

Las principales conclusiones que se extraen de los resultados obtenidos en el presente estudio son las siguientes:

1. La técnica de maceración prefermentativa en frío incrementó considerablemente la extracción de compuestos fenólicos, dando lugar a vinos con un contenido de antocianos y fenoles totales significativamente mayor que los vinos elaborados mediante maceración tradicional.
2. Los antocianos monoglucósidos y los derivados *p*-cumaroilados fueron los compuestos antociánicos que contribuyeron en mayor medida a la diferencia en el contenido antociánico entre los vinos.
3. Con respecto al color, la maceración prefermentativa en frío condujo a vinos con características significativamente diferentes a los elaborados por maceración tradicional, siendo la diferencia visualmente apreciable. Concretamente, favoreció vinos de color más oscuro, más saturado, con mayor colorido (más vivos) y tonalidad más azulada.
4. Como resultado metodológico, se ha comprobado la utilidad de la Colorimetría Triestímulo como herramienta para el seguimiento y control del efecto de la copigmentación en el color de vinos jóvenes, así como para poner de manifiesto diferencias de color significativas, inducidas por este fenómeno en el vino, debidas a la técnica de maceración aplicada.

Influence of Prefermentative Cold Maceration on the Color and Anthocyanic Copigmentation of Organic Tempranillo Wines Elaborated in a Warm Climate

BELEN GORDILLO,[†] M. ISABEL LÓPEZ-INFANTE,[‡] PILAR RAMÍREZ-PÉREZ,[‡]
 M. LOURDES GONZÁLEZ-MIRET,[†] AND FRANCISCO J. HEREDIA^{*†}

[†]Food Colour & Quality Laboratory, Department of Nutrition & Food Science, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012-Sevilla, Spain, and [‡]IFAPA, Centro de Cabra, 14940 Cabra, Córdoba, Spain

The stabilization of red wine color by the copigmentation phenomenon is a crucial process that does not always proceed favorably under natural conditions during the first stages of vinification. The impact of the prefermentative cold maceration technique on the phenolic composition and magnitude of the copigmentation level of organic Tempranillo wines elaborated in a warm climate have been studied as an enological alternative to the traditional maceration for obtaining highly colored wines. Tristimulus colorimetry was applied to study the color of wines during vinification, and a high-performance liquid chromatography (HPLC) procedure was used for the analysis of phenolic compounds. Spectrophotometric and colorimetric analyses were also performed to evaluate the copigmentation level of the wines. Significant chemical and color differences were found depending on the maceration technique applied. Prefermentative cold macerated wines were richer in those compounds accounting directly for the color of red wine (anthocyanins) and those involved in anthocyanin stabilization through copigmentation reactions (phenols), which was in accordance with the higher copigmentation degree and darker, more saturated and vivid bluish colors. The evaluation of the copigmentation based on colorimetric parameters in the CIELAB color space showed that prefermentative cold maceration caused greater effectiveness of copigmentation than traditional maceration since it induces more important and hence more easily perceptible color changes.

KEYWORDS: Color; organic red wine; warm climate; copigmentation

INTRODUCTION

The color of red wine is one of its most important quality parameters, which significantly determines the sensorial evaluation. Generally, it is the first characteristic perceived, and therefore, it plays a key role in the decision-making process of the consumer, who usually tends to prefer wines having deep color and hue (1). Phenolic compounds, which are responsible for wine color, are extracted from the skin and seeds of grapes and diffuse into the must and wine during the maceration step of the wine making process. While anthocyanins are the pigment accounting directly for the color of red wine, flavonols and hydroxycinnamic acid derivatives are involved in the stabilization of anthocyanins through copigmentation reactions (2). In this sense, the color of wines is determined first of all by the pigment content of the grapes and second by the pigments and copigments formed during vinification because the last ones exert an important influence on the higher or lower stability of color during aging.

In warm regions, the production of high quality red wines with high and stable color is greatly limited due to the stressful climate conditions that do not enable the grapes to reach optimum phenolic maturity at harvest (3, 4). The most likely reason for

this fact is that wines made from grapes low in pigments and cofactors are not able to form much copigmentation in the first steps of the wine making process (2); therefore, their color stabilization might not occur correctly. However, the concentrations and stability of wine anthocyanins can be affected by several factors, including viticultural practices and vinification techniques. In this sense, the elaboration of organic wines, based on an organic viticulture, constitutes an interesting strategy to improve the phenolic potential of red grapes in these areas since organic vineyards usually have higher natural resistance to the weather inclemency. Additionally, since no fungicides are used, microbes are more abundant, which lead to an increase in the synthesis of phenolic compounds acting as antioxidants (5).

Regarding the vinification technique, one of the most significant advances in warm climate vinifications has been the application of low maceration temperatures (5–15 °C) prior to fermentation, known as prefermentative cold maceration or cold soak. In the case of red wine production, this novel vinification technique was designed as an alternative to the traditional maceration for increasing the extraction of pigments, tannins, and aromas from the grape skins to the wine, which consequently improves some important quality characteristics of wines such as color and aroma (6–10). Although the application of prefermentative low temperature techniques implies an important investment in

*Corresponding author. Tel: +34 954556495. Fax: +34 954557017. E-mail: heredia@us.es.

technology, one of the main advantages of this vinification practice compared to traditional vinification is the rapid cooling down of the must, which inhibits the activity of some enzymes, such as polyphenol oxidase, and microorganism development, such as acetic bacteria. In this sense, both the aroma compounds and the anthocyanic pigments extracted become protected from oxidative reactions in a nontoxic way, avoiding excessive traditional chemical treatments, which may produce losses of pigments, as well as potential health problems (10–13). In fact, the positive repercussions of prefermentative cold maceration on the final color and flavor of Syrah wines produced in Andalusia (southwest of Spain) have been already confirmed (14, 15). However, there is no evidence of the application of the prefermentative cold maceration to organic wines as a useful technique to increase the extraction of anthocyanins and other phenolic compounds as well as the safety of the product, environment, and consumer.

Thus, the main objective of this work was to study the influence of prefermentative cold maceration on the phenolic composition and magnitude of copigmentation of organic wines elaborated from Tempranillo grapes grown in a warm climate and its effect on color quality.

The Tempranillo grape variety was selected because it is one of the most important red grape cultivars grown in Spain, with more than 75000 ha planted. This variety has been described as an excellent and robust grape, easy to cultivate with low vulnerability to diseases. It is defined as a neutral cultivar with subtle aroma and flavor that produces wines with intense fruity, spicy, and woody aromas (16). In recent years, it has been planted in warm climates vineyards, and its wines are becoming increasingly popular with consumers.

MATERIALS AND METHODS

Wine Making Protocol. Vinification was carried out on 350 kg of the *Vitis vinifera* var. Tempranillo, grown in an organic vineyard belonging to the Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), located in south-eastern Spain (warm climate). Organic grapes were treated with natural pesticide such as sulfur and pheromones, allowed by organic agriculture. The grapes were harvested (2006 vintage) at optimum maturity (density, 12°Bé; total acidity, 5.76 g/L; and pH, 3.47), in good sanitary conditions, placed in 15 kg plastic boxes, and transported to an experimental wine-production center. Then, the grapes were destemmed and crushed, and the must was homogenized and distributed into 50 L stainless-steel tanks (pilot scale) so that each tank contained about 42–43 kg of must.

Alcoholic fermentation was induced by inoculation with *Saccharomyces cerevisiae* selected yeast (71D, 20 mg/HI, 25 °C, Agrovín, Spain). To guarantee the development of malolactic fermentation, selected *Oenococcus oeni* lactic acid bacteria (VINIFERM Oe 104, Agrovín, Spain) were inoculated at the rate of 10 mg/L (after rehydration of cells in warm sterile water at 30 °C for 30 min) at the end of alcoholic fermentation. Two variants of maceration treatment, in four replicates for each one ($n = 4$), were performed.

Traditional Maceration (TM). Fermentation occurred at controlled temperature (25 °C). Fermentation caps were punched down once a day during the on-skin maceration period, which lasted 6 days (fermentative alcoholic maceration). After this, the mash was drawn off to remove the skins and other solid parts, and the free-run musts were left to finish malolactic fermentation, which occurred after 15 days. When fermentative processes were finished, the wines were racked and stored in 50 L stainless steel tanks and bottled 30 days later.

Cold Prefermentative Maceration (CM). The whole process consisted of two stages: a first stage of 8 days of prefermentative cold maceration (between 5 and 8 °C), followed by 6 days of traditional maceration (between 20 and 25 °C). Cold maceration was carried out controlling the skin contact time and temperature by using an industrial refrigeration system, consisting of a refrigeration unit (REVINSA mod. minifrico C-18,

Table 1. Conventional Analytical Data^a of the Final Red Wines

analytical data	CM ^b	TM ^b
ethanol (% v/v)	12.10	11.74
pH	3.70	3.57
total acidity (g/L as tartaric acid)	4.30	4.47
volatile acidity (g/L as acetic acid)	0.60	0.50
reducing sugars (g/L)	1.88	1.75
malic acid (g/L)	0.063	0.046
total sulfur dioxide (ppm)	35.80	34.75
free sulfur dioxide (ppm)	9.00	7.75
K ⁺ (ppm)	2	1

^a Average values of replicate. ^b Abbreviations: CM, cold macerated wines; TM, traditional macerated wines.

Arganda Del Rey, Madrid) for the recirculation of refrigerant liquid (water/glycerol at 2–7 °C) through cooling water jackets to keep low temperatures. After the cold maceration period was completed, the temperature of the tanks was rapidly brought to 20 °C to allow the starting of alcoholic fermentation. After this, the vinification process was carried out in the same conditions as those for the control wines, as previously explained.

In this study, must and wine samples (100 mL) were taken at five different moments along the vinification process: (1) at the beginning of fermentative maceration period, (2) during the alcoholic fermentation, (3) at the end of alcoholic fermentation, just after skin removal, (4) at the end of malolactic fermentation, and (5) at the moment of bottling. These sampling moments were specifically selected since they correspond to different vital periods for wine color: from 1 to 3, during the maceration phase, when anthocyanins and other phenolic compounds are extracted from grape skins and transferred to the must; and from 4 to 5, during the first few months of storage since the short shelf life of red wines produced in warm climates requires careful control of their color characteristics, especially when the main mechanism of the stabilization of color (copigmentation phenomenon) occurs.

Oenological Parameters. The conventional oenological parameters (Table 1) were performed according to the Official Methods established by European Union (17).

HPLC Analysis of Anthocyanins. High-performance liquid chromatography was applied to the anthocyanin determination by direct injection of the samples, previously filtered through a 0.45 μm Nylon filter (E0034, ANALISIS VINICOS, Spain), in an Agilent 1100 chromatographic system equipped with a quaternary pump, an UV–vis diode-array detector, an automatic injector, and ChemStation software (Palo Alto, CA). All analyses were made in triplicate. The anthocyanin identification was performed following the method described by Heredia et al (15). Anthocyanins were separated using a Zorbax C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm particle size) maintained at 38 °C. Acetonitrile–formic acid–water (3:10:87) as solvent A and acetonitrile–formic acid–water (50:10:40) as solvent B were used. The elution profile was as follows: 0–10 min 94% A–6% B; 10–15 min 70% A–30% B; 15–25 min 60% A–40% B; 25–35 min 55% A–45% B; 35–40 min 50% A–50% B; 40–42 min 40% A–60% B; 42–43 min 94% A–6% B. The flow rate was 0.8 mL/min, and the injection volume was 50 μL. UV–Vis spectra were recorded from 200 to 800 nm with a bandwidth of 2.0 nm. The quantification was made at 525 nm by comparing the areas and the retention times with the malvidin 3-glucoside standard, and anthocyanin concentration was expressed as mg/L.

Total anthocyanins (TA), sum of nonacylated anthocyanins (sum_g), sum of acetylglucosides (sum_ac) and sum of coumarylglucosides (sum_cm) were also calculated.

Copigmented and Polymerized Anthocyanin Determination. The contribution of copigmented anthocyanins (% CA), free anthocyanins (% FA), and polymeric pigments (% PP) to the total wine color at pH 3.6 were determined following the method proposed by Boulton (18). Wine samples were first adjusted to pH 3.6.

Colorimetric Measurements. The whole visible spectrum (380–770 nm) was recorded at constant intervals ($\Delta\lambda = 2$ nm) with a Hewlett-Packard UV–vis HP8452 spectrophotometer (Palo Alto, CA), using 2 mm path length glass cells and distilled water as a reference. The CIELAB parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , and h_{ab}) and the CIELUV saturation (s^*_{uv}) were determined by using the original software CromaLab (19), following

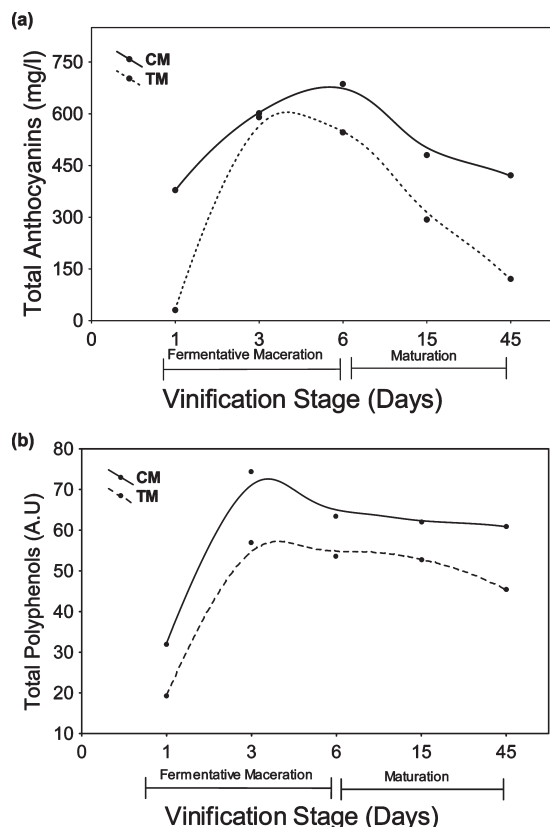


Figure 1. Total anthocyanin (a) and total polyphenol (TP) (b) evolution during vinification in cold macerated wines and traditional macerated wines.

the Commission Internationale de L'Eclairage's recommendations (20): the 10° Standard Observer and the Standard Illuminant D65. Saturation (s_{uv}^*) was included in the colorimetric analysis because it is considered the best correlation for the visually perceived saturation, and CIELAB space cannot define a similar correlation (21).

Color differences (ΔE_{ab}^*) were calculated as the Euclidean distance between two points in the three-dimensional space defined by L^* , a^* , and b^* : $\Delta E_{ab}^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$.

Statistical Analysis. Significant differences among wines and for each variable were assessed by analysis of variance (ANOVA) using the Statistica, version 8.0, software (22).

RESULTS AND DISCUSSION

Pigment Evolution. Independent of the maceration treatment, the two Tempranillo wines showed the same chromatographic profile; but quantitatively, the results showed that prefermentative cold maceration had a positive effect on the extraction and evolution of phenolic compounds during vinification.

Considering total anthocyanin (TA) and total polyphenol (TP) evolution in the two vinification protocols (Figure 1), it can be observed that along the whole alcoholic fermentation period (1–6 days), cold macerated wines had higher levels of phenolic compounds than traditional wines. The effectiveness of cold prefermentative treatment on the magnitude of pigment extraction was confirmed since prior to the beginning of the alcoholic fermentation, the anthocyanin content extracted represented 55% of the total extraction. As a consequence, prerefrigerated musts started the alcoholic fermentation with significantly higher phenolic content regarding traditional wines (TA = 378.16 ± 27.54 mg/L versus 30.82 ± 17.75 mg/L; TP = 32.06 ± 4.10 versus 19.37 ± 0.35).

It is also noteworthy that the wine making protocol influenced the evolution pattern of the different anthocyanin fractions resulting in clear differences regarding their stability (Figure 2).

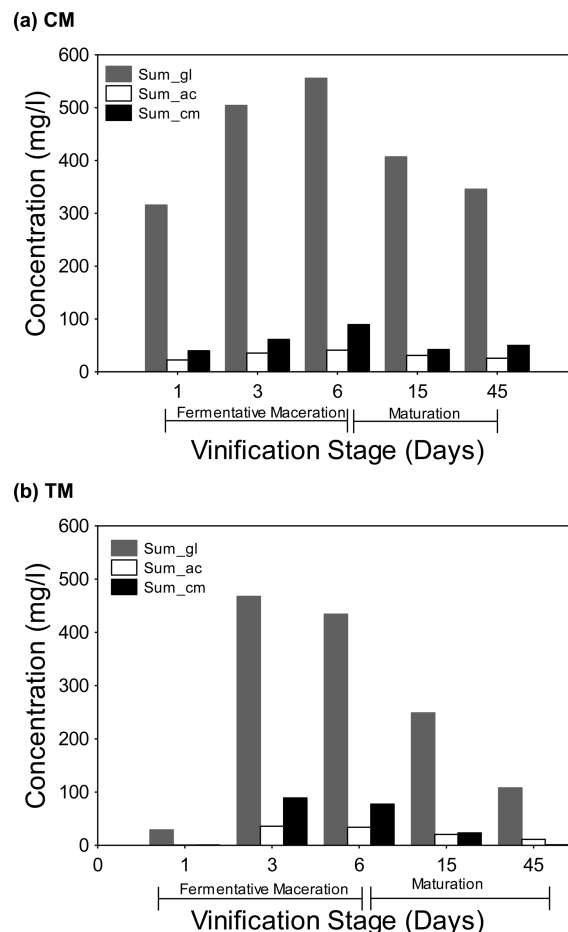


Figure 2. Evolution of the anthocyanin fractions (mg/L) during vinification for both cold macerated (a) and traditional macerated (b) wines.

In cold macerated wines, anthocyanins underwent a progressive increase during the whole fermentative maceration period, reaching their maximum just before skin removal (sum_gl = 555.73 ± 40.67 mg/L; sum_ac = 41.10 ± 4.17 mg/L; and sum_cm = 89.46 ± 18.30 mg/L). Notwithstanding, in traditional vinification, the rate of extraction increases rapidly during the first days of maceration because there was no previous contact between skins and must. The anthocyanin concentration reached a maximum on the third day of maceration (sum_gl = 467.63 ± 55.28 mg/L; sum_ac = 36.02 ± 7.78 mg/L; and sum_cm = 89.06 ± 10.52 mg/L), but after that, a slight decrease in all anthocyanin fractions was experimented. This meant a final loss of 7%, 5%, and 13%, respectively, which had important consequences over the pigment content (TA) of both wines at the end of the extraction process, being 20.5% higher in cold macerated wines (686.29 ± 19.03 mg/L versus 546.44 ± 25.09 mg/L). The statistical differences found in total anthocyanin content among the wines were due especially to monoglucosides, with higher level of significance ($p < 0.01$) for malvidin (384.68 ± 22.80 versus 311.44 ± 23.77 mg/L), delphinidin (61.16 ± 7.84 versus 40.28 ± 3.60 mg/L), and petunidin (81.00 ± 8.12 versus 56.64 ± 4.21 mg/L).

On the contrary, TP evolution was similar in the two wines (Figure 1). Although cold maceration induced higher extraction than traditional maceration, no significant difference was found among the two vinification treatments just before skin removal (TP = 63.45 ± 6.32 versus 53.72 ± 2.59). This result is according to previous studies on other varieties wines (14, 23), confirming that phenolic extraction is not more influenced by the low temperature maceration technique as anthocyanin extraction is. Apparently,

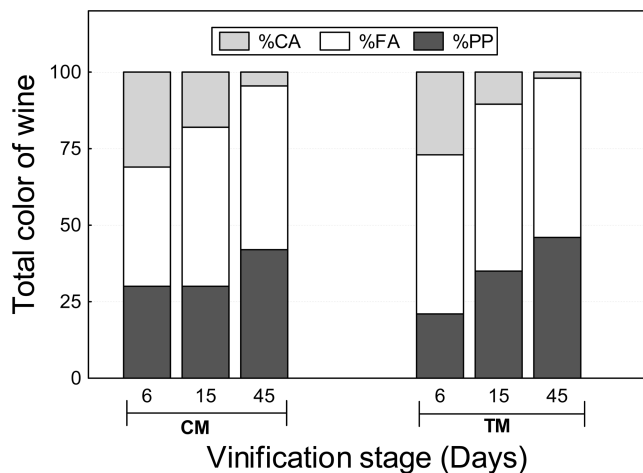


Figure 3. Evolution of the copigmented anthocyanins (% CA), free anthocyanins (% FA), and polymeric pigment (PP) during the two vinification techniques.

this observation might affect the future stability of wine color, but from a sensorial perspective, this effect can be considered positive because excessive phenolic extraction could make the wine too astringent and affect its global quality (24).

As expected, the concentration of monomeric anthocyanins decreased from skin removal to the moment of bottling in both kinds of wines studied, being especially remarkable for traditional macerated wines (77% versus 38% in cold macerated wines) (Figure 1). These observations confirm that red wines produced in warm climate regions easily suffer a considerable loss of pigment during the first stage of vinification, especially by traditional vinification. In this sense, the application of prefermentative cold maceration represented a useful oenological alternative to prevent an excessive pigment loss, improving the global quality of these wines. At the moment of bottling, both types of wines could be statistically differentiated regarding their chemical composition. Cold macerated wines showed the highest total anthocyanin content (421.55 ± 36.59 versus 120.83 ± 15.30 mg/L in traditional wines). An interesting observation is that the cryomaceration technique seemed to protect to a larger extent the presence of methylated anthocyanins (malvidin = 248.18 ± 10.46 mg/L versus 81.52 ± 15.58 mg/L; petunidin = 46.55 ± 4.78 mg/L versus 11.48 ± 2.38 mg/L; peonidin = 14.17 ± 3.34 mg/L versus 4.25 ± 0.64 mg/L) and acylated anthocyanins (sum_cm = 50.07 ± 9.98 mg/L versus 1.28 ± 0.70 mg/L) whose chemical characteristics have a great effect on the copigmentation phenomenon (25, 26).

Copigmentation and Polymerization Evolution. At the end of the maceration period, the high anthocyanin and total polyphenol content reached by low temperature treatment caused CM wines to have a higher grade of copigmentation and polymerization than TM wines (31% versus 27% and 30% versus 21%, respectively) (Figure 3). Despite of the pigment degradation, at the end of malolactic fermentation, the prerigorated wines showed the highest percent copigmentation values (18% versus 10.5% in traditional macerated wines). The highest copigmentation degree observed in cold macerated wines is evidence that they presented a better cofactor/pigment ratio than traditional wines (2) probably due to the lower loss of pigment experienced.

During the last stage of the maturation phase (15–45 days), an important decrease of % copigmentation (% CA) was produced, which was almost zero at the moment of bottling (2–4%). The gradual formation of new and more stable pigments during this period in the two kinds of wines was confirmed by a notable increase of bisulphite-stable color (% PP), which was higher in

traditional macerated wines (46% versus 42%, in cold macerated wines) (Figure 4).

Colorimetric Evolution. The evolution of the CIELAB (L^* , C^*_{ab} , and h_{ab}) and CIELUV (s^*_{uv}) psychometric color parameters in the course of the two wine making vinifications is shown in Figure 4. Color extraction was different for each maceration treatment but was coherent with pigment extraction.

In cold macerated wines, all of the colorimetric parameters evolve constantly in a positive way during the whole period of maceration indicating a positive effect not only on the color density but also on the color stability. Specifically, the lightness, L^* , of the initial must decreased by 13%, while chroma, C^*_{ab} , hue angle, h_{ab} , and saturation, s^*_{uv} , increased by 49%, 1°, and 56%, respectively.

In traditional macerated wines, the most color extraction was produced on the third day of fermentative maceration ($L^* = 76.17 \pm 3.32$, $C^*_{ab} = 35.22 \pm 4.74$ CIELAB units, and $s^*_{uv} = 0.67 \pm 0.11$ CIELUV units) coinciding with the maximum pigment extraction ($TA = 590.03 \pm 40.03$ mg/L). However, the loss of pigments observed between the third and the sixth day of maceration (7% as total anthocyanins) resulted in a fall of color (L^* and h_{ab} increased by 10% and 3°, while chroma, C^*_{ab} , and saturation, s^*_{uv} , decreased by 36% and 42%). Consequently, TM wines tended to show lower chromatic stability from maceration period than CM wines. The most likely reason for this fact could be a dual effect of the temperature with competing contributions: (i) it enhances the solubility of most species but especially those cofactors that have limited solubility, enhancing the pool of copigmented pigments; (ii) thermodynamically, it favors the dissociation of copigmented forms and causes loss of color (2, 27). On cooling treatments, the lower temperatures of the must inhibits the activity of some enzymes such as polyphenol oxidase and microorganism development, which avoid anthocyanin degradation favoring the color stability even when temperatures reach normal fermentation values (11, 28).

Comparing the color coordinates obtained at the end of alcoholic fermentation, significant differences were found for all color parameters among the two kinds of wines, revealing that the application of prefermentative low temperature induced higher color extraction than traditional maceration ($L^* = 73.59 \pm 3.05$ versus 82.15 ± 1.35 CIELAB units, $C^*_{ab} = 33.18 \pm 5.61$ versus 22.49 ± 2.07 CIELAB units, and $h_{ab} = -9.25^\circ \pm 0.59$ versus $-6.45^\circ \pm 0.8$, respectively).

Different causes have been attributable to the numerous anthocyanin transformations along the course of the first months following the maceration period, including the partial elimination by precipitation/adsorption by lactic bacteria, and also the stabilization by progressive displacement of copigmentation complexes into polymeric pigments (29, 30). In this sense, the polymerization process was not the main cause of a decrease in anthocyanins during the malolactic fermentation period (6–15 days) because both types of wines experienced a notable loss of color with respect to skin removal ($L^* = 76.07$ CIELAB units and $s^*_{uv} = 0.52$ CIELUV units in cold macerated wines; and $L^* = 84.74$ CIELAB units and $s^*_{uv} = 0.31$ CIELUV units in traditional macerated wines).

At the moment of bottling, although higher grade of polymerization was obtained in traditional macerated wines, lighter and less saturated wines were finally obtained by this technique ($L^* = 83.52$ CIELAB units and $s^*_{uv} = 0.29$ CIELUV units versus 76.36 and 0.44 CIELAB and CIELUV units, respectively), the difference among them being statistically significant (< 0.05). In the two types of wines, between 15 and 45 days, it can be observed that chroma (C^*_{ab}) and saturation (s^*_{uv}) modifications were more variable, which showed a slight tendency to decrease, while lightness (L^*) remained practically constant. Obviously, browning

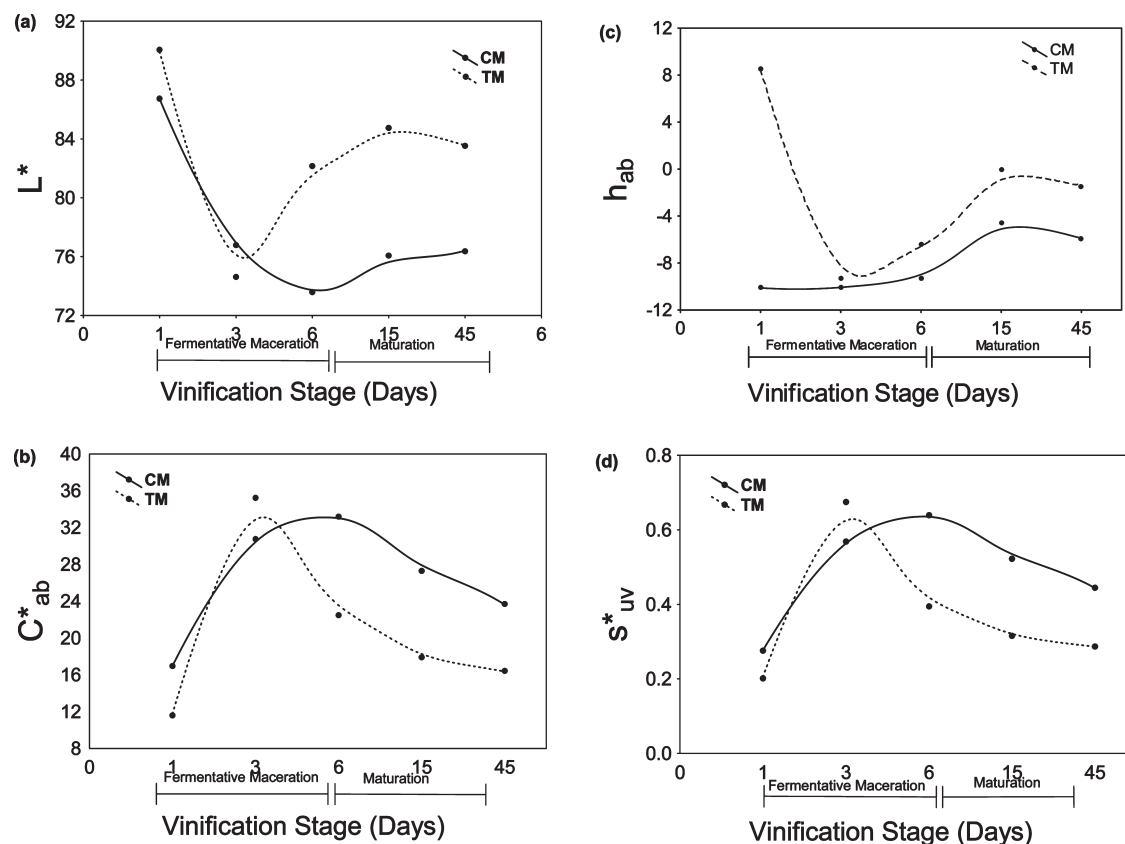


Figure 4. Evolution of color parameters: (a) L^* (lightness), (b) C^*_{ab} (chroma), (c) h_{ab} (hue angle), and (d) s^*_{uv} (saturation) during vinification. Cold macerated versus traditional macerated wines.

and precipitation of oligomeric and polymeric pigments also exist in red wines, which partially explain why anthocyanin polymerization led to wines with less color intensity and purity in late stages of vinification (31, 32).

With respect to the qualitative aspect of color (h_{ab}), both wines exhibited an increase of hue toward 0° (from bright bluish-red to red hues) from skin removal to bottling, showing a clear reduction of the blue component of the red color. These changes in color characteristics reflect the progressive displacement of copigmentation complexes and free anthocyanins by more stable polymeric pigments (33). However, the hue evolution was less intense for cold macerated wines, keeping their bluer tonalities for a longer time than the traditional macerated wines ($h_{ab} = -5.92^\circ$ versus -1.48° , respectively). The higher amount in bluish forms of anthocyanins (malvidin, petunidin, and delphinidin) and the higher degree of copigmentation could explain this finding (34).

The mean color difference calculated between the final wines was 9.56 CIELAB units. Considering that ΔE^*_{ab} of up to 3 CIELAB units indicates differences in color perceptible to the human eyes (35), it is concluded that a noticeable influence of the maceration technique on the color of wine existed. The differences of lightness (ΔL^*), chroma (ΔC^*_{ab}), and hue (Δh_{ab}) calculated among them showed that the color differences were more quantitative than qualitative ($\Delta L^* = -7.16$, $\Delta C^*_{ab} = 6.03$, and $\Delta h_{ab} = -3.98$ CIELAB units) and reveal that prefermentative cold maceration yields more darker, more intense, and with more bluish color wines than those submitted to traditional maceration.

These results are in agreement with those of Gómez-Míguez et al. (14) and Heredia et al. (15) for Syrah wines, but it should be taken into consideration that the effectiveness of the cryogenic technique used is largely determined by the way to achieve the temperature fall (freezing of grapes, dry ice, cold-maceration,

etc.), as well as the time and intensity of prefermentative maceration or the grape variety used in vinification (9, 10, 36–38).

Colorimetric Study of Copigmentation: CIELAB Color Space. The colorimetric implications of the copigmentation phenomenon on the total color of wine has been evaluated by tristimulus colorimetry since the entire visible spectrum (380–770 nm) must be considered to obtain an integral definition of color as well as to quantify the color difference that this phenomenon implies (39). In this study, the wine color with copigmentation effect was obtained from the absorbance spectrum of the wines after eliminating the SO_2 effect by means of the addition of acetaldehyde in excess. The wine color without copigmentation effect was reconstituted from the absorbance spectrum of the wine sample after diluting 20 times with wine-like solution (pH 3.6) and multiplying by the dilution factor. That dilution leads to the dissociation of the copigment complex, while the contributions of the free anthocyanins and the polymeric pigments remain (40).

The chromatic parameters (L^* , C^*_{ab} , and h_{ab}) of cold and traditional macerated wines with and without the copigmentation effect are summarized in **Table 2**. The results obtained show that the copigmentation phenomenon provokes important changes in the wine color independent of the vinification protocol. Quantitatively, when copigmentation complexes were dissociated, the wines presented higher values of lightness (L^* increased by 3%) and lower values of chroma (C^*_{ab} decreased by 10%). Regarding the qualitative component of color, the wines showed higher values of the hue angle (h_{ab} increase in 7.14°). According to Castañeda-Ovando et al. (41), the formation of the charge-transfer complex associated with the copigmentation phenomenon causes changes in the spectral properties of the molecules in the flavilium ion, increasing the absorption intensity (hyperchromic effect) and its maximum absorption wavelength (bathochromic

Table 2. Color Parameters of Copigmented and No-Copigmented Wines in Cold Macerated and Control Tempranillo Wines^a

		copigmented wines	no-copigmented wines
CM	L^*	76.20 ± 0.72 a	80.48 ± 1.71 a
	C^*_{ab}	26.68 ± 0.85 a	22.32 ± 0.93 b
	h_{ab}	-3.88 ± 0.42 a	9.24 ± 2.01 b
TM	L^*	83.22 ± 1.02 a	84.23 ± 3.24 a
	C^*_{ab}	20.12 ± 1.08 a	19.62 ± 1.73 a
	h_{ab}	0.15 ± 1.08 a	8.76 ± 0.05 a

^a Different letters within the same row mean significant differences ($p < 0.05$).

Table 3. Color Differences (ΔE^*_{ab}) Associated with the Copigmentation Phenomenon in Cold Macerated and Traditional Macerated Wines

	cold macerated wines	traditional macerated wines
ΔE^*_{ab}	8.25	3.19
ΔL^*	-4.28	-1.01
ΔC^*_{ab}	+4.36	+0.50
Δh_{ab}	-12.62	-8.61

effect). From a sensory perspective, these findings mean that for the same wine, as a consequence of the existence of copigmentation, the color changes notably in terms of luminosity, chromaticity, and intensity. Specifically, cold maceration contributed to the typical chromatic characteristics of young red wine, described as a vivid color with a red-blue hue.

The color difference (ΔE^*_{ab}) calculated between the wines with and without the copigmentation effect for both maceration techniques were higher than 3 units CIELAB, hence visually relevant (Table 3). However, ΔE^*_{ab} was more marked in cold macerated wines (8.25 versus 3.19 CIELAB units, in traditional macerated wines), which was consistent with the higher values obtained regarding the magnitude of copigmentation. Thus, cold prefermentative maceration caused greater effectiveness in the copigmentation phenomenon than the traditional maceration since it induced more important and hence more easily perceptible color changes.

In an attempt to understand the significance of these changes, the lightness, chroma, and hue differences (ΔL^* , ΔC^*_{ab} , and Δh_{ab}) were also calculated (Table 3). It was verified that color differences in cold macerated wines were due to both quantitative and qualitative changes ($\Delta L^* = -4.28$, $\Delta C^*_{ab} = +4.36$, and $\Delta h_{ab} = -12.62$), while in traditional macerated wines, they were basically qualitative ($\Delta L^* = -1.01$, $\Delta C^*_{ab} = +0.50$, and $\Delta h_{ab} = -8.61$).

As a summary, it might be stated that from a global chemical perspective, the results indicate that the maturation stage starts from different phenolic and colorimetric characteristics of the wines depending on the maceration technique previously applied. In this sense, cold macerated wines were richer in the compounds that account directly for the color of red wine (anthocyanins) and those that are involved in the stabilization of anthocyanins through copigmentation reactions (polyphenols); therefore, cold prefermentative maceration increased not only the extraction of anthocyanins but also their initial stability. For these reasons, a priori, cold macerated wines presented the most desirable chemical and sensorial characteristics that are nowadays required to produce high quality wines, especially in terms of their color.

LITERATURE CITED

- (1) Kunsági-Máté, S.; Stampel, E.; Kollár, L.; Pour Nikfardjam, M. S. The effect of the oxidation state of iron ions on the competitive complexation of malvidin by caffeic or ellagic acid. *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 693–696.
- (2) Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 67–87.
- (3) Mori, K.; Suyaga, S.; Gemma, H. Decrease anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci. Hortic.* **2005**, *105*, 319–330.
- (4) López, M. I.; Sánchez, M. T.; Díaz, A.; Ramírez, P.; Morales, J. Influence of a deficit irrigation regime during ripening on berry composition in grapevines (*Vitis vinifera* L.) grown in semi-arid areas. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2007**, *58*, 491–507.
- (5) Zafrilla, P.; Morillas, J.; Mulero, J.; Cayuela, J. M.; Martínez-Cachá, A.; Pardo, F.; López Nicolás, J. M. Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4694–4700.
- (6) Goumy, D.; Couason, M.; Seze, O. Carboxyque Française, France. French-Patent-Application, FR 2 731 22 A18, 1996.
- (7) Parenti, A.; Spugnoli, P.; Calamai, L.; Ferrari, S.; Gori, C. Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *Eur Food Res Technol.* **2004**, *218*, 360–366.
- (8) Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J. M.; Martínez-Cutillas, A.; Fernández-Fernández, J. I. Phenolic compounds and color stability of red wines. Effect of skin maceration time. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 271–275.
- (9) Koyama, K.; Goto-Yamamoto, N.; Hashizume, K. Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 958–965.
- (10) Gil-Muñoz, R.; Moreno-pérez, A.; Fernández-Fernández, J. I.; Martínez-Cutillas, E.; Gómez-Plaza, E. Influence of low temperature prefermentative techniques on chromatic and phenolic characteristics of Syrah and Cabernet Sauvignon wines. *Eur. Food Res Technol.* **2009**, *228*, 777–788.
- (11) Zamora, F. La maceración prefermentativa en frío de la uva tinta. *Enólogos.* **2004**, *32*, 36–39.
- (12) Datzberger, K.; Steiner, I.; Washiittl, J.; Kroyer, G. The influence of wine additives on colour and colour quality of young red wine. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1992**, *194*, 524–526.
- (13) Salaha, M. I.; Kallithraka, S.; Marmaras, I.; Koussissi, E.; Tzourou, I. A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *J. Food Comp. Anal.* **2008**, *21*, 660–666.
- (14) Gómez-Míguez, M.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J. Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *J. Food Eng.* **2007**, *79*, 271–278.
- (15) Heredia, F. J.; Escudero-Gilete, M. L.; Hernanz, D.; Gordillo, B.; Meléndez-Martínez, A. J.; Vicario, I. M.; González-Miret, M. L. Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. *Food Chem.* **2010**, *118*, 377–383.
- (16) Liu, L.; Cozzolino, D.; Cynkar, W. U.; Gishen, M.; Colby, C. B. Geographic classification of Spanish and Australian Tempranillo red wines by visible and near-infrared spectroscopy combined with multivariate analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6754–6759.
- (17) UE, Official Methods to Wine Analyses, Reglamento 440/2003.
- (18) Boulton, R. B. A Method for the Assessment of Copigmentation in Red Wines. Presented at the 47th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture, Reno, NV, June 1996.
- (19) Heredia, F. J.; Álvarez, C.; González-Miret, M. L.; Ramírez, A. *CromaLab®*, análisis de color; Registro General de la Propiedad Intelectual: SE-1052-04 Sevilla, Spain, 2004.
- (20) CIE. *Colorimetry*, 2nd ed.; publication 15.2; CIE: Vienna, Austria, 1986.
- (21) Wyszecki, G.; Stiles, W. S. *Color Science. Concepts and Methods. Quantitative Data and Formulae*, 2nd ed.; John Wiley and Sons: New York, 1982.
- (22) StatSoft Inc. *STATISTICA (data analysis software system)*, v 8; StatSoft Inc.: Tulsa, OK, 2007.
- (23) Álvarez, I.; Aleixandre, J. L.; García, M. J.; Lizama, V.; Aleixandre-Tudó, J. L. Effect of the prefermentative addition of copigments on the polyphenolic composition of Tempranillo wines after malolactic fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *228*, 501–510.

- (24) Llaudy, M. C.; Canals, R.; Canals, J. M.; Rozès, N.; Arola, L.; Zamora, F. New method for evaluating astringency in red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 742–746.
- (25) Hermosín Gutierrez, I.; Sánchez-Palomo, E.; Vicario, A. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel and Syrah. *Food Chem.* **2005**, *92*, 269–283.
- (26) Davies, A. J.; Mazza, G. Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 716–720.
- (27) Baranac, J. M.; Petranovic, N. A.; Dimitric-Markovic, J. M. Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1333–1336.
- (28) Schmid, F.; Li, Y.; Liebich, B.; Culbert, J.; Day, C.; Jiranek, V. Evaluation of red wine made on a small scale utilizing frozen must. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7156–7161.
- (29) Ribéreau-Gayón, P. *Anthocyanins of Grapes and Wines. Anthocyanins Food Colors*; Markakis, P., Ed.; Academic Publishers: New York, NY, 1982; pp 209–244.
- (30) Somers, T. C. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2175–2185.
- (31) Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *220*, 607–614.
- (32) Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle II. Non-anthocyanin phenolic compounds. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *220*, 331–340.
- (33) Gao, L.; Girard, B.; Mazza, G.; Reynolds, A. G. Changes in anthocyanins and color characteristics of Pinot Noir wines during different vinification processes. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2003–2008.
- (34) Heredia, F. J.; Francia-Aricha, E. M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Vicario, I. M.; Santos-Buelga, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes - I. pH effect. *Food Chem.* **1998**, *63*, 491–498.
- (35) Martínez, J. A.; Melgosa, M.; Pérez, M. M.; Hita, E.; Negueruela, A. I. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Sci. Technol. Int.* **2001**, *7*, 439–444.
- (36) Reynolds, A.; Cliff, M.; Girard, B.; Kopp, T. G. Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 235–240.
- (37) Heatherbell, D.; Dicey, M.; Goldworthy, S.; Vanhanen, L.; Henickkling, T. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Cool Climate Enology and Viticulture*; New York State Agricultural Experiment Station: Geneva, NY, 1996; VI:10, p 17.
- (38) Sacchi, K. L.; Bisson, L. F.; Adams, O. D. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 197–206.
- (39) Gómez-Miguez, M.; González-Manzano, S.; Escribano-Bailón, M. T.; Heredia, F. J.; Santos-Buelga, C. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5422–5429.
- (40) Darias-Martin, J.; Carrillo-López, M.; Echavarrri-Granado, J. F.; Díaz-Romero, C. The magnitude of copigmentation in the color of aged red wines made in the Canary Islands. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224*, 643–648.
- (41) Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. L.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chem.* **2009**, *113*, 859–871.

Received for review January 11, 2010. Revised manuscript received April 26, 2010. Accepted April 27, 2010. We are indebted to Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía, Spain) for financial support (PRY-84/2005 Research Project).

Capítulo 3. INFLUENCIA DE LA TÉCNICA DE REFRIGERACIÓN EN EL COLOR Y LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE VINOS TINTOS SYRAH OBTENIDOS POR CRIOMACERACIÓN PREFERMENTATIVA

Antecedentes

El vino tinto es un medio complejo cuya composición química evoluciona desde las primeras etapas de la vinificación. Los antocianos y otros fenoles no coloreados (pigmentos y copigmentos) extraídos de las distintas partes de la uva durante la fase de maceración son transformados progresivamente por diversos mecanismos en nuevos compuestos, determinando que la astringencia del vino disminuya y su color cambie desde el rojo azulado hacia tonos teja propios de los vinos maduros. Particularmente, las condiciones en las que se realiza el proceso de extracción (duración, temperatura, aditivos, etc.) tienen una gran influencia en la composición fenólica inicial del vino, y por tanto en los cambios químicos y sensoriales que ocurren durante la conservación y el envejecimiento (Bakker et al., 1998; Budic-Leto et al., 2006).

En las últimas décadas, el desarrollo tecnológico ha permitido la aplicación de nuevos procedimientos alternativos a la maceración tradicional con el objetivo de obtener vinos con características particulares (Sacchi et al., 2005; Canals et al., 2008; González-Neves et al., 2010; Soto-Vázquez et al., 2010). Entre éstos, se encuentra la maceración prefermentativa en frío, orientada a incrementar la extracción y estabilidad de determinados compuestos fenólicos y obtener vinos con un perfil cromático y aromático más complejo, lo cual confiere una mejor capacidad para el envejecimiento (Llaudy et al., 2005; Gil-Muñoz et al., 2009; Busse-Valverde et al., 2011; Albanese et al., 2012). Mediante esta técnica, en una primera fase prefermentativa se mantiene en contacto el mosto con los hollejos a bajas temperaturas durante un periodo variable de tiempo (0-10 °C, entre una y varias semanas), por lo que se retrasa el inicio de la fermentación alcohólica y la extracción de compuestos fenólicos tiene lugar en ausencia de etanol. De este modo se logra una difusión lenta y progresiva de los pigmentos y flavonoles de los hollejos al mismo tiempo que se evita una excesiva extracción de flavanoles de las semillas (Zamora, 2004; Kountoudakis et al., 2009). Posteriormente, en una segunda fase de maceración fermentativa (20-25 °C), la extracción de fenoles ocurre en presencia de etanol.

Sin embargo, algunos autores han puesto de manifiesto que el efecto de la maceración prefermentativa en frío sobre la calidad final del vino es variable en

función de la técnica de refrigeración aplicada (Koyama et al., 2007; Gil-Muñoz et al., 2009). Estas técnicas incluyen el uso de cámaras de vinificación a bajas temperaturas (5-10 °C) donde el mosto se mantiene en depósito mediante intercambiadores de frío y camisas de refrigeración (*criomaceración* o *cold soak*), la refrigeración directa de la masa de vendimia mediante la adición de fluidos criogénicos en estado líquido o sólido (N₂ o CO₂) al depósito de fermentación, el almacenamiento previo de la uva en cámaras frigoríficas que tras el estrujado se mantienen en frío en depósito mediante el uso de equipos industriales de refrigeración; o más recientemente, el diseño de equipos industriales de rápido enfriamiento mediante la inyección directa de CO₂ líquido manteniendo una atmósfera inerte (Carrillo et al., 2011).

Así, mientras que Reynolds et al. (2001) y Pérez-Lamela et al. (2007) han comprobado que la criomaceración no siempre produce una mejora en el contenido antocianico y el color de los vinos producidos, otros autores han demostrado que la adición de fluidos criogénicos es una práctica más efectiva para conseguir un incremento significativo de la extracción de antocianos y taninos (Couasón et al., 1999). No obstante, Parenti et al. (2004) confirmaron que el tipo de fluido criogénico adicionado también influye sobre el proceso de extracción y la calidad final del vino elaborado. Así, para una misma temperatura (-5 °C), aunque la adición de CO₂ sólido demostró ser menos efectiva en la extracción de fenoles que la de N₂ líquido, finalmente dio lugar a vinos con mejores características. Por otro lado, Gil-Muñoz et al. (2009) describen que la aplicación de criomaceración resultó ser una técnica más efectiva en la extracción de antocianos en uvas Cabernet Sauvignon, mientras que para la variedad Syrah, se obtuvieron mejores resultados cuando las uvas fueron previamente refrigeradas o tras la adición de CO₂ sólido.

Recientemente, en vinificaciones llevadas a cabo en regiones de clima cálido, se ha confirmado que la aplicación de la *criomaceración* ha supuesto una mejora de la calidad cromática y aromática tanto de vinos tintos como blancos (Gómez-Míguez et al., 2007a; Gómez-Míguez et al., 2007b; Hernanz et al., 2007; Heredia et al., 2008). Sin embargo, nuevos estudios orientados a comparar los efectos de distintas técnicas de refrigeración sobre la eficacia de extracción y la calidad final del vino son de gran utilidad en estas regiones, donde las pérdidas de color y de aromas son habituales.

Objetivos

El objetivo general es evaluar la influencia de la técnica de refrigeración aplicada en la maceración prefermentativa sobre el color y la composición fenólica de vinos tintos Syrah, elaborados en clima cálido. Como objetivos concretos se han planteado:

- Determinar, mediante el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), diferencias cualitativas y cuantitativas en el perfil antociánico y fenólico entre los vinos, según la técnica de refrigeración aplicada.
- Aplicar la Colorimetría Triestímulo para evaluar la influencia que ejerce la técnica de refrigeración prefermentativa sobre el color del vino tinto y su evolución durante la vinificación.
- Aplicar técnicas estadísticas multivariantes para establecer la relevancia de cada compuesto químico en la clasificación de los vinos en función de la técnica de refrigeración.

Parte experimental

Se han llevado a cabo 6 vinificaciones mediante maceración prefermentativa en frío a partir de uva Syrah procedente de la D.O. "Condado de Huelva", aplicando dos técnicas de refrigeración diferentes: 3 ensayos mediante refrigeración directa con adición de nieve carbónica entre 5-10 °C durante 10 días, y 3 ensayos mediante refrigeración previa manteniendo la uva en una cámara frigorífica de almacenamiento a 0 °C durante 24 horas, y posterior fase pre-fermentativa en depósito entre 3 y 8 °C durante 10 días.

Para cada vino, las muestras se tomaron por triplicado en distintas etapas durante 5 meses de estabilización en depósito: el primer día de encubado, al inicio de la fermentación alcohólica, tras el descube, y a los 15, 30, 60 y 90 días posteriores a éste.

El perfil antociánico y fenólico de los vinos, así como su contenido, se analizó por HPLC (Gómez-Míguez et al., 2004; Hernanz et al., 2007). El color se analizó mediante espectrofotometría de transmisión, obteniéndose las coordenadas de color

CIELAB con el software CromaLab[®] (Heredia et al., 2004). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica[®] vs. 6.0.

Los resultados mostraron que la técnica de refrigeración aplicada para llevar a cabo la maceración prefermentativa en frío influyó notablemente en el proceso de extracción de los compuestos fenólicos y su estabilidad, determinando diferencias químicas y colorimétricas entre los vinos que se mantuvieron en etapas más avanzadas de la vinificación.

Durante la etapa de maceración se comprobó que, respecto a la adición de nieve carbónica, la refrigeración previa de las uvas favoreció una extracción más intensa de los compuestos fenólicos de los hollejos, fundamentalmente de antocianos, con elevados niveles de significación ($p < 0.01$) en la mayoría de las distintas fracciones antociánicas estudiadas. No obstante, para ambas técnicas, el incremento en el contenido antociánico fue mucho más acusado en la fase prefermentativa, poniendo de manifiesto la efectividad de la aplicación del frío en el proceso de extracción de pigmentos en la uva Syrah. En cambio, durante la fase fermentativa, se observaron ciertas diferencias en la evolución y estabilidad de los antocianos entre ambas técnicas. En los vinos elaborados mediante refrigeración previa de la uva, el contenido en antocianos monoglucósidos y sus derivados acetilados disminuyó, mientras que la concentración de los derivados cumaroilados siguió incrementando hasta el final de la etapa de maceración. En el caso de los vinos elaborados mediante la adición de nieve carbónica, se observó una evolución similar para monoglucósidos, derivados acetilados y *p*-cumaroilados, cuyo contenido tendió ligeramente a disminuir.

Con respecto al contenido fenólico total, se observó un incremento progresivo durante toda la etapa de maceración en los dos tipos de vinos, tanto en la fase prefermentativa como fermentativa. De nuevo, la refrigeración previa de las uvas produjo una mayor intensidad de extracción de fenoles, especialmente de los flavonoles, compuestos que poseen una elevada capacidad para estabilizar el color de los antocianos por fenómenos de copigmentación (Gómez-Míguez et al., 2006).

La menor intensidad de extracción conseguida por la adición de nieve carbónica puede ser debida a que el enfriamiento de la masa de vendimia es menos homogéneo que aplicando la refrigeración previa. En el primer caso, la ruptura de los tejidos vegetales que favorece una mayor solubilidad de los compuestos fenólicos queda limitada a la zona de contacto de la nieve carbónica con el hollejo. Por el contrario, la refrigeración previa, aunque no produce rotura de las estructuras celulares si favorece

un enfriamiento más homogéneo de la masa de vendimia, por lo que la efectividad de extracción obtenida es mayor.

Durante la etapa de estabilización, los cambios producidos en el contenido antociánico de los vinos fueron de una menor magnitud que en la etapa de maceración. Mientras que en los vinos a los que se aplicó la refrigeración directa el nivel de las distintas fracciones antociánicas se mantuvo prácticamente constante; en los elaborados mediante refrigeración previa se produjo un ligero incremento de los derivados acetílicos y cumaroilados. En cuanto a la evolución del contenido total fenólico, aunque en ambos casos tendió a incrementar en las primeras fases de la estabilización, en los vinos elaborados por refrigeración directa se produjo finalmente una importante disminución, lo cual afectó en mayor medida al contenido en flavonoles. Así, la distinta evolución de los pigmentos y compuestos fenólicos extraídos determinó que las diferencias entre los vinos se hicieran más acusadas en las fases finales de la estabilización.

Considerando los datos en términos globales, se obtuvo que la refrigeración previa de la uva dio lugar a vinos cuyo contenido medio antociánico y fenólico fue un 15% y un 55% mayor que los elaborados mediante refrigeración directa (Antocianos Totales= 271.1 vs. 231.4 mg/L, y Fenoles Totales= 2841.5 vs. 1288.3 mg/L, respectivamente). En relación al contenido total antociánico, el mayor peso en la diferencia fue debida a los monoglucósidos (156.2 vs. 130.8 mg/L) y derivados cumaroilados (44.5 vs. 28.7 mg/L). De manera similar, el mayor contenido en fenoles no coloreados (316.7 vs. 287.3 mg/L) fue debida fundamentalmente a diferencias en los flavonoles totales (240.4 vs. 221.2 mg/L), entre los que destacan los derivados de la quercetina (81.6 vs. 46.1 mg/L) y el kaempferol (27.5 vs. 3.1 mg/L).

Por tanto, puede concluirse que la aplicación de la refrigeración previa de la uva para la elaboración de vinos Syrah en clima cálido tuvo una mayor efectividad en la extracción de los compuestos responsables del color del vino (antocianos) así como en la de otros fenoles implicados en reacciones de copigmentación (flavonoles), lo cual determinó una mayor estabilidad cromática en etapas más avanzadas de la vinificación.

En general, independientemente de la técnica de refrigeración aplicada, el color del vino sufrió una evolución más intensa durante la etapa de maceración, cuando los pigmentos antociánicos y otros fenoles están siendo extraídos; mientras que durante la estabilización en depósito, la variación del color fue menos acusada, ya que las

reacciones en las que están implicados los compuestos extraídos son de una menor magnitud.

Concretamente, durante la fase de maceración prefermentativa, debido a la extracción de pigmentos, ambos tipos de vino sufrieron una disminución significativa de la claridad (L^*) simultánea a un incremento del croma (C^*_{ab}), mientras que el tono (h_{ab}) permaneció relativamente constante en torno a -10° . Es decir, las muestras se oscurecieron de manera notable al mismo tiempo que alcanzaron la máxima intensidad cromática y mantuvieron una tonalidad rojo-azulada. Sin embargo, se observó cómo la refrigeración previa de la uva condujo a vinos de un color más oscuro e intenso que aquéllos en los que se empleó la nieve carbónica para el enfriado de la masa ($L^* = 63\%$ vs. 76% , $C^*_{ab} = 48.1$ vs. 35.4 , respectivamente), de acuerdo con la mayor intensidad de extracción conseguida. Posteriormente, una vez finalizada la maceración fermentativa y durante la fase estabilización, se produjo un incremento del croma y del tono en los vinos. Durante esta etapa, la modificación del tono fue más significativa, mostrando una tendencia hacia 0° , es decir, hacia un rojo más neto. No obstante, debido a la mayor estabilidad de los compuestos extraídos cuando se aplicó la refrigeración previa, estos vinos sufrieron una evolución menos marcada, manteniendo valores negativos de tono.

Considerando los valores medios de los parámetros colorimétricos de cada ensayo, puede concluirse que la técnica de refrigeración aplicada influyó significativamente ($p < 0.05$) en el color del vino, induciendo diferencias tanto en los atributos de color cuantitativos (L^* y C^*_{ab}), como en el cualitativo (h_{ab}). Concretamente, la aplicación de la refrigeración previa de la uva dio lugar a vinos notablemente más oscuros ($L^* = 82.5$ vs. 73.5%), de mayor intensidad cromática ($C^*_{ab} = 31.9$ vs. 23.14) y tono más azulado ($h_{ab} = -9.7$ vs. -7.9°). Con el objetivo de conocer si estas diferencias pudieran ser apreciables visualmente, se calculó la diferencia de color entre los vinos ($\Delta E^*_{ab} = 10.9$ u). Se considera que el umbral de discriminación visual para un observador normal es de unas 3 unidades CIELAB (Martínez et al., 2001), por lo que se puede afirmar que la técnica de refrigeración aplicada produjo diferencias claramente apreciables por el ojo humano.

Por último, con el objetivo de comprobar cuáles eran los compuestos fenólicos, tanto pigmentos como copigmentos, que más contribuyeron a las diferencias observadas entre los vinos, se aplicaron distintas técnicas estadísticas multivariantes de clasificación a la información química obtenida.

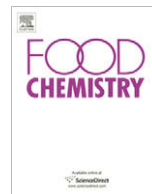
En primer lugar, la inclusión de la información química proporcionada por los compuestos fenólicos no coloreados en el análisis de componentes principales permitió obtener una buena discriminación entre distintos grupos de muestras, tanto entre los mostos y los vinos, como entre los vinos según la técnica de refrigeración aplicada. Consecuentemente se pudieron establecer algunas conclusiones sobre la estabilización del color mediante las reacciones de copigmentación. Para la correcta clasificación de las muestras en función de la técnica de refrigeración, la información aportada por el Factor 1 fue determinante. En este caso, el modelo incluyó diversos compuestos fenólicos que son considerados buenos copigmentos, como los ácidos cinámicos y distintos flavonoles. Entre éstos, determinados derivados del ácido cumárico, el ácido *m*-cutárico, derivados de la quercetina, el kaempferol, o el tirosol, tuvieron una mayor significación en la diferenciación. Debido a que el análisis de componentes principales es una técnica de clasificación no condicionada, los resultados obtenidos son de gran valor enológico ya que confirman las ventajas de la aplicación de la refrigeración previa de las uvas para obtener vinos de una mejor calidad y estabilidad cromática; lo cual es debido a que favorece una composición fenólica más rica en compuestos considerados mejores copigmentos.

En el análisis discriminante se ha considerado independientemente la información aportada por distintos grupos de fenoles, según sean o no coloreados, en función de la cual se pretende establecer una diferenciación de los vinos conforme a la técnica de refrigeración aplicada. Al considerar únicamente la información aportada por los fenoles coloreados, se comprobó que para obtener una correcta clasificación de las muestras (>95%), el modelo requiere incluir la mayoría de los pigmentos antociánicos cuantificados. Sin embargo, se obtuvo una correcta clasificación de las muestras (100%), al considerar la información aportada por los fenoles no coloreados, la mayoría de ellos, flavonoles y ácidos cinámicos.

Conclusiones

Las principales conclusiones que se extraen son las siguientes:

1. La refrigeración previa de la uva para la elaboración de vinos Syrah en clima cálido produce una mayor extracción de pigmentos y copigmentos que la refrigeración directa mediante adición de nieve carbónica, lo cual determina una mejor estructura y estabilidad química en etapas posteriores de la vinificación.
2. Se ha comprobado la utilidad de la Colorimetría Triestímulo como herramienta objetiva para el seguimiento y control de la vinificación, confirmando diferencias importantes y visualmente apreciables en el color del vino en función de la etapa de vinificación y de la técnica de refrigeración aplicada.
3. La refrigeración previa de la uva conduce a vinos distintos cromáticamente de los elaborados por refrigeración directa, siendo más oscuros, de colores más vivos y un tono más azulado.
4. Se ha establecido la relación entre la composición fenólica y antociánica y el color de los vinos, confirmando que diversos flavonoles y ácidos cinámicos son los compuestos que más contribuyen a las diferencias observadas entre éstos conforme a la técnica de refrigeración aplicada.



Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration

F.J. Heredia^{a,*}, M.L. Escudero-Gilete^a, D. Hernanz^b, B. Gordillo^a, A.J. Meléndez-Martínez^a, I.M. Vicario^a, M.L. González-Miret^a

^a Lab. Food Colour and Quality, Dept. Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, Universidad de Huelva, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2009

Received in revised form 13 March 2009

Accepted 30 April 2009

Keywords:

Colour

Tristimulus colorimetry

Red wine

Syrah

Pre-fermentative cold maceration

Refrigeration techniques

ABSTRACT

The vinification technique called pre-fermentative cold maceration is used to enhance the anthocyanins diffusion from the skins to the must, increasing the pigments extraction. For using this technique the application of low temperatures is needed. In this study, two different refrigerating methods (dry ice and cooling of grapes) have been assessed regarding the colour and the phenolic composition of the Syrah wines elaborated by applying pre-fermentative cold maceration. Results showed more intense and stable colours when grapes were previously refrigerated in cold-storage rooms, which showed higher values of chroma and more red-bluish hues. As regards phenolic composition, the cold maceration technique used yields to significant differences among the levels of phenolics, having higher levels of anthocyanins and some non-coloured phenols as flavonols in PR wines. Regarding the colour-composition relationships, it has been highlighted the importance of the co-pigments such as flavonols and cinnamic acids for classify the two groups of samples.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Colour is one of the main characteristic defining the quality of wines. During the storage the red-bluish colour of young wines changes to red-orange hues and their astringency diminishes. These sensory changes are induced by the transformation of phenolic compounds along the vinification. At the first steps of the winemaking process the wine shows bluish hues and high colour intensity since monomeric anthocyanins are implicated in co-pigmentation reactions. Nevertheless, the co-pigmentation complexes trend to disappear in the next few months of ageing due to the transformation of monomeric anthocyanins into polymeric pigments. This conversion yields to the colour stabilization of wine which shows brownish hues and less intensity colour (Boulton, 2001; Hermosín, Sánchez-Palomo, & Vicario, 2005). Anthocyanins are the pigments accounting for the colour of red wines, which are transferred to the wine during the maceration stage. The final colour of the wine depends on the extraction of phenolics from the must, which is determined by factors like the grape variety, as well as length and temperature of skin-contact, among others (Gómez & Heredia, 2004; Gómez-Plaza, Gil-Muñoz, López-Andreu, Martínez, & Fernández-Fernández, 2001).

Syrah has been described as an excellent and robust grape, easy to cultivate and little vulnerable to diseases. It is recommended to

monitor the harvests, perform a long fermentation, watch carefully the temperature, and carry out the ageing in oak barrels in order to produce quality wines from this grape (Robinson, 1996). Syrah wines exhibit high acidity, high levels of tannins and colourants, and floral and fruity aroma, with characteristic scent of violet and cassis and smoked touches.

In the last years, a new trend aimed at implementing the production of high quality red wines has been observed, which is being possible thanks to important investments in technology and the application of novel procedures intended to enhance the extraction of grape components responsible for the colour of wine. In this sense, the pre-fermentative cold maceration, also known as cold soaking or cryomaceration, is being increasingly used by enologists worldwide in order to improve some important quality characteristics of wines such as colour and aroma. This technique consists in maintaining the crushed grapes at low temperatures (5–10 °C) for a variable period (from one to several weeks), and thus the beginning of the fermentation process is delayed. During this period the extraction of polyphenols from the skins to the must takes place in the absence of ethanol. Later on, the temperature is raised to 20–25 °C and the fermentation starts in contact with the skins. The removal of the skins is performed a few days later, when the alcoholic fermentation is practically finished.

The cold needed to achieve the required low temperature can be obtained in diverse manners. Some studies have revealed that the effects of the cold maceration over the final quality of the wine are different depending on the cryogenic and the temperature

* Corresponding author. Tel.: +34 954556495; fax: +34 954557017.

E-mail address: heredia@us.es (F.J. Heredia).

used. In this sense, it is necessary to study comparatively refrigeration techniques employed to achieve the temperatures required for the pre-fermentative cold maceration. The most widely used technique is probably the addition of dry ice (solid carbon dioxide) which induces a thermal shock that cools down the must rapidly and inhibits the polyphenoloxidase enzymes. On the other hand, the saturation caused by the carbon dioxide produced by the sublimation of the dry ice displaces completely the oxygen present in the medium. Therefore, both the aroma compounds and the anthocyanic pigments become protected from oxidative reactions. Likewise, due to the freezing of the grape skins there are cellular breakdowns that favour the release and solubilisation of the pigments (Zamora, 2003, 2004). Other refrigeration method is cooling down (chilling) the grapes which will be used to produce the wine. This method consists in maintaining the grapes in a cold-storage room (below 4 °C) for 24 h prior crushing. In this case, the winery needs special equipments (cold-storage room) which are not habitual, and hence, this is not a usual process for vinification.

To gain insight into the etiology of colour it is necessary to relate the chromatic variables with the chemical compounds that account for it. Thus, there were initiatives where the anthocyanic pigments in solution (Gonnet, 1998, 1999, 2001; Heredia, Francia-Aricha, Rivas-Gonzalo, Vicario, & Santos-Buelga, 1998; Iñárrrea, Negueruela, & Echavarrí, 1992; Torskangerpoll & Andersen, 2005) or in the wine (Fernández de Simón, Hernández, Cadahía, Dueñas, & Estrella, 2003; Gómez-Cordovés & González-SanJosé, 1995; Gómez-Míguez, González-Manzano, Escribano-Bailon, Heredia, & Santos-Buelga, 2006) were studied.

The knowledge of the effects of the pre-fermentative cold maceration technique on the final quality of the wine is rather empirical; hence it is difficult to find related bibliography, and the scarce reports available are somewhat confusing. For instance, there are reports on the improvement of the colour and the phenolic content of wines through macerations with skins at around 15 °C (Gómez-Plaza, Gil-Muñoz, López-Andreu, & Martínez, 2000). Similarly, there are studies where the cold maceration is followed up with a raise in the temperature of fermentation to produce Syrah wines with higher colour intensity and varietal aromas (Reynolds, Cliff, Girard, & Kopp, 2001) in which authors recommend for this variety the use of temperatures of fermentation close to 30 °C along with a pre-fermentative cold maceration and a prolonged post-fermentative maceration.

The repercussion of the pre-fermentative cold maceration on the final colour and flavour of Syrah wines produced in Andalusia (southwest of Spain) have been already studied (Gómez & Heredia, 2004; Gómez-Míguez, González-Miret, & Heredia, 2007). The results revealed that the extraction of anthocyanins and other phenolic compounds was higher, and darker and less brown wines were obtained when the cold skin-contact process was applied.

Thus, the main objective of this study is to assess the influence of the application of two different refrigeration procedures for developing the pre-fermentative cold maceration on the colour and phenolic composition of Syrah wines. In this sense, the definition of chemical and colorimetric characteristics of the wines produced by pre-fermentative cold maceration, as well as the possible relationships between colour and chemical composition as a function of the technique of production have been assessed.

2. Materials and methods

2.1. Wine samples and vinification process

Six hundred and forty-four samples of musts and wines, corresponding to six different vinifications, were analysed. The wines were elaborated under different cold-maceration conditions, by

using two different cooling techniques to achieve low temperatures: direct refrigeration (DR) of the crushed grapes (must and solid parts) by adding carbonic ice (three assays average: 10 days CM at 5–10 °C), and previous refrigeration (PR), that is the refrigeration of the grapes in a cold-storage room at 0° for 24 h prior crushing (three assays average: 10 days CM at 3–8 °C).

All wines were elaborated in triplicate. In order to avoid effects due to other factors different from the refrigeration technique, all the processes involving the winemaking were carried out under the same conditions for all the six assays, as detailed below.

Healthy grapes of *Vitis vinifera* cv. Syrah, grown in southwest Spain, were harvested at optimum maturity (average 13.3° Baumé). Grapes were manually harvested, placed in 20 kg plastic boxes and transported to an experimental wine-production centre. About 1500 kg of grapes per assay were processed. The grapes were destemmed and crushed and then transferred into 1000 l stainless steel tanks. The cold-maceration was carried out controlling the skin contact time (10 days) and temperature (below 10 °C) by using an industrial refrigeration system, consisted of a refrigeration unit (HITSA-TOPAIR, mod RAE-101, Madrid, Spain) for the recirculation of refrigerant liquid (water:glycerol at 2–7 °C) through cooling water jackets to keep low temperatures. The cold-maceration conditions for each assay were those indicated above. After the cold-maceration period was completed, the temperature of the tanks was left to rise up to 20 °C to allow starting the alcoholic fermentation, which was conducted at controlled temperature (21–23 °C). The fermentation caps were punched down once a day for 4 days during this phase. After this, the mash was drawn off to remove the skins and other solid parts, and the free-run musts were left to finish the fermentation under the same conditions. At the end of fermentation, which occurred after 25 days, the wine was racked and stored in 500 l stainless steel tanks.

The treatments were adjusted at the same levels for all the assays: 50 mg/l total sulphur dioxide, 7 g/l total acidity expressed as tartaric acid.

2.2. HPLC–DAD phenols analysis

High performance liquid chromatography was applied for the phenolic content determination by direct injection of the samples, previously filtered through a 0.45 µm Nylon filter, in an Agilent 1100 (Palo Alto, CA), equipped with a quaternary pump, an UV–Vis diode-array detector, an automatic injector, and the ChemStation software. All analyses were made in triplicate.

The anthocyanins identification was performed following a modification of the method described in Gómez and Heredia (2004). Anthocyanins were separated on a Zorbax C18 column (250 × 4.6 mm, 5 µm particle size) maintained at 38 °C. Water–acetonitrile–formic acid (3:10:87) as solvent A, and water–acetonitrile–formic acid (50:10:40) as solvent B were used. The elution profile was as follows: 0–10 min 94% A–6% B; 10–15 min 70% A–30% B; 15–25 min 60% A–40% B; 25–35 min 55% A–45% B; 35–40 min 50% A–50% B; 40–42 min 40% A–60% B; 42–43 min 94% A–6% B. The flow-rate was 0.8 ml/min and the injection volume was 50 µl. UV–Vis spectra were recorded from 200 to 800 nm with a bandwidth of 2.0 nm. The quantification was made at 525 nm by comparing the areas and the retention times with malvidin 3-glucoside standard. The HPLC determination of the non-coloured phenolics was carried out as described in Hernanz et al. (2007). The wavelengths of detection were 280 nm (benzoic acids and tyrosol), 320 nm (cinnamic acids and their tartaric esters) and 360 nm (flavonols). The external calibration method was used for quantification, by comparing the areas with patrons of gallic, caffeic, *p*-coumaric, *m*-coumaric, protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic and ferulic acids, catechin, epicatechin, tyrosol,

Table 1

Mean values and standard deviations of the CIELAB colorimetric parameters, for direct refrigeration (DR) and previous refrigeration (PR) assays. *p*-Values of the ANOVA analysis.

Colorimetric parameter (CIELAB units)	DR (n = 402)	PR (n = 242)	<i>p</i> -Values (ANOVA)
Lightness <i>L</i> *	82.49 ± 4.99	73.50 ± 9.47	0.00
Coordinate <i>a</i> *	22.21 ± 6.33	28.40 ± 14.36	0.00
Coordinate <i>b</i> *	-3.66 ± 2.57	-3.59 ± 3.55	0.00
Chroma <i>C</i> _{ab}	23.14 ± 7.38	31.96 ± 11.67	0.00
Hue <i>h</i> _{ab}	-7.98 ± 4.74	-9.74 ± 4.85	0.00

Table 2

Mean values and standard deviations of the anthocyanin composition, for direct refrigeration (DR) and previous refrigeration (PR) assays. *p*-Values of the ANOVA analysis.

Anthocyanin (mg/l)	DR (n = 402)	PR (n = 242)	<i>p</i> -Values (ANOVA)
Delphinidin-3-glucoside	4.30 ± 3.10	8.37 ± 4.04	0.00
Cyanidin-3-glucoside	0.35 ± 1.05	1.45 ± 1.99	0.00
Petunidin-3-glucoside	9.57 ± 3.19	14.86 ± 4.69	0.00
Peonidin-3-glucoside	5.69 ± 6.16	15.20 ± 8.76	0.00
Malvidin-3-glucoside	110.89 ± 19.75	116.28 ± 28.88	0.01
Petunidin-acetate	4.96 ± 1.13	5.06 ± 1.38	0.35
Peonidin-acetate	7.48 ± 2.05	9.03 ± 2.12	0.00
Malvidin-acetate	59.44 ± 15.29	56.37 ± 14.21	0.01
Petunidin-coumarate	2.84 ± 0.83	4.40 ± 1.54	0.00
Peonidin-coumarate	5.46 ± 2.45	8.27 ± 3.00	0.00
Malvidin-coumarate	20.46 ± 12.22	31.83 ± 10.58	0.00
Total anthocyanins	231.44 ± 48.29	271.11 ± 65.93	0.00

Table 3

Mean values and standard deviations of the phenolic composition, for direct refrigeration (DR) and previous refrigeration (PR) assays. *p*-Values of the ANOVA analysis.

Phenolic compound (mg/l)	DR (n = 402)	PR (n = 242)	<i>p</i> -Values (ANOVA)
Gallic acid	12.65 ± 6.69	9.89 ± 7.54	0.01
Protocatechuic acid	4.05 ± 1.25	3.61 ± 1.03	0.01
<i>p</i> -Hydrobenzoic acid	6.33 ± 5.46	7.63 ± 7.52	0.17
Caffeic acid	2.46 ± 0.83	2.34 ± 0.60	0.23
Caftaric acid	32.21 ± 3.73	28.48 ± 5.32	0.00
Ferulic acid	1.35 ± 0.43	2.90 ± 0.83	0.00
Fertaric acid	1.50 ± 0.13	1.53 ± 0.36	0.40
<i>p</i> -Coutaric acid	6.39 ± 1.25	5.82 ± 1.42	0.00
<i>p</i> -Coumaric 1 derivatives	2.07 ± 0.62	3.12 ± 0.92	0.00
<i>p</i> -Coumaric 2 derivatives	1.45 ± 0.37	1.86 ± 0.46	0.00
<i>p</i> -Coumaric 3 derivatives	0.98 ± 0.34	0.74 ± 0.19	0.00
<i>p</i> -Coumaric 4 derivatives	0.89 ± 0.16	1.46 ± 0.37	0.00
Ethyl <i>p</i> -coumarate	0.78 ± 0.23	0.87 ± 0.26	0.01
<i>m</i> -Coutaric acid	3.04 ± 0.58	6.02 ± 1.07	0.00
Catechin	65.91 ± 18.89	55.03 ± 19.67	0.00
Epicatechin	106.15 ± 26.08	76.14 ± 24.36	0.00
Quercetin 1 derivatives	11.76 ± 4.04	16.27 ± 4.60	0.00
Quercetin 2 derivatives	7.17 ± 1.83	12.70 ± 3.45	0.00
Quercetin-3-rutinoside	13.10 ± 4.19	23.40 ± 13.96	0.00
Quercetin-3- <i>D</i> -galactoside	3.57 ± 1.04	7.31 ± 2.19	0.00
Quercetin 3 derivatives	6.06 ± 1.54	12.87 ± 2.85	0.00
Quercetin 4 derivatives	4.50 ± 1.49	9.16 ± 2.46	0.00
Kaempferol	3.04 ± 4.64	27.56 ± 22.69	0.00
Tyrosol	16.36 ± 15.90	39.06 ± 37.89	0.00
Total benzoic derivatives	23.04 ± 3.92	21.13 ± 4.78	0.00
Total <i>p</i> -coumaric derivatives	12.48 ± 2.19	13.87 ± 2.15	0.00
Total hydroxycinnamic derivatives	53.04 ± 4.91	55.14 ± 7.08	0.02
Total phenolic acids	76.08 ± 6.95	76.28 ± 8.82	0.86
Total flavonols	221.28 ± 51.25	240.44 ± 67.39	0.02
Total non-coloured phenolics	297.36 ± 55.71	316.71 ± 69.51	0.03
Total phenolics (Folin Ciocalteu)	1288.33 ± 421.53	2841.57 ± 1012.74	0.00

rutin, quercetin, kaempferol and quercetin-3-*D*-galactoside. For the identification of quercetin derivatives and the tartaric esters of the cinnamic acids their spectra were comparing to those from quercetin and the corresponding free acids, respectively.

2.3. Spectrophotometric colour measurement

Spectrophotometric measurement of the visible absorption spectrum (380–770 nm) at constant intervals ($\Delta\lambda = 2$ nm) was made, using distilled water as reference. The spectra were integrated by the CromaLab[®] software (Heredia, Álvarez, González-Miret, & Ramírez, 2004), which takes into consideration the Commission Internationale de l'Éclairage (CIE) recommendations

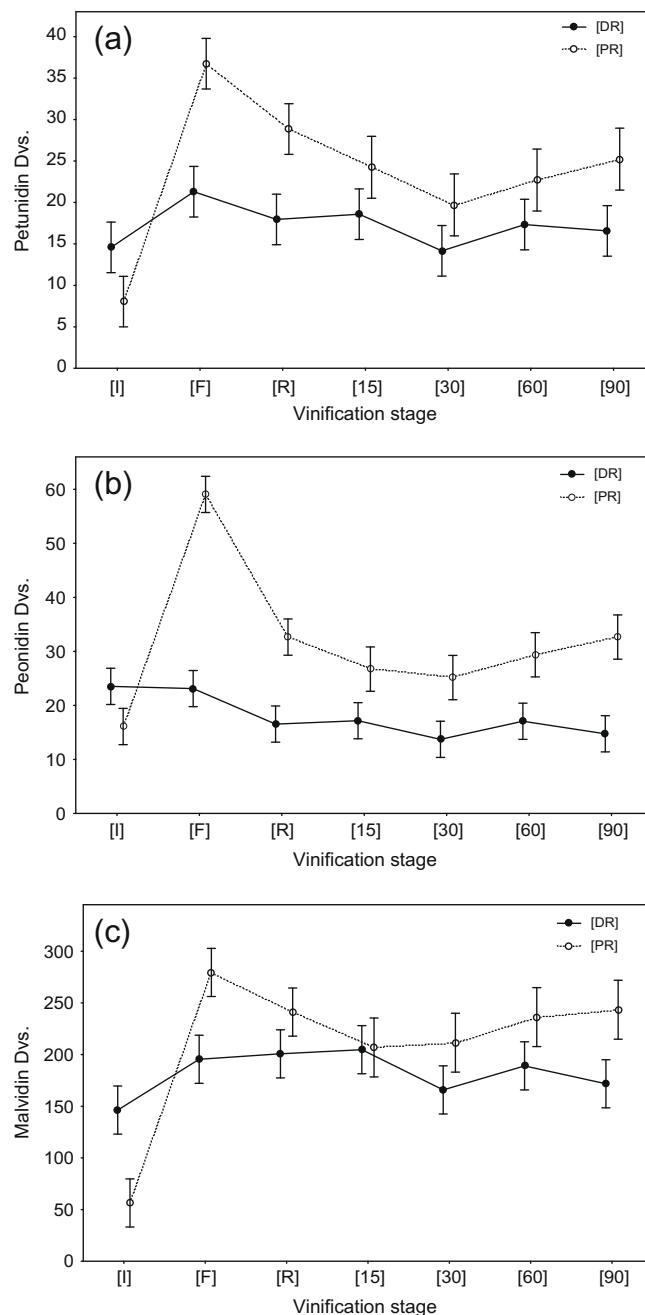


Fig. 1. Evolution of the major anthocyanidins occurring in the wine. (a) Petunidin derivatives, (b) peonidin derivatives, (c) malvidin derivatives.

(CIE, 2004). The colour coordinates of the uniform space CIE 1976- ($L^*a^*b^*$) (CIELAB) were obtained considering the 10° Standard Observer and the Standard Illuminant D65 (Wyszecki & Stiles, 1982).

2.4. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA/MANOVA), Principal Components Analysis (PA), and Stepwise Discriminant Analysis were applied in order to evaluate whether significant differences among the samples exist as well as to select the variable that most influence the differences between them. For the statistical treatment of the data the Statistica v.6.0 software (StatSoft Inc., 2001) was used.

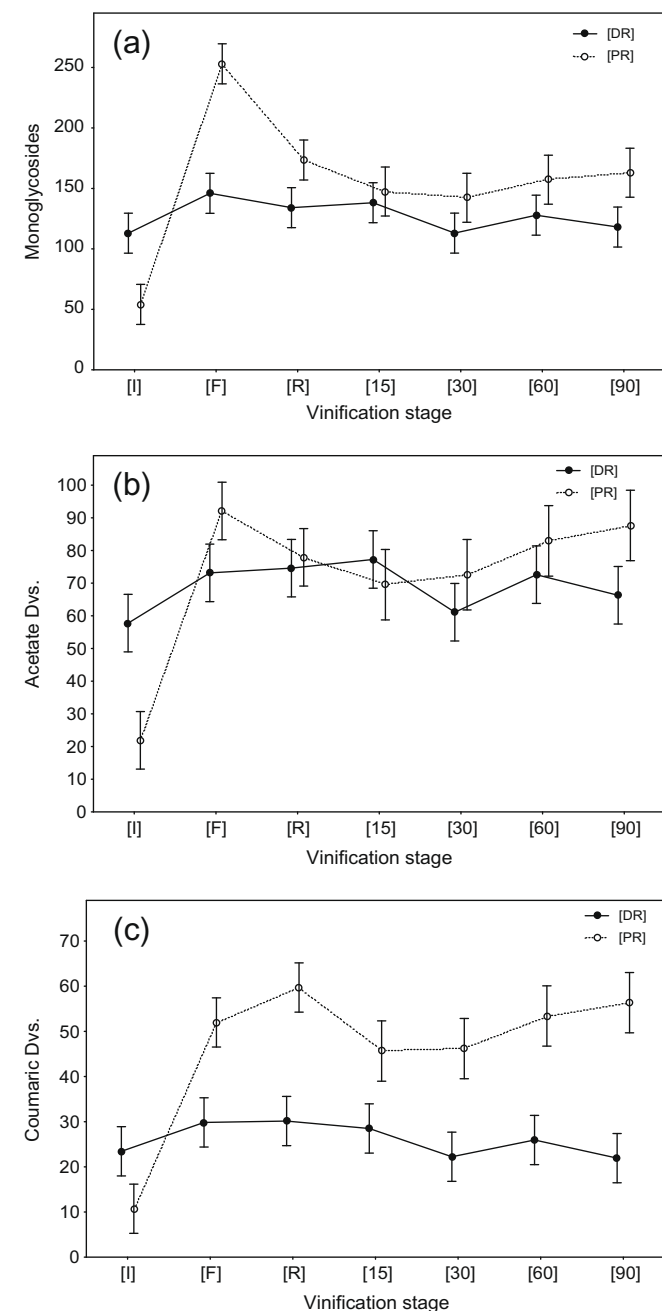


Fig. 2. Changes in the main anthocyanin groups. (a) Monoglycosides, (b) acetate derivatives, (c) coumaric derivatives.

3. Results and discussion

The colour of Syrah wines obtained by the application of different procedures of pre-fermentative cold maceration was objectively evaluated by tristimulus colorimetry. An exhaustive follow-up of the winemaking process allows us to acquire valuable information on the changes in pigments and colour of the wines.

The assessment of the changes in the levels of the pigments occurring along different stages is decisive to establish the points at which the different techniques have a greater impact in the quality of the wines. In this sense, the following stages were considered in the study: the initial point or grape crushing [I], the beginning of the fermentation [F], the skin removal [R], and 15, 30, 60 and 90 days after the removal of the skins. The mean values and the standard deviations of the colorimetric parameters, as well as the anthocyanic and phenolic composition for each type of chilling process are shown in Tables 1–3, respectively.

Regarding the colour, it can be observed that the chroma C_{ab}^* was higher in the wines obtained with previous refrigeration of the grapes and their lightness L^* was lower (darker wines). According to these results, higher anthocyanic and other phenolics contents were found in PR wines than in DR ones. Moreover, the analysis of variance (ANOVA) revealed significant differences among the levels of all the 3-glucoside anthocyanins as a function of the cold-maceration technique used, with high levels of significance in most of cases: $p < 0.001$ for delphinidin (Dp3g), cyanidin (Cy3g), petunidin (Pt3g) and peonidin (Pn3g); $p < 0.05$ for malvidin (Mv3g).

The evolutions of the compounds grouped by the anthocyanidin and the substituent were studied. When the major anthocyanins

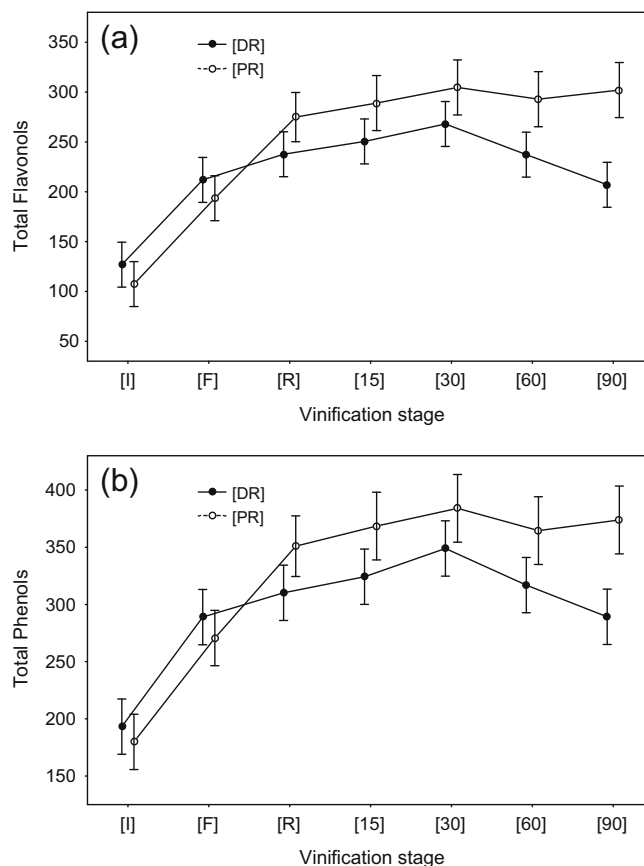


Fig. 3. Changes in phenolic composition along the vinification process, for each assay. (a) Total flavonols, (b) total phenols.

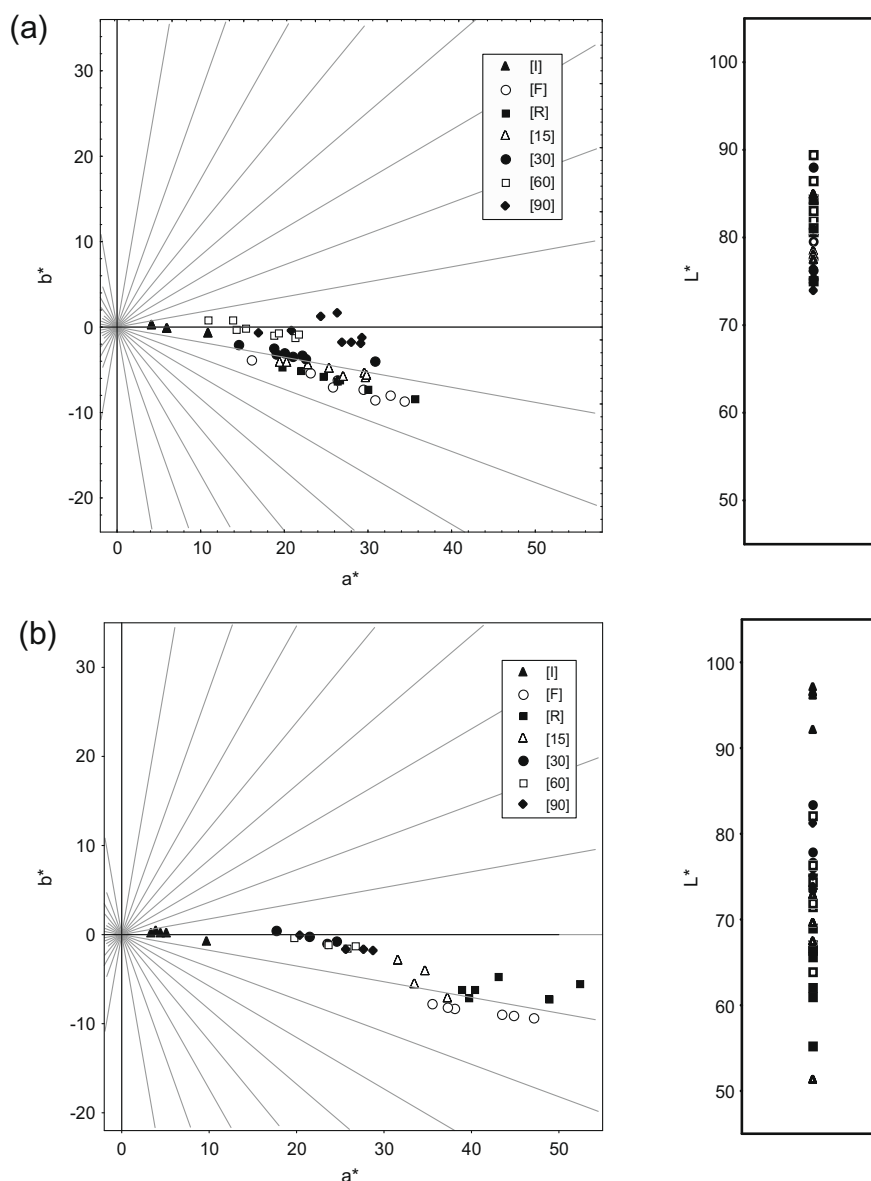


Fig. 4. CIELAB colour space (a^*b^*)-plane and lightness (L^*) for (a) direct refrigeration and (b) previous refrigeration assays.

were grouped by the anthocyanidin (Fig. 1) a very higher increase of the concentration along the cold-skin maceration was observed in all cases for the wines produced with previous refrigeration (PR). During the fermentation stage, these levels diminished, although they were always above those corresponding to the wines obtained by direct refrigeration (DR), especially for peonidin derivatives. DR wines showed a certain trend to diminish the levels of the anthocyanins and its derivatives, whilst the PR wines showed a slight ascending trend.

In general, the assays corresponding to the PR technique led to higher levels of each individual monoglycoside. It is worth stressing the changes in Mv3g, the major monoglycoside by far. Thus, it was noticed that the levels reached in both cases were similar, although in the case of the direct application of cold (DR) the appearance of the maximum levels holds back up to the removal of the skins, which denotes a slower extraction when dry ice is employed.

Considering the evolution of the groups of anthocyanins, regarding the substituent (Fig. 2), it is observed that the changes in the levels of monoglycosides (Fig. 2a) were much similar (except for

the cryomaceration stage, where higher levels were obtained for PR wines), although some differences and maybe a higher stability was perceived in the PR wines. The changes in the levels of acetate derivatives of the anthocyanins (Fig. 2b) were different and were clearer in the case of the coumarates (Fig. 2c), being their levels always higher when the previous refrigeration is used.

It could be expected that the use of carbonic ice (DR) affects the extraction of chemical components due to the breakage of the grape skins occurring during the freezing. Nevertheless, the PR wines showed higher levels (Tables 2 and 3) of anthocyanins and most of non-coloured phenols than the DR wines. It could be due to the local effect of the ice just in the mass being directly in contact with the carbonic ice, and so the increase of the extraction due to the effect of freezing is not in the whole mass. Moreover, this effect leads to more unspecific extractions which can induce reactions involving anthocyanins, yielding to less colour wines.

Considering the non-coloured phenolics, the flavonoids encompass different compounds such as the flavonols, which exhibit a great capacity to stabilize the colour of anthocyanins by co-pigmentation phenomena (Gómez-Míguez et al., 2006). Differences

between the two methodologies were observed, having higher levels in the samples from previously refrigerated grapes (PR), as observed in Fig. 3a (total flavonols), and b (total phenols).

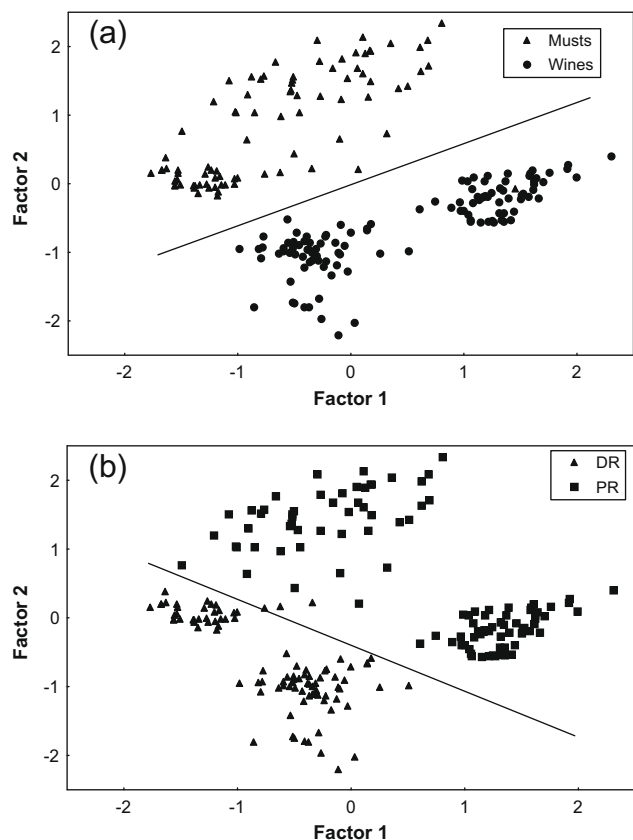


Fig. 5. Principal Components Analysis results based on the phenolic composition, regarding (a) the vinification stage, (b) the chilling process.

Table 4
Principal Components Analysis results.

	Factor 1	Factor 2
Gallic acid	0.554	-0.664
Protocatechuic acid	-0.124	-0.350
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	-0.526	0.722
Caffeic acid	0.255	-0.412
Caftaric acid	-0.390	0.031
Ferulic acid	0.786	0.327
Fertaric acid	-0.435	0.460
<i>p</i> -coumaric acid	0.133	-0.362
<i>p</i> -coumaric 1 drv.	0.937	-0.150
<i>p</i> -coumaric 2 drv.	0.860	-0.234
<i>p</i> -coumaric 3 drv.	0.057	-0.679
<i>p</i> -coumaric 4 drv.	0.608	0.484
Ethyl <i>p</i> -coumarate	0.325	-0.048
<i>m</i> -coumaric acid	0.786	0.480
Catechin	0.448	-0.618
Epicatechin	0.219	-0.690
Quercetin-3-rutinoside	0.339	0.477
Quercetin-3-galactoside	0.545	0.108
Quercetin 1 drv.	0.822	0.096
Quercetin 2 drv.	0.648	0.585
Quercetin 3 drv.	0.781	0.470
Quercetin 4 drv.	0.923	0.202
Kaempferol	0.827	0.035
Tyrosol	0.782	-0.377
Variance	8.868	4.565
Total	0.370	0.190

Bold letter means significant value ($p < 0.05$).

The definition of the colour by tristimulus colorimetry enables to establish objectively the chromatic characteristics of the wines and, above all, their variability. The colour points represented in the (a^*b^*)-colour diagram as well as their lightness are shown in Fig. 4a (DR wines) and b (PR wines). It can be noticed that practically all of samples are located in the fourth quadrant (positive a^* , negative b^*) of the (a^*b^*)-plane, corresponding to the purple or red-bluish colours region. The (a^*b^*)-colour diagram allows one to observe a clear trend in the evolution of colour. In general for both chilling techniques, during the pre-fermentative cold maceration a net rise in the chroma C_{ab}^* together to a decrease in the lightness L^* is observed, whilst the hue h_{ab} remains virtually constant. Along the active maceration (simultaneous to the alcoholic fermentation) and during the first stage after the removal of the skins slight changes in hue are noticed, although the values of chroma lie high. As the vinification proceeds, a reduction in the levels of chroma is observed, along with increase of hue towards 0° , i.e., towards the net red. Considering separately both techniques, after the pre-fermentative cold maceration the PR wines reached higher levels of chroma C_{ab}^* than the DR wines (48.1 and 35.4 CIELAB units, respectively), and lower lightness L^* values (63% and 76%, respectively). Comparing the final wines (after 90 days of stabilization) the PR wines kept the purple hues (nega-

Table 5

Coefficients of the classification functions obtained by SDA, considering the anthocyanic composition of the wines.

Anthocyanins	DR	PR
Pt-3 g	-0.16	0.18
Mv_ac	-0.17	-0.42
Pt_cm	-2.77	-0.11
Pn-3 g	0.20	0.35
Pn_cm	0.05	0.27
Pn_ac	1.76	2.38
Dp-3 g	-0.67	-1.06
Pt_ac	1.03	0.18
Cy-3 g	0.38	0.89
Mv-3 g	0.29	0.31
Constant	-15.08	-19.49
	Correct classification (%)	
Direct refrigeration (DR)	94.94	
Previous refrigeration (PR)	89.78	
Total	93.08	

Table 6

Coefficients of the classification functions obtained by SDA, considering the non-coloured phenolic composition of the wines.

	DR	PR
<i>m</i> -Coutaric acid	-2.46	3.90
Epicatechin	0.20	0.06
Quercetin 4 derivatives	-1.44	3.47
Caffeic acid	8.49	3.57
Ferulic acid	-3.96	3.11
Caftaric acid	2.05	0.52
Quercetin-3-galactoside	3.53	0.83
Quercetin 3 derivatives	-0.99	0.58
Quercetin 1 derivatives	-0.02	-0.66
Catechin	0.07	-0.18
<i>p</i> -Coumaric 4 derivatives	1.24	12.04
<i>p</i> -Coutaric acid	0.25	2.55
Quercetin 2 derivatives	-0.16	-1.12
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.53	0.98
Constant	-53.10	-56.04
	Correct classification (%)	
Direct refrigeration (DR)	100	
Previous refrigeration (PR)	100	
Total	100	

tive h_{ab} values) while some DR wines changed towards higher hue values.

The capability of different groups of variables for discriminating between types of wines (regarding the refrigeration technique) has been studied, highlighting the repercussion on the most relevant chemical components over the colour that is pigments and co-pigments.

The inclusion of the chemical information yielded by the non-coloured phenols on the PCA model allows us to reach very good discriminations, both between musts and wines, as expected (Fig. 5a), as well as between chilling technique (Fig. 5b), which makes possible to state conclusions about the colour stabilization by co-pigmentation reactions. In the second case (regarding the technology), the differentiations is mainly due to the Factor 1, which includes different phenolics considered good co-pigments as cinnamic acids and specially several flavonols (Table 4). Since the PCA is a non-conditioned technique, the results are of great enological value because they demonstrate the advantages of the pre-refrigeration of the grapes over the direct refrigeration for achieving a better colour stabilization in red wines by means of co-pigmentation.

On the other hand, Stepwise Discriminant Analysis (SDA) is a conditioned technique, so the groups of samples are previously defined. Its objective is to find a model which better classify the samples into their corresponding group based on the information given by the variables included in the study or to find the variables which better classify the samples. In this study, these variables are those phenolics presenting the major influence on the differences marked by the refrigeration technique used for the pre-fermentative cold maceration. The classification functions obtained showed that it is necessary to include almost all the anthocyanins for reaching a good discrimination (up to 95%, Table 5). Nevertheless, 100% of cases correctly classified is achieved by including only fourteen phenolics (Table 6), most of them flavonols and cinnamic acids, which are considered as good co-pigments.

4. Conclusions

It can be concluded that regarding the cooling technique used for reaching the low temperatures needed for the pre-fermentative cold maceration process the refrigeration of the grapes before crushing leads to wines with higher concentrations of anthocyanins as well as other phenolics than those wines obtained by using dry ice. Furthermore, higher values of chroma and red-bluish hues are shown in these wines. Thus, the technique used for obtaining

the low temperature influences the final chemical composition of the wine, especially regarding the phenolic compounds having high co-pigmentation power, which are of great interest on the stability of the colour of wines submitted to aging process.

Acknowledgments

Authors are indebted to Ministerio de Ciencia y Tecnología (Government of Spain) for the financial support (AGL2003-02972 Research Project) as well as to Vinícola del Condado Winery (Huelva, Spain) for supplying grapes and wine samples.

References

- Boulton, R. (2001). *American Journal of Enology Viticulture*, 52(2), 67–87.
- CIE (2004). *Colorimetry*. Vienna, Austria: Technical Report CIE 15.2, 3 ed.
- Fernández de Simón, B., Hernández, T., Cadahía, E., Dueñas, M., & Estrella, I. (2003). *European Food Research and Technology*, 216, 150–156.
- Gómez, M., & Heredia, F. J. (2004). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5117–5123.
- Gómez-Cordovés, C., & González-SanJosé, M. L. (1995). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 557–561.
- Gómez-Míguez, M., González-Manzano, S., Escribano-Bailon, M. T., Heredia, F. J., & Santos-Buelga, C. (2006). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5422–5429.
- Gómez-Míguez, M., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 79, 271–278.
- Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Andreu, F. J., Martínez, A., & Fernández-Fernández, J. I. (2001). *American Journal of Enology Viticulture*, 52, 266–270.
- Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Andreu, F. J., & Martínez, A. (2000). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 736–741.
- Gonnet, J. F. (1998). *Food Chemistry*, 63, 409–415.
- Gonnet, J. F. (1999). *Food Chemistry*, 66, 387–394.
- Gonnet, J. F. (2001). *Food Chemistry*, 75, 473–485.
- Heredia, F. J., Álvarez, C., González-Miret, M. L., & Ramírez, A. (2004). *CromaLab®*. Sevilla, España: Registro General de la Propiedad Intelectual SE-1052-04.
- Heredia, F. J., Francia-Aricha, E. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M., & Santos-Buelga, C. (1998). *Food Chemistry*, 63, 491–498.
- Hermosín, I., Sánchez-Palomo, E., & Vicario, A. (2005). *Food Chemistry*, 92, 269–283.
- Hernanz, D., Recamales, A. F., González-Miret, M. L., Gómez-Míguez, J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). *Journal of Food Engineering*, 80, 327–335.
- Iñarrea, M., Negueruela, A. I., & Echavarri, J. F. (1992). *Óptica Pura y Aplicada*, 25, 93–107.
- Reynolds, A., Cliff, M., Girard, B., & Kopp, T. G. (2001). *American Journal of Enology Viticulture*, 52, 235–240.
- Robinson, J. (1996). *Guide to wine grapes*. Oxford: Oxford University Press.
- StatSoft Inc. (2001). *STATISTICA (data analysis software system)*. version 6. <www.statsoft.com>.
- Torskangerpoll, K., & Andersen, O. M. (2005). *Food Chemistry*, 89, 427–440.
- Wyszecki, G., & Stiles, W. S. (1982). *Color science. Concepts and methods. Quantitative data and formulae* (2nd ed.). New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto. Aspectos científicos y prácticos*, AMV ed. Madrid: Editorial Mundi-Prensa.
- Zamora, F. (2004). *Enólogos*, 32, 36–39.

Capítulo 4. APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y LA COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO AL ESTUDIO DE LA APTITUD PARA EL ENVEJECIMIENTO DE VINOS TINTOS SYRAH ELABORADOS EN EL CONDADO DE HUELVA

Antecedentes

Mediante el proceso de envejecimiento en barrica, al ser la madera un material poroso, se somete al vino a un proceso de microoxigenación lento y progresivo, que en términos generales favorece un mayor desarrollo de las reacciones de polimerización, una estructura química más compleja, una mejor estabilización colorimétrica, y una clarificación espontánea (Pérez-Prieto et al., 2003; Cano-López et al., 2010). Recientemente, se han identificado diferentes grupos de pigmentos derivados antociánicos en los vinos tintos que resultan de la interacción entre los antocianos procedentes de la uva y una gran variedad de compuestos orgánicos presentes en el vino, incluidos los compuestos fenólicos de uva, metabolitos secundarios del proceso de fermentación o ciertos compuestos presentes en la madera que se extraen en vino durante el envejecimiento (Gambutí et al., 2010). Estos nuevos pigmentos, aunque están presentes en cantidades muy pequeñas, presentan unas características químicas y espectroscópicas particulares que justifican su importancia sensorial, ya que contribuyen positivamente a la estructura del vino, su color y estabilidad. Se han descrito diversos mecanismos para explicar la formación de estos pigmentos, estando algunas de ellas favorecidas por la presencia de oxígeno o acetaldehído derivados de la oxidación del etanol (He et al., 2006). Sin embargo, debido a que las transformaciones químicas que determinan la formación de éstos son complejas y, en general, requieren largos periodos de tiempo, es necesario tener en cuenta que todos los vinos no tienen la misma capacidad para ser sometidos a un proceso de envejecimiento. En zonas cálidas, las peculiaridades climáticas hacen que las uvas, y por lo tanto el vino que se elabora a partir de ellas, tengan características diferentes a las de otras zonas vitivinícolas, en algunos casos inadecuadas, que dificultan la obtención de vinos de calidad (Jones et al., 2005). Uno de los principales inconvenientes es la pérdida de la estabilidad cromática en los vinos tintos, especialmente cuando son sometidos a crianza, lo que les impide llevar a cabo un adecuado proceso de envejecimiento en madera. Sin embargo, recientemente en estas regiones se están incorporando nuevas variedades de uvas tintas con el fin de diversificar la oferta de vinos producidos en ellas, fomentar su consumo y expandir su mercado. En ese sentido, en los últimos años, se viene manifestando un gran interés por la elaboración de vinos tintos con

crianza en madera, que presenten características químicas y colorimétricas más acordes con las actuales demandas del mercado.

Objetivos

El objetivo general es evaluar la aptitud para el envejecimiento en barrica de vinos tintos de la variedad Syrah cultivada en la D.O. “Condado de Huelva”, elaborados particularmente mediante maceración prefermentativa en frío, técnica de vinificación orientada a obtener vinos con una mayor calidad y estabilidad cromática. Como objetivos concretos se plantean:

- Aplicar la cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a la detección por espectrometría de masas (HPLC-MS) a la caracterización y la cuantificación del perfil antociánico detallado de los vinos tintos elaborados.
- Definir las etapas clave del proceso de envejecimiento y establecer las condiciones óptimas de éste en función del efecto del tiempo en la evolución de las principales familias antociánicas.
- Aplicar la Colorimetría Triestímulo al estudio de la calidad y estabilidad del color de los vinos durante el proceso de envejecimiento.
- Evaluar por Colorimetría Triestímulo el efecto cuantitativo y cualitativo de la copigmentación en el color de vinos tintos envejecidos.
- Establecer, mediante la aplicación de técnicas estadísticas a la información química y colorimétrica, diferencias entre los vinos sometidos a distinto tiempo de envejecimiento.

Parte experimental

Para el desarrollo del presente estudio se ha elaborado un vino tinto de la variedad Syrah, mediante maceración prefermentativa a bajas temperaturas en la D.O. “Condado de Huelva” (campaña 2007), el cual fue posteriormente sometido a un proceso de envejecimiento en barrica durante 1 año. Tras un periodo de estabilización en depósito durante 5 meses, el vino se distribuyó en barricas de roble americano (225 L, tostado medio), analizándose por triplicado a los 3, 6, 9 y 12 meses.

El perfil antociánico de los vinos se analizó por HPLC-DAD-MS. El grado de copigmentación (%AC) y polimerización (%PP) se determinaron según el método de Boulton (1996). El efecto de la copigmentación en el color de los vinos se evaluó por Colorimetría Triestímulo, comparando el color del vino con y sin efecto de la copigmentación tras diluir éste 1:20 en vino sintético. El color se analizó mediante espectrofotometría de transmisión, obteniéndose las coordenadas de color CIELAB con el software CromaLab[®] (Heredia et al., 2004). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica[®] ver. 8.0. (StatSoft Inc., 2007).

La cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a la detección por espectrometría de masas (HPLC-MS) permitió separar, identificar y cuantificar un total de 32 pigmentos antociánicos. Entre estos se diferenciaron 14 compuestos mayoritarios procedentes de la uva (libres y acilados) y 18 compuestos minoritarios formados durante la vinificación (pigmentos antociánicos derivados), la mayoría procedente de Mv 3-gl y Pn 3-gl. De acuerdo con su estructura química, los compuestos identificados se agruparon en 4 familias:

a) Antocianos monoméricos, agrupados como monoglucósidos, y diversos derivados acilados: delfinidina 3-glc, petunidina 3-glc, malvidina 3-cafeoilglc, peonidina 3-glc, malvidina 3-glc, delfinidina 3-acetilglc, petunidina 3-acetilglc, peonidina 3-acetilglc, malvidina 3-acetilglc, delfinidina 3-p-coumaroilglc, cianidina 3-p-coumaroilglc, petunidina 3-p-coumaroilglc, peonidina 3-p-coumaroilglc, malvidina 3-p-coumaroilglc.

b) Piranoantocianos: vitisina A, vitisina B, vitisina A derivada de malvidina 3-acetilglc y malvidina 3-p-coumaroilglc, vitisina B derivada de peonidina 3-acetilglc y malvidina 3-acetilglc y malvidina 3-p-coumaroilglc, malvidina 3-gl-4-vinilcatecol, 4-vinilcatequina, 4-vinilfenol, y malvidina 3-acetilglc-4-vinilcatequina.

c) Pigmentos antociano-flavanol mediados por acetaldehído: malvidina 3-glc etil-catequina, malvidina 3-acetilglc etil-catequina, petunidina 3-glc-py-etil-catequina, malvidina 3-p-coumaroilglc-4-etil-catequina.

d) Pigmentos antociano-flavanol por condensación directa: malvidina 3-glc-catequina, malvidina 3-acetilglc-catequina, peonidina 3-p-coumaroilglc-catequina.

En cuanto al contenido de los pigmentos identificados, se observó que los vinos presentaron una concentración de antocianos, tanto mayoritarios como minoritarios, similar a las recogidas en bibliografía para otros vinos envejecidos en regiones españolas de clima cálido, como es el caso de la variedad Monastrell (Cano-López et al., 2010). Sin embargo, dicho contenido fue inferior si se compara con el de vinos tintos envejecidos en otras regiones de España con un clima menos extremo, y elaborados con variedades como Tempranillo o Graciano (García-Marino et al., 2010).

Estas diferencias pueden explicarse debido al efecto de dos factores, el clima y la variedad de uva. Con respecto al clima, es conocido que las condiciones extremas cálidas, como en el caso de los vinos Syrah y Monastrell descritos, pueden inhibir la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos en la uva, afectando negativamente a su potencial fenólico (Zamora, 2003; 2005). Consecuentemente, los vinos elaborados a partir de uvas con bajas concentraciones de pigmentos y otros compuestos fenólicos no son capaces de formar correctamente complejos de copigmentación en las primeras etapas de la vinificación, por lo que los pigmentos extraídos de la uva sufren una mayor degradación (Gómez-Plaza et al., 2000; Boulton, 2001) Con respecto a la variedad de uva, debido a que el potencial fenólico está determinado genéticamente, algunas variedades presentan naturalmente un mayor potencial que otras (Fanzone et al., 2012), las cuales si se desarrollan bajo condiciones climáticas no limitantes, dan lugar a vinos con una estructura química compleja y más estable, como es el caso de la variedad tinta Graciano descrita.

En cuanto a la evolución del contenido de las distintas familias de pigmentos en función del tiempo de crianza en barrica, se observó que a medida que el vino envejece se produjo una disminución de la contribución relativa de los antocianos mayoritarios (libres y acilados), menos estables y que aportan tonalidades más azuladas. Por el contrario, la contribución relativa de pigmentos minoritarios, de mayor estabilidad química y tonalidades rojo-anaranjadas (derivados antociánicos), tendió a incrementar, fundamentalmente los piranoantocianos.

Sin embargo, se comprobó que el patrón de evolución no fue igual para los distintos pigmentos minoritarios identificados. Entre 3 y 6 meses de crianza en barrica, los compuestos minoritarios predominantes fueron los piranoantocianos tipo vitisina, tanto de clase A como B. Por el contrario, en etapas más avanzadas del envejecimiento, los piranoantocianos de menor polaridad adquirieron de forma progresiva una mayor relevancia, destacando los compuestos 4-vinilcatequina, 4-vinilfenol y 4-vinilcatecol. Particularmente, la Mv 3-gl-4-vinilcatecol se detectó sólo a partir de 9 meses de crianza, alcanzando los niveles más elevados en la última etapa de ésta. La diferencia en cuanto a la presencia y evolución de éstos derivados antociánicos, se explica porque la reacción entre la Mv 3-gl y el vinilcatecol se caracteriza por ser más lenta y por tanto requiere un mayor tiempo de envejecimiento, mientras que la formación de aductos con vinilfenol o vinilcatequina generalmente se produce desde la etapa de fermentación (Fulcrand et al., 1996).

Por último, cabe resaltar la menor relevancia de los pigmentos derivados antociano-flavanol en el perfil antociánico de los vinos de Syrah estudiados, tanto a los formados por condensaciones directas o mediadas por acetaldehído. Con respecto a los primeros, fueron más abundantes en etapas intermedias del proceso de crianza (6 y 9 meses). En cuanto a los segundos, destacó la presencia mayoritaria de la Mv 3-glc-etilcatequina, cuyo contenido disminuyó significativamente a partir de 6 meses de crianza, poniendo de manifiesto la menor resistencia de esta familia de pigmentos frente al proceso de envejecimiento.

Aunque la copigmentación es un fenómeno generalmente característico de fases iniciales de la vinificación, los resultados mostraron que estuvo presente durante todo el proceso de crianza considerado, alcanzando un valor máximo en las muestras correspondientes a 3 meses de crianza en barrica (%AC= 28%). No obstante, la magnitud del copigmentación que presentaron los vinos Syrah estudiados fue menor a la descrita en otros vinos tintos jóvenes, donde este fenómeno puede llegar a contribuir hasta en un 50% al color total del vino (Boulton, 2001). La evaluación por Colorimetría Triestímulo puso de manifiesto que la copigmentación indujo siempre variaciones colorimétricas positivas en el color del vino que, además, fueron visualmente apreciables ($\Delta E^*_{ab} > 3$), confirmando la importancia de este fenómeno en etapas más avanzadas de la vinificación. A partir de los 3 meses, simultáneamente a la disminución del grado de copigmentación, se produjo un incremento del grado de polimerización, que alcanzó su valor máximo a los 9 meses (77%).

En cuanto a las características colorimétricas, se observó una influencia significativa del tiempo de crianza en los atributos del color, tanto en los cuantitativos (L^* y C^*_{ab}) como en los cualitativos (h_{ab}). Entre 3 y 9 meses, el color del vino evolucionó oscureciéndose e incrementando su intensidad cromática ($L^* = 75.6\%$; $C^*_{ab} = 24.7$) y perdiendo además los tonos azulados ($h_{ab} = +6.1^\circ$). Posteriormente, entre 9 y 12 meses, los vinos experimentaron un ascenso de la claridad y una disminución de la intensidad colorimétrica, debido probablemente a la precipitación de parte de la materia coloreada, lo cual coincide con una disminución del grado de polimerización y una importante degradación de pigmentos antociánicos mayoritarios. En cuanto al tono, a los 12 meses de envejecimiento, los vinos presentaron el valor más elevado ($h_{ab} = +11.3^\circ$), es decir, pierden los rasgos cromáticos propios de vinos jóvenes y muestran un color rojo con ciertos matices ligeramente rojo-anaranjados. El incremento progresivo del tono observado refleja el mayor peso de los pigmentos

minoritarios ($\lambda_{\text{máx}} = 430\text{-}460\text{ nm}$) en el color total del vino a tiempos mas prolongados de envejecimiento.

La aplicación del análisis en componentes principales a la información química y colorimétrica permitió una clara diferenciación de los vinos Syrah sometido a distintos tiempos de envejecimiento en barrica. Los dos primeros componentes principales, con autovalores superiores a 1, explicaron el 91.3% de la varianza. Para la correcta clasificación de las muestras, el modelo incluyó diversos pigmentos antociánicos, tanto mayoritarios (monoglucósidos, derivados acetilados y *p*-cumaroilados) como minoritarios (vitisinas, y derivados 4-vinilfenoles y Mv 3-gl-4-vinilcatequina); y entre las variables cromáticas consideradas, la claridad (L^*) y el croma (C^*_{ab}) tuvieron una mayor significación. Únicamente, las muestras correspondientes a 3 meses de envejecimiento mostraron un cierto solapamiento con las de 6 meses, obteniéndose en este caso un 66.6% de clasificación. Sin embargo, para el resto de muestras, la clasificación obtenida fue del 100%.

Conclusiones

Las principales conclusiones que se extraen de los resultados obtenidos en el presente estudio son las siguientes:

1. Gracias a la aplicación de la técnica analítica HPLC-MS, se ha podido determinar de manera exhaustiva el perfil antociánico detallado, de vinos tintos Syrah procedentes de la D.O. "Condado de Huelva" y sometidos a crianza en barrica.
2. Los compuestos antociánicos minoritarios con una mayor implicación en el color de los vinos estudiados son, principalmente, los pigmentos derivados de tipo piranoantocianos. Entre éstos destaca la presencia de las vitisinas en los primeros meses del envejecimiento, y los derivados 4-vinilfenoles y 4-vinilcatequina más relevantes en las etapas más avanzadas de crianza.
3. Periodos de envejecimiento entre 3 y 9 meses de crianza en barrica dan lugar a vinos con un mayor grado de polimerización, más oscuros y con mayor intensidad de color. Sin embargo, el efecto del proceso de envejecimiento sobre el color se modifica apreciablemente al prolongar el tiempo de crianza, resultando vinos de un color menos intenso y más claro.
4. La aplicación de la Colorimetría Triestímulo ha permitido evaluar las implicaciones colorimétricas del fenómeno de copigmentación durante uno de los procesos clave en el color del vino, la crianza en barrica. Se ha observado

que las modificaciones en el color, tanto a nivel cuantitativo (de la claridad L^* y del croma C^*_{ab}) como cualitativo (del tono h_{ab}), están influidas por el tiempo de envejecimiento.

5. Mediante la aplicación del análisis en componentes principales a la información química y colorimétrica, se han logrado establecer una clara diferenciación de los vinos sometido a distintos tiempos de envejecimiento en barrica.



ELSEVIER

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Application of LC–MS and tristimulus colorimetry to assess the ageing aptitude of Syrah wine in the Condado de Huelva D.O. (Spain), a typical warm climate region

B. Gordillo^a, F.J. Rodríguez-Pulido^a, N. Mateus^b, M.L. Escudero-Gilete^a, M.L. González-Miret^a, F.J. Heredia^{a,*}, V. de Freitas^b

^a Food Colour and Quality Laboratory, Department of Nutrition and Food Science, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

^b Centro de Investigação em Química, Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 4169-007 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 January 2012
Received in revised form 22 March 2012
Accepted 29 March 2012
Available online xxx

Keywords:

Ageing process
Copolymerisation
Detailed pigment composition
Quality colour
Oak wood

ABSTRACT

The study of the evolutions of different wine pigment families, copigmentation/polymerisation processes and colour characteristics during the first year of ageing in oak barrel has allowed the assessment of the ageing aptitude of Syrah wines from “Condado de Huelva D.O.”, a warm climate region. A total of 32 anthocyanic pigments were identified, including 14 major compounds from grape and 18 minor derivatives formed during the vinification. The anthocyanin profile changed towards more chemical complexity, being vitisin-like pyranoanthocyanins the predominant minor pigments during the first month of ageing. As wine became older, a progressive increase on the content of 4-vinylcatechin, 4-vinylphenol and 4-vinylcatechol compounds took place. Results showed that copigmentation occurred during the whole process of ageing inducing visual perceptible colour effects. Simultaneously to the copigmentation decrease, the degree of polymerisation increased during ageing, being maximum at 9 months old wines (77%). The colour of wines evolved progressively in a positive way from 3 to 9 months of ageing, becoming darker and with more vivid colour. However, from 9 to 12 months of ageing, the chemical structure of wines was negatively affected resulting in lighter, with more red-orange hues and less vivid colours. The inclusion of the chemical and colorimetric information on the PCA model allows us to reach very good discriminations among the Syrah wines with different wood contact period.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The climatic conditions of a given geographical area is one of the most important factors influencing the overall wine style of a region since determine the types and the quality of grapes that can be grown [1].

In warm climate regions, red grapes have not been traditionally cultivated because the high night temperatures and the severe light exposures during the ripening affects negatively the anthocyanic biosynthesis and its accumulation in the fruit skin, giving rise to poor coloured grapes [2]. As a consequence, red wines elaborated from them usually show important problems with colour quality and stability during winemaking maturation, especially when they are subjected to ageing processes.

However, due to the market demand, the interest for red wine vinifications in warm regions is becoming more and more increasing in the last decades. Particularly, in the “Condado de Huelva” Designation of Origin (D.O.), a restricted wine-producing zone in

south-western Spain with the typical climatological conditions of warm climate, new red grape varieties are being introduced in order to diversify the wine choice of the D.O. and to expand their potential market [3]. This D.O. includes approximately 6000 ha of neutral or slightly alkaline soil, having a typical Mediterranean climate with a clear Atlantic influence: gentle winters and springs and long and warm summers (average temperature 18 °C, minimum over 10 °C in winter and over 40 °C in summer), relative humidity ranging between 60% and 80%, and mean rainfall around 700 mm year⁻¹.

Vitis vinifera cv. Syrah grape is the main and more extensively grown in the zone. It was selected because has been described as an excellent and robust grape, well adapted to warm climate, easy to cultivate and little vulnerable to diseases.

In fact, the elaboration of young Syrah wines with better phenolic composition and higher colour intensity in the “Condado de Huelva D.O.” has been already possible thanks to important investments in new technologies such as the application of low maceration temperatures prior to fermentation, which resulted in a more effective extraction of the anthocyanin pigments and improved the colour stabilisation during the earlier stages of wine maturation [4,5]. Notwithstanding, as was previously stated, to produce high quality wines from Syrah grapes besides to preserve

* Corresponding author. Tel.: +34 954556495; fax: +34 954557017.
E-mail address: heredia@us.es (F.J. Heredia).

the levels of phenols in the winemaking, perform a long fermentation and watch carefully the temperature, submitting them to ageing processes is also recommended since they are especially fit for ageing in oak barrels [6]. Taking into account the absence of previous studies about the ageing potential of this variety during longer ageing processes in this region, further investigations are still necessary.

Nowadays, is well-known that the expression of the colour in red wines depends not only from the anthocyanin concentration originally extracted from grapes but also on physicochemical phenomena of copigmentation that led to the formation of new derived pigment which stabilise wine colour [7].

Recently, different groups of anthocyanin-derived pigments with particular colour characteristics have been identified in red wines, such as pyranoanthocyanins, direct flavanol–anthocyanin condensation products and acetaldehyde-mediated flavanol–anthocyanin condensation products [8]. Although some of these pigments have only been detected in very small quantities in wines, they present unique spectroscopic features that may somehow contribute together to the overall colour of aged red wines by means of additive, synergistic, or suppressive effects [9]. A common colorimetric characteristic of all these derived pigments is the greater resistance to degradation reactions that could further enhance their sensorial importance.

Different mechanisms have been proposed and confirmed the formation of this compounds [10,11] being some of them favoured by the presence of oxygen [12]. For this reason, although wine ageing in oak barrels implies a high cost outlay for the wineries, it is commonly used because the positive effects over the global quality of wines. Barrel storage leads the wine to undergo a “low oxidation process”, being the natural rate of permeation of oxygen into a new oak barrel is approximately between 1.66 and 2.5 mL L⁻¹ month⁻¹ (20–30 mL L⁻¹ year⁻¹). It plays an important role in polymerisation reactions as well as increasing colour stability, spontaneous clarification and wine complexity [13].

Although the wine quality depends on several factors and components (phenolic compounds extracted from the wood, aroma, stability in bottle, flavour, etc.), the main objective of this paper is to study more in depth the detailed anthocyanic composition of the aged Syrah wines elaborated in the “Condado de Huelva D.O.”, a typical warm climate region, as well as to assess their role in the wine colour quality according to the ageing time. For these purposes, not only the occurrence of the main anthocyanins was studied, but also those of the anthocyanin-derived pigments in order to establish the contribution of each pigment family at each moment of wine ageing. As the identification of minor pigments has proven difficult, especially because their levels are much lower than those of original anthocyanins, high performance liquid chromatography–diode array detection coupled to mass spectrometry (HPLC–DAD–MS) has been used in pigment identification.

Regarding colour assessment, tristimulus colorimetry, based on objective and direct spectral measurements, represent a useful methodology for colour specifications in red wines by means of the quantitative and qualitative colorimetric variables, which also provide high precision and accuracy to follow the integral colorimetric effect induced by copigmentation processes [14]. Moreover, applying principal component analysis, the usefulness of the pigment composition and colorimetric variables in the differentiation of the wines as a function of the ageing time was also assessed.

2. Materials and methods

2.1. Wine samples and ageing process

A red wine made from grapes *Vitis vinifera* var. Syrah (2007 vintage) cultivated in “Condado de Huelva” Designation of Origin,

in south-western Spain, was used for the experiment. The wine was elaborated by “prefermentative cold-maceration”, a vinification technique designed to obtain high concentrations of phenolic compounds, particularly anthocyanin pigments. It consisted of two stages: a first stage of 11 days of pre-fermentative cold maceration (between 5 and 8 °C), followed by 15 days of traditional maceration (between 20 and 25 °C). The cold-maceration process was carried out by using an industrial refrigeration system (HITSA-TOPAIR, mod RAE-101, Madrid, Spain) for the recirculation of refrigerant liquid through cooling water jackets to keep low temperatures. At the end of the stabilisation process in stainless steel tanks during 5 months, the wine without any previous treatment was distributed into three new American oak barrels (225 L, medium toast), where it was maintained for a 12 months. In order to avoid effects due to other factors different from the ageing time during the ageing process, all the processes involving the winemaking were carried out under the same conditions for all the barrels assays. The analytical characteristics of the wine at the start of the ageing process, considered as reference, were as follows: ethanol content, 12.53 ± 0.32; titratable acidity, 5.17 ± 0.07 g L⁻¹; volatile acidity, 0.63 ± 0.03 g L⁻¹; pH, 3.48 ± 0.02; residual sugars, 1.42 ± 0.11 g L⁻¹; free SO₂, 33.42 ± 2.8 mg L⁻¹; total SO₂, 57.62 ± 4.8 mg L⁻¹; malic acid, 0.6 ± 0.31 g L⁻¹; lactic acid, 2.86 ± 0.22 g L⁻¹.

Samples were analysed at 3, 6, 9, and 12 months of ageing, so a total of 12 wines (200 mL) were submitted to study.

2.2. HPLC–DAD–MS analysis

The HPLC used was an ELITE LaChrom fitted with a L-2130 quaternary pump, a L-2200 autosampler and a L-2455 DAD. The stationary phase was a MERK RP-C18 column 250 mm × 4 mm i.d. (5 μm). The injection volume was 20 μL and the mobile phase was composed by two solvents: solvent A, a 10% (v/v) aqueous formic acid solution, solvent B, formic acid:acetonitrile:water (1:3:6) (v/v). The elution conditions were: flow rate set at 1 mL min⁻¹, starting with a linear gradient from 20% to 66% of B in 50 min, a second linear gradient from 66% to 100% of B for 10 min followed by an isocratic elution of 100% of B for another 10 min. The column was washed with 100% of acetonitrile for a 7 min period preceded by a re-equilibration step of 15 min of isocratic 20% of B. The UV–vis absorbance spectra were recorded from 250 to 700 nm and the peaks recorded at 520 and 280 nm.

MS analyses were performed using a Finnigan LCQ MS detector (Thermoquest) equipped with an API source, using an electrospray ionisation (ESI) interface. The HPLC system was connected to the probe of the mass spectrometer via the UV cell outlet. Both the sheath and the auxiliary gas was nitrogen. The sheath gas flow was 1.2 L min⁻¹ and the auxiliary gas flow 6 L min⁻¹. The source voltage and the capillary voltage were 4.50 kV and 26 V, respectively, and the capillary temperature 195 °C. Spectra were recorded in positive ion mode between *m/z* 150 and 2000. The mass spectrometer was programmed to do a series of consecutive scans: a full mass and a MS2 scan of the most abundant ion in the full mass. The normalised energy of collision was 45%.

The quantification of the anthocyanins compounds was made by comparing the areas and the retention times with the malvidin 3-glucoside standard, and anthocyanin concentration was expressed as mg L⁻¹. On the basis of their chemical structure, the overall pigment profile was divided into four major pigment families: (a) monomeric anthocyanins, grouped as anthocyanidin-3-*O*-gluc (GL), acetylated anthocyanins (AC) and *p*-coumaroyl anthocyanins (COUM), (b) pyranoanthocyanins (PY), (c) acetaldehyde-mediated flavanol–anthocyanin products (ACD), and (d) direct flavanol–anthocyanin condensation products (DC). The proportion of the different pigment families estimated by summing the content of each member found and the total pigment content

estimated as the sum of the all compounds identified (SUM.TA) were also calculated.

2.3. Copigmented and polymerised anthocyanins determination

The contribution of copigmented anthocyanins (%CA) and polymeric pigments (%PP) to the total wine colour at pH 3.6 were determined following the method proposed by Boulton [15]. Wine samples were firstly adjusted to pH 3.6. The colorimetric effect of the copigmentation phenomenon was also evaluated by tristimulus colorimetry as reported by Gordillo et al. [14].

2.4. Colorimetric measurements

The whole visible spectrum of the wines (380–770 nm) was recorded at constant intervals ($\Delta\lambda = 2$ nm) with a Hewlett-Packard UV-vis HP8452 spectrophotometer (Palo Alto, CA), using 2 mm pathlength glass cells and distilled water as a reference. The CIELAB parameters (L^* , a^* , b^* , C_{ab}^* and h_{ab}) were determined by using the original software ChromaLab® [16], following the Commission Internationale de L'Eclairage recommendations: the 10° Standard Observer and the Standard Illuminant D65 [17]. Colour differences (ΔE_{ab}^*) were calculated as the Euclidean distance between two points in the three-dimensional space defined by L^* , a^* and b^* :
$$\Delta E_{ab}^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$
.

2.5. Statistical analysis

Significant differences among wines and for each variable were assessed by analysis of variance (ANOVA) using the Statistica® v 8.0 software [18].

3. Results and discussion

3.1. Detailed pigment composition in aged Syrah wines

In the Syrah wines studied 32 anthocyanic pigments were identified from suitable information concerning their UV–vis or mass spectral characteristics by comparing them with those reported by relevant literature references [9,19,20] (Table 1). Fig. 1 shows the HPLC chromatograms of the representative wine sample recorded at 520 nm, corresponding to 3 and 12 months of ageing.

In agreement with previous reports about other young and aged red wines [13,20,21], the major peaks in the HPLC chromatograms in all samples corresponded to monoglucoside anthocyanins, particularly of delphinidin (Dp 3-glc), petunidin (Pt 3-glc), peonidin (Pn 3-glc) and malvidin (Mv 3-glc) (peaks 2, 3, 5 and 6). Their identities were easily identified by UV–vis and MS analysis, providing a very high response factor. On contrast, cyanidin 3-glucoside was not detected in any of the aged wine samples revealing the lower stability of this anthocyanin against oxidative reactions due to its *o*-diphenolic chemical structure [22].

In the same way, their corresponding acetic (peaks 8, 13, 17, and 18) and coumaric (peaks 19, 21, 22, 28 and 29) esters were present in several samples but in minor proportions. The particular identity of all acyl derivatives was elucidated from their molecular ions, which showed other peaks $[M-204]^+$ and $[M-308]^+$, representing the aglycone after the loss of an acetylglucoside or coumaroylglucoside group. Specially, the peaks of Pn 3-glc derivatives (peaks 17 and 28) are overlapped by those of Mv 3-glc derivatives, being the MS^3 analysis very useful for the discrimination of their identities since malvidin had the characteristic elimination mass of 16 u whereas peonidin derivatives of 15 u.

The occurrence of esters of the caffeoyl acid with all monoglucoside anthocyanins were identified by Alcalde-Eon et al. [9] in

Tempranillo wines. However, in the Syrah wines studied, only Mv 3-caffeoylglucoside was detected, particularly in three month ageing samples (peak 4). It was assigned according to its mass (molecular ion at m/z 655, MS^2 fragment at m/z 331 and MS^3 at m/z 315) and HPLC retention characteristics, eluting immediately before Pt 3-glc.

Besides the main anthocyanin compounds referred, other 18 minor anthocyanin-derived pigments were identified. Monagas et al. [23] stated that the occurrence of anthocyanin-derived pigments in different red wines was related to the concentration of the corresponding anthocyanin precursors. In the aged wines studied, they were basically derived from Mv 3-glc and Pn 3-glc, which were the most abundant anthocyanidin monoglucosides previously described in young Syrah wines elaborated by cold maceration in warm climate [4,5].

As far as pyranoanthocyanins are concerned, 11 different compounds belonging to diverse sub-families were identified. A first sub-family, the A-type vitisins, corresponded to peaks 9, 11 and 20. Peak 9 was identified as vitisin A through its molecular ion (m/z 561) and by a characteristic fragment (m/z 399), which eluted soon after Mv 3-glc. Pyruvic acid derivatives of Mv 3-acetyl-glucoside (peak 11) and Mv 3-coumaroyl-glucoside (peak 20) were also detected at m/z values of 603 and 707, respectively. A fragment at m/z 399 was present for each of these compounds, resulting from the loss of acyl- and coumaroyl-glucoside groups. Additionally, the new ring in the structure of all these three compounds causes a typical hypsochromic shift of λ_{max} around 510 nm in the visible absorption maximum of the chromophore, which was confirmed in the DAD-vis analysis.

Vitisin B (peak 10), the adduct resulting from the direct reaction between Mv 3-glc and acetaldehyde, was identified by its MS spectrum that showed different fragments at m/z 517, 355, and 339, and for the retention time which was near and just after to the Vitisin A one. The DAD-vis analysis confirmed its identity by a characteristic hypsochromic shift of the λ_{max} at about 490 nm [21]. Other minor B-type vitisins derived from Pn 3-acetyl-glucoside, Mv 3-acetyl-glucoside, and Mv 3-coumaroyl-glucoside (peaks 12, 14, and 23, respectively) characterised by the same UV spectrum and the presence of mass ions at m/z 529, 559 and 663 were also detected.

Additional orange pyranoanthocyanin pigments exhibiting lower polarity and high factor response were detected in the last part of the HPLC chromatogram (peaks 27, 30, 31 and 32). Their chemical structures were consistent with a group of pyranoanthocyanins linked to a 4-vinylphenol group or directly to flavanols. The UV–vis spectrum features corresponding to each one of these peaks (from 505 to 515 nm) was very useful in the assignment of their identities because they presented λ_{max} values significantly lower than that of free anthocyanins [24]. The molecular ion of peak 27 (m/z 625) and its major ion fragment (m/z 463) were confirmed to be malvidin 4-vinylcatechol (known as Pinotin A), while its 4-vinylphenol adduct (malvidin 4-vinylphenol) was deduced from its molecular ion at m/z 609 and a main ion fragment at m/z 447. On the other hand, peaks 30 and 31 were identified as pyranoanthocyanins directly linked to flavanols. The molecular masses of 805 (peaks 30) and 847 (peaks 31) are, respectively, attributed to Mv 3-glc and Mv 3-acetylglucoside linked through a vinyl bridge to a catechin monomer. These pigments yielded the same ion fragments MS^2 at m/z 643 (aglycone moiety: mv-4-vinyl-cat) and MS^3 at m/z 491 corresponding to a retro-Diels–Alder product from the catechin unit [25].

Concerning the new pigments resulting from the reaction between anthocyanins and flavanols mediated by acetaldehyde, several compounds were detected (peaks 16, 24, 25 and 26). Compound 16 showed a characteristic maximum UV–vis spectrum with λ_{max} in the visible region at 532 nm. MS^2 fragmentation of the molecular ion at m/z 809 produced a major product ion at m/z 357, corresponding to the loss of a terminal unit of flavanol together

Table 1
Retention times, mass spectra details and chromatographic UV–vis spectrum data of anthocyanins and anthocyanin-derived pigments of aged Syrah wines found during ageing period.

Peak	Compound	Rt _(min)	M ⁺	MS ²	MS ³	λ _{max} (nm)	Pigment family	Samples (months)			
								3	6	9	12
1	Mv 3-glc-cat	19.04	781	619	467	280,535	Direct condensation	nd	*	*	*
2	Dp 3-glc	19.49	465	303		277,523	Anthocyanidin-3-O-glc	*	*	nd	nd
3	Pt 3-glc	26.58	479	317	302	277,526	Anthocyanidin-3-O-glc	*	*	*	*
4	Mv 3-cafglc	29.80	655	331	315	277,526	Caffeoyl anthocyanins	*	nd	nd	nd
5	Pn 3-glc	31.80	463	301	286	280,517	Anthocyanidin-3-O-glc	*	*	*	*
6	Mv 3-glc	33.01	493	331		280,526	Anthocyanidin-3-O-glc	*	*	*	*
7	Mv 3-acetylglc-cat	36.86	823	619	467	–	Direct condensation	*	nd	nd	nd
8	Dp 3-acetylglc	38.29	507	303	257	280,526	Acetylated anthocyanins	*	*	nd	nd
9	Vitisin A	38.60	561	339	338	277,511	Pyranoanthocyanins	*	*	*	*
10	Vitisin B	40.07	517	355	339	274,490	Pyranoanthocyanins	*	*	*	*
11	A-type vitisin of Mv-3-acetylglc	43.02	603	399	388	277,517	Pyranoanthocyanins	*	*	*	*
12	B-type vitisin of Pn-3-acetylglc	44.85	529	325	355	277,480	Pyranoanthocyanins	nd	*	nd	nd
13	Pt 3-acetylglc	45.51	521	317	302	268,529	Acetylated anthocyanins	*	*	nd	nd
14	B-type vitisin of Mv-3-acetylglc	45.61	559	355	339	268,499	Pyranoanthocyanins	nd	*	nd	nd
15	Pn 3-p-coumglc-cat	48.26	897	589	437	–	Direct condensation	nd	*	nd	nd
16	Mv 3-glc-ethyl-cat	50.00	809	357	342	280,532	Acetaldehyde-mediated	*	*	*	*
17	Pn 3-acetylglc	50.18	505	301	286	280,529	Acetylated anthocyanins	*	*	*	*
18	Mv 3-acetylglc	51.63	535	331	315	277,529	Acetylated anthocyanins	*	*	*	*
19	Dp 3-p-coumglc	53.85	611	303	257	280,532	p-coumaroyl anthocyanins	*	*	nd	nd
20	A-type vitisin of Mv-3-p-coumglc	56.27	707	399	383	280,518	Pyranoanthocyanins	*	*	*	*
21	Cy 3-p-coumglc	58.93	595	287	175	280,526	p-Coumaroyl anthocyanins	*	nd	nd	nd
22	Pt 3-p-coumglc	59.97	625	317	302	280,532	p-Coumaroyl anthocyanins	*	*	nd	nd
23	B-type vitisin of Mv 3-p-coumglc	60.59	663	355	340	286,532	Pyranoanthocyanins	nd	nd	*	nd
24	Mv-3-acetylglc-ethyl-cat	61.63	851	357	432	280,520	Acetaldehyde-mediated	nd	*	*	nd
25	Pt 3-glc-py-ethyl-cat	64.25	817	655	531	280,520	Acetaldehyde-mediated	nd	nd	*	nd
26	Mv 3-p-coumglc-4-ethyl-cat	64.52	955	665	357	280,532	Acetaldehyde-mediated	*	*	*	*
27	Mv 3-glc 4-vinylcatechol	64.70	625	463	447	280,511	Pyranoanthocyanins	nd	nd	*	*
28	Pn 3-p-coumglc	64.97	609	301	286	280,526	p-Coumaroyl anthocyanins	*	*	*	*
29	Mv 3-p-coumglc	65.43	639	331	315	283,529	p-Coumaroyl anthocyanins	*	*	*	*
30	Mv 3-glc-4-vinyl-cat	67.61	805	643	491	280,508	Pyranoanthocyanins	*	*	*	*
31	Mv-3-acetylglc-4-vinyl-cat	69.17	847	643	491	280,508	Pyranoanthocyanins	*	*	nd	*
32	Mv 3-glc 4-vinylphenol	69.66	609	447	431	280,505	Pyranoanthocyanins	*	*	*	*

Rt: retention time (min); M⁺: positive charged molecular ion; MS², MS³: fragmentation of M⁺ and M².

*Detected; nd – not detected.

with a glucose moiety (452 Da), indicating that this compound is a dimer Mv 3-glc ethyl-catechin [26]. Compounds 24 and 26 also showed a characteristic fragmentation pattern of pigments with ethyl linkages. Their molecular ions presented, respectively, 42 and 146 additional amu by comparing them to the mass of compound 16; so they were assigned to malvidin-3-acetyl and malvidin-3-p-coumaroyl ethyl-catechin dimers. Peak 25 gave a molecular ion at *m/z* 817 and a main fragment at *m/z* 655, which was identified as petunidin-3-glucoside-py-ethyl-catechin.

Moreover, Syrah wines studied also showed to contain a few minor direct anthocyanin–flavanol condensation products (peaks 1, 7 and 15). Their UV–vis spectra are characterised by a λ_{max} near 535 nm and a shoulder at 280 nm, which can only be confirmed for peak 1, the main compound of this pigment family. However, their retention times, *m/z* ratio of the molecular ions and fragmentation pattern allowed a decisive identification as direct condensation products between catechin with Mv 3-gl (peak 1, *m/z* 781, MS² 619), Mv 3-glc acetylglucoside (peak 7, *m/z* 823, MS² 619) and Pn 3-p-coumaroyl glucoside (peak 15, *m/z* 897, MS² 589).

3.2. Effect of ageing time on changes in the main phenolic families

The occurrence of each compound identified was variable along the ageing period studied (Table 1), which determined that the anthocyanin profile of the Syrah wines changed progressively towards more chemical complexity (Fig. 1). Thus, the influence of the ageing time on the relevance and evolution of the anthocyanic pigments was studied.

The changes in the levels (mg L⁻¹) of the main pigments families are showed in Fig. 2. As can be observed, the ageing time had a

significant influence over all the pigments classes studied. However, some differences were found concerning their development during maturation in oak barrels.

In general, the highest concentration of the total anthocyanin was found in the 3 months aged wines (Sum.TA = 455.8 ± 6.12 mg L⁻¹), from which an important decrease of 84% was produced along the ageing process resulting in a remained content of 73.7 ± 8.4 mg L⁻¹ in 12 months samples. The major pigments responsible for the red wine colour, mainly anthocyanins monoglucosides, were the compounds which more clearly contributed to the global pigment loss, followed by their respective acetylated and p-coumaroylated derivatives. Although the pattern evolution of the diverse monomeric anthocyanin was similar, the rate of decrease was different for each group of compounds. This observation agrees with those reported by del Álamo [27], which also observed particularly lower decreases of acetylated than non-acetylated anthocyanins content. This fact is explained because acetylated anthocyanins normally combine more quickly with tannins and non-acetylated anthocyanins are more implied in hydrolysis processes. However, in the Syrah wines studied, as ageing process advanced from 3 to 9 months, both monoglucosides and acylated derivatives experimented intense and significant decreases, being more marked for p-coumaroyl anthocyanins (sum.GL = 80%, sum.AC = 85% and sum.COUM = 90%). As also reported in literature [28], several simultaneous reactions take place over the shelf-life of red wines in contact with oak wood (oxidation, absorption and precipitation or polymerisation), which additionally are influenced by large number of factors (genetic, agronomical, or oenological). Thus, the final concentration of phenolic compounds can be quite variable in red wines.

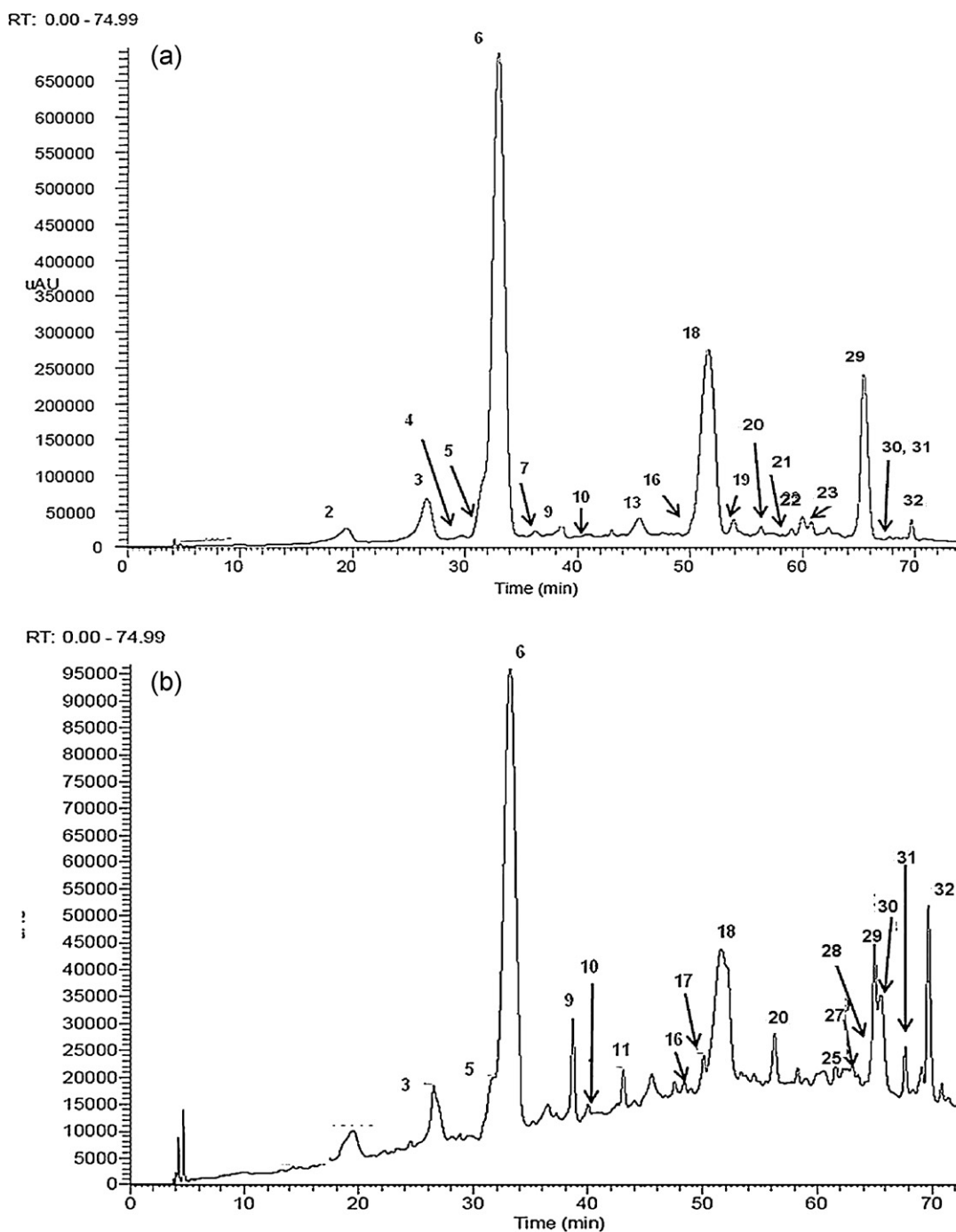


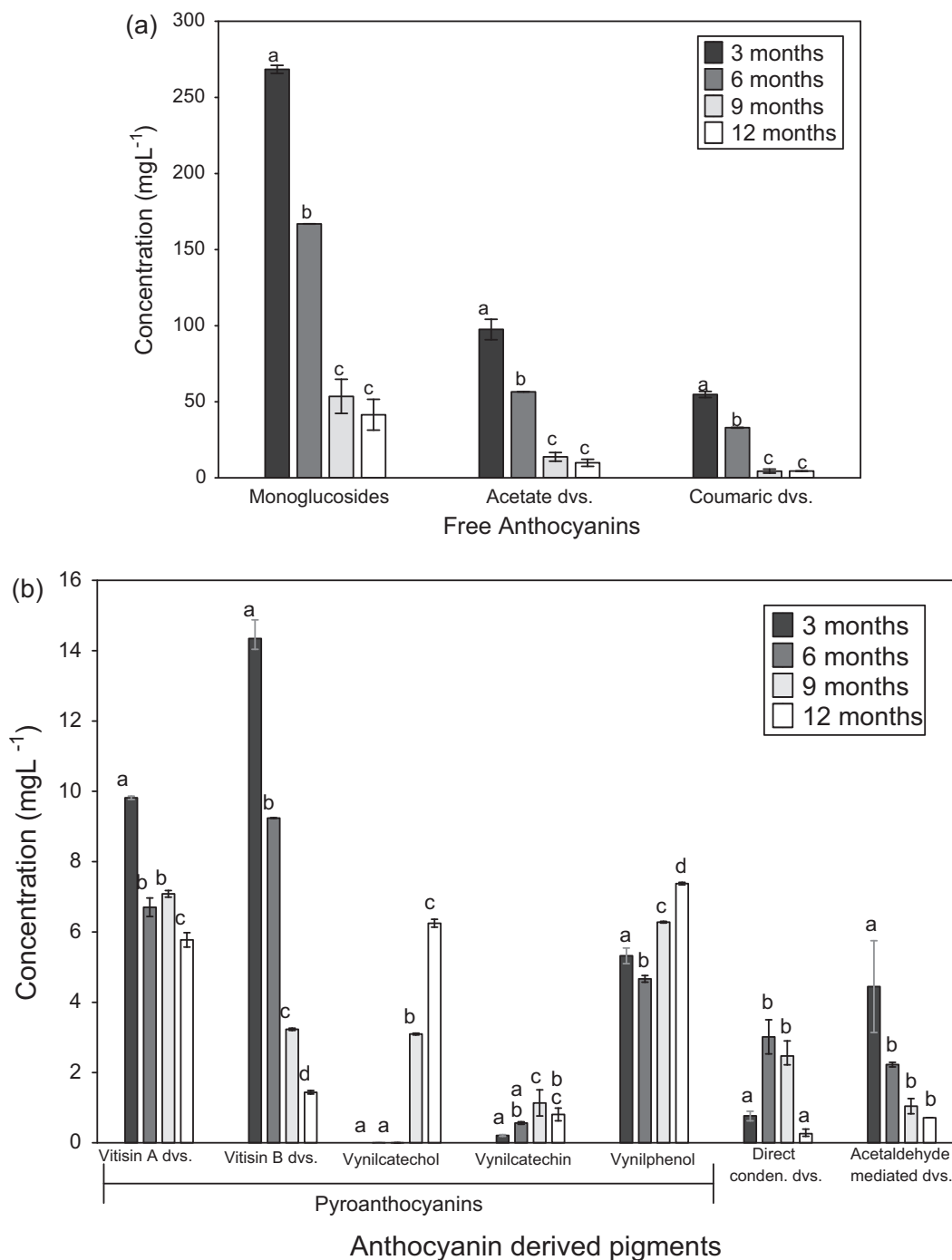
Fig. 1. Chromatograms recorded at 520 nm corresponding to (a) wine sample of 3 months, (b) wine sample of 12 months. The compound numbers correspond to those in Table 1.

After 9 months in barrels, the content for the most abundant anthocyanins remained quite stable in low levels until the end of the ageing period, and not significant differences were found among the levels respecting to 12 month-old samples.

Among the newly formed red wine pigments, whereas some groups of compounds showed similar behaviour, others seemed to be inversely affected, which resulted in a lower decrease than monomeric anthocyanins. The total amounts of the minor anthocyanins diminished from $34.9 \pm 1.3 \text{ mg L}^{-1}$ to $22.6 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$ during the whole ageing process (35%); but from 6 months only a slightly decrease was globally produced. The minor pigments content of the aged Syrah wines studied were similar to those described

in aged Monastrell wines by Cano-López et al. [13], but it was significant lower than those reported in aged Tempranillo/Graciano wines [29]. These differences can be explained by a dual effect: the warm climate (the case of Monastrell and Syrah wines), which can exert a negative influence on the phenolic content and copigmentation process [30], and the grape variety, since it is well known that Graciano has high phenolic content which improve the copigmentation reactions.

During the first stage of ageing (from 3 to 6 months), together with monomeric anthocyanins, the predominant minor anthocyanins corresponded to the vitisin-like pyranoanthocyanins (A and B types), contributing for 60–69% to the total derived pigments.



Different letters for each group of pigments among successive ageing stages mean significant differences ($p < 0.05$).

Fig. 2. Evolution of the anthocyanin content (mg L^{-1}) during the ageing of Syrah wines, grouped as (a) monoglucosides and acyl derivatives, (b) main minor anthocyanin-derived pigments.

Their presence in wine is related to the secondary metabolic products (pyruvate and acetaldehyde) mainly released by yeast during alcoholic fermentation, and because of their slow degradation rate, they could become the main derived pigments in young and early aged wines [31]. During ageing, since the formation of vitisins is not strongly favoured, the proportion of both kinds of compounds naturally diminished with time. However, although the concentration of the B-type vitisins was higher at the beginning of the ageing process, A-type vitisins were the most abundant member of this sub-family as wine became older. Specifically, the

remaining amount for the B-type vitisins at the end of the ageing process was only of 10% ($1.4 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$) while for the A-type vitisins was of 40% ($5.8 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$); indicating that the last ones were also more resistant towards the conditions undergone during ageing. This is probably due to the fact that, unlike acetaldehyde, pyruvic acid cannot be used as an intermediate in polymerisation processes [24]. The occurrence of these anthocyanin derivatives is of special interest in red wines typical from warm climates because these relatively small molecules remain in solution, in contrast to the classical flavanol–anthocyanin polymeric pigments that tend

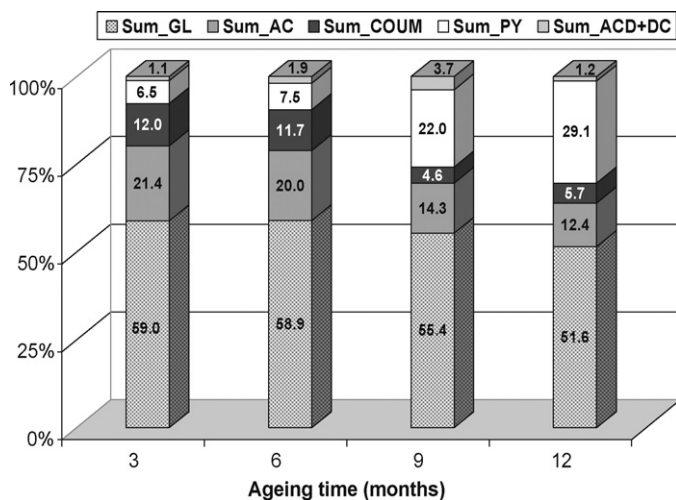


Fig. 3. Relative abundance (%) of the anthocyanin pigment families during ageing (Sum.GL: sum of monoglucosides; Sum.AC: sum of acetylated dvs.; Sum.COUM: sum of p-coumaroyl dvs.; Sum.PY: sum of pyranoanthocyanins; Sum.ACD+DC: sum of acetaldehyde-mediated and direct condensation anthocyanin products).

to precipitate. Oppositely, in the last three months of ageing (from 9 to 12 months) a progressive increase on the content of the lower polar pyranoanthocyanins took place, being the predominant derived pigments in 12 months wines (63.8%). The occurrence of 4-vinylcatechin and 4-vinylphenol was confirmed at every moment of ageing showing similar behaviour (Table 1). Their concentration tended to increase from 0.2 to 0.9 and from 5.3 to 7.4 mg L⁻¹, respectively, being the increases significant for both compounds. The occurrence of 4-vinylcatechol adduct was detected only from 9 months, reaching the highest levels in the last stage of ageing in the barrel (6.2 ± 0.1 mg L⁻¹). The difference found about the occurrence of those type of pyranoanthocyanins is explained because the reaction between 4-vinylcatechol and Mv 3-gl to produce Pinotitin A is reported to proceed rather slowly and requires years of storage to complete [32], while the formation of the Mv 3gl-4-vinylphenol or vinylcatechin adducts take place during fermentation [10].

Regarding acetaldehyde mediated derived anthocyanins; the main member of this family (Mv 3-glc-ethyl-cat) was present during the whole process of ageing. Nevertheless, after 9 months, the global content decreased significantly from 4.4 ± 1.2 to 0.7 ± 0.01 mg L⁻¹, which might indicate a lower resistance against the ageing process of this pigment family.

Finally, it is worth mentioning the lower importance of direct condensation adducts over the pigment profile of aged Syrah wines during the first and the last stages of ageing, where practically were quantified as very low concentrations. The highest contents of this sub-family of pigments were found at intermediate stages of ageing (from 6 to 9 months), reaching concentrations around 3.0 ± 0.3 mg L⁻¹. Despite the lower amounts of this anthocyanin-derived pigments comparatively to pyranoanthocyanins or ethyl mediated adducts, it was shown that they can induce significant modification in the colour of the genuine anthocyanins at concentrations similar to those that can exist in red wines [33]. Thus, they could also be considered as compounds with sensorial impact in Syrah aged wines.

To summarise, as wine became older, the proportion of the original grape anthocyanins (monomeric anthocyanins) tended to decrease from 92% to 70% (Fig. 3). On contrast, the anthocyanin-derived pigments played an increasing role (from 8% to 30%), being mainly due to compounds providing the wine with orange hues (pyranoanthocyanins). This gradual chemical transformation is in accordance with the positive maturation effects attributed

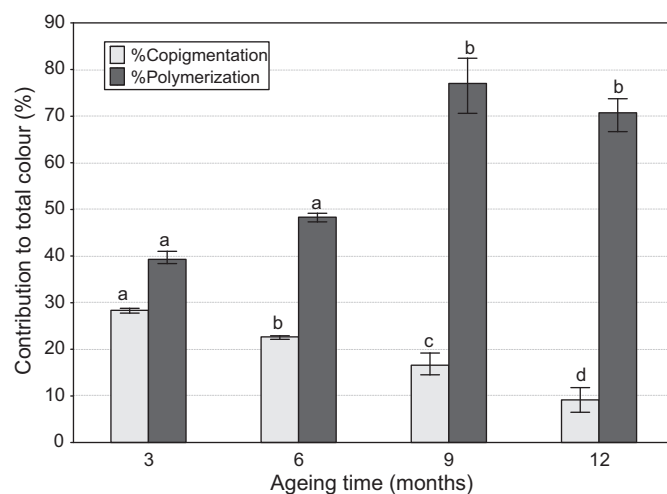


Fig. 4. Evolution of the copigmented anthocyanins (%CA) and polymeric pigment (%PP) during Syrah wine ageing.

to barrels [34]. As reported in literature, most of the anthocyanin derived pigments have a greater colour expression and stability than monomeric anthocyanins at wine pH [8]. Thus, despite being minor pigments, is expected they can contribute substantially to the overall colour of the aged Syrah wines.

3.3. Effect of ageing time on copigmentation, polymerisation and wine colour

Although copigmentation is a phenomenon mainly described in young red wines, the results showed that it occurred in the Syrah wines during the whole process of ageing in oak barrels (Fig. 4), which was in accordance with the results of some authors [35,36]. Notwithstanding, the general values obtained were lower than those reported for young red wines, where copigmented anthocyanins can even reach up to 50% of total colour [7]. The highest value of the magnitude of copigmentation was found in the three months samples (28.4 ± 0.5), but as the ageing advanced, the degree of copigmentation significantly decreased reaching a minimum value of 9.14 ± 2.6 in 12 months samples.

Tristimulus colorimetry was also applied to assess the colorimetric effect of copigmentation on the total colour of the aged Syrah wines as reported in [14]. Thus, the wine colour with and without copigmentation effect was calculated at each stage of ageing, and was represented graphically in the CIELAB (a^*b^*) diagram (Fig. 5). The CIELAB differences (ΔE_{ab}^* , ΔL , ΔC_{ab}^* , and Δh_{ab}) for every pair of wines were also calculated to follow the trend of the changes. As observed, the different location of the copigmented and no copigmented wines in the (a^*b^*) diagram confirms that not only the magnitude of copigmentation was influenced by the ageing process but also the colour changes induced by this phenomenon.

At shorter ageing times (3 and 6 months), copigmentation induced the greatest amplitude of the colour effect ($\Delta E_{ab}^* = 11.1 \pm 0.35$ and 8.24 ± 0.37 , respectively) contributing to the total colour mainly with quantitative changes, which consisted in strong increases of chroma and decreases of lightness ($\Delta C_{ab}^* = +8.6 \pm 0.2$ and $+5.4 \pm 0.1$; $\Delta L = -7.0 \pm 0.3$ and -6.2 ± 0.3 , respectively). On contrast, at longer ageing times (9 and 12 months), although the colour effects were significantly lower ($\Delta E_{ab}^* = 6.35 \pm 0.8$ and 3.9 ± 0.7 , respectively) the most important contribution of the copigmentation was qualitative, leading to a more bluish hues ($\Delta h_{ab} = -4.9 \pm 1.1$, respectively). In any case, all the colour differences calculated were higher than 3.0 CIELAB u (visually perceptible by the human eye) [37], which confirms the relevance of this

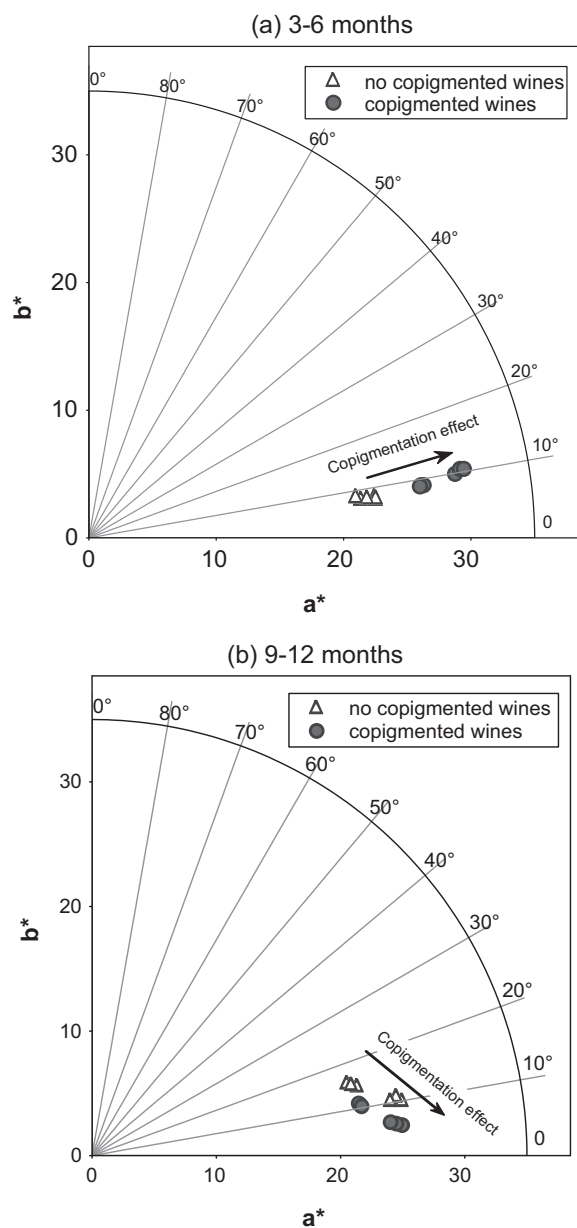


Fig. 5. Colour of the copigmented and no copigmented aged wines at (a) 3 and 6 months, (b) 9 and 12 months.

physicochemical phenomenon on the quality colour of aged wines, mainly at earlier stages.

Simultaneously to the copigmentation evolution, the degree of anthocyanin polymerisation increased during ageing, being maximum at 9 months old wines (%PP = 77.0% ± 3.6) (Fig. 4). This significant increase coincided with the observed losses of monomeric anthocyanins and gradual formation of new derived pigments, which reflects the complex pigment transformation described in the previous section. However, after 9 months of ageing, a slightly decrease of the polymerisation occurred (%PP = 70.7% ± 3.6), evidencing that extended ageing times affected negatively the chemical stability of pigments in the Syrah wines studied.

Regarding the colour evolution, the changes on the colorimetric parameters are shown in Fig. 6. The results showed that the evolution of the anthocyanins and the copigmentation/polymerisation processes resulted in important changes both on quantitative (L^* and C_{ab}^*) and qualitative (h_{ab}) psychophysical components of the

colour. As expected, the ageing time influenced significantly the trend of the changes.

From 3 to 9 months of ageing, the quantitative attributes of the wine colour evolved progressively in a positive way. Specifically, the lightness of the samples decreased by 6% (from 80.4 ± 0.6 to 75.6 ± 0.1 CIELAB u.), while chroma increased by 13% (from 21.4 ± 0.4 to 24.7 ± 0.4 CIELAB u.), that is, the wines became darker, with a more vivid colour. This colorimetric evolution indicates that no colour fall was produced in this period of time. Thus, it can be said that the significant loss of pigment and %copigmentation observed was due more to their transformation into derived pigments than to degradation, which also was confirmed by the increase in the %PP. However, from 9 to 12 months of ageing, the lightness and chroma of samples were negatively affected. As observed, the lightness increased by 4% (from 75.6 ± 0.1 to 78.7 ± 0.5 CIELAB u) and the chroma decreased by 13% (from 24.6 ± 0.4 to 21.3 ± 0.4 CIELAB u), that is, wines became lighter and with less vivid colour. Thus, despite not being especially significant the loss of anthocyanins in the last period of ageing, it seems to be mainly responsible for the colour loss since the polymerisation process tended also to decrease. It is well-known that the partial elimination of new polymeric pigments by precipitation is a usual chemical transformation of more matured red wines, which additionally can be intensified in warm climate regions. The colour difference (ΔE_{ab}^*) calculated between the colour of the 9 and 12 months samples revealed that this colour variation was of 5.1 ± 0.8 CIELAB u., thus, visually detectable by the human eye.

As far as qualitative attribute of colour (h_{ab}), it was remarkably affected, showing a clear tendency during the whole ageing process. It increased with increasing ageing time from 0.9 ± 0.8 to 11.3 ± 0.1 , that is, from redness towards more red-orange hues, which is expected according to the increasing role of anthocyanin derived pigments over the total pigment content.

3.4. Differentiation of aged Syrah wines based on the pigment and colorimetric characteristics

By comparing the four groups of wines (3, 6, 9 and 12 months) on the basis of their pigment composition and colorimetric characteristics, a PCA analysis was performed in order to examine which of these variables are more involved in the differentiation of aged Syrah wines from Condado de Huelva D.O. region, with different wood contact period. Fig. 7 shows the distribution of the samples along the first two principal components, where an accurate differentiation and classification of wines into each of their respective groups was obtained. The two principal components, with eigenvalues > 1, explained 91.3% of the variability in the original data.

The first factor, which explained 72.5% of the variance, clearly separates Syrah wines aged for 3 and 6 months, grouped in the negative area of PC1, from the respective ones aged for 9 and 12 months, located separately in the positive area of the graphic. Results showed that several compounds were useful for the differentiation between shorter and longer aged Syrah wines, including not only monomeric but also derived anthocyanic pigments. In particular, significant negative correlations were obtained for Glucosides, Acetates, Coumarates, Vitisin A dvs., Vitisin B dvs., and acetaldehyde mediated derived anthocyanins, which generally are more characteristics of earlier maturation stages in red wines. On contrast, significant positive correlations were obtained for minor anthocyanic compounds Mv 3-glc 4-vinylcatechol, Mv 3-glc-4-vinyl-catechin and Mv 3-glc 4-vinylphenol, usually associate with more extended ageing periods. Regarding the colour variables, shorter aged wines were significant correlated with lighter colour and higher levels of copigmentation (negative correlations), while longer aged wines with re-orange hues and higher degree of polymerisation (positive correlations).

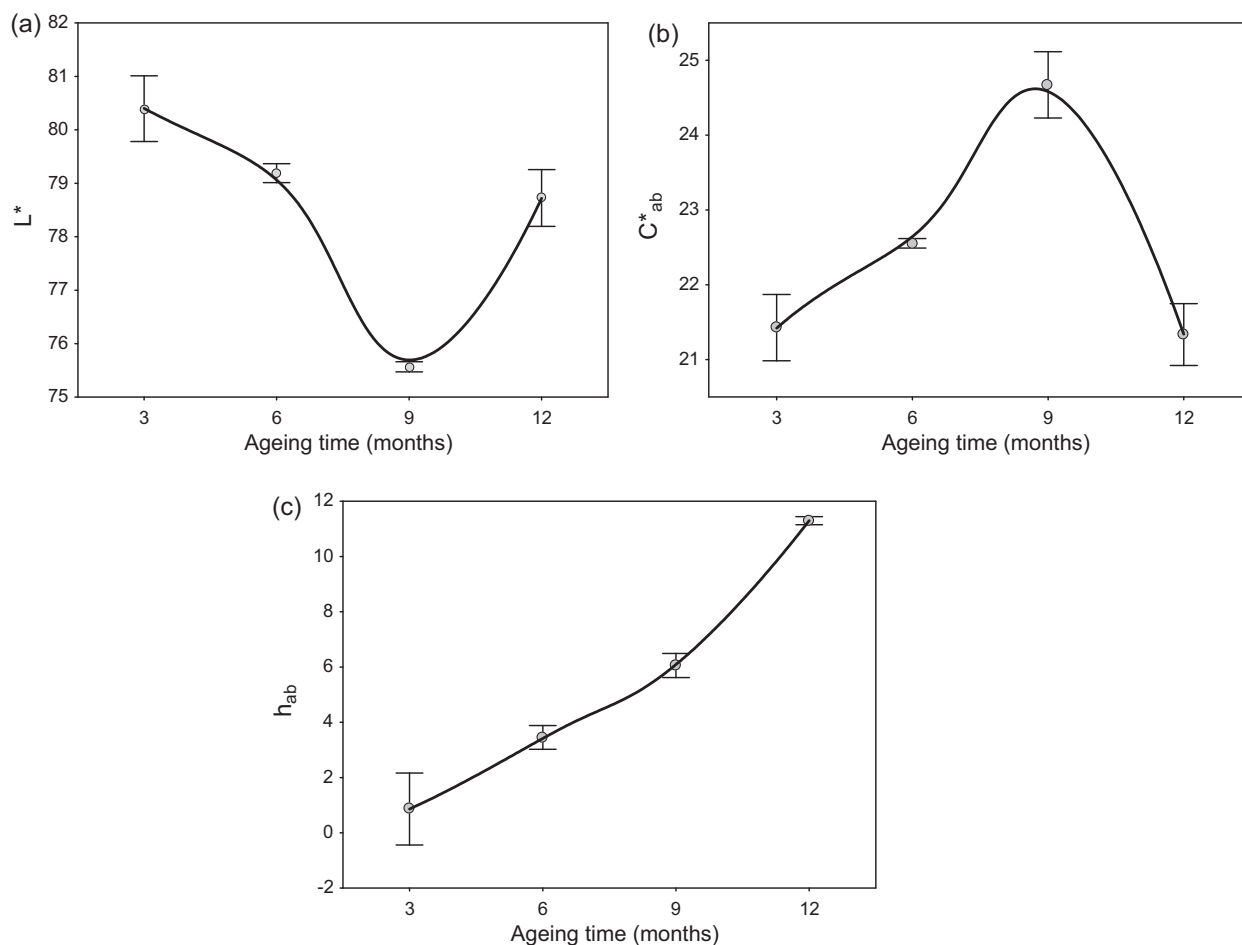


Fig. 6. Evolution of colour parameters: (a) L^* (lightness), (b) C^*_{ab} (chroma), and (c) h_{ab} (hue angle), during ageing.

On the other hand, the second factor which explained 18.8% of the variance, showed that 3 and 12 aged wines could be also differentiated from 6 and 9 aged wines on the basis of the direct condensation adducts content and chroma, both of them being significant positive correlated. This meant that intermediate ageing

periods were characterised by more intense colours and higher content of direct condensation anthocyanin adducts.

4. Conclusions

This work provides a better knowledge of the ageing aptitude of Syrah wines elaborated in warm climate. The results showed that the ageing time significantly influences the chemical composition and colorimetric characteristics of Syrah wines from “Condado de Huelva D.O.” during the first year of ageing. Based on the evolution of its detailed pigment composition and colour behaviour it could be concluded that Syrah wines showed better ageing aptitude when were submitted to intermediate ageing times (between 6 and 9 months). Although the total pigment content decreased from 3 to 9 months, the relative amounts of compounds which give higher chemical stability and orange hue increased and that of compounds less stable that gives blue hues decreased. During this period, 9 months aged wines exhibited most desirable global characteristics as required nowadays to produce high quality wines, that is, an adequate level of pigments and also darker and more redness vivid colour. On contrast, ageing times higher than 9 months produced an important pigment degradation resulting in lighter and less vivid colour wines.

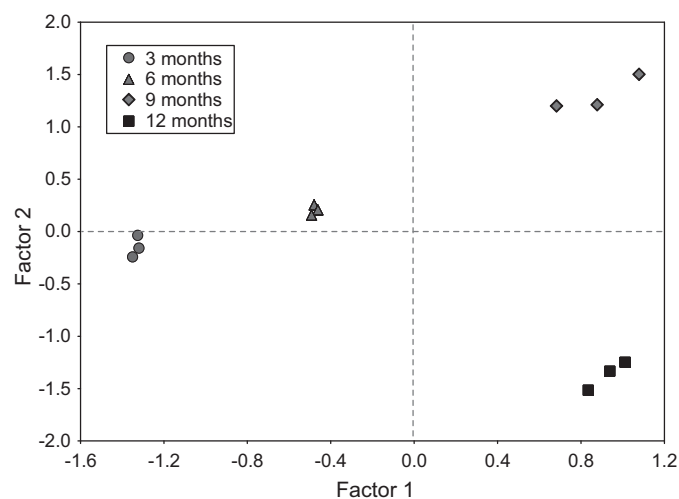


Fig. 7. Distribution of the Syrah wines ($n = 12$) by the first two principal components (72.5% and 18.8% of the variance, respectively) according to different wood contact periods (3, 6, 9, and 12 months).

Acknowledgements

Authors are indebted to Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía, Spain) (Project P10-AGR-6331) and

The Ministry of Science and Innovation of Spain for the financial support: Project AGL2008-05569-C02. The authors thank Vinicola del Condado winery (Bollullos par del Condado, Huelva, Spain) for technical assistance during vinifications and Dra. Zélia Azevedo for the LC–MS analysis.

References

- [1] G.V. Jones, M.A. White, O.R. Cooper, K. Storchmann, *Climatic Change* 73 (2001) 319–343.
- [2] K. Mori, S. Sugaya, H. Gemma, *Sci. Hortic.* 105 (2005) 319–330.
- [3] D. Hernanz, V. Gallo, A.F. Recamales, A.J. Meléndez-Martínez, M.L. González-Miret, F.J. Heredia, *Food Chem.* 113 (2009) 530–537.
- [4] M. Gómez-Míguez, M.L. González-Miret, F.J. Heredia, *J. Food Eng.* 79 (2007) 271–278.
- [5] F.J. Heredia, M.L. Escudero-Gilete, D. Hernanz, B. Gordillo, A.J. Meléndez-Martínez, I.M. Vicario, M.L. González-Miret, *Food Chem.* 118 (2010) 377–383.
- [6] J. Robinson, *Guide to Wine Grapes*, Oxford University Press, Oxford, 1996.
- [7] R. Boulton, *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (2001) 67–87.
- [8] V. De Freitas, N. Mateus, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 1467–1477.
- [9] C. Alcalde-Eon, M.T. Escribano-Bailón, C. Santos-Buelga, J.C. Rivas-Gonzalo, *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 238–254.
- [10] H. Fulcrand, P. Cameira dos Santos, P. Sarni-Manchado, J. Favre-Bonvin, F.B. Cheynier, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1996) 735–739.
- [11] M. Schwarz, T.C. Wabnitz, P. Winterhalter, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3682–3687.
- [12] H. Fulcrand, M. Dueñas, E. Salas, V. Cheynier, *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (2006) 289–297.
- [13] M. Cano-López, J.M. López-Roca, F. Pardo-Minguez, E. Gómez Plaza, *Food Chem.* 119 (2010) 191–195.
- [14] B. Gordillo, M.I. López-Infante, P. Ramírez-Pérez, M.L. González-Miret, F.J. Heredia, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 6797–6803.
- [15] R. Boulton, *Conference Proceedings of the 47th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture*, Reno, NV, 1996.
- [16] F.J. Heredia, C. Álvarez, M.L. González-Miret, A. Ramírez Cromalab, *Análisis de color, Registro General de la Propiedad Intelectual* (2004).
- [17] Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), *Technical Report, Colorimetry*, CIE Central Bureau, Vienna, 2004.
- [18] StatSoft, *STATISTICA*, version 8.0, StatSoft, 2007.
- [19] N. Mateus, S.D. Pascual-Teresa, J.C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, V. de Freitas, *Food Chem.* 76 (2002) 335–342.
- [20] A. De Villiers, G. Vanhoenacker, P. Majek, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 195–204.
- [21] I. Revilla, S. Pérez-Magariño, M.L. González-Sanjosé, S. Beltrán, *J. Chromatogr. A* 847 (1999) 83–90.
- [22] Z. Huang, B. Wang, P. Williams, R.D. Pace, *LWT – Food Sci. Technol.* 42 (2009) 819–824.
- [23] M. Monagas, V. Nuñez, B. Bartolomé, C. Gómez-Cordovés, *Am. J. Enol. Vitic.* 54 (2003) 163–169.
- [24] A. Morata, F. Calderón, M.C. González, M.C. Gómez-Cordovés, J.A. Suárez, *Food Chem.* 100 (2007) 1144–1452.
- [25] Y. Hayasaka, R.E. Asenstorfer, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 756–761.
- [26] B. Sun, C.P. Reis Santos, M.C. Leandro, V. De Freitas, M.I. Spranger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 2227–2236.
- [27] M. del Álamo, I. Nevares, L. Gallego, C. Martín, S. Merino, *Anal. Chim. Acta* 621 (2008) 86–99.
- [28] M. Rodríguez, J. Lezáun, R. Canals, M.C. Llaudy, J.M. Canals, F. Zamora, *Food Sci. Technol. Int.* 11 (2005) 289–295.
- [29] M. García-Marino, J.M. Hernández-Hierro, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón, *Anal. Chim. Acta* 660 (2010) 134–142.
- [30] M. Cano-López, F. Pardo-Minguez, J.M. López-Roca, E. Gómez-Plaza, *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (2006) 325–331.
- [31] C. Alcalde-Eon, E. Boido, F. Carrau, E. Dellacassa, J.C. Rivas-Gonzalo, *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (2006) 449–459.
- [32] M. Schwarz, G. Hofmann, P. Winterhalter, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 498–504.
- [33] S. González-Manzano, M. Dueñas, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón, C. Santos-Buelga, *Food Chem.* 114 (2009) 649–656.
- [34] A. Gambuti, R. Capuano, M.T. Lisanti, D. Strollo, L. Moio, *Eur. Food Res. Technol.* 231 (2010) 455–465.
- [35] J. Darias-Martín, M. Carrillo-López, J.F. Echavarri-Granado, C. Díaz-Romero, *Eur. Food Res. Technol.* 224 (2007) 643–648.
- [36] Z. Guadalupe, B. Ayestarán, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 9022–9029.
- [37] J.A. Martínez, M. Melgosa, M.M. Pérez, E. Hita, A.I. Negueruela, *Food Sci. Technol. Int.* 7 (2001) 439–444.

Capítulo 5. EVALUACIÓN INTEGRAL DEL EFECTO DE LA COPIGMENTACIÓN ANTOCIÁNICA EN EL COLOR MEDIANTE COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO

Antecedentes

El fenómeno de copigmentación, ampliamente extendido en la naturaleza y asociado exclusivamente a la familia de los pigmentos antociánicos (Delgado-Vargas et al., 2000), representa uno de los mecanismos más complejos y eficaces de estabilización de estos pigmentos. Particularmente, en la industria alimentaria es considerado un proceso de suma importancia ya que asegurar la calidad y estabilidad del color es uno de los objetivos principales en el control de calidad de los productos (Hutchings, 1994; Cavalcanti et al., 2011). En el campo de la enología, la intensificación de color que se ha descrito debida a la copigmentación justifica entre el 30 y el 50% del color total de los vinos tintos, principalmente en vinos jóvenes (Boulton, 2001), y además, es considerado el primer paso hacia la estabilización del color en etapas más avanzadas de la vinificación ya que favorece la formación de nuevos pigmentos más complejos y estables.

Las reacciones de copigmentación, es decir, las asociaciones no covalentes que se establecen entre los pigmentos antociánicos y una gran variedad de compuestos orgánicos (copigmentos) cuando coexisten en un medio típicamente acuoso, son responsables del desplazamiento del equilibrio antociánico hacia su forma coloreada catión flavilio y, además, de una modificación de sus propiedades espectrales consistente en un incremento de la absorbancia y en la mayoría de los casos en un desplazamiento de la $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción (Castañeda-Ovando et al., 2009). En ese sentido, el fenómeno de copigmentación no solo confiere una mayor estabilidad cromática a las disoluciones de antocianos, sino que también producen una modificación de su color. Por tanto, el conocimiento global del efecto de la copigmentación sobre el color implica necesariamente la evaluación íntegra de los cambios cromáticos inducidos, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.

El efecto de la copigmentación sobre el color se evalúa habitualmente mediante métodos espectrofotométricos, a partir de las variaciones que se producen en el espectro visible de las disoluciones de antocianos cuando están en presencia de copigmentos y, en la mayoría de los casos, específicamente en la $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción (≈ 520 nm). Esta metodología ha sido aplicada en numerosos estudios llevados a cabo con disoluciones modelo, así como con distintos productos de la industria alimentaria donde los antocianos coexisten naturalmente con otros copigmentos, o en los que

estos pigmentos se utilizan como aditivos colorantes (mermelada, zumo, yogur, vino tinto, etc.) (Brouillard et al., 1991; Baranac et al., 1997; Talcott et al., 2003; Hermosín et al., 2005; Gris et al., 2007; Lambert et al., 2011). En estos estudios, la aplicación de la espectrofotometría ha permitido estimar satisfactoriamente la contribución cuantitativa de la copigmentación al color, así como conocer la influencia que ejercen numerosos factores en su eficacia (la concentración de pigmentos y copigmentos, sus estructuras químicas, la relación molar pigmento/copigmento, el pH del medio, la temperatura, etc.). De la misma manera, en estudios llevados a cabo particularmente en vinos tintos, mediante simples medidas de absorbancia, se ha confirmado que la magnitud de copigmentación y su evolución durante la vinificación es extremadamente variable de acuerdo a factores agronómicos o enológicos (Boulton, 2001, Hermosín et al., 2003; 2005, Darias-Martín et al., 2001; 2002; 2007; Guadalupe & Ayestarán, 2008).

No obstante, aunque los métodos espectrofotométricos han demostrado ser una herramienta analítica válida, simple y rápida para la estimación de la magnitud de la copigmentación, es conocido que proporcionan una información y precisión limitada para una correcta especificación de los cambios de color inducidos por este fenómeno. En ese sentido, el análisis de la copigmentación basado en el cambio producido en un único valor de λ puede representar un índice de la extensión en que el fenómeno ocurre, pero no permite explicar ni cuantificar la modificación de color que implica, ni permite una evaluación cualitativa de dicho cambio, en el que las variaciones en todo el intervalo del espectro visible tienen influencia. Esta idea ya fue postulada por Gonnet (1999, 2001), quién explicó que una descripción rigurosa del cambio de color debido exclusivamente al fenómeno de copigmentación requiere al menos dos consideraciones: 1) evaluar los cambios espectrales en el intervalo completo de las longitudes de onda visibles, y no únicamente en la $\lambda_{\text{máx}}$ y 2) el uso de al menos tres atributos de color: claridad (L^*), croma (C^*_{ab}) y tono (h_{ab}).

En ese contexto, el análisis de la copigmentación por Colorimetría Triestímulo difiere del método anterior en que considera los cambios espectrales en el intervalo completo de las longitudes de onda visibles y por tanto describe correctamente las variaciones de color. Además, el resultado obtenido con la aplicación del método espectrofotométrico no se puede interpretar de forma cuantitativa en cuanto a apreciación visual, algo que no ocurre en el caso de la colorimetría triestímulo cuyo parámetro ΔE^*_{ab} (diferencia de color), entre otros, es interpretable a nivel visual (Martínez et al., 2001). Una interesante observación de los escasos estudios que

existen sobre el estudio de la copigmentación mediante Colorimetría Triestímulo (Gomez-Míguez et al., 2006; Berke y De Freitas, 2007; González-Manzano et al., 2008) es que la variación del color inducida por este fenómeno es diferente según el copigmento ensayado, no solo a nivel cuantitativo sino también cualitativo; y que además, existen divergencias en la magnitud de copigmentación según el método aplicado. Así, González-Manzano et al. (2008) encontraron que, en determinados casos, el incremento en la concentración del copigmento no produjo variación del valor de la A_{520} de la disolución del antociano, mientras que sí cambió el valor de la diferencia de color ΔE^*_{ab} , lo que confirmó la modificación del color.

Sin embargo, a pesar de su utilidad, la aplicación de la colorimetría en la evaluación integral de la copigmentación sigue siendo aún muy escasa, limitándose a trabajos llevados a cabo siempre en disoluciones modelo, lo cual dificulta la extrapolación de resultados al caso particular del vino tinto, donde estas reacciones ocurren con una mayor complejidad. Por ello, son necesarios nuevos estudios de copigmentación en disoluciones modelo que reproduzcan con mayor exactitud las situaciones reales en que estos compuestos se encuentran en vinos tintos, y aplicar la colorimetría directamente en vinos tintos para seguir avanzando en el conocimiento de este fenómeno.

Objetivos

El objetivo general ha sido aplicar la Colorimetría Triestímulo a la evaluación integral del efecto del fenómeno de copigmentación sobre el color de los pigmentos antocíánicos, tanto en disoluciones modelo de antocianos como en vinos tintos jóvenes de diferentes características. Como objetivos concretos se han planteado:

- Definir nuevas variables colorimétricas en el espacio de color CIELAB que permitan la evaluación integral (cuantitativa y cualitativa) del efecto colorimétrico de la copigmentación.
- Comparar la Colorimetría Triestímulo y la espectrofotometría en la evaluación del fenómeno de copigmentación, con el fin de hacer recomendaciones concretas sobre la utilidad práctica de cada método, según el propósito del análisis, en especial en lo que se refiere a la consideración no solo cuantitativa sino también cualitativa de los cambios de color.

- Evaluar el efecto de la copigmentación sobre el color en mezclas binarias pigmento/copigmento, y establecer diferencias en función del pH y la ratio molar.
- Evaluar el efecto de la copigmentación sobre el color en vinos tintos jóvenes, y establecer diferencias en función de la variedad y del grado de maduración de la uva.

Parte experimental

El efecto del pH se estudió en disoluciones modelos de copigmentación entre el principal antociano monoglucósido de vinos tintos, la Mv 3-gl, y dos de los principales flavanoles presentes en las semillas de uva: catequina y epicatequina, así como con el ácido cafeico. Las disoluciones Mv 3-gl:catequina (MC), Mv 3-gl:epicatequina (ME), y Mv 3-gl:ácido cafeico (MF), se prepararon en vino sintético a diferentes valores de pH (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, y 5.0.) y a una misma ratio molar pigmento/copigmento (1:5), similar al descrito en la bibliografía para provocar un efecto de copigmentación notable. El efecto de la ratio molar pigmento/copigmento se evaluó a partir de disoluciones de copigmentación entre Mv 3-gl:catequina (MC) y Mv 3-gl:epicatequina (ME), igualmente preparadas en vino sintético y a las ratios molares pigmento/copigmento: 1:0, 1:1, 1:2, 1:5, y 1:7. En ambos casos, la disolución de referencia (Mv 3-gl) contenía una concentración del pigmento puro de 200 mg/L (0.41 mM). Todas las disoluciones se prepararon por triplicado y se mantuvieron durante 2 horas en oscuridad para asegurar la estabilización de la copigmentación.

Con respecto a los vinos seleccionados para este estudio, se consideraron las mismas muestras descritas en el capítulo 1, es decir, 9 vinos elaborados mediante vinificación tradicional a partir de tres variedades de uva diferentes: Cabernet Sauvignon (CS, n=2), Tempranillo (TE, n=4) y Syrah (SY, n=3); y 6 vinos de la variedad Syrah elaborados por criomaceración a partir de uvas con dos grados de madurez distintos: SyA (12.5° Bé) y SyB (14.0 °Bé). Las muestras se correspondieron con las tomadas en 10 momentos distintos durante 5 meses de estabilización en depósito, por lo que el número total de vinos analizados fue 150.

En las disoluciones modelo, el efecto colorimétrico de la copigmentación se evaluó comparando el color de las disoluciones de antocianos puros con respecto a éstas cuando contenían los diferentes copigmentos. En el caso de los vinos tintos, se

realizó siguiendo las premisas del método de Boulton (1996) por comparación del color del vino, antes y después de ser diluido 1:20 con vino sintético, es decir, con y sin efecto de la copigmentación.

Los espectros de absorción molecular de cada ensayo de copigmentación así como de las muestras de vinos se registraron por espectrofotometría en la región del visible (380-770 nm). Los parámetros CIELAB (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h_{ab}) fueron determinados utilizando el programa de cálculo original CromaLab[®] (Heredia et al., 2004), que tiene en cuenta las recomendaciones de la Comisión Internacional de Iluminación (CIE, 2004).

Sección I. Interpretación colorimétrica de la copigmentación: definición de nuevas variables en el espacio de color CIELAB.

En esta primera sección se describe en detalle la interpretación colorimétrica del efecto del fenómeno de copigmentación en el espacio de color CIE 1976-($L^*a^*b^*$) (CIELAB), cuya representación gráfica se muestra en la Figura 46.

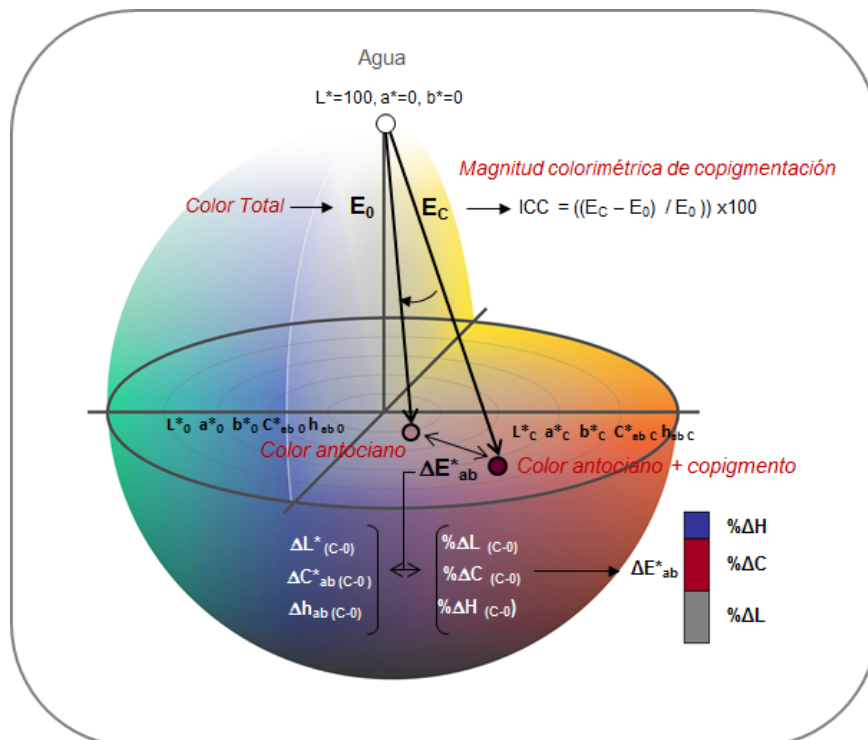


Figura 46. Interpretación colorimétrica del efecto de la copigmentación sobre el color en el espacio de color CIELAB.

En primer lugar, a partir de los espectros de absorción registrados, se calculan las coordenadas colorimétricas rectangulares (L^* , a^* , b^*) y cilíndricas (L^* , C^*_{ab} , h_{ab}) de una disolución de antocianos o de una muestra de vino, con y sin efecto de la

copigmentación, las cuales permiten describir el color en cada situación y localizarlo en el espacio de color CIELAB. Los parámetros de color sin efecto de la copigmentación se han designado como L^*_0 , a^*_0 , b^*_0 , $C^*_{ab\ 0}$, $h_{ab\ 0}$; mientras que los correspondientes con el efecto de ésta como L^*_C , a^*_C , b^*_C , $C^*_{ab\ C}$, $h_{ab\ C}$, tal y como puede observarse en la Figura 46.

A partir de éstos y mediante la aplicación de la colorimetría diferencial, se proponen distintas variables basadas en la *diferencia de color* (ΔE^*_{ab}) y en los *incrementos de claridad* (ΔL^*), *croma* (ΔC^*_{ab}), y *tono* (Δh_{ab}), lo que posibilita la evaluación integral (cuantitativa y cualitativa) del efecto de la copigmentación. Las nuevas variables propuestas se presentan a continuación:

- **Variación absoluta de color (ΔE^*_{ab}):** La diferencia de color calculada entre el color con y sin efecto de la copigmentación (L^*_C , a^*_C , b^*_C y L^*_0 , a^*_0 , b^*_0) expresa en términos cuantitativos absolutos la variación de color inducida por este fenómeno:

$$\Delta E^*_{ab\ (C-0)} = ((L^*_C - L^*_0)^2 + (a^*_C - a^*_0)^2 + (b^*_C - b^*_0)^2)^{1/2}$$

Además, es un parámetro cuyo valor es comparable a la apreciación visual (Martínez et al., 2001).

- **Incrementos de claridad (ΔL^*), croma (ΔC^*_{ab}) y tono (Δh_{ab}):** las diferencias absolutas de claridad (L^*), croma (C^*_{ab}) y tono (h_{ab}) calculadas entre el color con y sin efecto de la copigmentación permiten evaluar el sentido de la modificación del color, es decir, conocer si la variación producida es debida a una pérdida o ganancia de color. Además, la variación particular en cada atributo hace posible diferenciar si la modificación del color afecta a nivel cuantitativo, expresado por los cambios en la claridad y el croma, y/o a nivel cualitativo, expresado mediante los cambios en el tono:

$$\Delta L^*_{(C-0)} = L_C - L_0$$

$$\Delta C^*_{ab\ (C-0)} = C^*_{ab\ C} - C^*_{ab\ 0}$$

$$\Delta h_{ab\ (C-0)} = h_{ab\ C} - h_{ab\ 0}$$

- **Color Total (E):** La diferencia de color (ΔE^*_{ab}) calculada entre el color de una disolución dada (L^* , a^* , b^*) con respecto al color del agua ($L^*=100$, $a^*=0$, $b^*=0$; máxima claridad y ausencia de croma y tono) permite cuantificar

mediante un valor numérico absoluto la cantidad de color que presenta, es decir, lo que se podría denominar su “*color total*”. Así, se define el color total de la disolución de antociano con y sin efecto de la copigmentación, expresados como E_C y E_0 , a partir de las siguientes expresiones:

$$\text{Color Total sin efecto copigmentación} = E_0 = ((L^*_0 - 100)^2 + (a^*_0 - 0)^2 + (b^*_0 - 0)^2)^{1/2}$$

$$\text{Color Total con efecto copigmentación} = E_C = ((L^*_C - 100)^2 + (a^*_C - 0)^2 + (b^*_C - 0)^2)^{1/2}$$

- **Índice colorimétrico de copigmentación (ICC):** A partir del color total con y sin efecto de la copigmentación (E_C y E_0) se calcula la contribución cuantitativa de la copigmentación al color por comparación de los valores absolutos obtenidos y expresado como porcentaje.

$$ICC = ((E_C - E_0) / E_0) \times 100$$

Esta variable es un índice de la extensión en que el fenómeno ocurre y, por tanto, representa una expresión análoga a la magnitud de copigmentación calculada tradicionalmente por espectrofotometría por comparación de la variación producida en A_{520} nm. La diferencia entre ambos radica en que el nuevo índice propuesto considera las modificaciones producidas en el espectro visible completo, y por tanto, permite una cuantificación más exacta en términos de color.

- **Incrementos relativos de claridad (% ΔL), croma (% ΔC) y tono (% ΔH):** la variación relativa de claridad, croma y tono con respecto a la diferencia de color absoluta permite comparar el peso que cada atributo tiene sobre una variación de color dada, y además, comparar si éste varía según diferentes factores. Estas variables se calculan a partir de las siguientes expresiones:

$$\% \Delta L = ((\Delta L^*)^2 / (\Delta E^*_{ab})^2) \times 100$$

$$\% \Delta C = ((\Delta C^*_{ab})^2 / (\Delta E^*_{ab})^2) \times 100$$

Al ser L^* y C^*_{ab} magnitudes escalares, la variable ΔH , se deduce de la siguiente expresión, recomendada por la CIE (CIE 2004):

$$\Delta H = ((\Delta E^*_{ab})^2 - ((\Delta L)^2 + (\Delta C^*_{ab})^2))^{1/2}$$

y por tanto:

$$\% \Delta H = ((\Delta H)^2 / (\Delta E^*_{ab})^2) \times 100$$

Así, las variables $\% \Delta L$, $\% \Delta C$ y $\% \Delta H$, magnitudes escalares, se expresan en unidades CIELAB, y la suma total de ellas representan el 100% de variación de color absoluta inducida.

Sección II. Aplicación de las variables colorimétricas de copigmentación al estudio de la copigmentación en disoluciones modelo de antocianos y vinos tintos.

- Ensayo en disoluciones modelo. Efecto del pH

La adición de los diferentes copigmentos (catequina, epicatequina y ácido cafeico) a la disolución de Mv 3-gl (ratio molar pigmento/copigmento 1:5) confirmó el efecto positivo del fenómeno de copigmentación sobre la modificación del color que se produce en los antocianos debido a la variación del pH en una disolución acuosa.

El incremento del pH entre 1.0 y 5.0 produjo una importante disminución del color total (E0) de la disolución del antociano puro de 59.5 a 5.1, reflejando el desplazamiento del equilibrio antociánico hacia las formas incoloras o poco coloreadas (hemiacetal, chalcona, base quinoidal, etc.), lo cual es acorde con los resultados previamente descritos por Heredia et al. (1998). Sin embargo, para todos los valores de pH ensayados, se comprobó que en presencia de los distintos copigmentos, la disolución de Mv 3-gl experimentó una menor disminución del color total, poniendo de manifiesto un efecto protector de los copigmentos contra la degradación del color.

Además, al observar la localización de las muestras (disoluciones puras de Mv 3-gl y sus correspondientes de copigmentación) en el diagrama (a*b*) se comprobó que el efecto de la copigmentación en el color varió según el pH de la disolución, tanto en términos cuantitativos como cualitativos. Entre pH 1.0 y 3.0, se observa que el incremento del pH disminuye notablemente los valores de a* e incrementa los de L* (colores más claros y menos cromáticos), mientras que la copigmentación induce a una disminución de los valores de b* y de L*, es decir, la disolución de Mv 3-gl presentó un color más vivo y de una tonalidad roja más azulada en presencia de copigmentos. En este intervalo de pH, el efecto más notable de la copigmentación se obtuvo a pH 3.0, incrementando el color total de la disolución de Mv 3-gl desde 29.1 hasta 31.8, 32.7 y 32.8, con los distintos copigmentos ensayados. Por el contrario, a valores de pH superiores a 3.0, se observa que la localización de las disoluciones puras de Mv 3-gl y sus correspondientes de copigmentación es menos

dispersa y además se encuentran situadas cercanas al origen de coordenadas (colores menos cromáticos); lo cual refleja que a estos valores de pH el efecto de la copigmentación fue menos notable.

La evaluación de la magnitud de copigmentación por Colorimetría Triestímulo mediante la expresión $(E_c - E_0)/E_0 \times 100$, confirmó que la contribución de este fenómeno al color total del antociano es pH-dependiente, y que además estuvo influenciada por la naturaleza química del compuesto fenólico ensayado como copigmento. Siendo acorde con lo observado en el diagrama de color (a^*b^*), la mayor magnitud de copigmentación se obtuvo a pH 3.0, siendo significativamente superior ($p < 0.05$) para la epicatequina y el ácido cafeico en comparación al resultado obtenido para la catequina (13.7% y 13.8% vs. 9.3%, respectivamente). Estos resultados coinciden con los descritos en la bibliografía por distintos autores (Eiro et al., 2002; Darías-Martín et al., 2002; Gómez-Míguez et al., 2006; Cruz et al., 2010). Entre los distintos flavanoles del vino, la epicatequina suele presentar una mayor capacidad de copigmentación que la catequina ya que su estructura química presenta el grupo 3-hidroxilo y el anillo aromático B situados en la misma disposición en el espacio, lo cual facilita el acoplamiento con la estructura plana del antociano. Asimismo, los ácidos cinámicos, que se caracterizan por presentar un mayor número de sustituyentes donadores de electrones, favorecen una mayor interacción con los estos pigmentos.

Mediante las diferencias de color (ΔE^*_{ab}) entre las disoluciones de Mv 3-gl pura y las de copigmentación a pH creciente, se pudo comparar las implicaciones colorimétricas de este fenómeno para cada tipo de copigmento. En el intervalo de pH estudiado, los mayores valores de diferencia de color se obtuvieron entre pH 1.0 y 3.0; confirmando una mayor estabilización del catión flavilio en el equilibrio antociánico a valores de pH más ácidos. Concretamente, la mayor variación de color se obtuvo a pH 3.0, siendo 3.7, 3.4 y 3.1 con epicatequina, ácido cafeico y catequina, respectivamente. Aunque en comparación con otros compuestos fenólicos los flavanoles han sido considerados como peores copigmentos, la Colorimetría Triestímulo ha puesto de manifiesto que, a valores de pH más ácidos, estos compuestos inducen un efecto en el color apreciable visualmente (Martínez et al., 2001). Por el contrario, a valores de pH superiores a 3.0, todas las diferencias de color fueron inferiores a 2.0, y por tanto, difícilmente apreciables.

Otra interesante observación al aplicar la Colorimetría Triestímulo es que a determinados valores de pH (1.0 y 2.0), mientras que sí se obtuvo una variación del color debido a la presencia de copigmentos que pueden ser apreciables (cercana a

3.0), no se produjo cambio en la A_{520} . Este tipo de divergencia entre ambos métodos ya fue descrita anteriormente por González-Manzano et al. (2009), y confirma que la evaluación del efecto de la copigmentación sobre el color mediante métodos simplificados no siempre refleja la extensión del fenómeno.

El estudio de las diferencias absolutas de claridad, croma y tono (ΔL^* , ΔC^*_{ab} , y Δh_{ab}) entre la disolución de Mv 3-gl y las respectivas de copigmentación permitió evaluar el sentido de la modificación del color producida. Independientemente del tipo de copigmento ensayado, experto para la copigmentación con la catequina a pH 5.0, en todos los casos se obtuvieron valores negativos en los incrementos de claridad y tono y sin embargo positivos en el incremento de croma, es decir, en presencia de los copigmentos, las disoluciones de Mv 3-gl experimentaron un oscurecimiento, e incremento de la intensidad de color, así como de los matices azulados.

Por último, las variaciones cuadráticas relativas de claridad, croma y tono ($\% \Delta L$, $\% \Delta C$, y $\% \Delta H$) mostraron que el peso de cada atributo de color sobre las diferencias de color producida varía según el pH del medio y, aunque en menor medida, de la naturaleza química del copigmento. Con respecto a la influencia del pH, se observó que a pH 1.0, la mayor contribución a la variación de color fue debida al cambio de tono ($\% \Delta H = 80-88\%$, como valor medio), es decir, se produjeron principalmente variaciones cualitativas. Sin embargo, a medida que se incrementa el valor de pH (entre 2.0 y 4.0), el peso del cambio en los atributos cuantitativos se hace más importante, siendo especialmente debida a cambios en el croma ($\% \Delta C = 35-65\%$). Estas diferencias indican que a valores de pH más ácidos, la copigmentación tiene un mayor efecto en el cambio de las propiedades espectrales del catión flavilio que en la estabilización de éste en el equilibrio antociánico, lo cual es coherente con los valores obtenidos en los parámetros color total (E) y diferencia de color (ΔE^*_{ab}). Por el contrario, a valores de pH entre 2.0 y 4.0, al haber más formas incoloras en el equilibrio antociánico, el efecto de la copigmentación sobre la estabilización hacia las formas coloreadas es más notable. En relación al efecto del tipo de copigmento, se obtuvo que en términos generales la epicatequina y el ácido cafeico provocaron similares efectos en el color total de la Mv 3-gl a los distintos valores de pH, contribuyendo en mayor medida con cambios cuantitativos. Por el contrario, a valores más elevados de pH, la contribución cualitativa ($\% \Delta H$) fue más notable para la catequina.

- **Ensayos en disoluciones modelo. Efecto de la ratio molar**

Para los dos tipos de flavonoles ensayados, el incremento de la concentración de los copigmentos en las disoluciones de copigmentación produjo en todos los casos un incremento del color total del antociano puro (E_0), siendo significativo ($p < 0.05$) para ratios molares superiores a 1:2. El mayor efecto de copigmentación se obtuvo con la ratio molar 1:7, ya que en este caso fue cuando se obtuvo el mayor incremento del color total original ($E_0 = 49.3$, $E_c = 57.9$ y 57.3 para las disoluciones ME y MC respectivamente).

La localización de las muestras en el diagrama de color (a^*b^*) mostró que la copigmentación indujo cambios tanto cuantitativos como cualitativos en el color original de la Mv 3-gl. En ausencia de los copigmentos, la disolución de Mv 3-gl tomó valores positivos de a^* y b^* , y aparece situada cercana a los 0° de tono (h_{ab}), es decir, en la zona correspondiente al rojo neto ($L^* = 69.7\%$, $a^* = 38.8$ y $b^* = 0.39$). Sin embargo, el incremento progresivo de la concentración en ambos tipos de copigmentos produjo un notable desplazamiento de las muestras hacia una zona del diagrama más alejada del origen de coordenadas (croma más alto) y además desde el 1^{er} hacia el 4° cuadrante, es decir, las muestras presentaron un color más vivo y de tonalidad rojiazulada, siendo este efecto más marcado para la ratio molar 1:7.

En relación a la magnitud de copigmentación calculada según el método basado en Colorimetría Triestímulo, se comprobó que estuvo significativamente ($p < 0.05$) influenciada por la ratio molar pigmento/copigmento, y también, aunque en menor medida, por el tipo de flavanol ensayado. La adición de concentraciones crecientes de catequina entre las ratios 1:1 y 1:7 produjo un incremento en la magnitud de copigmentación de 1.2% hasta 16.0%, mientras que para el caso de la epicatequina este incremento fue desde 3.9% hasta 17.9%.

Tal y como podía esperarse, se confirmó la progresiva formación de los complejos de copigmentación a partir del incremento gradual en las diferencias de color (ΔE^*_{ab}) calculada entre la disolución de Mv 3-gl y sus correspondientes de copigmentación, a ratios molares crecientes. Para los diferentes niveles de concentración ensayados, todas las diferencias de color obtenidas superaron el nivel de discriminación visual, establecido en torno a 3.0 (Martínez et al., 2001). La mayor variación de color inducida se obtuvo para la ratio molar más alta (1:7), siendo ligeramente superior para la epicatequina (10.8 vs. 9.8, respectivamente), lo cual fue consistente con los mayores valores obtenidos para el color total (E_c) y la magnitud de copigmentación en este flavanol.

De nuevo, se puso de manifiesto divergencias en la evaluación del efecto colorimétrico de la copigmentación al comparar los resultados obtenidos por ambos métodos. Así, un incremento de la ratio molar entre 1:2 y 1:5 en la disolución MC no produjo ninguna modificación de la A_{520} (0.77), mientras que sí se produjeron incrementos tanto del color total (E_C de 52.6 a 54.3) como de la diferencia de color (ΔE^*_{ab} de 4.9 a 6.4).

En relación con el sentido de la modificación del color, para ambos copigmentos se observó una tendencia a mayores disminuciones de claridad y tono (ΔL^* y Δh_{ab}) a medida que se incrementa la ratio molar pigmento/copigmento, es decir, hacia un mayor oscurecimiento y un incremento de las tonalidades rojo-azuladas de las disoluciones de copigmentación. Con el objetivo de conocer la significación de estos cambios se estudiaron las correlaciones simples entre las variaciones absolutas de los distintos atributos de color y la ratio molar. Entre los distintos atributos evaluados, la variación absoluta del tono (Δh_{ab}) fue el parámetro mejor correlacionado mediante una regresión polinomial de segundo grado ($R^2=0.99$); confirmando la relevancia de los cambios cualitativos en el efecto colorimétrico inducido por la copigmentación.

Asimismo, las variaciones cuadráticas relativas de los distintos atributos del color ($\% \Delta L$, $\% \Delta C$, y $\% \Delta H$) confirmaron que, independientemente del tipo de flavanol y la ratio molar ensayada, la contribución de la copigmentación a los cambios de color fue principalmente cuantitativa ($\% \Delta L + \% \Delta C = 87.5\%$ vs. $\% \Delta H = 12.5\%$, como valores medios). En términos generales, se observó que el incremento de la concentración de los copigmentos produjo una disminución del peso de las modificaciones de claridad ($\% \Delta L = 67\%$ vs. 44%) mientras que las variaciones en los incrementos relativos del croma y tono no mostraron una tendencia definida.

Con respecto al tipo de flavanol ensayado, aunque su efecto fue menos notable que la ratio molar, para ciertos valores de ratio pigmento/copigmento se encontraron diferencias en el peso de cada atributo sobre la diferencia de color total. Así, para la ratio molar 1:5, mientras que ambos copigmentos indujeron diferencias de color de una magnitud similar, el cambio de color fue debido principalmente a una variación cualitativa en la catequina y cuantitativa en la epicatequina ($\% \Delta H = 30$ vs. 11% y $\% \Delta C = 30$ vs. 50% , respectivamente para MC y ME).

- Ensayos en vinos tintos.

Siguiendo las premisas del método de Boulton (1996), se asume que la dilución aplicada a cada muestra (1:20) es suficiente para provocar la total disociación de los complejos de copigmentación formados en un vino tinto joven. Por tanto, si el espectro de absorción registrado de la muestra de vino diluida se multiplica por el factor de dilución aplicado (20), se obtiene el espectro que teóricamente correspondería a esa muestra sin el efecto de la copigmentación. Así, a partir los espectros del vino de partida y de su correspondiente diluido y corregido, se obtiene el color del vino con y sin efecto de la copigmentación (E_C y E_0).

Se observó que la eliminación de la copigmentación produjo una importante disminución del color total del vino en todas las muestras analizadas ($E_C > E_0$, $n=150$). Por término medio, el color total del vino con copigmentación fue de 41.8 mientras que sin copigmentación de 33.1. A su vez, la λ_{max} del espectro del vino de partida experimentó una disminución media de absorbancia desde 1.1 hasta 0.8 U.A y además un desplazamiento medio batocrómico de 7 nm (desde 522 hasta 530 nm). Aplicando la Colorimetría Triestímulo ($(E_C - E_0)/E_C$), se obtuvo que la copigmentación contribuyó por término medio en un 21.9% al color total de los vinos tinto jóvenes estudiados, oscilando entre un valor mínimo de 5.1% y máximo de 46.1%.

Mediante la comparación de los parámetros colorimétricos psicofísicos (L^* , C^*_{ab} , h_{ab}) de los vinos con y sin efecto de la copigmentación, se confirmó el efecto positivo que este fenómeno tiene sobre el color del vino. Independientemente de la variedad y del grado de maduración de la uva, así como del tiempo de estabilización en depósito, la existencia de copigmentación produjo modificaciones cuantitativas y cualitativas en el color, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) para todos los parámetros colorimétricos. Estas diferencias determinaron una localización claramente distinta de las muestras en el diagrama de color (a^*b^*), para cada situación. Con el efecto de la copigmentación, los vinos presentaron valores de croma que oscilaron en el intervalo de 20.9 a 44.6 y de tono entre 2.9° y -8.3° , y por tanto las muestras se encontraron situadas alejadas del origen de coordenadas y en la zona del diagrama entre -10° (350°) y 0° de tono, lo cual se corresponde con colores vivos de tonos rojos con tendencia a mostrar matices azulados. Por el contrario, tras la dilución, los vinos presentaron valores de croma que oscilaron entre 12.7 y 39.1, y de tono entre -3.7° y 21.9° . Por tanto, la disociación de los complejos de copigmentación produjo un desplazamiento importante de todas las muestras hacia una zona más cercana al origen de coordenadas y aproximadamente entre 0° - 10° de tono, es decir, los vinos exhibieron un color menos vivo (menos cromático) y con tonos rojos más netos. Por

término medio, sin el efecto de la copigmentación, las muestras de vino presentaron mayores valores de claridad y tono ($L^* = 77.1$ vs. 71.2 , $h_{ab} = +7.1^\circ$ vs. -3.15) y menores de croma ($C^*_{ab} = 24.3$ vs. 30.6).

La diferencia de color absoluta (ΔE^*_{ab}) calculada entre el color del vino con y sin el efecto de la copigmentación varió entre 4.1 y 19.5, indicando que en todos los casos considerados ($n=150$) el fenómeno de copigmentación indujo una modificación de color del vino que puede ser visualmente apreciable (Martínez et al., 2001). Excepto en algunas muestras donde apenas se produjo modificación en alguno de los atributos de color, en general se obtuvieron incrementos negativos de claridad (ΔL^* entre -0.2 y -16.3) y de tono (Δh_{ab} entre -8.4° y -18.3°) y positivos en el incremento de croma (ΔC^*_{ab} entre $+0.3$ y $+26.1$). Por tanto, la copigmentación indujo una ganancia de color, favoreciendo particularmente que el color del vino fuese más oscuro, vivo, y de tonalidad más azulada. Asimismo, las variaciones medias relativas de claridad, croma y tono ($\% \Delta L$, $\% \Delta C$, y $\% \Delta H$) pusieron de manifiesto que, aunque el incremento de color producido fue debido en mayor medida a variaciones cuantitativas (de claridad y croma), el peso de la variación cualitativa (del tono) también fue importante ($\% \Delta L=41\%$, $\% \Delta C=38\%$, $\% \Delta H=21\%$).

De nuevo, se han encontrado divergencias en la evaluación del efecto de la copigmentación sobre el color del vino, según la metodología aplicada. Así, se comprobó que mientras que la magnitud de copigmentación calculada a partir del parámetro color total ($(E_C - E_0)/E_C$) y la diferencia de color (ΔE^*_{ab}) inducida por la copigmentación fueron muy variables entre distintas muestras de vino (18%-41%, y 7.4-16.8, respectivamente para $n=7$), de acuerdo la variación en la A_{520} éstas presentaron un mismo grado de magnitud de copigmentación (24%). Por tanto, aunque se encontró una buena correlación entre ambos índices ($r^* = 0.94$), al igual que ocurrió en el caso de las disoluciones modelos de antocianos, se puso de manifiesto que en vinos tintos la variación en la A_{520} no siempre representa el cambio de color real inducido por este fenómeno.

Por último, se estudió la influencia de la variedad y del grado de maduración de la uva en el proceso de copigmentación, confirmándose que ambos factores ejercen una influencia significativa ($p < 0.05$) tanto en la magnitud de copigmentación como en la variación de color asociada a este proceso.

Con respecto al factor varietal, se obtuvo que la variación de color inducida por la copigmentación fue significativamente superior ($p < 0.05$) en el vino SY que en CS y TE

(ΔE^*_{ab} = 10.6 vs. 7.6 y 7.4, respectivamente), lo cual fue coherente con la mayor magnitud de copigmentación desarrollada por esta variedad (21.5% vs. 14.7% y 11.8%). Aunque, en los tres tipos de vino, la copigmentación indujo una disminución de claridad y tono, así como un incremento del croma, la magnitud de las modificaciones cuantitativas fueron más acusadas en la variedad SY que con respecto a CS y TE (ΔL^* = -7.2 vs. -3.6 y -4.9; ΔC^*_{ab} = +6.1 vs. +4.8 y +2.6). La variación relativa de cada uno de los atributos del color confirmó que la contribución colorimétrica de la copigmentación en el vino SY fue en mayor medida cuantitativa (% ΔL =44.3%, % ΔC =39.5%, % ΔH =16.1%). Por el contrario, en los vinos CS y TE el peso de las modificaciones cualitativas fue más elevado (% ΔL =35.9%, % ΔC =43.4%, % ΔH =20.7%, en CS y % ΔL =48.7%, % ΔC =19.8%, % ΔH =31.5% en TE).

En relación al grado de madurez de la uva, los vinos elaborados a partir de uva más madura (SyB) experimentaron una mayor variación del color debido a la copigmentación que los vinos elaborados a partir de uva menos madura (SyA) (ΔE^*_{ab} = 11.5 vs. 9.5, respectivamente), coincidiendo con un mayor desarrollo de la magnitud de copigmentación (27.6% vs. 17.8%). Además, las variaciones relativas de claridad, croma y tono pusieron de manifiesto que el color del vino no estuvo siempre influenciado de la misma forma, variando de manera notable en alguno de los atributos de color en función del grado de madurez de la uva, como fue el caso del tono, cuyas modificaciones fueron más importantes en los vinos elaborados con uva más madura. (% ΔL =27.7 vs. 31.5%; % ΔC =51.5 vs. 56.2%; ΔH =20.7% vs. 12.3%, en SyB y SyA respectivamente).

Conclusiones

Las principales conclusiones que se extraen de los resultados obtenidos son las siguientes:

1. Tanto en disoluciones modelo de antocianos como en vinos tintos, la copigmentación favorece que el color fuese más oscuro, vivo y de tonalidad más azulada. En la mayoría de los casos, el efecto colorimétrico producido superó el nivel de apreciación visual, teniendo los cambios cualitativos de color un peso importante en dicha variación.
2. Se ha encontrado una buena correlación entre la evaluación de la magnitud de copigmentación por colorimetría y por espectrofotometría,

aunque en determinados casos, el método simplificado de medida, basado en los cambios en la A_{520} , no refleja con exactitud la extensión en que el fenómeno ocurre, ni ha permitido evaluar los cambios colorimétricos cuantitativos y cualitativos producidos.

3. En disoluciones modelos de antocianos, el efecto de la copigmentación sobre el color se modifica apreciablemente en función del pH del medio, y además por la naturaleza química y la concentración del copigmento.
4. Dentro del intervalo de pH ensayado e independientemente del tipo de copigmento, el mayor efecto colorimétrico de la copigmentación se produjo a pH 3.0. A valores más ácidos de pH (1.0), la contribución de la copigmentación al color es fundamentalmente cualitativa, mientras que a valores menos ácidos (2.0-4.0) es cuantitativa.
5. Con respecto al tipo de compuesto fenólico, la epicatequina y el ácido cafeico se comportaron como mejores copigmentos, teniendo un efecto similar en el color de la Mv 3-gl y contribuyendo en mayor medida con cambios cuantitativos.
6. Independientemente del tipo de copigmento, el mayor efecto de la copigmentación se obtuvo para la ratio molar 1:7.
7. En vinos tintos, el efecto de la copigmentación sobre el color se modifica apreciablemente en función de la variedad y del grado de maduración de la uva, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo.
8. La copigmentación tuvo un efecto colorimétrico fundamentalmente cuantitativo en la variedad Syrah, y tanto cuantitativo como cualitativo en Tempranillo y Cabernet Sauvignon.
9. Las modificaciones cualitativas inducidas por la copigmentación fueron más importantes en los vinos Syrah elaborados a partir de uvas más maduras.

Comprehensive Colorimetric Study of Anthocyanic Copigmentation in Model Solutions. Effects of pH and Molar Ratio

Belén Gordillo, Francisco J. Rodríguez-Pulido, M. Luisa Escudero-Gilete, M. Lourdes González-Miret, and Francisco J. Heredia*

Food Colour and Quality Laboratory, Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

ABSTRACT: New colorimetric variables have been defined in the uniform CIELAB color space to assess the quantitative and qualitative color changes induced by copigmentation and their incidence on visual perception. The copigmentation process was assayed in model solutions between malvidin 3-glucoside and three phenolic compounds (catechin, epicatechin, and caffeic acid) as a function of the pH and the pigment/copigment molar ratio. Along the pH variation, the greatest magnitude of copigmentation was obtained at pH 3.0, being significantly higher with epicatechin and caffeic acid. At high acidic pH, the main contribution of copigmentation to the total color was qualitative, whereas between pH 2.0 and 4.0, the main colorimetric contribution was quantitative. The contribution of epicatechin and caffeic acid to the color changes was more marked for the quantitative characteristics. On contrast, particularly at higher pH values, the qualitative contribution was more important in catechin copigmented solutions. Increasing copigment concentration induced perceptible color changes at molar ratios higher than 1:2, consisting in a bluish and darkening effect of the anthocyanin solutions. Among the different CIELAB attributes, hue difference was the best correlated parameter with the increase of copigment concentration, proving the relevance of this physicochemical phenomenon on the qualitative changes of anthocyanin color.

KEYWORDS: anthocyanin, color, copigmentation, Tristimulus Colorimetry

INTRODUCTION

Anthocyanins are the pigments accounting for the brilliant red, purple, and blue colors in many fruits, vegetables, and derived food products such as fruits juices, jams, and red wines.¹

It is well-known that the stability of anthocyanic pigments is greatly limited because their resonating structure confers intrinsic instability against several physical–chemical conditions. Evaluation of the factors affecting the stability of anthocyanins indicates that pH is the most important extrinsic factor of anthocyanin degradation. Depending on the pH of the medium, the red-colored flavylium cation coexists as an equilibrium mixture with other forms of anthocyanins: the blue-purple quinonoidal bases, the colorless hemiacetal B, and the pale yellow chalcones. Therefore, the same anthocyanin solution may show different colors.²

However, the chemical and colorimetric stability of anthocyanins can be improved by associations with other substances. The copigmentation phenomenon, among others, represents one of the most complex and efficient mechanisms of anthocyanin chromophore stabilization in nature and food systems.³ In food science, this phenomenon is considered to be a relevant interaction because obtaining stable and attractive colors is a major focus for quality control purposes.⁴ Especially, in winemaking, it is assumed that it plays a key role in the color evolution and stability of young red wines.⁵

Copigmentation reactions consist of noncovalent interactions between anthocyanins among themselves (self-association), between the central anthocyanin chromophore and aromatic acyl residues covalently linked to their glycosyl moieties (intramolecular copigmentation), or through intermolecular interaction with a wide variety of colorless organic

compounds named copigments or copigmentation cofactors (basically other phenolic compounds, but also amino acids, sugars, organic acids, polysaccharides, etc.).^{4–7}

From a molecular point of view, the anthocyanin–copigment complexes adopt a typical sandwich configuration (π – π stacking) via hydrophobic interaction. This structural conformation protects the red-colored flavylium cation against the nucleophilic attack of water, peroxide and sulfur dioxide bleaching, and pH changes, reducing the formation of the other colorless species in the anthocyanin equilibrium (hemiacetal and chalcone).⁶

In addition, copigmentation not only confers greater stability to anthocyanins but also induces color variations. This kind of molecular association is responsible for the typical changes in the spectral properties of the chromophore group, that is, an increase of the absorptivity and frequently a shift of the visible λ_{max} toward greater wavelengths. Consequently, copigmentation produces both quantitative and qualitative color changes in anthocyanin solutions. In this sense, the measurement and evaluation of these colorimetric changes is of great interest to the food industry because color is one of the main sensory parameters for the quality of foods influencing customer selection.⁷

The contribution of the copigmentation phenomenon in color has been widely studied using spectrophotometric methods, in both model and food systems that contain

Received: November 11, 2011

Revised: February 29, 2012

Accepted: February 29, 2012

Published: February 29, 2012



individual anthocyanins and added copigments or in red wines in which anthocyanins naturally co-occur with other phenolic compounds.^{8–15} The evaluation of the changes in the visible spectrum of anthocyanins, or specifically in the λ_{max} (520 nm), has permitted the determination of the influence of numerous factors on the effectiveness of the copigmentation including the concentrations of pigments and cofactors, their chemical structures, the cofactor/pigment molar ratio, the pH of the medium, etc. In the same way, several studies in red wines have shown that the magnitude of copigmentation and its evolution during winemaking is extremely variable according to viticultural, agronomical, or enological practices, accounting for approximately 25–50% of the total color of young red wines.^{5,16–20}

In any case, although spectral methods have been demonstrated to be valid, simple, and quick tools to quantitative estimations, it is generally accepted that they provide limited precision and accuracy for color specifications. The lower precision and accuracy achievable can be explained because an adequate description of the color variations requires (i) that spectral variations considered should be those affecting the entire spectral curve, not only its visible λ_{max} and (ii) the use of at least three colorimetric attributes: hue, saturation, and lightness.²¹ Moreover, the specific changes at the λ_{max} are also often interpreted incorrectly in colorimetric terms. It has been described that the hyperchromic and bathochromic effects make anthocyanin solutions appear bluer and with more intense color.^{3,22,23} However, the variation in a single wavelength does not explain the complete behavior of the color due to this phenomenon.

For these reasons, to advance the knowledge of the global colorimetric role of copigmentation it is necessary to consider both quantitative and qualitative color changes. In this context, Tristimulus Colorimetry, which is based on transmittance values of the whole spectra, represents a useful methodology that widely improves the objective analysis of color.

Thus, through Tristimulus Colorimetry, in this study is performed a precise colorimetric interpretation of the copigmentation phenomenon using the uniform 1976- ($L^*a^*b^*$) color space (CIELAB), which has been recommended by the Commission Internationale de l'Éclairage (CIE) as a more appropriate tool for color specification in most industrial applications. For this purpose, diverse colorimetric variables based on both the rectangular (L^* , a^* , b^*) and cylindrical (L^* , C^*_{ab} , h_{ab}) color coordinates have been defined to assess the quantitative and qualitative color implications associated to copigmentation and their incidence on visual perception. These colorimetric variables have been applied and compared with the most used simplified method in the evaluation of the copigmentation effects in model solutions.

For the model solution assay, the pigment chosen was malvidin 3-glucoside, one of the six most common anthocyanins in nature, fruits, and vegetables. The flavanols catechin, epicatechin, and caffeic acid were also selected because they are some of the main polyphenolic copigments described, especially in red wines.

MATERIALS AND METHODS

Standards and Copigmented Models Solutions. The pigment malvidin 3-glucoside (Mv 3-gl) was isolated in the laboratory from skins of *Vitis vinifera* red grapes of the Tempranillo variety. Extraction was made with acidic methanol (methanol/HCl 1 N; 95:5 v/v), and the extracts were purified by semipressure liquid chromatography

using a reversed-phase column, as described by Heredia et al.²⁴ The copigments (+)-catechin, (–)-epicatechin, and caffeic acid were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

All of the model solutions were prepared in a wine-like medium containing 5 g/L tartaric acid in 12% ethanol with ionic strength adjusted to 0.2 M by the addition of sodium chloride.

To evaluate the effect of the pH on the copigmentation phenomenon, three copigmented solutions of Mv 3-gl/(+)-catechin (MC), Mv 3-gl/(–)-epicatechin (ME), and Mv 3-gl/caffeic acid (MF), as well as a reference solution (Mv 3-gl), were prepared in wine-like medium at different pH values: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, and 5.0. The reference solution contained 200 mg/L (0.41 mM) Mv 3-gl. Copigmented solutions contained the same anthocyanin concentration and the corresponding copigment using a pigment/copigment molar ratio of 1:5.

The effect of the copigment concentration was also assessed. Two copigmented solutions of Mv 3-gl/(+)-catechin (MC) and Mv 3-gl/(–)-epicatechin (ME) and a reference solution were prepared in the same wine-like medium adjusted to pH 3.60. Copigmented solutions contained the same anthocyanin concentration (0.41 mM) and the corresponding copigments to give the required pigment/copigment molar ratios: 1:1, 1:2, 1:5, and 1:7.

All of the solutions were prepared in triplicate and equilibrated to reach the equilibrium for 2 h and stored closed in darkness at 25 °C, after which their absorption spectra were recorded.

Color Analysis. The absorption spectra (380–770 nm) of all the model solutions were recorded at constant intervals ($\Delta\lambda = 2$ nm) with a Hewlett-Packard UV-vis HP8452 spectrophotometer (Palo Alto, CA), using 2 mm path length glass cells and distilled water as a reference. The CIELAB parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , and h_{ab}) were determined by using CromaLab software,²⁵ following the recommendations of the Commission Internationale de l'Éclairage:²⁶ the 10° Standard Observer and Standard Illuminant D65.

The L^* value is the vertical axis and defines the lightness, the property according to which each color can be considered as equivalent to a member of the gray scale, between black and white, taking values within the range of 0–100, respectively. The a^* and b^* values represent the chromaticity scalar coordinates, which in turn represent opponent red–green and blue–yellow scales.

From L^* , a^* , and b^* , other parameters are defined, such as hue (h_{ab}) and chroma (C^*_{ab}). Hue angle (h_{ab}) is the attribute according to which colors have been traditionally defined as red, green, etc. On the other hand, chroma (C^*_{ab}) is the attribute that allows each hue to be determined by its degree of difference in comparison to a gray color with the same lightness. Moreover, these colorimetric parameters can be distinguished as quantitative or qualitative color attributes as they indicate quantitative (L^* and C^*_{ab}), or qualitative (h_{ab}) contributions to color.

Color difference, which is very important to evaluate relationships between visual and numerical analyses,²⁷ was determined by means of the CIE76 color difference parameter (ΔE^*_{ab}). It was calculated as the Euclidean distance between two points in three-dimensional space defined by L^* , a^* , and b^* : $\Delta E^*_{ab} = ((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)^{1/2}$

Colorimetric Analysis of Copigmentation in the CIELAB Color Space. The colorimetric effect of copigmentation was evaluated by comparing the color of the pure anthocyanin solutions and the color of the same solutions containing different copigment concentrations.

We consider a new variable E , which expresses the “total color” of a solution as the color difference between the corresponding L^* , a^* , and b^* values with respect to distilled water ($L^* = 100$, $a^* = 0$, $b^* = 0$). Therefore, the total color of the copigmented and noncopigmented solutions was expressed as E_C and E_0 , respectively. From E_C and E_0 , the percentage of the anthocyanin color solutions that is due to copigmentation was calculated as the following equation:

$$CCI = ((E_C - E_0)/E_0) \times 100$$

The absolute color variation induced by copigmentation was assessed as the CIELAB color difference formula (ΔE^*_{ab}) applied

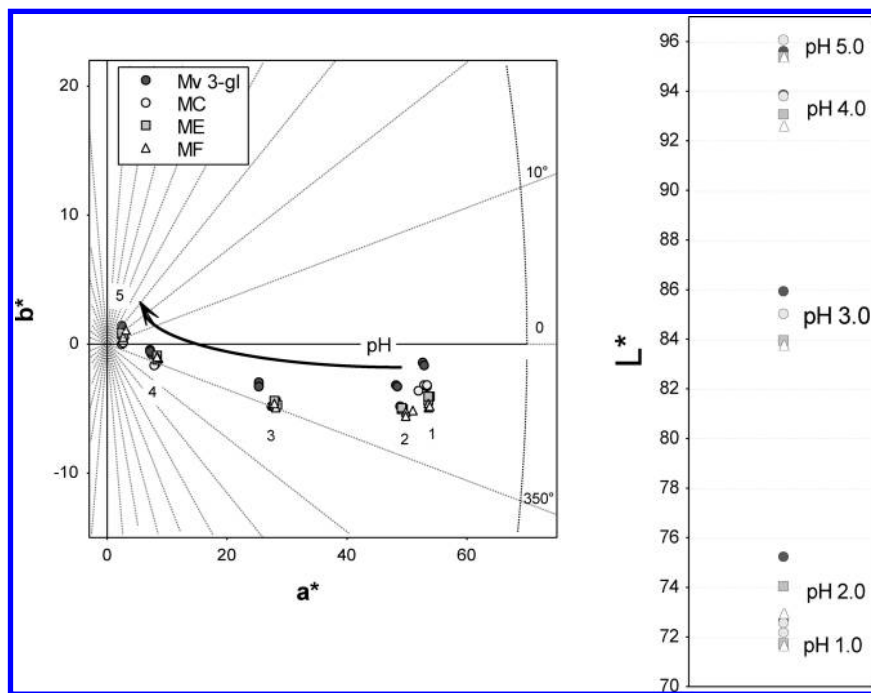


Figure 1. Change in the location of the pure Mv 3-gl and copigmented solutions (MC, ME, and MF) within (left panel) the (a^*b^*) diagram and (right panel) lightness values (L^*) as a function of the pH value.

between the color of the copigmented and noncopigmented anthocyanin solutions, as follows:

$$\Delta E^*_{ab(C-0)} = ((L^*_C - L^*_0)^2 + (a^*_C - a^*_0)^2 + (b^*_C - b^*_0)^2)^{1/2}$$

In the same way, the absolute lightness, chroma, and hue differences (ΔL^* , ΔC^*_{ab} , and Δh_{ab}) were used to assess the trend of the color changes induced by copigmentation. Specifically, Δh_{ab} is the difference between two hues, in sexagesimal degrees.

In addition, the relative contribution of the three color attributes that make up the total CIELAB color difference was also calculated to compare the copigmentation effect according to different factors. Thus, the weight of each color attribute was calculated as

$$\% \Delta L = ((\Delta L)^2 / (\Delta E^*_{ab})^2) \times 100$$

$$\% \Delta C = ((\Delta C)^2 / (\Delta E^*_{ab})^2) \times 100$$

$$\% \Delta H = ((\Delta H)^2 / (\Delta E^*_{ab})^2) \times 100$$

ΔH being deduced from ΔE^*_{ab} , ΔL , and ΔC values as follows:

$$\Delta H = ((\Delta E^*_{ab})^2 - ((\Delta L)^2 + (\Delta C)^2))^{1/2}$$

Therefore, ΔH , ΔL , and ΔC are scalar magnitudes in CIELAB units.

Statistical Analysis. For the statistical treatment of the data, Statistica v. 8.0 software²⁸ was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of pH and the Chemical Structure of Copigment on Copigmentation. A color analysis of the Mv 3-gl copigmented with different phenolic compounds was performed in the CIELAB space at different pH values (from 1 to 5 units) to evaluate the influence of the copigmentation reaction on the anthocyanin equilibria. Figure 1 depicts the location of the pure Mv 3-gl solution and its corresponding copigmentation with catechin (MC), epicatechin (ME), and

caffeic acid (MF) within the (a^*b^*) diagram and lightness values (L^*) according to pH value.

As previously reported by Heredia,²⁴ pH variations provoke important changes in both quantitative and qualitative psychophysical components of the anthocyanin color. As the pH increases, the total color (E) of the pure Mv 3-gl solution strongly decreased from 59.51 to 5.12 units, the progressive color degradation being especially remarkable at pH values >3.0 (Table 1). However, the addition of the different copigments increased significantly the total color of the pure Mv 3-gl solution, confirming the protective effect of the copigmentation phenomenon against color degradation.

As can be seen in Figure 1, between pH 1.0 and 3.0, the color of the pure Mv 3-gl solution underwent a slight decrease to blue hues and became less vivid and lighter. This color evolution reflects the kinetic and thermodynamic competition between the flavylium cation and the other colorless species in the anthocyanin equilibria, that is, hemiacetals, chalcones, and the blue anionic quinonoidal bases.² However, at this pH range, a notable displacement of all copigmented solutions with respect to the pure Mv 3-gl solution was produced in the CIELAB space, which tended progressively toward 350° color area (-10°). Therefore, whereas the pH effect diminishes the values of a^* and increases the values of L^* , which agrees with the increase of the discoloration (evolution to achromatic colors), copigmentation mainly diminishes the values of L^* and b^* . As a consequence, pure Mv 3-gl solutions exhibited the darkest and more vivid bluish color when they were in the presence of the copigments, revealing the positive influence of the copigmentation phenomenon on the anthocyanin equilibrium and, thus, on its color. Specifically, at pH 3.0, the total color (E) increased significantly from 29.1 (Mv 3-gl) to 31.8, 32.7, and 32.8 units, respectively.

On the contrary, according to their location in the (a^*b^*) colorimetric diagram, at pH values >3 units, both copigmented and noncopigmented solutions appear to be more grouped in

Table 1. Mean Values of the $A_{520\text{nm}}$ and the Total Color (E) Obtained for the Pure Anthocyanic Solution and Its Respective Copigmentation at Each pH Value (MV 3-gl: 200 mg/L, Molar Ratio 1:5) as well as the CIELAB Differences (ΔE^*_{ab} , ΔL^* , ΔC^*_{ab} , Δh_{ab}) between Mv 3-gl Solutions with and without Copigments

	pH	pigment		pigment/copigment	
		Mv 3-gl	MC	ME	MF
$A_{520\text{nm}}$	1	0.86 ± 0.001 a	0.84 ± 0.001 b	0.84 ± 0.008 b	0.83 ± 0.004 b
	2	0.73 ± 0.002 a	0.78 ± 0.03 a	0.73 ± 0.002 a	0.77 ± 0.03 a
	3	0.32 ± 0.001 a	0.34 ± 0.001 b	0.36 ± 0.004 c	0.37 ± 0.003 c
	4	0.10 ± 0.003a	0.10 ± 0.003 a	0.11 ± 0.001 b	0.12 ± 0.005b
	5	0.06 ± 0.001 a	0.05 ± 0.005a	0.06 ± 0.001 a	0.05 ± 0.002 a
E	1	59.51 ± 0.98 a	60.10 ± 0.23 b	60.77 ± 0.26 c	60.79 ± 0.16 c
	2	54.37 ± 1.67 a	57.51 ± 1.77 b	55.83 ± 0.17 b	57.88 ± 1.42 b
	3	29.13 ± 0.98 a	31.85 ± 0.17 b	32.68 ± 0.34 c	32.79 ± 0.20 c
	4	9.47 ± 1.67 a	10.22 ± 0.27 b	10.82 ± 0.01 c	11.06 ± 0.38c
	5	5.12 ± 0.60 a	4.93 ± 0.38 a	5.40 ± 0.12 a	5.52 ± 0.47 a
ΔE^*_{ab}	1		1.73 ± 0.06 a	2.88 ± 0.04 b	3.39 ± 0.13 c
	2		2.92 ± 0.48 a	2.29 ± 0.12 a	3.78 ± 1.06 a
	3		3.06 ± 0.17 a	3.69 ± 0.37 b	3.87 ± 0.24 b
	4		1.29 ± 0.08 a	1.38 ± 0.02 a	1.59 ± 0.27 a
	5		1.01 ± 0.14 a	0.54 ± 0.09 a	0.71 ± 0.14 a
ΔL^*	1		-0.46 ± 0.11 a	-0.91 ± 0.29 ab	-0.95 ± 0.10 b
	2		-2.64 ± 0.23 a	-1.16 ± 0.02 a	-2.27 ± 0.82 a
	3		-0.89 ± 0.01 a	-1.97 ± 0.20 b	-2.14 ± 0.13 b
	4		-0.03 ± 0.20 a	-0.77 ± 0.21 b	-1.03 ± 0.40 b
	5		+0.23 ± 0.28 a	-0.29 ± 0.10 a	-0.20 ± 0.40 a
ΔC^*_{ab}	1		+0.41 ± 0.21 a	+0.95 ± 0.15 b	+0.94 ± 0.14 b
	2		+0.47 ± 0.20 a	+1.03 ± 0.19 a	+2.77 ± 1.17 b
	3		+2.59 ± 0.18 a	+2.95 ± 0.27 a	+2.98 ± 0.15 a
	4		+0.91 ± 0.19 a	+1.09 ± 0.01 a	+1.17 ± 0.16 a
	5		+0.02 ± 0.06 a	+0.05 ± 0.01 a	+0.44 ± 0.24 b
Δh_{ab}	1		-1.74 ± 0.07 a	-2.74 ± 0.20 b	-3.35 ± 0.15 c
	2		-1.30 ± 0.75 a	-1.93 ± 0.07 a	-1.99 ± 0.53 a
	3		-2.91 ± 0.08 a	-2.12 ± 0.29 b	-2.61 ± 0.35 ab
	4		-6.65 ± 0.65 a	-2.75 ± 0.84 b	-2.20 ± 0.17 b
	5		-17.28 ± 2.30 a	-5.56 ± 0.92 b	-6.41 ± 3.07 b

the same color area nearer the coordinates origin, reflecting that the effect of the copigmentation was less relevant, being almost imperceptible at pH 5.0. At this pH range, all of the anthocyanin solutions became more and more achromatic (a^* and b^* tended toward zero) and clearer (L^* increases) and had a lower color intensity, which means a progressive loss of color.

Figure 2 shows the change in the magnitude of copigmentation for the copigmented solutions evaluated by Tristimulus Colorimetry as the ratio $((E_C - E_0)/E_0) \times 100$. The results showed that copigmentation occurred over the entire pH range we have studied for all of the phenolics used as copigments. However, the magnitude of the copigmentation and its colorimetric effect was strongly pH-dependent and influenced by the nature of the copigment used. The greatest magnitude of copigmentation was obtained at pH 3.0, being significantly higher with epicatechin and caffeic acid. They both increased respectively the total color of Mv 3-gl by 13.7 and 13.8%, whereas catechin, which was the less effective copigment, reached an increase of only 9.3%. This agrees with other studies that have shown that among the different

flavan-3-ol copigments, the more planar molecules such as (-)-epicatechin or with electron-donor substituents such as cinnamic acids can better stack with anthocyanins, resulting in higher copigmentation effect.^{11,29-31} The slightly lower values of the copigmentation magnitude obtained in this study with respect to those reported in the literature could be due to both the lower pigment/copigment molar ratio used and the chemical nature of the tested copigments. It has been established that the differences in the number, size, or spatial location of the substituents make monomeric flavan-3-ols, such as catechin, epicatechin, or simple phenolic acids, exhibit weaker copigmentation than more planar phenolic compounds such as flavonols.³²

As shown in Table 1, the CIELAB differences (ΔE^*_{ab} , ΔL^* , ΔC^*_{ab} , Δh_{ab}) between Mv 3-gl solutions with and without copigments were also calculated. Along the pH variation, the highest color differences (ΔE^*_{ab}) were produced from pH 1.0 to 3.0, confirming the colorimetric stabilization of the flavylium ion by copigmentation at lower rather than higher pH values. Specifically, the highest color differences were reached at pH 3.0, being 3.1, 3.7, and from 3.4 units in MC, ME, and MF

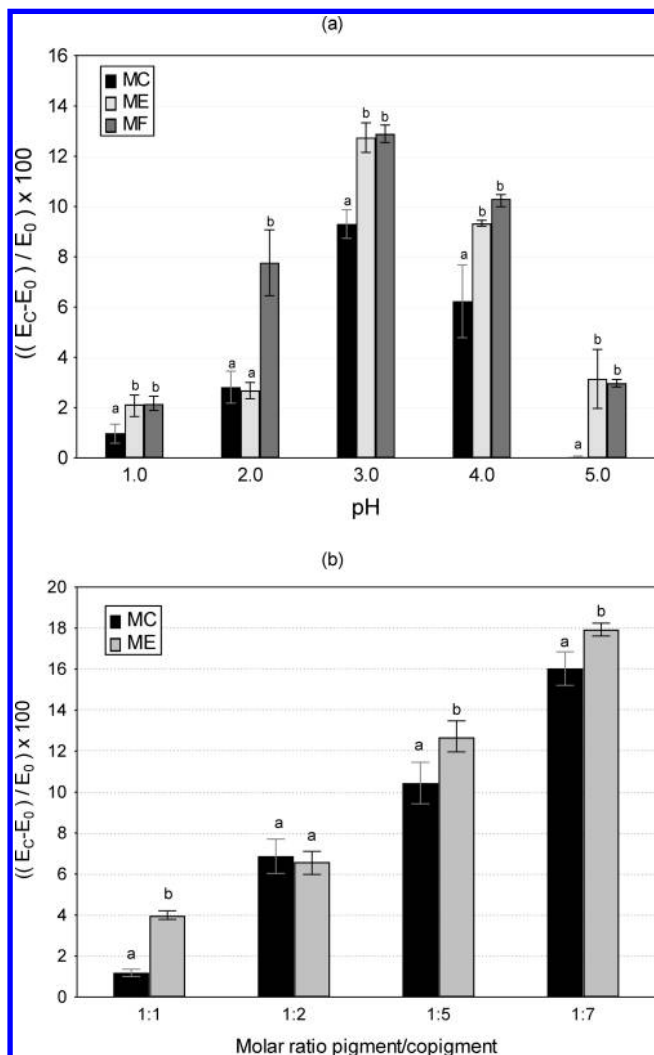


Figure 2. Changes in the magnitude of copigmentation for the Mv 3-gl solutions copigmented with catechin, epicatechin, and caffeic acid (MC, ME, and MF) (a) as a function of the pH and (b) as a function of the molar ratio, evaluated by Tristimulus Colorimetry as the ratio $((E_C - E_0)/E_0) \times 100$.

solutions, respectively. Therefore, although flavan-3-ols have been usually considered to be poorer anthocyanin copigments, at most acidic pH values, the color changes induced were always perceptible to the human eye.³³ However, at pH values >3.0 units, there was no significant difference between the color effect induced by the flavanols tested, all of the color differences being <2 units, that is, not visually distinguished. At higher pH values it could be expected a more marked effect of copigmentation due to the higher proportion of colorless anthocyanin. However, this is not always the case since each copigment has a particular optimum conditions and effectiveness of copigmentation which is determined by several factors (stereochemistry, pK value, etc.), as reported by Mazza et al.⁹

In general, caffeic acid produced the largest color effects, which was coherent with the results obtained about the magnitude of copigmentation when it was assessed by Tristimulus Colorimetry. On the contrary, as can be checked in Table 1, at some pH values, whereas color changes were detected in the CIELAB color space, no changes at A_{520nm} were observed. This divergence between the two analytical methods has been previously reported by González-Manzano¹⁴ and

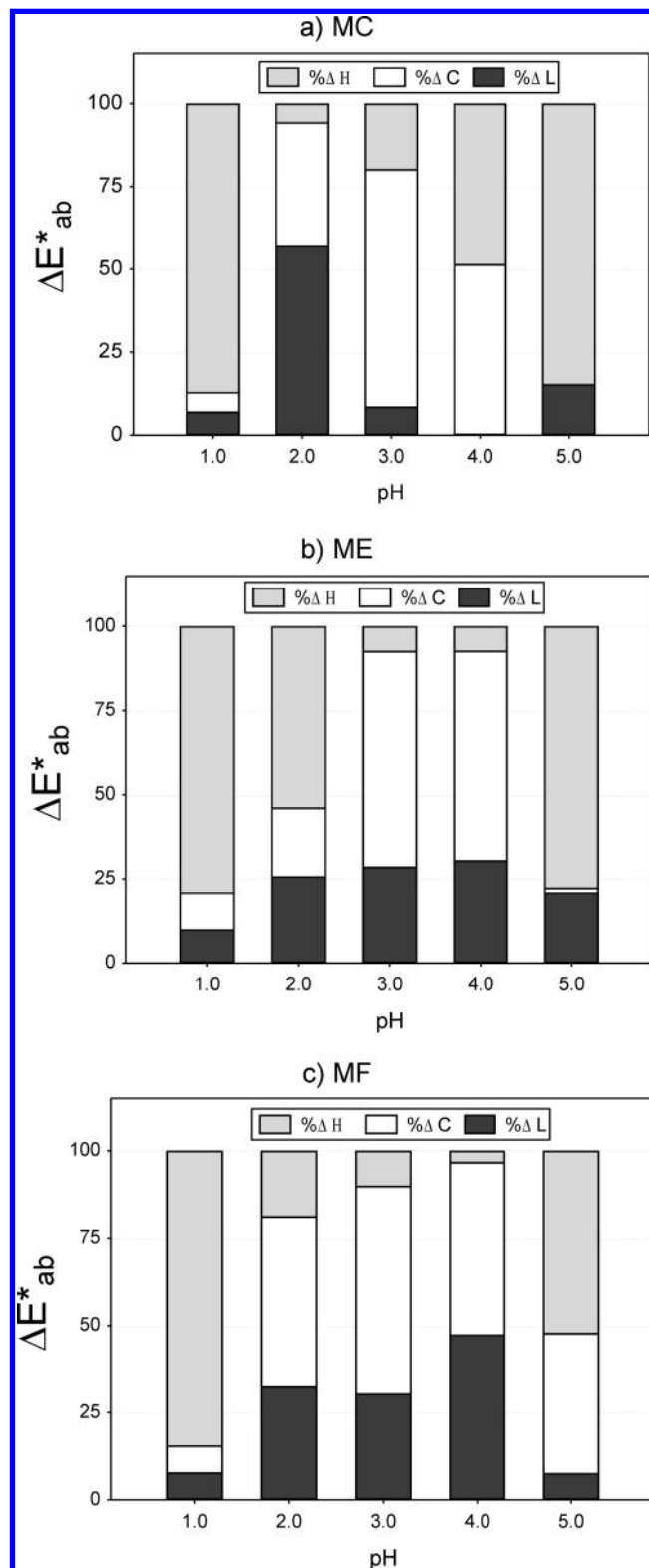


Figure 3. Relative contribution of lightness (%ΔL), chroma (%ΔC), and hue (%ΔH) to the total color difference for each pigment/copigment as a function of the pH value.

confirms that the most simplified methods not always can achieve a reliable evaluation of the copigmentation process.

For a more comprehensive analysis of the colorimetric implication of copigmentation process as a function of the pH, the relative contributions of lightness (%ΔL), chroma (%ΔC),

Table 2. Mean Values of the $A_{520\text{nm}}$ and the Total Color (E) Obtained for the Pure Anthocyanic Solution and Its Respective Copigmented Solution at Each Molar Ratio (Mv 3-gl: 200 mg/L, pH 3.6); as well as the CIELAB Differences (ΔE^*_{ab} , ΔL^* , ΔC^*_{ab} , Δh_{ab}) between Mv 3-gl Solutions with and without Copigments

colorimetric parameter	molar ratio					
	0	1	2	5	7	
MC	$A_{520\text{nm}}$	0.66 ± 0.001 a	0.68 ± 0.001 a	0.77 ± 0.008 b	0.77 ± 0.008 b	0.84 ± 0.004 c
	E	49.26 ± 0.45 a	49.84 ± 0.12 a	52.64 ± 0.58 b	54.40 ± 0.50 b	57.32 ± 0.90 c
	ΔE^*_{ab}		1.01 ± 0.33 a	4.89 ± 0.37 b	6.36 ± 0.19 b	9.76 ± 1.27 c
	ΔL^*		-0.16 ± 0.54 a	-4.51 ± 0.33 b	-3.95 ± 0.66 b	-8.56 ± 0.99 c
	ΔC^*_{ab}		+0.60 ± 0.26 a	+0.65 ± 1.06 a	+3.40 ± 1.17 a	+2.59 ± 3.60 a
	Δh_{ab}		-1.21 ± 0.60 a	-2.56 ± 0.99 a	-5.05 ± 0.13 b	-5.12 ± 0.13 b
ME	$A_{520\text{nm}}$	0.67 ± 0.004 a	0.72 ± 0.01 b	0.76 ± 0.004 c	0.78 ± 0.008 d	0.82 ± 0.002 e
	E	49.26 ± 0.001 a	51.21 ± 0.10 b	52.51 ± 0.28 c	55.50 ± 0.38 d	57.90 ± 0.36 e
	ΔE^*_{ab}		2.27 ± 0.20 a	4.53 ± 0.91 b	6.65 ± 0.33 c	10.69 ± 0.44 d
	ΔL^*		-1.77 ± 0.23 a	-3.99 ± 1.12 b	-4.16 ± 0.37 b	-5.53 ± 0.24 b
	ΔC^*_{ab}		+1.08 ± 0.30 a	+0.90 ± 0.95 a	+4.67 ± 0.34 b	+6.64 ± 0.63 c
	Δh_{ab}		-1.02 ± 0.54 a	-2.39 ± 0.83 ab	-3.11 ± 0.47 b	-3.38 ± 0.50 b

and hue ($\% \Delta H$) to the total color difference for each pigment/copigment solution were also calculated. As can be seen in Figure 3, the main contribution to the measured color differences ΔE^*_{ab} at pH 1.0 was qualitative, which was evidenced by the significantly higher contribution of hue $\% \Delta H$ (80–88%) with respect to lightness $\% \Delta L$ or chroma $\% \Delta C$ (7–10 and 6–10%, respectively). These results are coherent because at pH < 2, the anthocyanin exists primarily in the form of the red cation flavylium and the amount of the other colorless species is almost nonexistent. Therefore, at these pH values, the copigmented complexes do not provide important displacement of the anthocyanin equilibrium toward the red-colored flavylium cation, which is also reflected by the lower variations obtained for E and ΔE^*_{ab} . However, an interesting observation is that between pH 1.0 and 2.0, for which the distribution between anthocyanin forms should be very similar, the colorimetric changes induced by copigmentation were different. At pH 2.0, quantitative color changes ($\% \Delta C$ and $\% \Delta L$) became more pronounced, especially for MC and MF copigmented solutions. As reported by some authors, at a given copigment-to-pigment molar ratio and a given pH, the color will be characteristic, not only of malvin but also of the type of associated copigment.^{8,22} In this way, an infinite variety of colors may be produced by only one anthocyanin associated with various copigments. In this context, another interesting observation is that these different colorimetric changes could be revealed by Tristimulus Colorimetry instead of other simplified methods, confirming that it is a useful and objective technique for assessing the integral copigmentation effect on color.

On the other hand, between pH 2.0 and 4.0, the main colorimetric contribution was quantitative, the chroma modifications $\% \Delta C$ being particularly more marked than lightness $\% \Delta L$ (35–65 and 22–38%, respectively). In this pH range, the proportion of the other colorless species increases, coexisting with the red-colored flavylium cation in solution, so copigmentation complexes can provide at the same time color stabilization and variation, which coincides with the greatest changes in the E and ΔE^*_{ab} values. At pH 5.0, the most abundant colored species present is the quinoidal form, and thus Mv 3-gl itself does not confer much color to a solution; so again, the contribution of the copigmentation to color is mainly qualitative, that is, significantly due to hue changes.

Moreover, the relative contributions of lightness, chroma, and hue permitted us to compare the colorimetric effect induced by the different flavanols tested. In general terms, epicatechin and caffeic acid produced similar effects on the total color of the Mv 3-gl across the pH changes, their contributions being more marked with quantitative changes than qualitative ones ($\% \Delta L + \% \Delta C = 55\text{--}63\%$ and $\% \Delta H = 45\text{--}37\%$). On the contrary, particularly at the higher pH values, the qualitative contribution was more important in catechin copigmented solutions.

Effect of the Molar Ratio on Copigmentation. The influence of the pigment/copigment molar ratio was also assayed at pH 3.60. For this purpose, two copigmented solutions of Mv 3-gl/catechin (MC) and Mv 3-gl/epicatechin (ME) were prepared in the same wine-like medium at molar ratios 1:1, 1:2, 1:5, and 1:7.

For both assays, the positive effect of the copigmentation on the Mv 3-gl total color was increased with increasing copigment concentration (Table 2), which is in agreement with previous studies reported in the bibliography despite the range of the pigment/copigment molar ratios used being lower.³⁴ The maximum displacement of hydration/dehydration equilibrium toward the colored species was achieved using the highest molar ratio (1:7) because it caused the greatest total color increases.

Moreover, significant differences in L^* , a^* , and b^* values among the pure Mv 3-gl solution and its corresponding copigmented solution were found, especially at molar ratios higher than 1:2, resulting in a different location of the samples in the (a^*b^*) colorimetric diagram (Figure 4). In the absence of any copigments, the original anthocyanin color took positive a^* and b^* values and appeared located near 0° , that is, in a well-defined reddish color area ($L^* = 69.71$, $a^* = 38.84$, and $b^* = 0.39$ CIELAB). However, with the increasing addition of the flavanol copigments, the samples appeared located progressively farther from the coordinates origin and experienced a remarkable evolution from the first toward the fourth quadrant, that is, from the reddish to the purple or red-bluish color region. The behavior of the color parameters as a function of the concentration was similar for both copigments used. At the highest molar ratio (1:7), copigmented samples reached the lowest L^* and b^* values but the highest a^* values, and, thus, they exhibited the darkest and most vivid bluish color.

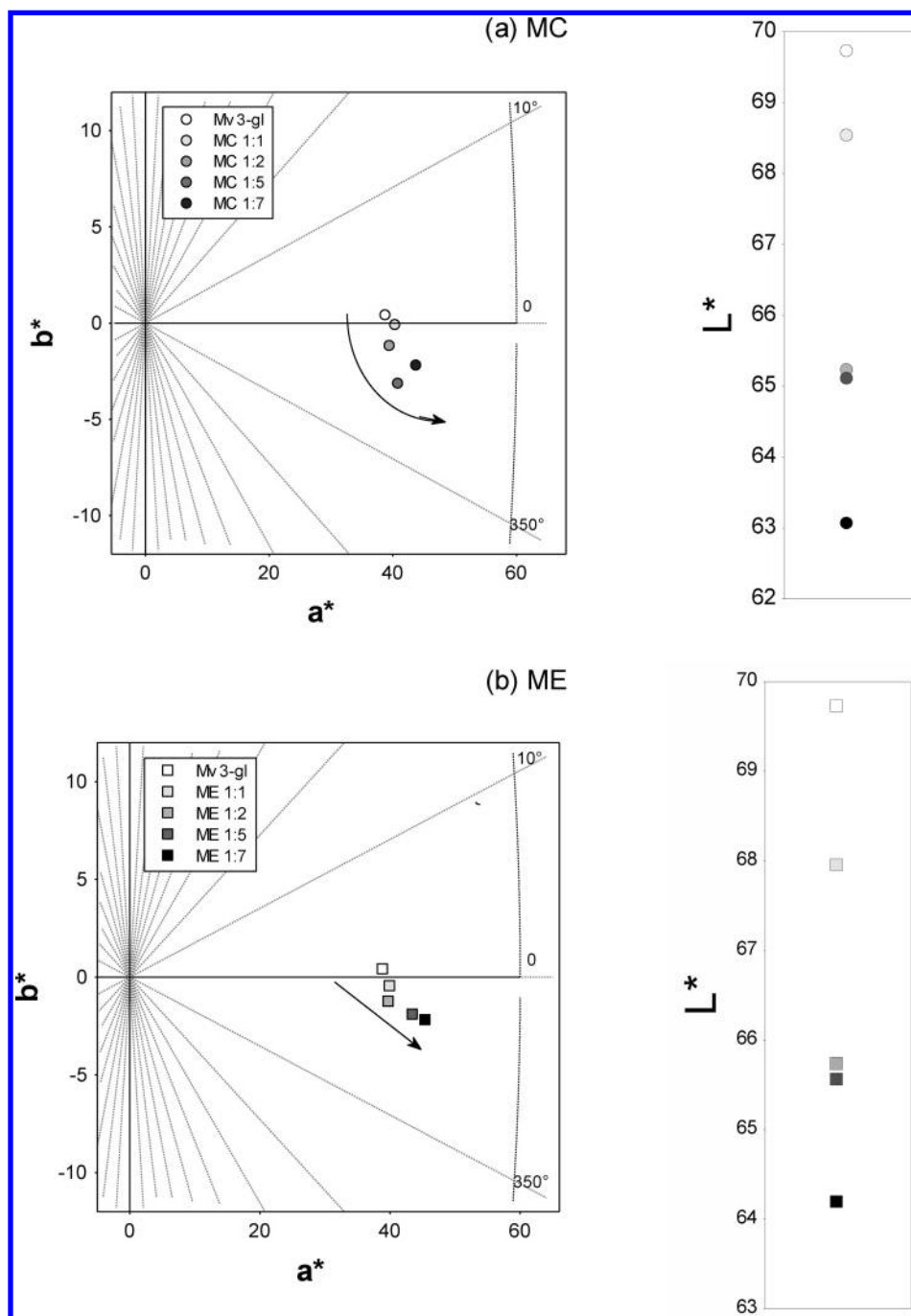


Figure 4. Change in the location of the pure Mv 3-gl and copigmented solutions (MC, ME) within (a) the (a^*b^*) diagram and (b) lightness values (L^*) as a function of the molar ratio.

With regard to the changes in the contribution of the copigmentation to the total anthocyanin color, the added copigments caused significant concentration-dependent increases in the magnitude of the effect, as can be seen in Figure 2. From 1:1 to 1:7 molar ratios, catechin induced an increase of the Mv 3-gl total color from 1.2 to 16.0%, whereas with epicatechin, the increase was from 3.9 to 17.9%. Notwithstanding, although the pattern evolution was similar between both flavanol pigments, once again, the ability of the epicatechin to act as Mv-3gl copigment was stronger than that of catechin because significantly higher values for copigmentation were achieved for most of the molar ratios tested.

As noted in the previous section of this study, the dependence between the amplitude of the color effect induced by copigmentation was evaluated by means of the CIELAB color differences (ΔE^*_{ab}) (Table 2). As expected, the progressive formation of copigmentation complexes was confirmed by a successive increase in the color differences between anthocyanin and flavanol solutions when copigment concentrations were increasingly added. For all of the concentration levels tested, epicatechin caused always significant increases ($p < 0.05$) in the color differences. In contrast, higher increases in the molar ratio were necessary to induce significant changes with catechin copigmented solutions.

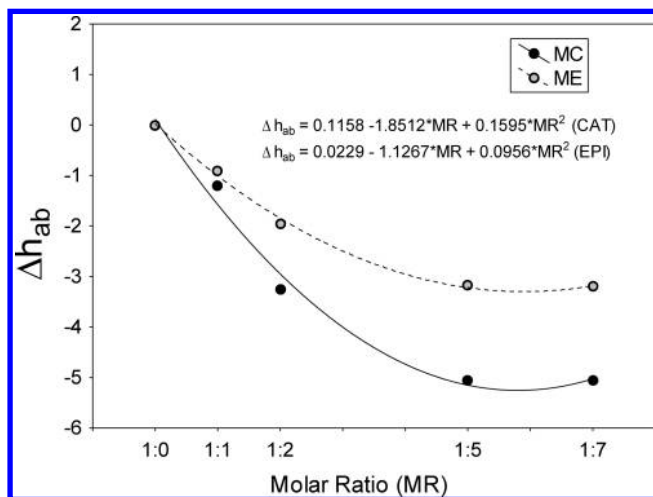


Figure 5. CIELAB hue differences (Δh_{ab}) as a function of molar ratio for Mv 3-gl/catechin (MC) and Mv 3-gl/epicatechin (ME) solutions.

In any case, calculation of the simple regression coefficients between total color differences and the copigment concen-

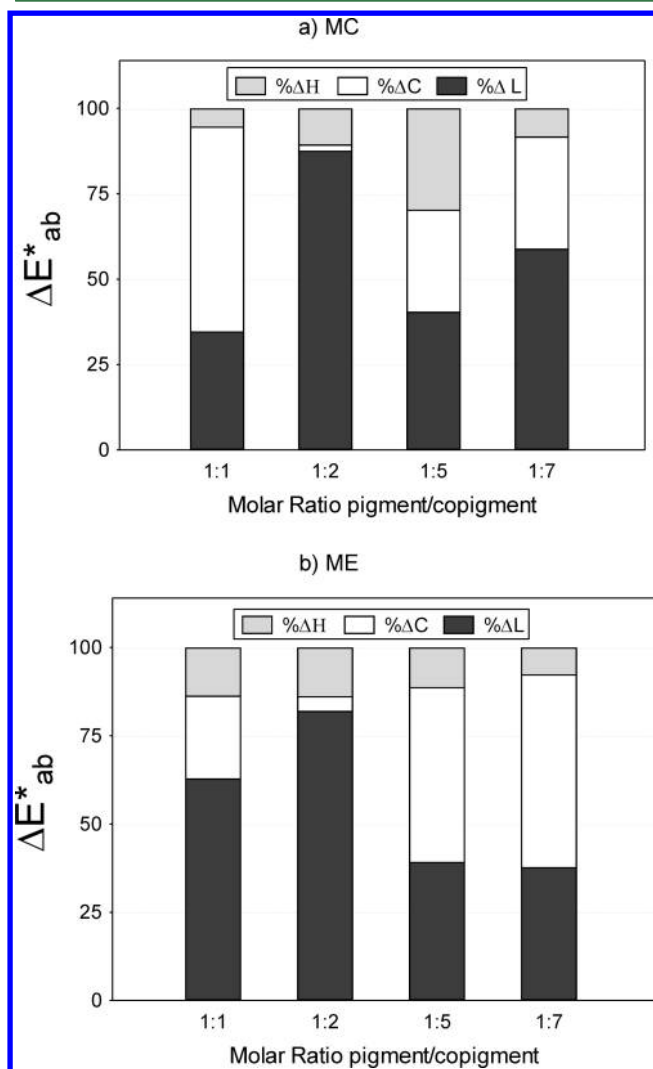


Figure 6. Relative contribution of lightness (% ΔL), chroma (% ΔC), and hue (% ΔH) to the total color difference for each pigment/copigment as a function of the molar ratio.

tration for each copigmented solution confirmed that the relationship was significantly high with regard to the copigment used (r^* values ranged from 0.95 to 0.98 units, $p < 0.05$). The lowest color differences were found between pure Mv 3-gl solution and the copigmented ones at the lowest molar ratio used (1:1), taking values of 1.0 and 2.3 units with catechin and epicatechin, respectively. However, the color differences obtained at all molar ratios higher than 1:1 were >3 units and, hence, visually relevant. The largest color changes were induced with the highest copigment concentration (molar ratio 1:7), being slightly more marked with epicatechin (10.79 vs 9.76 units, in MC solutions). This was consistent with the higher values also obtained regarding the total color (E) and the magnitude of copigmentation, although the difference was not significant.

In relation to the quantitative and qualitative color changes that the original Mv 3-gl solution underwent with increasing molar ratio, the tendency was always toward higher decreases of ΔL^* and Δh_{ab} , which means an increasing bluish and darkening effect. Simultaneously, chroma differences ΔC^*_{ab} tended toward higher increases resulting in an increasing vivid effect, although this tendency was less marked than lightness and hue trends.

Univariate correlations between individual color attributes differences (ΔL^* , ΔC^*_{ab} , Δh_{ab}) and copigment concentration were explored to determine the significance of these changes. Across the different copigmented solutions, the best relationships were obtained with simple regression for quantitative attributes (ΔL^* , ΔC^*_{ab}) and with second-degree polynomial regression for the qualitative (Δh_{ab}). Calculation of the coefficient regressions revealed that all of the relationships were strong and significant ($p < 0.05$), except for those corresponding to ΔC^*_{ab} for MC solutions. Regression coefficients took negative signs for lightness and hue differences, ranging as mean values between 0.71 and 0.95 and between 0.93 and 0.99, respectively; these values were positive for chroma differences. Among the different CIELAB attributes, hue differences (Δh_{ab}) were the best correlated parameter because $>95\%$ of cases showed high quadratic regression coefficients ($R^2 = 0.99$), proving the relevance of this physicochemical phenomenon in the qualitative changes of anthocyanin color. A schematic representation of the hue differences (Δh_{ab}) evolution as a function of molar ratio is shown in Figure 5.

Again, the higher precision and accuracy of the colorimetric method to better evaluate the global color changes associated with copigmentation were manifested by comparing the A_{520nm} , E , and ΔE^*_{ab} values. As can be observed in Table 2, no effect of copigmentation was detected when the molar ratio was increased from 1:2 to 1:5 in MC solution, because no changes on the A_{520nm} were obtained. However, the increase in the catechin concentration resulted in increases of the total color and of the total color difference.

Finally, by comparing the relative contributions of lightness (% ΔL), chroma (% ΔC), and hue (% ΔH) obtained at each molar ratio (Figure 6), it was observed that for all of the molar ratios tested, the absolute color differences induced by copigmentation were due mainly to quantitative changes (% ΔL + % ΔC = 87.5%, as mean values) and to a lesser extent to the qualitative ones (% ΔH = 12.5%), the weight of the lightness modifications being, in general, more marked than in chroma. However, increasing concentration for both copigments influenced especially the pattern evolution of the

lightness contribution, which notably decreased from low to high molar ratios (% ΔL = 67 vs 44%, respectively).

In contrast, chroma and hue contributions were in general more variable and did not show a clear tendency. Interestingly, at a given molar ratio value, both chroma and hue changes were influenced in different ways by the type of copigment. For example, at a molar ratio of 1:5, both copigments induced similar absolute color differences (Table 2), but catechin induced higher changes in hue and epicatechin in chroma (% ΔH = 30 vs 11% and % ΔC = 30 vs 50%, respectively).

As a summary, the colorimetric interpretation of copigmentation based on the CIELAB color space has demonstrated to be of practical interest because both quantitative and qualitative color changes can be better understood. It has been demonstrated that pH, copigment structure, and concentration have significant influences on the copigmentation process, which induced different absolute and relative color changes in anthocyanin solutions. The greatest magnitude of copigmentation and color effect was obtained at pH 3.0, being significantly higher with epicatechin and caffeic acid. At high acidic pH values (1.0) the main contribution to color differences was qualitative, whereas between pH 2.0 and 4.0, the main colorimetric contribution was quantitative, the chroma modifications % ΔC being particularly more marked than lightness % ΔL . At pH 3.60, the greatest color effects were induced by epicatechin at a molar ratio of 1:7. Increasing molar ratio produced always an increasing bluish, vivid, and darkening effect on anthocyanin solutions, affecting especially the lightness contribution % ΔL . On the other hand, epicatechin and caffeic acid produced similar effects on the total color of the Mv 3-gl, contributing more marked quantitatively changes than qualitative changes. In contrast, particularly at the higher pH values, the qualitative contribution was more important in catechin copigmented solutions.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +34 954556495. Fax: +34 954557017. E-mail: heredia@us.es.

Funding

We are indebted to the Ministry of Science and Innovation of Spain (Project AGL2008-05569-C02-02 and Fellowship BES-2009-025429) and the Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía (Project P07-AGR-02893) for financial support.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

(1) Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A. R.; Paredes-López, O.; Francis, F. J. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, *40*, 173–289.

(2) Brouillard, R. Chemical structure of anthocyanidins. In *Anthocyanins as Food Colors*; Markakis, P., Ed.; Academic Press: New York, 1982; pp 1–40.

(3) Cavalcanti, R. N.; Santos, D. T.; Meireles, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems – an overview. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 499–509.

(4) Hutchings, J. B. *Food Colour and Appearance*; Blackie Academic and Professional: Glasgow, Scotland, 1994.

(5) Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 67–87.

(6) Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M.; Páez-Hernández, M.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chem.* **2009**, *113*, 859–871.

(7) Montes, C.; Campos, J.; Pons, A.; Heredia, F. J. Instrumental factors influencing absorption measurements for fluid food color determination. *J. AOAC Int.* **2004**, *87*, 632–638.

(8) Brouillard, R.; Wigand, M. C.; Dangles, O.; Cheminat, A. pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *J. Chem. Soc., Perkins Trans. 2* **1991**, *8*, 1235–1241.

(9) Davies, A. J.; Mazza, G. Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 716–720.

(10) Baranac, J. M.; Petranovic, N. A.; Dimitric-Markovic, J. M. Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 2. Malvin and the nonglycosidized flavone quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1694–1697.

(11) Eiro, M. J.; Heinonen, M. Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7461–7466.

(12) Talcott, S. T.; Brenes, C. H.; Pires, D. M.; Del Pozo-Insfran, D. Phytochemical stability and color retention of copigmented and processed muscadine grape juice. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 957–963.

(13) Gris, E.; Ferreira, E.; Falcao, L.; Bordignon-Luiz, M. Influence of ferulic acid on stability of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grapes in a model system and a yogurt system. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2007**, *42*, 992–998.

(14) González-Manzano, S.; Dueñas, M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buelga, C. Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chem.* **2009**, *114*, 649–656.

(15) Lambert, S. G.; Asenstorfer, R. E.; Williamson, N. M.; Iland, P. G.; Jones, G. P. Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chem.* **2011**, *125*, 106–115.

(16) Hermosin-Gutiérrez, I. Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4079–4083.

(17) Hermosin-Gutiérrez, I.; Lorenzo, E. S.-P.; Espinosa, A. V. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chem.* **2005**, *92*, 269–283.

(18) Darias-Martín, J.; Carrillo-López, M.; Echavarrri-Granado, J. F.; Díaz-Romero, C. The magnitude of copigmentation in the colour of aged red wines made in the Canary Islands. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224*, 643–648.

(19) Guadalupe, Z.; Ayestarán, B. Effect of commercial mannoprotein addition on polysaccharide, polyphenolic, and color composition in red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9022–9029.

(20) Gordillo, B.; López-Infante, M. I.; Ramírez-Pérez, P.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J. Influence of prefermentative cold maceration on the color and anthocyanic copigmentation of organic Tempranillo wines elaborated in a warm climate. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6797–6803.

(21) Gonnet, J. F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited – 1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chem.* **1998**, *63*, 409–415.

(22) Asen, S.; Stewart, R. N.; Norris, K. H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1139–1144.

(23) Dangles, O.; Brouillard, R. A spectroscopic method based on the anthocyanin copigmentation interaction and applied to the quantitative study of molecular complexes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1992**, 247–257.

- (24) Heredia, F. J.; Francia-Aricha, E. M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Vicario, I. M.; Santos-Buelga, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect. *Food Chem.* **1998**, *63*, 491–498.
- (25) Heredia, F. J.; Álvarez, C.; González-Miret, M. L.; Ramírez, A. Cromalab, análisis de color. Registro General de la Propiedad Intelectual, 2004.
- (26) CIE. *Technical Report Colorimetry*; Commission Internationale de l'Éclairage Central Bureau: Vienna, Austria, 2004.
- (27) Melgosa, M.; Hita, E.; Poza, A. J.; Alman, D. H.; Berns, R. S. Suprathreshold color-difference ellipsoids for surface colors. *Col. Res. Appl.* **1997**, *22*, 148–155.
- (28) StatSoft Inc. *STATISTICA* (data analysis software system), v 8; StatSoft Inc.: Tulsa, OK, 2007.
- (29) Darias-Martín, J.; Martín-Luis, B.; Carrillo-López, M.; Lamuela-Raventós, R.; Díaz-Romero, C.; Boulton, R. Effect of caffeic acid on the color of red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2062–2067.
- (30) Gómez-Míguez, M.; Gonzalez-Manzano, S.; González-Miret, M. L.; Escribano-Bailón, M. T.; Heredia, F. J.; Santos-Buelga, C. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5422–5429.
- (31) Cruz, L.; Brás, N. F.; Teixeira, N.; Mateus, N.; Ramos, M. J.; Dangles, O.; De Freitas, V. Vinylcatechin dimers are much better copigments for anthocyanins than catechin dimer procyanidin B3. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3159–3166.
- (32) Kunsági-Maté, S.; Szabó, K.; Nikfardjam, M. P.; Kollar, L. Determination of the thermodynamic parameters of the complex formation between malvidin-3-O-glucoside and polyphenols. Copigmentation effect in red wines. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2006**, *69*, 113–119.
- (33) Martínez, J. A.; Melgosa, M.; Pérez, M. M.; Hita, E.; Negueruela, A. I. Note. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Sci. Technol. Int.* **2001**, *7*, 439–444.
- (34) Berké, B.; De Freitas, V. A colorimetric study of oenin copigmented by procyanidins. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 260–265.

Conclusiones generales



CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones más importantes que se deducen de los resultados obtenidos son las siguientes:

PRIMERA. Determinados factores agronómicos, como la variedad o el grado de madurez de la uva, o enológicos como la técnica de vinificación empleada o el tiempo de crianza en barrica, determinan importantes diferencias en la composición fenólica y las características de color de vinos tintos monovarietales elaborados en clima cálido.

SEGUNDA. La Colorimetría Triestímulo representa una técnica útil para la medida objetiva del color del vino durante la vinificación y permite definir etapas clave en la evolución de éste (extracción y la estabilización), así como poner de manifiesto que las modificaciones cuantitativas y cualitativas inducidas por ambos procesos varían en función de factores agronómicos o tecnológicos.

TERCERA. La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS) junto con la Colorimetría Triestímulo representan técnicas analíticas relevantes para el control de calidad en el campo de la enología. Su precisión analítica ha demostrado ser útil para el estudio colorimétrico y estructural de compuesto fenólicos y, en particular, ha permitido evaluar la capacidad de envejecimiento de vinos Syrah elaborados en clima cálido.

CUARTA. El estudio de las relaciones color-composición conduce a ecuaciones que permiten predecir el color final de los vinos a partir de su composición antociánica; y además, ha puesto de manifiesto que tanto los pigmentos antociánicos (monoglucósidos, derivados acetilados y *p*-cumaroilados) como otros compuesto fenólicos que actúan como copigmentos (flavonoles o el ácido cumárico) son parámetros de calidad que permiten claramente diferenciar distintos tipos de vinos.

QUINTA. Con respecto a la influencia de la variedad y el grado de madurez de la uva en vinos tintos elaborados en la D.O. "Condado de Huelva", puede concluirse que se ha conseguido el mejor potencial fenólico, magnitud de copigmentación y la mayor calidad cromática a partir de las variedades Syrah y Cabernet Sauvignon, así como particularmente en los vinos Syrah elaborados con uvas más maduras.

SEXTA. Con respecto a la técnicas de vinificación ensayadas, se ha confirmado que la maceración prefermentativa en frío representa una procedimiento enológico útil para la elaboración de vinos tintos ecológicos Tempranillo en clima cálido, ya que conduce a una mejor estructura química, un desarrollo de la copigmentación más adecuado y consecuentemente, una mayor calidad y estabilidad cromática que cuando se aplica la vinificación tradicional.

SÉPTIMA. La maceración prefermentativa en frío representa una técnica de vinificación útil y eficiente para la extracción de pigmentos y copigmentos de la uva Syrah en clima cálido, siendo más efectiva la extracción y la estabilidad química y cromática del vino si las bajas temperaturas se aplican mediante la refrigeración previa de la uva en cámara frigorífica que mediante la adición de nieve carbónica.

OCTAVA. Los vinos tintos Syrah elaborados mediante maceración prefermentativa se muestran aptos para ser sometidos a procesos de crianza en barrica. A priori, periodos de envejecimiento entre 6 y 9 meses dan lugar a vinos con una mejor estructura química, más oscuros y con mayor intensidad de color.

NOVENA. La aplicación de la Colorimetría Triestímulo, particularmente del espacio de color CIELAB, constituye una herramienta metodológica útil para la evaluación integral del efecto colorimétrico de la copigmentación, permitiendo evaluar las variaciones del color tanto cuantitativas como cualitativas. Se ha demostrado que las modificaciones del color inducidas son variables en función de factores como el pH, la estructura del copigmento, la ratio molar pigmento/copigmento o, en el caso del vino, de la variedad y el grado de maduración de la uva.

GENERAL CONCLUSIONS

The following main conclusions are drawn from the studies carried out:

FIRST. It was confirmed that viticultural and oenological factors as grape variety, maturity grade of grapes, vinification technique or ageing time determine important differences on the phenolic composition and colour characteristics of red wines elaborated in warm climate.

SECOND. Tristimulus Colorimetry has shown to be a suitable technique to objectively measure the colour of wine, which allowed defining crucial periods on the colour evolution during vinification (extraction and stabilization) and establishing that the quantitative and qualitative colour changes induced for both process are variable according to agronomical factors or oenological practices.

THIRD. High resolution liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) combined with Tristimulus Colorimetry represent relevant analytical techniques for quality control in oenology field. Its analytical precision has demonstrated to be useful for the structural and colorimetric evaluation of phenolic compounds and, in particular, for assessing the ageing aptitude of Syrah wine in a typical warm climate region.

FOURTH. Regarding the colour-composition relationships, it has been highlighted the importance of the anthocyanin pigments such as monoglucosides or acetylated and *p*-coumaric derivatives, as well as co-pigments such as flavonols for clearly classify different wines. Also, it has been demonstrated that it is possible to have good predictions of the wine colour from the anthocyanin composition data.

FIVETH. As far as the variety and the ripeness grade of grape, it could be concluded that phenolic potential, the magnitude of copigmentation and the chromatic characteristics of red wines elaborated in the D.O. "Condado de Huelva" is improved using Syrah and Cabernet Sauvignon grapes and, particularly in Syrah wines, using more matured grapes.

SIXTH. Respecting to the vinification technique assessed, it was confirmed that the prefermentative cold maceration is a useful oenological procedure to elaborate red wines in warm climates since it improves both phenolic composition and quality and stability colour of Tempranillo wines, causing greater effectiveness of copigmentation than Traditional vinification.

SEVENTH. Regarding the cooling technique used for reaching the low temperatures needed for the prefermentative cold maceration process, the refrigeration of the grapes in cold-storage room before crushing leads to Syrah wines with better chemical and chromatic characteristics than those obtained by using dry ice.

EIGHTH. The ageing time significantly influences the chemical composition and colorimetric characteristics of Syrah wines from "Condado de Huelva D.O." during the first year of ageing. Based on the evolution of its detailed pigment composition and colour behaviour it could be concluded that Syrah wines showed better ageing aptitude when were submitted to intermediate ageing times (between 6 and 9 months).

NINETH. The colorimetric interpretation of copigmentation based on the CIELAB colour space has demonstrated to be of practical interest because both quantitative and qualitative colour changes can be better understood. It has been demonstrated that different factors as pH, structure and concentration copigment or the variety and the ripeness grade of grapes have significant influences on the copigmentation process, inducing different colour changes in anthocyanin solutions and wines.

Referencias



REFERENCIAS

- Alcalde-Eón, C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C. & Rivas-Gonzalo, J.C. (2006a). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. *Anal. Chim. Acta*, **563**, 238-254.
- Alcalde-Eón, C.; Boido, E.; Carrau, F.; Dellacassa, E. & Rivas-Gonzalo, J.C. (2006b). Pigment profiles in monovarietal wines produced in Uruguay. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 449-459.
- Alcalde-Eon C.; Escribano-Bailon M.T.; Santos-Buelga C.; & Rivas- Gonzalo J.C. (2007) Identification of dimeric anthocyanins and new oligomeric pigments in red wine by means of HPLC-DAESI/ MSn. *J. Mass Spectrom.* **42**, 735-748.
- Albanese, D.; Attanasio, G.; Cinquanta, L. & Di Matteo, M. (2012). Volatile Compounds in RedWines Processed on an Industrial Scale by Short Pre-fermentative Cold Maceration. *Food Bioprocess Technol*-In press.
- Álvarez, I.; Aleixandre, J.L.; García, M.J., Lizama, V. & Aleixandre-Tudó, J.L. (2009). Effect of the prefermentative addition of copigments on the polyphenolic composition of Tempranillo wines after malolactic fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* , **228**, 501-510.
- Amerine, M.A. & Ough, C.S. (1980). *Methods for analysis of musts and wines*. Ed. John Willey and Sons, Inc. Nueva York. EUA
- Ancín-Azpilicueta, C.; González-Marco, A. & Jiménez-Moreno, N. (2010). Comparative study of the amine concentration in wines obtained from the traditional fermentation and from a more anaerobic fermentation method. *LWT - Food Sci. Tech.* **43**, 771-776.
- AOAC. *Official methods of analysis* (1990). Association of Official Analytical Chemists, (15th Ed.), Arling, Virginia, USA.
- Arozarena, I.; Casp, A., Marín, R. & Navarro, M. (2000). Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition *Eur. Food Res. Technol.* **212**, 108-112.
- Asen, S.; Stewart, R.N. & Norris, K.H. (1972). Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry.* **11**, 1139-1144.
- Asenstorfer R.E.; Hayasaka Y. & Jones G.P. (2001). Isolation and structures of oligomeric wine pigments by bisulfite-mediated ionexchange chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5957-5963.
- Asenstorfer, R.E.; Markides, A.J.; Iland, P.G. & Jones, G.P. (2003). Formation of vitisin A during red wine fermentation and maturation. *Aus. J. Grape Wine Res.* **9**, 40-46.
- Auw, J.M.; Blanco, V.; O'Keefe, S.F. & Sims, C.A. (1996). Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin, and noble wines and juices. *Am. J. Enol. and Vitic.* **47**, 279-286.
- Ayala, F.; Echávarri, J.F. & Negueruela, A.I. (1999). A new simplified method for measuring the color of wines. III. All wines and brandies. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**, 359-363.
- Bakker, J.; Bridle, P.; Bellworthy, S.J.; Garcia-Viguera, C.; Reader, H.P. & Watkins, S.J. (1998). Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine. *J. Sci. Food Agric.* **78**, 297-307.

- Bakker, J.; Bridle, P.; Honda, T.; Kuwano, H.; Saito, N.; Terahara, N. & Timberlake, C.F. (1997). Identification of an anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry*. **44**, 1375-1382.
- Bakker, J.; Picinelli, A. & Bridle, P. (1993). Model wine solutions: colour and composition changes during aging. *Vitis*. **32**, 111-118.
- Baldi, A.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Vincieri, F.F. & Casetta, B. (1995). HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 2104-2109.
- Baranac, J. M.; Petranovic, N. A.; Dimitric-Markovic, J. M. (1996). Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1333-1336.
- Baranac, J. M.; Petranovic, N. A. & Dimitric-Markovic, J. M. (1997a). Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 2. Malvin and the nonglycosidized flavone quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1694-1697.
- Baranac, J.M.; Nadezda, J.M.; Petranovic, A. & Dimitric-Markovic, J.M. (1997b). Spectrophotometric Study of Anthocyan Copigmentation Reactions. 4. Malvin and Apigenin 7-Glucoside *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1701-1703.
- Bergqvist, J.; Dokoozlian, N. & Ebisuda, N. (2001). Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 1-7.
- Berké, B. & De Freitas, V. (2007). A colorimetric study of oenin copigmented by procyanidins. *J. Sci. Food Agric.* **87**, 260,265.
- Bernabéu, R.; Brugarolas, M.; Martínez-Carrasco, L. & Díaz, M. (2008). Wine origin and organic elaboration, differentiating strategies in traditional producing countries. *British Food J.* **110**, 174-188.
- Bindon, K.A.; Smith, P.A. & Kennedy, J.A. (2010). Interaction between Grape-Derived Proanthocyanidins and Cell Wall Material. 1. Effect on Proanthocyanidin Composition and Molecular Mass. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 2520–2528.
- Boss, P.K.; Davies, C. & Robinson, S.P. (1996). Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour. *Aus. J. Grape Wine Res.* **2**, 163-170.
- Boulet, J. C. & Moutounet, M. (2003). *La microoxigenación de los vinos. Enología, Fundamentos Científicos y Técnicos*; Flanzky; AMV Ediciones/Ed. Mundi- Prensa: Spain.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 67-87.
- Boulton, R. B. A method for the assessment of copigmentation in red wines. (1996). Presented at the 47th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture, Reno, NV, June.
- Boulton, R., Neri, R., Levensgood, J., & Vaadia, M. (1999). Copigmentation of anthocyanins in Cabernet Sauvignon and Merlot wines from the Napa valley of California. In A. Lonvaud-Funel (Ed.), Proceedings of the 6th symposium international d'enologie. Paris, France: Tec. & Doc.
- Bourzeix, M.; Weyland, D. & Heredia, N. (1986). Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull OIV*, 669670: 1171-1253.
- Brouillard, R y Dangles, O. Anthocyanins molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chem.* 1994, **51**, 365-371.

- Brouillard, R.. *Chemical structure of anthocyanins* en “ Anthocyanins as food color”. (1982). Ed. P. Markakis, Academic Press, New York.
- Brouillard, R.; Wigand, M. C.; Dangles, O. & Cheminat, A. (1991). pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *J. Chem. Soc. Perkins Trans.* **2**, 1235-1241.
- Budic-Leto, I.; Lovric, T.; Gajdos Kljusuric, J.; Pezo, I. & Vrhovsek, U. (2006). Anthocyanin composition of the red wine Babić affected by maceration treatment. *Eur. Food Res. Technol.* **222**, 397-402.
- Busse-Valverde, N.; Gomez-Plaza, E.; Lopez-Roca, J. M.; Gil- Muñoz, R.; Fernandez-Fernandez, J. I. & Bautista-Ortín, A. B. (2010). Effect of different enological practices on skin and seed proanthocyanidins in three varietal wines. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 11333-11339.
- Busse-Valverde, N.; Gomez-Plaza, E.; Lopez-Roca, J.M.; Gil-Muñoz, R. & Bautista-Ortín, A. (2011). The Extraction of Anthocyanins and Proanthocyanidins from Grapes to Wine during Fermentative Maceration Is Affected by the Enological Technique. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 5450-5455.
- Ciaccheri, L. & Mignani, A.G. (2008). Scattered colorimetry and multivariate data processing as an objective tool for liquid classification and mapping. *Curr. Anal. Chem.* **4**, 371-377.
- C.I.E. *C.I.E.Proceedings 1931, 1932*, Cambridge University Press, Cambridge
- Camps, J.O. and Ramos, M.C. (2011). Grape harvest and yield responses to inter-annual changes in temperature and precipitation in an area of north-east Spain with a Mediterranean climate. *Int. J. Biometeorol.* -Art in Press.
- Canals, R.; Llaudy, M.C.; Canals, J.M. & Zamora, F. (2008). Influence of the elimination and addition of seeds on the colour, phenolic composition and astringency of red wine. *Eur. Food Res. Technol.* **226**, 1183-1190.
- Cano-López, M.; Pardo-Minguez, F.; López-Roca, J.M. & Gómez-Plaza, E. (2006). Effect of microoxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 325-331.
- Cano-López, M.; López-Roca, J.M.; Pardo-Minguez, F., & Gómez Plaza, E. (2010). Oak barrel maturation vs. micro-oxygenation: Effect on the formation of anthocyanin-derived pigments and wine colour. *Food Chem.* **119**, 191-195.
- Carillo, M.; Formato, A.; Fabiani, A.; Scaglione, G. & Pucillo, G.P. (2011). An inertizing and cooling process for grapes cryomaceration. *Electron. J. Biotechnol.* **14**, 6.
- Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M.; Páez-Hernández, M.; Rodríguez, J.A. & Galán-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **113**, 859-871.
- Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E. & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol Profiles of *Vitis vinifera* Red Grapes and Their Single-Cultivar Wines. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 992-1002.
- Cavalcanti, R.N.; Santos, D.T. & Meireles, M.A.A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Res. Int.* **44**, 499-509.
- CEE. Métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino. Reglamento No. 2676/90. 1990
- Cejudo-Bastante, M.J.; Hermosín-Gutiérrez, I. & Pérez-Coello, M.S. (2011). Micro-oxygenation and oak chip treatments of red wines: Effects on colour-related phenolics, volatile

- composition and sensory characteristics. Part I: Petit Verdot wines. *Food Chem.* **124**, 727-737
- Chauvet, M. & Reyner, A. (1984). *Manual de viticultura*. Ed. Mundi-prensa, Madrid.
- Chinnici, F.; Sonni, F.; Natali, N.; Galassi, S. & Riponi, C. (2009). Colour features and pigment composition of Italian carbonic macerated red wines. *Food Chem.* **113**, 651-657.
- CIE (1986). *Colorimetry*. 2nd edn. Publication no. 15.2. Vienna: CIE.
- CIE Technical Report Colorimetry; Commission Internationale de l'Eclairage Central Bureau: Vienna, Austria, 2004.
- Douglas, B. (2002). *Colour in food. Improving quality*. Ed. by Douglas B. CRC PRESS. MacDougall.
- Couasnon, M.B. (1999). Une nouvelle technique: La macération préfermentaire à froid-extraction à la neige carbonique. Première partie: Résultats oenologiques. *Rev. Oenol.* **92**:26-30.
- Cruz, L.; Teixeira, N.; Silva, A.M.S.; Mateus, N.; Borges, J. & De Freitas, V. (2008). Role of vinylcatechin in the formation of pyranomalvidin-3-glucoside-(+)- catechin. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 10980-10987.
- Cruz, L.; Brás, N.F.; Teixeira, N.; Mateus, N.; Ramos, M.J.; Dangles, O. & De Freitas, V. (2010). Vinylcatechin dimers are much better copigments for anthocyanins than catechin dimer procyanidin B3. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3159-3166.
- Cuinier, C. Ceppi di lievito e composizione fenolica dei vini rossi. *Vignevini*, 1997, **7/8**, 39-42.
- Czochanska, Z.; Foo, L.Y.; Newman, R.H. & Porter, L.J. (1979). Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 2278-2286.
- Dallas, C.; Ricardo Da Silva, J.M. & Laureano, O. (1996a). Interactions of oligomeric procyanidins in model wine solutions containing malvidin-3-glucoside and acetaldehyde. *J. Sci. Food Agric.*, **70**, 493-500.
- Dallas, C.; Ricardo Da Silva, J.M.; Laureano, O. (1996b). Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2 and acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2402-2407.
- Dangles, O. & Brouillard, R. (1992). A spectroscopic method based on the anthocyanin copigmentation interaction and applied to the quantitative study of molecular complexes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**, 247-257.
- Dangles, O.; Stoeckel, C.; Wigand, M.C. & Brouillard, R. (1992). Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett.* **33**, 5227-5230.
- Darias-Martín, J.; Carrillo, M., Díaz, E.; Boulton, R.B. (2001). Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chem.* **73**, 217-220.
- Darias-Martín, J.; Martín-Luis, B.; Carrillo-López, M.; Lamuela-Raventós, R.; Díaz-Romero, C.; & Boulton, R. (2002). Effect of caffeic acid on the color of red wine. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2062-2067.
- Darías-Martín, J.; Carrillo-López, M.; Echavarri-Granado, J.F. & Díaz-Romero, C. (2007). The magnitude of copigmentation in the colour of aged red wines made in the Canary Islands. *Eur. Food Res. Technol.* **224**, 643-648.

- Datzberger, K.; Steiner, I.; Washüttl, J. & Kroyer, G. (1992). The influence of wine additives on colour and colour quality of young red wine. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. **194**, 524-526.
- Davies, A. J. & Mazza, G. (1993). Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *J. Agric. Food. Chem.* **41**, 716-720.
- De Freitas, V. & Mateus, N. (2010). *Updating Wine Pigments. Chapter 3 from "Recent Advances in Polyphenol Research"*. Ed. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- De Freitas, V. & Mateus, N. (2011). Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.*, **401**, 1467-1477.
- De Santis, D. & Frangipane, M.T. (2010). Effect of prefermentative cold maceration on the aroma and phenolic profiles of a Merlot red wine. *Ital. J. Food Sci.* **22**, 47-53.
- De Villiers, A.; Vanhoenacker, G.; Majek, P. & Sndra, P. (2004). Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. *J. Chromatogr. A.* **1054**, 195-204.
- Del Álamo Sanza, M.; Nevares, I. & García, S. (2004). Influence of different aging systems and oak woods on aged wine color and anthocyanin composition. *Eur Food Res Technol.* **219**, 124-132.
- Del Álamo Sanza, M. & Nevares (2006). Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods Anthocyanin composition *Anal. Chim. Acta.* **563**, 255-263.
- Del Alamo, M.; Nevares, I.; Gallego, L. & Merino, M.S. (2008). Aging markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Analytica Chim. Acta* **6**, 86-99.
- Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A.R.; Paredes-López, O. & Francis, F.J. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crc. Cr. Rev. Food Sci.* **40**, 173-289.
- Di Stefano, R.; Cravero, M.C. & Gentilini, N. (1989). Metodi per lo studio dei polifenoli. *Enotecnico*, **5**, 83-89.
- Downey, M. O.; Harvey, J.S. & Robinson, S. P. (2004). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Aust. J. Grape Wine Res.* **10**, 55-73.
- Dunn, G.M. (2005) *Factors that control flower formation in grapevines*. Ed. K. de Garis, C. Dundon, R. Johnston & S. Partridge. Transforming flowers to fruit. Mildura, Victoria: A. Soc. *Vitic. and Oenol.* 11-18.
- Eiro, M. J. & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7461-7466.
- Escribano-Bailón, T.; Dangles, O. & Brouillard, R. (1996). Coupling reactions between flavylum ions and catechin. *Phytochemistry.* **41**, 1583-1592.
- Escribano-Bailón, T.; Álvarez-García, M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Heredia, F.J. & Santos-Buelga, C. (2001). Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin 3-O-Glucoside and (+)-catechin. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1213-1217.
- Escudero-Gilete, M.L.; Meléndez-Martínez, A.J.; Heredia, F.J. & Vicario, I.M. (2009). Optimization of olive-fruit paste production using a methodological proposal based on a sensory and objective color analysis. *Grasas y Aceites.* **60**, 396-404.

- Escudero-Gilete, M.L.; González-Miret, M.L. & Heredia, F.J. (2010). Implications of blending wines on the relationships between the colour and the anthocyanic composition. *Food Res. Int.* **43**, 745-752.
- Fanzone, M.; Zamora, F.; Jofré, V.; Assof, M.; Gómez-Cordovés, C. & Peña-Neira, A. (2012). Phenolic characterisation of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). *J Sci Food Agric.* **92**, 704-718.
- Fernández de Simon, B.; Hernández, T.; Cadahía, E.; Dueñas, M. & Estrella, I. (2003). Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 150-156.
- Fernández-Vázquez, R.; Stinco, C.M.; Escudero-Gilete, M.L.; Meléndez-Martínez, A.J.; Heredia, F.J.; Vicario, I.M. (2010). Preliminary study on the utility of colour to classify orange juices attending to its processing. *Opt. Pura Apl.* **43**, 245-249.
- Flamini, R. 2003. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spect. Rev.* **22**, 218-250.
- Folin, O. & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* **73**, 627-650.
- Folin, O. & Denis, W. (1912). On phosphotungstic-phosphomolibdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**, 239-243.
- Francia-Aricha E.M.; Guerra, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C. & Santos-Buelga, C. (1997). New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *J Agric Food Chem.* **45**, 2262-2266.
- Fulcrand, H.; Cameira dos Santos, P.; Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V. & Favre-Bonvin, J. (1996). Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 735-739.
- Galbreath, J. (2011). To What Extent is Business Responding to Climate Change? Evidence from a Global Wine Producer. *J Bus Ethics.* **104**, 421-432
- Gambutì, A.; Capuano, R.; Lisanti, M.T.; Strollo, D. & Moio, L. (2010). Effect of ageing in new oak, one-year-used oak, chestnut barrels and bottle on color, phenolics and gustative profile of three monovarietal red wines. *Eur. Food Res. Technol.* **231**, 455-465.
- García Romero, E.; Sanchez Munoz, G.; Martín Alvarez, P.J. & Cabezero Ibanez, M.D. (1993). Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **655**, 111-117.
- García, J. *Técnicas analíticas para vinos*. (1990). Ed. Moiá-Olérdola, España.
- García-Beneytez, E.; Revilla, E. & Cabello, F. (2002). Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *Eur. Food Res. Tech.* **215**, 32-37.
- García-Marino, M.; Hernández-Hierro, J.M.; Rivas-Gonzalo, J.C. & Escribano-Bailón, M.T. (2010). Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Anal. Chim. Acta.* **660**, 134-142.
- García-Puente Rivas, E.; Alcalde-Eon, C.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. & Escribano-Bailón, M.T. (2006). Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. *Anal. Chim. Acta*, 2006, **563**, 215-222.
- Garde-Cerdán, T. & Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Crc Cr Food Sci. Technol.* **17**, 438-447.

- Gay, J. & Hirschler, R. (2001). Determination of industrial colour tolerance limits, case studies in the textile industry Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, 4421, 646-649
- Gil-Muñoz, R.; Moreno-Pérez, A.; Fernández-Fernández, J.I.; Martínez-Cutillas, A. & Gómez-Plaza, E. (2009). Influence of low temperature prefermentative techniques on chromatic and phenolic characteristics of Syrah and Cabernet Sauvignon wines. *Eur. Food Res. Technol.* **228**, 777-788.
- Girard, B.; Yuksel, D.; Cliff, M.A.; Delaquis P. & Reynolds A.G. (2001). Vinification effects on the sensory, colour, and GC profiles of Pinot noir wines from British Colombia. *Food Res. Int.* **34**, 483-499.
- Girard, B.; Kopp, T.G.; Reynolds, A.G & Cliff M. (1997). Influence of vinification treatments on aroma constituents and sensory descriptors of Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**, 198-206.
- Giusti, M. M. & Wrolstad, R. E. (2001). Anthocyanins. Characterization and measurement with Uvvisible spectroscopy. In R.E. Wrolstad Ed. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: Wiley.
- Giusti, M.M. & Wrolstad, R.E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem. Eng. J.* **14**, 217-225.
- Gómez-Cordovés, M.L; González-SanJosé, B.; Junquera, B. & Estrella., I. (1995). Correlation Between Flavonoids and Color in Red Wines Aged in Wood. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**, 295-298.
- Gómez-Míguez, M. & Heredia, F.J. (2004). Effect Of The Maceration Technique on the Relationships Between Anthocyanin Composition And Objective Color Of Syrah Wines J. *Agr. Food Chem.* **52**, 5117-5123.
- Gómez-Míguez, M.; González-Manzano, S.; Escribano-Bailón, M.T.; Heredia, F.J. & Santos-Buelga, C. (2006). Influence of different phenolic copigments on the color of Malvidin 3-glucoside. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 5422-5429.
- Gómez-Míguez, M.; González-Miret, M.L.; & Heredia, F.J. (2007a). Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *J. Food Eng.* **79**, 271-278.
- Gómez-Míguez, M.J.; González-Miret, M.L.; Hernanz, D.; Fernández, M.A.; Vicario, I.M., & Heredia, F.J. (2007b). Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *J Food Eng.* **78**, 238-245.
- Gómez-Míguez, M.J.; Gómez-Míguez, M.; Vicario, I.M. & Heredia, F.J. (2007c). Assessment of colour and aroma in white wines vinifications: Effects of grape maturity and soil type. *J. Food Eng.* **79**, 758-764.
- Gómez-Plaza, E.; Gil-Munóz, R.; López-Roca, J.M.; & Martínez, A. (2000). Color and Phenolic Compounds of a Young Red Wine. Influence Of Wine-Making Techniques, Storage Temperature, and Length of Storage Time. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 736-741.
- Gómez-Plaza, E.; Gil-Muñoz, R.; López-Roca, J.M.; Martínez-Cutillas, A. & Fernández-Fernández, J.I. (2001). Phenolic compounds and color stability of red wines: Effect of skin maceration time. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 266-270.
- Gómez-Plaza, E.; Miñano, A. & López-Roca, J.M. (2006). Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chem.* **97**, 87-94.

- Gómez-Plaza, E. & Cano-López, M. (2011). A review on micro-oxygenation of red wines: Claims, benefits and the underlying chemistry. *Food Chem.* **125**, 1131-1140.
- Gonnet, J.F. (1999). Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited – 1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chem.* **63**, 409–415.
- Gonnet, J.F. (2001). Colour effects of co-pigmentation of anthocyanin revisited - 3. A further description using CIELAB differences and assessment of matched colours using the CMC model. *Food Chem.* **75**, 473-485 13.
- González-Manzano, S.; Rivas-Gonzalo, J.C. & Santos-Buelga, C. (2004). Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta*, **513**, 283-289.
- González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J.C. & Escribano-Bailón, T. (2008). Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins European *Food Res. Technol.* **226**, 483-490.
- González-Manzano, S.; Dueñas, M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. & Santos-Buelga, C. (2009). Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chem.* **114**, 649-656.
- González-Miret, M.L.; Terrab, A.; Hernanz, D.; Recamales, M.A.F.; Heredia, F.J. (2005). Multivariate Correlation between Color and Mineral Composition of Honeys and by their Botanical Origin. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 2574-2580.
- González-Miret, M.L.; Ayala, F.; Terrab, A.; Echávarri, J.F.; Negueruela, A.I. & Heredia, F.J. (2007a). Simplified method for calculating color of honey by application of the characteristic vector method. *Food Res. Int.* **40**, 1080-1086.
- González-Miret, M.L.; Ji, W.; Luo, R.; Hutchings, J. & Heredia, F.J. (2007b). Measuring Colour Appearance of Red Wines. *Food Qual. Pref.* **18**, 862-871.
- González-Neves, G.; Gil, G.; Barreiro, L.; Ferrer, M. & Franco, J. (2006). Composición fenólica de las uvas de las principales variedades tintas de vitis vinifera cultivadas en Uruguay. *Agrociencia*, **2**, 1 -14.
- González-Neves, G.; Franco, J.; Barreiro, L.; Gil, G.; Moutounet, M. & Carbonneau, A. (2007). Varietal differentiation of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and wines according to their anthocyanic composition. *Eur. Food Res. Technol.* **225**, 111-117.
- González-Neves, G.; Gil, G.; Barreiro, L. & Favre, G. (2010). Pigment profile of red wines cv. Tannat made with alternative winemaking techniques. *J. Food Comp. Anal.* **23**, 447-454.
- González-San José, M.L. (2005). Transferencia de color de la uva al vino. *ACE Revista de Enología*, **61**.
- González-San José, M.L.; Santa-María, G. & Díez, C. (1990). Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region and winemaking methods. *J. Food Comp. Anal.* **3**, 54-66.
- Gordillo, B.; Ciaccheri, L.; Mignani, A.G.; Gonzalez-Miret, M.L. & Heredia, F.J. (2011). Influence of turbidity grade on color and appearance of virgin olive oil. *JAOCs.* **88**, 1317-1327.
- Goto, T. & Kondo, T. (1991). Structure and molecular stacking of anthocyanins flower colour variation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **30**, 17-33.
- Goumy, D.; Couason, M. & Seze, O. (1996). Carboxyque Française, France. French-Patent-Application, FR 2 731 228 A1.

- Gris, E.; Ferreira, E.; Falcao, L. & Bordignon-Luiz, M. (2007). Influence of ferulic acid on stability of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grapes in a model system and a yogurt system. *Int. J. Food Sci. Technol.* **42**, 992-998.
- Guadalupe, Z.; Palacios, A. & Ayestarán, B. (2007). Maceration Enzymes and Mannoproteins: A Possible Strategy to Increase Colloidal Stability and Color Extraction in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4854-4862.
- Guadalupe, Z. & Ayestarán, B. (2008). Effect of commercial mannoprotein addition on polysaccharide, polyphenolic, and color composition in red wines. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 9022-9029.
- Guild, J. (1931). The colorimetric properties of the spectrum. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, A230, 149-187.
- Habekost, M. (2007). Color difference equations and the human eye. Proceedings of the Technical Association of the Graphic Arts, TAGA , 291-310.
- Harbertson, J. F.; Kennedy, J. A. & Adams, D. O. (2002). Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot Noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* **53**, 54-59.
- Harbertson, J. F.; Picciotto, E.A. & Adams, D.O. (2003). Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wine using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching. *Am. J. Enol. Vitic.* **54**, 301-306.
- Hayasaka, Y. & Asenstorfer R.E. (2002). Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* **50**, 756-761.
- He, J.; Santos-Buelga, C.; Silva, A. M. S.; Mateus, N. & De Freitas, V. (2006). Isolation and structural characterization of new anthocyanin-derived yellow pigments in aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9598-9603.
- Heatherbell, D.; Dicey, M.; Goldsworthy, S. & Vanhanen. L. (1996). Effect of cold maceration on the composition, color, and flavor of Pinot noir wine. In Proceedings of the Fourth International Symposium on Cool Climate Enology and Viticulture. Ed. T. Henick-Kling et al., New York State Agricultural Experiment Station, Geneva.
- Heredia, F. J.; Álvarez, C.; González-Miret, M. L. & Ramírez, A. (2004). "CromaLab®, análisis de color", Registro General de la Propiedad Intelectual SE-1052-04: Sevilla, Spain.
- Heredia, F.J. & Chozas, M.G. (1992). Proposal of a novel formula to calculate dominant wavelength for colour of red wines. *Food Chem.* **43**, 125-128.
- Heredia, F.J. & Guzman Chozas, M. (1991). Reliability of the Spanish official method for colour of red wines in comparison with the CIE 1931-(x, y) method. *Food Chem.* **39**, 167-174.
- Heredia, F.J. & Guzmán, M. Parámetros cromáticos de vinos de la Denominación de Origen "La Mancha" y relación con su composición y características. *Alimentaria* 1988, **196**, 89-92.
- Heredia, F.J., Troncoso, A.M. & Guzmán-Chozas, M. (1997). Multivariate characterization of aging status in red wines based on chromatic parameters. *Food Chem.* **60**, 103-108.
- Heredia, F.J.; Francia-Aricha, E.M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Vicario, I. M. & Santos-Buelga, C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes - I. pH effect. *Food Chem.* **63**, 491-498.
- Heredia, F.J.; Vicario, I.M.; González-Miret, M.L.; Escudero, M.L.; A.J. Meléndez, A.J.; Hernanz, D. (2008). Patente: "Procedimiento de mejora para la extracción de compuestos volátiles y

- cromáticos de la uva". Nº de publicación: 2 302 455. (WO/2008/074904: Procedure of improvement for extraction of volatile and chromatic compounds from grapes)
- Heredia, F.J.; González-Miret, M.L.; Escudero-Gilete, M.L.; Gordillo, B.; Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Hernanz, D. (2008). Production of Syrah wines in warm climates by using cold temperatures to improve the extraction of colour. *International Syrah Symposium*, 4, 111- 117.
- Hermosín Gutiérrez, I. (2003). Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4079-4083.
- Hermosín Gutierrez, I.; Sánchez-Palomo, E. & Vicario, A. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel an Syrah. *Food Chem.* **92**, 269-283.
- Hernández, B.; Sáenz, C.; De la Hoz, J.F.; Alberdi, C.; Alfonso, S. & Diñeiro, J.M. (2009). Assessing the color of red wine like a taster's eye. *Color Res. App.* 34, 153-162.
- Hernández-Jiménez, A.; Gómez-Plaza, E.; Martínez-Cutillas, A. & Kennedy, J.A. (2009). Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell × Syrah grapes. *J Agric. Food Chem.* **57**, 10798-10803.
- Hernanz, D.; Recamales, A.F.; González-Miret, M.L.; Gómez-Míguez, M.J.; Vicario, I.M. & Heredia, F.J. (2007). Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale. *J. Food Eng.* **80**, 327-335.
- Hernanz, D.; Recamales, M.A.F.; Meléndez-Martínez, A.J.; González-Miret, M.L. & Heredia, F.J. (2008). Multivariate Statistical Analysis of the Relationships Color-Anthocyanins in Different Soilless-Grown Strawberry Genotypes. *J. Agr. Food Chem.* **56**, 2735-2741.
- Hernanz, D.; Gallo, V.; Recamales, M.A.F.; Meléndez-Martínez, A.J.; González-Miret, M.L. & Heredia, F.J. (2009). Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard. *Food Chem.* **113**, 530-537.
- Ho, P.; Silva, M.D. & Hogg, T.A. (2001). Changes in colour and phenolic composition during the early stages of maturation of port in wood, stainless steel and glass. *J. Sci. Food Agric.* **81**, 1269-1280.
- Holland, T. & Barry Smit, B. (2010). Climate Change and the Wine Industry: Current Research Themes and New Directions. *J Wine Res.* **21**, 125-136.
- Huang, Z.; Wang, B.; Williams, P.; and Pace, R.D. (2009). Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS LWT - *Food Sci. Tech.*, **42**, 819-824.
- Hussain, M.; Cholette, S. & Castaldi, R.M. (2008). An Analysis of Globalization Forces in the
- Hutchings J.B. (1999). *Food colour and appearance*, 2nd Ed. Aspen Publishers, Gaithersburg
- Hutchings, J. (2002). The perception and sensory assessment of colour. Part I Perceiving and measuring colour. In *Colour in food. Improving quality*. CRC Press LLC.
- Iland, P. & Gago, P. (2002) *Australia Wines. Styles and Tastes*. Campbelltown, South Australia: Patrick Iland Wine Promotions.
- Johnson, D.E. (2000). *Métodos multivariados aplicados al análisis de dados*. International Thomson Editores, Madrid.
- Jones, G.V. & Hellman, E. (2003), *Site Assessment: in "Oregon Viticulture"*. Ed. Hellman, E., 5th Edition, Oregon State University Press, Corvallis, Oregon, 44-50.
- Jones, G.V; White, M.A.; Cooper, O.R. & Storchmann, K. (2005). Climate change and global wine quality. *Clim. Change.* **73**, 319-343.

- Jones, G.V. & Webb, L.B. (2010). Climate Change, Viticulture, and Wine: Challenges and Opportunities. *J Wine Res.* **21**, 103-106.
- Kennedy, J.A. & Waterhouse. A.L. (2000). Analysis of pigmented high-molecular-mass grape phenolics using ion- pair, normal-phase high-performance liquid chromatography . *J Chromatogr. A.* **866**, 25-34.
- Kountoudakis, N.; Canals, R.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J.M. & Zamora, F. (2009). Maceración prefermentativa en frío. Aspectos tecnológicos en la elaboración de vinos de crianza. *ACE, revista de enología.*
- Kontoudakis, N.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J.M. & Zamora, F. (2011). Use of unripe grapes harvested during cluster thinning as a method for reducing alcohol content and pH of wine. *A. J. Grape Wine Res.* **17**, 230-238.
- Kontoudakis, N.; González, E.; Gil, M.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J. & Zamora, f. (2011b). Influence of Wine pH on Changes in Color and Polyphenol Composition Induced by Micro-oxygenation. *Food Chem.* **59**, 1974-1984
- Kovac, V.; Alonso, E. & Revilla, E. (1995). The Effect of Adding Supplementary Quantities of Seeds During Fermentation on the Phenolic Composition of Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 363-367
- Kovac, V.; Alonso, E.; Bourzeix, M. & Revilla, E. (1992). Effect of Several Enological Practices on the Content of Catechins and Proanthocyanidins of Red Wines. *J. Agric Food Chem.* **40**, 1953-1957.
- Koyama, K.; Goto-Yamamoto, N. & Hashizume, K. (2007). Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 958-965.
- Koźmiński, P. & Brett, A.M.O. (2006). Reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection of anthocyanins. *Analytical Lett.* **39**, 2687-2697.
- Kramling, T.E. & Singleton, V.L. (1969). An estimate of the non-flavonoid phenols in wines. *Am. J. Enol. Viticult.* **20**, 86-92.
- Kudo, M. & Sodeyama. M. (2002). Weight distribution of red wine polyphenols affected by length of maceration. *Am. J. Enol. Vitic.* **53**, 332 A.
- Lambert, S.G.; Asenstorfer, R.E.; Williamson, N. M.; Iland, P.G. & Jones, G.P. (2011). Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chem.* **125**, 106-115.
- Lamikanra, O. & Garlick, D. (1987). Effects of Grape Skins and Seeds on the Composition and Quality of Muscadine Wines. *Food Chem.* **26**, 245-251.
- Lamuela-Raventos, R.M. & Waterhouse, A.L. (1994). A direct HPLC separation of wine phenolics. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**, 41-46.
- Larrauri, J.A.; Sánchez-Moreno, C.; Rupérez, P. & Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity in the aging of selected red spanish wines. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1603-1606.
- Liu, H.; Chen, Y.; Hao, Y.; Zheng, N. & Jia, A. (2012). The evaluation of lightness and chroma difference for images according to color difference formulae. *Appl. Mech. Mater.* **130**, 3036-3040

- Liu, L.; Cozzolino, D.; Cynkar, W. U.; Gishen, M. & Colby, C. B. (2006). Geographic classification of Spanish and Australian Tempranillo red wines by visible and near-infrared spectroscopy combined with multivariate analysis. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6754-6759.
- Llaudy, M.D.C.; Canals, R.; González-Manzano, S.; Canals, J.M.; Santos-Buelga, C. & Zamora, F. (2006). Influence of micro-oxygenation treatment before oak aging on phenolic compounds composition, astringency, and color of red wine. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4246-4252.
- López, M.I.; Sánchez, M.T.; Díaz, A.; Ramírez, P. & Morales, J. (2007). Influence of a deficit irrigation regime during ripening on berry composition in grapevines (*Vitis vinifera* L.) grown in semi-arid areas. *Int. J. Food Sci. Nut.* **58**, 491-507.
- Luo, M.R.; Cui, G. & Rigg, B. (2001). The Development of the CIE 2000 Colour-Differences Formula: CIEDE2000. *Colour Res. Appl.* **26**, 340-350.
- Luo, M.R. (2002), Development of colour-difference formulae. *Rev. Progr. Coloration Related Topics.* **32**, 28-39
- Malheiro, A.C.; Santos, J.A.; Fraga, H. & Pinto, J.G. (2010). Climate change scenarios applied to viticultural zoning in Europe. *Clim. Res.* **43**: 163-177.
- Manfra, M.; De Nisco, M.; Bolognese, A.; Nuzzo, V.; Sofo, A.; Scopa, A., Santi, L., & Novellino, E. (2011). Anthocyanin composition and extractability in berry skin and wine of *Vitis vinifera* L. cv. Aglianico. *J. Sci. Food Agric.* **91**, 2749-2755.
- Marquette, B. (1999). La madurez fenólica. Seminario Internacional de Microbiología y Polifenoles del Vino. Universidad de Chile, Santiago.
- Martín, Q. (2001). *Curso de tratamiento de datos con SPSS*. Ed. Hespérides, Salamanca.
- Martínez, J. A.; Melgosa, M.; Pérez, M. M.; Hita, E. & Negueruela, A. I. (2001). Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Sci. and Technol. Int.* **7**, 439-444.
- Mateus, N.; Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. & De Freitas, V. (2002a). Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines. *Food Chem.* **76**, 335-342.
- Mateus, N.; Silva, A.M.S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. & De Freitas, V. (2002b). Identification of Anthocyanin-Flavanol Pigments in Red Wines by NMR and Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2110-2116.
- Mateus N.; Carvalho E.; Carvalho A.R.; ,Melo A.; Gonzalez-Paramas A.M.; Santos-Buelga C.; Silva A.M. & De Freitas, V. (2003) Isolation and structural characterization of new acylated anthocyanin-vinyl-flavanol pigments occurring in aging red wines. *J Agric Food Chem* **51**, 277-282.
- Mateus, N.; Oliveira, J.; Santos-Buelga, C.; Silva, A.M.S.; De Freitas, V. (2004) NMR structure characterization of a new vinylpyranoanthocyanincatechin pigment (a portisin). *Tetrahedron Lett* **45**, 3455-3457.
- Mattivi, F.; Guzzon, R.; Vrhovsek, U.; Stefanini, M. & Velasco, R. (2006). Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7692-7702.
- Mazza, G. & Brouillard, R. (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry.* **29**, 1097-1102.
- Mazza, G. (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* **35**, 341-371.

- Mazza, G.; Fukumoto, L.; Delaquis, P.; Girar, B. & Ewert, B.. (1999). Anthocyanins, Phenolics, and Color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4009 -4017.
- Mazzaracchio, P.; Pifferi, P.; Kindt, M.; Munyaneza, A. & Barbiroli, G. (2004). Interactions between anthocyanins and organic food molecules in model systems. *Int. J. Food Sci. Technol.* **39**, 53-59.
- McDonald, M. S.; Hughes, M.; Burns, J.; Lean, M. E. J.; Matthews, D. & Crozier, A. (1998). Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 368-375.
- Melgosa, M.; Gómez-Robledo, L.; Huertas, R., Capitán-Vallvey, L.F.; Moyano, M.J. & Heredia, F.J. (2009). Color measurements in blue-tinted cups for virgin-olive-oil tasting. *JAOCS*, **86**, 627-636
- Melgosa, M.; Hita, E.; Poza, A.J.; Alman, D.H. & Berns, R.S. (1997). Suprathreshold color-difference ellipsoids for surface colors. *Color Res. App.* **22**, 148-155.
- Melgosa, M.; Pérez, M.M.; Yebra, A., Huertas, R. & Hita, E. (2001). Algunas reflexiones y recientes recomendaciones internacionales sobre evaluación de diferencias de color. *Óptica pura y aplicada*, **34**, 1-10.
- Merken, H.M. & Beecher, G.R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 577-599.
- Mignani, A.G.; Smith, P.R.; Ciaccheri, L. & Cimato, A. (2003). Spectral nephelometry for making extravirgin olive oil fingerprints. *Sensors Actuat. B.* **90**, 157-162.
- Mignani, A.G.; Ciaccheri, L.; Cimato, A.; Attilio, C. & Smith, P.R. (2003). Spectral nephelometry for the geographic classification of Italian extra virgin olive oils. *Sensors Actuat. B.* **111**, 363-369.
- Mignani, A.G.; Ciaccheri, L.; Ottevaere, H.; Thienpont, H.; Conte, L.; Marega, M.; Cichelli, A. & Cimato, A. (2011a). Visible and near-infrared absorption spectroscopy by an integrating sphere and optical fibers for quantifying and discriminating the adulteration of extra virgin olive oil from Tuscany. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 1315-1324.
- Mignani, A.G.; Ciaccheri, L. & Mencaglia, A.A. (2011b). Optical spectroscopy for food and beverages control. Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering 8173.
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.* **43**, 1844-1855.
- Mirabel, M.; Saucier, C.; Guerra, C.; & Glories, Y. (1999). Copigmentation in model wine solutions: Occurrence and relation to wine aging. *Am. J. Enol. and Vitic.* **50**, 211-218.
- Monagas, M.; Núñez, V.; Bartolomé, B. & Gómez-Cordovés, C (2003). . Anthocyanin-derived pigments in Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon wines produced in Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* **54**, 163-169.
- Monagas, M.; Bartolomé, B. & Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Crc. Cr. Rev. Food Sci. and Nut.* **45**, 85-118.
- Moran, W. (2006) Crafting terroir: people in cool climates, soils, and markets. Sixth International Cool Climate Symposium for Viticulture and Oenology, Christchurch, New Zealand.

- Morata, A.; Gómez-Cordovés, M.C.; Colomo, B. & Suárez, J.A. (2003). Pyruvic Acid and Acetaldehyde Production by Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with Vitisin A and B Formation in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7402-7409.
- Morata, A.; Calderón, F.; González, M.C.; Gómez-Cordovés, M.C. & Suárez, J.A. (2007). Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. *Food Chem.* **100**, 1144-1152.
- Mori, K.; Suyaga, S. & Gemma, H. (2005). Decrease anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci. Hort.* **105**, 319-330.
- Mori, K.; Goto, Yamamoto, N.; Kitayama, M. & Hadhizume, K. (2007) Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature, *J. Exp. Bot.* **58**, 1935-1945.
- Nave, F.; Teixeira, N.; Mateus, N. & De Freitas, V. (2010). The fate of flavanol-anthocyanin adducts in wines: Study of their putative reaction patterns in the presence of acetaldehyde. *Food Chem.* **121**, 1129-1138.
- Nevarés, I., & Del Álamo, M. 2008 Measurement of dissolved oxygen during red wines tank aging with chips and micro-oxygenation. *Anal. Chim. Acta* **621**, 68-78.
- Nguyen, D.D.; Nicolau, L.; Dykes, S.I. & Kilmartin, P.A. (2010). Influence of microoxygenation on reductive sulfur off-odors and color development in a cabernet sauvignon wine American *J. Enol. Vitic.* **61**, 457-464.
- Norman, G.R. & Streiner, D.L. (1996). *Bioestadística*. Mosby/Doyma Libros S.A.; Times Mirror International Publishers, Madrid.
- Office Internationale de la vigne et du Vin. (1990). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins, 1990, París: OIV.
- Office Internationale de la vigne et du Vin. (2007). Situation et statistiques du secteur vitivinicole mondial, París: OIV.
- Oleari, C.; Melgosa, M. & Huertas, R. (2011). Generalization of color-difference formulas for any illuminant and any observer by assuming perfect color constancy in a color-vision model based on the OSA-UCS system *Journal of the Optical Society of America A. Opt. Im. Sci. Vis.* **28**, 2226-2234.
- Oliveira J.; Santos-Buelga C.; Silva A.M.S.; De Freitas V. & Mateus, N. (2006) Chromatic and structural features of blue anthocyanin-derived pigments present in port wine. *Anal Chim Acta* **563**, 2-9.
- Oliveira, J.; De Freitas, V.; Silva, A.M.S. & Mateus, N. (2007). Reaction between hydroxycinnamic acids and anthocyanin-pyruvic acid adducts yielding new portisins. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 6349-6356.
- Ortega-Heras, M.; Pérez-Magariño, S.; Cano-Mozo, E. & González-San José, M.L. (2010). Differences in the phenolic composition and sensory profile between red wines aged in oak barrels and wines aged with oak chips. *LWT. Food Sci. Technol.* **43**, 1533-1541.
- Parenti, A.; Spugnoli, P.; Calamai, L.; Ferrari, S. & Gori, C. (2004). Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *Eur. Food Res. Technol.* **218**:360-366.
- Parish, M.; Wollan, D. & Paul, R. (2000). Micro-oxygenations a review. Annual Technical issue. The Australian Grapegrower & Winemaker, 47-50.
- Pauling, L. (1940). *The Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals - An Introduction to Modern Structural Chemistry*, 2nd Edn. Oxford University Press, London.

- Pérez-Lamela, C.; García-Falcón, M.S.; Simal-Gándara, J. & Orriols-Fernández, I. (2007). Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chem.* **101**, 601-06.
- Pérez-Magariño, S. & González-San José, M.L.(2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chem.* **96**, 197-208.
- Pérez-Prieto, L.J., López-Roca, J.M., Martínez-Cutillas, A., Pardo Mínguez, F. & Gómez-Plaza, E. (2002). Maturing wines in oak barrels. Effects of origin, volume, and age of the barrel on the wine volatile composition. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3272-3276.
- Pérez-Prieto, L.J.; De La Hera-Orts, M.L.; López-Roca, J.M.; Fernández-Fernández, J.I. & Gómez-Plaza, E. (2003). Oak-matured wines: Influence of the characteristics of the barrel on wine colour and sensory characteristics. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 1445-1450.
- Peri, C. & Pompei, C. (1971). An assay of different phenolic fractions in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **22**, 55-58.
- Pointer, M.R. & Attridge, G.G. (1997). Some aspects of the visual scaling of large colour differences. *Color Res. App.* **22**, 298-307.
- Porter, L.J.; Hirstich, L.N. & Chang, B.G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry.* **25**:223- 230.
- Programa de Vinos de Calidad-Memoria (2005). Consejería de Agricultura y Pesca.Junta de Andalucía.
- Quijada-Morín, N.; Dangles, O.; Rivas-Gonzalo, J.C. & Escribano-Bailón, M.T. (2010). Physico-chemical and chromatic characterization of malvidin 3-glucoside-vinylcatechol and malvidin 3-glucoside-vinylguaicol wine pigments. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9744-9752.
- Ramos, M.C. & Martínez-Casasnovas, J.A. (2010). Soil water balance in rainfed vineyards of the Penedès region (Northeastern Spain) affected by rainfall characteristics and land levelling: influence on grape yield. *Plant. Soil.* **333**, 375-389.
- Ramos, M.C.; Jones, G.V. & Martínez-Casasnovas, J.A. (2008) Structure and trends in climate parameters affecting winegrape production in northeast Spain. *Clim. Res.* **38**: 1-15.
- Ramos, R.; Andrade, P.B.; Seabra, R.M.; Pereira, C.; Ferreira, M.A. & Faia, M.A. (1999). A preliminary study of non-coloured phenolics in wines of varietal white grapes (Códega, Gouveio and Malvasia Fina: effects of grape variety, grape maturation and technology of winemaking. *Food Chem.* **67**, 39-44.
- Rebelein (1973).*Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **2**, 112-121.
- Recamales, M.A.F.; Hernanz, D.; Álvarez, C.; González-Miret, M.L. & Heredia, F.J. (2007). Colour of Amontillado wines aged in two oak barrel types. *Eur. Food Res. Tech.* **224**, 321-327.
- Rentzsch M.; Schwarz, M.; Winterhalter, P.; Blanco-Vega, D. & Hermosin-Gutiérrez, I. (2010) Survey on the content of vitisin A and hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Tempranillo wines. *Food Chem.* **119**, 1426-1434.
- Revilla, E.; Ryan, J.M.; Kovac, V. & Nemanic, J. (1998). The effect of the addition of supplementary seeds and skins during fermentation on the chemical and sensory characteristics of red wines. *Dev. Food. Sci.* **40**, 583-596.
- Revilla, I.; Pérez-Magariño, S.; González-SanJosé, M.L. & Beltrán S. (1999). Identification of anthocyanin derivatived in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A.* **847**, 83-90.

- Revilla, E. & Ryan, J.M. (2000). Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *J. Chromatogr. A*. **881**, 461- 469.
- Reyero, J.R.; Lorenzo, C.; Pardo, F.; Alonso, G.L. & Salinas, M.R. (2005). Comparación del potencial fenólico de uvas en el momento óptimo de vendimia y características de sus vinos. *Enólogos*. **37**.
- Reynolds, A.; Cliff, M.; Girard, B. & Kopp, T.G. (2001). Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 235- 240.
- Riberéau-Gayón, P.; Glories, Y.; Maujean, A. & Dubourdieu, Y. (1999). Phenolic Compounds in Handbook of enology. In *The chemistry of wine, Stabilization and treatments*. Ed. John Wiley y son, Ltd, Chichester, 129-186.
- Ribéreau-Gayon, P. & Stonestreet, E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim. France*. **9**, 2649-2652.
- Ricardo Da Silva, J.M.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Cheminat, A. & Moutounet, M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, **30**, 1259-1264.
- Rigaud, J.; Cheynier, V.; Souquet, I.M.; Moutounet, M. (1991). Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics. *J. Sci. Food Agric.* **57**, 55-63.
- Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T. & Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine- effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*. **16**, 17-23.
- Robinson, J. (1996). *Guide to wine grapes*. Oxford University Press:Oxford.
- Rodríguez-Pulido, F.J.; Gómez-Robledo, L.; Melgosa, M.; Gordillo, B.; González-Miret, M.L. & Heredia, F.J. (2012). Ripeness estimation of grape berries and seeds by image analysis *Comput. Elec. Agric.* **82** , 128-133.
- Romero, C. & Bakker, J. (1999). Interactions between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and color in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3130-3139.
- Romero-Cascales, I.; Fernández-Fernández, J.I.; López-roca, J.M. & Gómez-Plaza, E. (2005). The maceration process during winemaking extraction of the anthocyanins from grape skins into wine. *Eur Food Res Technol.* **221**, 163-167.
- Ryan, J.M. & Revilla, E. (2003). Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J Agric Food Chem.* **51**, 3372-3378.
- Sacchi, K.L.; Bisson, L.F. & Adams, D.O. (2005). A Review of the Effect of Winemaking Techniques on Phenolic Extraction in Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **56**, 197-206.
- Sadras, V.O.; Stevens, R.M.; Pech, J.M.; Taylor, E.J.; Nicholas, P.R. & McCarthy, M.G. (2007a). Quantifying phenotypic plasticity of berry traits using an allometric-type approach: a case study on anthocyanins and sugars in berries of Cabernet Sauvignon. *A. J. Grape Wine Res.*, **13**, 72-80.
- Sadras, V.O.; Soar, C.J. & Petrie, P.R. (2007b) Quantification of time trends in vintage scores and their variability for major wine regions of Australia. *A. J. Grape Wine Res.*, **13**, 117-123.
- Saint-Cricq, N. ; Vivas, N. & Glories, Y. (1998). Maturité phénolique: définition et contrôle. *Revue Française d' Oenologie.*, **173**, 22-25.

- Salaha, M.I.; Kallithraka, S.; Marmaras, I.; Koussissi, E. & Tzourou, I. (2008). A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *J. Food Comp. Anal.* **21**, 660-666.
- Salas E.; Atanasova V.; Poncet-Legrand C.; Meudec E.; Mazauric J.P. & Cheynier, V. (2004) Demonstration of the occurrence of flavanolanthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Anal Chim Act.* **513**, 325-332.
- Salinas, M.R.; Garijo, J.; Pardo, F.; Zalacain, A. & Alonso, G.L. (2005). Influence of prefermentative maceration temperature on the colour and the phenolic and volatile composition of rosé wines. *J. Sci. Food Agric.* **85**, 1527-1536.
- Sanz, T.; Salvador, A. & Fiszman, S.M. (2004). Innovative method for preparing a frozen, battered food without a pre-frying step. *Food Hydrocolloids* **18**, 227-231.
- Scheffeldt, P. & Hrazdina, G.; (1978). Copigmentation of anthocyanins under physiological conditions. *J. Food Sci.* **43**, 517-520.
- Schmid, F.; Li, Y.; Liebich, B.; Culbert, J.; Day, C. & Jiranek, V. (2007). Evaluation of red wine made on a small scale utilizing frozen must. *J. Agric. Food. Chem.* **55**, 7156-7161.
- Schultz, H.R. & Jones, G. (2010). Climate Induced Historic and Future Changes in Viticulture. *J. Wine Res.* **21**, 137-145.
- Schwarz, M.; Wabnitz, T. C. & Winterhalter, P. (2003). Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3682-3687.
- Schwarz, M.; Hofmann, G. & Winterhalter, P. (2004). Investigations on Anthocyanins in Wines from *Vitis vinifera* cv. Pinotage: Factors Influencing the Formation of Pinotin A and Its Correlation with Wine Age. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 498-504.
- Schwarz, M.; Picazo-Bacete, J.J.; Winterhalter, P. & Hermosín-Gutiérrez, I. (2005). Effect of Copigments and Grape Cultivar on the Color of Red Wines Fermented after the Addition of Copigments. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 8372-8381.
- Singleton, V.L. & Trouslade, E. K. (1992). Anthocyanin-Tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 63-70.
- Solli, M.; Andersson, M.; Lenz, R. & Kruse, B. (2005). Color measurements with a consumer digital camera using spectral estimation techniques. *Lecture Notes in Computer Science* **3540**, 105-114.
- Somers, T. C. & Evans, M. E. (1977). Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, and chemical age. *J. Sci. Food Agric.* **28**, 279-287.
- Somers, T.C. (1971). The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry.* **10**, 2175-2185.
- Soto Vázquez, E.; Río Segade, S. & Orriols Fernández. (2010). Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. *Eur Food Res Technol.* **231**, 789-802.
- Souquet, J.M.; Labarbe, B.; Le Guerneve, C.; Cheynier V. & Moutounet, M. (2000). Phenolic composition of grape stems. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1076-1080.
- Spayd, S. E.; Tarara, J.M.; Mee, D.L. & Ferguson, J.C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis Vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **53**, 171-182.

- StatSoft Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), v 8; StatSoft Inc.: Tulsa, OK.
- Su, C.T. & Singleton, V.L. (1969). Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry*. **8**, 1553-1558.
- Sun, B.; Reis Santos, C.P.; Leandro, M.C.; De Freitas, V. & Spranger, M.I. (2007). High-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of new products formed by the reaction between flavanols and malvidin 3-glucoside in the presence of acetaldehyde. *Rapid Commun Mass Spectrometry*. **21**, 2227-2236.
- Tabachnick, B.G.; Fidell, L.S. (1983). *Using multivariate statistics*. Harper & Row Publishers, New York.
- Talcott, S. T.; Brenes, C. H.; Pires, D. M. & Del Pozo-Insfran, D. (2003). Phytochemical stability and color retention of copigmented and processed muscadine grape juice. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 957-963.
- Timberlake C.F. & Bridle, P. (1976) Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am J Enol Vitic.* **27**, 97-105.
- Tintunen, S. & Lehtonen, P. (2001). Distinguishing organic wines from normal wines on the basis of concentrations of phenolic compounds and spectral data. *Eur. Food Res. Technol.* **212** :390-394.
- Tomassi, D.; Jones, G.V.; Giust, M.; Lovat, L. & Gaiotti, F. (2011). Grapevine Phenology and Climate Change: Relationships and Trends in the Veneto Region of Italy for 1964–2009. *Am. J. Enol. Vitic.* **62**, 329- 339.
- Tsanova-Savova, S., Dimov, S. & Ribarova, F. (2002). Anthocyanins and color variables of Bulgarian aged red wines. *J. Food Comp. Anal.* **15**, 647-654.
- UE, Official Methods to Wine Analyses, (1990). Reglamento 440/2003.
- Vaudour, E. & Shaw, A.B. (2005) A worldwide perspective on viticultural zoning, South African *J. of Enol. Vitic.* **26**, 106-116.
- Versari, A.; Boulton, R.B. & Parpinello, G.P. (2008). A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. *Food Chem.* **106**, 397-402.
- Vitrac, X.; Castagnino, C.; Waffo-Teguo, P.; Delaunay, J.C.; Vercauteren, J.; Monti, J.P.; Deffieux, G. & Merillon, J.M. (2001). Polyphenols newly extracted in red wine from southwestern France by centrifugal partition chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5934-5938.
- Vitrac, X.; Monti, J.P.; Vercauteren, J.; Deffieux, G. & Merillon, J.M. (2002). Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal Chim Acta.* **458**, 103-110.
- Vivar-Quintana, A.M.; Santos-Buelga, C.; & Rivas-Gonzalo, J.C. (2002). Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Anal Chim Acta.* **458**, 147-155.
- Vivas, N.; Glories, Y.; Lagune, L.; Saucier, C.; Agustín, M. (1994). Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au pdiméthylaminocinnamaldéhyde. *J.Int. Sci. Vigne Vin.* **28**, 319-336.
- Waterhouse, A.L. & Lamuela-Raventós, R.M. (1994). The occurrence of piceid, a stilbene glucoside in grape berries. *Phytochemistry*. **37**, 571-573.
- Webb, L.B.; Whetton, P.H. & Barlow, W.R. (2011). Observed trends in winegrape maturity in Australia. *Glob. Chang. Biol.* **17**, 2707-2719.

- Wei, S.-T.; Ou, L.C.; Luo, M.R. & Hutchings, J.B. (2012). Optimisation of food expectations using product colour and appearance. *Food Qual. Prefer.* **23**, 49-62.
- Wright, W.D. (1928). A re-determination of the trichromatic coefficients of the spectral colours. *Trans. Opt. Soc.* **30**, 141.
- Wrolstad, R.E.; Durst, R.W. & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 423-428.
- Wyszecki, G. & Stiles, W.S. (1982). *Color Science. Concepts and Methods. Quantitative Data and Formulae*, 2^a Ed. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Zafrilla, P.; Morillas, J.; Mulero, J.; Cayuela, J.M.; Martínez-Cachá, A.; Pardo, F. & López Nicolás, J.M. (2003). Changes during Storage in Conventional and Ecological Wine: Phenolic Content and Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4694-4700.
- Zamora, F. (2002). La madurez fenólica, Un tema abierto. *Enólogos*, **18**, 24-28.
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. AMV Ed. Mundiprensa, Madrid, España.
- Zamora, F. (2004). La maceración prefermentativa en frío de la uva tinta. *Enólogos*. **32**, 36-39.
- Zamora, F. (2005). El cambio climático: una amenaza para nuestra viticultura. *Enólogos*. **39**, 28-31
- Zheng, Y.; Zhou, S.; Qi, Y. & Zhang, L. (2012). Performance of CIE LAB-based color difference formulae under different viewing conditions. *Adv. Mat. Res.* **457**, 1294-1298.
- Zinnai, A.; Venturi, F. & Andrich, G (2006). Cold maceration in production of high quality wine. 1st International Symposium on Environment Identities and Mediterranean Area, ISEIM, 4150524 , 522-525.

Apéndices



Colorimetría Triestímulo

El color es una *respuesta mental* al estímulo que una *radiación luminosa* visible produce en la *retina*. Se considera como un concepto psicofísico, relacionado al mismo tiempo con la psicología del observador, la fisiología de la visión y con la energía radiante espectral de una fuente luminosa.

Wyszecki y Stiles (1982) dan una definición precisa para el color percibido: "El color es el aspecto de la percepción visual por el cual un observador puede distinguir diferencias entre dos campos de visión del mismo tamaño, forma y estructura, causadas por diferencias en la composición espectral de la energía radiante implicada en la observación".

No es, por tanto, una propiedad intrínseca del objeto que refleja o transmite la radiación luminosa, pues basta con cambiar la fuente para modificar el estímulo producido. Depende de la distribución espectral de la radiación incidente, de la capacidad del objeto para transformarla y de la fisiología del observador.

El estímulo cromático está compuesto por tres sensaciones bien diferenciadas, que dan al color su carácter tridimensional; éstas son:

- El *matiz* o *tono* que es el atributo fundamental. Tradicionalmente definido como el que nos permite clasificar a los colores como rojizos, amarillentos, etc., o aquél que permite diferenciar un color respecto al gris del mismo brillo, denominado estímulo acromático. Está relacionado con las diferencias de absorbancia de la energía radiante a diferentes longitudes de onda (λ). Es decir, es el atributo cualitativo del color.
- El *brillo* o *luminosidad*, característica por la que un color puede clasificarse, en términos generales, como claro u oscuro. Más exactamente se puede definir como el atributo en virtud del cual los colores pueden considerarse equivalentes a alguno de los miembros de la escala de grises, entre el negro y el blanco. Es una medida relativa de la luz reflejada frente a la absorbida.
- La *saturación* o *pureza*, que determina para cada matiz su grado de diferencia frente al gris del mismo brillo, y describe la reflexión o transmisión a una determinada longitud de onda.

Se considera que el matiz es la medida cualitativa de la **cromaticidad** y la saturación la cuantitativa. El brillo no se considera partícipe de la característica cromática.

Historia del Color

Las teorías del color nacen, como tantos otros aspectos del conocimiento científico, en la Grecia Clásica. Platón contempla la idea del color como un fuego interior que da origen a unos rayos visuales que se dirigen desde el ojo hacia el objeto. Epicuro, por su parte, propone todo lo contrario, y explica la visión de los colores como la entrada en el ojo de emanaciones procedentes del objeto, compuestas de diminutos corpúsculos coloreados. Aristóteles, en su obra "De Coloribus", propone por primera vez algo tan importante como es el considerar el color como una propiedad de la luz; pero creía que dicha propiedad era atribuida a la "contaminación" de la luz por los objetos, que conferían "negrura" a la luz blanca, y de la cualidad de esta "negrura" resultaban los distintos colores.

Pintores del Renacimiento como Freischer, Porta, Telesii y el mismo Leonardo da Vinci (Lozano, 1978) ya establecieron reglas empíricas para las mezclas de colores. Descartes y Dominis habían publicado algunas obras referentes a la luz y el color, y Marci había expuesto su teoría sobre la naturaleza de la luz, como resultado de las contracciones y dilataciones de un medio inmaterial. Pero no es hasta la segunda mitad del s. XVII, cuando Newton (1642-1727), que investigaba en este campo, expone las primeras conclusiones con base científica sobre las propiedades del color y su carácter tridimensional. En síntesis, Newton (1672; 1704) realiza un descubrimiento trascendental: la dispersión por un prisma de los siete colores espectrales en los que se descomponía la luz solar y cuya intensidad intentó medir, aunque sus resultados no fueron correctos. Previó, además, el proceso inverso, que demostró con su círculo de colores de centro blanco, observando que la pureza espectral variaba en sentido radial. Intuyó asimismo que

la luminosidad o claridad sería la tercera dimensión del color.

El color abarca o comprende, para una explicación plausible, la intervención no sólo de la física-matemática sino también de la fisiología y la psicología. Es por ello que Goethe (1749-1832), escritor y poeta, analiza el color desde otro punto de vista: las impresiones visuales del observador particular (punto de vista subjetivo). Goethe (1945), polemizando con Newton y rechazando su teoría, expone que la sensación del fenómeno del color es un factor individual y subjetivo. Siglos más tarde se aceptaría la dualidad psicofísica del color y de las sensaciones luminosas.

En 1794, Dalton inicia sus estudios sobre anomalías cromáticas (dicromatismo) que serían continuados por varios autores: König, Rayleigh, Seebeck (Lozano, 1978).

En 1777, George Palmer (McLaren, 1983) publica su *Teoría de los Colores y la Visión*, en la que asegura que todos los colores están compuestos por sólo tres colores primarios: rojo, amarillo y azul; y que "la superficie de la retina debe estar compuesta por tres clases de fibras, o membranas, cada una de ellas análoga a cada uno de los tres rayos primarios, susceptibles de ser estimuladas por ellos".

Pero, ya en el s. XIX, aparece, después de Newton y Palmer, otra figura importante: Thomas Young (1773-1829), médico, físico y egiptólogo, quien predice la Teoría Tricromática del Color, explica que en la retina existen tres detectores diferentes de cuya conjugación se consigue predecir el estímulo de color (Young, 1802a,b). Afirmó que "*es casi imposible concebir que cada punto sensitivo de la retina esté compuesto por un número infinito de partículas capaces de vibrar en perfecto unísono con cada posible ondulación, por lo que hay que suponer un número limitado de las mismas sensible a los tres colores principales, capaces de ponerse en movimiento en mayor o menor concordancia según las diferentes ondulaciones. Cada filamento sensitivo del nervio óptico consiste en tres porciones, una para cada color*". Como otros muchos científicos, Young no estableció la diferencia fundamental entre las mezclas de luces y las de pigmentos.

Herman Ludwig von Helmholtz (1821-1894), médico, físico-matemático, filólogo y musicólogo, contribuiría también a la Teoría Tricromática. Existe alguna forma de estímulo triple generado en la retina del ojo que da lugar a la percepción en la corteza cerebral, mediante un proceso no descrito. Helmholtz (1852), en su teoría, se extiende más allá explicando los fenómenos de:

- la adaptación a la luz del color
- la fatiga visual
- las imágenes accidentales, etc.

Consideró el espectro constituido fundamentalmente por cinco colores: rojo (R), amarillo (Y), verde (G), azul (B) y violeta (V).

Dos autores completarían las bases de la Teoría Tricromática. Grassmann (1853) enuncia tres leyes sobre las mezclas de colores, las cuales, aunque con ciertas limitaciones, aún perduran. Dedujo que las luces del mismo color, pero de diferente composición espectral, se comportaban de forma idéntica en mezclas, lo que conduce a la consideración de las Ecuaciones de Igualación de Color, con estructura algebraica. Son las bases de la Colorimetría moderna y fueron cuantificadas por Maxwell (1860): para igualar cualquier color basta con la determinación de las cantidades de tres luces primarias estandarizadas, con lo que se hace innecesario el concurso del ojo humano. Quedaba la cuestión de cuál es la cantidad de componentes primarios tricromáticos que igualaba a las diversas radiaciones del espectro. Esta calibración, que junto con las leyes de mezclas de Grassmann permitía predecir el resultado de cualquier combinación de colores, fue realizada por Maxwell, aunque no del todo correctamente. Como no existían adecuadas fuentes luminosas no podía producir luz monocromática de alta intensidad. Recurrió a un blanco de referencia al que agregaba el color a evaluar y luego, por diferencia con la suma de las cantidades de cada primario para igualar el blanco de referencia, medía partes proporcionales para cada color espectral. Algunos (Sherman, 1981) prefieren atribuir conjuntamente la Teoría Tricromática a tres autores: Young, Helmholtz y Maxwell. En ella se basan prácticamente todos los métodos y sistemas colorimétricos actuales.

Pero los continuos avances en Biología, Psicología y la técnica instrumental, contribuyeron a mejorar y ampliar estas teorías. Particularmente las técnicas para medir efectos en las partes más sensibles, complejas y delicadas del ojo y cerebro humanos. König, que colaboró con Helmholtz en su teoría, trató, pero sin éxito pleno, de explicar las anomalías en la visión del color.

Al mismo tiempo que la solución (o aproximación) "física", existía la corriente sensorial, que ya apuntó Goethe. Hering reactualizó la vieja teoría desde un plano científico: a cada sensación se le supone una opuesta; es la "teoría de los colores oponentes", que suponía la existencia de un mecanismo de colores antagónicos, y que se diferenciaba en tres procesos visuales

$$R = -G \qquad B = -Y \qquad W = -N$$

Esta teoría fue completada por Adams (1923) y actualizada por Judd (1949). Von Kries, cuando crea su teoría "de zonas" realiza el nexo entre las teorías "físicas" de Helmholtz y las "sensoriales" de Hering, demostrando más tarde Schrödinger, en 1925, la relación matemática que une ambas teorías (Lozano, 1978).

En la actualidad, todas las teorías y sistemas de color son canalizados por la **Comisión Internacional de Iluminación, C.I.E.** ("*Commission Internationale de l'Eclairage*"), que tiene su origen en la "*Commission Internationale de Photometrie*" de principios de siglo. Este organismo es el encargado de recoger, evaluar y recomendar los diferentes avances realizados en Colorimetría.

Sistemas de color por comparación de patrones. Atlas de color

Dentro del campo de la colorimetría ocupan un capítulo de gran interés práctico los atlas, diccionarios y colecciones de colores, basados en la comparación visual con patrones ordenados de forma sistemática, generalmente basada en la naturaleza tridimensional del color.

Ingle (1962) describe los diferentes sistemas de patrones materiales. Son muy numerosos los sistemas y atlas de color diseñados a lo largo del tiempo para su aplicación industrial: *Sistema Lovibond*, ampliamente utilizado en la tecnología de los alimentos como método de rutina para el análisis del color (Sancho *et al.*, 1962); *Sistema A.P.H.A.*; *Escala Gardner*; *Sistema Munsell*; *Sistema Ostwald*; *Sistema DIN*; *Sistema NCS*; *Sistema ISCC-NBS*; *Atlas RHS*, etc. Calvo (1989) recopila y analiza los más conocidos.

El sistema Ostwald (Foss *et al.*, 1944), basado en la igualdad visual de mezclas de colores y en la complementariedad de los tonos opuestos, define también los colores en función de las tres variables (tono, claridad y saturación) haciendo uso de un colorímetro de discos. Los que llama colores "puros", que no tienen relación con los colores espectrales puros, son ocho: rojo, anaranjado, amarillo, verde hoja, verde mar, turquesa, ultramarino, púrpura; cada uno se divide en tres sectores, lo que hace un total de 24 matices. Hoy día es muy utilizado por los que se interesan por el aspecto estético del color (armonía de los colores).

Munsell, profesor de pintura, desarrolló a principios de siglo (Munsell, 1905) el Sistema que lleva su nombre, basado en una disposición puramente psicológica de los colores. Este sistema, ampliamente usado sobre todo en los EE.UU. (Munsell *et al.*, 1933; Munsell Color Company, 1966), es objeto de continuos estudios por numerosos grupos de investigadores que han propuesto diversas *renotaciones* (Newhall *et al.*, 1943; Nickerson, 1950)

Decía Munsell que "al igual que ocurre en la música, el color puede expresarse mediante:

- tono o matiz ("hue")
- valor o intensidad ("value")
- croma o saturación (pureza o "chroma")

las tres, dimensiones que se miden por una escala apropiada". Tiene la ventaja de que cada nombre de un color (notación) autodefine su matiz, valor y croma y que, mediante una transformación adecuada que se provee con cada producto, se puede conocer su equivalencia con el sistema CIE. Pero presenta el inconveniente del envejecimiento con la luz y la humedad de los patrones, por lo que es necesario preservarlos de la luz, del calor y los ambientes húmedos.

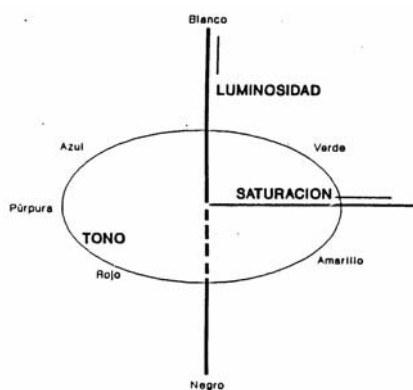


Fig. 1. Sólido de colores de Munsell.

El sólido de colores (Fig. 1) tiene un eje principal donde se representan desde el blanco hasta el negro ("value"). El radio vector (simetría polar) en el plano horizontal indica la saturación ("chroma"). El tono o matiz ("hue") viene dado por el ángulo del radio vector con el eje de coordenadas. El valor es la escala de grises.

Divide el círculo cromático en 100 partes, de forma que comienza en RP-R (rojo púrpura-rojo), pasando por el valor 5, R (rojo); el 25, Y (amarillo); el 45, G (verde); el 65, B (azul); y el 85, P (púrpura); y los intermedios: el 15, YR (amarillo-rojo); el 35, GY (verde-amarillo); el 55, BG (azul-verde); el 75, PB (púrpura-azul) y el 95, RP (rojo-púrpura).

Se han propuesto transformaciones no lineales del sistema Munsell mediante la consideración de planos X-Z en el sistema colorimétrico CIE 1931 (antes de publicarse las renotaciones de Munsell) (Adams, 1942); así como intentos por encontrar, mediante transformaciones no lineales del observador cromático CIE 1931, espacios coloreados esencialmente iguales al Munsell, aunque, en la mayoría de los casos las fórmulas de transformación son excesivamente complicadas (Moon y Spencer, 1943). Otros trabajos en este sentido relacionan, para algunos patrones, los valores según los sistemas Munsell, Hunter y CIE (Nickerson, 1950).

El más reciente es el sistema DIN. Comenzado en los años cuarenta por el profesor M. Richter, la Asociación de Normas Alemanas, a través de su Comité de Colorimetría, estableció la norma DIN 6164 en 1952 (Richter, 1953).

Este espacio es similar al Munsell, pero con diferencias al evaluar la luminosidad. Al igual que el sistema Ostwald hay 24 matices o tonos ("Farbton"); pero no son colores empíricos (como en Munsell, por ej., donde la escala es fijada psicológicamente con renotación para una escala psicofísica más correcta) por mezclas de tintes, pinturas, etc., sino manteniendo el principio del color espectral.

El sólido de colores se representa por un cono, cuyo radio vector varía a lo largo del eje. Existen distintas secciones horizontales, caracterizando el factor de "negrura" o el factor de oscuridad. Las líneas de igual matiz y "oscuridad" son un arco de parábola (Fig. 2) y representan la cualidad denominada saturación ("Sättigung"). El espaciamiento de la saturación, tampoco es constante. El espaciamiento fue realizado por 317 observadores en un período de varios años, y por etapas: matiz, saturación y oscuridad. DIN provee hoy un atlas de colores mates.

La Terminología del Color puede llegar a hacerse sumamente complicada, si se tienen en cuenta las impresiones subjetivas de los observadores a la hora de establecer los nombres de los diferentes colores. El *Diccionario de Maerz y Paul* (1950) recoge una lista de 4000 nombres de colores con sus muestras correspondientes y dispuestos de forma sistemática. Chapanis (1965) asegura que existen hasta 200 tonos discriminables por el ojo humano, en los que se pueden establecer unos 450 "pasos" de luminancia y unos 80 de saturación, por término medio (ya que las posibilidades de discriminación según la pureza varían entre 15 y 165, según el tono considerado). Esto nos lleva a unos 7.000.000 de estímulos coloreados discriminables.

Con fines prácticos se han establecido (Kelly, 1943) las siguientes zonas de color sobre el Diagrama CIE 1931-(x,y) (Fig. 13): *rojo, anaranjado rojizo, anaranjado, anaranjado amarillento, amarillo, amarillo verdoso, amarillo-verde, verde amarillento, verde, verde azulado, azul-verde, azul verdoso, azul, azul púrpureo, púrpura azulado, púrpura, púrpura rojizo, rojo-púrpura, rojo púrpureo, rosa púrpureo, rosa y rosa anaranjado.*

Los métodos basados en la comparación con patrones materiales presentan inconvenientes. La falta de flexibilidad y universalidad de dichos patrones y los errores propios de la evaluación visual evidencian la importancia de una medición objetiva del color (Reilly y Smith, 1960; Little, 1963; 1973b; Clydesdale, 1969; Little y MacKinney, 1969).

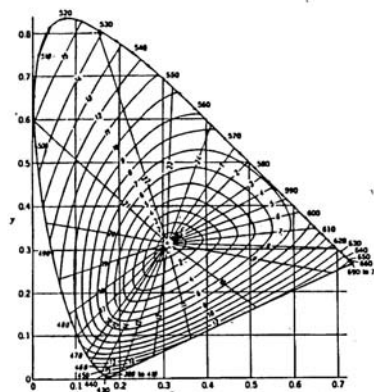


Fig. 2. Sistema DIN. Curvas de saturación y rectas de tono constante en el diagrama CIE 1931-(x,y).

Colorimetría

La Colorimetría es la rama de la ciencia que estudia la especificación numérica del color de un estímulo visual definido físicamente de manera que:

- Estímulos con la misma especificación y bajo las mismas condiciones de observación aparecen iguales para un observador con visión normal de los colores; es decir, que existe una perfecta igualación ("*color matching*").
- Estímulos que aparecen iguales poseen la misma especificación.
- Los números que comprende la especificación son funciones continuas de los parámetros físicos que definen la distribución de energía radiante espectral del estímulo.

Generalización Tricromática

Las leyes experimentales de la igualación del color se resumen en un principio ya enunciado por Newton (1672) y reafirmado por Young (1802a,b) conocido como "**Generalización Tricromática**". Ésta establece que bajo un amplio rango de condiciones de observación, muchos estímulos de color pueden ser igualados por mezclas aditivas de tres estímulos primarios, cuyas energías radiantes se han ajustado y fijado previamente.

En Colorimetría, el concepto *mezcla aditiva*, se refiere a un estímulo de color para el cual la energía radiante en cualquier intervalo de longitud de onda y en cualquier zona del espectro es igual a la suma de las energías, en el mismo intervalo, de los componentes de la mezcla. Matemáticamente la igualación del color, en la Generalización Tricromática, obedece ciertas leyes de linealidad conocidas como las "leyes de las mezclas aditivas del color" de Grassmann (1853).

La primera ley es la base de la colorimetría tricromática y se puede enunciar: la potencia radiante de un estímulo **Q** es equivalente a la suma de las potencias radiantes respectivas de los tres estímulos primarios (**R**, **G** y **B**). Existe una y sólo una combinación de tres primarios que iguala perceptualmente cualquier color real

$$q Q \equiv r R + g G + b B \quad [1]$$

La segunda ley, o ley de la proporcionalidad, establece que si la intensidad del estímulo que produce una sensación de color dada se multiplica por un factor cualquiera, el valor de la sensación no cambia

$$n q Q \equiv n r R + n g G + n b B \quad [2]$$

La tercera ley sostiene que la suma algebraica de dos estímulos cualesquiera es equivalente a la suma algebraica de las cantidades de los estímulos de referencia que igualan los estímulos en cuestión.

$$\begin{aligned} q_1 Q_1 &\equiv r_1 R + g_1 G + b_1 B \\ q_2 Q_2 &\equiv r_2 R + g_2 G + b_2 B \end{aligned} \quad [3]$$

La suma de ambos será:

$$q_1 Q_1 + q_2 Q_2 \equiv (r_1 + r_2) R + (g_1 + g_2) G + (b_1 + b_2) B \quad [4]$$

Además, de manera general, se cumplen las leyes de simetría y transitividad. Si un estímulo de color **A** iguala un estímulo de color **B**, entonces el estímulo **B** iguala el estímulo **A**. Si **A** iguala **B** y **B** iguala **C** entonces **A** iguala **C**.

En la generalización tricromática, además, hay que tener en cuenta tres importantes consideraciones:

- la dependencia, en la igualación, de las condiciones de observación bajo las que se comparan dos estímulos
- los posibles efectos de diferentes exposiciones de los ojos a la luz
- las diferencias que en la igualación pueden detectar diferentes observadores

Dentro de las condiciones de observación, es importante tener en cuenta que el tamaño angular de los campos de igualación puede variar ampliamente, y por ello es un factor que ha sido considerado en las Recomendaciones de la CIE, tal como se verá más adelante.

El efecto de la pre-exposición a la luz se conoce como persistencia de la igualación del color. Aunque esta propiedad supone la no alterabilidad de la igualación del color aunque exista una exposición previa a la luz, evidentemente esto es cierto sólo si se trata de intensidades luminosas bajas o medias. Pero si la pre-exposición es a luces de alta intensidad el efecto sobre la igualación ha de ser necesariamente apreciable.

No todos los observadores necesitan tres estímulos primarios independientes para conseguir las igualaciones aditivas de color con un estímulo dado. Para una pequeña, pero importante proporción (aproximadamente 2,6% de los hombres y menos del 0,05% de las mujeres), es suficiente con dos estímulos primarios; se trata de observadores con visión defectuosa del color denominados dicrómatas. Para los monocrómatas (en mucha menor proporción, 0,003%) en realidad no existe discriminación del color, y su igualación es, de hecho, una igualación del brillo, puesto que se realiza con un solo estímulo primario. También entre la igualación tricromática se pueden dar defectos en la visión; así, un 5,5% de los hombres y un 0,4% de las mujeres se pueden considerar tricrómatas anómalos, pues experimentan desviaciones de la igualación cromática general como menor sensibilidad a las diferencias de color y otras deficiencias en la respuesta visual.

Excluyendo todos los observadores con defectos en la visión cromática (monocrómatas, dicrómatas y tricrómatas anómalos) queda aproximadamente un 95% de observadores cuya visión del color puede considerarse normal y en los que son aceptables las aproximaciones colorimétricas para un hipotético *observador normal medio*. Sobre esta base fueron establecidos, por la "Commission Internationale de l'Éclairage", en 1931 el **Observador Colorimétrico Patrón CIE 1931**, y en 1964 el **Observador Colorimétrico Patrón Suplementario CIE 1964**, más apropiado para campos visuales de igualación más amplios.

Espacio Triestímulo

Las leyes que rigen la generalización tricromática se pueden expresar de forma geométrica, considerando un espacio vectorial de tres dimensiones denominado **Espacio Triestímulo**, en el que cada estímulo de color (**Q**) viene representado por un vector, expresión de las cantidades proporcionales de cada uno de los estímulos primarios rojo (**R**), verde (**G**) y azul (**B**).

En la especificación completa de un estímulo de color es necesario conocer, además de la distribución espectral absoluta de energía radiante emitida por la superficie externa, otros factores que caracterizan la situación del estímulo, tales como el tamaño angular de dicha superficie. Sin embargo, en el desarrollo de las expresiones para la igualación de color estos factores suelen considerarse fijos, con lo cual, el estímulo solamente viene caracterizado por su **distribución espectral de energía**, $\{P_\lambda d\lambda\}$. Así, se definen los estímulos primarios de valor unitario:

- $\{ \rho P_\lambda d\lambda \}_R$, que define el estímulo primario ROJO
- $\{ \gamma P_\lambda d\lambda \}_G$, que define el estímulo primario VERDE
- $\{ \beta P_\lambda d\lambda \}_B$, que define el estímulo primario AZUL
- $\{ P_\lambda d\lambda \}_Q$ para un estímulo de color cualquiera, **Q**

ρ , γ , β son factores constantes positivos que tienen utilidad sólo en determinadas aplicaciones. En general, se suelen escoger como cantidades unitarias de estímulos primarios aquellas que al mezclar aditivamente producen una igualación de color completa con un estímulo acromático especificado, es decir, caracterizado por un espectro de energía constante.

De acuerdo con esto, un estímulo dado **Q** podría expresarse como la mezcla aditiva de determinadas cantidades de los tres estímulos primarios fijados **R**, **G**, **B**:

$$Q \equiv R_Q R + G_Q G + B_Q B \quad [5]$$

Los factores escalares R_Q , G_Q , B_Q asignados a los estímulos primarios se denominan **valores triestímulos** (término abreviado de "*Valores del Triple Estímulo Internacional*") de **Q**.

Esta ecuación vectorial tiene una sencilla interpretación geométrica en el espacio tridimensional mostrado en la Fig. 3. Los vectores unitarios **R**, **G**, **B**, que representan los estímulos primarios, definen el espacio, tienen un origen común y se sitúan en tres direcciones arbitrariamente elegidas. Las tres componentes que definen el vector **Q** se sitúan a lo largo de los ejes definidos por **R**, **G**, **B**, y tienen longitudes respectivamente iguales a la R_Q , G_Q , B_Q , valores triestímulos de **Q**. De esta manera, en el espacio triestímulo-(**R,G,B**) el estímulo coloreado **Q** se define como un vector triestímulo-(R_Q, G_Q, B_Q).

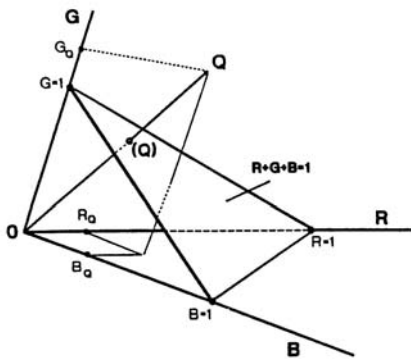


Fig. 3. Espacio cromático (**R,G,B**).

La representación vectorial del color, además de no ser totalmente correcta por carecer del elemento neutro para la operación (Álvarez-Claro *et al.*, 1976; Álvarez-Claro e Hita, 1978), no resulta práctica, puesto que conlleva el manejo de estructuras tridimensionales. Por ello se prefiere un tratamiento bidimensional del mismo, aunque hay que tener en cuenta que necesariamente se reduce la información que ofrece el vector triestímulo. Una representación bidimensional útil es la que se obtiene por la proyección sobre el plano $R+G+B=1$, según muestra la Fig. 3. Cada vector triestímulo **Q** intersecciona con dicho plano en un punto **Q**. Es fácil entender que la localización de dicho punto **Q** determina la dirección del vector pero no su longitud, caracterizada por la intensidad del estímulo.

En el plano unitario es conveniente elegir como ejes de coordenadas las líneas de intersección entre dicho plano y cada uno de los planos definidos por pares de vectores primarios. El triángulo formado por dichas líneas de intersección define el **diagrama de cromaticidad-(r,g,b)**. Las coordenadas de cromaticidad de **Q** están relacionadas con los valores triestímulos ($R=R_Q$, $G=G_Q$, $B=B_Q$) y vienen definidas por las siguientes ecuaciones:

$$r = \frac{R}{R + G + B} \quad g = \frac{G}{R + G + B} \quad b = \frac{B}{R + G + B} \quad [6]$$

de donde se desprende que:

$$r + g + b = 1$$

La representación de dos de las coordenadas resulta suficiente para la definición práctica de cualquier color. El triángulo equilátero representado en la Fig. 4 se conoce como **Triángulo de Color de Maxwell**. Más recientemente se prefiere la representación sobre un triángulo donde los dos ejes de coordenadas elegidos (*r,g*) sean perpendiculares entre sí. El triángulo rectángulo así definido se puede obtener mediante sencillas modificaciones sobre el espacio triestímulo que no alteran las ecuaciones colorimétricas básicas.

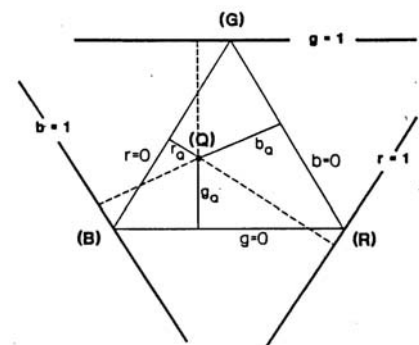


Fig. 4. Triángulo de Maxwell.

Ecuaciones Colorimétricas Básicas

En un espacio vectorial, el vector resultante de la suma de otros puede expresarse como la resultante de las sumas parciales de las componentes de éstos. De la misma forma, un estímulo de color **Q**, con distribución de energía radiante $\{P_\lambda d\lambda\}_Q$, puede expresarse como la mezcla aditiva de una serie de estímulos **Q_i**, con distribuciones espectrales $\{P_\lambda d\lambda\}_{Q_i}$, asociados a *n* intervalos de longitud de onda de ancho $(\Delta\lambda)_i$ (donde $i=1$ a *n*). Los *n* intervalos de longitud de onda, no necesariamente de anchura constante, subdividen completamente el espectro visible (380 a 770 nm).

Cada estímulo **Q_i** se define por la ecuación básica:

$$Q_i \equiv R_{Q_i} R + G_{Q_i} G + B_{Q_i} B$$

[7]

donde R_{Q_i} , G_{Q_i} , B_{Q_i} son los valores triestímulos de Q_i .

La mezcla aditiva de todos los estímulos Q_i igualará el estímulo original Q que, entonces, puede definirse como:

$$Q = \sum_{i=1}^n Q_i = \left(\sum_{i=1}^n R_{Q_i} \right) R + \left(\sum_{i=1}^n G_{Q_i} \right) G + \left(\sum_{i=1}^n B_{Q_i} \right) B \quad [8]$$

El número n de intervalos crece a medida que se reduce la anchura de los mismos. El caso límite genera la siguiente suma:

$$P = \lim_{|(\Delta\lambda)_{i=k}| \rightarrow 0} \sum_{i=1}^n P_{\lambda_i}(\Delta\lambda)_i \quad [9]$$

esto es, la integral definida de la concentración de energía radiante espectral P_λ en el espectro visible (entre λ_a y λ_b),

$$\int_{\lambda_a}^{\lambda_b} P_\lambda d\lambda = \lim_{|(\Delta\lambda)_{i=k}| \rightarrow 0} \sum_{i=1}^n P_{\lambda_i}(\Delta\lambda)_i \quad [10]$$

Normalmente la subdivisión del espectro se realiza para intervalos constantes de longitud de onda, con lo que $(\Delta\lambda)_i = \Delta\lambda$, y así la ecuación definitiva es:

$$P = \int_{\lambda_a}^{\lambda_b} P_\lambda d\lambda = \lim_{\Delta\lambda \rightarrow 0} \sum_{i=1}^n P_{\lambda_i} \Delta\lambda \quad [11]$$

donde λ_i corresponde a la longitud de onda central del intervalo $\Delta\lambda$; $P_\lambda \Delta\lambda$ representa la energía radiante del intervalo $d\lambda$, y se denomina normalmente "estímulo monocromático de longitud de onda λ , Q_λ ". Cada estímulo monocromático Q_λ puede expresarse

$$Q_\lambda \equiv R_\lambda R + G_\lambda G + B_\lambda B \quad [12]$$

donde R_λ , G_λ , B_λ se suelen denominar "valores triestímulos espectrales".

Se define como *estímulo equienergético* E el compuesto por estímulos monocromáticos E_λ cuya energía radiante es constante e igual a 1 en todas las longitudes de onda del espectro visible (desde $\lambda_a = 380$ a $\lambda_b = 770$ nm). Estos estímulos monocromáticos vienen definidos por la ecuación:

$$E_\lambda = \bar{r}(\lambda) R + \bar{g}(\lambda) G + \bar{b}(\lambda) B \quad [13]$$

donde $\bar{r}(\lambda)$, $\bar{g}(\lambda)$, $\bar{b}(\lambda)$ son notaciones especiales para los valores triestímulos del estímulo monocromático E_λ . Los estímulos primarios fijados son también estímulos monocromáticos cuyas longitudes de onda son: $\lambda_R = 700$ nm, $\lambda_G = 546,1$ nm, $\lambda_B = 435,8$ nm, respectivamente.

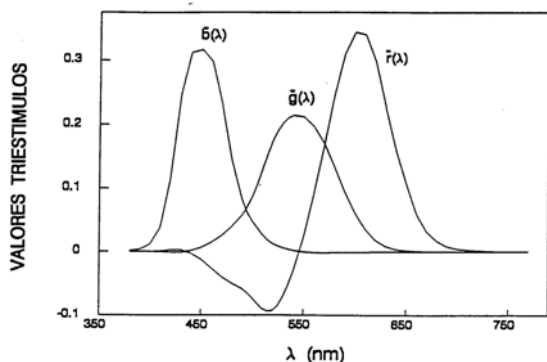


Fig. 5. Funciones de Igualación de Color del Sistema RGB.

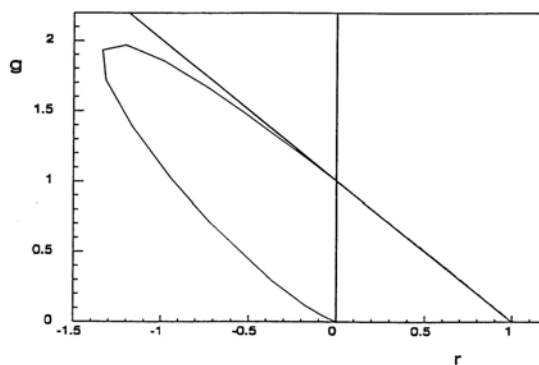


Fig. 6. Diagrama cromático (r,g).

Se denominan *funciones de igualación de color* (Fig. 5) a las series de valores triestímulo espectrales de E_λ en un determinado sistema de estímulos primarios (por ej. \mathbf{R} , \mathbf{G} , \mathbf{B}). A partir de los valores triestímulo $\bar{r}(\lambda)$, $\bar{g}(\lambda)$, $\bar{b}(\lambda)$ de cada estímulo monocromático E_λ , según la fórmula general, se obtienen las coordenadas cromáticas $r(\lambda)$, $g(\lambda)$, $b(\lambda)$. La representación en un diagrama cartesiano de todos los valores $r(\lambda)$, $g(\lambda)$ produce el denominado "*spectrum locus*", que define el **diagrama cromático-(r,g)** (Fig. 6). En el diagrama de cromaticidad-(r,g) el estímulo equienergético \mathbf{E} viene expresado por las coordenadas cromáticas:

$$r_E = g_E = 0,333$$

La línea recta que une los puntos extremos del *spectrum locus* ($\lambda_a=380$ nm, $\lambda_b=770$ nm) se denomina *línea de púrpuras* y representa la localización cromática de las mezclas aditivas de los estímulos situados en ambos extremos. La consideración de estas funciones de igualación de color permite calcular los valores triestímulo de un estímulo de color \mathbf{Q} según la ecuación para cada estímulo monocromático \mathbf{Q}_λ :

$$Q_\lambda = (P_\lambda d\lambda) E_\lambda = (P_\lambda d\lambda) \bar{r}(\lambda) \mathbf{R} + (P_\lambda d\lambda) \bar{g}(\lambda) \mathbf{G} + (P_\lambda d\lambda) \bar{b}(\lambda) \mathbf{B} \tag{14}$$

Asumiendo que P_λ es una función continua en el espectro visible, la ecuación [14] es integrable, esto es, los valores triestímulo $R=R_Q$, $G=G_Q$, $B=B_Q$ de un estímulo \mathbf{Q} vienen dados por las expresiones:

$$R = \int_{\lambda_a}^{\lambda_b} P_\lambda \bar{r}(\lambda) d\lambda \quad G = \int_{\lambda_a}^{\lambda_b} P_\lambda \bar{g}(\lambda) d\lambda \tag{15}$$

$$B = \int_{\lambda_a}^{\lambda_b} P_\lambda \bar{b}(\lambda) d\lambda$$

Sistema Colorimétrico CIE

A partir del concepto original de espacio triestímulo y de las ecuaciones colorimétricas básicas, la C.I.E. propuso en 1931, aunque se publicaría un año más tarde (CIE, 1932), su sistema colorimétrico basado en unas "Especificaciones sobre observadores estándares en colorimetría" y unas "Recomendaciones sobre cuestiones relacionadas".

La dificultad en el cálculo de los valores triestímulo \mathbf{R} , \mathbf{G} , \mathbf{B} según las ecuaciones básicas indujo a la C.I.E. a la adopción de otro sistema tricromático. Este sistema se basa en los experimentos que realizaron Guild (1931) y Wright (1928-1929) con observadores reales, en los que establecieron las magnitudes de los primarios que igualaban los colores espectrales. Mediante una transformación matricial, a partir de los primarios \mathbf{R} , \mathbf{G} , \mathbf{B} se definen los nuevos estímulos \mathbf{X} , \mathbf{Y} , \mathbf{Z} . Se trata de estímulos imaginarios y no igualables con los espectrales visibles, pero que aseguran que las coordenadas de cromaticidad x , y , z , no adopten valores negativos, cuyo significado físico podría resultar confuso en

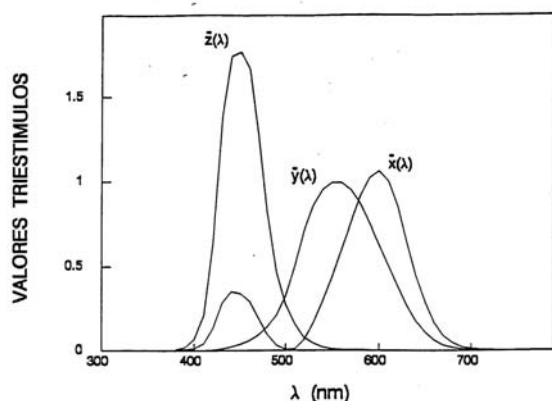


Figura 7. Funciones de Igualación de Color del Sistema XYZ.

su aplicación a la medida del color de materiales coloreados, como pueden ser los alimentos (Francis, 1975b; Clydesdale, 1975a,b; DeMan, 1976).

Asimismo, se definen las "funciones de igualación de color" como las propiedades del Observador Estándar CIE-1931 (u Observador de 2°), en el rango de longitudes de onda de la zona visible del espectro (Fig. 7). Se representan por:

$$\bar{x}(\lambda) \quad \bar{y}(\lambda) \quad \bar{z}(\lambda)$$

En 1964 se define un Observador Estándar Colorimétrico Suplementario (u Observador de 10°), completamente análogo al anterior, cuyas funciones de igualación de color son

$$\bar{x}_{10}(\lambda) \quad \bar{y}_{10}(\lambda) \quad \bar{z}_{10}(\lambda)$$

La C.I.E. define una serie de Diistribuciones Espectrales de Energía Radiante a las que se las denomina "Iluminantes Estándares CIE" [Committee on Colorimetry (O.S.A.), 1944b], y que vienen simbolizadas por la expresión general:

$$\{ S(\lambda) d(\lambda) \}$$

donde $S(\lambda)$, o distribución espectral relativa del iluminante, representa la concentración espectral de energía radiante incidente (Judd y Wyszecki, 1975; Wyszecki y Stiles, 1982).

Entre los diferentes iluminantes propuestos están:

- **Iluminante A**, que representa la luz de un radiador total a la temperatura absoluta de 2856 K, según la Escala Internacional Práctica de Temperatura 1968.
- **Iluminante B**, que representa la luz solar directa y se relaciona con una temperatura de color aproximada de 4874 K.
- **Iluminante C**, que se asimila con la luz diurna media (tradicionalmente luz de cielo nublado), con temperatura de color de, aproximadamente, 6774 K. Es, todavía, el más utilizado como referencia en la evaluación de color de alimentos, aunque en 1971 (CIE, 1971) fue eliminado, junto con el iluminante B, de la lista de iluminantes recomendados por presentar serias deficiencias en la distribución espectral en la región UV, importante en el caso de materiales fluorescentes. Según Judd (1933), se obtiene mediante el filtrado de la luz de lámpara de tungsteno definida como Iluminante A, a través de los filtros líquidos C_1 (en determinadas proporciones $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, manitol y piridina en agua) y C_2 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y H_2SO_4 en agua). En la Fig. 8 se observa la distribución espectral de energía radiante para el iluminante C.
- **Iluminante D_{65}** , se relaciona con una temperatura de color aproximada de 6504 K y representa una fase de la luz de día natural. Es el más utilizado actualmente y el que recomienda la CIE en la mayoría de los casos.
- **Iluminante D_{55}** , relacionado con una temperatura de color de 5503 K.
- **Iluminante D_{75}** , junto con el D_{55} son la alternativa al D_{65} recomendada por la CIE. Se relaciona con una temperatura de color de 7504 K.

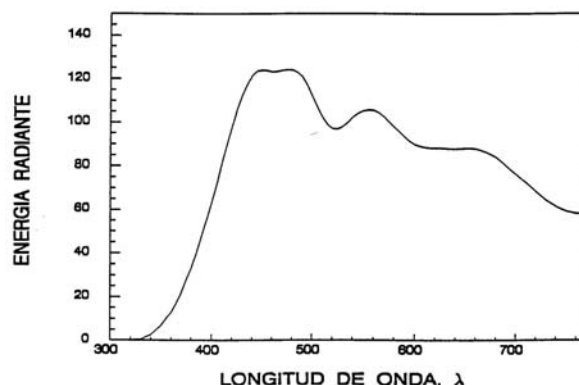


Figura 8. Distribución espectral de energía radiante del Iluminante Estándar C.

Sistemas CIE 1931-(x,y) y CIE 1964-(x₁₀,y₁₀) (CIEXYZ)**Cálculo de valores triestímulo y coordenadas de cromaticidad**

Para la definición de los valores triestímulos y el cálculo de las coordenadas de cromaticidad, la CIE propone las siguientes ecuaciones generales, de acuerdo con los dos observadores patrón

CIE 1931-(x,y)		CIE 1964-(x ₁₀ ,y ₁₀)	
$X = k \int_{\lambda} P_{\lambda} \bar{x}(\lambda) d(\lambda)$		$X_{10} = k_{10} \int_{\lambda} P_{\lambda} \bar{x}_{10}(\lambda) d(\lambda)$	
$Y = k \int_{\lambda} P_{\lambda} \bar{y}(\lambda) d(\lambda)$	[16]	$Y_{10} = k_{10} \int_{\lambda} P_{\lambda} \bar{y}_{10}(\lambda) d(\lambda)$	[17]
$Z = k \int_{\lambda} P_{\lambda} \bar{z}(\lambda) d(\lambda)$		$Z_{10} = k_{10} \int_{\lambda} P_{\lambda} \bar{z}_{10}(\lambda) d(\lambda)$	
$x = \frac{X}{X + Y + Z}$		$x_{10} = \frac{X_{10}}{X_{10} + Y_{10} + Z_{10}}$	
$y = \frac{Y}{X + Y + Z}$	[18]	$y_{10} = \frac{Y_{10}}{X_{10} + Y_{10} + Z_{10}}$	[19]
$z = \frac{Z}{X + Y + Z}$		$z_{10} = \frac{Z_{10}}{X_{10} + Y_{10} + Z_{10}}$	

donde X, Y, Z y X₁₀, Y₁₀, Z₁₀ son los valores triestímulos respectivos; x, y, x₁₀, y₁₀ son las coordenadas de cromaticidad de ambos sistemas coloreados. k y k₁₀ toman valores arbitrarios y son factores normalizantes. P_λ corresponde al componente monocromático de longitud de onda λ, en el estímulo coloreado. $\bar{x}(\lambda)$, $\bar{y}(\lambda)$, $\bar{z}(\lambda)$ y $\bar{x}_{10}(\lambda)$, $\bar{y}_{10}(\lambda)$, $\bar{z}_{10}(\lambda)$ son las funciones de igualación de color del espectro visible.

Se puede realizar una transformación de las ecuaciones generales a través de la definición del componente monocromático P(λ),

$$P(\lambda) = T(\lambda)S(\lambda) \quad [20]$$

donde T(λ) es la transmitancia espectral del objeto, y así se obtienen las ecuaciones especiales:

CIE 1931-(x,y)		CIE 1964-(x ₁₀ ,y ₁₀)	
$X = k \int_{\lambda} T(\lambda)S(\lambda)\bar{x}(\lambda)d(\lambda)$		$X_{10} = k_{10} \int_{\lambda} T(\lambda)S(\lambda)\bar{x}_{10}(\lambda)d(\lambda)$	
$Y = k \int_{\lambda} T(\lambda)S(\lambda)\bar{y}(\lambda)d(\lambda)$	[21]	$Y_{10} = k_{10} \int_{\lambda} T(\lambda)S(\lambda)\bar{y}_{10}(\lambda)d(\lambda)$	[22]
$Z = k \int_{\lambda} T(\lambda)S(\lambda)\bar{z}(\lambda)d(\lambda)$		$Z_{10} = k_{10} \int_{\lambda} T(\lambda)S(\lambda)\bar{z}_{10}(\lambda)d(\lambda)$	

que son aplicables a "estímulos objeto-color" (los producidos por la radiación transmitida o reflejada por un objeto) y en las que k y k₁₀ vienen definidas por las expresiones:

$$k = \frac{100}{\int_{\lambda} S(\lambda) \bar{y}(\lambda) d(\lambda)} \quad [23]$$

$$k_{10} = \frac{100}{\int_{\lambda} S(\lambda) \bar{y}_{10}(\lambda) d(\lambda)} \quad [24]$$

De esta forma, los valores triestímulos Y e Y₁₀ del difusor transmitente perfecto [T(λ) = 1,0 ó β(λ) = 1,0 , a todas las longitudes de onda] se hacen igual a 100.

Para objetos reflectantes en lugar de transmisores, ha de utilizarse la reflectancia espectral, β(λ). El valor triestímulo Y, así calculado, define el "factor de luminancia", a diferencia del factor Y₁₀ que no tiene tal significación fotométrica.

Transformación de las integrales en sumas

La complicación del cálculo integral lleva a que en los casos prácticos se haga una transformación en sumatorio de las integrales, utilizando dos métodos conocidos como de las ordenadas ponderadas y el de las ordenadas seleccionadas.

El método más comúnmente usado es el de las ordenadas ponderadas. A partir de los valores de transmitancia (T) obtenidos para intervalos constantes de longitud de onda (1, 5 ó 10 nm), se calculan los valores triestímulos por aplicación de las ecuaciones

$$\begin{aligned} & \text{CIE 1931-(x,y)} \\ X &= k \sum_{\lambda=\lambda_a}^{\lambda_b} T(\lambda) S(\lambda) \bar{x}(\lambda) \Delta(\lambda) \\ Y &= k \sum_{\lambda=\lambda_a}^{\lambda_b} T(\lambda) S(\lambda) \bar{y}(\lambda) \Delta(\lambda) \quad [25] \\ Z &= k \sum_{\lambda=\lambda_a}^{\lambda_b} T(\lambda) S(\lambda) \bar{z}(\lambda) \Delta(\lambda) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{CIE 1964-(x}_{10},y_{10}) \\ X_{10} &= k_{10} \sum_{\lambda=\lambda_a}^{\lambda_b} T(\lambda) S(\lambda) \bar{x}_{10}(\lambda) \Delta(\lambda) \\ Y_{10} &= k_{10} \sum_{\lambda=\lambda_a}^{\lambda_b} T(\lambda) S(\lambda) \bar{y}_{10}(\lambda) \Delta(\lambda) \quad [26] \\ Z_{10} &= k_{10} \sum_{\lambda=\lambda_a}^{\lambda_b} T(\lambda) S(\lambda) \bar{z}_{10}(\lambda) \Delta(\lambda) \end{aligned}$$

$$k = \frac{100}{\sum_{\lambda=\lambda_a}^{\lambda_b} S(\lambda) \bar{y}(\lambda) \Delta(\lambda)} \quad [27]$$

$$k_{10} = \frac{100}{\sum_{\lambda=\lambda_a}^{\lambda_b} S(\lambda) \bar{y}_{10}(\lambda) \Delta(\lambda)} \quad [28]$$

La concentración relativa de energía radiante, S(λ), es siempre constante dentro del intervalo de anchura Δλ. Por consiguiente, el producto con la función de igualación correspondiente es constante.

Un método alternativo es el de las ordenadas seleccionadas de Hardy (1936). Aquí los intervalos de λ en que se divide el espectro no son de anchura constante aunque su número es menor (generalmente 30, reduciéndose hasta 10 intervalos si los colores no difieren mucho del blanco o el gris). El criterio seguido al establecer los Δλ es la elección de la anchura, de tal modo que el producto S(λ)·ξ(λ)·Δλ sea constante para la longitud de onda media de cada intervalo. Después, se procede de igual forma que en el método de las ordenadas ponderadas. Diversos autores consideraron este método suficientemente preciso para la mayoría de los requerimientos, llegándose a diseñar ingeniosos aparatos que calculaban los valores triestímulos a partir de los datos espectrofotométricos (Swank y Mellon, 1937).

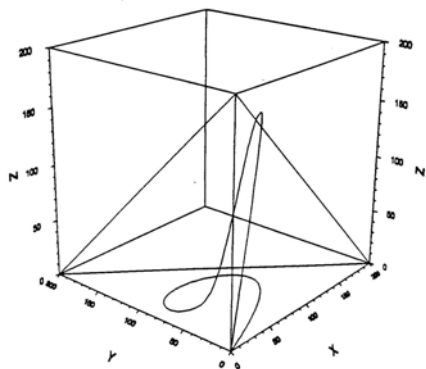


Figura 9. Espacio Triestímulo XYZ.

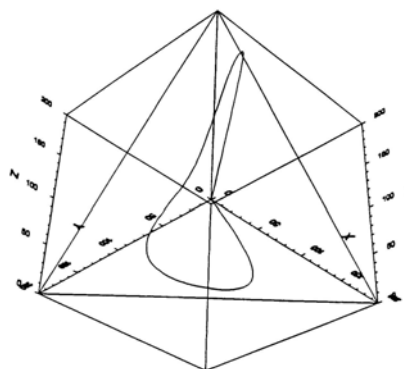


Figura 10. Rotación del Espacio XYZ.

Si en el espacio CIEXYZ se representan los valores triestímulos de los estímulos monocromáticos, E_{λ} , a lo largo del espectro visible, se obtiene la línea curva que muestra la Fig. 9. Rotando la gráfica adecuadamente se tiene una imagen aproximada de una de las posibles proyecciones sobre el plano unitario o diagrama de cromaticidad (Fig. 10).

La proyección que se elige en colorimetría, a partir del origen de coordenadas, es oblicua y se realiza sobre un triángulo rectángulo produciendo el "spectrum locus" o perímetro del diagrama cromático (Fig. 11). La línea de púrpuras representa las diferentes mezclas entre los estímulos monocromáticos extremos azul y rojo ($\lambda=400$ nm y $\lambda=770$ nm, respectivamente) (Fig. 12).

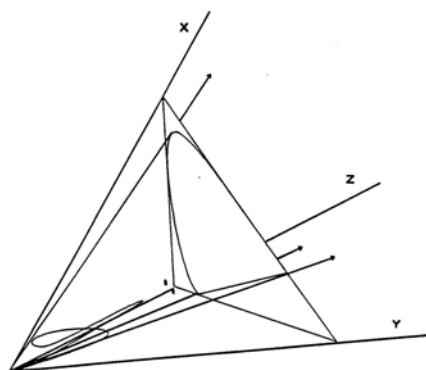


Figura 11. Proyección oblicua del Espacio XYZ.

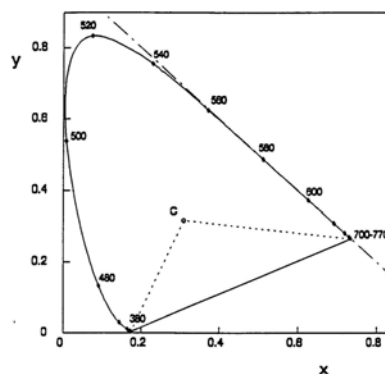


Figura 12. Diagrama cromático CIE 1931-(x,y) y spectrum locus.

Longitud de onda dominante y pureza

A partir del espacio CIE 1931 (x,y), y de su diagrama de cromaticidad, se proponen dos conceptos importantes en la caracterización del color: longitud de onda dominante, λ_d , y pureza o saturación.

La longitud de onda dominante de un estímulo coloreado es la correspondiente al estímulo monocromático que, mezclado con uno acromático (iluminante de referencia) produce la igualación con el color original. La Fig. 13 muestra las zonas de color predominante (Kelly, 1943).

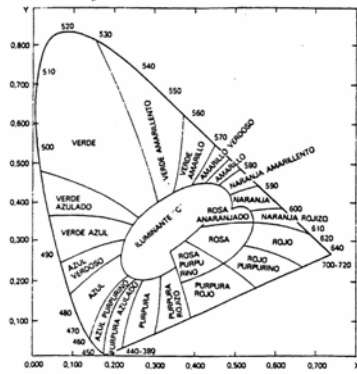


Fig. 13. Zonas de color predominante en el diagrama cromático (x,y) (Kelly, 1943).

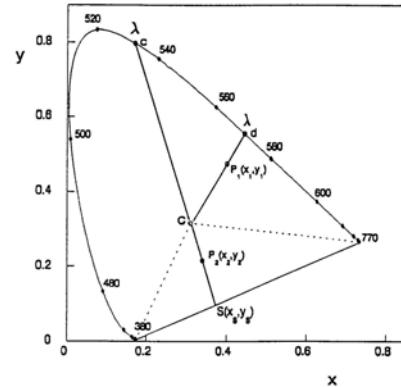


Fig. 14. Obtención gráfica de la longitud de onda dominante (λ_d) y de la longitud de onda complementaria (λ_c).

Para los estímulos cuya longitud de onda dominante aparecería en la llamada "línea de los púrpuras" (zona no espectral del "spectrum locus"), se prefiere el concepto de longitud de onda complementaria, λ_c. Corresponde a la del estímulo monocromático espectral linealmente opuesto (Fig. 14).

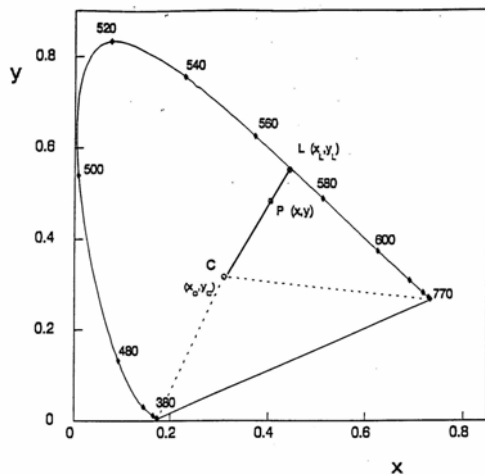


Fig. 15. Obtención gráfica de la pureza de excitación (P_e).

La saturación o pureza se define como el porcentaje de estímulo monocromático de λ_d en la mezcla que iguala el estímulo considerado. Se calcula mediante la relación de distancias al punto de acromaticidad (iluminante), en el diagrama, correspondientes al estímulo en cuestión y al estímulo monocromático (λ_d) (Fig. 15).

Se utilizan normalmente dos escalas diferentes de pureza:

- Pureza de excitación , en función de la coordenada (x ó y) a lo largo de la cual se orienta fundamentalmente el estímulo, con respecto a su longitud de onda dominante:

$$p_e(x) = \frac{x - x_C}{x_L - x_C} \quad \text{ó} \quad p_e(y) = \frac{y - y_C}{y_L - y_C} \quad [29]$$

donde p_e(x) y p_e(y) son las purzas de excitación en función de la coordenada x ó y, respectivamente; x_c, y_c son las coordenadas del iluminante o estímulo acromático; x_L, y_L son las del estímulo de longitud de onda λ_d, o el punto correspondiente en la línea de púrpuras.

- Pureza colorimétrica , análoga a la anterior y que se expresa en función de la orientación predominante del punto:

$$p_c(x) = \frac{y_L \cdot (x - x_C)}{y \cdot (x_L - x_C)} \quad \text{ó} \quad p_c(y) = \frac{y_L \cdot (y - y_C)}{y \cdot (y_L - y_C)} \quad [30]$$

La única diferencia entre ambas consiste en la consideración de x_L, y_L, en el caso de estímulos no espectrales, como las coordenadas del estímulo complementario. Por esta razón, la pureza colorimétrica de estímulos no espectrales puede adquirir valores negativos.

Algunos trabajos han puesto de manifiesto la falta de uniformidad del Espacio Cromático CIE 1931, demostrando que existen variaciones de magnitud y orientación de las elipses cuando consideran observadores diferentes (Brown y MacAdam, 1949).

Escala Uniforme UCS 1960

Hasta los años sesenta se habían propuesto diversos sistemas coloreados, a partir de la idea de transformar proyectivamente el espacio CIE (Judd, 1935), que fueron considerados por el Comité de Colorimetría CIE con el fin de conseguir espacios uniformes en los que las diferencias de color estuviesen correlacionadas con la apreciación visual, es decir, donde los colores con iguales diferencias observables puedan ser representados por puntos equidistantes.

Éstos dieron lugar a la recomendación de la Escala de Cromaticidad Uniforme CIE 1960 (UCS) (Fig. 16), propuesta por MacAdam (1937; 1942a; 1944), que es una transformación proyectiva del Diagrama de Cromaticidad CIE 1931 (x,y). Se definieron las nuevas coordenadas u,v, a partir de las siguientes expresiones:

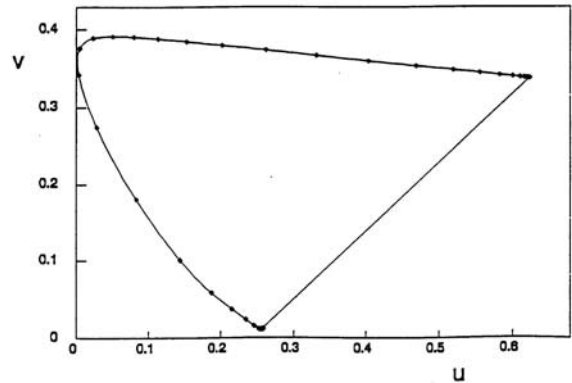


Figura 16. Escala de Cromaticidad Uniforme UCS 1960.

$$\begin{aligned}
 u &= \frac{4x}{-2x + 12y + 3} & u &= \frac{4X}{X + 15Y + 3Z} \\
 v &= \frac{6y}{-2x + 12y + 3} & v &= \frac{6Y}{X + 15Y + 3Z}
 \end{aligned}
 \tag{31}$$

en las que x, y, X, Y, Z son las coordenadas de cromaticidad y valores triestímulos, respectivamente, según el Observador Patrón CIE 1931.

Espacio U*V*W*

A partir del nuevo diagrama de cromaticidad UCS 1960, y basándose en el trabajo de Wyszecki (1963), la CIE considera, un año más tarde, una modificación tridimensional del mismo. Se trata del Sistema CIE 1964 (U*V*W*), en el que se incluyen los índices de cromaticidad U* y V* , y de luminosidad W*, los cuales se definen según las ecuaciones:

$$W^* = 25 \sqrt[3]{Y} - 17 \tag{32}$$

$$U^* = 13 W^* (u - u_o) \tag{33}$$

$$V^* = 13 W^* (v - v_o) \tag{34}$$

donde Y es el valor triestímulo CIE 1931; u,v, las coordenadas de cromaticidad CIE 1960 (UCS), correspondientes al estímulo coloreado en cuestión, y u_o , v_o, las del estímulo acromático relacionado con el iluminante de referencia. Para el caso del Iluminante C y el observador Estándar CIE 1931, estos valores son

$$u_o(C) = 0,2009 \qquad v_o(C) = 0,3073$$

Se propone, además, una fórmula para las diferencias de color que considera la influencia de la luminosidad en la cromaticidad:

$$\Delta E_{U^*V^*W^*} = \sqrt{(\Delta U^*)^2 + (\Delta V^*)^2 + (\Delta W^*)^2} \tag{35}$$

que es una extensión tridimensional del Teorema de Pitágoras para la distancia entre dos puntos del diagrama.

Espacio CIELUV

Dos espacios cromáticos completan la serie de Recomendaciones de la C.I.E. (1978): El espacio de color CIE 1976 $L^*u^*v^*$ (CIELUV), y el espacio de color CIE 1976 $L^*a^*b^*$ (CIELAB).

El espacio CIELUV es una modificación del sistema CIE 1964 ($U^*V^*W^*$). Este espacio coloreado incorpora una nueva Escala Uniforme de Color, CIE 1976 UCS (MacAdam, 1974; 1978; Nickerson, 1975), representada por el Diagrama de Cromaticidad (u',v') (Fig. 17) y directamente relacionado con el Diagrama de Cromaticidad (u,v) de 1960:

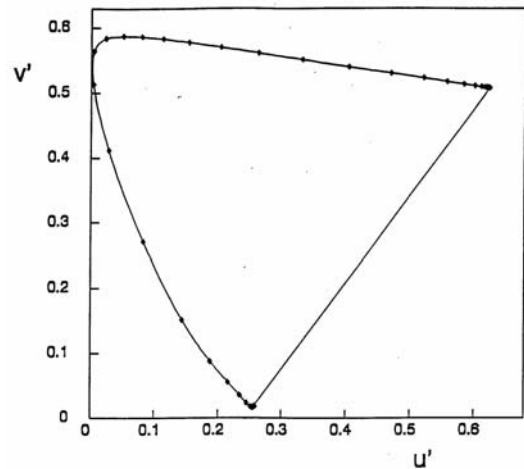


Fig. 17. Escala de Cromaticidad Uniforme UCS 1976.

$$u' = \frac{4X}{X + 15Y + 3Z} \quad v' = \frac{X - Y + Z}{X + 15Y + 3Z}$$

[36]

con lo que $u' = u$ y $v' = 1,5 \cdot v$

El espacio CIELUV viene determinado por la respuesta tridimensional en coordenadas rectangulares de las cantidades de "Claridad Psicométrica", L^* , y cromaticidad u^* , v^* . Se definen por las expresiones:

$$L^* = 116 \sqrt[3]{\frac{Y}{Y_n}} - 16 \quad [37]$$

$$u^* = 13 L^* (u' - u'_n) \quad [38]$$

$$v^* = 13 L^* (v' - v'_n) \quad [39]$$

donde u', v' representan la cromaticidad de un estímulo coloreado; u'_n, v'_n la del estímulo blanco correspondiente al iluminante de referencia; Y, Y_n son los valores triestímulos CIE 1931, para el estímulo considerado y el estímulo blanco, respectivamente.

En el caso del Iluminante C y el Observador Estándar CIE 1931, u',n y v',n toman los valores

$$u'_n(C) = u_o(C) = 0,2009$$

$$v'_n(C) = 1,5 v_o(C) = 0,4610$$

Valores muy bajos de Y/Y_n pueden dar lugar a claridades negativas, por lo que se recomienda otra fórmula para L^* (en este caso L^*_m):

$$L^*_m = 903,3 \left(\frac{Y}{Y_n} \right) \quad \text{para } Y/Y_n \leq 0,008856 \quad [40]$$

Esta modificación se debe a Pauli (1976).

En este sistema, la fórmula para diferencias de color propuesta es análoga a la anterior, y también considera

conjuntamente la claridad y cromaticidad:

$$\Delta E_{uv}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta u^*)^2 + (\Delta v^*)^2} \quad [41]$$

Espacio CIELAB

El espacio de Color CIE 1976 L*a*b* (CIELAB), que procede de los sistemas de raíz cúbica (Glasser *et al.*, 1958) como el Sistema ANLAB (Glasser y Troy, 1952), queda definido, tal como muestra la Fig. 18, cuando se representan en coordenadas rectangulares las siguientes expresiones para claridad, L*, y cromaticidad, a*, b*:

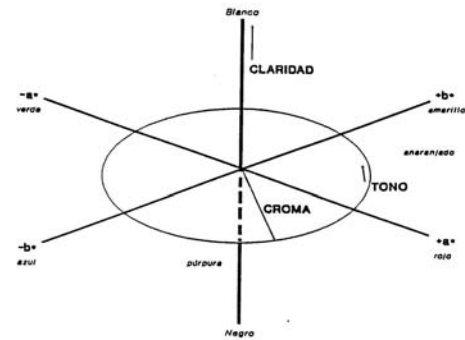


Fig. 18. Coordenadas cartesianas y cilíndricas del Espacio de Color CIE 1976-(L*a*b*) (CIELAB).

- **Claridad (L*)**, que se define igual que en el sistema CIELUV y, análogamente, hay que considerar la modificación de Pauli (1976) para evitar la pérdida de uniformidad para valores de $Y/Y_n < 0,008856$.

$$L^* = 116 \sqrt[3]{\frac{Y}{Y_n}} - 16 \quad \text{para } Y/Y_n > 0,008856 \quad [42]$$

$$L_m^* = 903,3 \left(\frac{Y}{Y_n} \right) \quad \text{para } Y/Y_n \leq 0,008856 \quad [43]$$

- **Cromaticidad (a*, b*)**:

$$a^* = 500 \left[f \left(\frac{X}{X_n} \right) - f \left(\frac{Y}{Y_n} \right) \right] \quad [44]$$

$$b^* = 200 \left[f \left(\frac{Y}{Y_n} \right) - f \left(\frac{Z}{Z_n} \right) \right] \quad [45]$$

siendo:

$$f \left(\frac{X}{X_n} \right) = \sqrt[3]{\frac{X}{X_n}} \quad \text{para } X/X_n > 0,008856 \quad [46]$$

$$f \left(\frac{X}{X_n} \right) = 7,787 \left(\frac{X}{X_n} \right) + \frac{16}{116} \quad \text{para } X/X_n \leq 0,008856 \quad [47]$$

$$f \left(\frac{Y}{Y_n} \right) = \sqrt[3]{\frac{Y}{Y_n}} \quad \text{para } Y/Y_n > 0,008856 \quad [48]$$

$$f \left(\frac{Y}{Y_n} \right) = 7,787 \left(\frac{Y}{Y_n} \right) + \frac{16}{116} \quad \text{para } Y/Y_n \leq 0,008856 \quad [49]$$

$$f \left(\frac{Z}{Z_n} \right) = \sqrt[3]{\frac{Z}{Z_n}} \quad \text{para } Z/Z_n > 0,008856 \quad [50]$$

$$f \left(\frac{Z}{Z_n} \right) = 7,787 \left(\frac{Z}{Z_n} \right) + \frac{16}{116} \quad \text{para } Z/Z_n \leq 0,008856 \quad [51]$$

los valores X_n , Y_n , Z_n corresponden al estímulo considerado como blanco. Para el iluminante C y el Observador Estándar CIE 1931,

$$X_n = 98,041 \quad Y_n = 100 \quad Z_n = 118,103$$

La diferencia de color queda definida por:

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad [52]$$

Al contrario de lo que sucede con los espacios coloreados CIE 1964 (U*V*W*) y CIELUV, el espacio CIELAB no está relacionado directamente con el espacio CIE 1931 (x,y). Mientras que algunos autores (Lozano, 1977; 1979) ponen de manifiesto las diferencias existentes entre los sistemas CIELUV y CIELAB, asegurando que se dan indicios de la superioridad de los sistemas tipo *raíz cúbica* (ANLAB, CIELAB), otros estudios (McLaren, 1970; 1981) parecen demostrar fehacientemente que, en la práctica, estas diferencias no son significativas en orden a la caracterización cromática de los objetos.

En algunos casos, parece obligada la consideración de los sistemas colorimétricos uniformes. En este sentido existen diversos trabajos que demuestran

- desviaciones graduales de uniformidad en el espacio CIEUVW (Wyszecki, 1975)
- fallos en la predicción cromática que presenta el observador estándar de la CIE (Hita *et al.*, 1988).

Por otro lado, aunque el espacio CIELAB se recomienda en numerosas aplicaciones prácticas (Artigas *et al.*, 1985), en ocasiones puede presentar algunas limitaciones y anomalías que desaconsejen su uso, siendo conveniente en estos casos tomar como alternativa el sistema CIELUV (Felipe y Artigas, 1986). En este sentido, Hita *et al.* (1985) realizan un interesante estudio comparativo entre los cuatro sistemas de especificación del color, encontrando evoluciones similares entre CIEXYZ y CIELAB por un lado, y entre CIEUVW y CIELUV, por otro. Llegan a la conclusión de que todavía hay mucho por hacer en la consecución de un espacio verdaderamente uniforme.

Existen otros sistemas y espacios coloreados recomendados en la bibliografía, como es el caso del espacio LABHNU 1977 (Richter, 1980); el espacio "zeta" de Saunderson-Milner (1946), producto de una modificación del Sistema Munsell de Colores; la escala RUCS ("Rectangular Uniform-Chromaticity-Scale"), aún muy usada en luces de señalización (Breckenridge y Schaub, 1939); los sistemas de representación de color ATD y ATDN (Hita *et al.*, 1987).

Parámetros Psicométricos Uniformes

A partir de los índices de claridad-cromaticidad (L^* , u^* , v^* , a^* , b^*) definidos por los espacios CIELUV y CIELAB, se recomiendan otros componentes del color, importantes en su especificación psicofísica. Así,

- Croma (C^*, u_v , C^*, a_b), función dependiente de las coordenadas de cromaticidad,

$$C_{uv}^* = \sqrt{(u^*)^2 + (v^*)^2} \quad [53]$$

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad [54]$$

- Saturación (s^*, u_v), explicitada en el sistema CIELUV por la expresión:

$$s_{uv}^* = 13 \sqrt{(u' - u_{n'})^2 + (v' - v_{n'})^2} \quad [55]$$

y que se puede calcular a partir del croma y la claridad,

$$s_{uv}^* = \frac{C_{uv}^*}{L^*} \quad [56]$$

En el sistema CIELAB no se aplica una correlación similar para la saturación.

- Tono (h_{uv} , h_{ab}), que es el ángulo, en grados sexagesimales, formado entre el vector que representa al punto en el diagrama y el eje de abscisas:

$$h_{uv} = \arctan\left(\frac{v^*}{u^*}\right) \quad [57]$$

$$h_{ab} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad [58]$$

Según los valores que adopten las coordenadas cromáticas, este ángulo se sitúa en un determinado cuadrante,

- si $u^* > 0$ y $v^* > 0 \Rightarrow 0^\circ < h < 90^\circ$
- si $u^* < 0$ y $v^* > 0 \Rightarrow 90^\circ < h < 180^\circ$
- si $u^* < 0$ y $v^* < 0 \Rightarrow 180^\circ < h < 270^\circ$
- si $u^* > 0$ y $v^* < 0 \Rightarrow 270^\circ < h < 360^\circ$

En todas estas correlaciones psicométricas, de los conceptos de luminosidad, croma y matiz, con la percepción visual, hemos de tener en cuenta la influencia que pueden ejercer las condiciones de observación.

Las diferencias de tono (ΔH^*_{uv} , ΔH^*_{ab}) entre dos estímulos coloreados aparecen como función de las diferencias de color, corregidas por la claridad y el croma,

$$\Delta H^*_{uv} = \sqrt{(\Delta E^*_{uv})^2 - (\Delta L^*)^2 - (\Delta C^*_{uv})^2} \quad [59]$$

$$\Delta H^*_{ab} = \sqrt{(\Delta E^*_{ab})^2 - (\Delta L^*)^2 - (\Delta C^*_{ab})^2} \quad [60]$$

Cuando se trata de pequeñas diferencias entre pares de estímulos suficientemente alejados del estímulo acromático, se puede emplear,

$$\Delta H^*_{uv} = \frac{C^*_{uv} h_{uv} \pi}{180} \quad [61]$$

$$\Delta H^*_{ab} = \frac{C^*_{ab} h_{ab} \pi}{180} \quad [62]$$

donde la diferencia de matiz es el tono, expresado en radianes, corregido por el valor del croma.

Se planteó una interesante polémica en cuanto a la conveniencia del cálculo del Tono (h), en el color de alimentos, mediante el cociente a/b defendido inicialmente por Francis (1975a), o si era preferible, en cuanto a la interpretación de resultados, la consideración de b/a, tesis defendida por Little (1975) y que se impuso finalmente.

Diferencias de Color

Desde el punto de vista del uso industrial, quizás sea más importante que medir un color, el determinar las magnitudes de las diferencias respecto de un color de referencia o patrón. En otras palabras, puede ser más necesario evaluar la uniformidad de la producción de un color que conocer su real magnitud (Lozano, 1978).

La mayor y más completa contribución a este problema se debe a MacAdam (1942b; 1943a,b; Brown y MacAdam, 1949), que construyó un aparato para la discriminación de cromaticidad con el cual un sólo observador llegó a realizar 25000 determinaciones. Estos experimentos llevaron a MacAdam a considerar las áreas asociadas a una serie de colores investigados (en las que el observador establecía una igualdad) para la elaboración de un modelo matemático que pudiera extenderse a toda el área cromática. Dichas áreas, llamadas por su especial forma *Elipses de MacAdam*, no presentan uniformidad ni en magnitud, ni en orientación entre sí, ni entre observadores, lo que hace que el problema de

la generalización a todo el diagrama sea más complicado de lo que podría parecer.

Otros autores han contribuido posteriormente a la resolución del problema de la medición instrumental de pequeñas diferencias de color (Hunter, 1948). Wyszecki (1965; 1972) y Wyszecki y Fielder (1971) han realizado estudios con varios observadores en los que se mide la variabilidad en las elipses, y cuyos resultados concuerdan con los de MacAdam.

En nuestro país existen trabajos en relación al problema de las diferencias de color (Hita *et al.*, 1989; Melgosa *et al.*, 1990) así como estudios sobre los *elementos de línea*, en el diagrama CIE 1931-(x,y), muy relacionados con las elipses de MacAdam (Romero *et al.*, 1986b).

En la Legislación española existe ya una recomendación sobre algunos de los sistemas cromáticos estudiados, y que se consideran en la Norma UNE 72-031-83 (UNE, 1983) sobre *Magnitudes colorimétricas*. Esta norma tiene por objeto "definir las magnitudes derivadas matemáticamente de los valores triestímulos, respuestas primarias de los detectores que definen los observadores colorimétricos UNE-3 y UNE-4 (según normas UNE 72-014 y UNE 72-015), y que pueden considerarse por tanto como respuestas de éstos a un estímulo luminoso. Tratando de imitar los observadores reales, estas respuestas se hacen depender del tipo de estímulo y del blanco de referencia".

La norma reproduce las definiciones de magnitudes y términos del Espacio coloreado CIE 1976 ($L^*a^*b^*$) (CIELAB), además de establecer una clasificación de los estímulos visuales en cuanto a su luminancia relativa:

Estímulo independiente: "Estímulo único o de luminancia muy superior a la de los estímulos que le rodean, que ante los observadores reales aparece como fuente primaria de luz".

Estímulo dependiente: "Estímulo rodeado por otros de luminancias no todas muy bajas con respecto a él, que ante los observadores reales aparece como estímulo no autoluminoso".

Estímulo blanco de referencia: "Estímulo que, por convenio, se considera que aparece como blanco (color acromático de la máxima claridad) al observador UNE correspondiente, en las circunstancias de observación de que se trate.

En la norma se consideran las magnitudes, tomadas del espacio CIELAB: *coordenadas colorimétricas* (L^*, a^*, b^*), *claridad* (L^*), *croma* (C^*), *tono* (H^*), *saturación* (S^*). Además considera y define el parámetro *Luminosidad* (Q^*) como una magnitud derivada de la claridad L^* y de la luminancia del blanco de referencia Y_N . Con el término *cromaticidad* designa la variable bidimensional que considera el conjunto de dos magnitudes que, junto con la claridad, pueden definir el color de un estímulo: (a^*, b^*) ó (C^*, H^*) ó (S^*, H^*).

Bibliografía

- ADAMS, E.Q. (1923). A theory of colour vision. *Psych. Rev.* **30**, 56-76.
- ADAMS, E.Q. (1942). X-Z Planes in the 1931 I.C.I. System of Colorimetry. *J. Opt. Soc. Am.* **32**, 168-173.
- ALVAREZ-CLARO, M.; HITA, E. (1978). Espacio de color y estructura matemática. Parte segunda. *Optica Pura y Aplicada* **11(2)**, 119-122.
- ALVAREZ-CLARO, M.; HITA, E.; PARDO, G. (1976). Espacio de color y estructura matemática. *Optica Pura y Aplicada* **9(2)**, 109-111.
- ARTIGAS, J.M.; GIL, J.C.; FELIPE, A. (1985). El espacio uniforme de color CIELAB. Utilización. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **25(3)**, 316-320.
- BRECKENRIDGE, F.C.; SCHAUB, W.R. (1939). Rectangular Uniform-Chromaticity-Scale Coordinates. *J. Opt. Soc. Am.* **29**, 370-380.
- BROWN, W.R.J.; MacADAM, D.L. (1949). Visual Sensitivities to Chromaticity and Luminance Differences. *J. Opt. Soc. Am.* **39(10)**, 808-834.
- CALVO, C. (1989). Atlas de color. Fundamentos y aplicaciones. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **29(1)**, 15-29.
- C.I.E. (1932). *C.I.E. Proceedings 1931*. Cambridge University Press, Cambridge. p. 19.
- C.I.E. (1971). *Colorimetry (Official Recommendations of the International Commission on Illumination)*, CIE Publication No. 15 (E-1.3.1). Bureau Central de la CIE, Paris.
- C.I.E. (1978). *Recommendations on Uniform Color Spaces, Color-Difference Equations, Psychometric Color*

- Terms, CIE Publication No. 15 (E-1.3.1) 1971, Supplement 2. Bureau Central de la CIE, Paris.*
- CLYDESDALE, F.M. (1969). The measurement of color. *Food Technol.* **23(1)**, 16-22.
 - COMMITTEE ON COLORIMETRY (O.S.A.) (1944). Quantitative Data and Methods for Colorimetry. *J. Opt. Soc. Am.* **34(11)**, 633-688.
 - CHAPANIS, A. (1965). Color names for color space. *Am. Sci.* **53**, 327-346.
 - FELIPE, A.; ARTIGAS, J.M. (1986). Limitaciones, anomalías y particularidades del espacio uniforme de color CIELAB. *Optica Pura y Aplicada* **19(3)**, 173-178.
 - FOSS, C.E.; NICKERSON, D.; GRANVILLE, W.C. (1944). Analysis of the Ostwald Color System. *J. Opt. Soc. Am.* **34(7)**, 361-381.
 - FRANCIS, F.J. (1975a). The origin of $\tan^{-1} a/b$. *J. Food Sci.* **40**, 412.
 - GLASSER, L.G.; MCKINNEY, C.D.; REILLY, C.D.; SCHNELLE, P.D. (1958). Cube-Root Color Coordinate System. *J. Opt. Soc. Am.* **48(10)**, 736-740.
 - GLASSER, L.G.; TROY, D.J. (1952). A new high sensitivity differential colorimeter. *J. Opt. Soc. Am.* **42**, 652.
 - GOETHE, J.W. (1945). Esbozo de una teoría de los colores (Entwurf einer farbenlehre); en *Obras Completas, vol. I (4a.,ed)*. Ed. Aguilar, Madrid. p. 473-734.
 - GRASSMANN, H.G. (1853). Zur Theorie der Farbenmischung. *Poggendorff's Ann. Phys.* **89**, 69-84.
 - GUILD, J. (1931). The colorimetric properties of the spectrum. *Phil. Trans. Roy. Soc. A* **230**, 149-187.
 - HARDY, A.C. (1936). *Handbook of Colorimetry*. The Technology Press, Cambridge, Massachusetts.
 - HELMHOLTZ, H.L.v. (1852). Ueber die Theorie der zusammengesetzten Farben. *Poggendorff's Ann.* **87**, 45.
 - HITTA, E.; JIMENEZ DEL BARCO, L.; ROMERO, J.; CORRONS, A. (1988). Análisis colorimétrico del observador patrón CIE. *Optica Pura y Aplicada* **21(1)**, 13-25.
 - HITTA, E.; MELGOSA, M.; JIMENEZ DEL BARCO, L.; ROMERO, J. (1989). Coeficientes métricos y fórmulas de diferencia de color asociadas a la discriminación cromática con presentación en modo de objeto. *Optica Pura y Aplicada* **22(3)**, 133-145.
 - HITTA, E.; MELGOSA, M.; ROMERO, J.; JIMENEZ DEL BARCO, L. (1987). Estudio de la uniformidad de los sistemas de representación del color ATD y ATDN. *Optica Pura y Aplicada* **20(1)**, 39-47.
 - HITTA, E.; ROMERO, J.; JIMENEZ DEL BARCO, L.; CARRILLO, A. (1985). Experimental study of color specification systems. *Optica Pura y Aplicada* **18(2)**, 123-133.
 - HUNTER, R.S. (1948). Photoelectric Color-Difference Meter. *J. Opt. Soc. Am.* **38**, 661.
 - INGLE, G.W. (1962). Medición del color; en *Enciclopedia de Tecnología Química, vol. IV* (R.E. Kirk; D. Othmer,ed). Union Tipográfica Editorial Hispano-Americana, Mexico. p. 107-117.
 - JUDD, D.B. (1933). The 1931 I.C.I. Standard Observer and Coordinate System for Colorimetry. *J. Opt. Soc. Am.* **23(10)**, 359-374.
 - JUDD, D.B. (1935). A Maxwell Triangle Yielding Uniform Chromaticity Scales. *J. Opt. Soc. Am.* **25**, 24-35.
 - JUDD, D.B. (1949). Response functions for types of vision according to Muller theory. *J. Res. NBS* **42**, 1-15.
 - JUDD, D.B.; WYSZECKI, G. (1975). *Color in business, science and industry, 3rd ed.* John Wiley & Sons, New York. p. 91-396.
 - KELLY, K.L. (1943). Color Designations for Lights. *J. Opt. Soc. Am.* **33(11)**, 627-632.
 - LITTLE, A.C. (1963). Evaluation of single-number expressions of color difference. *J. Opt. Soc. Am.* **53**, 293-296.
 - LITTLE, A.C. (1973). A dualistic concept of colorimetry. *Die Farbe* **22**, 281.
 - LITTLE, A.C. (1975). Off on a tangent. *J. Food Sci.* **40**, 410-411.
 - LITTLE, A.C.; MACKINNEY, G. (1969). The sample as a problem. *Food Technol.* **23(1)**, 25-28.
 - LOZANO, R.D. (1977). Evaluation of different color-difference formulae by means of an experiment on color scaling. Preliminary report. *Color Res. Appl.* **2(1)**, 13-18.
 - LOZANO, R.D. (1978). *El color y su medición*. Ed. America Lee, Buenos Aires.
 - LOZANO, R.D. (1979). Diferencias de color. *Investigación y Ciencia, Diciembre*, 8-14.
 - MacADAM, D.L. (1937). Projective transformations of ICI color specification. *J. Opt. Soc. Am.* **27(8)**, 294-299.

- MacADAM, D.L. (1942a). Projective Transformations of Color-Mixture Diagrams. *J. Opt. Soc. Am.* **32(1)**, 2-6.
- MacADAM, D.L. (1942b). Visual Sensitivities to Color Differences in Daylight. *J. Opt. Soc. Am.* **32(5)**, 247-274.
- MacADAM, D.L. (1943a). Specification of Small Chromaticity Differences. *J. Opt. Soc. Am.* **33(1)**, 18-26.
- MacADAM, D.L. (1943b). The Graphical Representation of Small Color Differences. *J. Opt. Soc. Am.* **33(11)**, 675-679.
- MacADAM, D.L. (1944). On the geometry of color space. *J. Franklin Inst.* **238**, 195-210.
- MacADAM, D.L. (1974). Uniform color scales. *J. Opt. Soc. Am.* **64(12)**, 1691-1702.
- MacADAM, D.L. (1978). Colorimetric data for samples of OSA uniform color scales. *J. Opt. Soc. Am.* **68(1)**, 121-130.
- MAERZ, A.; PAUL, M.R. (1950). *A Dictionary of Color, 2nd ed.* McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.
- MAXWELL, J.C. (1860). On the theory of compound colours, and the relations of the colours of the spectrum. *Phil. Trans. Roy. Soc.* **150**, 57-84.
- McLAREN, K. (1970). The precision of textile colour matchers in relation to colour difference measurements. *Proc. AIC-Color 69*, Estocolmo, p. 688-708.
- McLAREN, K. (1981). *Golden Jubilee of Colour in the CIE* (Society of Dyers and Colourists, ed). S.D.C., Bradford. p. 168.
- McLAREN, K. (1983). *The Colour Science of Dyes and Pygments*. Adam Hilger Ltd., Bristol. p. 94-140.
- MELGOSA, M.; HITTA, E.; ROMERO, J.; JIMENEZ DEL BARCO, L. (1990). Fórmulas de diferencia de color. *Optica Pura y Aplicada* **23(3)**, 137-146.
- MOON, P.; SPENCER, D.E. (1943). A Metric for Colorspace. *J. Opt. Soc. Am.* **33(5)**, 260-269.
- MUNSELL COLOR COMPANY (1966). *Munsell Book of Color*. Munsell Color Co., Inc., Baltimore.
- MUNSELL, A.H. (1905). *A Color Notation*. Boston Ellis, Baltimore.
- MUNSELL, A.E.O.; SLOAN, L.L.; GODLOVE, I.H. (1933). Neutral Values Scales. I. Munsell Neutral Value Scale. *J. Opt. Soc. Am.* **23**, 394-411.
- NEWHALL, S.M.; NICKERSON, D.; JUDD, D.B. (1943). Final Report of the O.S.A. Subcommittee on the Spacing of the Munsell Colors. *J. Opt. Soc. Am.* **33(7)**, 385-416.
- NEWTON, I. (1672). A new theory about light and colours. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, 3075-3087.
- NEWTON, I. (1704). *Optics*. W. Innys, Londres.
- NICKERSON, D. (1950). Munsell Renotations Used to Study Color Space of Hunter and Adams. *J. Opt. Soc. Am.* **40(2)**, 85-88.
- NICKERSON, D. (1975). Uniform color scales: Munsell conversion of OSA committee selection. *J. Opt. Soc. Am.* **65(2)**, 205-207.
- PAULI, H. (1976). Proposed extension of the CIE recommendation on uniform color spaces, color difference equations, and metric color terms. *J. Opt. Soc. Am.* **66**, 866-867.
- REILLEY, C.N.; SMITH, E.M. (1960). Chemical Applications of Complementary Tristimulus Colorimetry. *Anal. Chem.* **32(10)**, 1233-1240.
- RICHTER, M. (1953). The official german standard color chart. *J. Opt. Soc. Am.* **45(3)**, 223-226.
- RICHTER, K. (1980). Cube-Root Color Spaces and Chromatic Adaptation. *Color Res. Appl.* **5(1)**, 25-43.
- ROMERO, J.; HITTA, E.; LOPEZ-LAFUENTE, M. (1986). Análisis y obtención de elementos de línea en el diagrama cromático CIE 1931. *Optica Pura y Aplicada* **19(3)**, 179-203.
- SANCHO, J.; SERNA, A.; NAVARRO, F. (1962). Color en las especies *Capsicum*. II. Un método para la determinación de color. *Anal. Bromatol.* **14**, 35-50.
- SAUNDERSON, J.L.; MILNER, B.I. (1946). Modified Chromatic Value Color Space. *J. Opt. Soc. Am.* **36(1)**, 36-42.
- SHERMAN, P.D. (1981). *Colour vision in the 19th Century*. Adam Hilger Ltd., Bristol.
- SWANK, H.W.; MELLON, M.G. (1937). A Calculator for Obtaining Tristimulus Values from

- Spectrophotometric Data. *J. Opt. Soc. Am.* **27**, 414-415.
- U.N.E. (1983). *Norma UNE 72-031-83: Magnitudes colorimétricas*. Instituto Español de Normalización (IRANOR), Madrid. p. 1-4.
 - WRIGHT, W.D. (1928-29). A re-determination of the trichromatic coefficients of the spectral colours. *Trans. Opt. Soc.* **30**, 141.
 - WYSZECKI, G. (1965). Matching Color-Differences. *J. Opt. Soc. Am.* **55(10)**, 1319-1324.
 - WYSZECKI, G. (1972). Color Matching and Color-Difference Matching. *J. Opt. Soc. Am.* **62(1)**, 117-128.
 - WYSZECKI, G. (1975). Uniform color scales: CIE 1964 U. *J. Opt. Soc. Am.* **65(4)**, 456-460.
 - WYSZECKI, G.; FIELDER, G.H. (1971). Color-Difference Matches. *J. Opt. Soc. Am.* **61(11)**, 1501-1513.
 - WYSZECKI, G.; STILES, W.S. (1982). *Color Science. Concepts and Methods. Quantitative Data and Formulae, 2nd ed.* John Wiley & Sons, Inc, New York. p. 117-248.
 - YOUNG, T. (1802a). On the theory of light and colours. *Phil. Trans. Roy. Soc.* **1802**, 12-48.
 - YOUNG, T. (1802b). An account of some cases of the production of colours, not hitherto described. *Phil. Trans. Roy. Soc.* **1802**, 734-740.

Abreviaturas de pigmentos identificados

1. Mv 3-gl-cat: Aducto Malvidina 3-*O*-glucósido-catequina
2. Df 3-gl / Dp 3-glc: Delfinidina 3-*O*-glucósido
3. Pt 3-gl: Petunidina 3-*O*-glucósido
4. Mv 3-cafglc: Malvidina 3-*O*-(6'-*p*-cafeoil)-glucósido
5. Pn 3-gl: Peonidina 3-*O*-glucósido
6. Mv 3-gl: Malvidina 3-*O*-glucósido
7. Mv 3-acetylgc-cat: Aducto Malvidina 3-*O*-(6'-acetil)-glucósido-catequina
8. Dp 3-acetylgc: Delfinidina 3-*O*-(6'-acetil)-glucósido
9. Vitisin A: Vitisina A
10. Vitisin B: Vitisina B
11. A-type vitisin of Mv-3-acetylgc: Vitisina tipo A de Malvidina 3-*O*-(6'-acetil)-glucósido
12. B-type vitisin of Pn-3-acetylgc: Vitisina tipo B de Peonidina 3-*O*-(6'-acetil)-glucósido
13. AcPt / Pt 3-acetylgc: Petunidina 3-*O*-(6'-acetil)-glucósido
14. B-type vitisin of Mv-3-acetylgc: vitisina B de Peonidina 3-*O*-(6'-acetil)-glucósido
15. Pn 3-*p*-coumgc-cat: Aducto Peonidina 3-*O*-(6'-*p*-cumaroil)-glucósido-catequina
16. Mv 3-glc-ethyl-cat: Malvidina 3-*O*-glucósido-8-etil-catequina
17. AcPn / Pn 3-acetylgc: Peonidina 3-*O*-(6'-acetil)-glucósido
18. AcMv / Mv 3-acetylgc: Malvidina 3-*O*-(6'-acetil)-glucósido
19. Dp 3-*p*-coumgc: Delfinidina 3-*O*-(6'-*p*-cumaroil)-glucósido
20. A-type vitisin of Mv-3-*p*-coumgc: Vitisina tipo A de Malvidina 3-*O*-(6'-*p*-cumaroil)-glucósido
21. Cy 3-*p*-coumgc: Cianidina 3-*O*-(6'-*p*-cumaroil)-glucósido
22. CumPt / Pt 3-*p*-coumgc: Petunidina 3-*O*-(6'-*p*-cumaroil)-glucósido
23. B-type vitisin of Mv 3-*p*-coumgc: Vitisina tipo B de Malvidina 3-*O*-(6'-*p*-cumaroil)-glucósido
24. Mv-3-acetylgc-ethyl-cat : Malvidina 3-*O*-(6'-acetil)-glucósido-8-etil-catequina
25. Pt 3-glc-py-ethyl-cat : Aducto Petunidina 3-*O*-glucósido- 8-etil-catequina
26. Mv 3-*p*-coumgc-4-ethyl-cat: Aducto Malvidina 3-*O*-(6'-*p*-cumaroil)-etil-catequina
27. Mv 3-glc 4-vinylcatechol: Aducto Malvidina 3-*O*-glucósido-4-vinilcatecol
28. CumPn / Pn 3-*p*-coumgc: Peonidina 3-*O*-(6'-*p*-cumaroil)-glucósido
29. CumMv / Mv 3-*p*- coumgc : Malvidina 3-*O*-(6'-*p*-cumaroil)-glucósido
30. Mv 3-glc-4-vinyl-cat: Aducto Malvidina 3-*O*-glucósido-4-vinilcatequina
31. Mv-3-acetylgc-4-vinyl-cat: Aducto Malvidina 3-*O*-(6'-acetil)-glucósido-4-vinilcatequina
32. Mv 3-glc 4-vinylphenol: Aducto Malvidina 3-*O*- glucósido-4-vinilfenol

