



**Departamento de Química Agrícola y Edafología  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**ESTUDIO DE LA RETENCIÓN DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS FORMADOS DURANTE EL  
PARDEAMIENTO EN VINOS BLANCOS**

*AZAHARA LÓPEZ TOLEDANO*



ESTUDIO DE LA RETENCIÓN DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS FORMADOS DURANTE EL PARDEAMIENTO  
EN VINOS BLANCOS

TRABAJO PRESENTADO PARA OPTAR AL  
GRADO DE *DOCTOR EUROPEO* EN CIENCIAS QUÍMICAS.

CÓRDOBA, ABRIL DE 2002

Fdo.: M<sup>a</sup> AZAHARA LÓPEZ TOLEDANO

LOS DIRECTORES

FDO. MANUEL MEDINA CARNICER  
CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD

FDO. JULIETA MÉRIDA GARCÍA  
PROF<sup>a</sup>. TITULAR DE UNIVERSIDAD

FDO. MANUEL MAYÉN RIEGO  
PROF. TITULAR DE UNIVERSIDAD



*No es desgracia morir con sueños incumplidos,  
sí lo es no soñar.*

*A mis padres y hermana.*

*A ti.*





Departamento de Química Agrícola y Edafología  
Universidad de Córdoba

---

ANGEL TRINIDAD MATEOS, Director del Departamento de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba,

INFORMA:

Que el presente Trabajo de Investigación, titulado ESTUDIO DE LA RETENCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS FORMADOS DURANTE EL PARDEAMIENTO EN VINOS BLANCOS y que constituye la Memoria presentada por D<sup>a</sup> Azahara López Toledano para optar al Grado de *Doctor Europeo* en Ciencias Químicas, ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento y cuya presentación ha sido autorizada por el Consejo de Departamento el veinticuatro de abril de 2002 mediante el procedimiento de asuntos urgentes o de trámite.

Y para que así conste y a petición de la interesada se expide el presente informe en Córdoba, a veinticuatro de Abril de dos mil dos.

Fdo. Prof. Dr. A. Trinidad Mateos





Departamento de Química Agrícola y Edafología  
Universidad de Córdoba

---

MANUEL MEDINA CARNICER, JULIETA MÉRIDA GARCÍA Y MANUEL MAYÉN RIEGO, como Directores de la Memoria de Tesis Doctoral presentada por D<sup>a</sup> Azahara López Toledano titulada ESTUDIO DE LA RETENCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS FORMADOS DURANTE EL PARDEAMIENTO EN VINOS BLANCOS, para aspirar al Grado de Doctor Europeo,

INFORMAN que la citada Memoria de Tesis Doctoral se ha realizado utilizando la metodología adecuada y haciendo uso de las técnicas idóneas para culminar los objetivos previstos. Asimismo, la licenciada López Toledano ha mostrado en todo momento una alta dedicación e interés por el tema de trabajo, superando con creces los niveles de calidad científica exigibles para la obtención del Grado de Doctor Europeo.

Y para que conste a los efectos de tramitación para la obtención del citado Grado de Doctor Europeo, se firma el presente informe en Córdoba, a veintitrés de Abril de dos mil dos.

Fdo. Manuel Medina Carnicer

Fdo. Julieta Mérida García

Fdo. Manuel Mayén Riego



Una vez terminada la presente Memoria, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han ayudado a su realización.

Primeramente a mis directores de Tesis. A D. Manuel Medina Carnicer, por confiar en mí como investigadora desde el primer día que entré en el departamento. A D<sup>a</sup> Julieta Mérida García, por su completa dedicación y estar ahí, apoyándome en todo momento. Ha sido más que una directora, más que una amiga, más que una maestra, y sin ella no hubiese sido capaz de sacar todo esto adelante. A D. Manuel Mayén Riego, por su visión crítica del trabajo.

A D<sup>a</sup> Lourdes Moyano, una gran amiga, y a D. Luis Zea, por el gran interés mostrado por ambos y por su ayuda, especialmente en la parte de cata. A D. Juan Moreno, por sus enseñanzas enológicas.

A David, Begoña, Jose Antonio, Rafa y Mónica, por su apoyo y gran colaboración. A Concha, Carmen, Chiqui, y Rocío, por ser tan geniales y animarme en los momentos difíciles. También a Manolo Molina, por su ayuda prestada siempre que la necesité.

A Bodegas Alvear S.A., especialmente a D. Bernardo Lucena, por todas las facilidades prestadas para el desarrollo de este trabajo.

No quisiera olvidar a Pepe González y José Miguel Cuevas, las dos personas que me animaron a estudiar Química, mi vocación escondida.

A todos aquellos que haya olvidado nombrar y hayan contribuido en mayor o menor medida a la realización del presente trabajo.

A Jose Enrique, mi columna y mi aliento. Las palabras no son suficientes para agradecerle todo. Finalmente, a mi familia, por ayudarme, apoyarme y soportarme en los buenos y malos momentos. Ellos son mi guía y sé que cumpliendo mis sueños, realizo los suyos.



*El origen de las ciencias experimentales fue la observación de los seres vivos y materiales presentes en la Naturaleza. Esa inquietud humana por adquirir conocimientos partió del estudio de las propiedades y comportamiento del mundo que rodeaba al curioso interesado por la Ciencia. Y ese mundo le mostró respuestas para multitud de problemas que se habían planteado y resuelto a lo largo del camino evolutivo de las especies. No obstante, la profundización en los conocimientos de las diferentes disciplinas que conforman el árbol de la ciencia llevó, más pronto que tarde, al mundo investigador a alejarse progresivamente de su medio natural. Por un lado, el desarrollo de las sociedades tecnológicas exigía prácticas nuevas, que precisamente por su novedad no encontraban traducción en el entorno natural. Por otro, esa ambición humana de crear lo que no existe, de trascender de sus propias limitaciones como seres vivos, esa soberbia de dominar por encima de todo y de todos también contribuyó a que muchas ramas del saber fueran dando la espalda a sus orígenes. Incluso, este no mirar atrás se realizó en algunas épocas de manera vergonzante, ya que lo que rodeaba al investigador era demasiado vulgar, al alcance del resto de los mortales, poco sofisticado. Han tenido que pasar veinte o treinta años para que el mundo de la Ciencia vuelva a mirar a la Naturaleza, si bien ahora por motivos generalmente distintos. La constatación del daño medioambiental que un desarrollo tecnológico sin limitaciones está ori-*

*ginando, junto al reconocimiento humilde de muchos errores del pasado y la toma de conciencia de la imposibilidad de permanencia de una sola especie al margen de las demás pueden, quizá, explicar este cambio de mentalidad.*

*El mundo del vino siempre tuvo un halo de misterio. Posiblemente, el hecho de que la vista humana no pueda apreciar la presencia de seres vivos que transforman el zumo de una fruta en una bebida alcohólica sea lo que ancestralmente contribuyó a esa consideración, que por oculta resultaba mágica. Y la práctica secular hizo el resto. El silencio de la bodega, su oscuridad y quietud, su paz en definitiva, han contribuido en no poca medida a alimentar ese respeto con el que en enología se trata al vino.*

*Pero las prácticas industriales han ido progresando conforme el consumidor se volvía más exigente. Ya no importaba que el vino abandonara la tierra que le vio nacer, viajando hacia otras de muy distintas condiciones ambientales. Era exigible la misma transparencia, la permanencia de su brillante color y, en definitiva, que mantuviera inalterable sus propiedades hedonísticas. Para conseguirlo, la industria enológica también tuvo que alejarse de su hábitat natural, quizá no tanto como otras empresas alimentarias, pero de forma perceptible.*

*La presente memoria presenta como objetivo general el estudio de las levaduras como agentes inhibidores del pardeamiento de vinos blancos. En realidad, la idea original de este trabajo se basó en dos pilares. Por un lado, la costumbre, ya abandonada en Andalucía, que tenían los capataces de algunas bodegas de agitar el vino con sus lías de fermentación. La tradición oral de padres a hijos, y su propia experiencia, aconsejaban esta práctica para mejorar el color de la bebida. Por otro lado, la percepción de que el tiempo de*

*pardeamiento se detiene en tanto que los vinos finos permanecen en contacto con sus levaduras de crianza, poniéndose de nuevo en marcha cuando son separados. Ambos pilares corresponden a observaciones obtenidas en el propio mundo del vino, que pudieran en un futuro conducir a tratamientos naturales que controlaran la evolución negativa de su color, en la mejor tradición de la Ciencia antigua y, curiosamente, en la línea de las más actuales tendencias aplicables a la industria alimentaria.*



# ÍNDICE

<i>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</i>	1
○ COMPUESTOS FENÓLICOS: INTRODUCCIÓN	2
○ COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO BLANCO	4
○ REACCIONES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL VINO	10
PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO	10
PARDEAMIENTO QUÍMICO	21
<i>MÉTODOS EXPERIMENTALES</i>	41
○ DETERMINACIONES GENERALES	42
PH	42
ACIDEZ TITULABLE	42
ACIDEZ VOLÁTIL	42
DIÓXIDO DE AZUFRE	42
GRADO ALCOHÓLICO	43
○ MEDIDAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS	43
○ EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO	44
○ IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO	45
○ CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO	48
○ IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN DISOLUCIONES MODELO	49
○ TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS	50
<i>ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO DE VINOS BLANCOS EN CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO</i>	51
○ INTRODUCCIÓN	52
○ MATERIAL EXPERIMENTAL	53
○ RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
○ CONCLUSIONES	73
<i>ESTUDIO DEL PARDEAMIENTO ACELERADO DE VINOS BLANCOS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LEVADURAS</i>	75
○ INTRODUCCIÓN	76
○ MATERIAL EXPERIMENTAL	78
○ RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
○ CONCLUSIONES	96

<i>ESTUDIO DEL PARDEAMIENTO ACELERADO DE VINOS BLANCOS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LEVADURAS INMOVILIZADAS EN <math>\kappa</math>-CARRAGENATO</i>	99
○ INTRODUCCIÓN	100
○ MATERIAL EXPERIMENTAL	103
○ RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
○ CONCLUSIONES	115
<i>ESTUDIO DEL PARDEAMIENTO ACELERADO DE VINOS BLANCOS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LEVADURAS DESPUÉS DE UN AÑO DE ALMACENAMIENTO</i>	117
○ INTRODUCCIÓN	118
○ MATERIAL EXPERIMENTAL	118
○ RESULTADOS Y DISCUSIÓN	121
○ CONCLUSIONES	126
<i>ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE DISOLUCIONES MODELO DE (+)-CATEQUINA Y (-)-EPICATEQUINA EN PRESENCIA DE LEVADURAS</i>	129
○ INTRODUCCIÓN	130
○ MATERIAL EXPERIMENTAL	131
○ RESULTADOS Y DISCUSIÓN	132
○ CONCLUSIONES	144
<i>RESUME</i>	147
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	153
<i>ANEXO</i>	167

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## COMPUESTOS FENÓLICOS: INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son unos de los principales constituyentes del vino y responsables de algunas de las propiedades organolépticas del producto, como el color y la astringencia. Los compuestos fenólicos pueden ser o no coloreados; de unos 3000 flavonoides conocidos, sólo algunos de ellos absorben en la región visible del espectro. En el vino destacan por su color los antocianos en los vinos tintos y los flavonoides amarillos presentes también en los vinos blancos. Los fenoles, incluso incoloros, son extremadamente reactivos y pueden alterar su color de tal forma que sea rechazado el producto por el consumidor. Además, estos compuestos intervienen en el sabor de los vinos, concretamente confiriéndole sensaciones de astringencia y amargor (SINGLETON AND NOBLE, 1976; NOBLE, 1990; NOBLE, 1998). La estructura química responsable de sus propiedades astringentes es el resto di- o tri- hidroxifenil característico de los fenoles muy solubles en agua y de los taninos hidrolizables que poseen capacidad de unión con las proteínas salivares. Dado que el tamaño molecular de los compuestos fenólicos afecta al amargor y a la astringencia del vino (LEA, 1990; PELEG *et al.*, 1999), se han llevado a cabo estudios que pretenden correlacionar estas propiedades sensoriales con la composición fenólica de la uva y el vino (BROSSAUD, 2001). Por todo ello, uno de los principales retos en la investigación enológica es determinar la relación existente entre la composición fenólica y la calidad del producto.

MACHEIX *et al.* (1991) señalan que los compuestos fenólicos presentes en el vino pueden tener diferentes orígenes, entre los que cabe destacar: heredados de la uva, producidos durante las transformaciones enzimáticas o no enzimáticas, extraídos de la uva durante la fabricación del vino, extraídos de la madera, etc.

Estos compuestos se caracterizan por su carácter reductor, es decir, poseen gran sensibilidad a la oxidación que les lleva a provocar una alteración negativa en los alimentos que los contienen. Sin embargo, este mismo carácter reductor los lleva a actuar como antioxidantes, lo que les confiere un efecto protector frente a enfermedades cardiovasculares, como muestran algunos estudios epidemiológicos comparativos llevados a cabo en los últimos años (RICHARD *et al.*, 1981; RICHARD, 1987; DUCIMETIÈRE, 1995). En este sentido, también se ha confirmado que el consumo de ciertos antioxidantes, como son los fenoles flavonoides, podría estar inversamente relacionado con el peligro cardiovascular basándose en la teoría oxidante del ateroma. Según esta teoría, los fenoles flavonoides del vino podrían prevenir el desarrollo de lesiones vasculares mediante la protección contra las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (PARTASARATHY AND RANKIN, 1992).

Además, a los compuestos fenólicos les han sido también atribuidas propiedades como son la actividad antihipertensiva, antiinflamatoria, antimicrobiana y/o antitrombógenos, explotadas a veces en la farmacopea (ANTON, 1988; GABOR, 1988; ANTON AND BERETZ, 1990; MIDDLETON AND KANDASWAMI, 1992; BRUN, 1995). Asimismo, han sido descritas propiedades fisiológicas de algunos compuestos flavonoides presentes tanto en la uva como en el vino, en concreto el flavonol quercetina reduce considerablemente el daño renal y sus secuelas inflamatorias (SHOSKES, 1998) y la miricetina y epicatequina logran evitar la proliferación de células leucémicas humanas *in vitro* (UDDIN AND CHOUDHRY, 1995), mejorando además el comportamiento biológico de células humanas en el cáncer de mama (RODGERS AND GRANT, 1998).

Los ácidos fenólicos podrían exhibir igualmente algunas de las propiedades mencionadas anteriormente como consecuencia de su parecida capacidad antioxidante, sobre todo en el caso de los *o*-difenoles (GRIFFITHS, 1982). Para otros fenoles no flavonoideos encontrados en la uva, como es el resveratrol, se ha encontrado un efecto antitumoricida (JANG AND PEZZUTO, 1999), capacidad de inhibir el crecimiento de líneas celulares de carcinoma humano de mama (LU AND SERRERO, 1999), así como actividad antineoplástica (HSIEH AND WU, 1999), leucemia promielocítica (SURH *et al.*, 1999), carcinoma de la boca (ELATTAR AND VIRJI, 1999) y hepatoma humano inducido (CIOLINO *et al.*, 1998). No obstante, este compuesto sólo aparece en uvas que han sido atacadas por determinados agentes químicos u hongos, o han sido expuestas a un exceso de rayos UV, y en cualquiera de los casos, nunca ha sido encontrado en vinos tipo Sherry (MARTÍNEZ ORTEGA *et al.*, 2000).

La variabilidad en la composición fenólica de los vinos no depende solamente de las variedades de uvas de las cuales se obtienen, sino también de factores tales como proceso de vinificación utilizado, especies o razas de levaduras que conducen la fermentación, tipos de envejecimiento, etc., lo que condiciona el hecho de que no todos los vinos tengan la misma capacidad antioxidante (DE RIJKE *et al.*, 1996; SHARPE *et al.*, 1995; SUZUKAWA *et al.*, 1994; MARTÍNEZ ORTEGA *et al.*, 2001). En este sentido, ha sido señalado que algunos vinos blancos obtenidos sin maceración con hollejos, no presentan apenas capacidad antioxidante (FUHRMAN *et al.*, 1995) y además ha sido observado que determinados vinos blancos no poseen capacidad antioxidante *in vitro* pero sí *in vivo*.

## COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO BLANCO.

Los compuestos fenólicos se han clasificado desde diversos puntos de vista debido al gran número de ellos que aparecen en la naturaleza, así como al hecho de que algunas de estas estructuras puedan llegar a ser bastantes complejas. De manera simplificada, se pueden dividir en cuatro grandes grupos:

- Compuestos fenólicos de bajo peso molecular
- Compuestos fenólicos flavonoideos
- Agregados naturales de naturaleza fenólica
- Otros compuestos polifenólicos.

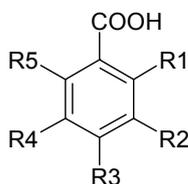
Una amplia descripción de los compuestos incluidos en cada uno de estos grupos ha sido realizada con anterioridad por otros miembros del grupo de investigación (BARON, 1997). Sin embargo, y a modo de resumen, en la presente memoria se realizará una breve descripción de los más importantes presentes en el vino blanco, agrupados desde el punto de vista químico en no-flavonoides y flavonoides.

### • Compuestos no flavonoides

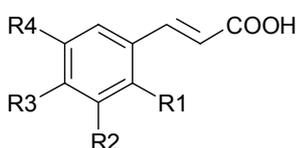
Dentro de este grupo se puede hacer una clasificación de compuestos basándose en el número de átomos de carbono, y que los engloba en polifenoles con estructura:

- C6: fenoles sencillos y benzoquinonas
- C6-C1: ácidos, alcoholes y aldehídos hidroxibenzoicos
- C6-C2: acetofenonas y derivados del ácido fenilacético
- C6-C3: alcoholes, ácidos y aldehídos hidrocinnámicos, así como los ésteres de éstos con algún hidroxilácido o glucosa
- otros polifenoles de bajo peso molecular, como tirosol y triptofol.

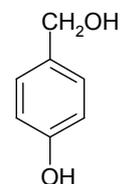
De todos estos compuestos, en los vinos blancos están mayoritariamente representados los ácidos fenólicos, fundamentalmente ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinnámicos, así como los ésteres hidroxicinnámicos y el tirosol.



Ácidos hidroxibenzoicos



Ácidos hidroxicinnámicos



Tirosol

En relación con los contenidos de estos compuestos en el vino, SOMERS *et al.* (1987) identifican 10 componentes derivados de los ácidos hidroxicinámicos, destacando los ésteres tartáricos del cafeico, *p*-cumárico y ferúlico. Sin embargo, no encuentran ácido cafeico ni *p*-cumárico libre en el mosto, pero sí en el vino, debido a que durante la vinificación se produce una hidrólisis parcial de los ésteres hidroxicinámicos hacia los ácidos hidroxicinámicos libres. Además, todos los compuestos identificados tenían la configuración *trans*.

GARCÍA BARROSO *et al.* (1994) detectan los ácidos gálico, vaníllico y protocatéuico, tanto en vinagres como en vinos tipo Amontillado de la zona de Jerez, mientras que en vinos Finos de la misma zona, determinan los ácidos *p*-cumárico, cafeico y 3,4,5-trimetoxicinámico y, en menor cantidad, los ácidos ferúlico, *o*-cumárico y sinápico, observando además que las cantidades de estos últimos aumentan durante la fermentación (GARCÍA BARROSO *et al.*, 1986). También se ha encontrado en muestras de vino Fino el ácido *m*-cumárico (LÁZARO *et al.*, 1990).

NAGEL AND WULF (1979) y NAGEL *et al.* (1979), observaron durante la vinificación y envejecimiento de variedades de uvas blancas, Muscat y Riesling, un descenso de caftárico y cutárico, muy pronunciado durante la vinificación y menor durante el envejecimiento y ningún descenso significativo en la concentración de feftárico. Esta tendencia descendente durante la vinificación no es observada siempre. Por ejemplo, algunos autores advierten que durante el proceso fermentativo del sherry se produce el fenómeno contrario, es decir una mayor concentración de estos ésteres en el vino que en el mosto (GARCÍA BARROSO *et al.*, 1994; MAYÉN *et al.*, 1996).

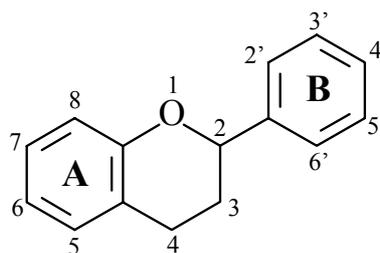
ALONSO *et al.* (1988) estudian diversos compuestos de bajo peso molecular en 15 vinos tintos y 15 vinos blancos procedentes de las Denominaciones de Origen Rioja, Valdepeñas y La Mancha, sin haber sido sometidos a envejecimiento en madera, encontrando, en los vinos blancos analizados, el ácido *cis-p*-cumárico y el ácido *p*-hidroxibenzoico, si bien el tirosol se cuantifica junto con él. De acuerdo con los resultados obtenidos por estos autores parecen existir ciertas diferencias según sea el origen de las muestras, los vinos blancos de Rioja son, de forma general, más pobres en compuestos fenólicos de bajo peso molecular que los de Valdepeñas y La Mancha, que muestran un comportamiento muy homogéneo. Otros componentes, como los ácidos protocatéuico, vaníllico y ferúlico, apenas sufren variaciones, por lo que es posible que su contenido en estos vinos no esté relacionado con caracteres varietales.

También se han encontrado aldehídos benzoicos en muestras de mosto, tales como 2,3-dimetoxibenzaldehído, siringaldehído, protocate-

quilaldehído y *p*-hidroxibenzaldehído en mostos de la variedad Palomino fino de la zona de Jerez (GARCÍA BARROSO *et al.*, 1987), presumiblemente procedentes de la lignina existente en el hollejo y la semilla de la uva.

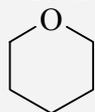
• Compuestos flavonoides

Los polifenoles flavonoideos constituyen sin duda el grupo más numeroso y extendido de los compuestos fenólicos vegetales, y aunque se conocen cerca de 2000 estructuras diferentes, todas pueden reducirse a un pequeño número de tipos moleculares basados en el esqueleto carbonado C6-C3-C6, como puede verse en la Figura:



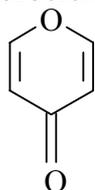
Según sea el grado de oxidación del heterociclo oxigenado pueden diferenciarse las familias que se detallan a continuación en la siguiente Tabla, incluyendo en cada una de ellas los principales tipos de compuestos.

II.1 Con heterociclo Pirano



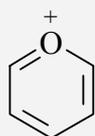
- a) *Flavanoles o Derivados del Flavan-3ol*
- b) *3,4 Flavanodiolos o Leucoantocianidinas*

II.2 Con heterociclo Pirona



- a) *Flavonas*
- b) *Flavonoles*
- c) *Derivados reducidos de Flavonas y Flavonoles*  
*Flavanonas*  
*Flavanonoles*
- d) *Calconas*
- e) *Isoflavonas o 3-Fenilcromonas*

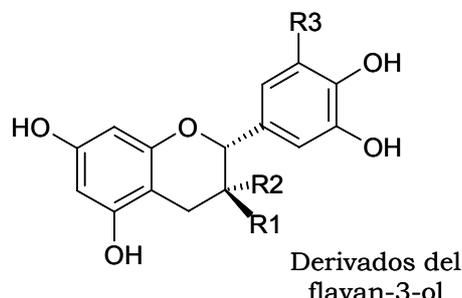
II.3. Con heterociclo Pirilo



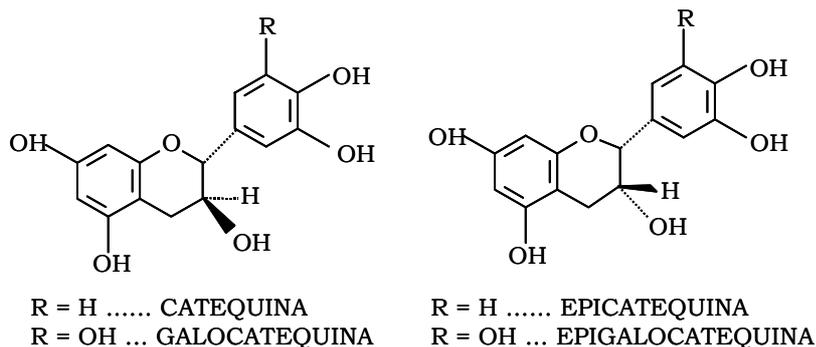
- a) *Antocianos*

II.4 Auronas

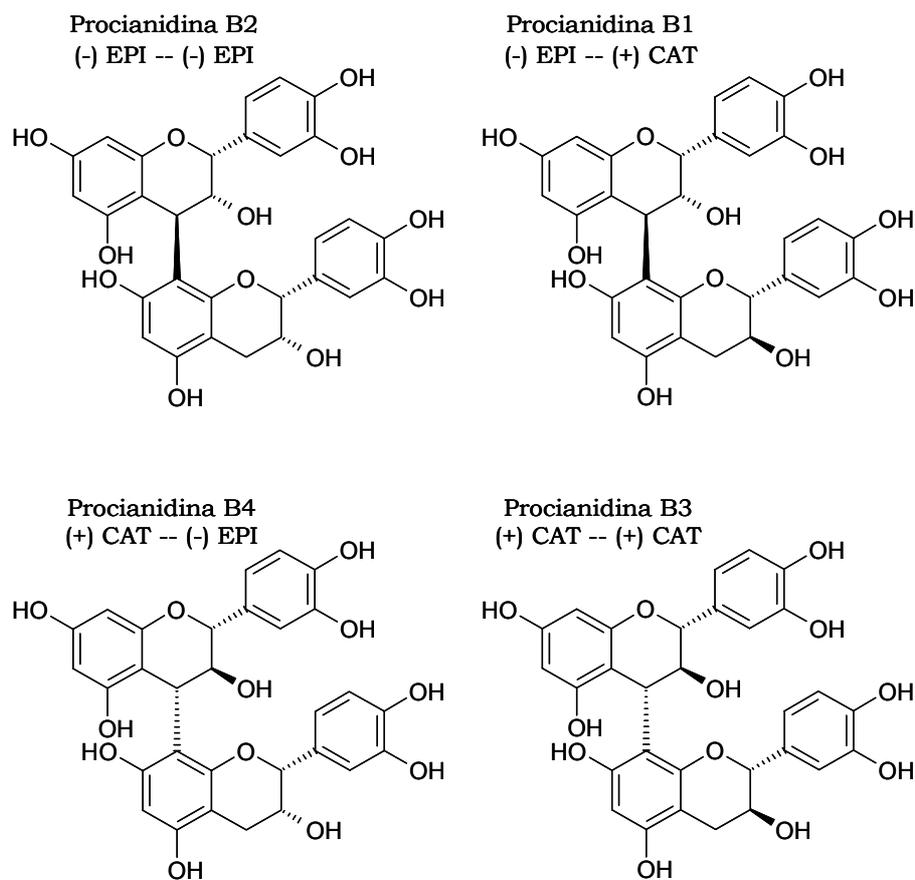
Todas estas estructuras pueden a su vez estar sustituidas en una o varias posiciones (glicosiladas, esterificadas, etc), dando lugar a múltiples compuestos fenólicos. Las antocianinas y los flavanoles son particularmente importantes, ya que constituyen los pigmentos rojos y taninos presentes en el vino. De todos estos compuestos flavonoideos, en vinos blancos y en especial en el vino utilizado en esta memoria, están mayoritariamente representados los derivados del flavan-3-ol cuya estructura base se muestra en la Figura.



Dentro de esta familia existen varios compuestos con 1, 2 o 3 grupos hidroxilos en el anillo B que nunca están metoxilados, entre los que cabe destacar como más importantes a los estereoisómeros catequina y epicatequina y galocatequina y epigalocatequina (Figura).



Además de los monómeros, también se han identificado dímeros constituidos por unidades de catequina, epicatequina y epicatequina-3-O-galato unidas por puentes interflavánicas C4-C6 (procianidinas tipo B) o C4-C8 (tipo A). En el vino, han sido descritas como más importantes las procianidinas de tipo B cuyas principales estructuras se muestran en la siguiente Figura:

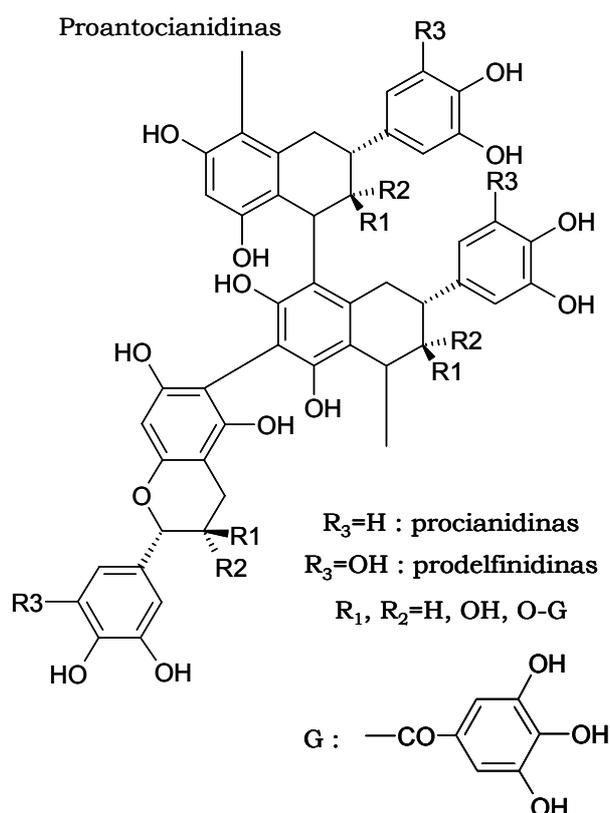


Respecto a los derivados monómeros y dímeros del flavan-3-ol, son la (+)-catequina y (-)-epicatequina, y las procianidinas de tipo B los compuestos mayoritariamente encontrados en los vinos blancos. En concreto, según LEA *et al.* (1979) son las B1, B2, B3, B4 y B5 las procianidinas presentes en vinos blancos, mostrándose para algunos autores como mayoritarias la B1 y la B2 (HASLAM, 1980; BOURZEIX *et al.*, 1986; DALLAS *et al.*, 1995), mientras que para otros autores son la B1 y B3 las mayoritarias en vinos tipo sherry (FABIOS *et al.*, 2000; BONILLA *et al.*, 2001).

Durante el envejecimiento del vino se han encontrado descensos significativos de (+)-catequina y procianidinas posiblemente como consecuencia de su participación en procesos de pardeamiento oxidativo seguidos de condensación y posterior precipitación (FERNANDEZ-ZURBANO *et al.*, 1995). Por otra parte, otros autores mantienen la hipótesis que durante el envejecimiento del vino tiene lugar una hidrólisis de las procia-

nidinas oligómeras y/o dimeras por rotura de enlaces C-C, catalizadas por los ácidos presentes en el vino (TIMBERLAKE AND BRIDLE, 1976; HASLAM, 1980; DALLAS *et al.*, 1995). Como consecuencia de los diferentes procesos en los que los flavanos están involucrados durante el envejecimiento, BARON *et al.* (1997) mostraron que las procianidinas presentes en el vino se comportan de diferente forma durante la crianza biológica, encontrando que la B3 no manifiesta cambios importantes, la B1 aumenta ligeramente, en tanto que la B2 y la B4 disminuyen.

Sin embargo, los derivados del flavan-3-ol no sólo existen como monómeros y dímeros, sino que también pueden estar presentes en el vino como oligómeros y/o polímeros, denominados taninos condensados o proantocianidinas. Hay que decir, que todas las uniones son de tipo B, es decir, uniones C-C entre el C4 de una de las unidades y el C6 o C8 de la otra. Las uniones de tipo A, con un enlace de tipo éter, no han sido formalmente identificadas en el mundo de la enología. A pesar de su importante contribución a las propiedades organolépticas de los vinos, la caracterización de estos compuestos está todavía en fase de estudio.



## **REACCIONES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL VINO**

Los compuestos fenólicos participan en el vino en dos grupos de reacciones importantes, uno formado por aquellas que tienen lugar por vía enzimática, mientras que el segundo grupo sucede por vía química. Aunque ambos tipos de reacciones pueden tener lugar de forma simultánea, las primeras son más habituales en los primeros estadios de la fabricación del vino (CHEYNIER *et al.*, 1990), mientras que las segundas, mucho más lentas, suelen producirse durante el envejecimiento y almacenamiento, ya que las enzimas son inactivadas en su mayor parte durante el proceso de elaboración (SINGLETON, 1987; CILLIERS AND SINGLETON, 1991).

### **Pardeamiento Enzimático**

Los polifenoles son compuestos muy reactivos debido al carácter ácido de los grupos hidroxilo y las propiedades nucleófilas de los anillos fenólicos. Muchos de ellos son buenos sustratos para diversos tipos de enzimas, entre las que se pueden citar las esterasas, glicosidasas y oxidadasas, siendo estas últimas las responsables del pardeamiento enzimático. Las polifenoloxidasas (PPO) están localizadas en el citoplasma, mientras que los compuestos fenólicos están predominantemente localizados en la vacuola. Las reacciones comienzan cuando son liberadas al medio las enzimas por rotura de las células de los granos de uvas tanto durante la vendimia como en los siguientes pasos de la vinificación. Ello conduce a una gran diversidad de productos que se suman a los ya existentes, provocando que exista una gran complejidad de productos fenólicos en el vino. La lacasa, oxidasa de origen fúngico, no está en la uva de forma natural, sino que puede estar presente en mostos de uvas atacadas por la podredumbre. Es la única que su actividad puede mantenerse en los vinos aún después del proceso de fermentación en los cuales, si existe exposición al aire, puede provocar quiebra oxidásica, precipitación de compuestos de alto peso molecular debida a un pardeamiento intenso.

Las PPO son metaloproteínas con cobre como grupo prostético en su estructura, las cuales utilizan el oxígeno molecular como aceptor y que, dependiendo de la reacción concreta que catalicen, pueden encuadrarse en tres tipos diferentes (Figura 1):

- La cresolasa es una monofenoloxidasa, cataliza la hidroxilación de los monofenoles en *o*-difenoles.
- La catecolasa es *o*-difenoloxidasa y su actividad es catalizar la oxidación de *o*-difenoles en *o*-quinonas.

- o La lacasa es una *p*-difenoloxidasas y su actividad principal es catalizar la oxidación de *p*-difenoles en *p*-quinonas.

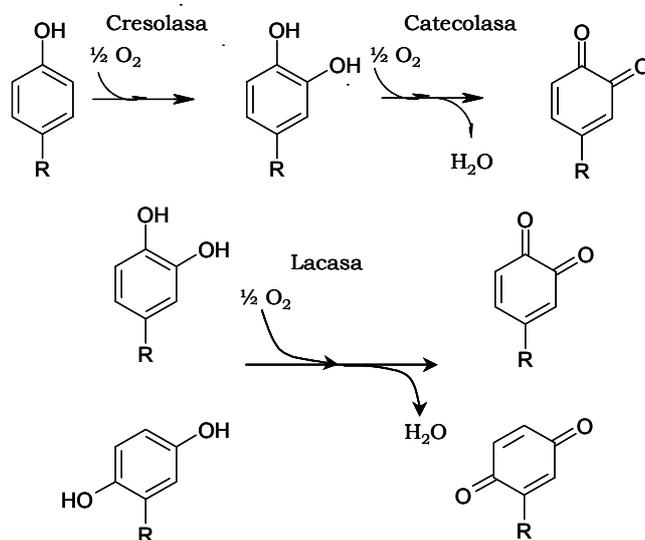


Figura 1. Actividad de las polifenoloxidasas (PPO)

Los centros activos y el mecanismo concreto de actuación de la cresolasa-catecolasa se muestran en la Figura 2 (SINGLETON, 1987).

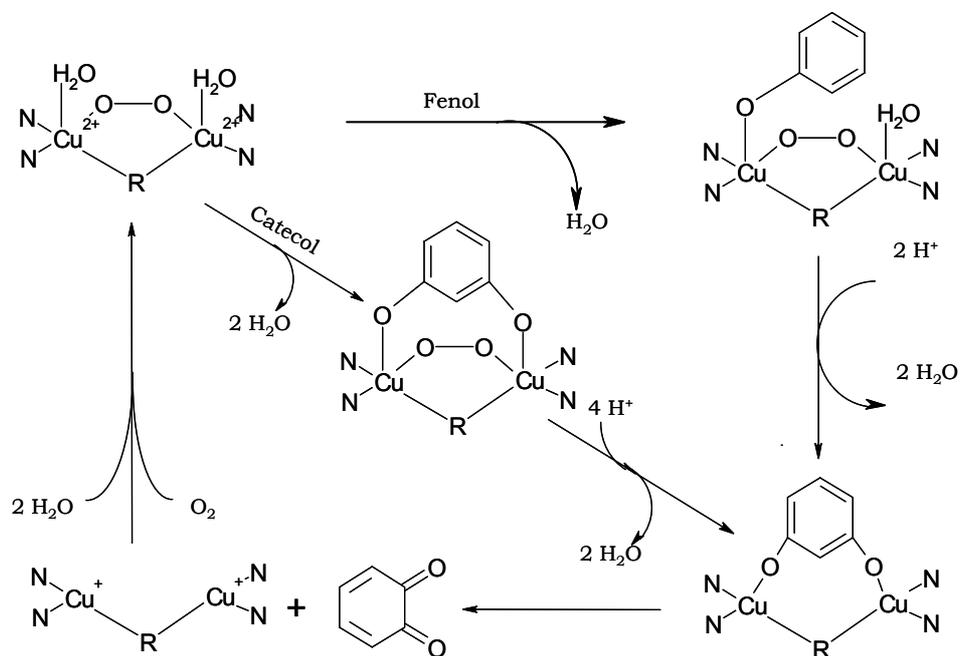


Figura 2. Sitio activo y mecanismo de cresolasa-catecolasa

Todas estas enzimas están ampliamente distribuidas en el mundo vegetal, aunque su papel está todavía en estudio. Parece ser que están involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas contra algunos microbios o patógenos virales. De hecho, la participación de la lacasa en la polimerización de la lignina ha sido demostrado recientemente (O'MALLEY *et al.*, 1993) y también ha sido sugerida la posible cooperación entre la lacasa y la peroxidasa en los procesos de lignificación (STERJADES *et al.*, 1993).

El mejor sustrato de la oxidación enzimática en los mostos blancos es el ácido cafeoiltartárico (ácido *t*-caftárico) y, en menor extensión, el ácido *p*-cumaroiltartárico (GUNATA *et al.*, 1987). CHEYNIER *et al.* (1995) postulan dichas reacciones para el ácido *t*-caftárico, tal como resumidamente se muestran en la Figura 3.

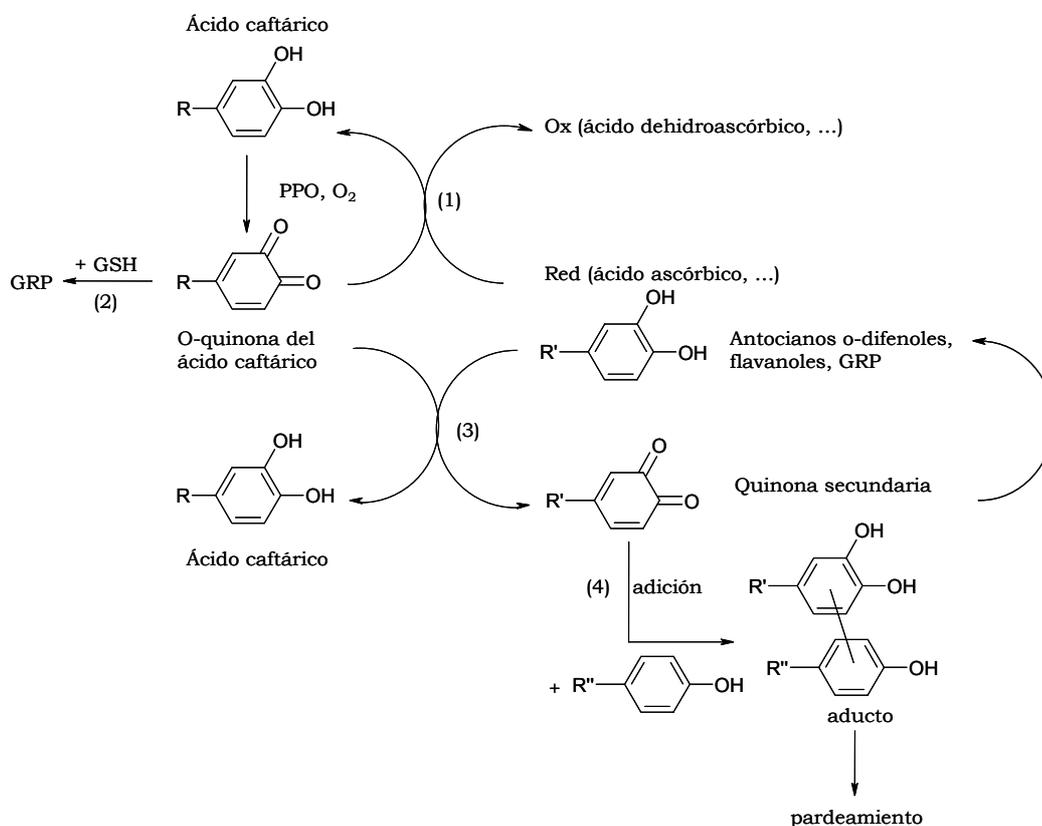


Figura 3. Oxidación enzimática del ácido *t*-caftárico

El primer paso es la oxidación del ácido *t*-caftárico, catalizada por la presencia de la polifenoloxidasas (PPO), transformándose en su quinona correspondiente. La oxidación de los reductores presentes en el medio,

tales como ácido ascórbico o sulfitos (RIGAUD *et al.*, 1991), conlleva la consiguiente regeneración del ácido *t*-caftárico (1). La *o*-quinona del ácido *t*-caftárico puede entonces sufrir la adición nucleófila del glutatión, tri-peptido abundante en la uva (CHEYNIER *et al.*, 1986)(2) y formarse el denominado GRP (SINGLETON *et al.*, 1985) (Figura 4):

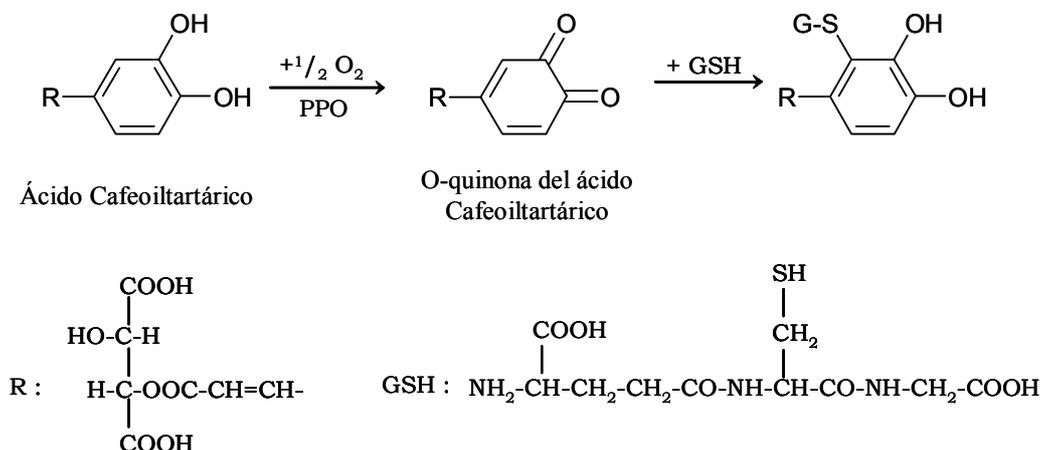


Figura 4. Formación de GRP a partir del ácido caftárico

El GRP formado no es un buen sustrato para la PPO y supone una paralización de la quinona del caftárico frente a las reacciones que dan lugar a la formación de pigmentos pardos (SINGLETON *et al.*, 1985). No obstante, el GRP puede ser oxidado por las quinonas del ácido *t*-caftárico en exceso, después de agotarse el glutatión, con el resultado de un pardeamiento intenso (CHEYNIER AND VAN HULST, 1988). El ácido cafeoiltartárico también se puede regenerar por la oxidación acoplada de otros compuestos fenólicos con funciones *o*-difenoil, como flavanoles y antocianos (en vinos tintos o rosados), formándose *o*-quinonas secundarias (3). Estas especies oxidadas son altamente inestables, dando lugar rápidamente a reacciones entre ellas, tales como reacciones de adición primarias y secundarias con otros compuestos fenólicos nucleófilos (4). El GRP formado en el proceso es incoloro, pero las siguientes etapas conducen a la aparición de pigmentos pardos (WESCHE-EBELING AND MONTGOMERY, 1990; SARNI-MANCHADO *et al.*, 1995).

CHEYNIER *et al.* (1989) concluyen que la labilidad al pardeamiento es independiente del contenido en ésteres hidroxicinámicos del vino, y depende de la relación molar ácidos hidroxicinámicos/glutatión, que constituye una característica varietal, así como también está correlacio-

nado con la concentración en flavanoles en el mosto, la cual está determinada según las condiciones de vinificación, que favorezcan o no la extracción de estos compuestos. Así, se han podido establecer tres clases de mostos que se diferencian en su relación molar ácidos hidroxicinámicos/glutación (AH/GSH):

- mostos poco sensibles al pardeamiento:  $AH/GSH < 1$
- mostos sensibles al pardeamiento:  $1 < AH/GSH < 3$
- mostos muy sensibles al pardeamiento:  $AH/GSH > 3$

En los mostos poco sensibles, los ácidos hidroxicinámicos se oxidan muy rápidamente mientras que el GRP se acumula en el medio. Como consecuencia, el consumo de oxígeno es pequeño y el color apenas varía. En los otros dos tipos de mostos, la concentración de GRP llega al máximo después de varios minutos de oxidación y luego disminuye rápidamente. La regeneración del sustrato inicial a partir de su quinona en la reacción de oxidación acoplada es continuada inmediatamente de una nueva oxidación de las moléculas de cafeoiltartárico regeneradas, lo que se traduce en un gran consumo de oxígeno.

La adición de glutación en exceso a un mosto limita el pardeamiento (RIGAUD *et al.*, 1991), lo cual confirma el mecanismo de reacción propuesto, ya que sólo puede ser atribuible a que todas las quinonas del sustrato inicial son transformadas en GRP, eliminando la posibilidad de que activen la oxidación acoplada que conduce al pardeamiento.

No obstante, la comparación de las cinéticas de reacción en mostos y soluciones modelo, indican que hay otros componentes del mosto que reaccionan con la quinona del caftárico, compitiendo así con el glutación. Entre estos compuestos se encuentran los reductores fuertes como el ácido ascórbico. En efecto, la adición de éste a los mostos retarda la degradación del ácido *t*-caftárico y la formación del GRP. La adición de SO<sub>2</sub> también inhibe el pardeamiento del mosto, ya que reduce las quinonas a su fenol original, consiguiendo que no se continúe el proceso de formación de pigmentos pardos.

En disoluciones modelo de (+)-catequina con ácido *t*-caftárico en presencia de PPO se han podido identificar los posibles aductos formados, así como una posible estructura formada entre el ácido caftárico y la (+)-catequina y que se muestran en la Figura 5 (CHEYNIER *et al.*, 1988). Cuando se forma la *o*-quinona de (+)-catequina, ésta reacciona rápidamente con una hidroquinona para formar productos de condensación, en este caso con el *t*-caftárico (CHEYNIER *et al.*, 1989), siendo los productos de condensación entre estas dos moléculas similares a los encontrados

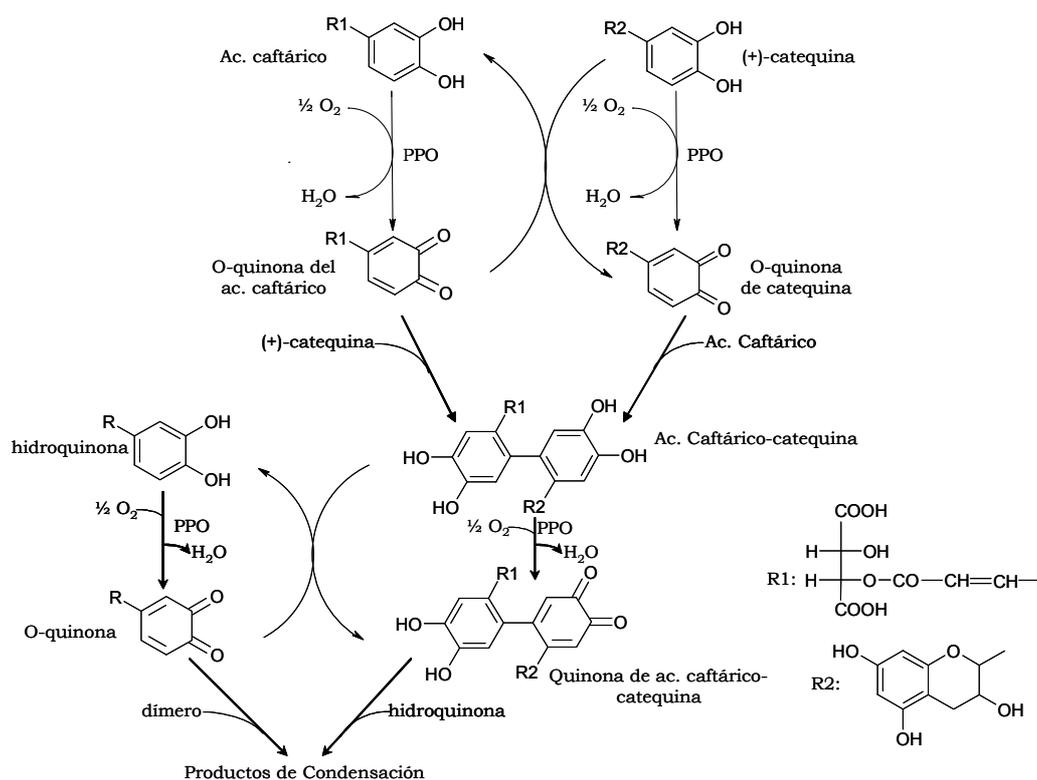
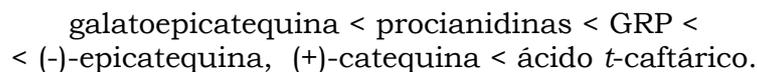


Figura 5. Reacciones enzimáticas de ácido caftárico y (+)-catequina

en medios modelo del tipo mosto de manzana (OSZMIANSKY AND LEE, 1990; RICHARD-FORGET *et al.*, 1995).

CHEYNIER *et al.* (1988) considerando el potencial redox de varios compuestos fenólicos presentes en el vino, establecieron el orden que entre ellos existe para producir en mayor o menor medida el acoplamiento oxidativo:



En este sentido, CHEYNIER AND RICARDO DA SILVA (1991) indican que, en las condiciones normales de obtención del mosto, las procianidinas son fácilmente oxidadas por acoplamiento oxidativo con ácido *t*-caftárico en presencia de PPO, dando posteriormente reacciones de condensación que aumentan el pardeamiento.

También se ha estudiado la reacción entre el ácido *t*-caftárico con antocianos (cianidín-3-glucósido, y malvidín-3-glucósido) en presencia de PPO, para confirmar las reacciones anteriores en disoluciones modelo (SARNI-MANCHADO *et al.*, 1995). Ambos antocianos, aunque son de diferente naturaleza, reaccionan con la o-quinona del caftárico formada enzimáticamente (Figura 6).

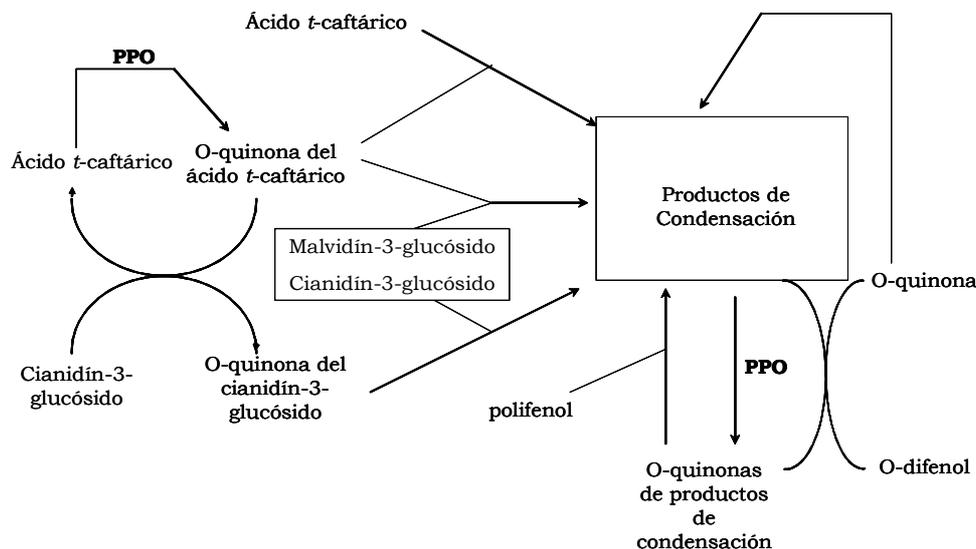


Figura 6. Reacción del ácido caftárico con antocianos

Mientras la cianidina se ve favorecida a formar acoplamientos oxidativos, la malvidina prefiere formar aductos con la o-quinona del caftárico, hecho confirmado posteriormente por SARNI-MANCHADO *et al.* (1997). Se forman productos coloreados rojos en una primera etapa, para después degradarse hacia compuestos incoloros de forma gradual debido a que se producen o bien oxidaciones enzimáticas, o bien reacciones posteriores con quinonas primarias o secundarias.

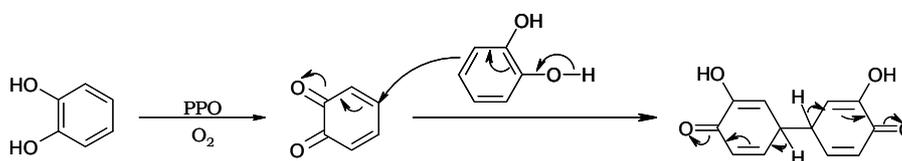
También se realizaron reacciones de oxidación enzimática de (+)-catequina en disoluciones modelo en ausencia de ácido cafeoiltartárico. En concreto, GOODENOUGH *et al.* (1983) llevaron a cabo la reacción en presencia de polifenol oxidasa, observando que se generan compuestos coloreados ( $\lambda_{\max}$  390 nm), análogos a la dehidrocatequina A, identificada cuando la oxidación se lleva a cabo en presencia de peroxidasa. Además, aparecen pequeñas cantidades de productos incoloros, posiblemente 8-hidroxicatequina, tanto si la reacción es catalizada por PPO como por peroxidasa (WEINGES AND EBERT, 1968), así como otros pigmentos amarillos que muestran máximos de absorción a 380 y 420 nm (OSZ-

MIANSKI AND LEE, 1990; ROUET-MAYER *et al.*, 1990) y procianidina B3 (OSZMIANSKI AND LEE, 1990). Por otro lado, ha sido descrita que en la oxidación catalizada por peroxidasa de la (+)-catequina se producen cuatro isómeros incoloros de procianidinas del tipo B (dehidrodicateguina B) y dehidrotricateguina (WEINGES, 1971), además de la ya mencionada dehidrocateguina A (WEINGES *et al.*, 1969).

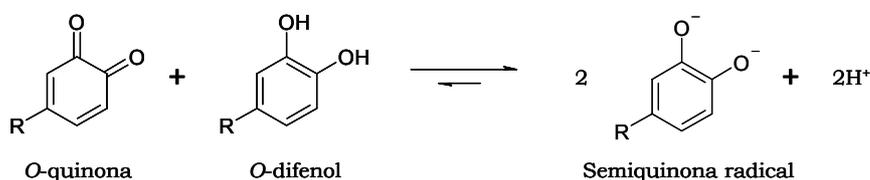
Estas diferencias encontradas en los productos formados se podrían explicar en base a que la oxidación enzimática de la (+)-catequina puede transcurrir según dos diferentes tipos de reacción. Por un lado, en presencia de peroxidasa tiene lugar una oxidación monoelectrónica que generaría radicales de semiquinona (MCDONALD AND HAMILTON, 1973) y, con polifenoloxidasas la reacción es bielectrónica produciéndose *o*-quinonas (KALYANAMARAN *et al.*, 1984). También pueden influir las condiciones de incubación de las disoluciones, tales como pH, fuerza iónica, etc., que provocarían reacciones de acoplamiento entre las diferentes especies químicas presentes. Sobre todo es interesante destacar el efecto del pH, ya que a altos valores, se incrementa la proporción de aniones fenolato que son más fácilmente oxidados al radical libre semiquinona que los fenoles protonados. Además, variaciones de pH modifican la velocidad de degradación de varias *o*-quinonas, y la naturaleza de los productos de oxidación formados, tanto enzimática (RICHARD-FORGET *et al.*, 1992) como químicamente (FULCRAND *et al.*, 1994).

GUYOT *et al.* (1995) estudiaron la influencia del pH en la oxidación enzimática de (+)-catequina, demostrando que, en gran medida, afecta en la naturaleza y cantidad de los productos formados, predominando los compuestos incoloros ( $\lambda_{\text{max}}$  280 nm) a valores menores de 4, mientras que a altos valores de pH los predominantes son los amarillentos ( $\lambda_{\text{max}}$  385-415 nm). Los mecanismos de oxidación, así como las estructuras de los diferentes productos formados son hasta la actualidad poco conocidos, si bien a través de algunas hipótesis han sido propuestas dos diferentes vías:

- adición nucleófila de Michael de un anillo fenólico a una *o*-quinona para el acoplamiento de fenoles en presencia de PPO (MCDONALD AND HAMILTON, 1973).



- acoplamiento de radicales semiquinona formados por desprotonación reversa que pueden ser una alternativa ya que algunas condiciones de incubación (gran exceso de PPO) pueden provocar desprotonación reversa (PETER, 1989).



La adición Michael puede ser favorecida por altos valores de pH, que incrementan el carácter nucleofílico de la (+)-catequina, mientras que a bajos valores de pH se favorecen los mecanismos radicálicos como consecuencia de incrementar la reactividad de los radicales semiquinonas.

GUYOT *et al.* (1996) dilucidan las posibles estructuras resultantes de la oxidación de (+)-catequina en presencia de PPO. Los dímeros encontrados no correspondían con la estructura de las procianidinas naturales, sino que debían estar formados por la reacción de una *o*-quinona de la catequina con una catequina o por unión de dos semiquinonas de catequina, las cuales se muestran en la Figura 7 de la página siguiente.

De estos nuevos posibles compuestos, algunos de ellos son incoloros (1, 2, 3 y 4) y otros presentan una tonalidad amarillenta (5, 6, 7 y 8). La formación de (3) corresponde con la dehidrocatequina B4, que se ha podido formar por un ataque nucleofílico del carbono C8 de una unidad de (+)-catequina sobre el anillo B de la catequina oxidada como quinona en la adición tipo Michael (Figura 8a).

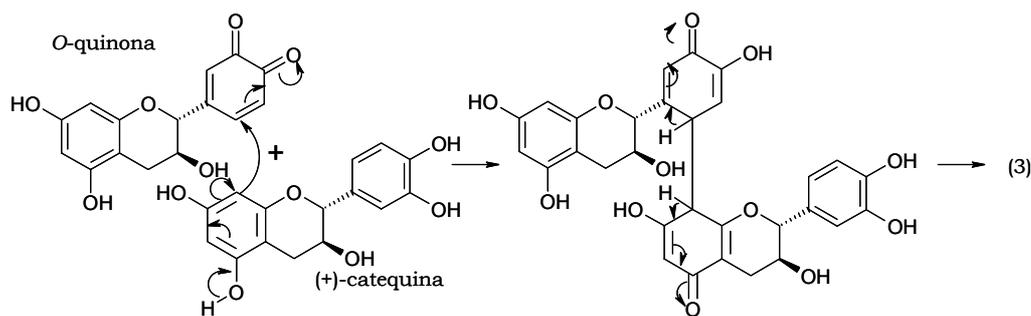


Figura 8a. Mecanismos de formación de productos de oxidación

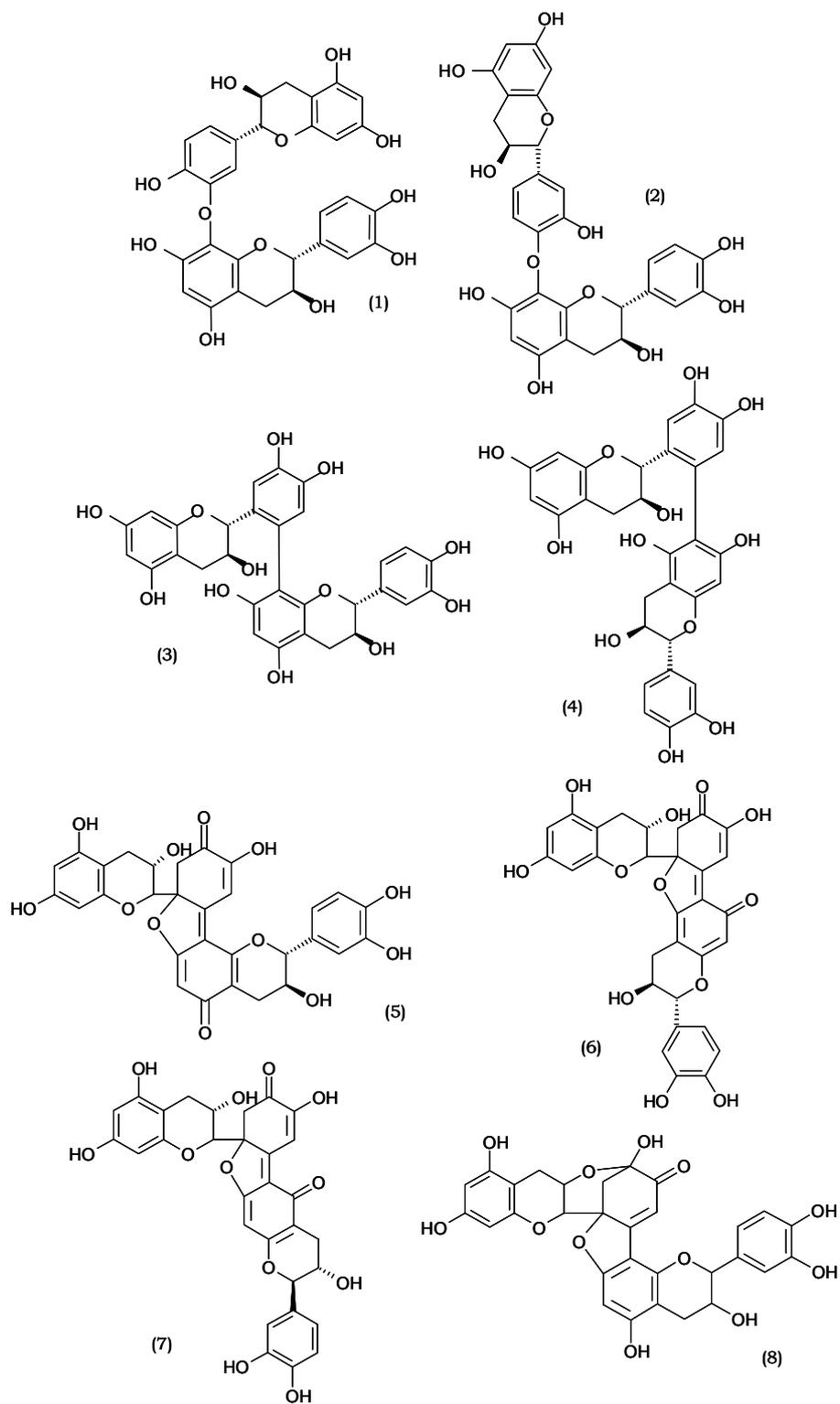


Figura 7. Algunas estructuras resultantes de la oxidación enzimática de (+)-catequina

Sin embargo, los compuestos amarillos resultantes pueden también surgir desde la estructura (3) por dos diferentes mecanismos de adición intramoleculares seguidos de la oxidación del anillo B, ambos enzimáticos, o por una oxidación acoplada que involucra a la quinona de la (+)-catequina como un oxidante (Figura 8b).

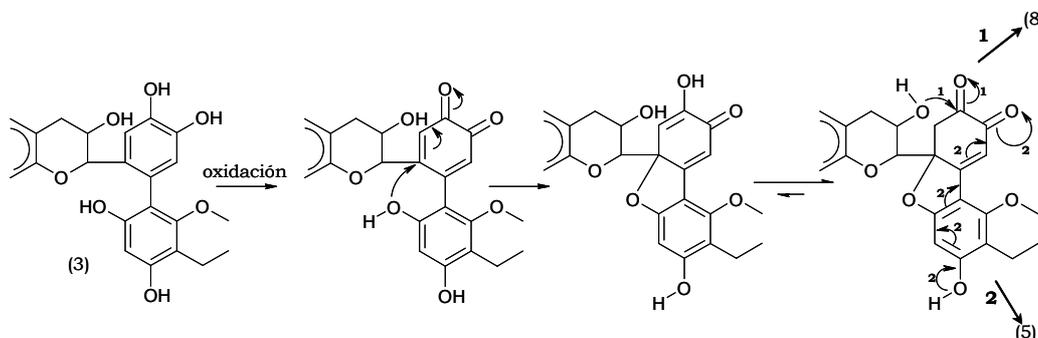


Figura 8b. Mecanismos de formación de productos de oxidación

La formación de uniones O-3'B-C-8D y O-4'B-C-8D observadas para las estructuras (1) y (2) respectivamente, pueden ser el resultado de reacciones de acoplamiento que involucran a radicales semiquinonas (Figura 8c). Los mecanismos radicálicos de acoplamiento pueden ser explicados por una sustitución homolítica aromática postulada por MCDONALD AND HAMILTON (1973), como un mecanismo alternativo al más clásico acoplamiento homolítico de dos radicales.

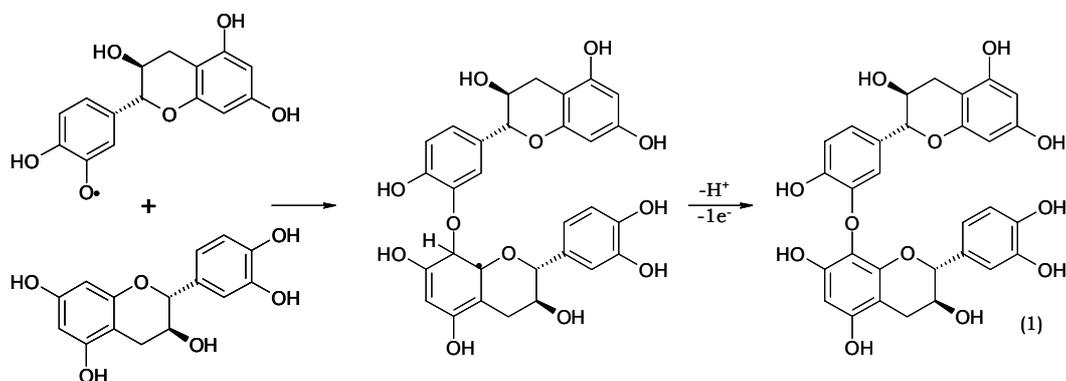


Figura 8c. Mecanismos de formación de productos de oxidación

La formación de especies radicálicas de anillos B puede resultar como consecuencia de la desprotonización reversa, que se ve favorecida

cuando en las condiciones de incubación usadas existe un exceso de (+)-catequina comparada con la de quinona (+)-catequina (Figura 8d).

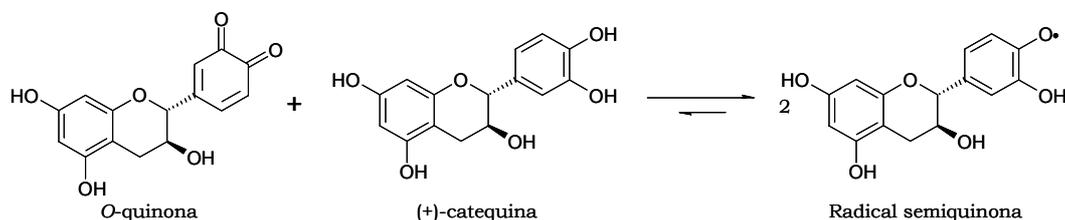
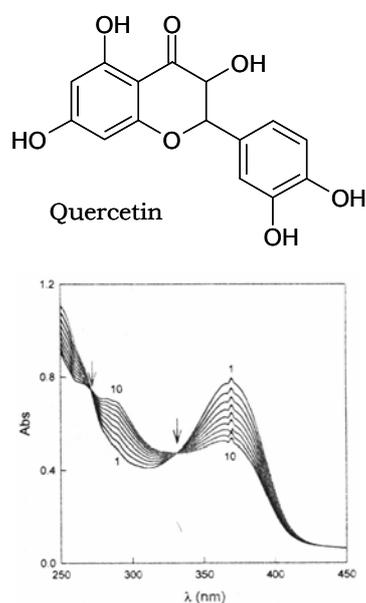


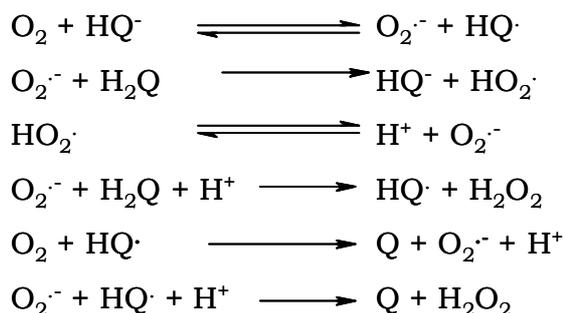
Figura 8d. Mecanismos de formación de productos de oxidación

Por último, en otros estudios del pardeamiento enzimático también llevados a cabo en disoluciones modelo, JIMÉNEZ AND GARCÍA-CARMONA (1999) realizaron la oxidación del flavonol quercetina por la PPO. En el medio de oxidación se observaron cambios en los máximos espectrales a 372 nm, decreciendo la absorbancia, y a 291 nm aumentando la correspondiente. Además, la presencia de dos puntos isobécticos a 272 y 342 nm sugiere que sólo un compuesto absorbente se forma durante la oxidación de la quercetina por la PPO, cambios, además, que no se producen en ausencia de la enzima, lo cual confirma que son como consecuencia de la actividad de la misma.



### Pardeamiento Químico

Durante la conservación y el envejecimiento de los vinos se producen cambios de color, los cuales son normalmente atribuidos a la formación progresiva de pigmentos condensados resultado de la interacción y/o oxidación de los componentes fenólicos del vino. Estas reacciones son más lentas que las que ocurren en presencia de enzimas, en el llamado pardeamiento enzimático, ya que durante esta fase del proceso de producción del vino las enzimas ya no son activas. A continuación se muestran las reacciones involucradas en la oxidación de los catecoles del vino a ortoquinonas en las que  $H_2Q$  representa el catecol,  $HQ^-$  el anión fenolato,  $HQ\cdot$  la semiquinona,  $O_2^{\cdot-}$  el ión superóxido y  $Q$  la ortoquinona (SINGLETON, 1987):



correspondiendo el balance final a la ecuación:



siendo la fase limitante de este proceso la producción de semiquinonas, debido principalmente a la débil concentración de iones fenolato al pH ácido del vino (SINGLETON, 1987; CILLIERS AND SINGLETON, 1989). Es interesante señalar la formación de moléculas de peróxido de hidrógeno como resultado de la reacción de oxidación. La presencia de éstas en el vino podrían explicar el aumento en acetaldehído del medio, resultado de la oxidación del etanol por ellas (WILDENRADT AND SINGLETON, 1974). Ciertamente, el acetaldehído está presente en el vino como consecuencia del metabolismo de las levaduras durante el proceso de fermentación (ROMANO *et al.*, 1994), aumentando mucho sus concentraciones en algunos vinos como los sherry como consecuencia de su particular modo de envejecimiento (CASAS, 1985; MARTINEZ DE LA OSSA *et al.*, 1997; CORTES *et al.*, 1998, 1999).

Estas reacciones químicas son extremadamente lentas y pueden requerir semanas o incluso meses para que puedan ser apreciadas bajo condiciones ácidas (OSZMIANSKI *et al.*, 1985), pero son aceleradas en condiciones alcalinas (ROSSI AND SINGLETON, 1966; TULYATHAN, 1984), o por la presencia de catalizadores metálicos como el cobre o el hierro (GORINSTEIN *et al.*, 1985), siempre presentes en el vino. Es por ello que algunos autores han variado las condiciones de pH, llevando las disoluciones modelo a condiciones alcalinas, para así acelerar el proceso de oxidación. De este modo SINGLETON (1987) estudió la autooxidación alcalina del ácido gálico, ya que las reacciones involucradas en el proceso de oxidación son muy similares a las que ocurren en condiciones ácidas y la velocidad es mucho más rápida (Figura 9). Además, el estudiar la oxidación bajo condiciones alcalinas es una ayuda más para vislumbrar mejor los mecanismos de reacción, así como los compuestos que toman parte en ella.

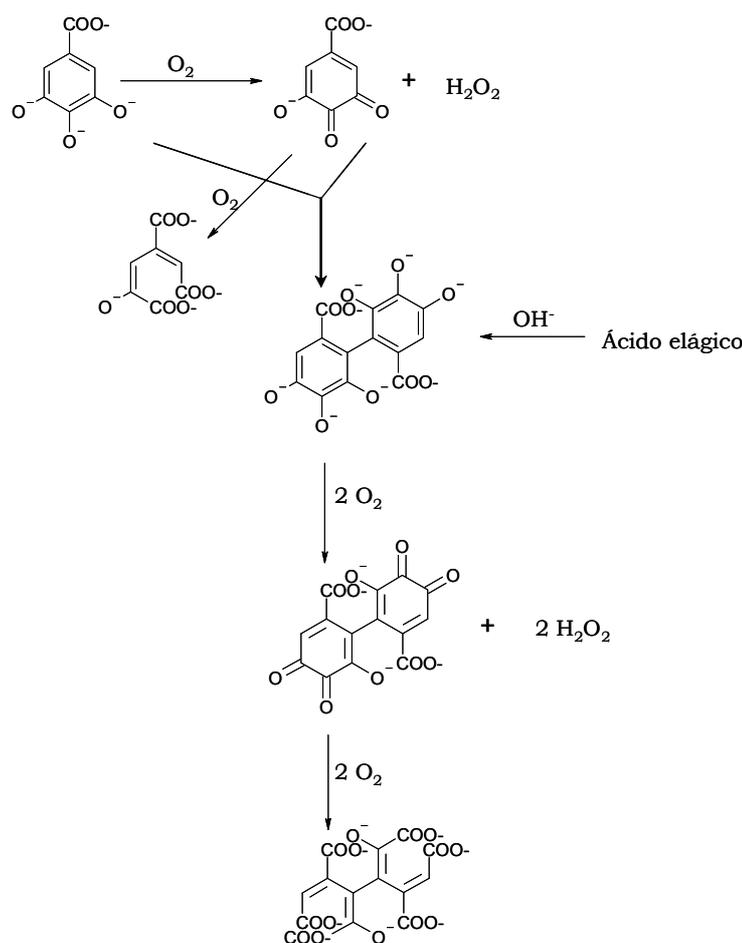
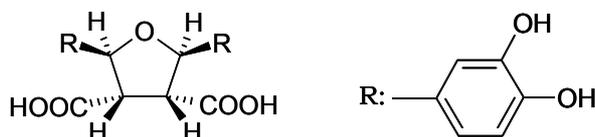
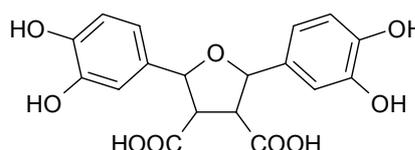


Figura 9. Autoxidación del ácido gálico en condiciones alcalinas

Durante la autoxidación del ácido gálico a pH 14, se consumen 5 átomos de oxígeno por mol de ácido, produciéndose cerca de dos moles de peróxido de hidrógeno, lo que prueba el mecanismo anteriormente comentado de la producción de un fuerte oxidante acoplado a la oxidación de fenoles (WILDENRADT AND SINGLETON, 1974). La dimerización regenerativa del ácido gálico ocurre en el 98% de los casos, mientras que el 2% restante se completa con la oxidación como monómero. El dímero ácido es entonces reoxidado, apareciendo productos idénticos a los encontrados en tratamientos similares con ácido elágico.

Sin embargo, el estudiar la oxidación en condiciones alcalinas tan drásticas y a su vez tan diferentes a las condiciones naturales de pH del vino, puede provocar que las reacciones no ocurran tal y como se describen. Es por ello que muchos autores han decidido realizar sus estudios

en condiciones ácidas, aunque las reacciones sean más lentas. De hecho, CILLIERS AND SINGLETON (1991) caracterizaron varios productos resultantes de la oxidación del ácido cafeico a diferentes pHs, todos superiores a 4, encontrando que los perfiles cromatográficos eran muy similares, diferenciándose por la proporción de los productos formados. Sin embargo, FULCRAND *et al.* (1994), realizaron la oxidación del ácido cafeico en condiciones más ácidas (pH 3.6), encontrando que se forman otros productos diferentes a los encontrados por los anteriores autores. Los compuestos mayoritarios de esta oxidación son dos isómeros del ácido 2,5-(3',4'-dihidroxifenil)-tetrahidrofuran-3,4-dicarboxílico (Figura), formados a partir de la dimerización del ácido cafeico. Dependiendo de la configuración de los enlaces de los sustituyentes del anillo del furano es posible encontrar hasta 4 isómeros distintos, siendo el mayoritario el siguiente:



El mecanismo de formación de los derivados tetrahidrofuranos según FULCRAND *et al.* (1994) es el mostrado en la Figura 10, en la cual el agua actúa como nucleófilo a bajos valores de pH. Esta reacción no fue observada a altos valores de pH.

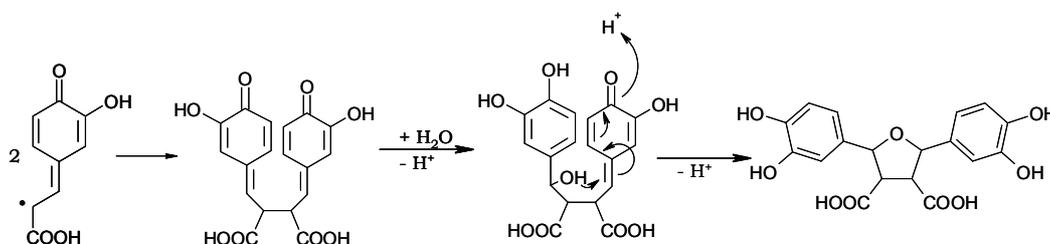


Figura 10. Mecanismos de formación de los derivados tetrahidrofuranos

Como ya ha sido comentado anteriormente, los catalizadores metálicos como cobre o hierro pueden acelerar el proceso de oxidación de los fenoles (GORINSTEIN *et al.*, 1985; CILLIERS AND SINGLETON, 1989). Centrándose en la oxidación del vino, CACHO *et al.* (1995) estudiaron la in-

fluencia del hierro, cobre y manganeso, metales que suelen estar presentes en la composición natural del vino. De los tres cationes metálicos, el hierro y el manganeso parecen tener una mayor influencia en la pérdida de compuestos fenólicos debido a la oxidación de los mismos. A causa de que la concentración en hierro de los vinos es superior a la del manganeso, es por lo que casi todos los estudios se han centrado en el primero.

HOCKING AND INTIHAR (1985) investigaron la oxidación de fenoles por peróxido de hidrógeno catalizada por complejos de hierro, encontrando que un posible mecanismo de actuación sería el que se muestra en la Figura 11:

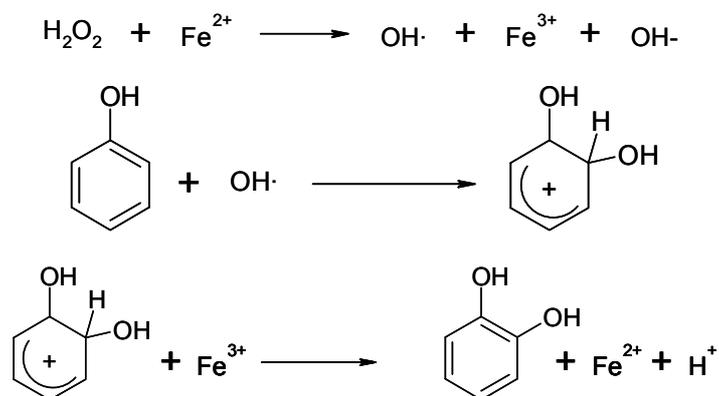


Figura 11. Hidroxilación del fenol catalizada por ión ferroso

Así, OSZMIANSKI *et al.* (1996), centrándose en disoluciones modelo parecidas al vino, catalizaron la oxidación de la (+)-catequina con ión ferroso. Conforme transcurría el tiempo de incubación, las disoluciones previamente incoloras, iban pardeándose, produciéndose numerosos productos de reacción, incluyendo compuestos incoloros. Muchos de los productos formados eran eluidos después de la (+)-catequina en HPLC, lo cual implica que son menos polares y/o mayores en tamaño que el compuesto de partida, tal y como ocurría en oxidaciones enzimáticas de la (+)-catequina (OSZMIANSKI AND LEE, 1990; GUYOT *et al.*, 1995).

Los compuestos amarillentos se van acumulando gradualmente en el medio conforme aumenta el período de incubación de la disolución y cuando la concentración de hierro en el medio es mayor (OSZMIANSKI *et al.*, 1996). Sin embargo, estos autores observaron que tales compuestos amarillentos difieren de los formados por vía enzimática o de los formados en disoluciones de autooxidación en ausencia de hierro.

La estructura original de la (+)-catequina se mantiene en los compuestos incoloros formados, ya que estos muestran espectros UV-visibles semejantes a los de la (epi)catequina y procianidinas, con un máximo de absorbancia cercano a 280 nm. Ello implica uniones C-C y C-O en los dímeros formados. Estos compuestos incoloros deben ser intermediarios en la vía de síntesis hacia los compuestos pardos, tal y como ha sido demostrado en disoluciones de (+)-catequina oxidadas enzimáticamente (GUYOT, 1994).

Dentro de las reacciones de pardeamiento no enzimático, no sólo se produce la oxidación de los flavanoles, también es posible una condensación entre los compuestos fenólicos. Ello es debido a que los fenoles, en general, y los flavanos en particular actúan como agentes nucleófilos (FULCRAND *et al.*, 1994). En este sentido, FULCRAND *et al.* (1996), estudiaron la polimerización inducida por el acetaldehído de los flavan-3-ol en disoluciones modelo parecidas al vino. El acetaldehído está presente en el vino por su producción por parte de las levaduras durante el proceso de fermentación, debido a la crianza biológica en los vinos tipo sherry o por una oxidación previa del etanol, como ya se ha comentado anteriormente. El acetaldehído se añadía al medio de reacción ya que los procesos de condensación son muchos más rápidos en presencia de contenidos más altos de este compuesto (BAKKER *et al.*, 1993).

Estos autores (FULCRAND *et al.*, 1996) incubaron por separado (+)-catequina y (-)-epicatequina con acetaldehído en un medio hidroalcohólico ácido, parecido al vino, encontrando dímeros flavano-flavano unidos por un puente etilo, mediante el mecanismo que se muestra en la Figura 12. El proceso comienza con la protonación del acetaldehído en el medio ácido, convirtiéndose en un carbocatión que experimenta un ataque nucleófilo por parte de la unidad del flavano, bien por el C6 o el C8 del anillo A. El aducto etanólico entonces formado se transforma en un nuevo carbocatión por pérdida de una molécula de agua. La nueva especie sufre entonces un nuevo ataque nucleófilo por una segunda unidad de flavano formándose el dímero, y continuando el proceso, llegándose a formar trímeros, tetrámeros, etc., llegando a detectar hasta hexámeros. Esta misma reacción ya fue estudiada por CACHO *et al.* (1995), pero con el objetivo de demostrar que el hierro cataliza la combinación del acetaldehído con los compuestos fenólicos.

De esta forma FULCRAND *et al.* (1996) confirmaron el mecanismo previamente postulado por TIMBERLAKE AND BRIDLE (1976) y aunque fue demostrado con la (+)-catequina, también la (-)-epicatequina puede realizar el mismo proceso, formándose compuestos análogos a los formados por su isómero. Además, en los resultados obtenidos con la (-)-epicatequina, se observaron más picos de los previstos, lo que sugiere o

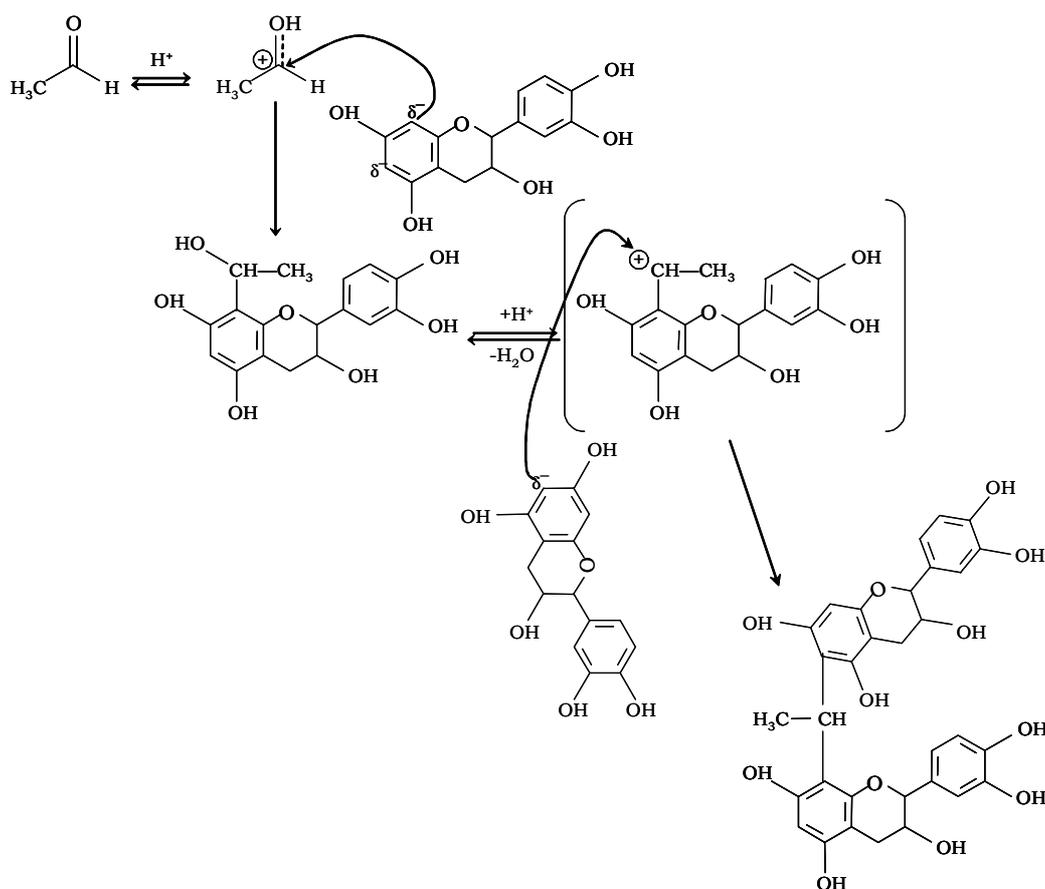


Figura 12. Mecanismo de polimerización de flavan-3-ol inducida por el acetaldehído

bien una contaminación del monómero por su isómero homólogo, o bien una posible epimerización de la (-)-epicatequina en (+)-catequina, formándose así mayor número de compuestos en la disolución.

En este mismo sentido, SAUCIER *et al.* (1997) analizaron la conformación estructural de los compuestos formados en el proceso de condensación de la (+)-catequina con el acetaldehído, confirmando todo lo observado anteriormente.

ES-SAFI *et al.* (1999a) estudiaron la competición de la (+)-catequina y (-)-epicatequina para polimerizarse en presencia de acetaldehído. A todos los valores de pH estudiados, la velocidad de reacción de la (-)-epicatequina es mayor que la (+)-catequina incubados por separado, especialmente cuando las disoluciones modelo ensayadas son más ácidas, es decir con un pH más parecido al del vino. También es interesante des-

tacar que cuando incubaron juntos ambos flavanos, la (-)-epicatequina seguía reaccionando más rápida que la (+)-catequina, pero que, además de los dímeros anteriormente dados por FULCRAND *et al.* (1996), encontraron otros heterogéneos formados por una unidad de catequina y otra de epicatequina unidas por un puente etilo. Además de los dímeros, se formaron otra serie de compuestos, que por la complejidad de los cromatogramas, no pudieron identificar, pero muy probablemente corresponden con trímeros, tetrámeros, etc., heterogéneos además de los homogéneos anteriormente encontrados en las disoluciones en las que fueron incubados por separado.

ES-SAFI *et al.* (1999b) también estudiaron la condensación inducida por acetaldehído de (-)-epicatequina y malvidín-3-O-glucósido, reacción que es posible encontrar en los vinos tintos. Nuevamente obtuvieron productos oligómeros resultado de la condensación del flavano con otro flavano o con la unidad de antociano, unidos por un puente etilo. En ningún caso aparecieron dos unidades de antociano unidas por el puente etil. Es más, en los posteriores trímeros y tetrámeros, encontraron que la unidad de antociano podía formar parte de ellos, pero siempre como unidad final, nunca en el interior de la molécula (Figura 13).

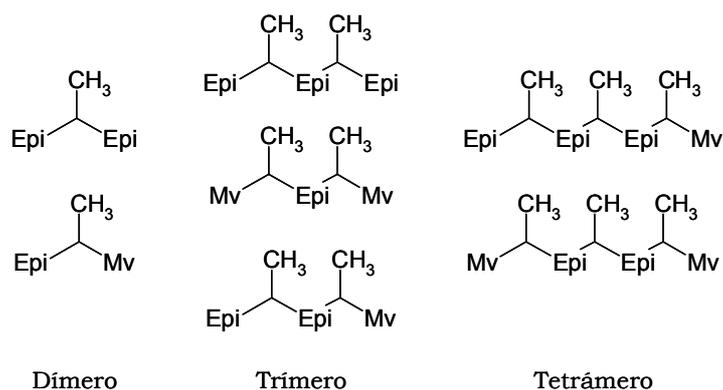


Figura 13. Estructuras simplificadas de los aductos flavano-etil-flavano y antociano-etil-flavano

Como consecuencia, el proceso de polimerización se detiene cuando los finales de la cadena son ocupadas por unidades de malvidina. Es también interesante resaltar el hecho de que no encontraron aductos monómeros intermedios o compuestos dímeros que consistiesen solamente en unidades de malvidín-3-O-glucósido. Ello demuestra que la unidad de antociano no es atacada por el primer carbocatión formado

por protonación del acetaldehído, sino al contrario, solamente es atacada la unidad de flavanol.

Los dos compuestos mayoritarios formados muestran un espectro UV-visible similar al malvidin-3-O-glucósido, lo cual indica que el cromóforo flavylum está presente en ambos pigmentos. Además, los dos muestran un hombro a 450 nm, y la longitud de onda de sus máximos de absorbancia en el visible son significativamente mayores que la del monómero (545 frente a 525 nm), probablemente debido a un efecto de copigmentación inter- o intramolecular, tal y como fue ya descrito por ESCRIBANO-BAILÓN *et al.* (1996) para los compuestos coloreados con puentes etilo obtenidos por la interacción entre la (+)-catequina, acetaldehído y un pigmento flavylum sintético.

Según los datos del análisis por LC/MS obtenidos por ES-SAFI *et al.* (1999b) estudiando la condensación flavano-antociano inducida por acetaldehído, se encontraron intermedios de reacción que indican que quizás el mecanismo de formación es similar al anteriormente postulado por TIMBERLAKE AND BRIDLE (1976) y confirmado posteriormente por FULCRAND *et al.* (1996) para la condensación de flavanos. Sin embargo, el hecho de que la reacción antociano-etil-flavano necesite la contribución de calor para transcurrir, indica que sus aductos son más estables que los equivalentes flavanos.

Al igual que se ha comentado anteriormente, se ha sugerido que los dímeros formados en la condensación antociano-flavano son transitorios, ya que después están involucrados en el desarrollo de compuestos de mayor grado de condensación, los cuales finalmente precipitan (BAKKER *et al.*, 1993; GARCIA-VIGUERA *et al.*, 1994). Todo esto explicaría la pérdida de astringencia y cambio de color observado durante el envejecimiento de vinos tintos.

Pero no solamente es posible el acetaldehído como puente en la condensación de flavan-3-ol, FULCRAND *et al.* (1997) también demostraron que una molécula de ácido tartárico oxidada puede competir con el acetaldehído en la misma función. Para ello incubaron (+)-catequina en un medio hidroalcohólico con iones de hierro (II) y rebajando el pH del medio con ácido tartárico. Para acelerar el proceso, además las disoluciones fueron incubadas a 39°C. Como consecuencia de la catálisis del hierro, el ácido tartárico se oxida a ácido glioxílico, y es éste el que reacciona con las unidades de (+)-catequina, formándose los dímeros, trímeros, etc. por un mecanismo análogo al observado para el acetaldehído (Figura 14). Esta hipótesis la confirmaron los propios autores incubando la (+)-catequina directamente con ácido glioxílico en las mismas condiciones que las anteriores, ya que se formaron los mismos compuestos

observados con el ácido tartárico. Asimismo, se pueden formar estereoisómeros en los dímeros y trímeros al unirse las moléculas o bien por el C6 o bien por el C8 del anillo A, tal y como ocurría con el acetaldehído.

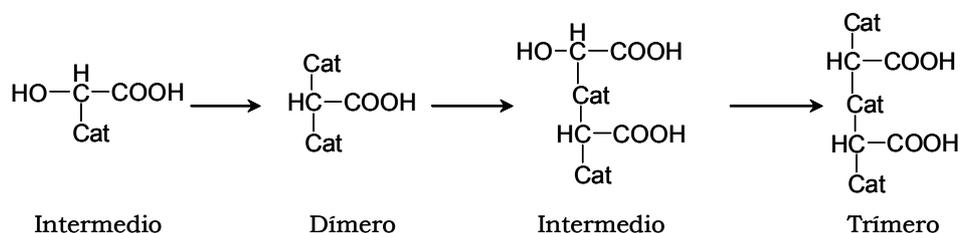
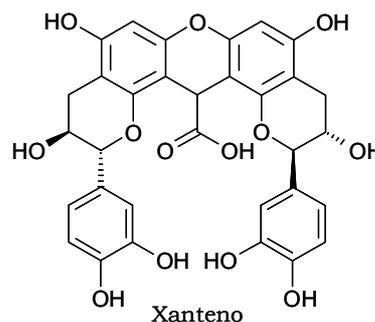


Figura 14. Productos formados en la condensación de (+)-catequina con ácido glioxílico

En esta reacción de condensación, se forman compuestos incoloros y coloreados, si bien la formación de pigmentos amarillentos parece estar relacionado con la desaparición de compuestos incoloros. Considerando la concentración existente de ácido tartárico y de iones ferroso en el vino, esta reacción puede ser una importante ruta en los procesos de envejecimiento, probablemente compitiendo con la policondensación inducida por el acetaldehído descrita anteriormente. Además, es interesante destacar que estos productos amarillos derivados de los incoloros, parecen ser más estables y como consecuencia pueden contribuir a la posterior formación de otros pigmentos coloreados involucrados en los procesos de pardeamiento.

Continuando con esta línea de investigación, ES-SAFI *et al.* (1999c y 1999d) estudiaron la aparición de un nuevo compuesto polifenólico de estructura base xanteno (Figura), formado a partir de la reacción entre (+)-catequina y ácido glioxílico. Así, aislaron por HPLC semipreparativa el dímero incoloro mayoritario formado a partir del flavano y el glioxílico (Figura 15), una vez identificado comprobaron que este compuesto coincidía con el que había sido previamente identificado por FULCRAND *et al.* (1997) como el isómero 8-8.



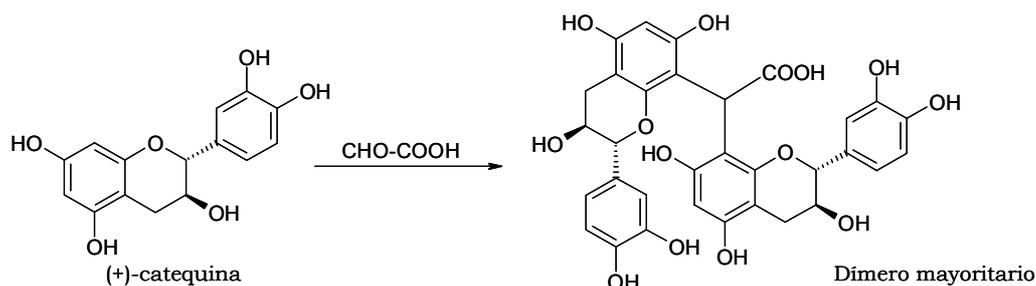


Figura 15. Síntesis de dímeros incoloros a partir de (+)-catequina y ácido glioxílico

Posteriormente estos autores incubaron al citado dímery en una disolución hidroalcohólica a pH 3.5 y comprobaron que, a medida que transcurría el tiempo, se van formando pigmentos amarillos con la consecuente desaparición del compuesto incoloro incubado. Los propios autores (ES-SAFI *et al.*, 1999d) observaron que este pigmento mostraba propiedades similares a las sales del xanteno. Asimismo, propusieron un mecanismo de formación basado en una deshidratación previa del compuesto dímery incoloro obteniendo el xanteno, y una posterior oxidación que conduce a la sal correspondiente (Figura 16):

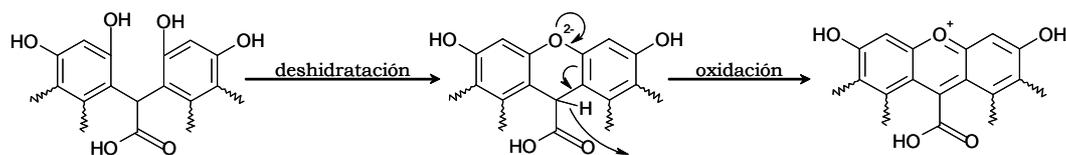


Figura 16. Mecanismo de formación de la sal de xantilium, vía xanteno, a partir del dímery incoloro.

Sin embargo, en la experiencia no sólo obtuvieron este compuesto (sal de xantilium), sino que aparece otro de color amarillo, con características similares y con una masa molecular 28 unidades superior. Todos estos datos llevaron a los autores a pensar que es un derivado de la sal obtenida anteriormente, concretamente un derivado etílico. Este hecho lo confirmaron, porque al incubar la sal en metanol en lugar de etanol, se obtuvo un compuesto también amarillento ligeramente más polar, que correspondía con el derivado metanólico.

Por todo ello, los autores proponen un mecanismo general de formación de compuestos coloreados, derivados de la sal de xantilium, a través del dímery incoloro mayoritario que se forma al reaccionar la (+)-catequina con el ácido glioxílico que se muestra en la Figura 17. El grupo

metoxi o etoxi puede ser fijado por esterificación directa de la sal del xanteno o por esterificación del compuesto dímero incoloro, el cual se puede a su vez ciclar formando compuestos xantenos esterificados, y por oxidación se producen los compuestos xantilium esterificados. Los compuestos 2, 3 y 4 son incoloros, 5, 6 y 7 compuestos tipo xanteno y 8, 9 y 10 son pigmentos amarillentos.

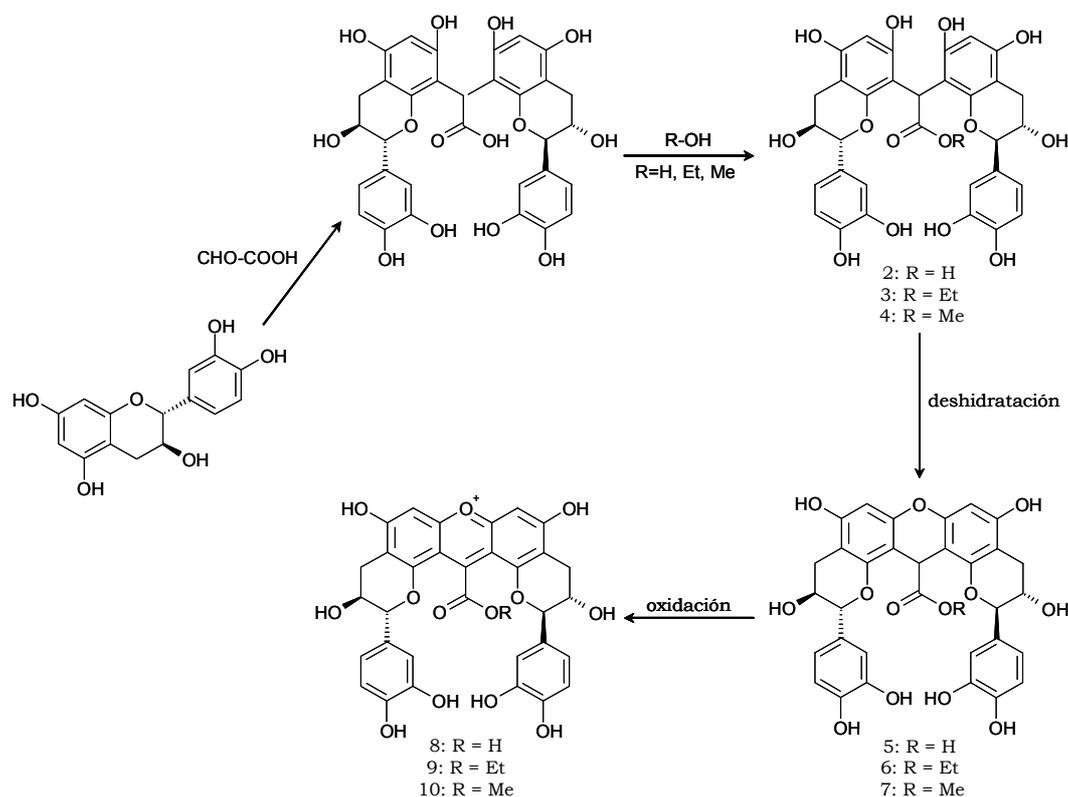


Figura 17. Mecanismo de formación de la sal de xantilium, vía xanteno, a partir de (+)-catequina y ácido glioxílico

Dado que en disoluciones modelo que contenían (+)-catequina, ácido tartárico y etanol se encontraron dos derivados del xantilium, ello implica que estos compuestos se obtienen por la misma reacción, tanto si el ácido glioxílico se añade directamente, como si se forma por oxidación del ácido tartárico (FULCRAND *et al.*, 1997), por lo que esta reacción puede ser una vía de formación de compuestos amarillentos y por tanto una posible contribución al pardeamiento del vino.

Además de los compuestos citados, y obtenidos a partir del dímero mayoritario incoloro, ES-SAFI *et al.* (2000a) obtuvieron otros pero incu-

bando en disolución acuosa el resto de dímeros incoloros que habían sido obtenidos por la citada reacción entre (+)-catequina y ácido glioxílico. En este sentido, cuando incubaron los dímeros resultantes de la unión entre el C6 de una unidad de (+)-catequina con el C8 de otra unidad del flavano mediante un puente etilo, se obtuvieron, en ambos casos, dos nuevos compuestos amarillos con espectro UV-visible similar al xantilium y que mediante análisis posteriores mediante LC-MS indicaron que éstos son isómeros del xantilium (Figura 18a). Los dos isómeros del xantilium se forman por un proceso de deshidratación del dímero incoloro que, a su vez, puede tener lugar en dos posiciones diferentes: o bien entre el grupo hidroxilo del C7 del anillo A de la molécula de (+)-catequina que se ha dimerizado por el C8, o a través del grupo hidroxilo del C5 o C7 del anillo A de la otra molécula de (+)-catequina que se ha unido por el C6 al puente etilo.

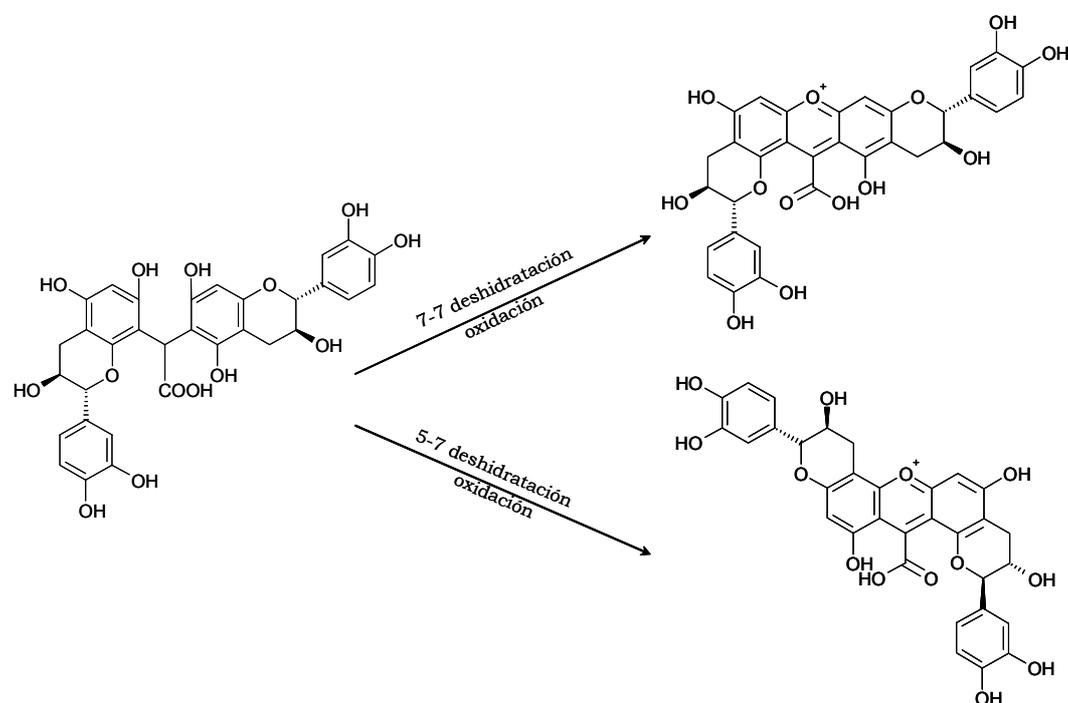


Figura 18a. *Mecanismo de formación de pigmentos amarillos a partir de dímeros incoloros.*

Asimismo, observaron otros picos más pequeños con el mismo espectro que los anteriores y que podrían resultar de la división de los dímeros incoloros, los cuales se pueden recombinar dando otros dímeros isómeros y otros compuestos amarillentos. Finalmente, el último dímero incoloro posible, dos unidades de (+)-catequina unidas por el puente etilo al C6 de ambas, fue incubado en las mismas condiciones que los anteriores, obteniéndose tres compuestos amarillos. El mecanismo de formación de éstos debe ser similar al postulado hasta ahora para los anteriores, es decir, una deshidratación previa seguida de una oxidación. En este caso son posibles tres opciones: deshidratación 5-5, 7-7 y 5-7 (Figura 18b):

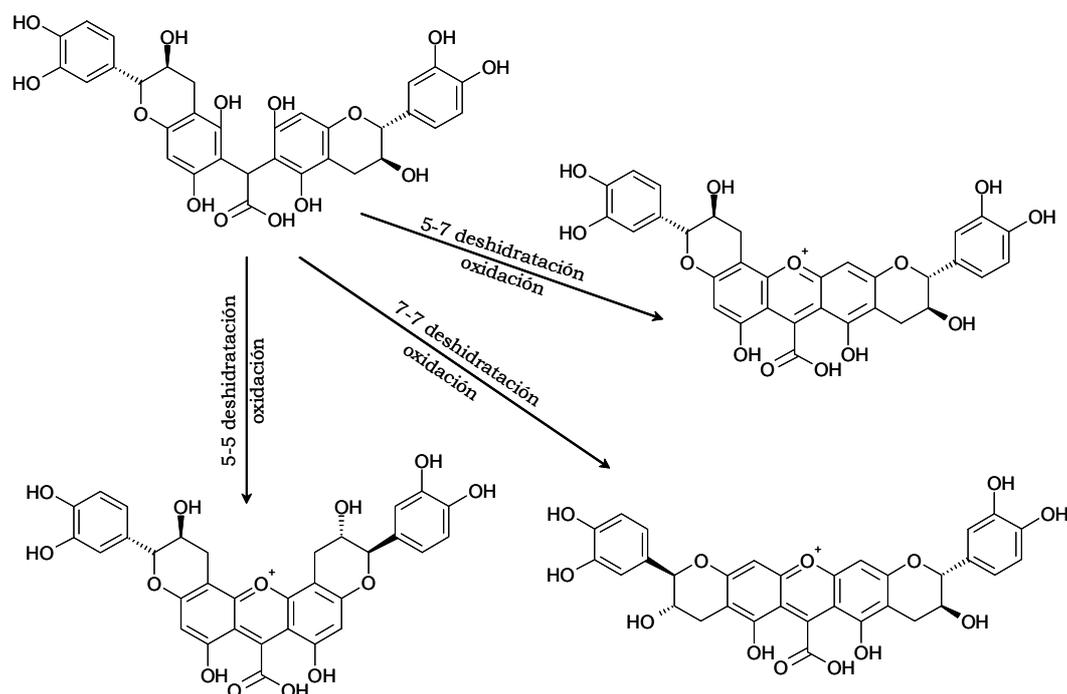
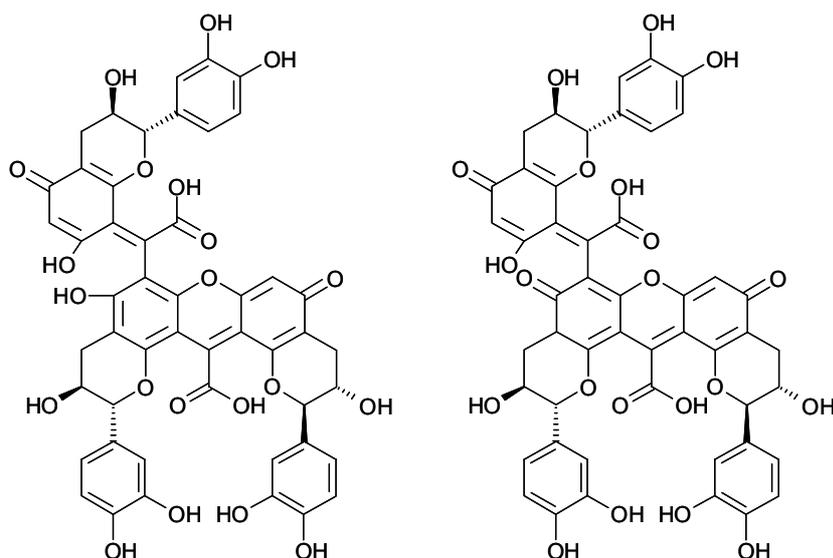


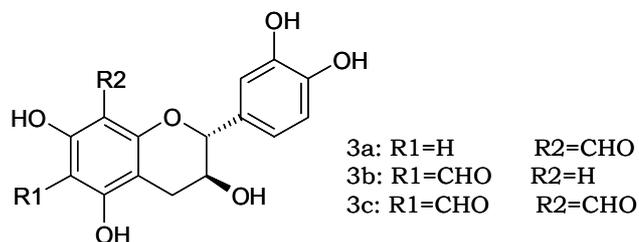
Figura 18b. Mecanismo de formación de pigmentos amarillos a partir de dímeros incoloros.

Todos estos resultados explicarían la gran cantidad de compuestos amarillos formados cuando se incubaba (+)-catequina con ácido tartárico y hierro (OSZMIANSKI *et al.*, 1996; LOPEZ-TOLEDANO *et al.*, 2002). Sin embargo, estos compuestos amarillentos pueden seguir polimerizándose, tal como han demostrado ES-SAFI *et al.* (2000b) después de incubación una disolución de (+)-catequina y ácido glioxílico durante varios días. Así, detectaron dos nuevos compuestos de color rojo, que exhiben un espectro

UV-visible con un máximo de absorción alrededor de 560 nm y cuyos análisis posteriores de LC/ESI-MS en modo ión negativo indicaron que se trataban de estructuras trímeras. La presencia de un esqueleto quinonoidal podría explicar la absorción alrededor de 560 nm observada en ambos compuestos. En la Figura siguiente pueden observarse las estructuras propuestas para estos dos nuevos compuestos coloreados:



Pero no sólo se encontraron estos compuestos coloreados, también se obtuvieron otros compuestos polifenólicos, cuya estructura base se muestra en la siguiente Figura. Tres de ellos (3a, 3b y 3c) exhiben un máximo de absorción en el UV-visible a 295 nm y un hombro alrededor de 340 nm. La elucidación estructural de éstos por RMN mostró que consisten en unidades de (+)-catequina con un grupo aldehído unido a la posición 6 (3b), 8 (3a) o en ambas posiciones a la vez (3c), del anillo A.



Otros tres nuevos compuestos (4a, 4b y 4c) exhibían un espectro similar a las sales de xantiliium. Después de aislar éstos mediante HPLC en escala semipreparativa, concentrarlos al vacío, congelarlos y liofilizarlos, solamente del compuesto 4a obtuvieron cantidad suficiente para poder elucidar su estructura. Así, demostraron que consiste en un derivado de la sal xantiliium con dos unidades de (+)-catequina en las cuales tres de las cuatro posiciones 6 o 8 están sustituidas. En este sentido, estos autores (ES-SAFI *et al.*, 2000b) explicaron la posible estructura de otros picos del cromatograma y además, propusieron posibles reacciones que pueden tener lugar cuando se incubaba (+)-catequina con ácido glioxílico después de varios días (Figura 19).

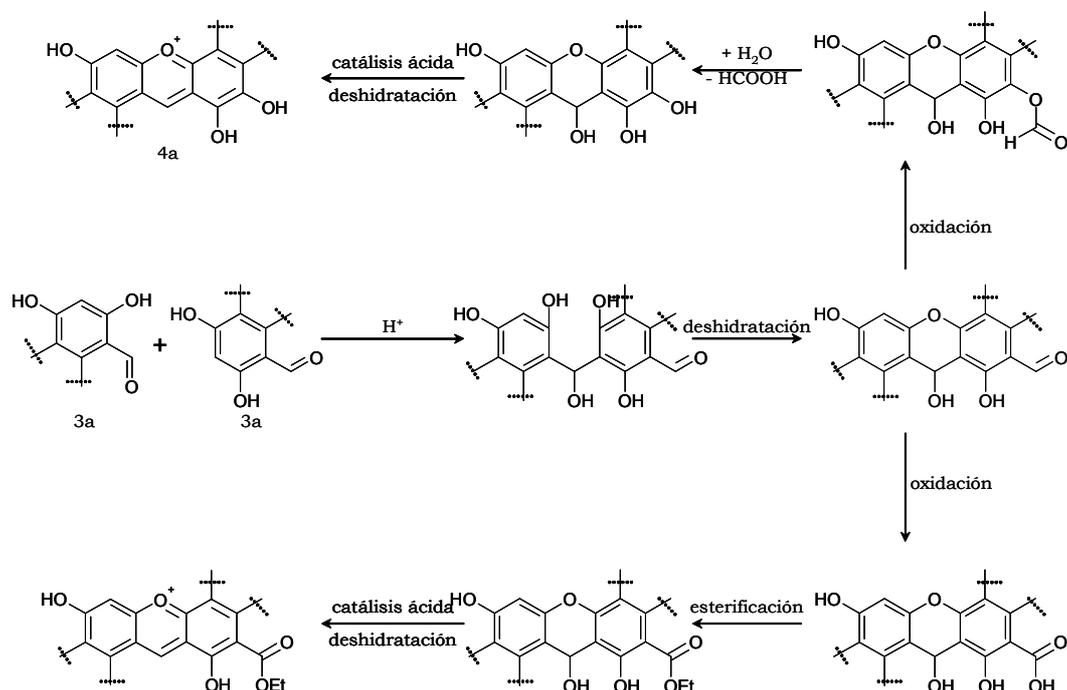


Figura 19. Algunas de las posibles reacciones resultantes de la incubación de (+)-catequina con ácido glioxílico.

Siguiendo en este sentido, ES-SAFI *et al.* (2000c) incubaron (+)-catequina con 5-hidroximetilfurfural (HMF) y furfural, respectivamente, a diferentes pHs. Nuevamente los carbocationes tienen mayor disponibilidad por el furfural o el HMF a bajos valores de pH, tal y como ya habían observado previamente para la reacción con acetaldehído (ES-SAFI *et al.*, 1999b). Cuando la (+)-catequina fue incubada con furfural, la disolución sufrió un progresivo oscurecimiento, llegando a ponerse completamente

negra al final del ensayo. Los compuestos que se obtenían eran muy parecidos a los observados en los estudios de (+)-catequina con ácido glioxílico, pero haciendo de puente el furfural (Figura). Obtuvieron cuatro picos importantes, los cuales son isómeros entre sí. El mecanismo de formación de estos compuestos posiblemente podría ser el mismo que el postulado por TIMBERLAKE AND BRIDLE (1976). En el caso de la incubación con HMF aparecieron compuestos análogos a los descritos anteriormente, siendo incluso más rápidos éstos en formarse. En la Figura 20 se pueden observar los posibles isómeros obtenidos en ambas incubaciones de (+)-catequina (R=H o CH<sub>2</sub>OH, furfural y HMF respectivamente):

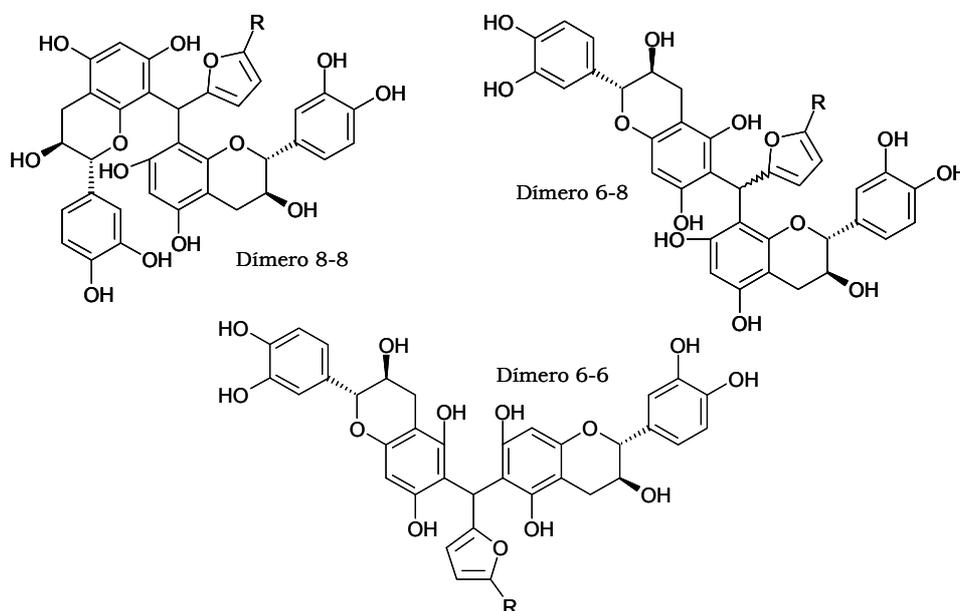
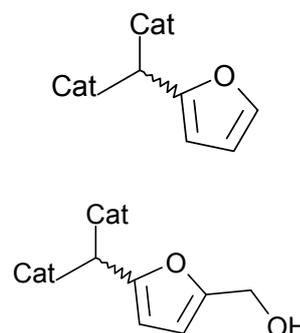


Figura 20. Estructuras de los dímeros (+)-catequina-furfuril y (+)-catequina-hidroximetilfurfuril.

Además de los compuestos descritos, ES-SAFI *et al.* (2000c) obtuvieron otros, los cuales, después de un estudio de su estructura, llegaron a la conclusión que se trataban de estructuras tipo xanteno y xantilium (Figura 21).

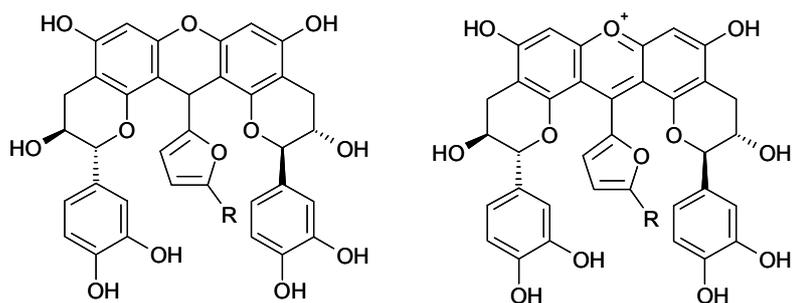
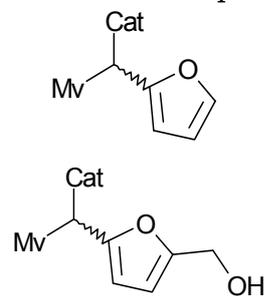


Figura 21. Estructuras derivadas de los dímeros (+)-catequina-furfuril y (+)-catequina-hidroximetilfurfuril.

Además, estos autores, una vez demostrado el papel del furfural y el HMF en los procesos de polimerización de los flavanoles, realizaron la misma experiencia pero incubando (+)-catequina con malvidín-3-O-glucósido. En cualquier caso, observaron la aparición de oligómeros en los cuales el flavanol estaba unido a otra unidad de flavanol o a una unidad de antociano por un puente furfuril o hidroximetilfurfuril. Así obtenían nuevos compuestos coloreados de estructura similar a los encontrados por ES-SAFI *et al.* (1999b) cuando incubaron (-)-epicatequina con malvidín-3-O-glucósido en presencia de acetaldehído.

Por último, es interesante señalar que ES-SAFI *et al.* (2000c) observaron que los dímeros flavanos homogéneos siempre son predominantes en comparación con aquellos que involucran (+)-catequina y malvidín-3-O-glucósido. Este no era el caso de la reacción estudiada en presencia de acetaldehído, en donde los dímeros flavanoles homogéneos eran predominantes al comienzo de la reacción y desaparecían rápidamente en detrimento de aquellos en los que estaban involucrados tanto el flavano como el antociano (ES-SAFI *et al.*, 1999b). El hecho de que la concentración del antociano monómero decrezca más rápidamente que el de (+)-catequina, sumado al hecho de que el decrecimiento del antociano no va acompañado de un incremento de los pigmentos coloreados puenteados, muestra que el antociano puede sufrir otra reacción además de los procesos de polimerización con (+)-catequina y furfural (Figura). Este hecho se confirma con la detección de compuestos que exhiben un espectro UV-visible con absorción máxima a 500 nm, los cuales son similares a los obtenidos de la reacción entre acetaldehído y malvidín-3-O-glucósido, resultando cicloadiciones entre ambos compuestos (BAKKER AND TIMBERLAKE, 1997). Cuando el furfural fue reemplazado por HMF, observaron la formación de compuestos oligoméricos



análogos a los anteriormente comentados.

En conjunto, los compuestos fenólicos presentes en el vino blanco, y en particular los flavanos, están involucrados en multitud de reacciones oxidativas y de condensación, directas o indirectas, lo que puede contribuir a una alteración del color del producto. Debe tenerse presente, además, que el pardeamiento altera los caracteres sensoriales de la bebida de forma proporcional a su avance por lo que, junto al aspecto, su resultado es el rechazo por el consumidor. Por ello, esta alteración condiciona desde el modo de trabajo industrial en algunos tipos de vino, como el fino, hasta los perjuicios económicos que se derivan de su retirada del mercado a partir de un determinado tiempo de almacenamiento.



## **MÉTODOS EXPERIMENTALES**

## **DETERMINACIONES GENERALES**

### **pH**

Para la medida del pH se utiliza un pH-metro digital, siguiendo el método tradicional y efectuando la calibración del instrumento con tampones de 7.02 y 4.00 a 25 °C.

### **ACIDEZ TITULABLE**

Este parámetro, suma de los ácidos libres del vino, se establece previa eliminación del anhídrido carbónico, por valoración con una disolución de hidróxido sódico 0.1 N (estandarizada con ftalato ácido de potasio) de 10 mL de muestra hasta alcanzar un pH 7. El método descrito es el aprobado por la U.E. en el año 1990.

### **ACIDEZ VOLÁTIL**

La acidez volátil se define como el conjunto de ácidos de cadena corta que se encuentran en el mosto o vino. Se excluyen los ácidos láctico y succínico, así como el ácido carbónico y el dióxido de azufre, tanto en su forma libre como combinada.

La cuantificación se efectúa por destilación con arrastre de vapor, rectificación de los vapores y posterior valoración del destilado según el método de la UNIÓN EUROPEA (1990). Para ello, una muestra de 20 mL de vino exenta de gas carbónico se acidifica con 5 mL de disolución de ácido tartárico (100 g/L), antes de proceder al arrastre, recogiendo unos 200 mL de destilado para su posterior valoración con NaOH 0.1 N usando fenoltaleína como indicador. A la acidez del destilado hay que restar el SO<sub>2</sub> arrastrado, ya sea en su forma libre o combinado al acetaldehído, valorándolo para ello con Yodo 0.1 N.

### **DIÓXIDO DE AZUFRE**

El dióxido de azufre total se cuantifica según el método aprobado por la U.E. (1990), basado en una yodometría triple que permite obtener su fracción libre y combinada, considerándose el total como la suma de ambas.

Se parten de 25 mL de muestra a la que se adiciona 3 mL de ácido sulfúrico 0.1 N, 5 mL de engrudo de almidón y 5 mL de una disolución

de AEDT (6 g/L), valorando a continuación con yodo 0.01 N. Tras la valoración anterior se sube el pH añadiendo 8 mL de hidróxido sódico 4 N y se deja reposar durante 5 minutos. Luego se realiza una segunda valoración con yodo 0.01 N, adicionando antes de esta valoración 10 mL de ácido sulfúrico 0.1 N.

Al finalizar esta segunda valoración se adicionan 20 mL de NaOH 4 N, dejando reposar 5 minutos para a continuación diluir con 200 mL de agua fría y añadir 30 mL de ácido sulfúrico 0.1 N, efectuando una tercera yodometría.

El sulfuroso libre, combinado y total se establece a partir de los volúmenes de las valoraciones anteriores.

### **GRADO ALCOHÓLICO**

El método de CROWELL AND OUGH (1979) fue el utilizado para la determinación del grado alcohólico. El etanol del vino se destila con arrastre de vapor y a una alícuota de destilado se le añade un volumen establecido de dicromato potásico para la posterior medida de la absorbancia a 600 nm. La cuantificación se realiza llevando el dato anterior a una recta de calibrado previamente elaborada.

### **MEDIDAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS**

La absorbancia a 280 nm es un índice del contenido en polifenoles totales, ya que los compuestos fenólicos tienen un máximo de absorción en esa zona del espectro. La absorbancia a 420 nm se registra como una medida del pardeamiento del vino blanco (SIMPSON, 1982), ya que los productos de oxidación tienen en los alrededores de esta longitud de onda su máximo de absorción. Además, estos productos pardos pueden presentar ciertas tonalidades rojas, de ahí que sea frecuente registrar la absorbancia a 520 nm.

Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU serie 600, empleando cubetas de cuarzo de 10 mm de paso de luz y una dilución de 1:10 cuando la longitud de onda es de 280 nm, y sin dilución para medir las absorbancias a 420 y 520 nm. Previamente, las muestras fueron filtradas por 0.45  $\mu$ .

## **EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO.**

El método seguido para el fraccionamiento de los distintos compuestos fenólicos se basa en el uso de Cartuchos SEP-PAK C18 (Water Associates, de 820 mg/cartucho) que se eluyen con diferentes disolventes para separar a las distintas familias de compuestos fenólicos (JAWORSKI AND LEE, 1987; OSZMIANSKI *et al.*, 1988; BARON *et al.*, 1997).

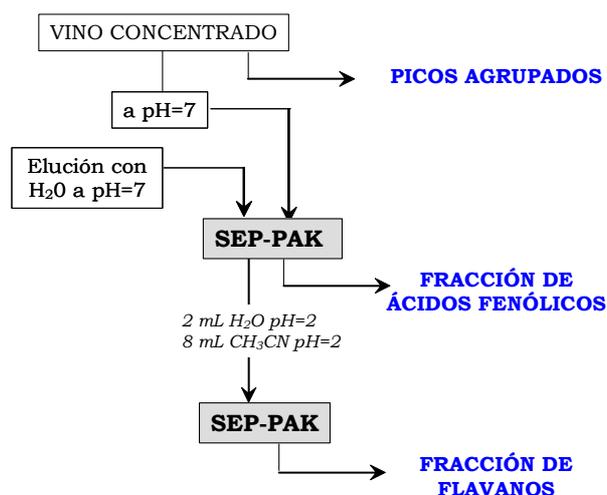
Previamente a la utilización del SEP-PAK en la técnica de separación de compuestos fenólicos, se ha de realizar un preacondicionamiento del cartucho, según el método propuesto por JAWORSKI AND LEE (1987). Para acondicionar el cartucho a un pH 7 se realiza previamente el peinado de las cadenas C18 mediante el paso de 8-10 mL de metanol, seguido del paso de un poco de aire y de 8-10 mL de agua ultrapura llevada a pH 7 con una disolución de NaOH.

Una vez acondicionado el cartucho, el fraccionamiento de los compuestos fenólicos se ha realizado eluyendo con diferentes disolventes tal y como se muestra en el esquema.

Se parte de 100 mL de vino, que se concentran a vacío (temperatura de  $40 \pm 2$  °C) hasta unos 20 mL y se llevan a un matraz aforado de 25 mL enrasando con agua ultrapura. Una pequeña alícuota de este concentrado se utiliza para realizar una inyección directa en HPLC a fin de cuantificar aquellos compuestos de tamaño molecular elevado que no se someten a separación en cartucho, denominados en lo sucesivo PICOS AGRUPADOS.

El vino concentrado se lleva a pH 7 por adición de NaOH y a continuación se hace pasar por el cartucho SEP-PAK previamente acondicionado a pH 7. Después de pasar el vino, se eluye con agua ultrapura (7-8 mL) llevada a pH 7 con NaOH, y la fracción recogida se lleva a sequedad y se enrasa hasta 5 mL con ácido acético al 2% en un matraz aforado. Se filtra a través de  $0.45 \mu$  y se inyecta en HPLC, siendo esta fracción la de ÁCIDOS FENÓLICOS.

Posteriormente el SEP PAK se eluye con 2 mL de agua ultrapura, previamente llevada a pH 2 con HCl. A continuación se pasan 8 mL de CH<sub>3</sub>CN al 16% a pH 2 y todo el líquido que ha eluido por el SEP-PAK se recoge y se enrasa hasta 10 mL con CH<sub>3</sub>CN al 16%; se filtra igual que en el caso anterior y se inyecta en HPLC. Esta fracción recoge a los FLAVANOS o también denominados DERIVADOS DE FLAVAN-3-OL.



### IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO

Las determinaciones se realizaron con un Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia (TermoFinnigan Spectra-System P4000), con Detector UV-V diodo array (TermoFinnigan UV6000LP) y columna Lichrospher 100, con relleno C18 (250 mm x 4,6 mm) y de 5  $\mu$ m de tamaño de partícula. Las condiciones cromatográficas para las distintas fracciones fueron:

- Fase Móvil: A= CH<sub>3</sub>CN y B= CH<sub>3</sub>COOH 2%
- Flujo: 2 mL/min
- Detección: 280, 420 y 520 nm
- Las condiciones de elución para el disolvente A se indican en la siguiente Tabla, correspondiendo la diferencia al disolvente B:

	FRACCIÓN DE	
	ÁCIDOS FENÓLICOS Y PICOS AGRUPADOS	FLAVAN-3-OL
Tiempo	% CH <sub>3</sub> CN	% CH <sub>3</sub> CN
0 min	0	0
5 min	5	15
15 min	5	15
20 min	15	20
30 min	15	30
40 min	100	100
50 min	100	100

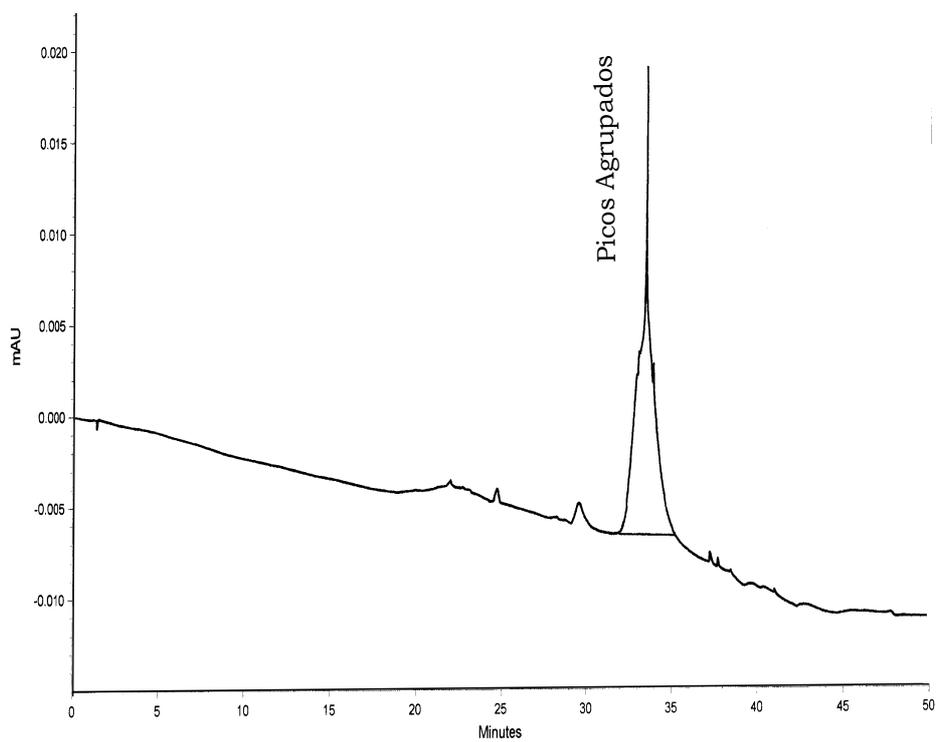
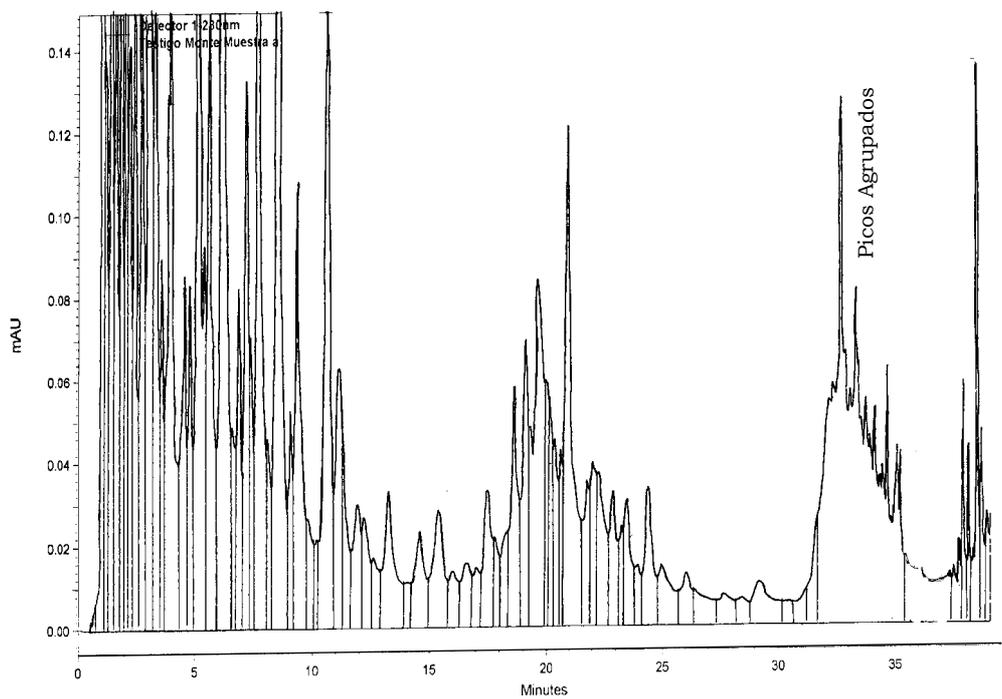
La identificación de los compuestos fenólicos se realizó por comparación con los tiempos de retención y con los espectros UV-V de los patrones inyectados en HPLC y en algunos casos se realizó una co-inyección de patrón y muestra.

En la fracción de ÁCIDOS FENÓLICOS se han podido identificar compuestos pertenecientes a las familias de ácidos hidroxibenzoicos (gálico, protocatéquico, *p*-hidroxibenzoico, *m*-hidroxibenzoico, vanílico y siríngico), ácidos hidroxicinámicos (cafeico, *p*-cumárico y ferúlico), ésteres de ácidos hidroxicinámicos (*t*-caftárico, *c*-cutárico y *t*-cutárico) y además tirosol. Asimismo, se han identificado una serie de compuestos de naturaleza desconocida que, por tener espectros de absorción similares a los fenoles sencillos, fueron cuantificados como ácido gálico y que se han denominado Pico 1, Pico 2, Pico 3, etc.

En el cromatograma correspondiente a la fracción de DERIVADOS DEL FLAVAN-3-OL se han podido identificar los monómeros (+)-catequina y (-)-epicatequina, y las procianidinas B1, B2, B3 y B4. De nuevo, fueron identificados una serie de picos desconocidos (Pico A y Pico B) que por similitud en los espectros de absorción podrían ser, otras procianidinas dímeras y/o trímeras, tetrámeras, etc., según la bibliografía consultada.

En la siguiente Figura (superior) se recoge un cromatograma obtenido por inyección directa de la muestra, y registrado a 280 nm. En él se puede apreciar la presencia de un conjunto de picos solapados, eluidos a altos tiempos de retención (entre 32 y 36 minutos) y que se han denominado Picos Agrupados. Para su cuantificación se han sumado las correspondientes áreas y se han expresado como ácido gálico.

Los denominados Picos Agrupados son estructuralmente desconocidos, aunque deben corresponderse, al menos en su mayor parte, con productos de oxidación y/o polimerización ya que, a diferencia del resto de compuestos fenólicos identificados son coloreados. En la siguiente Figura (inferior) se muestra el mismo cromatograma anterior, obtenido por inyección directa de la muestra, pero registrado a 420 nm. Puede comprobarse que sólo la zona correspondiente a los Picos Agrupados presenta absorbancia significativa a esta longitud de onda, lo que sugiere de nuevo que estos compuestos sean productos de pardeamiento.



### CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO

Las sustancias patrón utilizadas fueron suministradas por Sigma-Aldrich Chemical Co. (Madrid, España) y Sarsynthese Co. (Genay, Francia). Los ésteres de los ácidos hidroxicinámicos fueron aislados por el grupo de investigación (MAYEN *et al.*, 1995; BARON, 1997) según el método propuesto por SINGLETON *et al.* (1978).

De cada uno de los compuestos fenólicos identificados en las muestras de vino se prepararon disoluciones de diferente concentración que se sometieron al mismo procedimiento analítico que las muestras (método de SEP-PAK) y se inyectaron en HPLC con las mismas condiciones cromatográficas. Para cada uno de los compuestos se construyeron rectas de calibración, cuyas ecuaciones y coeficientes de regresión aparecen en la siguiente Tabla:

COMPUESTO	RECTA DE CALIBRACIÓN	COEFICIENTE REGRESIÓN
ÁCIDO GÁLICO	$y = 139781.8 x - 142537.3$	0.9977
ÁCIDO PROCATÉQUICO	$y = 77805.3 x - 92598.1$	0.9934
ÁCIDO <i>p</i> -HIDROXIBENZOICO	$y = 74096.2 x - 85191.3$	0.9924
ÁCIDO <i>m</i> -HIDROXIBENZOICO	$y = 27995.0 x - 68284.6$	0.9928
ÁCIDO VANÍLLICO	$y = 79486.4 x - 37539.6$	0.9919
ÁCIDO SIRÍNGICO	$y = 103088 x - 211689.1$	0.9986
ÁCIDO CAFEICO	$y = 224116.7 x - 104042.7$	0.9921
ÁCIDO <i>p</i> -CUMÁRICO	$y = 242373.3 x - 182908.2$	0.9946
ÁCIDO FERÚLICO	$y = 128285.9 x - 159332.8$	0.9962
ÁCIDO <i>t</i> -CAFTÁRICO	$y = 55410.3 x - 65237.58$	0.9978
ÁCIDO <i>c</i> -CUTÁRICO	$y = 52816.59 x + 278351.1$	0.9999
ÁCIDO <i>t</i> -CUTÁRICO	como <i>c</i> -CUTÁRICO	
TIROSOL	$y = 17053.8 x - 9839.9$	0.9996
(+)-CATEQUINA	$y = 20220.4 x - 18959$	0.9998
(-)-EPICATEQUINA	$y = 20713.9 x - 18345.2$	0.9999
PROCIANIDINA B1	$y = 27508.4 x - 16783.5$	0.9993
PROCIANIDINA B2	$y = 30764.0 x - 5004.7$	0.9996
PROCIANIDINA B3	como PROCIANIDINA B1	
PROCIANIDINA B4	como PROCIANIDINA B1	
PICOS AGRUPADOS	como ÁCIDO GÁLICO	
PICO 1, PICO 2, etc	como ÁCIDO GÁLICO	
PICO A, PICO B, etc	como (+)-CATEQUINA	

### IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN DISOLUCIONES MODELO

Las sustancias patrón (+)-catequina y (-)-epicatequina utilizadas fueron suministradas por Sigma-Aldrich Chemical Co. (Madrid, España). La determinación de estos flavanos y de los nuevos compuestos que aparecen durante su periodo de incubación se realizó por HPLC con el mismo instrumento anteriormente descrito, utilizando el siguiente método cromatográfico:

Fase Móvil: A= CH <sub>3</sub> CN B= CH <sub>3</sub> COOH 2%  Flujo: 2 mL/min  Detección: 280, 420 y 520 nm	Tiempo	Elución disolvente A
	0 min	0
	5 min	5
	15 min	5
	20 min	15
	30 min	15
	40 min	100
50 min	100	

Se realizaron inyecciones directas de pequeñas alícuotas de las disoluciones modelo. La identificación se realizó por comparación con los tiempos de retención y con los espectros UV-V de los patrones. Para la cuantificación se construyeron unas nuevas rectas de calibrado, utilizando las sustancias patrón (+)-catequina y (-)-epicatequina. Los picos nuevos registrados, estructuralmente desconocidos, se cuantificaron como ácido gálico, tanto a 280 nm como a 420 nm. La Tabla siguiente muestra para cada una de las rectas de calibrado obtenidas, las ecuaciones y sus coeficientes de regresión.

COMPUESTO	RECTA DE CALIBRACIÓN	COEFICIENTE REGRESIÓN
(+)-CATEQUINA	$y = 32840.92x - 62404.31$	0.9999
(-)-EPICATEQUINA	$y = 29408.87x - 518446.2$	0.9987

## **TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS**

En los diferentes capítulos de esta memoria, se han realizado distintos tratamientos estadísticos sobre los resultados de los triplicados de las muestras para las diferentes experiencias realizadas. Entre ellos se incluye Análisis Multivariante de Componentes Principales, Análisis de Regresión y Análisis de Varianza Unifactorial usando Statgraphics Statistical Computer Package (Statistical Graphics Corp.).

**ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO BIOLÓGICO  
DE VINOS BLANCOS EN CONDICIONES  
CONTROLADAS DE LABORATORIO**

## INTRODUCCIÓN

Los vinos tipo fino son típicos de la D.O. Montilla-Moriles y Jerez-Xerex-Sherry, y se distinguen por poseer un color amarillo muy pálido y flavor almendrado, con carácter punzante. Estos vinos son obtenidos mediante crianza biológica, proceso realizado posteriormente a la obtención del vino a partir de la fermentación alcohólica del mosto. La crianza biológica se caracteriza por el crecimiento de una capa de levaduras, denominada velo, sobre la superficie del vino durante su almacenamiento en botas de madera. Debido a que dependiendo de la estación del año, ese velo formado por las levaduras “florece”, formándose una capa más gruesa, tradicionalmente se les ha denominado también levaduras de flor. Como levaduras dominantes deben ser citadas *Saccharomyces cerevisiae*, razas *beticus*, *chere-siensis* y *montuliensis* para la región de Jerez (CASAS, 1985), en tanto que en Montilla-Moriles son la *capensis* y *bayanus* las dominantes.



El desarrollo de las levaduras de flor se ve principalmente influenciado por el contenido en etanol del vino, el cual se sitúa alrededor de 15 % v/v, y la temperatura durante el envejecimiento (inferior a 22.5 °C). Alejándose de estas cifras, por ejemplo según la temperatura de la estación del año, el velo de flor se deteriora, lo que hace más lento el proceso de envejecimiento (IBEAS *et al.*, 1997).

El color es el primer elemento de diferenciación de los diferentes tipos de vinos sherry por el consumidor. Los vinos finos obtenidos por envejecimiento biológico, muestran un color amarillo muy pálido que los diferencia claramente de otros tipos de vinos sherry procedentes de envejecimiento oxidativo. Este pálido color es consecuencia de que estos vinos finos experimentan durante el envejecimiento biológico un escaso pardoamiento que tradicionalmente se ha atribuido al efecto de protección que ejercen las levaduras de velo desarrolladas sobre su superficie frente al oxígeno atmosférico (MARTINEZ DE LA OSSA *et al.*, 1987; DOMEQ, 1989).

Sin embargo, esta interpretación puede ser parcialmente criticada, ya que de una parte, se debe considerar que la madera es un material poroso, la cual permite la entrada de aire, por lo que su influencia no debe ser despreciada en envejecimientos de larga duración, como es el caso del envejecimiento biológico. Por otra parte, el efecto de protección de las levaduras de velo no es ejercido durante todo el año a causa de las exigentes condiciones de temperatura (alrededor de 20°C), que necesitan

para su desarrollo. Por ello, estas levaduras se desarrollan fuertemente durante primavera y otoño, dejando al vino parcialmente en contacto con el aire durante verano e invierno. Por último, a fin de obtener un vino de características organolépticas similares de un año a otro, se llevan a cabo trasiegos periódicos, denominados rocíos, que se realizan en contacto con el aire, lo que conduce a su saturación temporal en oxígeno, el cual paulatinamente es consumido durante el siguiente nivel de envejecimiento. Todo ello sugiere que, además del mencionado efecto de protección, las levaduras de velo retienen compuestos pardos, controlando de esta forma el incremento en la concentración de los mismos y con ello la evolución negativa del color (BARON *et al.*, 1997).

El siguiente capítulo tiene como objetivo estudiar la evolución del color y de los compuestos fenólicos de vinos durante el envejecimiento biológico manteniendo constantes algunos de los factores que inciden sobre este tipo de crianza, a fin de poder asignar los cambios observados al mínimo número posible de causas. Para ello, las experiencias se realizan con control de temperatura, en recipientes de vidrio y con inoculación de cultivos puros de levaduras de velo.

## **MATERIAL EXPERIMENTAL**

El vino utilizado para la realización de esta experiencia procede de la fermentación de mosto de uva de la variedad *Pedro Ximénez* realizada en una bodega de la Denominación de Origen Montilla-Moriles durante la campaña 95/96, siguiendo los criterios industriales de la bodega. La siguiente Tabla muestra las principales determinaciones generales realizadas en este vino.

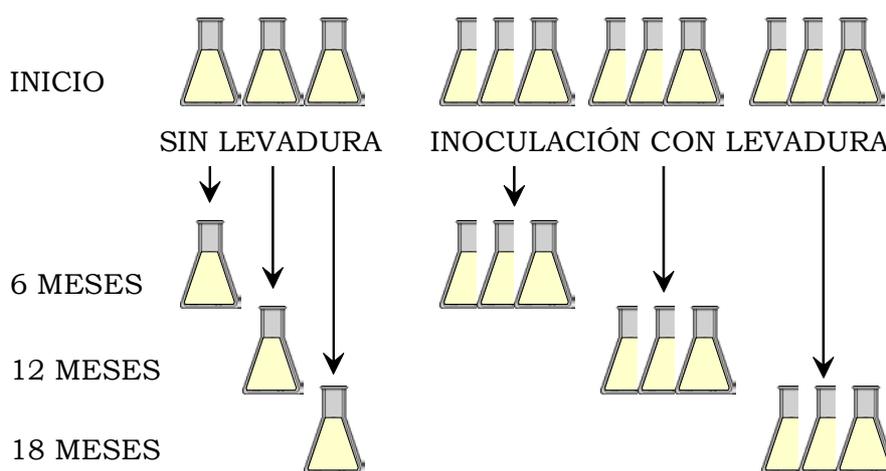
Etanol (% v/v)	15.7 ± 0.0
Acidez Volátil (meq/L)	4.30 ± 0.04
Acidez Titulable (meq/L)	64.5 ± 0.0
pH	3.19 ± 0.00
Azúcares Reductores (g/L)	4.80 ± 0.00
SO <sub>2</sub> libre (mg/L)	6.20 ± 0.00
SO <sub>2</sub> combinado (mg/L)	64.3 ± 0.1
SO <sub>2</sub> total (mg/L)	74.9 ± 0.7

Previamente al inicio de la experiencia, el vino fue homogeneizado, esterilizado por filtración EK (SEITZ, Alemania) y separado en varios lotes según se muestra en el esquema siguiente. Los recipientes utilizados en todos los casos fueron erlenmeyer de 5 litros de capacidad, los cuales se rellenaron hasta un volumen de 4.5 litros, a fin de obtener una relación superficie/volumen de 15.8 cm<sup>2</sup>/L, igual a la tradicionalmente utilizada en la zona Montilla-Moriles para rellenar los barriles de roble americano durante la crianza biológica.

El primer lote contiene recipientes con vino estéril, sin ninguna carga microbiológica (denominado vino Sin Levadura), y que se deja evolucionar durante el tiempo de duración de la experiencia. La toma de muestras se realiza por triplicado en cada uno de los recipientes. El segundo lote contiene recipientes con vino que se inocularon por triplicado con levadura *Saccharomyces cerevisiae* raza *capensis* (colección de levaduras del Dpto de Microbiología de la Universidad de Córdoba), hasta una población inicial de 10<sup>6</sup> células vivas/mL.

Durante el desarrollo de la experiencia, todos los recipientes se mantuvieron en una cámara termostatazada a 20 °C, con una humedad relativa en el ambiente que superó en todo momento el 70%, preservados de la luz y tapados con algodón hidrófobo esterilizado.

La toma de muestras se realizó en el vino de partida y a los 6, 12 y 18 meses de iniciadas las experiencias. Con objeto de mantener siempre constante la relación superficie/volumen, al inicio se parte de tantos recipientes como tomas de muestras estaban previstas, tal y como se muestra en el esquema de la experiencia.

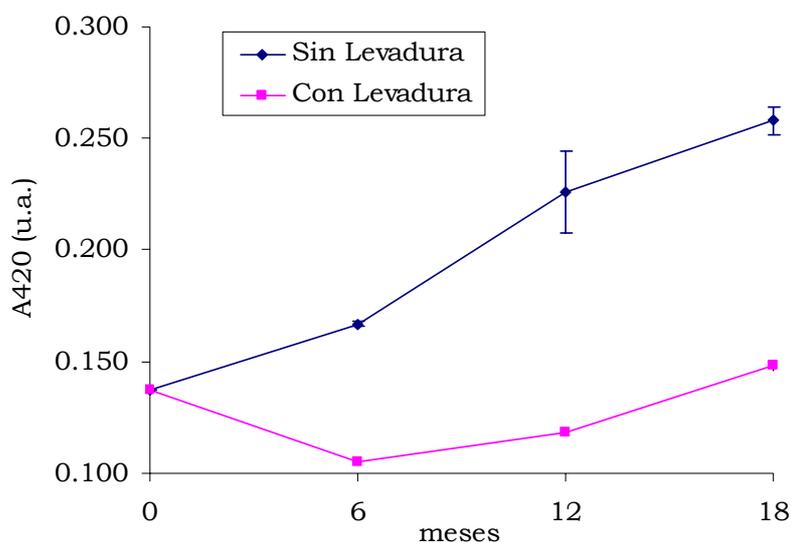


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 (Anexo) muestra los valores por triplicado, medias y desviaciones estándar obtenidas para las medidas espectrofotométricas realizadas a las muestras de vino durante el desarrollo de la experiencia.

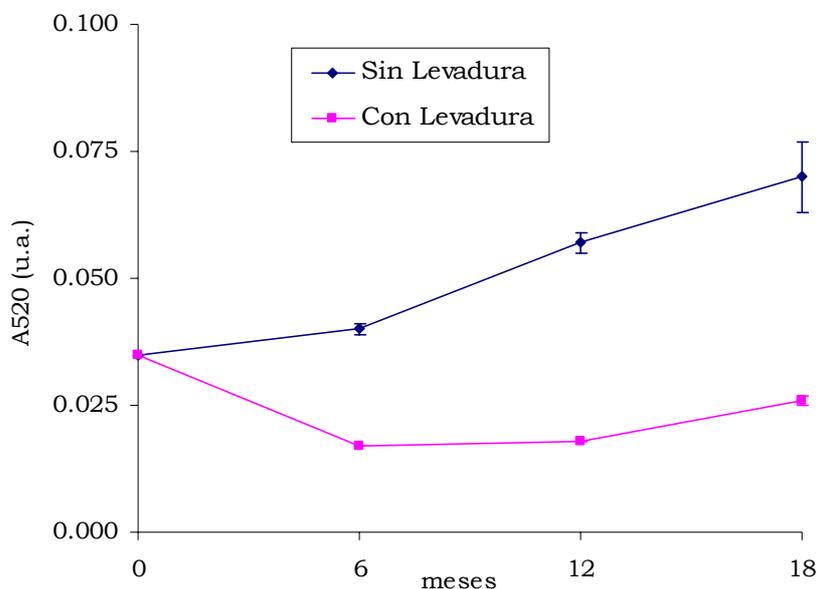
La absorbancia a 420 nm se usa como medida habitual del pardeamiento del vino, a causa de que los productos pardos procedentes de la oxidación de compuestos fenólicos muestran un máximo de absorción en esta zona del espectro visible. En la siguiente Figura se muestra la evolución de los valores medios de la absorbancia a 420 nm a lo largo del tiempo de estudio tanto en ausencia como en presencia de levadura.

Como puede observarse, el valor inicial de la absorbancia es de 0.137 u.a., que en ausencia de levadura aumenta progresivamente hasta valores ya excesivamente altos para la salida del vino al mercado. En concreto, en los primeros seis meses, el color del vino incrementa en un 22%, mientras que en los siguientes seis meses lo hace en un 35%, para alcanzar un valor de 0.226 u.a. al año de comienzo de la experiencia. Finalmente, a los dieciocho meses el color del vino es 1.88 veces más alto que al inicio de la experiencia (A420 de 0.258 u.a.). Este progresivo aumento de la absorbancia a 420 nm puede ser atribuido a la oxidación y polimerización de los compuestos fenólicos (SIMPSON, 1982; OSZMIANSKI *et al.*, 1985; DALLAS *et al.*, 1995; FERNANDEZ-ZURBANO *et al.*, 1995), reacciones que provocan la formación de compuestos coloreados, principalmente en el rango del espectro correspondiente a la zona del amarillo-pardo.



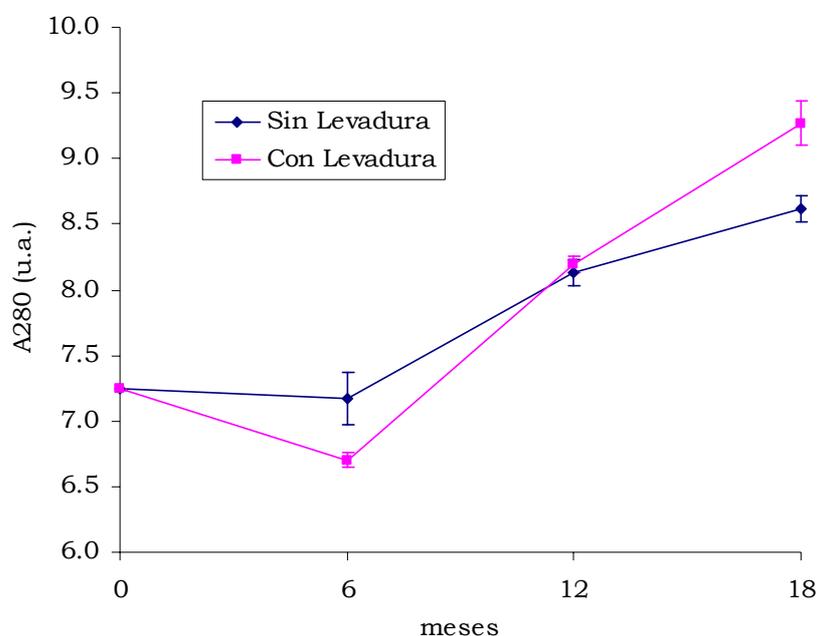
Sin embargo, puede observarse una diferente evolución del color cuando el vino envejece en presencia de levaduras de velo. Así, el vino muestra en los primeros seis meses una disminución en el valor de absorbancia de 0.137 a 0.105 u.a., que puede ser atribuida a la precipitación de los compuestos fenólicos polimerizados presentes en el vino joven. Dicha polimerización está favorecida por la presencia de acetaldehído (HASLAM AND LILLEY, 1988), producido por las levaduras de velo desarrollada en la superficie del vino durante el proceso de crianza biológica. Desde los seis meses hasta ya el final de la experiencia, (18 meses), el vino va aumentando progresivamente su valor de absorbancia a 420 nm, aunque a una menor velocidad que en ausencia de levadura de flor, alcanzando un valor final de 0.148 u.a., sólo un poco superior que la que tenía el vino al comienzo de la experiencia, y que todavía entra dentro del rango de valores aceptado en el mercado para su comercialización.

La Figura siguiente muestra la evolución de los valores de absorbancia a 520 nm de los vinos a lo largo del período de estudio. La gráfica muestra un comportamiento parecido de los vinos al ya comentado para la absorbancia a 420 nm, tanto en presencia como en ausencia de levaduras, con la salvedad de que el orden de magnitud de esta absorbancia es mucho menor, ya que hace referencia a tonos rojizos, muy escasos en este tipo de vinos.



La Figura mostrada seguidamente presenta la evolución del contenido en polifenoles totales, medido como A280, durante el envejecimiento del vino. El vino inicial presenta un valor de 7.24 u.a. que, en ausencia de levadura y durante los primeros 6 meses de experiencia, prácticamente se mantiene para posteriormente ir aumentando de forma progresiva. Dicho aumento es más acentuado entre los seis y los doce meses, (13.4%) ya que entre los doce y los dieciocho meses el incremento en el valor de absorbancia es sólo de un 6%, llegando al final del tiempo de desarrollo de la experiencia a un valor de 8.62 u.a.

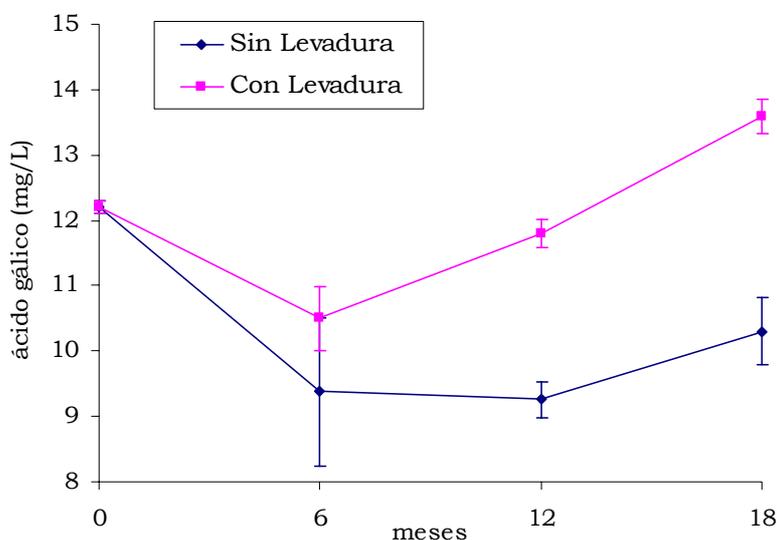
En presencia de levadura de velo, el vino experimenta en los primeros seis meses un descenso acusado en los valores de absorbancia (de 7.24 a 6.70 u.a.), para luego aumentar desde los seis meses hasta los dieciocho meses, con una pendiente más o menos constante, llegando a valores finales de 9.27 u.a. Cuando el envejecimiento biológico del vino tiene lugar en la bodega, este aumento podría ser explicado por una extracción de compuestos desde los barriles de madera, fundamentalmente lignina y taninos, como han puesto de manifiesto algunos autores (PUECH, 1987; VIRIOT *et al.*, 1993). Sin embargo, en esta experiencia, donde el envejecimiento del vino tiene lugar en recipientes de vidrio, el aumento de la absorbancia y, por tanto, el contenido en polifenoles totales, puede ser explicado en base a un aumento de la concentración de compuestos fenólicos incoloros, que podrían proceder de una hidrólisis de los taninos presentes en el vino blanco, razón por la cual no se traduce en un aumento paralelo en los valores de la absorbancia a 420 nm. No



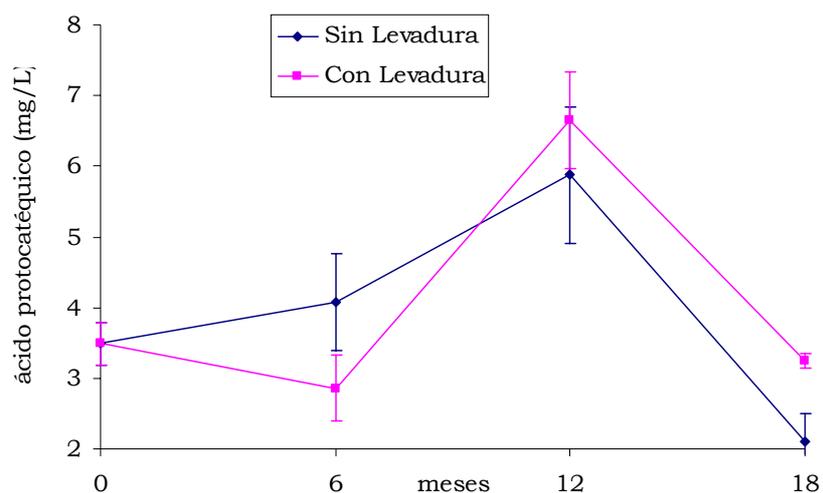
obstante, esta interpretación es delicada si se tiene en cuenta que a esta longitud de onda absorbe un gran número de compuestos, particularmente aquellos que poseen anillos bencénicos, y que proceden del metabolismo levaduriano.

La Tabla 2 (Anexo) muestra los contenidos por triplicado, media y desviación estándar, de los diferentes ácidos hidroxibenzoicos en los vinos estudiados.

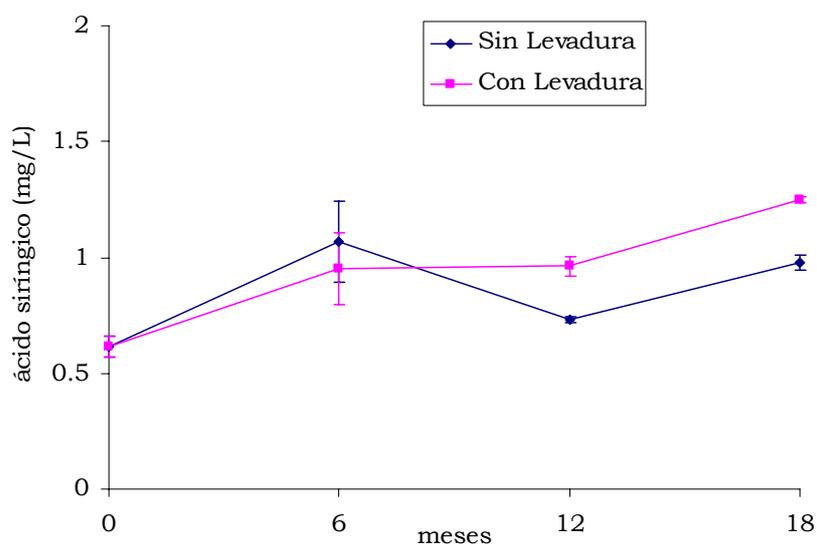
La siguiente Figura muestra los contenidos en ácido gálico para los vinos envejecidos en presencia y en ausencia de levadura y a lo largo del periodo de estudio. Puede observarse que el vino que evoluciona en ausencia de levadura de velo muestra al comienzo de la experiencia un descenso en los niveles de este ácido (23.12%), llegando a valores cercanos a 9.3 mg/L, manteniéndose estadísticamente en dicho valor hasta los doce meses. Posteriormente, se produce un pequeño aumento en la concentración del ácido desde los doce meses hasta los dieciocho meses, quedando el vino en una concentración de 10.3 mg/L al final de la experiencia. La evolución del vino en presencia de levadura de velo, muestra que en los primeros seis meses se produce una disminución de la concentración de ácido gálico de 13.94%, menor que la producida cuando el vino estaba ausente de levadura. Sin embargo, posteriormente hay un aumento continuado hasta los dieciocho meses, llegando a valores finales de 13.6 mg/L, que son incluso superiores a los iniciales.



Como se puede observar en la siguiente Figura, la evolución del ácido protocatéquico sigue tendencias muy parecidas en ambas muestras de vino. Solamente cabe destacar que en presencia de levadura de velo y al final del tiempo de estudio, el vino tiene una concentración en este ácido fenólico prácticamente igual que al comienzo, de 3.24 mg/L, mientras que cuando el vino no está protegido por la levadura, llega a valores incluso inferiores (2.11 mg/L).

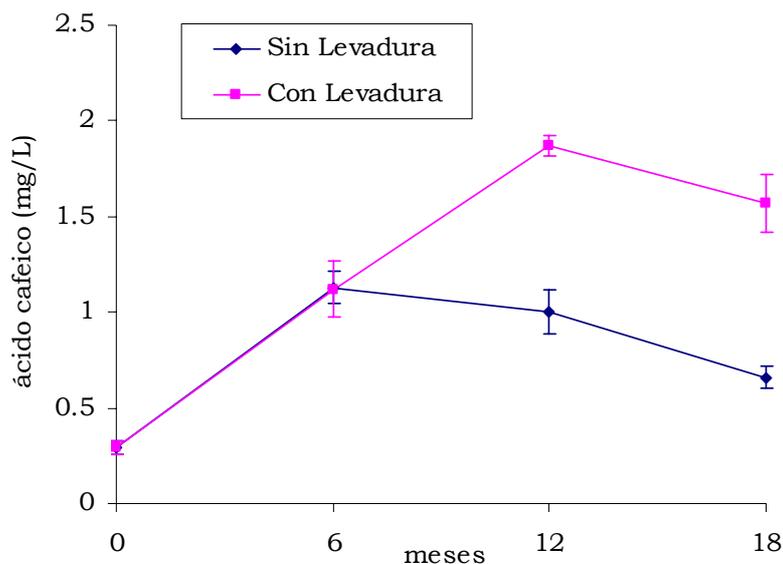


La Figura siguiente muestra la evolución de la concentración de ácido siríngico a lo largo del tiempo de estudio para las dos experiencias realizadas. Como se puede apreciar, en los primeros seis meses, tanto el

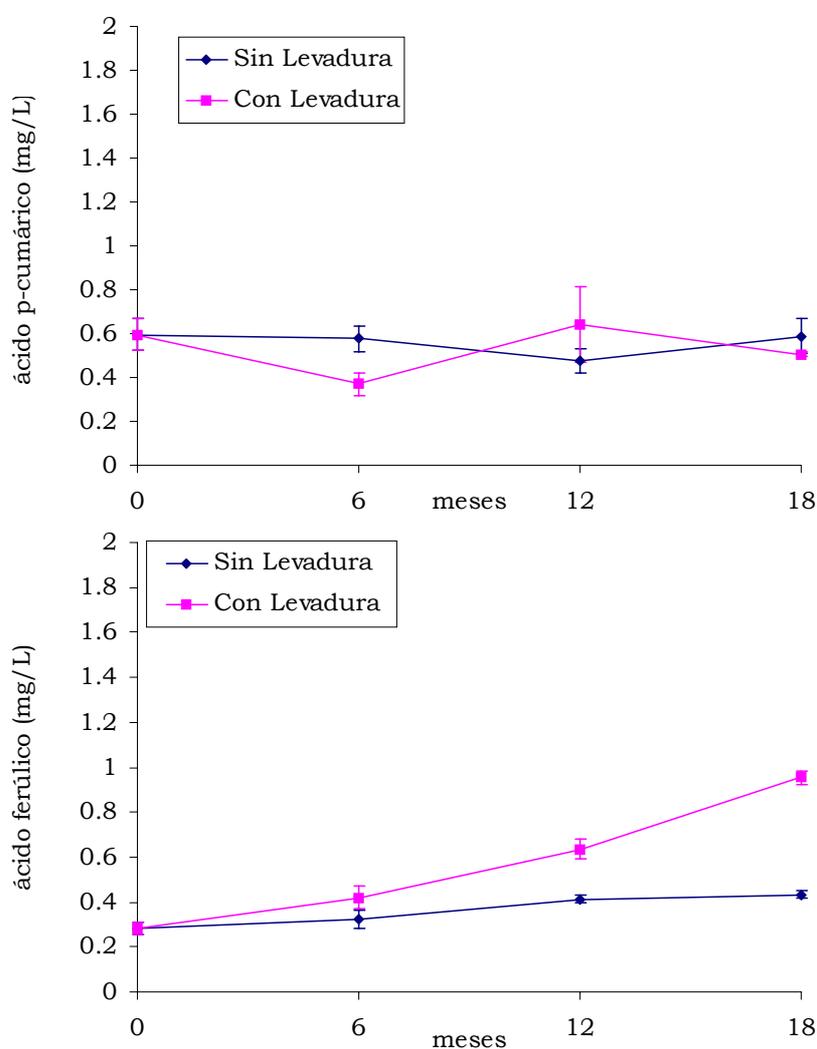


vino que evoluciona con levadura de velo como el correspondiente sin levadura aumentan sus contenidos, aunque se debe tener en cuenta que el rango de concentración es mucho menor para este ácido que para los anteriormente comentados. Asimismo, desde los seis hasta los dieciocho meses, la concentración en este ácido no experimenta variación significativa, tanto en ausencia como en presencia de levadura de velo.

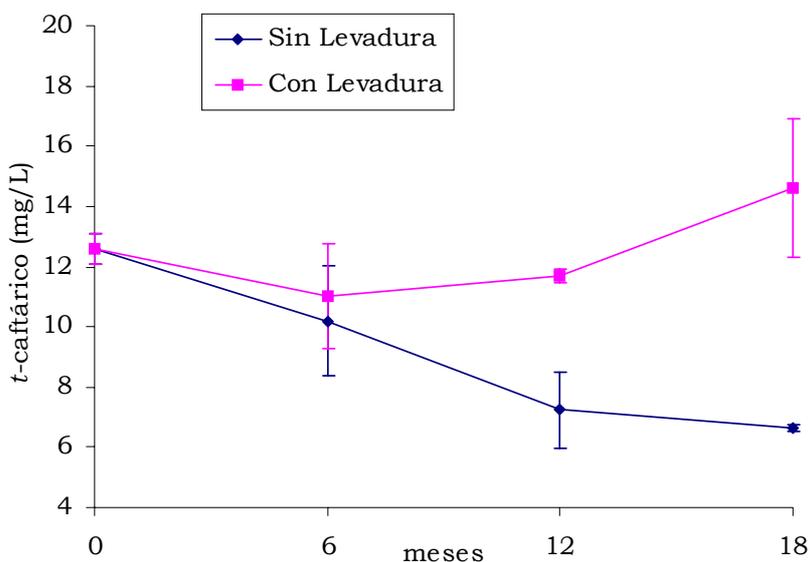
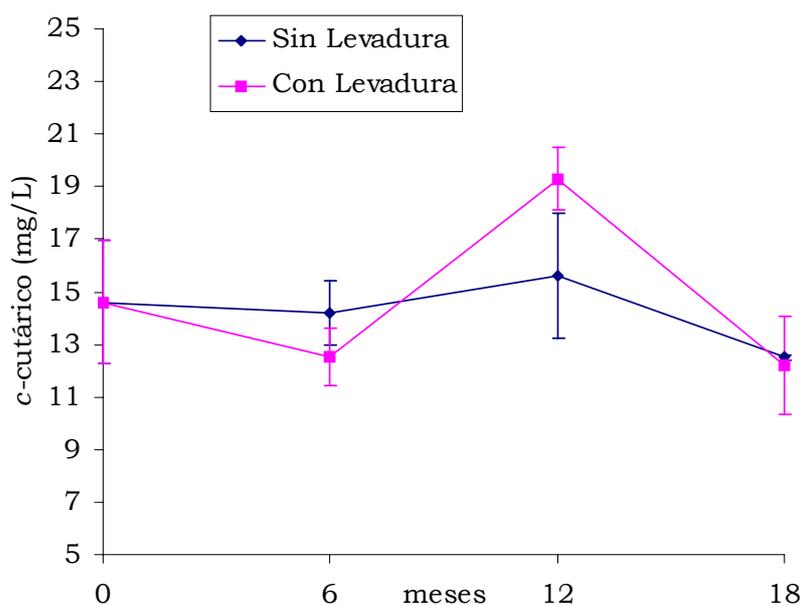
La evolución del ácido cafeico durante el envejecimiento del vino, tanto en presencia como en ausencia de levadura, se muestra en la siguiente Figura. Como puede observarse en ambos tipos de envejecimiento, la evolución de este ácido es la misma en los primeros seis meses, aumentando la concentración en 3.86 veces el valor inicial. A partir de este punto, la evolución es diferente para los vinos de las dos experiencias. En presencia de levadura de velo, el vino sigue aumentando su concentración en cafeico hasta los doce meses con una progresión constante, disminuyendo hacia el final de la experiencia. Para el vino que evoluciona sin levadura de velo sigue disminuyendo su concentración en este ácido de manera casi lineal a partir de los seis meses y hasta el final de la experiencia.



La siguiente Figura muestra la evolución del ácido *p*-cumárico en los dos tipos de envejecimiento, en la que puede observarse que las concentraciones de este ácido permanecen prácticamente constantes durante el desarrollo de la experiencia, sin encontrar diferencias significativas entre ambos tipos de envejecimiento. Sin embargo, en la evolución del ácido ferúlico se aprecia una ligera diferencia, ya que mientras en ausencia de levadura los contenidos de este ácido permanecen prácticamente constantes, en presencia de levadura se observa un aumento lineal ( $R^2=0.9679$ ) de las concentraciones de ferúlico desde 0.283 mg/L (vino inicial) hasta valores finales de 0.953 mg/L a los dieciocho meses de contacto.

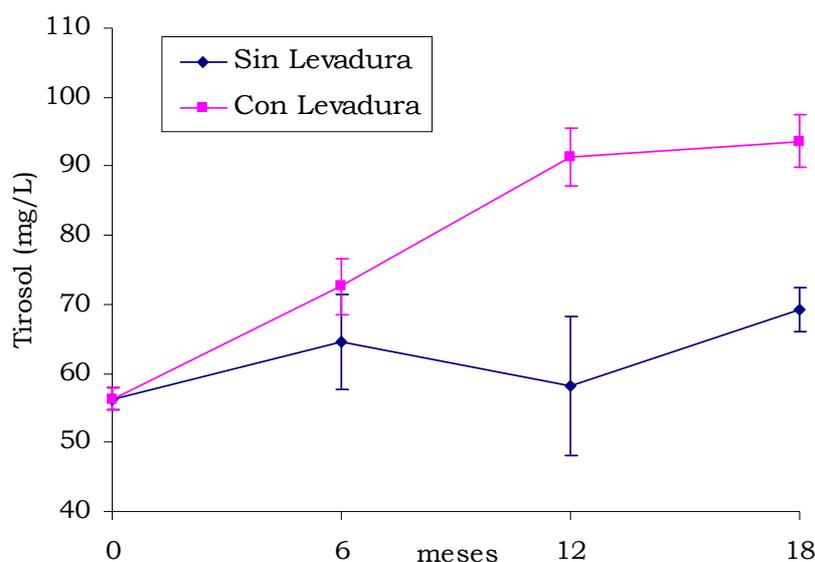


La evolución en el tiempo de los contenidos en ésteres de ácidos hidroxicinámicos, *c*-cutárico y *t*-caftárico, para los vinos estudiados, se muestra en las siguientes Figuras. Los contenidos en ácido *c*-cutárico no presentan una variación importante a lo largo del envejecimiento del vino, encontrándose además que no existen diferencias significativas entre ambos tipos de envejecimiento. Respecto al ácido *t*-caftárico, el vino sin levadura disminuye de forma importante su concentración durante el tiempo de estudio hasta prácticamente la mitad. Sin embargo, en la



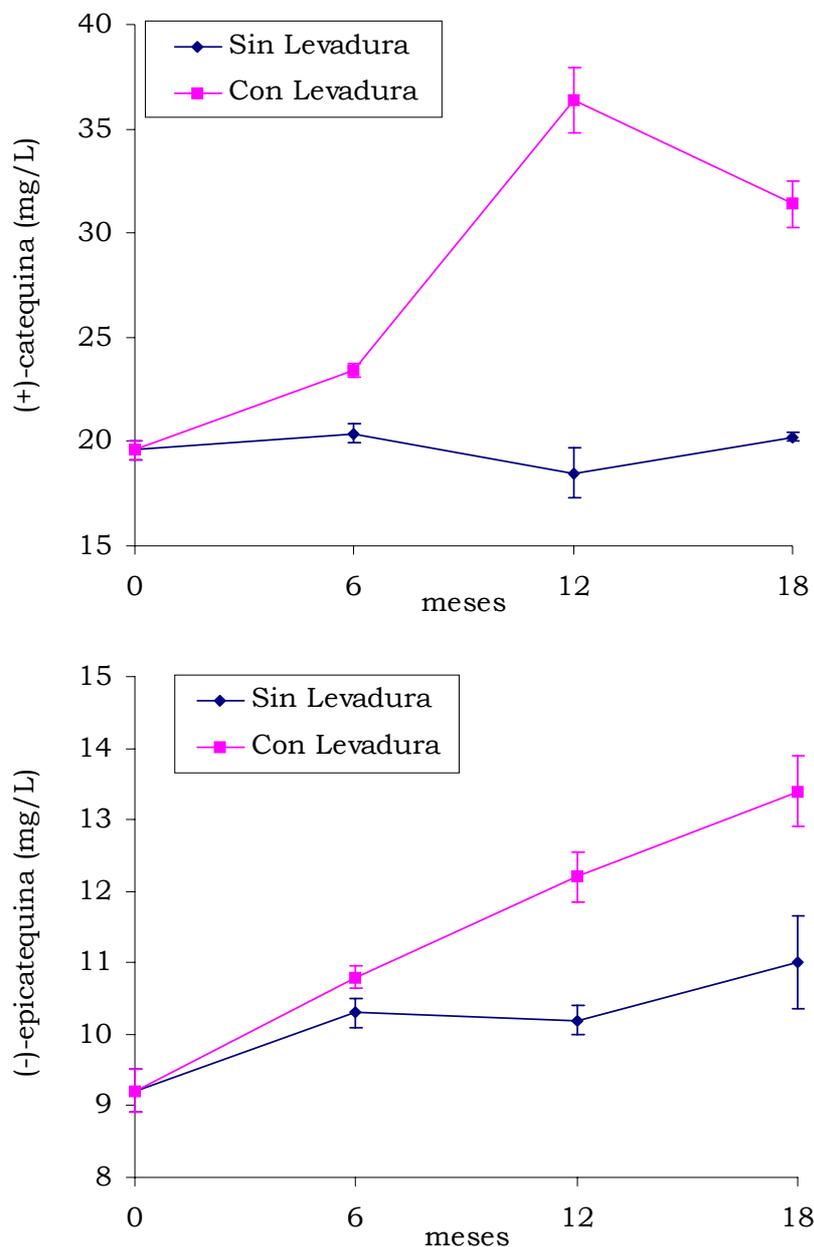
muestra de vino con levadura de velo, si bien al principio, durante los primeros 12 meses se mantiene prácticamente la concentración del éster, al final del tiempo de estudio puede observarse un pequeño aumento en la concentración del mismo durante el tiempo de crianza al que se somete el vino.

La Figura mostrada a continuación representa la diferente evolución de los contenidos en tirosol para los vinos de las dos experiencias durante el período de estudio.



Mientras que la muestra de vino que permanece sin levadura de velo, no varía sus contenidos de forma significativa durante el período de estudio, la muestra desarrollada bajo crianza biológica, sí manifiesta una variación significativa. Así, en los primeros doce meses de desarrollo de la experiencia, se produce un aumento progresivo en la concentración de tirosol, pasando de una concentración de 56.3 mg/L en el vino base, a una concentración de 72.6 mg/L a los seis meses, y de 91.4 mg/L al año del comienzo de la experiencia, manteniéndose prácticamente en este valor hasta el final de la misma.

Las siguientes Figuras muestran la evolución de los contenidos en derivados monómeros de flavan-3-ol, (+)-catequina y (-)-epicatequina, para los vinos durante el periodo de envejecimiento, tanto en presencia como en ausencia de levadura de velo.



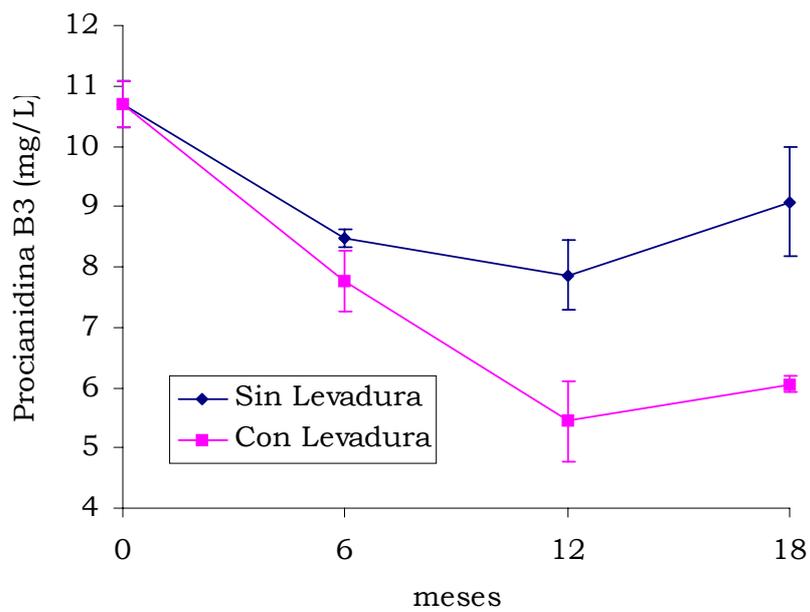
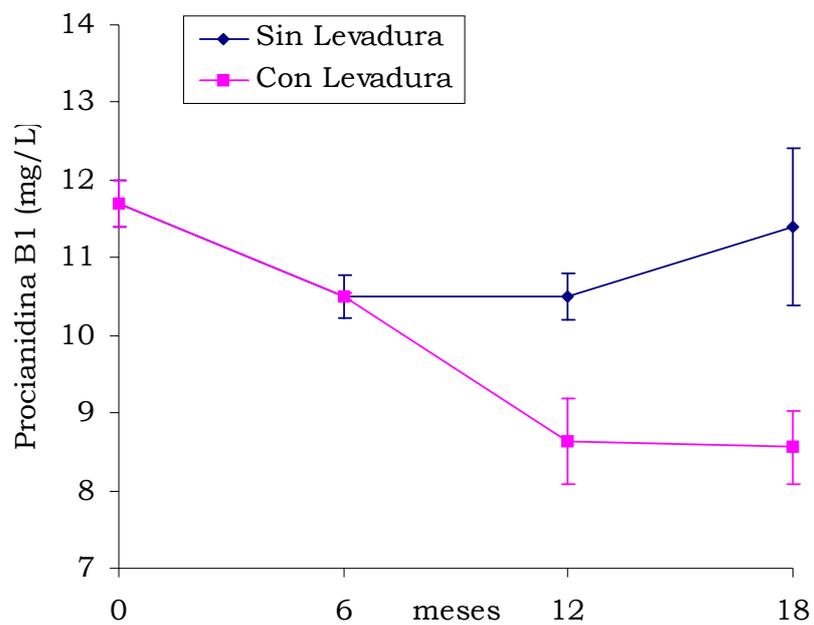
Para la muestra de vino que evoluciona sin levadura de velo, los valores de (+)-catequina se mantienen con pequeñas fluctuaciones a lo largo de la experiencia, comenzando con valores de 19.6 mg/L para terminar en valores de 20.2 mg/L, sin diferencias significativas entre los valores intermedios, por lo que puede decirse que en ausencia de levadura los contenidos de este derivado monómero del flavan-3-ol no varían. Sin embargo, cuando el vino es sometido a envejecimiento biológico, la concentración de (+)-catequina sí varía con el tiempo. En los primeros seis meses hay un pequeño aumento de 19.6 a 23.4 mg/L, siendo dicho aumento, entre los seis y los doce meses, mucho más significativo (55.5%), llegando a valores de 36.4 mg/L. Posteriormente, entre los doce y los dieciocho meses, los contenidos de este flavano disminuyen ligeramente, si bien el contenido final es de 1.6 veces el valor inicial.

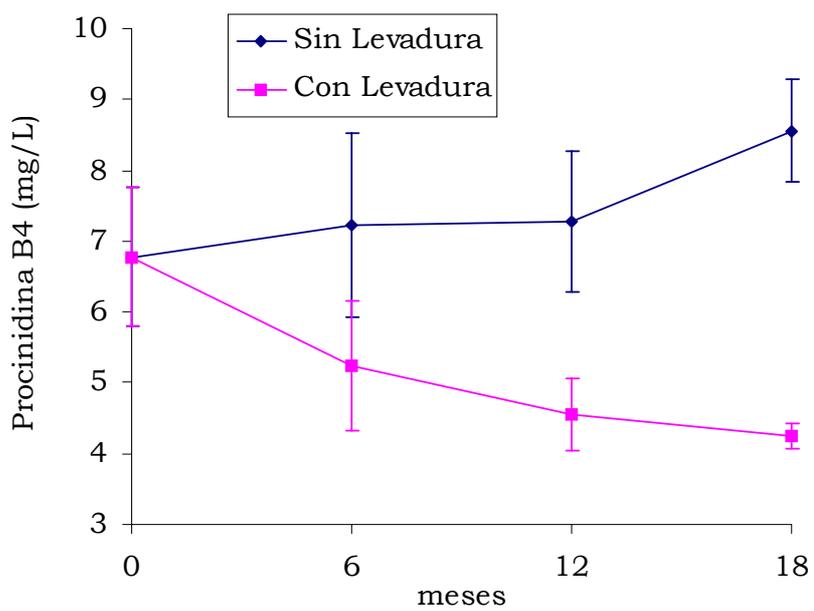
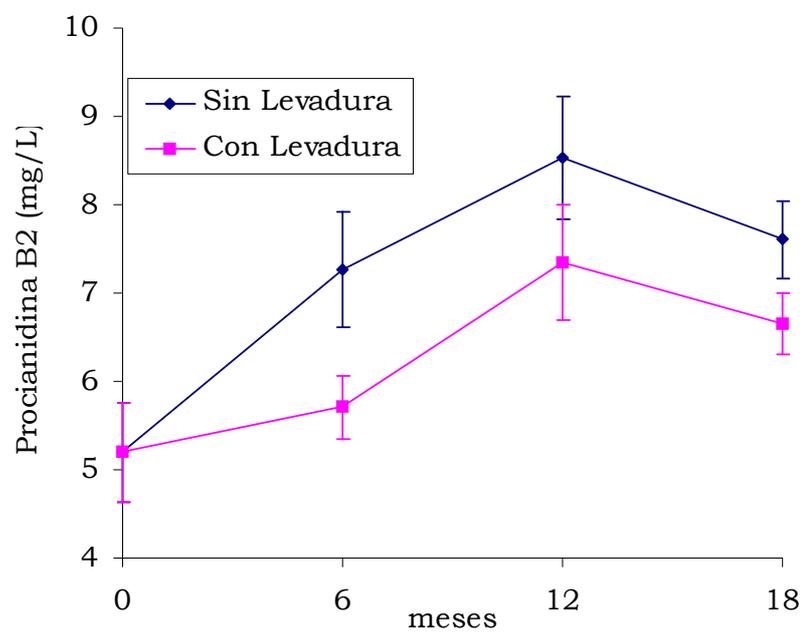
Las concentraciones de (-)-epicatequina se mantienen prácticamente constantes en la muestra de vino que envejece sin levadura de velo, con un ligero aumento hasta el final de la experiencia. Sin embargo, la muestra de vino con envejecimiento biológico presenta un aumento lineal de las concentraciones de este flavano ( $R^2=0.9961$ ) desde el comienzo de la experiencia, con valores de 9.21 mg/L, hasta el final de la misma, llegando a valores de 13.4 mg/L a los 18 meses.

En cuanto a los derivados dímeros del flavan-3-ol, la evolución de los contenidos de las cuatro procianidinas tipo B a lo largo del periodo de estudio, se muestra en las siguientes Figuras. En primer lugar, puede observarse que las procianidinas B1, B3 y B4 tienen un comportamiento muy similar en ambas experiencias. En este sentido, cabe recordar que el parecido estructural de estas tres procianidinas estriba en que todas poseen (+)-catequina como unidad monomérica, siendo la B1 producto de la unión epicatequina-catequina, la B3 de catequina-catequina y la B4 de catequina y epicatequina. La procianidina B2 es el dímero formado por unión de dos unidades de epicatequina.

En ausencia de levadura, se produce un descenso en la concentración de las procianidinas B1 y B3 en los primeros seis meses, siendo éste más acusado en la procianidina B3 (20.2%). Entre los seis y los dieciocho meses, ambos compuestos mantienen prácticamente invariables sus concentraciones en términos estadísticos.

La procianidina B4 también presenta muy pocas variaciones en el envejecimiento ausente de levadura, manteniendo su concentración prácticamente constante durante los primeros doce meses en valores cercanos a 7.20 mg/L, y con un ligero aumento no significativo hasta valores de 8.56 mg/L a los dieciocho meses del inicio de la experiencia.





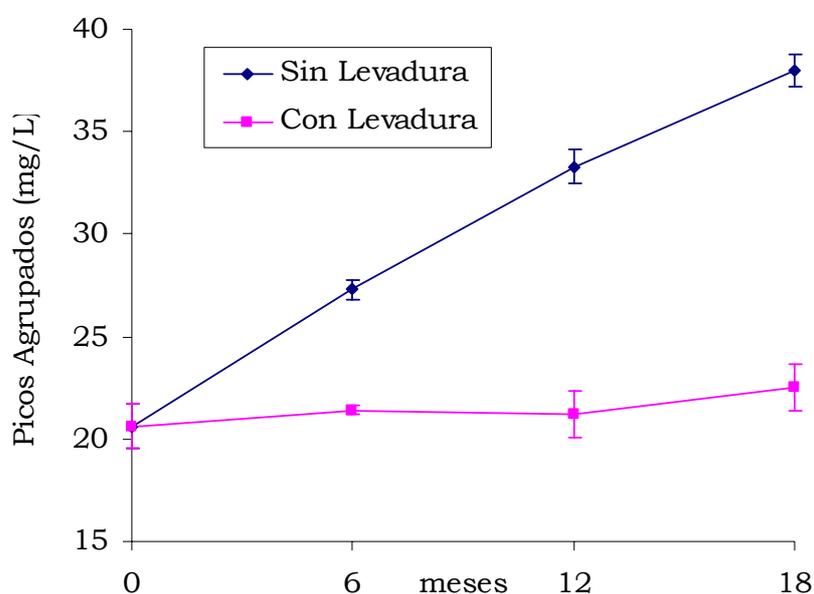
La procianidina B2 presenta en ausencia de envejecimiento biológico un comportamiento diferente, ya que en los primeros doce meses su concentración sufre un aumento de 5.20 mg/L a 8.53 mg/L, para posteriormente bajar dicha concentración a 7.61 mg/L a los dieciocho meses. No obstante, tampoco cabe hablar de diferencias significativas para este compuesto a partir de los seis meses de envejecimiento.

En el caso de la evolución del vino con envejecimiento biológico, en las procianidinas B1, B3 y B4 se produce un descenso en su concentración en los primeros doce meses, más acusado en las dos primeras. Los contenidos en las tres procianidinas se mantienen ya prácticamente constantes hasta el final de la experiencia. Sin embargo, el comportamiento de la procianidina B2 en la muestra de vino con levadura de velo es diferente, en el sentido de que durante el primer año hay un aumento de su concentración, que tiende a disminuir no significativamente a los dieciocho meses, llegando a valores de 6.65 mg/L.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, parece razonable atribuir los descensos en los derivados del flavan-3-ol a procesos oxidativos, ya que es bien conocida la participación de estos compuestos en reacciones de pardeamiento oxidativo en vinos (SIMPSON, 1982; FERNANDEZ-ZURBANO *et al.*, 1995). Sin embargo, también han sido descrita por diversos autores la posibilidad de hidrólisis de flavanos (TIMBERLAKE AND BRIDLE, 1976; HASLAM, 1980; DALLAS *et al.*, 1995) lo que también permitiría explicar la subida en las concentraciones de los monómeros y dímeros durante el desarrollo de la experiencia. No se puede, por tanto, descartar la posibilidad de que ambos procesos tengan lugar en el vino, y que dependiendo de las condiciones del medio se favorezca más un proceso u otro.

La Tabla 5 (Anexo) muestra los valores obtenidos por triplicado, con sus medias y desviaciones estándar, para una serie de compuestos de naturaleza estructural desconocida en todos los vinos estudiados. De todos estos compuestos se le prestará una especial atención a los denominados Picos Agrupados que han sido señalados en trabajos anteriores como compuestos relacionados con el envejecimiento del vino (FABIOS *et al.*, 2000). Estos compuestos, deben de corresponder con productos procedentes de procesos de oxidación, polimerización y/o condensación de los compuestos fenólicos presentes en el vino. Además deben ser los responsables en gran parte del color que el vino toma con el paso del tiempo, ya que estos mismos productos aparecen en los cromatogramas registrados a 420 nm, zona del espectro donde se observa el color del vino blanco.

La siguiente Figura muestra la evolución de estos compuestos a lo largo del periodo de estudio. Puede observarse que en el vino que envejece sin levadura de velo, su concentración aumenta linealmente ( $R^2=0.994$ ) con una pendiente importante, pasando de valores de 20.6 mg/L, al comienzo de la experiencia, a valores de 38.0 mg/L al final de la misma. Sin embargo, en las muestras de vino que evolucionan bajo levadura de flor, puede observarse que la concentración de dichos compuestos apenas si varía de forma significativa durante el tiempo de estudio, con un valor de concentración final de 22.5 mg/L, prácticamente igual a la concentración existente al comienzo de la experiencia. Por ello, se puede afirmar que en presencia de levaduras de velo, la formación de productos de degradación coloreados se encuentra muy inhibida, o bien estos productos se forman pero son retenidos por las propias levaduras como sugiere BARON *et al.* (1997) en trabajos anteriores.



Con todos los datos obtenidos para las determinaciones espectrofotométricas y los contenidos en compuestos fenólicos para los vinos sometidos a los dos tipos de envejecimiento, se han realizado análisis de varianza, utilizando como factor de variación *tipo de envejecimiento*, a fin de comprobar las variables que se comportan significativamente diferentes cuando el vino envejece en presencia y en ausencia de levaduras.

Los resultados de los análisis de varianza se muestran en la siguiente Tabla, en la que se puede comprobar que existen algunas varia-

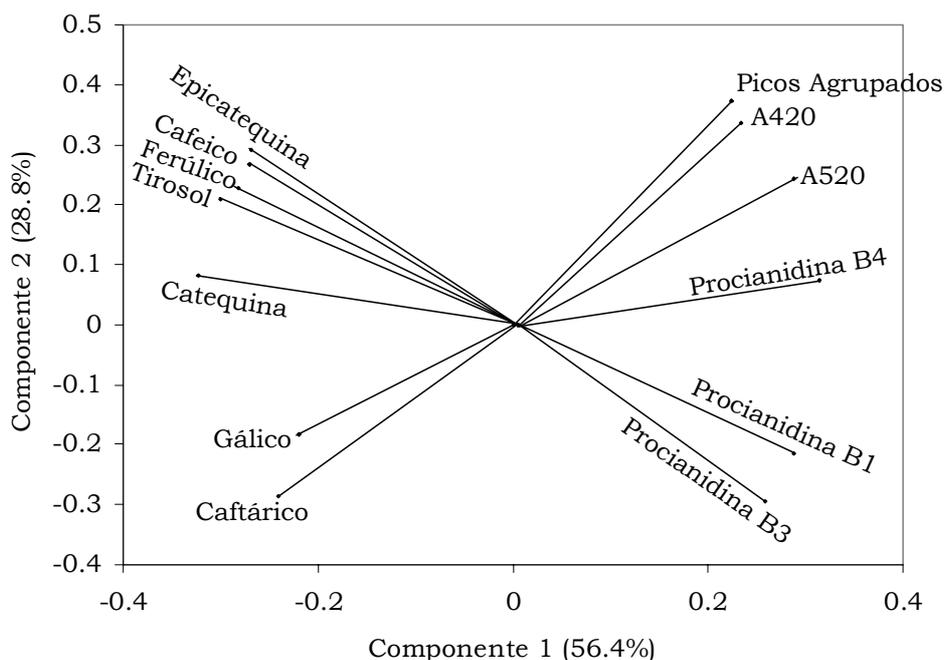
bles que no presentan diferencias significativas entre los dos tipos de envejecimiento (A280, ácidos protocatéquico, siríngico, *p*-cumárico y *c*-cutárico y procianidina B2).

	<b>F</b>	<b>p</b>	<b>Grado de significancia</b>
A420	20.55	0.0002	< 99.9%
A520	31.16	0.0000	< 99.9%
A280	0.03	0.8599	no significativo
ácido gálico	10.89	0.0033	< 99%
ácido protocatéquico	0.07	0.7893	no significativo
ácido siríngico	1.05	0.3162	no significativo
ácido cafeico	4.57	0.0439	< 95%
ácido <i>p</i> -cumárico	1.25	0.2751	no significativo
ácido ferúlico	6.96	0.0150	< 95%
ácido <i>t</i> -caftárico	12.57	0.0020	< 99%
ácido <i>c</i> -cutárico	0.18	0.6758	no significativo
tirosol	10.21	0.0042	< 99%
(+)-catequina	16.48	0.0005	< 99.9%
(-)-epicatequina	5.31	0.0311	< 95%
procianidina B1	5.86	0.0242	< 95%
procianidina B3	4.51	0.0452	< 95%
procianidina B2	3.26	0.0845	no significativo
procianidina B4	22.91	0.0001	< 99.9%
Picos agrupados	17.58	0.0004	< 99.9%

Partiendo de este hecho, con todas las variables que muestran un grado de significancia superior al 95%, y por tanto presentan un comportamiento diferente en los dos tipos de envejecimiento, se ha realizado un análisis multivariante de componentes principales, obteniéndose que las dos primeras explican el 85.2% de la varianza total.

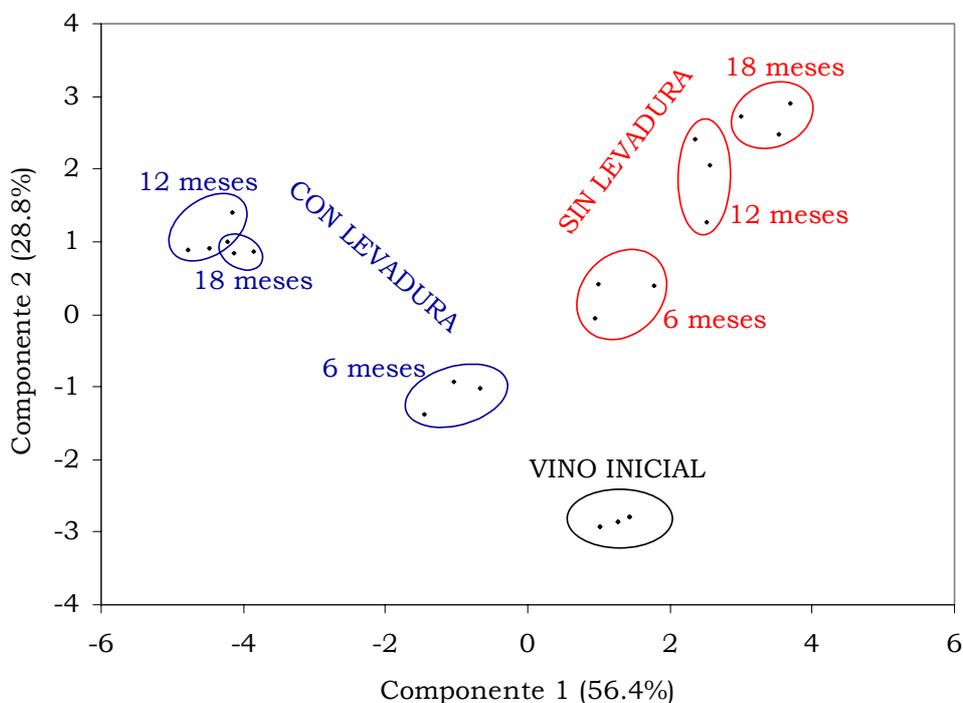
En la siguiente Figura se ha representado el plano formado por estas dos componentes, así como los autovectores correspondientes a cada una de las variables. La componente 1 explica el 56.4% del total de la varianza y sobre ella influyen fundamentalmente (+)-Catequina, Procianidina B4 y Tirosol, si bien tal y como se puede comprobar en la Figura todas las variables elegidas tienen un peso muy similar sobre esta Componente, lo cual parece lógico si se tiene en cuenta que se han elegido aquellas que mostraban más variabilidad en el envejecimiento. Sobre la componente 2, que explica el 28.8% de la varianza, pesan fundamental-

mente Picos Agrupados y A420. La gran cercanía de los vectores correspondientes a Picos Agrupados, y A420, nos indican la alta correlación existente entre estas variables. Asimismo, puede observarse que los vectores correspondientes a los monómeros de los flavanos y los de las procianidinas, sobre todo B1 y B3, forman un aproximado ángulo de 180° entre sí, indicando con ello que su evolución en el proceso de envejecimiento es de signo contrario.



La siguiente Figura muestra la distribución de las muestras en el citado plano formado por las citadas dos primeras componentes, que permite diferenciar claramente al vino inicial y a los vinos sometidos o no a envejecimiento biológico. Como se puede observar, las muestras correspondientes al vino inicial, están en el centro de la componente 1. En la zona correspondiente al signo positivo de este eje, se encuentran localizadas las muestras envejecidas sin levadura de velo, mientras que los vinos con envejecimiento biológico se encuentran situados en la zona correspondiente al signo negativo de la componente 1, poniendo de manifiesto que respecto a las variables elegidas se pueden distinguir claramente los dos tipos de envejecimiento. En ausencia de levadura, aumentan durante el almacenamiento las absorbancias a 420 y 520 nm, así como los contenidos en Picos Agrupados, manteniéndose prácticamente constantes, aunque con tendencia a aumentar las procianidinas, mien-

tras que en presencia de levadura dichos contenidos no muestran variaciones. Por el contrario, las concentraciones de los ácidos gálico, cafeico, ferúlico y *t*-caftárico, tirosol, (+)-catequina y (-)-epicatequina, tienden a aumentar en presencia de levadura y a mantenerse en ausencia de ella.



También es de destacar que la distribución de las muestras respecto de la componente 2 hace referencia al tiempo de envejecimiento, diferenciándose claramente el vino inicial, del envejecido durante 6 meses, 12 meses y 18 meses, independientemente del tipo de envejecimiento.

## **CONCLUSIONES**

Con los resultados obtenidos del estudio del envejecimiento biológico de vinos blancos bajo condiciones controladas de laboratorio, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. En ausencia de levadura de velo, se observa a lo largo del período de estudio un acusado aumento de las absorbancias a 420 y 520 nm, como resultado del progresivo pardeamiento que el vino va alcanzando. Sin embargo, en presencia de levadura de velo, dichas absorbancias prácticamente no sufrieron variación durante los 18 meses del estudio, poniendo de manifiesto la protección que ejercen sobre el vino.
2. Los ácidos gálico, cafeico, ferúlico, *t*-caftárico y el tirosol aumentaron sus contenidos durante el envejecimiento biológico, manteniéndose prácticamente constantes en ausencia de levadura. El resto de ácidos fenólicos estudiados y ésteres de ácidos hidroxici-námicos no variaron significativamente en ninguno de los dos tipos de experiencias, con y sin levaduras.
3. Los contenidos en los monómeros derivados del flavan-3-ol, (+)-catequina y (-)-epicatequina aumentaron en mayor medida durante el envejecimiento biológico que en ausencia de levadura, mientras que, por el contrario, las procianidinas mantienen contenidos siempre inferiores en los vinos con levadura de flor.
4. En relación a los Picos Agrupados, sus concentraciones aumentan considerablemente en los vinos almacenados sin levadura, de forma muy similar a como lo hace la absorbancia a 420 nm. Sin embargo, en presencia de levadura de velo, la formación de estos productos de degradación coloreados se encuentra muy inhibida, o bien, una vez formados son retenidos por las propias levaduras de flor que crecen sobre la superficie del vino.



**ESTUDIO DEL PARDEAMIENTO ACELERADO  
DE VINOS BLANCOS  
EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LEVADURAS**

## INTRODUCCIÓN

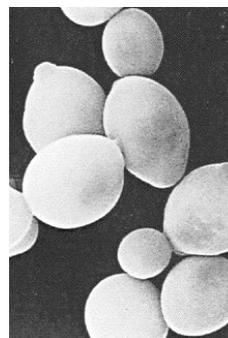
Como se ha comentado ya en el capítulo anterior, es un hecho bien conocido el escaso pardeamiento que sufren los vinos finos durante el envejecimiento biológico, bien por el efecto de protección que frente al oxígeno atmosférico ejercen las levaduras de velo, bien por la capacidad que presentan de retener compuestos pardos. Esta capacidad de las levaduras de velo de retrasar la aparición de este tipo de compuestos coloreados ha sido puesta de manifiesto por BARON *et al.* (1997) realizando un seguimiento de la crianza biológica a nivel de bodega, y en el capítulo anterior de esta memoria, bajo condiciones controladas de laboratorio.

Desde hace varios años es conocido que las levaduras y sus paredes celulares muestran una capacidad de retención frente a algunos compuestos presentes en el vino que ha sido señalada por algunos autores (RIBEREAU-GAYON, 1985). Particularmente, en relación con compuestos fenólicos, se ha mostrado en vinos tintos que las levaduras de vinificación retienen en grado variable antocianos y compuestos poliméricos (BOURZEIX AND HEREDIA, 1986; AUGUSTIN, 1986; CUINIER, 1988; VASSEROT *et al.*, 1997). Asimismo, se ha descrito la adsorción de los precursores de la alteración del color de algunos vinos blancos hacia tonos rosados (rosissement o pinking oxidativo), por levaduras en el estado de lías (DUBOURDIEU, 1995). Deben también destacarse los trabajos de SALMON *et al.* (2002) que muestran en soluciones modelo una fuerte interacción de polifenoles libres con lías de levaduras. Estas observaciones, junto a otras relacionadas con la mejora de algunos caracteres organolépticos, pueden justificar la práctica enológica tradicional en algunas regiones vitivinícolas de envejecimiento sobre las lías de levaduras fermentativas (BOULTON *et al.*, 1996; FORNAIRON-BONNEFOND *et al.*, 2001). Basándose en estos precedentes, recientemente BONILLA *et al.* (2001) han mostrado la posibilidad de usar células de levadura como agente de acabado para la corrección del color, poniendo de manifiesto la capacidad específica de retención de las levaduras hacia productos del pardeamiento de vinos blancos.

Por todo ello, cabe plantearse la posibilidad de utilizar levaduras como agentes preventivos del pardeamiento de dichos vinos, a fin de disminuir la velocidad de este proceso y, como consecuencia, alargar su período de consumo. Desde luego, el primer problema que se plantea en un estudio de este tipo es su larga duración. En efecto, en condiciones normales de almacenamiento es necesario al menos un año para que los estudios relativos al pardeamiento sean representativos, lo que se revela como un plazo excesivo a poco que se quieran estudiar varias dosis o formas de aplicación de las levaduras. De aquí que se haya optado por el estudio de pardeamiento en condiciones aceleradas por la temperatura,

que permite extraer conclusiones en un tiempo más razonable, pudiendo extrapolar posteriormente para acercarse al mundo real.

En el capítulo presente ha sido utilizada levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) por su fácil disponibilidad en el mercado y de la cual se tiene un gran conocimiento, científicamente hablando. Constituye uno de los productos de fermentación industrial más antiguos y hoy día, es uno de los productos biotecnológicos más importantes. Comercialmente, la levadura se presenta como levadura comprimida (o levadura fresca) y levadura desecada.



La levadura comprimida se vende en bloques envueltos en papel acerado y/o celofán, o en forma de gránulos de forma más o menos irregular. Está preparada para su uso inmediato, pero es un producto perecedero, el cual debe almacenarse a bajas temperaturas (0-4°C). A mayores temperaturas el tiempo de vida es menor de tres semanas.

La levadura desecada está disponible en dos formas: desecada activa y desecada instantánea.

- La levadura desecada activa se presenta en paquetes herméticos, sellados al vacío o completados con un gas inerte, como el nitrógeno. La vida media de este producto es de unos 7 años. Para mejorar los resultados es necesario rehidratarla previamente.
- La levadura desecada instantánea proviene de someter a la levadura comprimida a un rápido proceso de desecado. Se presenta normalmente en forma de pequeñas varillas de elevada porosidad y fácil rehidratación.

Por razones de disponibilidad y facilidad de uso, fueron las levaduras de panificación desecadas instantáneas las empleadas como agentes de prevención del pardeamiento en vinos blancos. De esta forma se mejora la reproducibilidad de los resultados y extensión de los mismos a otras experiencias posteriores.

## MATERIAL EXPERIMENTAL

Esta experiencia ha sido realizada con vino comercial tipo fino perteneciente a la D.O. Montilla-Moriles. A fin de evitar las posibles pequeñas diferencias existentes entre botellas, y previamente al inicio de la experiencia, se realizó una homogeneización del vino, para lo cual las botellas se abrieron y se vertió mezclando su contenido en un depósito. A continuación, las mismas botellas de 70 cL fueron rellenas hasta la mitad de su capacidad, a fin de que se mantuviera una cámara de aire en contacto con el vino que facilitara su pardeamiento. La siguiente Tabla muestra los parámetros generales de este vino, suministrados por la bodega, expresados como el intervalo aceptado para su comercialización.

Etanol (% v/v)	14.85-14.90
Acidez Volátil (meq/L)	4.83-7.00
Acidez Titulable (meq/L)	61.4-63.9
pH	3.20-3.35
Azúcares Reductores (g/L)	≈1
SO <sub>2</sub> libre (mg/L)	3.20-3.84
SO <sub>2</sub> total (mg/L)	102-131

A las diferentes botellas que contenían el vino Inicial homogeneizado se les adicionó levadura de panificación liofilizada (Mauripan Fleischmann's Foods, Canadá), sin hidratar previamente, en concentraciones de 0 (Sin Levadura), 1.0, 1.5 y 2.0 g/L. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Previamente a la adición de las células se procedió a su inactivación, con objeto de evitar que se produzca la autólisis de las levaduras por desnaturalización de las enzimas responsables de ello. La inactivación se realizó con una disolución hidroalcohólica al 50% (v/v), calentando la mezcla hasta evaporación del líquido.

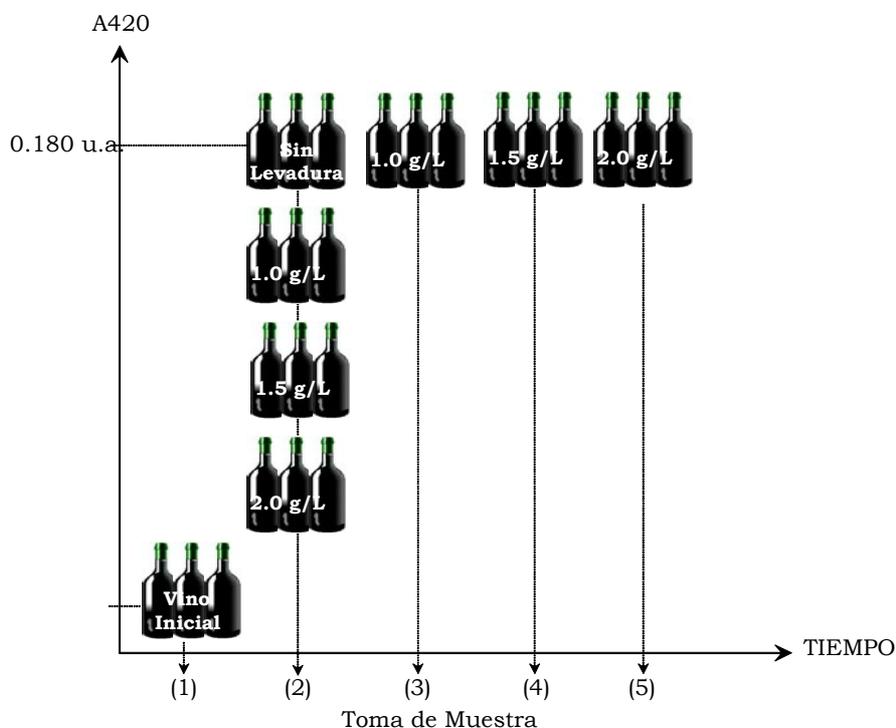
Como se ha comentado, a fin de acelerar el proceso de pardeamiento del vino, las diferentes botellas se introdujeron en una estufa con temperatura controlada a 35 °C, permaneciendo cerradas en todo momento con su tapón comercial, excepto en los instantes que duraron las diferentes tomas de muestra.

La toma de muestras para el seguimiento de las medidas espectrofotométricas se realizó al inicio de la experiencia y en todas las muestras de vino cada tres días. Dado que la absorbancia a 420 nm está amplia-

mente descrita en la bibliografía como una medida del pardeamiento del vino, este parámetro se utilizó para dar por finalizada la experiencia en cada una de las muestras, concretamente cuando alcanzaron un valor de 0.180 u.a., establecido como límite comercial para la retirada del mercado de este tipo de vinos finos.

Sin embargo, la toma de muestras para la determinación del contenido en polifenoles por HPLC se realizó de forma diferente (Figura), ya que se eligieron los siguientes puntos del periodo de estudio:

- En el vino Inicial antes de comenzar el pardeamiento (1).
- Cuando el vino Sin Levadura alcanzó un valor de A420 de 0.180 u.a. (2)
- Cuando todas las muestras de vino con adición de levadura alcanzaron el valor establecido de 0.180 u.a. (3), (4) y (5)

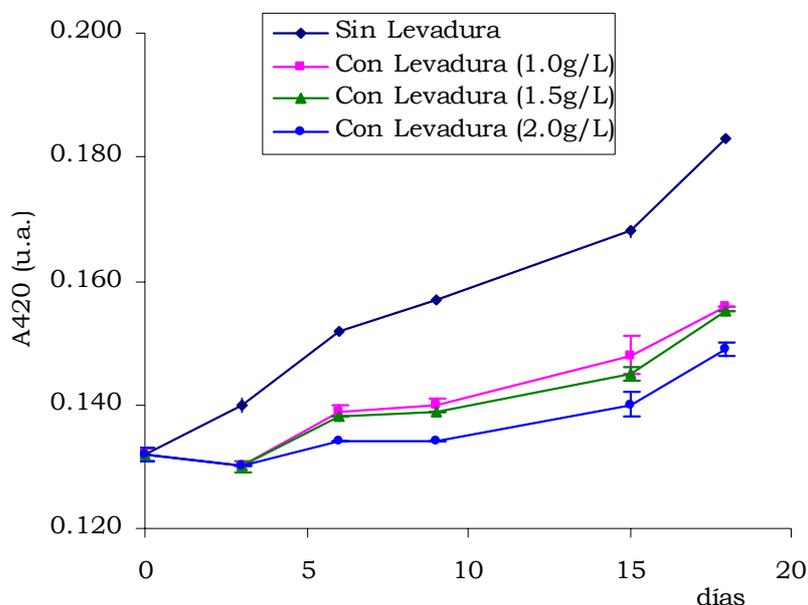


Como se puede observar, en el punto (2) de toma de muestra se recogieron todos los vinos estudiados, donde solo el vino Sin Levadura alcanzó el valor límite de A420, con lo que todos tenían el mismo tiempo de almacenamiento. En los puntos (3), (4) y (5) todos los vinos tratados presentaban el valor límite de A420 aunque lo consiguieron a diferente tiempo de almacenamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Tablas 6, 7, 8, 9, 10 y 11 (Anexo) muestran los valores por triplicado, medias y desviaciones estándar de las absorbancias medidas a 280, 420 y 520 nm de los vinos sometidos a pardeamiento acelerado, tanto en ausencia como en presencia de levaduras.

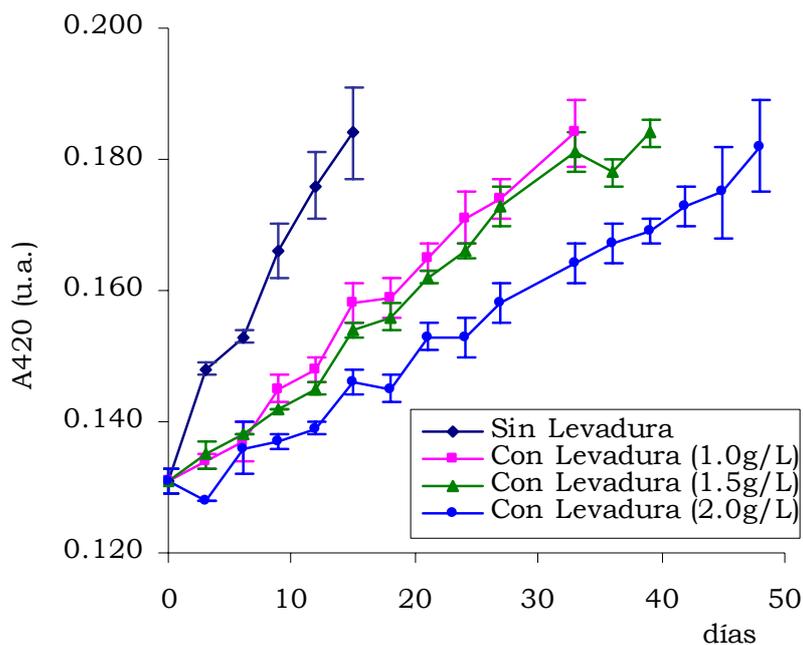
La evolución de la absorbancia a 420 nm durante la primera fase de estudio se muestra en la siguiente Figura, es decir, cuando el vino sin levadura añadida alcanzó un valor de 0.180 u.a. En primer lugar, puede observarse que la evolución seguida por el vino que no contenía levadura es muy diferente a la de los vinos que evolucionaron en presencia de levadura, en el sentido de que el color aumentó a mucha mayor velocidad, necesitando tan sólo 18 días para incrementar su absorbancia desde 0.132 hasta el límite establecido de 0.180 u.a.



Sin embargo, las muestras de vino que contenían levadura en diferentes concentraciones, experimentaron en los primeros tres días un ligero descenso en el valor de absorbancia, posiblemente como consecuencia de la adsorción de compuestos responsables del color por parte de las levaduras, como ha sido señalado por BONILLA *et al.* (2001) en vinos tipo Sherry y por SALMON *et al.* (2002) en soluciones modelo. Posteriormente, se produce un aumento del valor de absorbancia, aunque no tan pronunciado como en el caso del vino Sin Levadura. De esta forma, a los 18 días, cuando el testigo sin Levadura tenía 0.180 u.a., las diferentes muestras de vino con levadura mostraron valores bastante inferiores,

cercanos a 0.155 u.a. para los vinos con dosis de 1.0 y 1.5 g/L y de 0.149 u.a. para el tratado con 2.0 g/L de levadura. El análisis de varianza realizado con estos resultados, pone de manifiesto que a los 18 días no existen diferencias significativas entre el color de los vinos tratados con las dos dosis más pequeñas y sí se muestra significativamente diferente el vino tratado con una concentración de levadura de 2 g/L.

La siguiente Figura muestra la evolución de las medidas de absorbancia a 420 nm a lo largo de todo el estudio, es decir cuando todos los vinos estudiados alcanzaron el valor límite establecido. El vino que contenía 1.0 g/L de levadura alcanzó el valor establecido como límite en 33 días, prácticamente 15 días más que el vino sin levadura añadida, encontrándose además que esta muestra no presenta diferencias significativas con la de 1.5 g/L a lo largo de la experiencia, si bien ésta última necesitó 6 días más para llegar al mismo valor de A420. La dosis de 2 g/L de levadura es la que se reveló como más eficaz para aumentar el periodo de almacenamiento del vino, pues tarda 30 días más en alcanzar el mismo valor de absorbancia que el vino comercial que evolucionó en ausencia de levadura.



En la fotografía se puede ver la diferencia de color existente entre el vino Inicial de partida, y el vino Sin Levadura al final de la experiencia, cuando ya había alcanzado el valor de absorbancia final.



A fin de estudiar a qué modelo matemático de regresión simple se ajusta mejor la evolución de las absorbancias a 420 nm obtenidas para cada una de las muestras de vino, se ha realizado el estudio correspondiente, mostrándose los resultados en la siguiente Tabla.

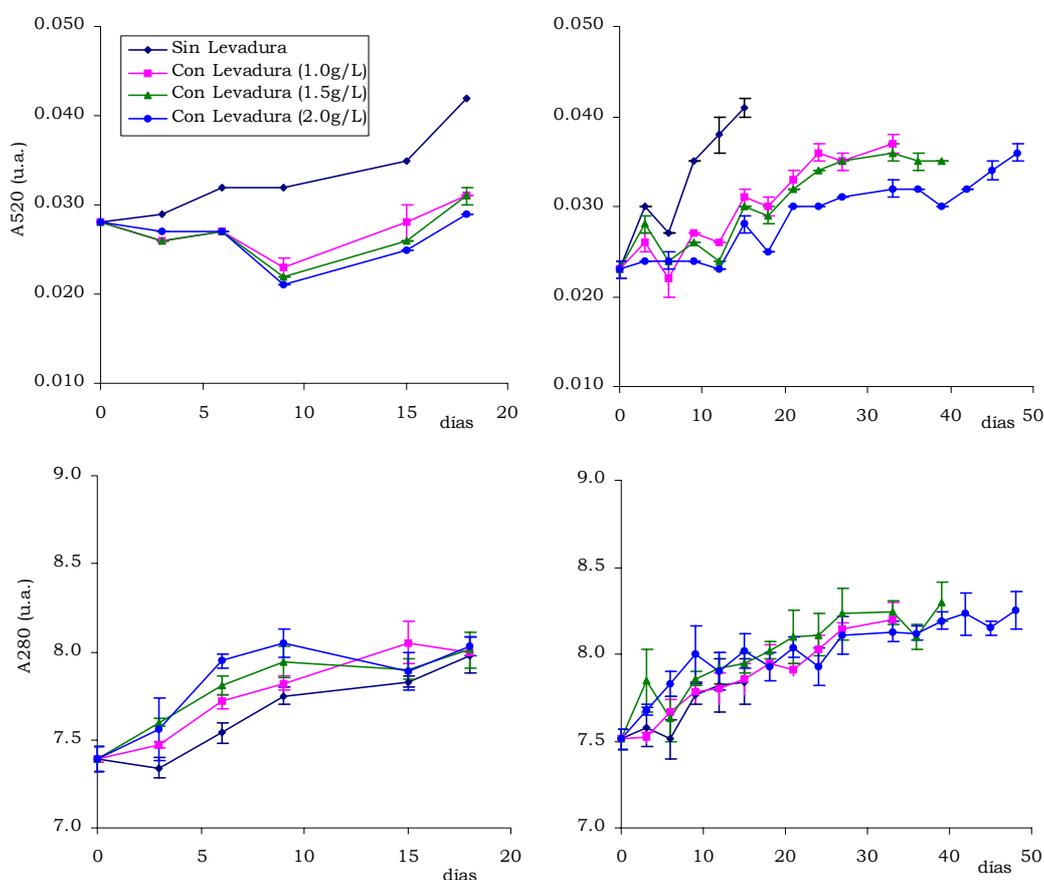
	Modelo matemático	R <sup>2</sup>	Ecuación
Sin Levadura	Lineal	94.90	$A_{420}=0.0134+3.4 \times 10^{-3}T$
Con Levadura (1.0 g/L)	Exponencial	92.55	$A_{420}=\exp(-2.02+9.8 \times 10^{-3}T)$
Con Levadura (1.5 g/L)	Exponencial	95.33	$A_{420}=\exp(-2.02+8.7 \times 10^{-3}T)$
Con Levadura (2.0 g/L)	Exponencial	94.05	$A_{420}=\exp(-2.02+9.8 \times 10^{-3}T)$

Como se puede observar, la muestra de vino Sin Levadura muestra una tendencia lineal, lo que permite deducir que el pardeamiento del vino se ha producido por un aumento progresivo del color a velocidad constante. Sin embargo, todas las muestras de vino con levadura añadida exhibieron una tendencia exponencial, indicando que la velocidad de pardeamiento en los estadios iniciales es menor, manteniendo al vino en unos valores bajos los primeros 9 días aproximadamente, tiempo a partir del cual el color aumentó a una mayor velocidad. Estos datos muestran, por tanto, que la eficacia de las levaduras no es constante a lo largo del tiempo, sugiriendo que a medida que aumenta el pardeamiento su control sobre el mismo es menor.

En conjunto, la presencia de levadura en el vino retarda el aumento progresivo del color que se aprecia en el vino Sin Levadura. De las dosis de levadura utilizadas para la experiencia, la de 2.0 g/L es la que permitió mantener más tiempo (48 días) el vino en la estufa para alcanzar el mismo valor de absorbancia de 0.180 u.a. que el vino Sin Levadura. Entre las dosis de 1.0 y 1.5 g/L no se encuentran diferencias significativas, siendo necesario esperar sólo 27-33 días para alcanzar el valor de A<sub>420</sub> establecido como límite. Por ello, debe admitirse una menor eficiencia proporcional conforme se incrementa la dosis añadida, ya que

una adición de 50% y 100% sobre la de 1.0 g/L no conduce a 1.5 y 2 veces el tiempo necesario para alcanzar el límite de 0.180 u.a.

Respecto al mecanismo mediante el cual la levadura retrasa el aumento del color en los vinos blancos utilizados, puede pensarse en un consumo de oxígeno competitivo, preferencialmente por los lípidos de las membranas celulares (SALMON *et al.*, 2000), impidiendo así que, en un primer momento los compuestos fenólicos del vino se oxiden formándose productos que incrementan su color. Otra hipótesis, que no debe descartarse, es la capacidad de las levaduras para adsorber compuestos fenólicos coloreados, como afirma BONILLA *et al.* (2001) al utilizar la levadura como producto de clarificación.



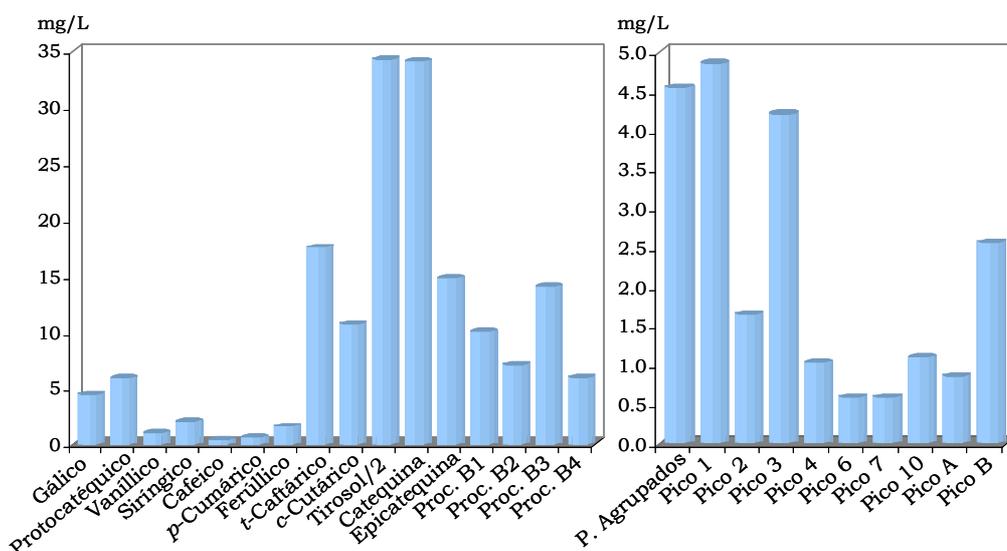
Las Figuras anteriores muestran la evolución de los valores de absorbancia a 520 nm y 280 nm desde el inicio hasta los 18 días (figuras de la izquierda) y desde el inicio hasta el final de la experiencia (figuras de la derecha). La evolución de la absorbancia 520 nm es prácticamente la

misma que la ya comentada para la absorbancia 420 nm, aunque se ha de considerar que los valores obtenidos son suficientemente bajos como para no utilizarlos para extraer conclusiones. En este sentido, es necesario considerar que ni siquiera al final del estudio, los vinos están suficientemente pardeados como para que se formen apreciablemente compuestos coloreados con tonalidades rojas.

En cuanto a los valores de absorbancia a 280 nm, se observa una tendencia a aumentar a lo largo del almacenamiento del vino, sin encontrar diferencias significativas entre las muestras que evolucionan con levadura frente a las que lo hacen sin ella. Este parámetro está ampliamente reconocido como una medida de los polifenoles totales del vino, por lo que podría deducirse que durante su periodo de almacenamiento, tanto en ausencia como en presencia de levadura los compuestos que se van formando absorben más a esta longitud de onda.

Las Tablas 12-19 (anexo) muestran los valores del triplicado, medias y desviaciones estándar de los contenidos de los distintos compuestos fenólicos englobados en las familias de Ácidos Fenólicos, Ésteres de Ácidos Hidroxicinámicos, Flavanos y Picos Desconocidos (mg/L) en el vino Inicial y en todos los vinos estudiados, tanto a los 18 días (cuando el vino Sin Levadura llega a un valor de A420 de 0.180 u.a.), como al final de la experiencia (cuando los vinos con levadura alcanzan dicho valor de absorbancia).

El vino Inicial presenta unos contenidos medios en compuestos fenólicos que están en concordancia con los encontrados por otros autores para este tipo de vinos comerciales (BARON *et al.*, 1997; FABIOS *et al.*, 2000). Como se puede comprobar en la siguiente Figura, tirosol y (+)-catequina son los compuestos mayoritarios (68.6 y 34.1 mg/L respectivamente), seguidos por el resto de derivados del flavan-3-ol, fundamentalmente (-)-epicatequina y procianidina B3 y ácido *t*-caftárico. Los ácidos fenólicos se encuentran en concentraciones bajas, en la mayoría de los casos no superan los 2 mg/L, a excepción de los ácidos gálico y protocatequico que se encuentran en mayor proporción (4.43 y 5.85 mg/L respectivamente). Además de todos estos compuestos, se han cuantificado una serie de desconocidos que, aunque se encuentran en baja concentración, adquieren especial importancia por ser compuestos coloreados (Picos Agrupados).



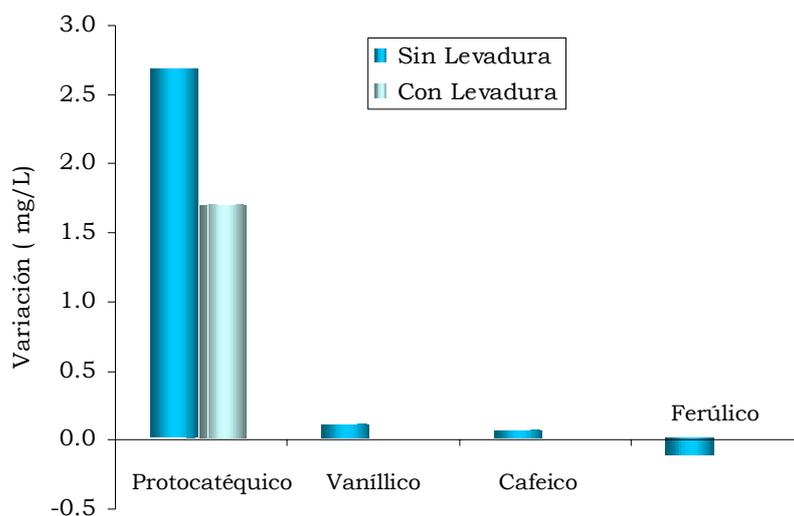
Para estudiar los cambios de las concentraciones en los diferentes compuestos fenólicos durante el almacenamiento del vino, tanto en ausencia como en presencia de levadura, se han calculado los incrementos-decrementos de dichos contenidos fenólicos entre el vino Inicial y cada uno de los tratados con levaduras, a los 18 días (cuando el vino Sin Levadura alcanzó 0.180 u.a.) y al final del periodo de tiempo necesario para alcanzar esta absorbancia cada uno de ellos. Al objeto de simplificar la exposición de todos los resultados obtenidos, se ha realizado un análisis de varianza con los datos correspondientes, que permitirá solo comentar aquellos resultados que se muestren significativamente diferentes al vino Inicial.

Respecto a los ácidos fenólicos, la siguiente tabla muestra los resultados del análisis de varianza realizado para comparar el vino Inicial con los que se han almacenado durante 18 días, tanto en ausencia de levadura como en presencia de la mayor dosis utilizada (2 g/L).

	Sin Levadura		Con Levadura (2.0 g/L)	
	F	P	F	p
Ácido Cafeico	21.9	**	1.92	n.s.
Ácido p-Cumárico	0.18	n.s.	0.03	n.s.
Ácido Ferúlico	16.1	*	0.71	n.s.
Ácido Gálico	0.02	n.s.	5.41	n.s.
Ácido Protocatequico	237	***	29.5	**
Ácido Siríngico	1.35	n.s.	0.03	n.s.
Ácido Vanílico	7.98	*	2.29	n.s.

\*\*\* p<0.001    \*\* p<0.01    \* p<0.05    n.s.: no significativo

Como puede apreciarse, los ácidos protocatéquico, vanílico, cafeico y ferúlico tienen diferencias significativas con respecto al vino Inicial en ausencia de levadura, mientras que con levadura solo varía significativamente el ácido protocatéquico. En la siguiente Figura se ha representado sólo las variaciones significativas de estos ácidos fenólicos.



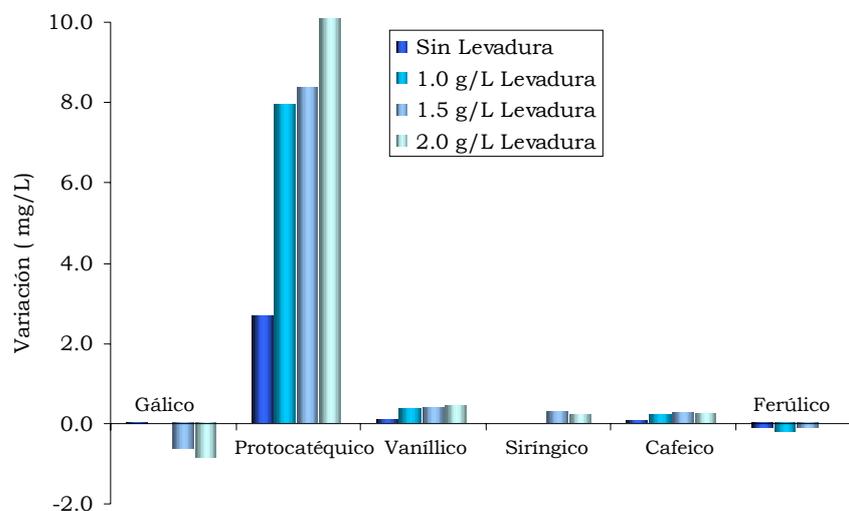
Como se ha señalado, el ácido protocatéquico es el que experimenta en ambos vinos una variación mayor en su concentración, siendo 1.58 veces superior el aumento en el vino en ausencia de levadura. Los ácidos cafeico y vanílico incrementan ligeramente sus contenidos en estos 18 días de pardeamiento acelerado en ausencia de levadura (0.12 y 0.10 mg/L respectivamente), mientras que el ácido ferúlico disminuye ligeramente (0.12 mg/L). Sin embargo, todas estas variaciones son tan pequeñas que es difícil poder extraer conclusiones fiables del comportamiento de estos ácidos durante el almacenamiento del vino.

Con los datos correspondientes a los contenidos en ácidos fenólicos de todos los vinos al final de la experiencia (A420 de 0.180 u.a), y al objeto de compararlos con el vino Inicial, se ha realizado otro análisis de varianza cuyos resultados se muestran en la siguiente Tabla:

	Sin Levadura		Con Levadura					
			1.0 g/L		1.5 g/L		2.0 g/L	
	F	p	F	p	F	p	F	p
Cafeico	21.9	**	26.0	**	68.8	**	80.3	***
<i>p</i> -Cumárico	0.18	n.s.	0.00	n.s.	1.73	n.s.	1.98	n.s.
Ferúlico	16.1	*	13.5	*	15.1	*	1.69	n.s.
Gálico	0.02	n.s.	4.50	n.s.	13.8	*	22.1	**
Protocatéq.	237	***	379	***	1858	***	4100	***
Siringico	1.35	n.s.	2.17	n.s.	21.7	**	10.4	*
Vanílico	7.98	*	61.6	**	28.5	**	112	***

\*\*\* p<0.001    \*\* p<0.01    \* p<0.05    n.s.: no significativo

La siguiente Figura muestra las variaciones significativas producidas en los contenidos de ácidos fenólicos entre el vino Inicial y todos los vinos al final de la experiencia (A420 de 0.180 u.a.). Como se puede advertir, en este punto de la experiencia existe ya un mayor número de ácidos que tienen diferencias significativas con respecto al vino Inicial. Nuevamente es el ácido protocatéquico el que en todos los vinos estudiados experimenta una mayor variación en su concentración, siendo las muestras con levadura añadida las que aumentan en mayor proporción.

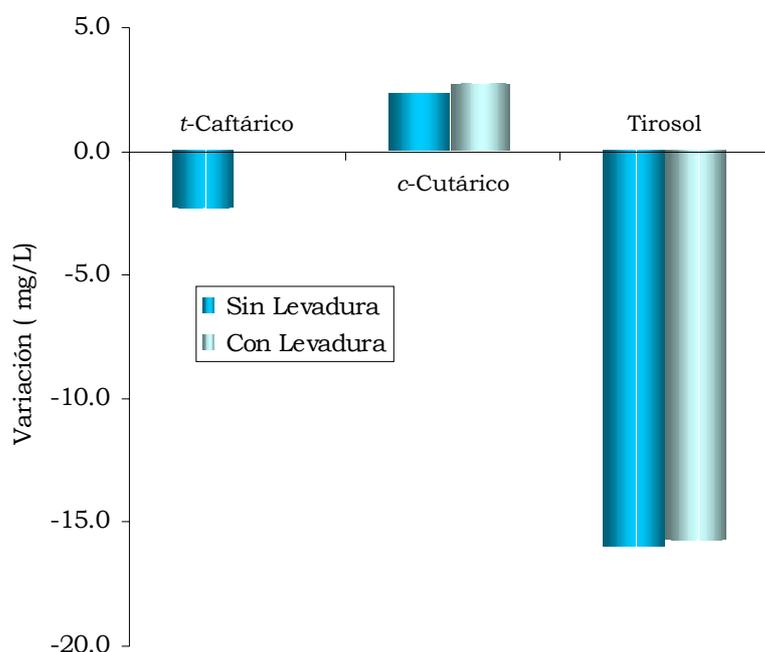


En cuanto a los ésteres de ácidos hidroxicinámicos y tirosol, la siguiente Tabla muestra el análisis de varianza realizado para comparar los vinos almacenados durante 18 días, con y sin levadura, con el vino Inicial. Con los datos que mostraron una significancia superior al 95% se

calculó la variación que experimentan los correspondientes contenidos durante al almacenamiento (Figura)

	Sin Levadura		Con Levadura (2.0 g/L)	
	F	p	F	p
Ácido <i>t</i> -Caftárico	61.5	**	1.66	n.s.
Ácido <i>c</i> -Cutárico	46.7	**	24.8	**
Tirosol	4347	***	2808	***

\*\*\* p<0.001    \*\* p<0.01    \* p<0.05    n.s.: no significativo



Se puede comprobar un comportamiento diferente para el *t*-caftárico y el *c*-cutárico, ya que el primero, con una concentración inicial de 17.5 mg/L, disminuye hasta 15.1 mg/L en el vino Sin Levadura y no manifiesta un cambio significativo en el vino con levadura añadida. Sin embargo, el ácido *c*-cutárico experimenta en estos 18 días un aumento de su concentración en ambas muestras de vino con respecto al vino Inicial, de 2.3 mg/L en el vino Sin Levadura y de 2.7 mg/L en el vino Con Levadura.

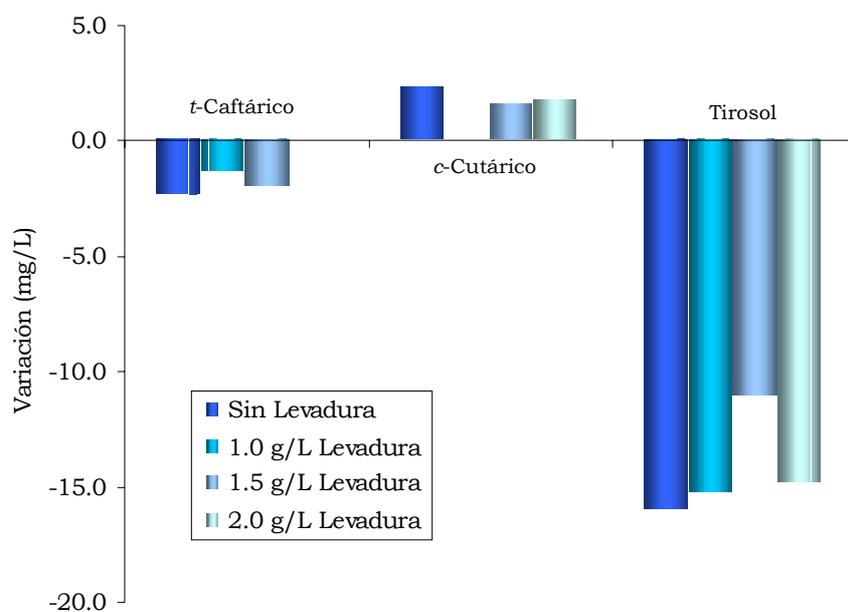
Por otra parte, los contenidos en tirosol descienden considerablemente en ambas muestras de vino, pasando de 68.6 mg/L que tenía el

vino al inicio, a 52.6 y 52.8 mg/L respectivamente para el vino Sin Levadura y Con Levadura.

Al final de la experiencia, cuando todos los vinos alcanzaron el valor límite de absorbancia, y basándose en el correspondiente análisis de varianza (Tabla), la Figura siguiente muestra las variaciones significativas para los contenidos en estos tres compuestos fenólicos.

	Sin Levadura		Con Levadura					
	F	p	1.0 g/L		1.5 g/L		2.0 g/L	
	F	p	F	p	F	p	F	p
<i>t</i> -Caftárico	61.5	**	11.8	*	21.4	**	5.07	n.s.
<i>c</i> -Cutárico	46.7	**	3.73	n.s.	14.6	*	25.5	**
Tirosol	4347	***	904	***	616	***	1391	***

\*\*\* p<0.001    \*\* p<0.01    \* p<0.05    n.s.: no significativo

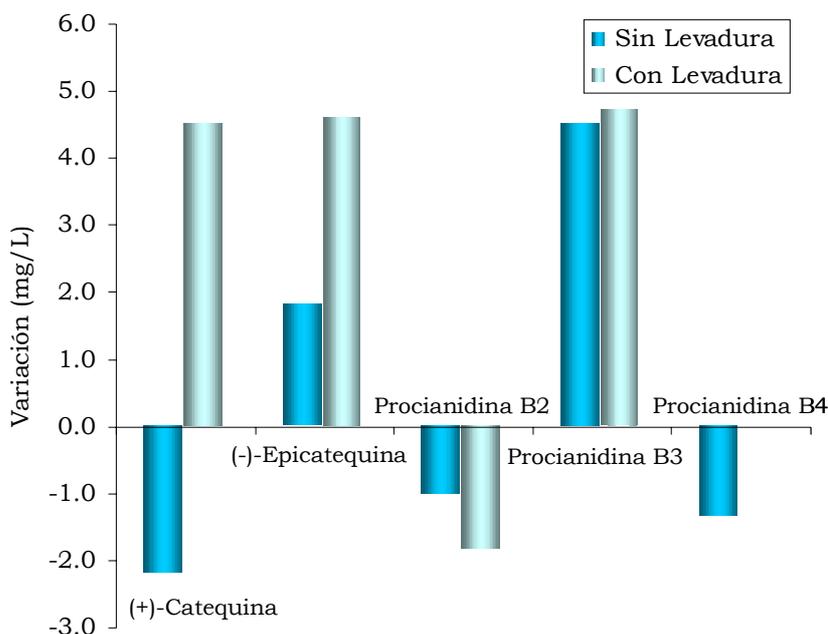


Como se puede observar, las muestras de vino disminuyen ligeramente su concentración en el ácido *t*-caftárico, incluso las muestras con levadura añadida a diferentes concentraciones, lo que induce a pensar que este compuesto tiende a bajar sus contenidos durante el proceso de pardeamiento, lo cual está ampliamente descrito en la bibliografía para el

caso del pardeamiento enzimático. Sin embargo, en el caso del *c*-cutárico, el comportamiento es diferente ya que todas las muestras de vino incrementan su concentración respecto al vino Inicial.

De nuevo, los contenidos de tirosol experimentan una variación negativa de la concentración en todas las muestras de vino. Dado que a los 18 días los dos vinos antes mencionados (con y sin levadura) presentaban muy diferente valor de A420, y sus contenidos en tirosol eran muy similares, es difícil atribuir las variaciones de este compuesto al pardeamiento del vino, y puesto que dichas variaciones son del mismo orden de magnitud en los vinos con y sin levadura, también es improbable que sea debido a la acción de las levaduras.

Respecto a los derivados monómeros y dímeros del flavan-3-ol, se ha realizado igualmente un análisis de varianza que permite comparar de forma significativa el vino Inicial con los vinos almacenados 18 días, tanto en presencia como en ausencia de levadura. En la Figura siguiente se han representado para los dos vinos estudiados las variaciones significativas de estos compuestos.



	Sin Levadura		Con Levadura (2.0 g/L)	
	F	p	F	P
(+)-Catequina	42.2	**	69.3	**
(-)-Epicatequina	9.49	*	35.7	**
Procianidina B1	0.47	n.s.	0.00	n.s.
Procianidina B2	22.0	**	31.9	**
Procianidina B3	129	***	47.8	**
Procianidina B4	15.4	*	6.25	n.s.

\*\*\* p<0.001    \*\* p<0.01    \* p<0.05    n.s.: no significativo

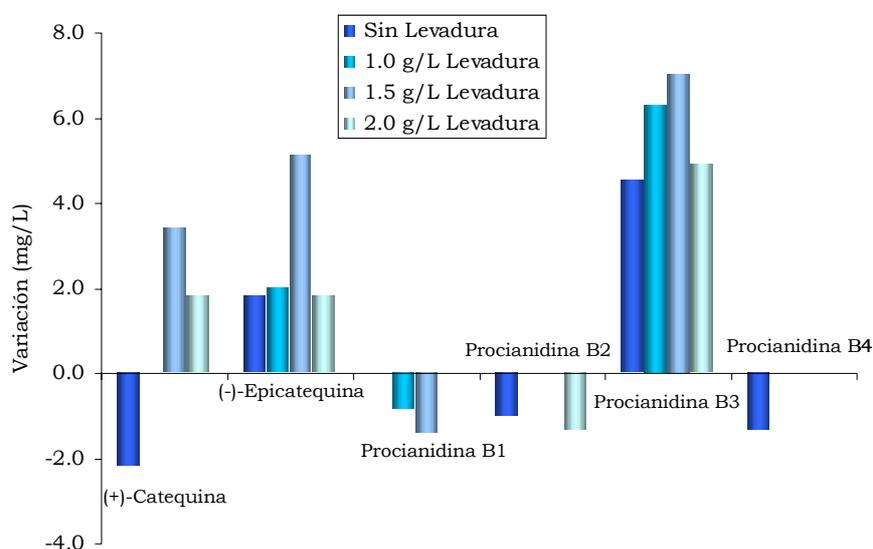
En primer lugar, y en lo que se refiere a la (+)-catequina, cabe destacar que el vino Sin Levadura presenta una concentración de 31.9 mg/L, lo que supone una disminución del 6.45% respecto del vino Inicial. Sin embargo, en presencia de levadura la (+)-catequina no experimenta esta disminución, sino todo lo contrario, un aumento del 13.20%. En lo que respecta a la (-)-epicatequina, la variación de su concentración en el vino Con Levadura es prácticamente la misma que la observada para el otro flavano monómero (4.6 mg/L), a diferencia de lo mostrado en el vino Sin Levadura que aumenta, aunque ligeramente (1.8 mg/L).

En cuanto a las procianidinas estudiadas, B1 (epicatequina  $4\beta \rightarrow 8$  catequina), B2 (epicatequina  $4\beta \rightarrow 8$  epicatequina), B3 (catequina  $4a \rightarrow 8$  catequina) y B4 (catequina  $4a \rightarrow 8$  epicatequina), hay que hacer distinción en el comportamiento de ellas durante estos días de almacenamiento. Por un lado, en este punto de la experiencia, la B1 no varía significativamente sus contenidos en ninguno de los dos vinos. Por otro lado, mientras en la B3 se produce una variación positiva en la concentración con respecto al vino Inicial en ambas muestras de vino, las B2 y B4 la variación es negativa, aunque no es significativa para ésta última.

Respecto a la variación que experimentan estos derivados del flavan-3ol desde el inicio hasta el final de la experiencia (A420 de 0.180 u.a. en todos los vinos estudiados), la siguiente tabla muestra el correspondiente análisis de varianza, que permitirá representar solo los incrementos significativos (Figura siguiente). Es preciso recordar que cada uno de los vinos (0, 1.0, 1.5 y 2.0 g/L de levadura) necesitaron un periodo de almacenamiento diferente para alcanzar dicho valor de absorbancia (18, 33, 39 y 48 días respectivamente).

	Sin Levadura		Con Levadura					
			1.0 g/L		1.5 g/L		2.0 g/L	
	F	p	F	p	F	p	F	p
Catequina	42.2	**	5.00	n.s.	36.6	**	14.8	*
Epicatequina	9.49	*	11.0	*	38.6	**	10.7	*
Proc. B1	0.47	n.s.	7.75	*	10.4	*	2.55	n.s.
Proc. B2	22.0	**	4.06	n.s.	3.16	n.s.	44.7	**
Proc. B3	393	***	267	***	412	***	316	***
Proc. B4	15.4	*	1.87	n.s.	1.72	n.s.	2.96	n.s.

\*\*\* p<0.001    \*\* p<0.01    \* p<0.05    n.s.: no significativo



La (+)-catequina manifiesta un comportamiento diferente dependiendo de que el vino se almacene con o sin levadura, ya que mientras que en el vino sin levadura sus contenidos disminuyen con respecto al vino Inicial (2.2 mg/L), las muestras de vino con levadura experimentan un aumento. Este hecho fue igualmente observado a los 18 días, es decir cuando el vino sin levadura alcanzó A420 de 0.180, lo que nos permite considerar que la evolución de la (+)-catequina durante el almacenamiento del vino es diferente en presencia y en ausencia de levadura. Este comportamiento podría explicarse en base a que los vinos con levadura se almacenaron durante mayor tiempo, por lo que todas las posibles reacciones de hidrólisis de oligómeros de los flavanos están más favorecidas, tal y como ha sido descrito por otros autores (TIMBERLAKE AND BRID-

LE, 1976; DALLAS *et al.*, 1995; BARON *et al.*, 2000) para explicar el aumento de los derivados del flavan-3-ol.

Este mismo aumento puede observarse en la (-)-epicatequina, isómero del anterior, aunque en este caso también aumenta la concentración en la muestra de vino sin levadura. En cuanto a las procianidinas B2 y B4, ambas disminuyen su concentración respecto al vino Inicial, tanto en los vinos almacenados Sin Levadura como en los que contenían diferentes dosis de levadura, aunque no son significativas. En el caso de la procianidina B2, las variaciones son únicamente significativas para la concentración de levadura más alta presente en el vino. Esta variación cada vez mayor, se puede explicar nuevamente en base al mayor tiempo necesario para alcanzar el mismo valor de absorbancia, es decir, al mayor período de almacenamiento. Para la procianidina B4, se puede observar un comportamiento muy similar al ya comentado para la procianidina B2.

Por otro lado, respecto a la procianidina B1, puede apreciarse una disminución de la concentración en las muestras de vino con levadura en 0.83 mg/L, 1.40 mg/L y 0.57 mg/L (n.s.), respectivamente para las muestras con 1.0, 1.5 y 2.0 g/L de levadura, mientras que el vino Sin Levadura aumenta su concentración ligeramente (0.3 mg/L, n.s.).

En cuanto a la procianidina B3, el vino Inicial contenía una concentración de 14 mg/L y puede observarse que todas las muestras de vino al final de la experiencia tienen una concentración superior a este valor. De hecho, la variación observada para esta procianidina es bastante mayor que la observada para las otras, de 4.5 mg/L para el vino Sin Levadura, y de 6.3, 7.0 y 4.9 mg/L para las muestras de vino con levadura añadida.

En conjunto, los dos monómeros y la procianidina B3 aumentan sus contenidos a lo largo del almacenamiento del vino tanto en ausencia como en presencia de levadura, posiblemente como consecuencia de la hidrólisis de otras moléculas de flavanos (TIMBERLAKE AND BRIDLE, 1976; HASLAM, 1980; DALLAS *et al.*, 1995), a excepción de la catequina que, en ausencia de levadura, disminuye su concentración probablemente por participar en reacciones de oxidación también ampliamente descritas en la bibliografía (SIMPSON, 1982; FERNANDEZ-ZURBANO *et al.*, 1995)

En relación con los compuestos de estructura desconocida cuantificados, las siguientes Tablas muestran los resultados correspondientes a los dos análisis de varianza realizados con los vinos almacenados, tanto a los 18 días (primera tabla), como al final de la experiencia (segunda tabla).

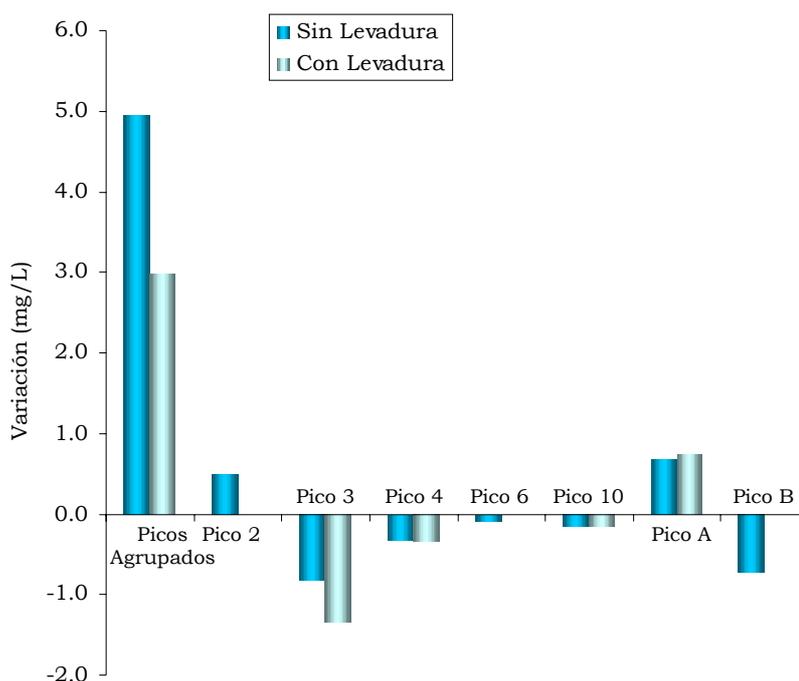
	Sin Levadura		Con Levadura (2.0 g/L)	
	F	p	F	P
Picos Agrupados	770	***	85.0	***
Pico 1	0.00	n.s.	0.02	n.s.
Pico 2	52.8	**	0.10	n.s.
Pico 3	13.5	*	34.8	**
Pico 4	125	***	22.2	**
Pico 6	8.59	*	3.67	n.s.
Pico 7	0.30	n.s.	0.15	n.s.
Pico 10	25.2	**	9.48	*
Pico A	23.4	**	8.88	*
Pico B	15.0	*	1.10	n.s.

\*\*\* p<0.001    \*\* p<0.01    \* p<0.05    n.s.: no significativo

	Sin Levadura		Con Levadura					
			1.0 g/L		1.5 g/L		2.0 g/L	
	F	p	F	p	F	p	F	p
P. Agrupados	770	***	50.0	**	49.4	**	910	***
Pico 1	0.00	n.s.	0.01	n.s.	0.59	n.s.	1.35	n.s.
Pico 2	52.8	**	9.52	*	7.94	*	0.41	n.s.
Pico 3	13.5	*	20.5	*	1.71	n.s.	1.75	n.s.
Pico 4	124	***	17.8	*	105	***	362	***
Pico 6	8.59	*	110	***	8.27	*	49.0	**
Pico 7	0.30	n.s.	0.00	n.s.	0.50	n.s.	5.13	n.s.
Pico 10	25.2	**	26.3	**	13.7	*	25.2	**
Pico A	23.4	**	36.0	**	32.8	**	32.1	**
Pico B	15.0	*	3.94	n.s.	20.2	*	1.16	n.s.

\*\*\* p<0.001    \*\* p<0.01    \* p<0.05    n.s.: no significativo

En la Figura siguiente se puede observar la variación de las concentraciones de los picos desconocidos con respecto al vino Inicial, cuando el vino Sin Levadura alcanza el valor de A420 de 0.180 u.a, es decir, a los 18 días. De todos estos compuestos, se ha de prestar una especial atención a los denominados Picos Agrupados, ya que son coloreados y han sido descritos como responsables más directos del aumento de color en el pardeamiento del vino blanco (FABIOS *et al.*, 2000; BONILLA *et al.*, 2001). Además, otros picos desconocidos también aparecen en el cromatograma registrado a 420 nm, aunque con áreas muy pequeñas y con mala resolución por lo que no se han podido cuantificar.



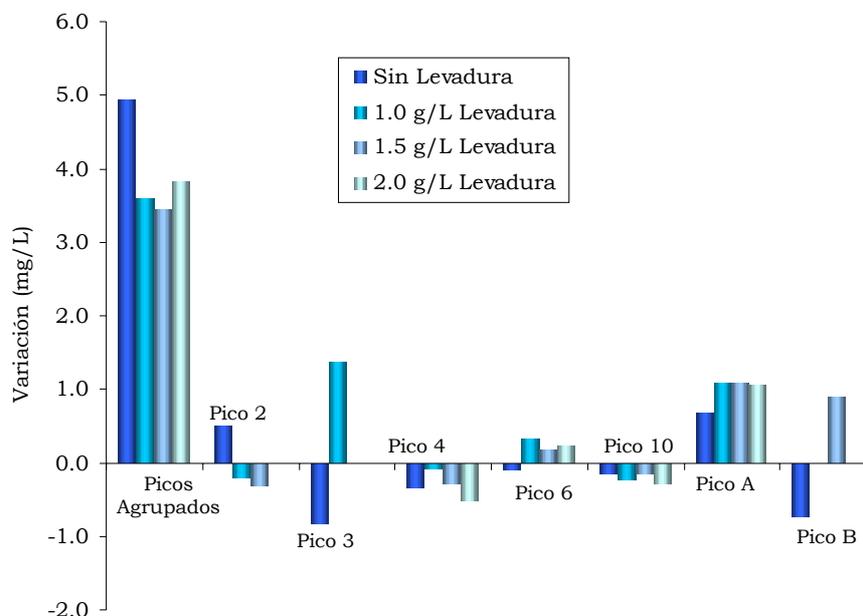
Inicialmente, en el vino comercial de partida, la concentración de Picos Agrupados era de 4.55 mg/L, que aumentó hasta 9.49 mg/L (2.08 veces) cuando el vino Sin Levadura alcanzó el valor de A420 fijado como límite de 0.180 u.a., es decir a los 18 días. Sin embargo, para este mismo tiempo de almacenamiento, el aumento producido en el vino Con Levadura fue bastante menor, alcanzándose valores de 7.53 mg/L. Hay que destacar que el vino con levadura presentaba en ese punto de la experiencia un valor de absorbancia de 0.149 u.a., bastante menor que el del vino Sin Levadura (0.180 u.a.), lo que sugiere que los compuestos englobados en los denominados Picos Agrupados son los principales responsables del aumento de color del vino blanco por pardeamiento.

En cuanto al resto de picos desconocidos, cabe destacar que el denominado Pico 3 es el que experimenta una mayor disminución en su concentración a lo largo de estos 18 días de almacenamiento, siendo de 1.34 mg/L en presencia de levadura y de 0.83 mg/L en el vino al cual no se le adiciona levadura.

Finalmente, cuando se estudian los valores finales de la experiencia, Figura siguiente, puede observarse que, aunque las muestras de vino con levadura añadida en diferentes concentraciones han alcanzado el mismo valor de A420 que el vino Sin Levadura, la concentración de Picos Agrupados es menor en presencia de levadura. Este hecho hace pensar que, por una parte, durante el pardeamiento del vino las levaduras retie-

nen estos compuestos pardos o impiden que se formen. Pero, por otra parte, cabe la posibilidad de que como todas las muestras de vino alcanzan el mismo valor final de absorbancia y tienen diferente concentración de estos compuestos, además de ellos, existan en el vino otros componentes que participan en el aumento de color. Todo ello induce a pensar que los compuestos responsables del color no son los mismos en el vino almacenado sin levadura que en las muestras de vino que permanecieron en contacto con levaduras, posiblemente como consecuencia de que estas células interactúan en el proceso de pardeamiento provocando que los compuestos responsables del color se formen por vías de síntesis diferente.

Además esta consideración puede confirmarse con el hecho de que la concentración en algunos picos desconocidos es mayor en las muestras finales de vino con levadura que en el vino Inicial, y que en el vino Sin Levadura (Figura).



## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos del estudio del pardeamiento acelerado de vinos blancos tipo fino en presencia y ausencia de levaduras de panificación, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

5. La presencia de células libres de levadura retrasa el pardeamiento del vino, como consecuencia de frenar la velocidad de aumento del color, permitiendo con ello que el tiempo de almacenamiento pueda ser mayor en comparación con los vinos sin levadura. Además, la velocidad de aumento de la absorbancia a 420 nm es menor en los estadios iniciales, lo que permite mantener en los primeros días el color inalterable.
6. Respecto a las dosis de levadura utilizadas en el estudio, la más alta (2 g/L) es la que se mostró más eficaz, ya que permitió mantener más tiempo el vino almacenado por debajo del valor fijado como límite de absorbancia a 420 nm (0.180 u.a.) que el vino sin levadura añadida. No obstante lo anterior, no se advierten claramente relaciones de linealidad entre retraso en el pardeamiento y dosis de levadura aplicada. Al menos este hecho parece desprenderse de la falta de diferencias significativas entre el comportamiento de los dosis de 1.0 y 1.5 g/L.
7. En lo que respecta a los ácidos fenólicos, la presencia de levadura no modifica sustancialmente la composición del vino, mientras que, tanto en presencia como en ausencia de levadura, dichos compuestos tienden a aumentar sus concentraciones a medida que el tiempo de almacenamiento es mayor. Sin embargo, los contenidos en tirosol disminuyen durante el periodo de estudio tanto en presencia como en ausencia de levadura.
8. Los monómeros del flavan-3-ol y la procianidina B3 aumentan sus contenidos durante el almacenamiento del vino tanto en ausencia como en presencia de levadura, posiblemente como consecuencia de la hidrólisis de otros flavanos oligómeros, a excepción de la (+)-catequina que en ausencia de levadura disminuye su concentración, probablemente a causa de su participación en reacciones de oxidación.
9. La concentración de Picos Agrupados y de otros picos desconocidos es menor en presencia que en ausencia de levadura durante todo el período de estudio, lo que hace pensar que las levaduras retienen estos compuestos pardos o que de alguna manera interaccionan en el proceso de pardeamiento del vino provocando una inhibición en la formación, si no de todos ellos, sí de algunos.



**ESTUDIO DEL PARDEAMIENTO ACELERADO  
DE VINOS BLANCOS  
EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LEVADURAS  
INMOVILIZADAS EN K-CARRAGENATO**

## INTRODUCCIÓN

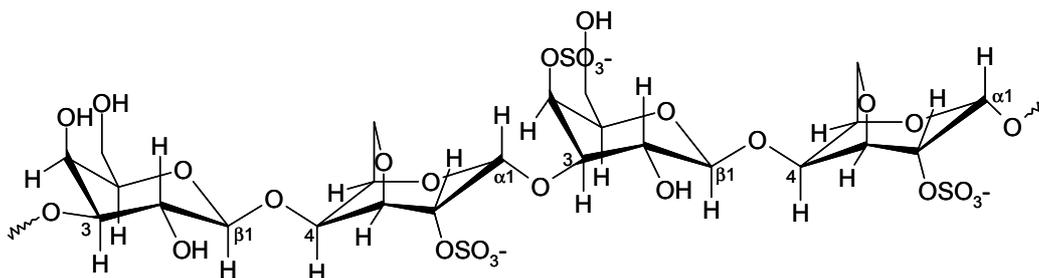
En el capítulo anterior se ha puesto de manifiesto la capacidad de las levaduras de panificación para retrasar el pardeamiento en los vinos blancos tipo fino y con ello aumentar su periodo de almacenamiento. Sin embargo, y como se ha comentado anteriormente, la aplicación de levadura produce un enturbiamiento no deseado para el consumo del producto, por lo que de hecho esta técnica sólo sería aplicable a estadios de conservación del vino en bodega en la que un tratamiento de ultrafiltración le devuelve a su necesaria transparencia.

El vino es un producto alimenticio en el que se ha de cuidar no sólo su calidad, sino también su presentación frente al consumidor, por lo que se ha de evitar en la medida de lo posible el enturbiamiento que le proporciona una mala imagen. A fin de evitar este problema, se pensó en la posibilidad de utilizar las células de levadura inmovilizadas en un gel de carragenato con la suficiente consistencia para evitar el indeseado enturbiamiento del vino.

Carragenatos, carragenanos o carrageen es el nombre genérico dado a toda una familia de polisacáridos lineales, sulfatados en diferente grado, que se obtienen mediante extracción alcalina en caliente de diversas especies de algas rojas íntimamente emparentadas (clase Rhodophyceae: género *Chondrus*, *Euchema* y *Gigartina*).

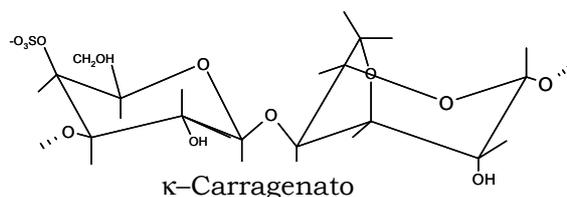


Este polisacárido está constituido por una cadena de unidades de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa, sulfatadas y no sulfatadas unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,3 y  $\beta$ -1,4, alternantes.

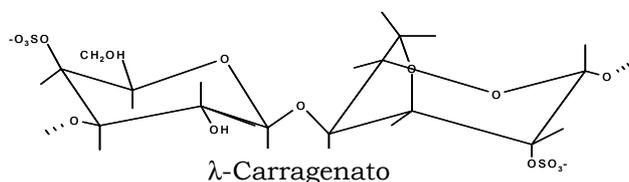


Las propiedades gelificantes del carragenato se ven afectadas por la riqueza en grupos sulfato y su localización en el polisacárido. En base a ello, se distinguen tres tipos principales de carragenatos:

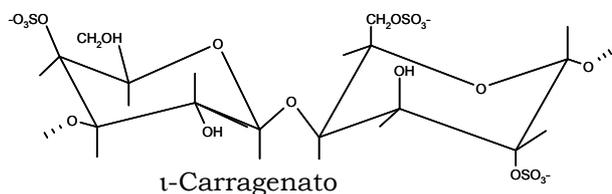
- $\kappa$ -carragenato está compuesto por D-galactosa, 3,6-anhidro-D-galactosa y sulfato unidos por enlace éster a la cadena principal, encontrándose que los restos de galactosa sulfatados están casi en su totalidad en posición 4, mientras los de anhidrogalactosa se esterifican en las posiciones 2, 6 o en ambas. Este tipo de carragenato necesita la presencia de iones  $K^+$  o  $Ca^{2+}$  para su gelificación, aunque el máximo grado de consistencia se consigue con los primeros. Es estable a pH ácido.



- $\lambda$ -carragenato está formado por unidades de galactosa-2-sulfato-galactosa-2,6-disulfato y se caracteriza por tener un mayor contenido en sulfato, lo que provoca que la conformación resultante es una cinta en zig-zag, sin características gelificantes.

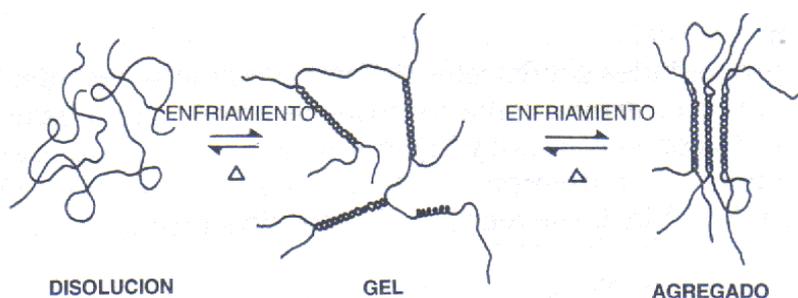
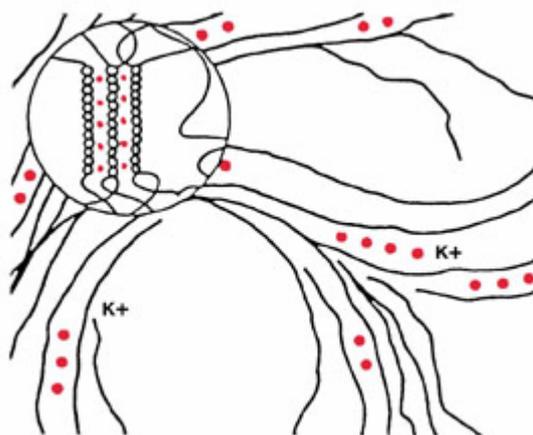


- $\iota$ -carragenato está formado por unidades de galactosa-4-sulfato-3,6-anhidrogalactosa 2-sulfato. Esta estructura necesita la presencia de iones  $Ca^{2+}$  para gelificar.



La solubilidad en agua de los carragenatos es tanto mayor cuanto más alto sea el contenido en restos sulfatados y más baja sea la proporción de azúcar anhidro.

El  $\kappa$ -carragenato forma geles térmicamente reversibles con entramados enlazados mediante la formación de dobles hélices. Al enfriarse, se produce la gelificación si se forman dobles hélices suficientes para constituir las zonas de unión necesarias para lograr una red continua. Cuando el número de dobles hélices formado es muy alto, se asocian para constituir agregados y el gel se torna opaco, mientras que cuando el grado de agregación es suficientemente alto, la red se contrae con la subsiguiente exclusión de líquido en los intersticios, y el gel se fragiliza.



El cambio estructural del polisacárido, pasando de un enrollamiento al azar a otro helicoidal, se ve favorecido por la disminución de su contenido en sulfatos, por lo que el  $\kappa$ -carragenato, que está menos sulfatado, es el que mejor forma geles opacos. Las hélices se forman gracias al establecimiento inicial de puentes de hidrógeno, entre los oxígenos 2 y 6 de restos de galactosa situados en distintas hebras de la doble hélice, para a continuación todos los grupos hidroxilo no sustituidos formar puentes de hidrógeno intrahelicoidales que confieren una gran estabilidad a la doble hélice. Los restos de sulfato, que se localizan en la superficie externa, refuerzan el esqueleto de las hélices, mediante empaquetamiento de las mismas por atracción electrostática entre cationes ( $K^+$  y  $Ca^{2+}$ ) y los aniones, por lo que la gelificación puede regularse ajustando

la concentración de cationes, aunque su presencia provoca un aumento de la temperatura de formación del gel.

La utilización de carragenato como gel inmovilizador está ampliamente descrita en el mundo de la alimentación, concretamente para acelerar y mejorar los procesos de clarificación en bebidas alcohólicas, para estabilizar y mejorar la viscosidad en los batidos de chocolate, para espesar salsas y condimentos, etc. Recientemente se están llevando a cabo estudios sobre la inmovilización de células bacterianas para producir queso fresco de forma continua (SODINI *et al.*, 1997). Asimismo, ha sido también ampliamente descrito su uso en el campo de la biotecnología, por ejemplo, la producción de etanol a partir de células de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas (GARCIA-GARCIA *et al.*, 1989; NIGAM, 2000). Más concretamente, en el campo de la Enología se han estudiado técnicas de inmovilización de células de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* para el control de la fermentación maloláctica de los vinos (CRAPISI *et al.*, 1987).

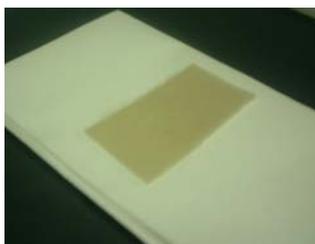
El objetivo del presente capítulo es estudiar mediante un seguimiento del color y del contenido en compuestos fenólicos, la capacidad de las levaduras inmovilizadas en  $\kappa$ -carragenato para retrasar el pardeamiento de los vinos blancos, con ello aumentando su periodo de almacenamiento posterior al embotellado.

## **MATERIAL EXPERIMENTAL**

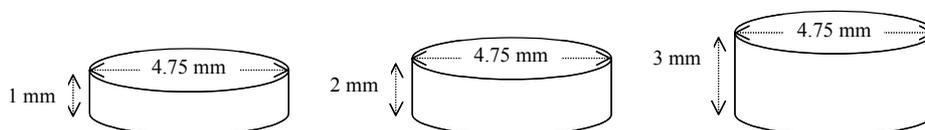
La experiencia fue realizada con el mismo vino blanco comercial tipo fino, perteneciente a la D.O. Montilla-Moriles, utilizado en la experiencia del capítulo anterior. El vino embotellado se descorchó y su contenido fue vertido en un depósito de acero inoxidable a fin de homogeneizarlo. A continuación se rellenaron de nuevo las botellas de 70 cL solo hasta la mitad de su capacidad para asegurar una cámara de aire en contacto con el vino que favoreciera su pardeamiento.

La levadura utilizada para el proceso, al igual que en el capítulo anterior, es del tipo liofilizada instantánea (Mauripan Fleischmann's Foods, Canadá). Previamente a la inmovilización de las células en  $\kappa$ -carragenato se procedió a su inactivación, con objeto de evitar que, una vez formado el gel, se desarrolle un crecimiento celular que provoque su rotura en el medio donde se va a aplicar, además de imposibilitar la autólisis de las levaduras ya comentada. La inactivación se realizó con una disolución hidroalcohólica al 50% (v/v), calentando la mezcla hasta evaporación del líquido.

Una vez inactivadas las levaduras, se preparó una mezcla homogénea que contenía agua, 4 g/L de  $\kappa$ -carragenato y 2 g/L de levadura. Dicha mezcla se calentó y antes de su gelificación se vertió sobre un recipiente rectangular con altura variable a fin de conseguir láminas de diferentes espesores. Se dejó enfriar



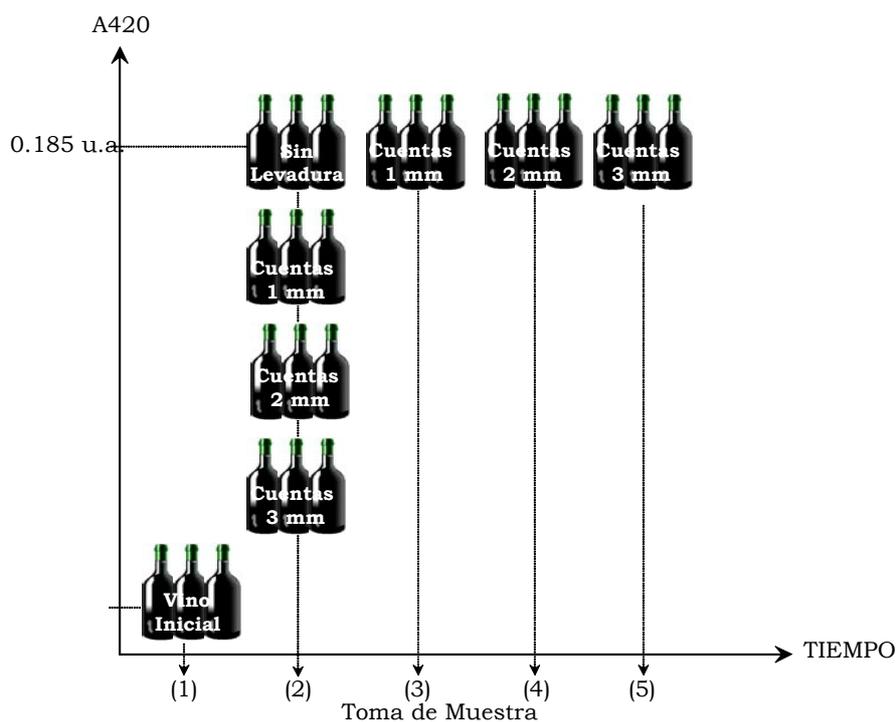
y se estabilizó por inmersión en una disolución de cloruro potásico al 2.5%. Por último, la lámina de gel se cortó en cuentas de 4.75 mm de diámetro interno y con diferentes espesores (1, 2 y 3 mm), tal y como se muestra en el siguiente esquema.



A cada una de las botellas de vino se le añadió la cantidad necesaria de cuentas de gel para que cada botella tuviera una concentración de levadura de 2 g/L y a continuación se cerraron con su tapón comercial. A fin de acelerar el proceso de pardeamiento, las botellas se introdujeron en una estufa con temperatura controlada de 35 °C.

La toma de muestras para el seguimiento del color, se realizó al inicio de la experiencia y cada tres días hasta el final de la misma. Para la determinación del contenido en polifenoles por HPLC, la toma de muestras fue en los siguientes puntos del estudio (Figura):

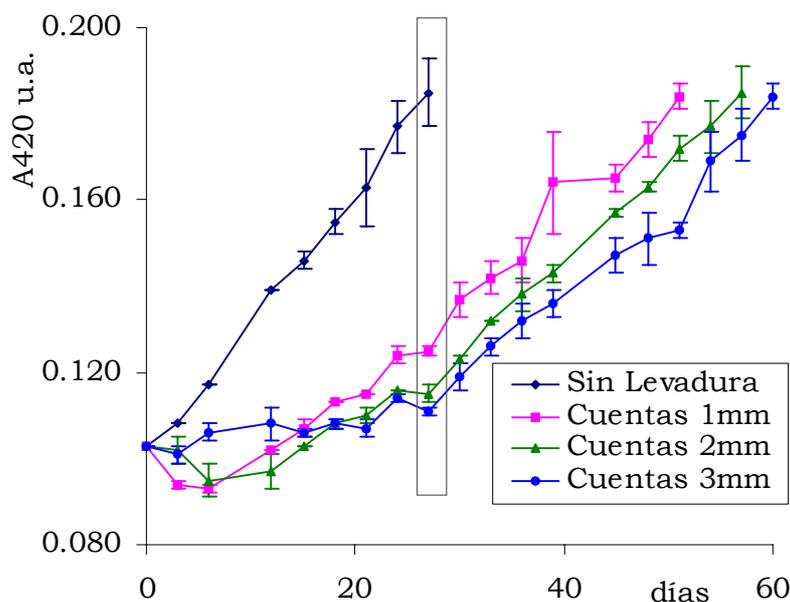
- En el vino inicial antes de comenzar el proceso de pardeamiento (1).
- Cuando el vino Sin Levadura alcanzó un valor de A420 de 0.185 u.a. (2)
- Cuando todas las muestras de vino con adición de levadura alcanzaron el valor establecido de 0.185 u.a. (3), (4) y (5).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Tablas 20, 21, 22 y 23 del Anexo muestran las medidas espectrofotométricas por triplicado, sus medias y desviaciones estándar realizadas a las muestras de vino durante el desarrollo de la experiencia tanto en ausencia como en presencia de levaduras inmovilizadas.

En la siguiente Figura se presenta la evolución de los valores medios y sus desviaciones estándar de la absorbancia a 420 nm durante el almacenamiento del vino Sin Levadura y de los vinos que contenían las tres diferentes cuentas de gel (1, 2 y 3 mm de espesor). Como puede observarse, mientras el vino testigo alcanzó el valor final de 0.185 u.a. en 27 días, las muestras de vino almacenadas durante ese mismo tiempo con las células de levadura, sólo experimentaron un pequeño aumento en el valor de absorbancia. Concretamente, en esos 27 días, los vinos con cuentas de 2 y 3 mm mostraron un leve aumento de la absorbancia desde 0.103 u.a. hasta valores de 0.115 y 0.111 u.a., respectivamente, y sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, la muestra que contenía las cuentas de menor espesor se comportó en este punto significati-



vamente diferente a las otras dos, con un valor ligeramente superior (0.124 u.a.).

Por otro lado, y como puede observarse en la Figura el resto de los vinos alcanzaron el valor límite de 0.185 u.a. en un periodo de tiempo claramente superior. En concreto, las muestras con cuentas de gel de 1 mm de espesor tardaron 51 días, las de 2 mm lo hicieron en 57 días y las de 3 mm de espesor en 60 días o, dicho de otra manera, la presencia de cuentas de gel de 1, 2 y 3 mm retrasaron el pardeamiento acelerado del vino en 24, 30 y 33 días. Teniendo en cuenta que la concentración de levadura fue siempre la misma (2 g/L), el mejor comportamiento de las cuentas de mayor espesor se puede explicar en base a que se apelmazan menos en la botella que las de tamaño menor y a factores tales como la porosidad estructural de las cuentas.

Si comparamos los resultados obtenidos en este ensayo con los obtenidos en el capítulo anterior, utilizando células de levadura libres, se puede observar que los resultados son comparativamente muy parecidos, lo que pone de manifiesto que el gel de  $\kappa$ -carragenato es inerte con respecto a los componentes del vino, tal y como ya había observado BONILLA (2002) al utilizar levadura inmovilizada en este mismo gel como agente clarificante.

Con los datos correspondientes a la evolución de la absorbancia a 420 nm a lo largo de todo el periodo de almacenamiento para los vinos

estudiados, tanto en ausencia como en presencia de levadura inmovilizada, se ha realizado un análisis estadístico para estudiar el modelo de regresión al que se ajusta mejor cada uno de ellos. La siguiente Tabla muestra cada una de las ecuaciones de tendencia de A420 frente al tiempo, así como sus correspondientes coeficientes de determinación.

Muestra	Modelo	R <sup>2</sup>	Ecuación
Sin Levadura	Lineal	97.15	$A420=0.099+0.003T$
Cuentas 1 mm	Exponencial	94.59	$A420=\exp(-2.41+0.014T)$
Cuentas 2 mm	Exponencial	93.21	$A420=\exp(-2.41+0.012T)$
Cuentas 3 mm	Exponencial	91.55	$A420=\exp(-2.37+0.010T)$

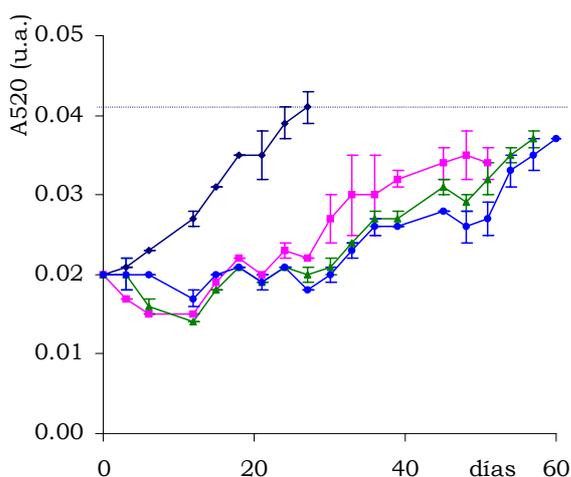
Puede comprobarse que el vino sin levadura aumenta su color de forma lineal con el tiempo, es decir con una velocidad constante, mientras que las muestras de vino con levadura inmovilizada presentan una tendencia exponencial. Estos resultados confirman los encontrados en el capítulo anterior, en el sentido de que la presencia de levadura provoca que el pardeamiento del vino transcurra a muy baja velocidad en los primeros días y más rápidamente a medida que avanza el tiempo, posiblemente como consecuencia de que la levadura va perdiendo progresivamente su efectividad quizá, a causa de problemas de saturación en la retención de compuestos pardos. De hecho, al final de la experiencia las cuentas de gel quedan totalmente coloreadas como consecuencia de esta adsorción. En la fotografía se puede observar la diferencia de color existente entre las cuentas de gel al inicio de la experiencia (izquierda) y al final de la misma (derecha), que han pasado de tener un color beige a un



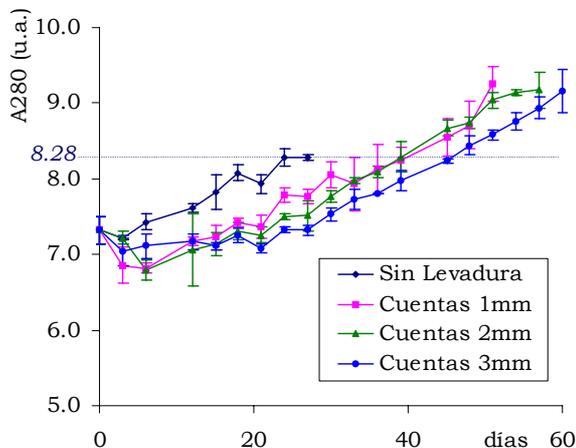
color pardo oscuro (chocolate) en el punto final. Esta apreciación visual confirma que las cuentas de gel son capaces de adsorber compuestos coloreados, evitando así que el vino almacenado con levadura inmovilizada pardee tan rápidamente como lo hace el vino Sin Levadura.

La evolución de la absorbancia a 520 nm de todos los vinos estudiados a lo largo del periodo de almacenamiento se pueden observar en la Figura siguiente. De la misma forma que se ha comentado para la A420, la presencia de levadura inmovilizada provoca que los vinos almacenados mantengan prácticamente los valores iniciales de esta absorbancia durante la primera mitad del periodo, para luego aumentar ligeramente

hasta el final del mismo, incluso con valores más bajos que los obtenidos por el vino Sin Levadura. El hecho de que en el punto final de cada experiencia todos los vinos tuvieron el mismo valor de A420 (0.185 u.a.) y los que contenían levadura presentaron un menor valor de A520, es por lo que es razonable pensar que los productos coloreados formados durante el almacenamiento son ligeramente diferentes en ausencia que en presencia de levadura.



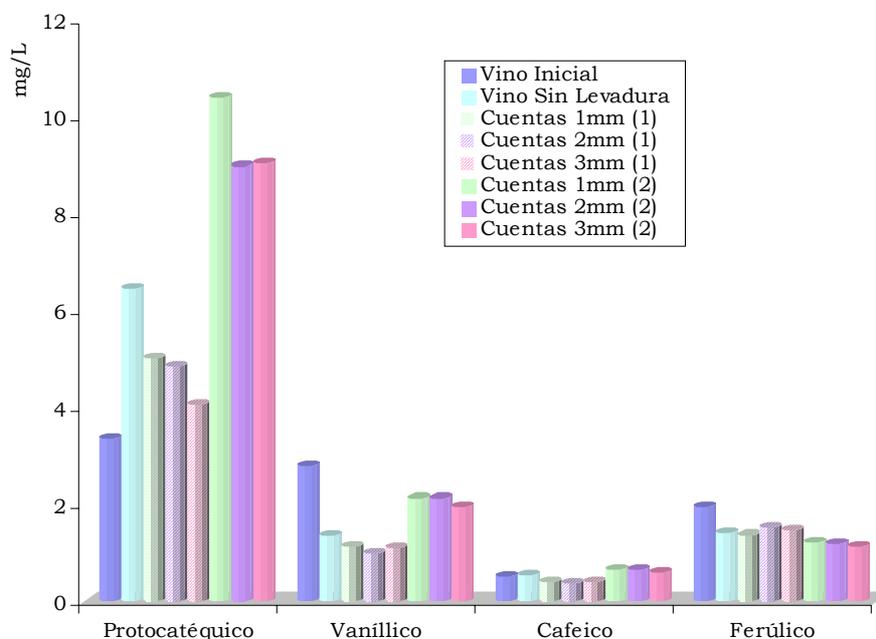
La siguiente Figura muestra la evolución del contenido en polifenoles totales, medido como absorbancia a 280 nm de todos los vinos estudiados durante el periodo considerado. Cabe destacar que todas las muestras aumentaron su valor de absorbancia, lo que concuerda con lo encontrado por otros autores estudiando el almacenamiento de diferentes tipos de vinos finos comerciales (BARON, 1997). Además, en tanto que la muestra Sin Levadura al final del ensayo tiene un valor de 8.28 u.a., los tres vinos que contenían cuentas de gel llegan a alcanzar valores de absorbancia entre 9.19 y 9.29 u.a., sin diferencias significativas entre ellos, lo que podría indicar que si bien todos los vinos están igualmente coloreados (a 420 nm), la presencia de levadura y/o su mayor tiempo de almacenamiento provoca la formación de una mayor concentración de polifenoles totales y/o compuestos de mayor coeficiente de absorptividad molar.



En las Tablas 24-31 del Anexo se muestran las concentraciones (valores por triplicado, media y desviación estándar) en los diferentes compuestos fenólicos analizados para el vino Inicial y los almacenados, con y sin levadura, tanto a los 27 días como al final de la experiencia. Con todos estos datos se ha realizado un análisis estadístico de varianza,

al objeto de comparar, para cada uno de los compuestos, los vinos almacenados en diferentes condiciones con el vino inicial ( $p < 0.05$ ). Para simplificar la discusión de los resultados, solamente se representarán los correspondientes a aquellos compuestos que presentan diferencias significativas, es decir los que sufrieron variación durante el almacenamiento del vino, excepto la (+)-catequina que, a pesar de no variar significativamente, se ha representado por su importante papel en el pardeamiento del vino.

En la Figura siguiente se representa la concentración de los ácidos fenólicos en el vino Inicial, en el vino Sin Levadura a los 27 días, y las diferentes muestras de vino con levadura tanto a los 27 días (1), es decir cuando el vino Sin Levadura alcanzó el valor límite de A420, como al final de la experiencia (2), cuando todas las muestras alcanzaron ese valor, concretamente a los 51, 57 y 60 días para las cuentas de 1 mm, 2 mm y 3 mm respectivamente.



Los contenidos en los ácidos gálico, siríngico y *p*-cumárico no variaron significativamente durante el almacenamiento del vino, ni en presencia ni en ausencia de levadura, de ahí que no aparezcan representados en la Figura. El ácido protocatéquico es el que nuevamente, tal y como ocurría en el capítulo anterior, presenta una variación mayor con respecto al vino Inicial, tendiendo en general a aumentar sus contenidos iniciales de 3.35 mg/L durante todas las condiciones de almacenamiento. A

los 27 días, el vino Sin Levadura aumentó 1.92 veces su concentración, mientras que los vinos con levadura inmovilizada también lo hacen pero de forma mucho menos pronunciada. Puesto que en este caso el tiempo es el mismo en todos ellos, este menor aumento de concentración del ácido, podría justificarse en base a que la levadura interfiera. Al final de la experiencia (2) todas las muestras de vino aumentaron la concentración en este ácido más que el vino Sin Levadura, si bien se podría justificar en base a su mayor tiempo de almacenamiento. Este aumento es de casi tres veces el valor inicial, no encontrándose diferencias significativas entre las muestras de vino con cuentas de gel de 2 y 3 mm.

Un comportamiento muy parecido al descrito para el ácido protocatéquico es el observado para el ácido cafeico, aunque las variaciones sean bastantes menores. Al comienzo del ensayo, el vino inicial tiene una concentración de 0.520 mg/L, que apenas sufre variación con respecto a la muestra sin levadura añadida después de 27 días de experiencia (grupos homogéneos a  $p < 0.05$ ). Para este mismo tiempo de almacenamiento, las muestras de vino con las cuentas de gel tienen una concentración algo menor en este ácido, cercana a los 0.400 mg/L. Al final del tiempo de ensayo, todos los vinos con levadura mostraron una concentración de ácido cafeico mayor que la presentada por el vino Sin Levadura, de 0.665, 0.655 y 0.605 mg/L para las mantenidas con cuentas de gel de 1, 2 y 3 mm.

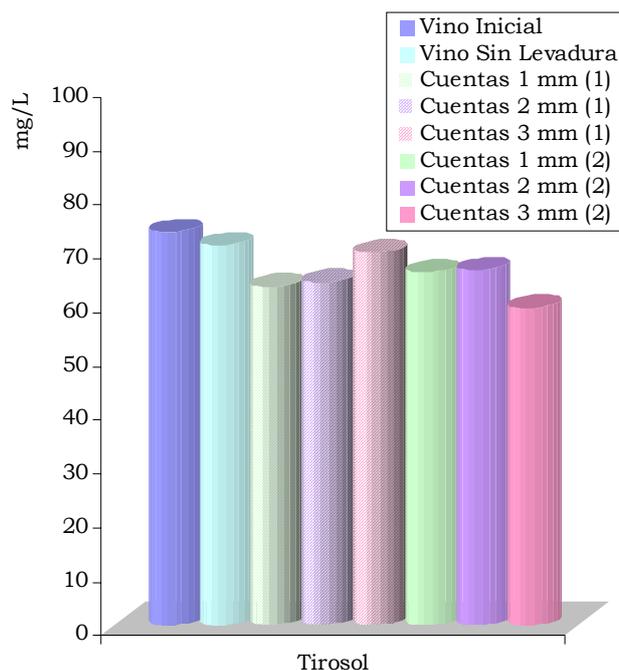
En cuanto a la variación de los contenidos en ácido vaníllico a lo largo del periodo estudiado, ocurre algo similar, si bien la única diferencia es en este caso que la concentración existente en el vino Inicial es mayor que la medida para todas las muestras de vino a los 27 días (punto 1) y al final del tiempo de ensayo (punto 2), es decir que los contenidos en este ácido descienden durante el almacenamiento, tanto en presencia como en ausencia de levadura.

Por último, en lo que respecta al ácido ferúlico, cabe destacar que este ácido está presente en el vino Inicial en una concentración de 1.96 mg/L y que desciende a lo largo del periodo en todos los vinos estudiados de forma similar a como lo hacía el ácido vaníllico. A los 27 días, cuando el vino Sin Levadura alcanza el valor de A420 límite, se produce un descenso de la concentración en todos los vinos, sin diferencias significativas entre ellos y muy cercano al 30%. A partir de ese punto, las muestras de vino con levadura continúan disminuyendo su concentración hasta el final del tiempo de ensayo (2), donde las que contenían cuentas de gel de 1 mm (a los 51 días), presentaban una concentración de 1.21 mg/L, las de 2 mm (a los 57 días) de 1.19 mg/L y las de 3 mm (a los 60 días), habían descendido ya el 41.84%. Teniendo en cuenta que todas las muestras de vino con levadura inmovilizada contenían la misma concentración en

levadura (2 g/L), estas diferencias en la concentración de ácido ferúlico se podrían explicar, como en casos anteriores, en base al diferente tiempo de almacenamiento que cada uno de los vinos ha sido necesario esperar para alcanzar el mismo valor de absorbancia límite.

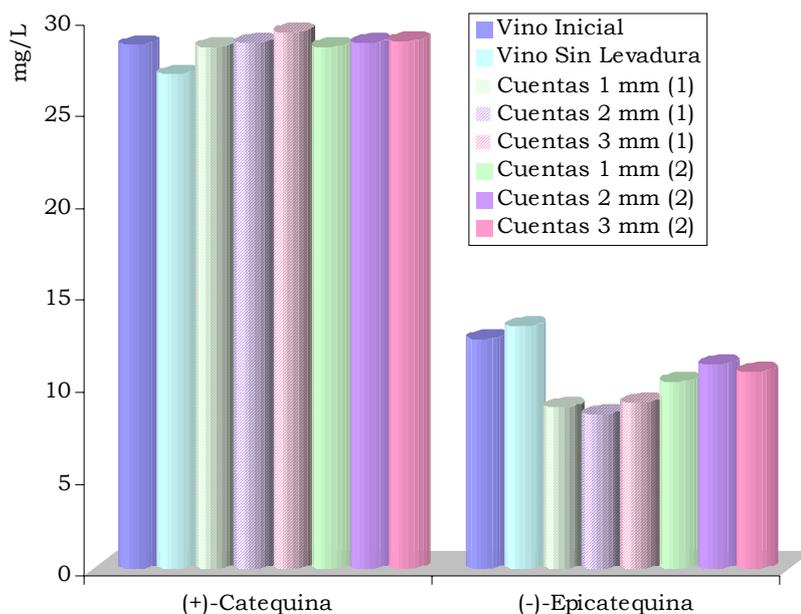
En lo que respecta a los ésteres de los ácidos hidroxicinámicos, cabe destacar en primer lugar, que el ácido *c*-cutárico y el *t*-caftárico no presentan diferencias significativas entre el vino Inicial y las diferentes muestras de vino estudiadas en la experiencia, por lo que no han sido representados

En la Figura siguiente se pueden observar los resultados obtenidos para el tirosol, tanto en el vino Inicial, como en el vino sin Levadura y las muestras de vino con levadura inmovilizada añadida a los 27 días de iniciada la experiencia (1) y al final de la misma (2). En cuanto al comportamiento del tirosol, sus contenidos disminuyen tanto en presencia como en ausencia de levadura inmovilizada, sin encontrar diferencias significativas entre las tres formas diferentes de inmovilizar la levadura.



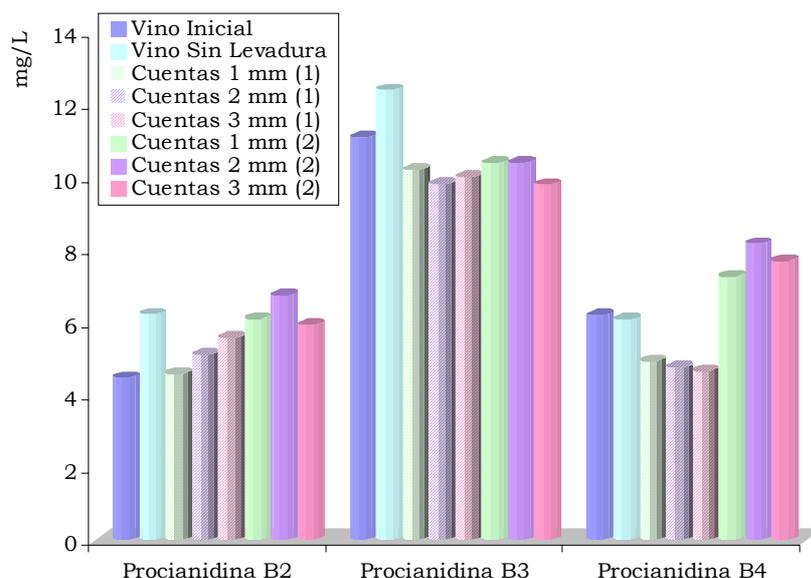
Los contenidos en monómeros derivados del flavan-3-ol, (+)-catequina y (-)-epicatequina de todos los vinos estudiados se muestran en la Figura siguiente. Como se ha comentado en el capítulo anterior la

catequina en la muestra de vino sin levadura añadida disminuye su concentración con respecto al vino Inicial, es decir en ausencia de levadura los contenidos en (+)-catequina disminuyen durante el almacenamiento, posiblemente como consecuencia de que se ve involucrada en reacciones de oxidación y/o polimerización. Sin embargo, en presencia de levadura, su concentración prácticamente se mantiene con respecto al vino del punto de partida.



Los contenidos en (-)-epicatequina no variaron significativamente en los vinos almacenados durante 27 días sin levadura, sin embargo, disminuyeron su concentración en las muestras de vino con levadura añadida, en torno al 33.3% a los 27 días de comenzada la experiencia y del 14.4% al final de la misma, sin diferencias significativas entre los tres tipos de cuentas de gel.

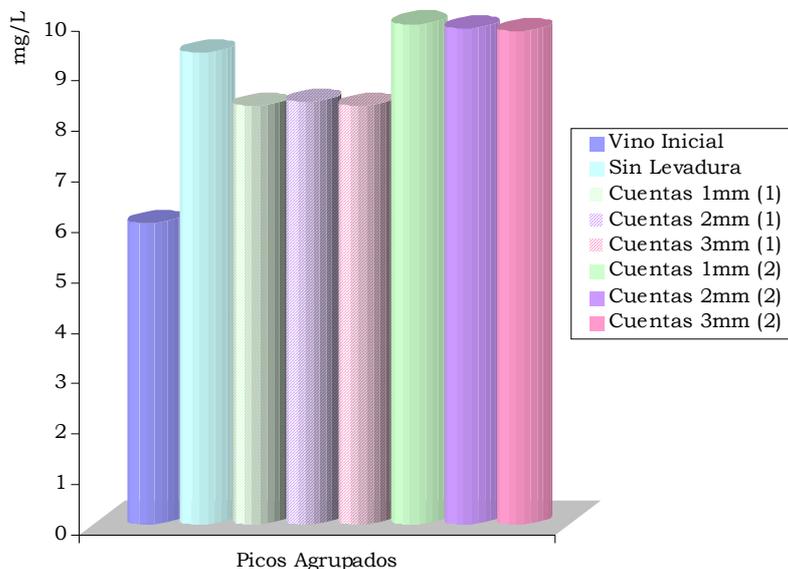
La siguiente Figura muestra los contenidos en los dímeros de los flavanos que presentaban diferencias significativas entre el vino Inicial y los vinos almacenados. Cabe destacar, en primer lugar, que la procianidina B1, que junto con la B3 son las mayoritarias en el vino estudiado, no ha sido representada ya que sus concentraciones no variaron significativamente. Con respecto a la procianidina B2, las muestras con cuentas de gel aumentaron su concentración durante el periodo de almacenamiento, siendo dicho aumento mayor al final de la experiencia que en los primeros 27 días.



Por otro lado, la procianidina B3 aumentó ligeramente su concentración durante el almacenamiento del vino sin levadura, mientras que en aquellas muestras que contienen cuentas de gel disminuye la concentración, concretamente desde los 11.1 mg/L del vino Inicial, hasta 10.4 mg/L en las de cuentas de 1 y 2 mm, y hasta 9.80 mg/L en las de 3 mm. Por último, en lo que se refiere a la procianidina B4, cabe señalar que a los 27 días, las muestras de vino con cuentas de gel disminuyen ligeramente su concentración pero, sin embargo, puede observarse al final de la experiencia, cuando los vinos se han almacenado durante más tiempo, que los contenidos en esta procianidina aumentaron.

Aunque bien es cierto que ha sido demostrado por BONILLA (2002) que el polisacárido  $\kappa$ -carragenato no afecta directamente a la retención de compuestos fenólicos del vino, los diferentes comportamientos observados para los flavanos, cuando se añaden las células de levadura libres o inmovilizadas, podría explicarse en base a que la interacción de las levaduras con el proceso de pardeamiento del vino sea diferente en ambos casos, posiblemente como consecuencia de estar o no atrapada en las redes de polisacáridos.

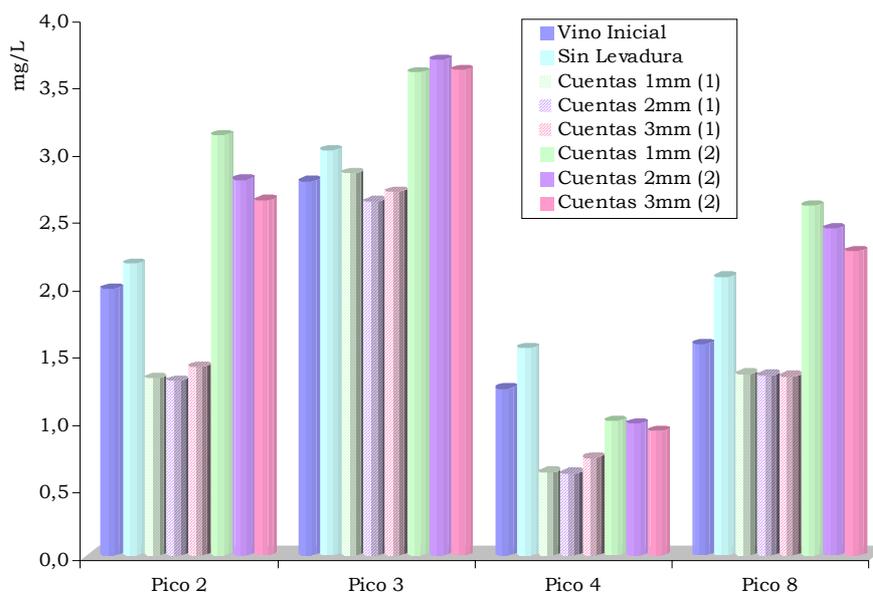
En la siguiente Figura se han representado las concentraciones obtenidas por HPLC de los denominados Picos Agrupados para las diferentes muestras de vino, tanto en ausencia como en presencia de levadura. En primer lugar, cabe destacar que todas aumentaron su concentración en estos compuestos coloreados con respecto al vino inicial de partida (5.97 mg/L). Por otra parte, se puede observar que a los 27 días, las



muestras de vino que contenían levadura inmovilizada tienen un valor de concentración menor que el vino Sin Levadura. De hecho, mientras que el vino Sin Levadura aumenta en 1.57 veces, hasta un valor de 9.36 mg/L, las muestras con cuentas de levadura aumentaron su concentración en 1.39 veces, no encontrándose diferencias significativas entre las muestras con diferentes tamaño de cuentas. En este sentido, es preciso recordar que en este punto de la experiencia, los valores de A420 son superiores en el vino sin levadura que en los que contenían levadura, por lo que de nuevo se pone de manifiesto la relación existente entre el pardeamiento del vino y la concentración de estos denominados Picos Agrupados. Este hecho puede confirmarse con los datos obtenidos al final de la experiencia (2), donde todos los vinos, con y sin levadura, que presentaban el mismo grado de pardeamiento forman un grupo homogéneo respecto a la concentración de Picos Agrupados.

En cuanto a los datos correspondientes al resto de picos desconocidos, todos están recogidos en las correspondientes Tablas del Anexo. En la siguiente Figura solamente se han representado lo que han mostrado una variación significativa entre los vinos almacenados y el vino inicial. Como se puede comprobar, todos estos picos presentan un comportamiento muy similar al ya comentado para los denominados Picos Agrupados, en el sentido de que aumentan su concentración durante el almacenamiento en ausencia de levadura. Sin embargo, a los 27 días de comenzada la experiencia (1), las muestras con levadura añadida tienen una concentración menor que al final de la experiencia (2) e incluso menor que en el vino Inicial, pero que progresivamente tienden

nor que en el vino Inicial, pero que progresivamente tienden a ir aumentando para situarse en unos valores finales muy superiores a los correspondientes al vino Sin Levadura, excepto el pico 4 que siempre mantiene en presencia de levadura unos valores menores que en ausencia de ella. Es de destacar a este respecto que precisamente el pico 4 es el que junto con los Picos Agrupados, aparece en el cromatograma registrado a 420 nm por lo que más claramente puede relacionarse con el pardeamiento del vino.



## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos acerca del estudio del pardeamiento acelerado de vinos blancos tipo fino en presencia y ausencia de levaduras de panificación inmovilizadas en  $\kappa$ -carragenato, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Las células de levadura inmovilizadas se muestran eficaces para retrasar el pardeamiento acelerado del vino, comportándose como mejores las cuentas de gel de mayor espesor (3 mm), posiblemente como consecuencia de que se apelmazan menos y de factores tales como la porosidad estructural del gel que, en conjunto, permiten un mayor contacto vino-levadura. Además, en presencia de células inmovilizadas, al igual que ocurría cuando las células se añadie-

ron libres, la velocidad de pardeamiento del vino transcurre de forma exponencial lo cual provoca un mantenimiento del color en los primeros estadios del almacenamiento.

11. Cuando todos los vinos están igualmente pardeados (A420 de 0.185 u.a.) se observa que la presencia de levadura inmovilizada y/o un mayor tiempo de almacenamiento conduce a un mayor contenido de polifenoles totales en el vino (A280). Asimismo, en estas condiciones existen menores valores de absorbancia a 520 nm, lo que pudiera indicar que los productos formados son diferentes en presencia de levadura.
12. Los contenidos en los ácidos gálico, siríngico y *p*-cumárico y ésteres de ácidos hidroxicinámicos no varían significativamente bajo ninguna de las condiciones de almacenamiento. El resto de los ácidos fenólicos, y fundamentalmente el ácido protocatéquico, tienden a aumentar tanto en presencia como en ausencia de levadura, alcanzando valores mayores a medida que se extiende el tiempo de estudio. Sin embargo, los contenidos en tirosol disminuyen en ambas condiciones, sin encontrar diferencias significativas entre los distintos grosores de cuentas de gel.
13. En ausencia de levadura las concentraciones de (-)-epicatequina y procianidina B4 prácticamente no varían, mientras que las de B2 y B3 aumentan ligeramente. Al contrario de lo que ocurría en presencia de células libres, las levaduras inmovilizadas provocan que los contenidos en (-)-epicatequina y procianidina B3 disminuyan respecto al vino inicial, lo que indica que la interacción de la levadura con los polifenoles del vino no es exactamente la misma cuando se encuentra ocluida en las redes del polisacárido.
14. Al igual que ocurría en presencia de levaduras libres, la concentración de Picos Agrupados y de otros picos desconocidos es menor en presencia que en ausencia de células inmovilizadas durante el tiempo de almacenamiento del vino, poniendo de manifiesto de nuevo la capacidad de las levaduras de interactuar con el proceso de pardeamiento, provocando el retraso del mismo.

**ESTUDIO DEL PARDEAMIENTO  
DE VINOS BLANCOS  
EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LEVADURAS  
DESPUÉS DE UN AÑO DE ALMACENAMIENTO**

## **INTRODUCCIÓN**

Los estudios llevados a cabo en los dos capítulos anteriores acerca del pardeamiento de vinos en ausencia y presencia de levadura, tanto libre como inmovilizada, han sido realizados acelerando el proceso de pardeamiento mediante un aumento de la temperatura (SIMPSON, 1982). Sin embargo, aunque desde el punto de vista científico la aceleración es muy útil pues se puede con ello acortar el tiempo de estudio, no permite sacar conclusiones acerca del alargamiento real en el tiempo de consumo, ni de la variación de las características organolépticas del vino como consecuencia de la presencia de células de levadura durante largos períodos de almacenamiento. Por ello, se planteó como muy interesante realizar el almacenamiento del vino a temperatura ambiente de bodega (18-20°C) al objeto de comprobar si era posible aumentar el tiempo de vida del producto en el mercado sin alterar las características organolépticas. Además, era preciso constatar la estabilidad de las cuentas de gel cuando se almacenan durante largos períodos de tiempo en contacto con el vino. En este sentido, el objetivo de la siguiente experiencia fue estudiar la efectividad de las células de levadura, tanto libre como inmovilizada, en cuanto a su capacidad de retardar el pardeamiento en condiciones próximas a las reales de conservación del vino.

## **MATERIAL EXPERIMENTAL**

La presente experiencia fue realizada con el mismo vino comercial embotellado tipo fino, perteneciente a la D.O. Montilla-Moriles, ya utilizado anteriormente. Previamente al inicio de la experiencia, se realizó una homogeneización del vino, para lo cual las botellas se abrieron y se vertió su contenido en un depósito. A continuación, las mismas botellas de 70 cL fueron rellenas hasta la mitad de su capacidad, tal y como se ha hecho en los capítulos anteriores.

Con las botellas de vino homogeneizado se prepararon diferentes lotes, cada uno de ellos conteniendo muestras por triplicado de:

- Vino sin levadura.
- Vino con 2 g/L de células de levadura libres (descritas con anterioridad).
- Vino con 2 g/L de células de levadura inmovilizadas en cuentas de gel de 1 mm (descritas con anterioridad).
- Vino con 2 g/L de células de levadura inmovilizadas en cuentas de gel de 2 mm (descritas con anterioridad).

- Vino con 2 g/L de células de levadura inmovilizadas en cuentas de gel de 3 mm (descritas con anterioridad).

Las diferentes botellas permanecieron durante todo el periodo de estudio (un año) en una cámara con temperatura controlada de  $19 \pm 1$  °C, cerradas con su tapón comercial. De todas las muestras de vino especificadas se tomaron alícuotas de 2 mL cada tres meses, a fin de seguir la evolución del color mediante medidas espectrofotométricas a 420 y 520 nm, así como la absorbancia a 280 nm como medida del contenido en polifenoles totales.

Además de estas muestras de vino comentadas anteriormente, han sido utilizadas otras para comparar los resultados obtenidos al final de la experiencia. Así se ha utilizado:

- Vino embotellado del mismo lote que el anterior, almacenado en las mismas condiciones pero sin abrir la botella comercial. De ese modo, sólo existe una pequeña cámara de aire en la botella, que no varía durante todo el proceso de almacenamiento.
- Vino comercial recién embotellado en la fecha en la cual finalizaba la experiencia.

Al finalizar el tiempo de estudio todas las muestras de vino anteriormente descritas, se pasaron por filtros de 0.45  $\mu$ m de tamaño de poro al objeto de medir las absorbancias y someterlas al análisis sensorial.

El análisis sensorial se ha llevado a cabo mediante tres paneles de cata diferentes para determinar aroma, sabor y color de los vinos descritos en la Tabla, siguiendo las normas ISO 8586-1-1993.

Vino recién embotellado		R
Vino almacenado durante 1 año	Sin Levadura y sin abrir	A
	Con Levadura libre	L
	Con cuentas de gel de 3 mm	C3

El jurado estaba compuesto por 25 catadores (16 hombres y 9 mujeres), de los cuales el 56% habían sido entrenados en la valoración de vinos tipo fino durante un año por miembros del grupo de investigación. Los tres paneles fueron presentados en una sala de cata termostatzada a 20°C, utilizando catavinos homologados según la norma UNE 87-022-92 equivalente a la norma ISO 3591-1977. En el proceso de realización de las pruebas, los catavinos estaban perfectamente señalizados y tapados, para evitar así la pérdida de las propiedades organolépticas del vino. Previamente a la realización de las pruebas, se efectuó una exposición del problema a resolver y de las normas a seguir en el procedimiento, entre-

gando a cada individuo la correspondiente ficha de análisis que se muestra a continuación.

Nombre:  
Fecha:

---

**PRUEBA TRIANGULAR: AROMA**

Examine las tres muestras por su **olor**. Existen dos iguales y una diferente. Tache la muestra diferente

Puesto nº 1	A	B	C
Puesto nº 2	A	B	C
Puesto nº 3	A	B	C
Puesto nº 4	A	B	C
Puesto nº 5	A	B	C
Puesto nº 6	A	B	C

---

**PRUEBA nº 2**

Puntúe cada uno de los cuatro vinos por su **sabor**

A	B	C	D
Deseable	Deseable	Deseable	Deseable
Aceptable	Aceptable	Aceptable	Aceptable
Indeseable	Indeseable	Indeseable	Indeseable

---

**PRUEBA nº 3**

Puntúe cada uno de los cuatro vinos por su **color** en relación con la referencia

A	B	C	D
Deseable	Deseable	Deseable	Deseable
Aceptable	Aceptable	Aceptable	Aceptable
Indeseable	Indeseable	Indeseable	Indeseable

- Primer panel: Aroma. Se efectuó una prueba triangular de juicio forzado según la norma UNE 87-005-92 equivalente a la norma ISO 5495-1983, utilizando cata ciega. El objetivo fue que el catador determinara mediante una prueba olfativa si existían o no diferencias entre la muestra recién embotellada o referencia (R) con las muestras tratadas con cuentas de gel (C3) y con levadura (L). Para cada uno de los dos análisis se prepararon tres juegos (AAB, ABB y ABA), obteniéndose un total de 75 respuestas (25 catadores x 3 juegos). Al finalizar la prueba, algunos de los catadores más expertos, realizaron una cata sensorial al objeto de aportar algunos descriptores aromáticos característicos de los vinos muestreados.

- Segundo panel: Sabor. La finalidad de la prueba fue que el catador realizara una evaluación global de la calidad de las muestras (R, C3, L y A) mediante apreciación gustativa y en cata ciega, según la norma UNE 87-020-93 equivalente a la norma ISO 4121-1987. Se utilizó como grado de calidad la escala de: deseable (3), aceptable (2) e indeseable (1). Se rechazaron a todos los individuos que calificaron como indeseable la muestra de referencia.
- Tercer panel: Color. Siguiendo la misma norma anterior, se realizó una evaluación global de la calidad de las muestras (R, C3, L y A) mediante apreciación del color valorándolo comparativamente frente a la muestra de referencia (R). El grado de calidad utilizado fue igualmente deseable (3), aceptable (2) e indeseable (1). Se rechazaron a todos los individuos que no calificaron como deseable la muestra de referencia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tablas 32, 33 y 34 del Anexo se incluyen los valores (triplicados, media y desviación estándar) de absorbancias obtenidas a 280, 420 y 520 nm durante toda la experiencia para todos los vinos estudiados.

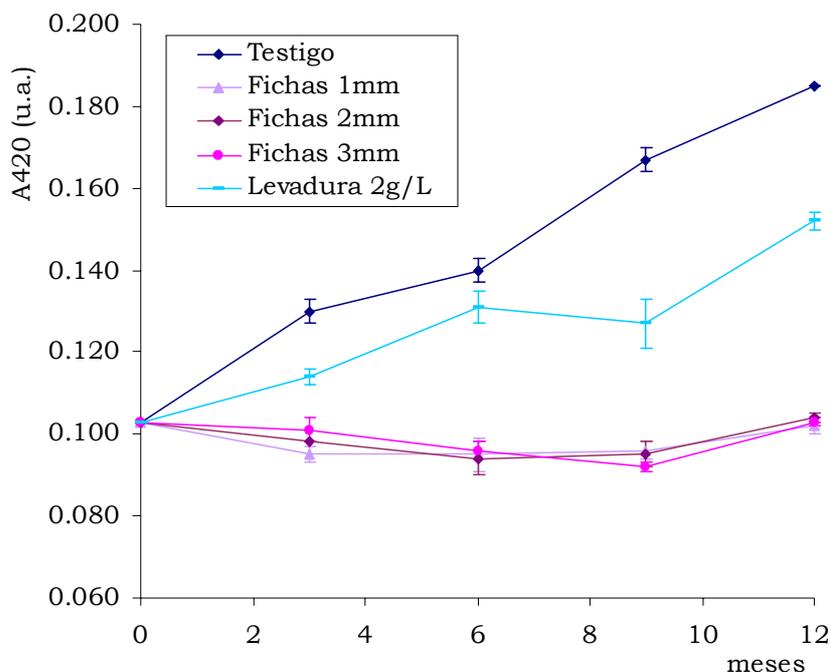
Con estos datos obtenidos se ha realizado análisis de varianza ( $p < 0.05$ ) al objeto de comparar entre sí la evolución de cada uno de los vinos estudiados durante el período de almacenamiento. En la siguiente Tabla se pueden observar los grupos homogéneos resultantes del estudio:

	Sin Levadura	Levadura 2 g/L	Cuentas 1 mm	Cuentas 2 mm	Cuentas 3 mm
A280	b	b	a	a	a
A420	c	b	a	a	a
A520	c	b	a	a	a

Los resultados muestran que los vinos Sin Levadura y los que contenían 2 g/L de células libres no presentan diferencias significativas en cuanto al contenido total de polifenoles, medido como absorbancia a 280 nm. Asimismo, los tres vinos almacenados con cuentas de gel forman otro grupo homogéneo, y con una A280 menor que las anteriores.

En lo que respecta a las absorbancias a 420 y 520 nm, el comportamiento es muy similar, ambas dan lugar a tres grupos homogéneos,

que permiten distinguir los vinos Sin Levadura de los que contienen células libres y de los que fueron adicionados con células inmobilizadas. En la Figura siguiente se puede observar la evolución de la absorbancia a 420 nm, ya que como se ha comentado anteriormente, es un parámetro habitual utilizado en la bibliografía para estudiar el pardeamiento del vino.



La muestra de vino Sin Levadura aumentó progresivamente su valor de absorbancia en esta zona del visible desde 0.103 hasta un valor final de 0.185 al año de comenzar la experiencia. Con este valor de  $A_{420}$ , un consumidor medio ya detecta una variación del color que le podría llevar a rechazar el producto.

Por otro lado, las tres muestras de vino con cuentas de gel de diferentes tamaños han ido evolucionando de forma paralela, pudiéndose afirmar que han sido muy efectivas a la hora de controlar el pardeamiento, ya que durante el año de almacenamiento, prácticamente se han mantenido las absorbancias en el visible en torno a los valores iniciales. Curiosamente, la muestra de levadura sin inmobilizar, permite retrasar el proceso de pardeamiento del vino, no siendo tan efectiva como las cuentas de gel, aunque éstas tienen también 2 g/L de levadura. La explicación de estos resultados contradictorios podría estar en el hecho de que las levaduras libres, una vez añadidas a la botella, se apelmazan en el

fondo de la misma, y solamente son efectivas una delgada capa de las que están en contacto superficial con el vino. Ello no ocurre tan acusadamente con las cuentas de gel, ya que éstas tienden menos a apelmazarse, quedando huecos entre ellas, que permiten una mayor superficie de contacto con los compuestos responsables del color disueltos en el vino.

Por otro lado, el contacto durante un tiempo prolongado de levaduras y/o geles con el vino podría conducir a alteraciones en los caracteres sensoriales del mismo. Por ello, se juzgó interesante realizar una valoración organoléptica que permitiera aclarar estos puntos. Para la realización de esta prueba, se compararon las muestras de vino almacenadas con vino recién embotellado, así como con vino conservado en las mismas condiciones que las primeras, pero sin abrir las botellas hasta que se finalizó la experiencia. Las absorbancias a 420 nm de todos los vinos muestreados son las siguientes:

DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS			A420
Vino recién embotellado		R	0.090±0.000
Vino almacenado durante 1 año	Sin Levadura y sin abrir	A	0.147±0.001
	Sin Levadura y abierta	S	0.185±0.000
	Con Levadura libre	L	0.152±0.002
	Con cuentas de gel de 1 mm	C1	0.102±0.002
	Con cuentas de gel de 2 mm	C2	0.104±0.001
	Con cuentas de gel de 3 mm	C3	0.103±0.001

Considerando que el vino almacenado cerrado durante todo el año de experiencia presentaba un valor de A420 ligeramente inferior al observado para la muestra de vino que había sido almacenado con 2 g/L de levadura libre, se podría deducir que la levadura adicionada al vino ha sido capaz de ir consumiendo el oxígeno del medio hasta hacerlo equivalente al que contiene una botella cerrada. Este consumo de oxígeno por las levaduras en estado de lías ha sido observado por SALMON *et al.* (2000).

El primer panel de cata realizado para el análisis sensorial de los vinos consistió en una prueba triangular mediante la técnica del juicio forzado en cata ciega, al objeto de evaluar las diferencias significativas que las muestras almacenadas con cuentas de gel (C3) y con levaduras libres (L) presentaban respecto al vino recién embotellado (R) en cuanto a

su aroma. Los resultados correspondientes se encuentran en la siguiente Tabla:

Muestra	Número de respuestas que lo distinguen de la referencia (R)	Número de respuestas que no lo distinguen de la referencia (R)	Significación de la diferencia entre muestras
Con cuentas de gel (C3)	53	22	***
Con levadura libre (L)	43	32	***

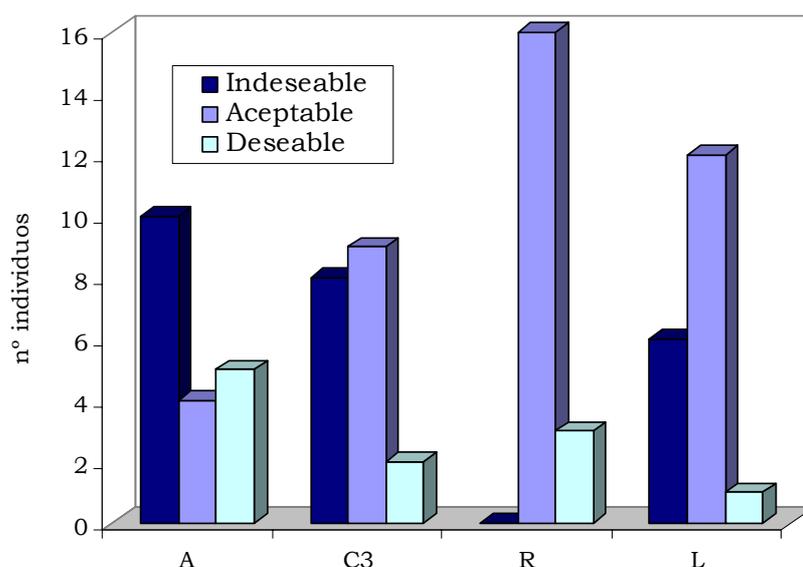
\*\*\*  $p < 0.001$

En general, los individuos participantes en la prueba mostraron una cierta dificultad para distinguir los vinos. De hecho, de las respuestas positivas que consiguieron diferenciar el vino referencia del vino con cuentas de gel (53), una gran mayoría se trataban de las dadas por los expertos catadores (33). No obstante, el análisis estadístico realizado mostró que con un nivel de significancia del 99.9%, los dos vinos presentaban diferencias en cuanto al aroma. Asimismo, el análisis sensorial realizado a las muestras de vino almacenadas con levadura libre, reveló que 43 respuestas eran positivas, por lo que ambos vinos se pueden diferenciar también significativamente por su aroma al 99.9%. Igualmente, cabe destacar que la gran mayoría de los que los distinguieron ambos vinos fueron expertos catadores.

Como consecuencia de que los vinos se apreciaron diferentes, y al objeto de conocer si las muestras tratadas serían rechazadas por el consumidor, algunos de los catadores más expertos realizaron una cata sensorial para aportar descriptores aromáticos característicos de los vinos evaluados. Así, el vino recién embotellado (R), se describió como un vino equilibrado con aromas característicos de los vinos finos, destacando por sus notas florales, frutales y a sintético, si bien ésta última no era tan intensa como las anteriores. Asimismo, presentaba olores del tipo almendrado, a levadura y fresco.

El vino tratado con cuentas de gel (C3) fue definido por los catadores como algo menos equilibrado que el anterior, si bien su perfil sensorial era agradable, con notas a miel, uva pasa, dulce y sintético. Además, presentó aroma a rancio aunque de intensidad débil. Por último, el vino tratado con levadura libre (L) fue considerado de aroma no agradable, y mucho menos intenso que en los casos anteriores, destacando notas aromáticas que recuerdan a defectos en su elaboración, como rancio, podrido, fruta sobremadura y cuero-animal.

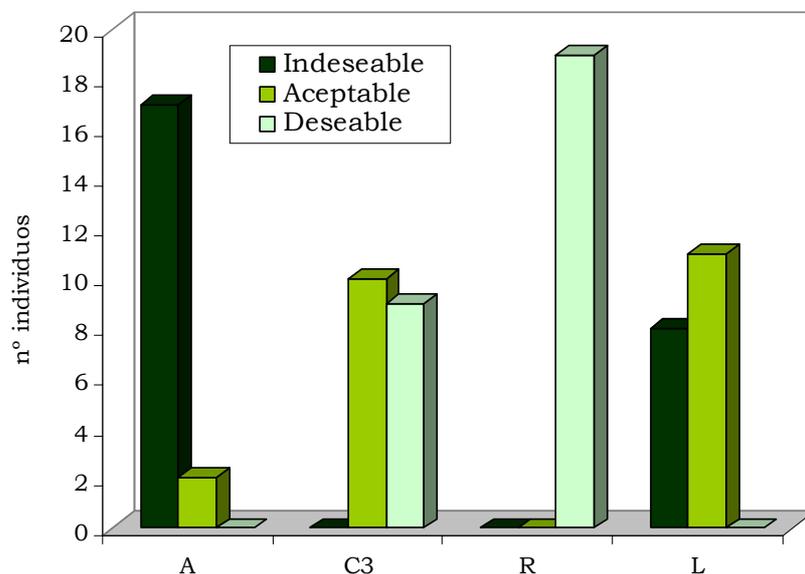
En una segunda prueba, mediante apreciación gustativa (sabor) y en cata ciega, se realizó una evaluación global de la calidad de los vinos denominados R, A, L y C3 anteriormente descritos. Cada uno de los cuatro fue puntuado por 25 catadores, de los cuales se rechazaron a aquellos individuos (6) que puntuaban como indeseable al vino recién embotellado y que se considera como referencia. La siguiente Figura muestra la frecuencia de respuesta para cada uno de los grados de calidad utilizados: deseable, aceptable e indeseable.



Los resultados muestran que, de los 19 catadores que realizaron de forma válida la prueba, el vino sin tratar (A) fue calificado por el 52.6% como indeseable, mientras que los tratados con cuentas de gel (C3) y levadura libre (L) fueron considerados como aceptables-deseables por 11 y 13 individuos respectivamente, lo que supone en ambos casos más del 50% de las respuestas válidas. Además, debe destacarse que a pesar de que algunos de los catadores habían calificado los vinos como indeseables, todos afirmaron que ninguno era completamente defectuoso y que los habían calificado así sólo porque manifestaban desviaciones perceptibles.

Por último, se realizó una prueba de apreciación del color a los mismos vinos antes mencionados pero, en este caso, los individuos conocían cual era el color del vino de referencia. Asimismo, todos aquellos catadores que no supieron distinguir al vino de referencia, fueron recha-

zados de la prueba (6). En la Figura siguiente se muestran las frecuencias de respuesta de cada uno de los grados de calidad en cuanto al color del vino de los 19 individuos participantes en el panel:



Como se puede apreciar, todos los catadores puntuaron como aceptable-deseable el vino tratado con cuentas de gel (C3), mientras que el tratado con levadura libre (L) sólo fue puntuado como aceptable en un 57.9%, y el resto lo consideró como indeseable. Por último, el vino almacenado sin tratar (A) fue mayoritariamente puntuado como indeseable.

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos acerca del estudio del pardeamiento de vinos blancos tipo fino en presencia y ausencia de levaduras libres e inmovilizadas durante un año de almacenamiento, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los vinos embotellados sin levadura que periódicamente fueron abiertos para la toma de muestra y almacenados en condiciones habituales durante un año, alcanzan un valor de absorbancia tal que les llevaría a ser rechazados por el consumidor, mientras que en presencia de células de levadura inmovilizadas, dicha absorbancia prácticamente no varía, por lo que las cuentas de gel se muestran eficaces para retrasar el pardeamiento del vino. Las ca-

racterísticas sensoriales de estos vinos tratados los definen como diferentes con respecto al recién embotellado en cuanto al aroma y al sabor, destacándose por un perfil sensorial algo menos equilibrado que el vino recién embotellado aunque agradable y con notas dulzonas.

16. Las células de levadura libres se muestran también eficaces para retrasar el pardeamiento del vino, aunque en menor cuantía. Su absorbancia después de un año de almacenamiento se puede equiparar con la correspondiente a un vino que ha permanecido durante el mismo tiempo herméticamente cerrado. Su análisis sensorial lo muestra distinguible de los vinos recién embotellados en cuanto al aroma y mayoritariamente aceptable en cuanto a su sabor. No obstante, los catadores más expertos lo califican con un aroma no agradable, menos intenso y con notas que recuerdan a defectos propios de vinos finos.



**ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE  
DISOLUCIONES MODELO  
DE (+)-CATEQUINA Y (-)-EPICATEQUINA  
EN PRESENCIA DE LEVADURAS.**

## INTRODUCCIÓN

En los anteriores capítulos de la presente memoria se ha puesto de manifiesto la capacidad de las levaduras para retrasar el pardeamiento de vinos finos. Como es bien sabido, el pardeamiento basado en reacciones de compuestos fenólicos es una importante alteración en alimentos de origen vegetal durante su etapa de conservación. En vinos blancos esta alteración es probablemente la principal causa de pérdidas económicas porque el consumidor rechaza esta bebida a medida que incrementa su color, y que paralelamente va alterando sus características organolépticas.

La primera causa del desarrollo de pardeamiento en el vino blanco durante su etapa de conservación se encuentra en la oxidación de compuestos fenólicos a través de la vía no enzimática. La composición de la fracción de polifenoles es importante, habiendo sido señalados los derivados del flavan-3-ol como buenos sustratos de estas reacciones no enzimáticas de pardeamiento (SIMPSON, 1982; OSZMIANSKI *et al.*, 1985; DALLAS *et al.*, 1995; FERNANDEZ-ZURBANO *et al.*, 1995).

Sin embargo en un medio ácido como el vino esta vía es lenta, si bien puede ser agilizada catalíticamente por la presencia de trazas de algunos metales (HOCKING AND INTIHAR, 1986; SPEIER, 1986; CILLIERS AND SINGLETON, 1989; OSZMIANSKI *et al.*, 1996). Particularmente, la oxidación catalítica de (+)-catequina en medio ácido, en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$ , ha sido estudiada por autores como OSZMIANSKI *et al.* (1996), poniendo de manifiesto la formación de compuestos análogos a los obtenidos por reacción enzimática además de otros no coloreados y amarillentos. Estudios posteriores de estos compuestos ponen de manifiesto que adicionalmente a la vía de oxidación mencionada anteriormente, otras reacciones paralelas pueden desarrollarse afectando a compuestos fenólicos, contribuyendo al incremento de color en la zona amarillo-parda. En este sentido, FULCRAND *et al.* (1997) señalan la formación de oligómeros no coloreados de (+)-catequina en disoluciones modelo que contienen ácido tartárico y  $\text{Fe}^{2+}$ , y que se forman como consecuencia de la oxidación del ácido tartárico a ácido glioxílico, compuesto que actúa de puente de unión entre las moléculas del flavano. La posterior deshidratación y oxidación de los dímeros no coloreados da como resultado la aparición de compuestos amarillos (ES-SAFI *et al.*, 1999a; 1999b; 2000a). Un vez formado el ácido glioxílico, su condensación con los flavanos es similar a la descrita para otros compuestos tales como el acetaldehído, con el que potencialmente competiría (FULCRAND *et al.*, 1997).

A causa de que en el vino blanco todos los compuestos mencionados están presentes, es probable que el pardeamiento sea el resultado de

las múltiples reacciones señaladas, tanto de oxidación como de condensación si bien son necesarios estudios cinéticos a fin de evaluar la contribución real de cada una de ellas. En el presente capítulo se estudia la evolución de disoluciones modelo de (+)-catequina y (-)-epicatequina en presencia de levaduras, a fin de observar posibles efectos de inhibición que estos microorganismos pueden ejercer sobre algunos mecanismos responsables del aumento de color en vinos blancos durante su etapa de almacenamiento.

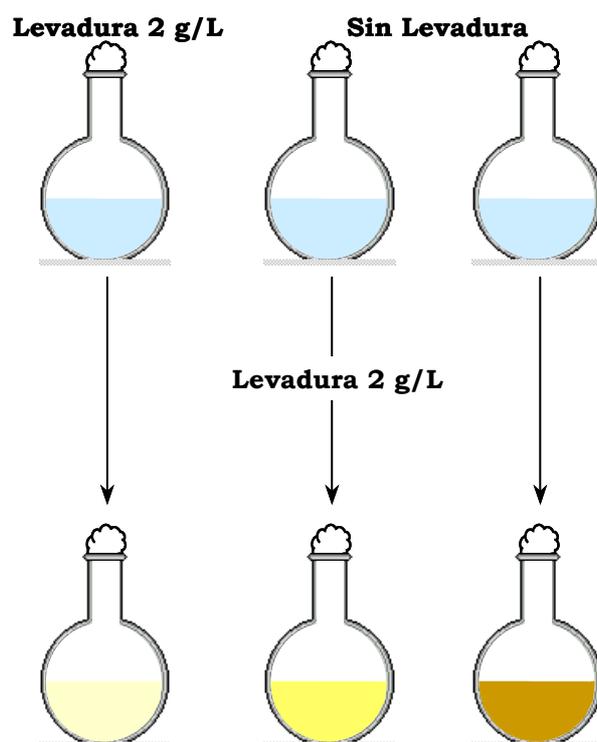
## **MATERIAL EXPERIMENTAL**

Para el desarrollo de la presente experiencia, se han utilizado dos disoluciones modelo diferentes, cada una conteniendo 500 mg/L de (+)-catequina o (-)-epicatequina (Sigma-Aldrich Chemical, SA, Madrid, España), y un 15 % de etanol imitando al vino fino anteriormente utilizado. El pH de las disoluciones fue ajustado a 3.5 con ácido tartárico, y se añadió ión ferroso, en forma de sulfato, en una concentración de 20 mg/L, como catalizador oxidativo (OSZMIANSKI *et al.*, 1996).

De cada disolución modelo se realizaron tres lotes. Al primero le fue inicialmente añadido 2 g/L de levadura de panificación, la misma que ha sido utilizada en los anteriores capítulos. Al segundo lote se le añadió la levadura después de tres semanas de incubación; mientras que al tercer lote, no se le añadió levadura en ningún momento de las ocho semanas de duración de la experiencia. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

El ensayo fue realizado en matraces redondos de fondo plano de 1 litro de capacidad, tapados con algodón hidrófobo. Solamente se llenaron hasta la mitad de su volumen, a fin de asegurar que hubiese oxígeno suficiente en el medio, tal y como se había hecho con las botellas de vino en las experiencias anteriores.

El seguimiento del proceso se llevó a cabo mediante toma de muestra de 2 mL cada semana, para su posterior análisis del color y cuantificación en HPLC.

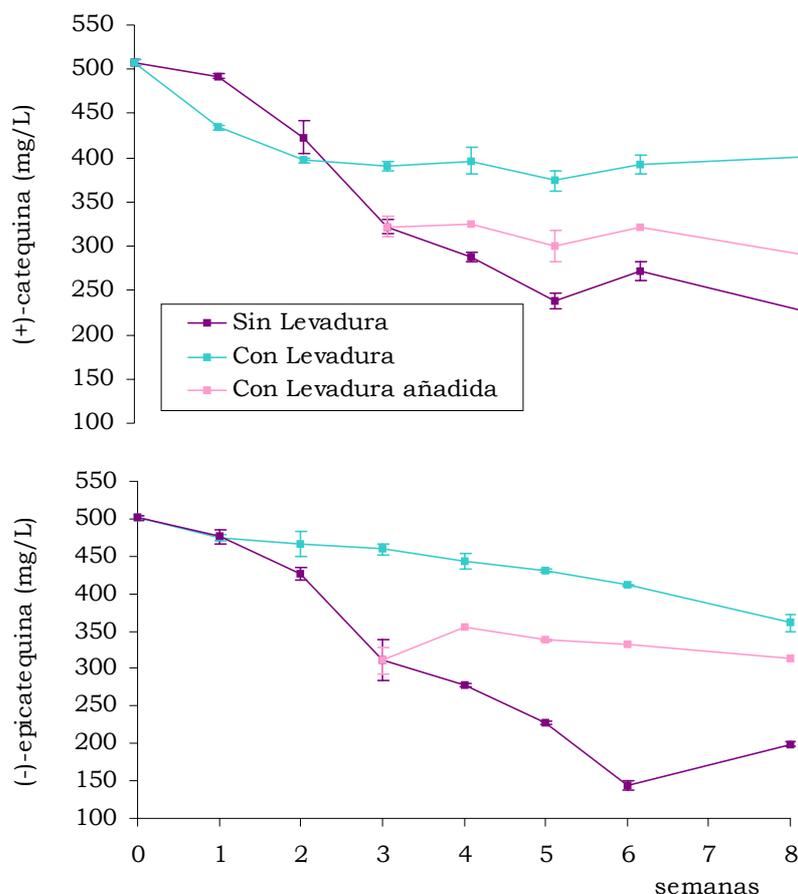


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tablas 35-43 (Anexo) se muestran todos los resultados obtenidos para los triplicados, con sus medias y desviaciones estándar de los análisis realizados en el presente capítulo a las disoluciones modelo. La Figura siguiente muestra la evolución en el tiempo de los contenidos en (+)-catequina y (-)-epicatequina, respectivamente, correspondientes a las disoluciones modelo ensayadas.

En ausencia de levadura los contenidos en ambos flavanos mostraron un fuerte descenso a lo largo del tiempo de duración de la experiencia. Los valores finales de concentración son del orden de la mitad de los iniciales para la (+)-catequina (226 mg/L), y aún incluso más bajas para la (-)-epicatequina (197 mg/L).

Por el contrario, las disoluciones de flavanos a las que inicialmente se les añadieron levaduras mostraron una mucho mayor resistencia a la degradación de estos compuestos, ya que sólo descienden las concentra-



ciones en un 19.6 y 27.8 % para la catequina y epicatequina respectivamente. Ello pone de manifiesto un efecto protector de las levaduras, que no debería, al menos en su mayor parte, atribuirse a una retención de estos fenoles, ya que de ser así sus concentraciones deberían haber descendido drásticamente inmediatamente después de la adición de levaduras, justo después de una semana.

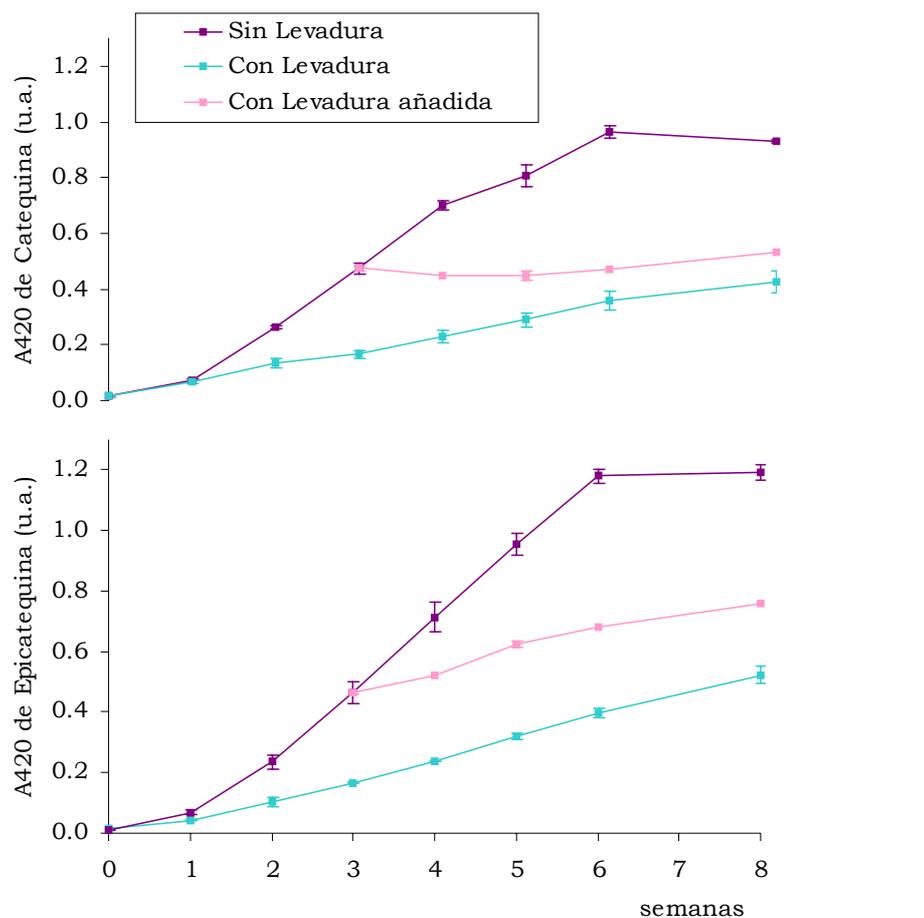
Al objeto de observar la posible relación entre productos de degradación de (+)-catequina y (-)-epicatequina y el mencionado efecto protector de las levaduras, es por lo que fue realizada la tercera experiencia en la que las levaduras fueron añadidas a las disoluciones de estos flavanos después de tres semanas de degradación. La adición de levaduras originó una disminución en la velocidad de degradación de estos compuestos, comportándose las respectivas disoluciones modelo a partir de este momento de forma similar y casi paralela a aquellas que contenían levaduras desde el inicio.

Se ha realizado un estudio estadístico para ajustar a un modelo matemático de regresión las tendencias de cada flavano, a fin de comparar entre si la evolución de (+)-catequina y (-)-epicatequina tanto en ausencia como en presencia de levadura. En la siguiente Tabla se pueden observar las ecuaciones a las que mejor se ajustan cada una de las disoluciones estudiadas:

	Muestra	Ecuación	R <sup>2</sup>
Catequina	Sin Levadura	$C = 1/0.002 + 0.34^{-3}T$	89.16
	Con Levadura	$C = 479.3 - 39.7T^2$	68.70
	Levadura Añadida	$C = 527.2 - 90.6T^2$	84.39
Epicatequina	Sin Levadura	$E = 489.0 - 46.5T$	86.53
	Con Levadura	$E = 500.9 - 15.9T$	93.44
	Levadura Añadida	$E = 510.5 - 75.2T^2$	79.31

A la vista de los resultados, la primera conclusión que se puede obtener es que ambos flavanos no se comportan de igual forma aunque son isómeros ópticos, ya que la (-)-epicatequina tiene una mayor tendencia a la degradación que la (+)-catequina. Este hecho se confirma con el dato de que, siendo la concentración inicial de ambas disoluciones la misma, al final del período de incubación, la concentración en (-)-epicatequina fue menor que en (+)-catequina.

Como se ha mencionado, la absorbancia a 420 nm se usa como medida habitual del pardeamiento en bebidas, tales como vinos, a causa de que los productos pardos procedentes de la oxidación de compuestos fenólicos muestran un máximo de absorción en esta zona de la región visible del espectro. En este sentido, debe señalarse que en las condiciones de este estudio pueden contribuir a la formación de compuestos coloreados dos vías de síntesis diferentes. Por un lado, la autooxidación de los flavanos (OSZMIANSKI *et al.*, 1996) y, por otro la formación de oligómeros de estos compuestos en presencia de productos de oxidación del ácido tartárico (FULCRAND *et al.*, 1997; ES-SAFI *et al.*, 2000a). La Figura muestra la evolución de las absorbancias a 420 nm de las diferentes disoluciones modelo de (+)-catequina y (-)-epicatequina estudiadas a lo largo del período de incubación. En ausencia de levaduras, se observaron acusados incrementos de color a esta longitud de onda para ambas disoluciones de flavanos, como resultado de la aparición de productos de degradación coloreados. Al comienzo de la experiencia, las disoluciones eran incoloras (valores de absorbancia menores de 0.020) pero al finali-



zar el período de incubación, las muestras tomaron un color pardo, lo que se tradujo en valores de A420 de 0.931 para la disolución de catequina, y 1.19 para la de epicatequina.

Sin embargo, las disoluciones que contenían levadura añadida desde el inicio de la experiencia mostraron un incremento en A420 mucho más moderado, siendo los valores finales en ambas disoluciones prácticamente la mitad que las correspondientes a las disoluciones sin levadura en ambos flavanos. Ello evidencia una concentración menor en disolución de los mencionados productos pardos en estas condiciones. Por otro lado, las disoluciones a las cuales se les añadió levadura pasadas tres semanas de incubación, presentaron un freno al aumento lineal de pendiente tan pronunciada que se observa en las disoluciones sin levadura.

Con los datos correspondientes a las absorbancias a 420 nm, se han calculado los modelos matemáticos a los que se ajusta mejor la evo-

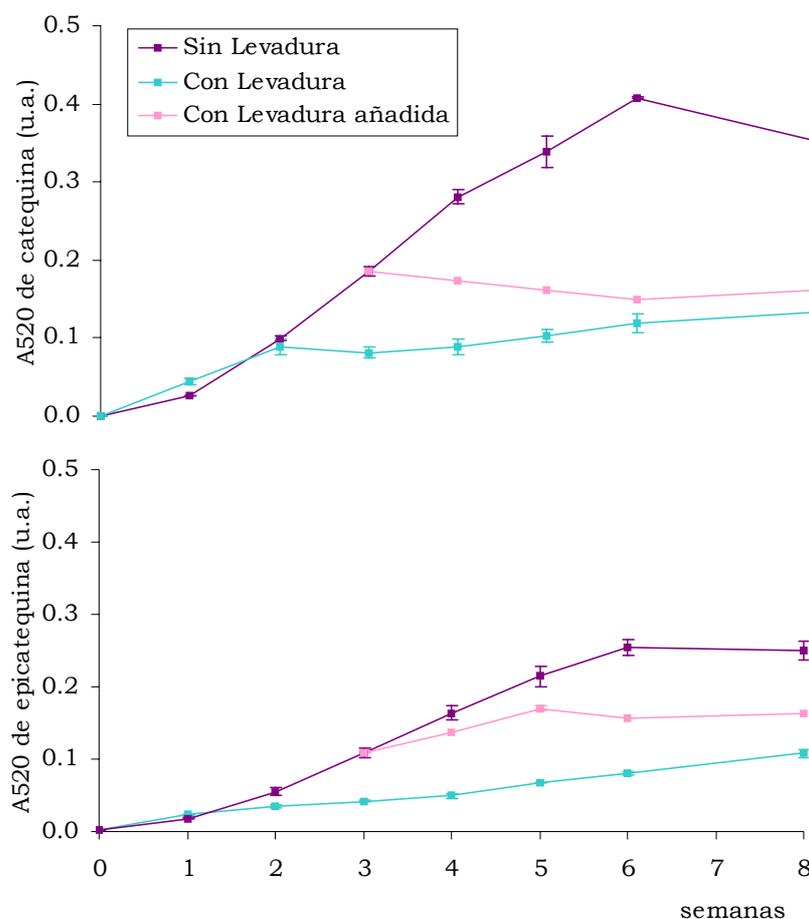
lución de este parámetro para todas las disoluciones estudiadas. En la siguiente Tabla se encuentran las ecuaciones obtenidas para esta variable, así como su coeficiente de determinación:

	Muestra	Ecuación	R <sup>2</sup>
Catequina	Sin Levadura	$A_{420} = 0.038 + 0.135T$	91.37
	Con Levadura	$A_{420} = 0.029 + 0.053T$	97.24
	Levadura Añadida	$A_{420} = 0.404 + 0.013T$	45.73
Epicatequina	Sin Levadura	$A_{420} = -0.030 + 0.174T$	94.25
	Con Levadura	$A_{420} = -0.016 + 0.067T$	98.66
	Levadura Añadida	$A_{420} = 0.050 + 0.102T$	92.35

Cabe destacar que todas las disoluciones aumentaron de forma lineal su  $A_{420}$ . Cuando a las disoluciones no se les añadió levadura, la pendiente que representa la tendencia del proceso es 2.5 veces mayor que la pendiente de las rectas correspondientes a las disoluciones con levadura añadida desde el inicio de la experiencia. Ello demuestra que las levaduras actúan sobre las disoluciones modelo de forma que impiden el aumento tan rápido de los valores de absorbancia a 420 nm, es decir, que impiden la formación de compuestos pardos, que son los que hacen aumentar el valor de este parámetro. Por otro lado, es importante señalar que las pendientes son mayores en las disoluciones de (-)-epicatequina con y sin levadura, lo que implica una formación de compuestos pardos, que absorban a esta longitud de onda, más rápida que en las disoluciones de (-)-catequina, lo que concuerda con la diferente velocidad de degradación de ambos flavanos, tal y como ya había sido observado por ES-SAFI *et al.* (1999c) también estudiando disoluciones modelo.

Asimismo, las ecuaciones también ponen de manifiesto que las levaduras provocan una inhibición en la formación de los compuestos de degradación de los flavanos, aunque ésta ya haya comenzado. Ello se puede observar ya que, aunque se añada la levadura tres semanas después de iniciado el proceso de incubación, las pendientes de las rectas también son más pequeñas que la de las rectas que representan a las disoluciones sin levadura.

La Figura siguiente muestra las absorbancias a 520 nm para las disoluciones modelo de los flavanos estudiados. Nuevamente puede apreciarse un comportamiento similar al anteriormente comentado en relación a las absorbancias a 420 nm. No obstante, en ausencia de levaduras, los compuestos formados a partir de las disoluciones de (+)-



catequina presentaron un mayor tono rojizo que los correspondientes a las disoluciones de (-)-epicatequina, ya que para una misma concentración presentan un mayor valor de absorbancia a 520, pero menor a 420 nm.

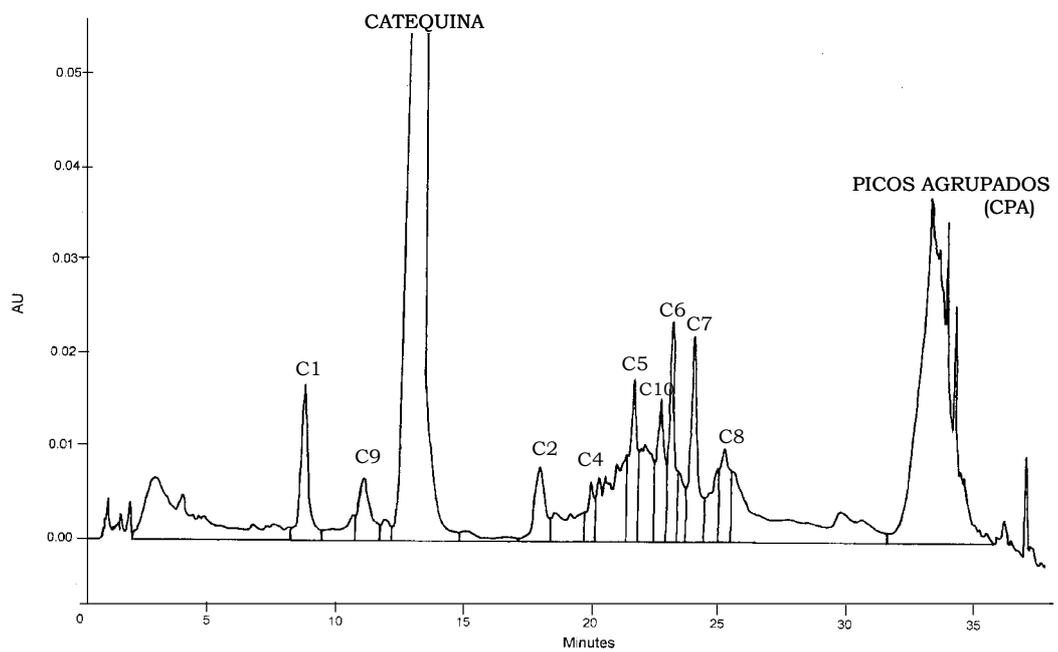
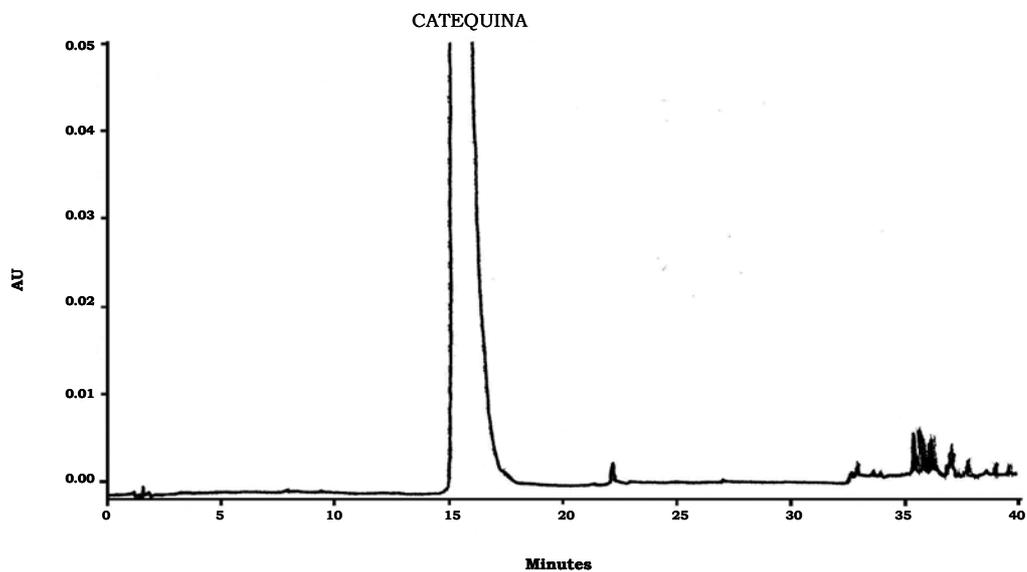
Teniendo en cuenta que los flavanos estudiados son isómeros, es decir con la misma masa molecular, las cantidades molares degradadas de (-)-epicatequina a lo largo de las experiencias sin adición de levaduras fueron superiores a las de (+)-catequina, tal y como se evidencia en la gráfica de evolución de estos compuestos. Sin embargo, puesto que se obtuvieron mayores valores de A520 para la (+)-catequina en ausencia de levaduras, es razonable pensar que los compuestos coloreados formados a partir de este flavano poseen un coeficiente de absorptividad molar mayor a esta longitud de onda que los correspondientes a la (-)-epicatequina.

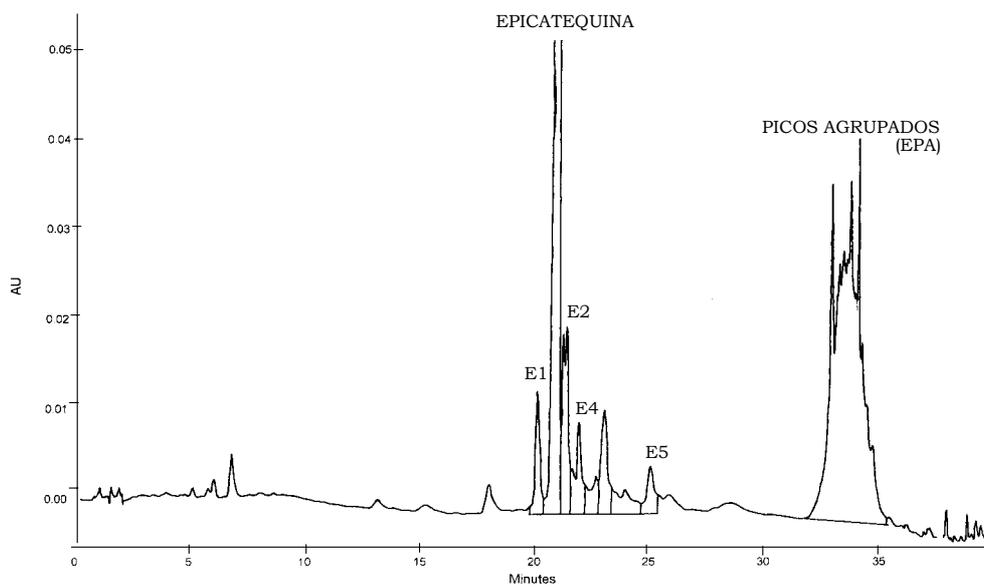
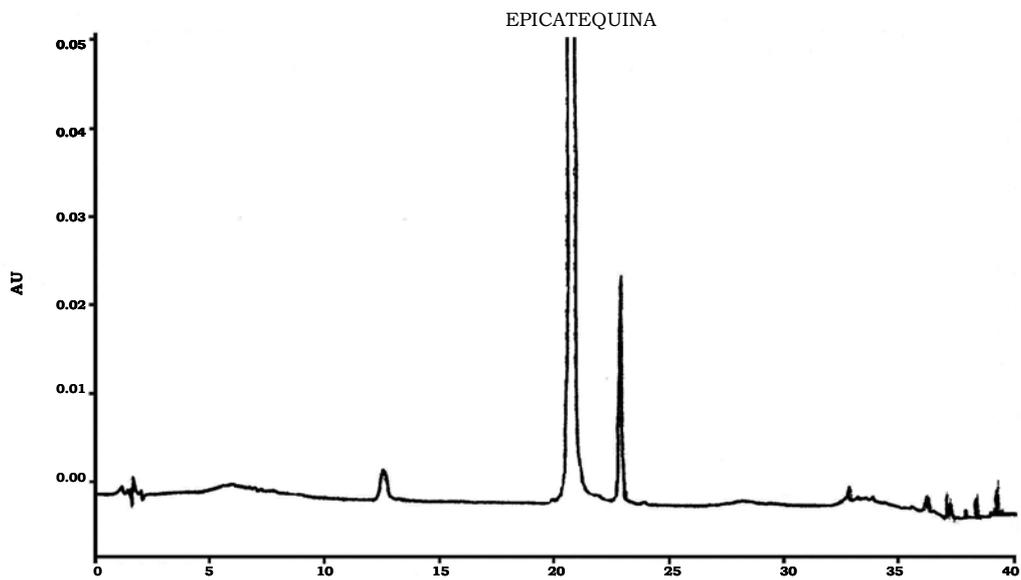
Asimismo, es importante destacar el diferente comportamiento que mostraron las disoluciones de ambos flavanos a las que se añadieron levaduras después de tres semanas. Dado que en el momento de la adición de las levaduras las disoluciones de (+)-catequina mostraban el doble de color (a 520 nm) que las correspondientes a las de (-)-epicatequina, podría haberse esperado que las absorbancias a 520 nm obtenidas a partir de este punto para la (+)-catequina fueran superiores a las correspondientes a la (-)-epicatequina, suponiendo una eficiencia igual de las levaduras para todos los tipos de compuestos coloreados formados. Sin embargo, las absorbancias de las disoluciones de (+)-catequina no aumentaron, por lo que debería admitirse una mayor eficacia de las levaduras hacia los productos de degradación formados a partir de la (+)-catequina.

Las Figuras siguientes muestran los cromatogramas registrados a 280 nm para las dos disoluciones modelo de flavanos en ausencia de levadura, antes y después de ocho semanas de estudio. Como puede observarse, en el cromatograma correspondiente a la (+)-catequina al final del estudio (Figura inferior), junto a los picos del flavano estudiado aparecen un conjunto complejo de compuestos que se formaron como resultado de la degradación del flavano.

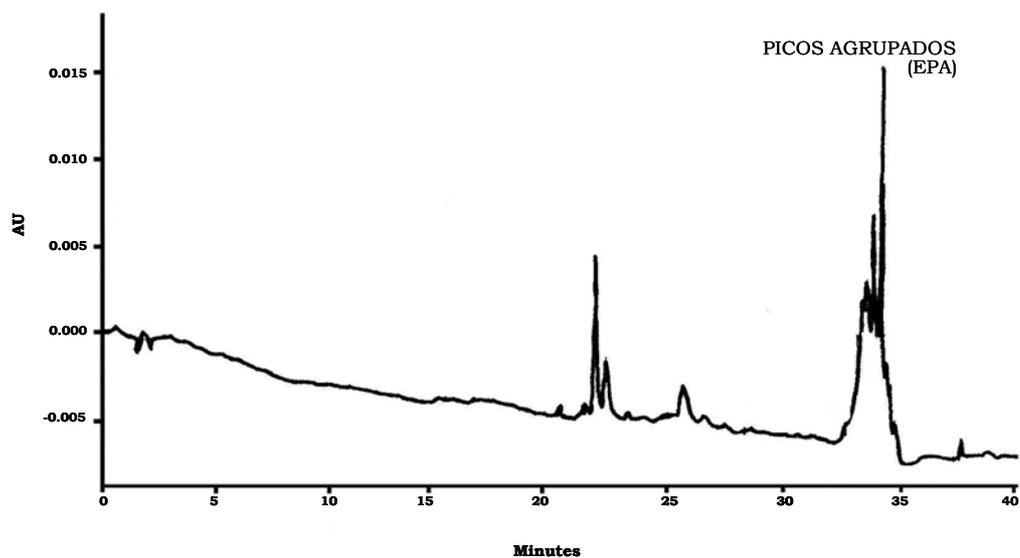
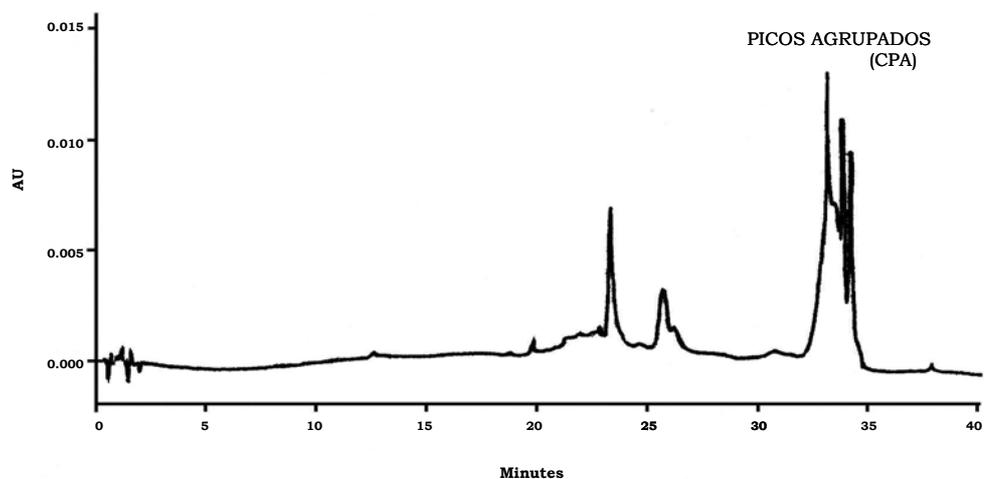
En el caso de la (-)-epicatequina, como se puede observar, los picos desconocidos que han aparecido como resultado de la degradación de este flavano son diferentes a los obtenidos para la (+)-catequina, ya que aparecen a diferente tiempo de retención. También, es destacable que, aunque en el caso de la disolución de (-)-epicatequina aparecen los denominados Picos Agrupados, la silueta de éstos es diferente a la encontrada para la disolución de (+)-catequina. Asimismo, es interesante anotar que estos Picos Agrupados aparecen al mismo tiempo de retención que los observados en el vino blanco tipo fino utilizado en los capítulos anteriores de la presente memoria.

Al objeto de determinar la contribución de los productos de degradación al color de las disoluciones, a cada uno de los picos presentes en el cromatograma le fueron realizados barridos UV-V. Los resultados mostraron que la mayoría de ellos absorben en la zona visible del espectro, si bien en su mayor parte en un orden de magnitud muy pequeño, lo que impide su cuantificación con garantía en esta región del espectro, excepto el conjunto picos solapados, eluidos entre 31 y 35 minutos y que se han considerado en conjunto.



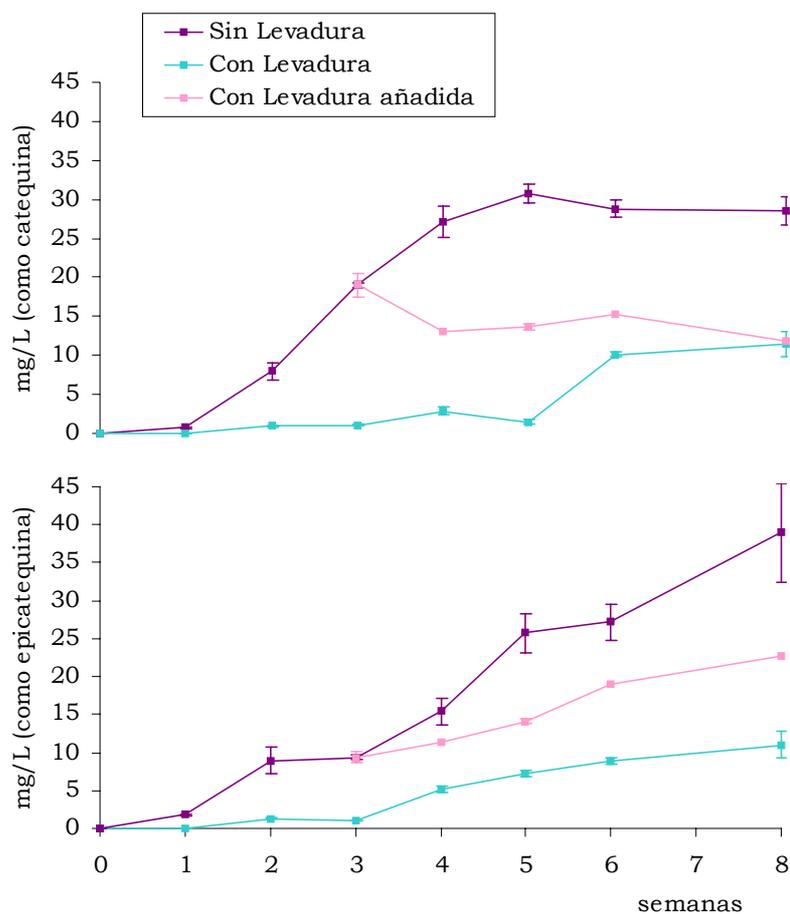


En las Figuras siguientes podemos observar los cromatogramas de los Picos Agrupados registrados a 420 nm, tanto para las disolución de (+)-catequina (Figura superior) como de (-)-epicatequina (Figura inferior). Como se puede comprobar, si bien aparecen picos de área pequeña que absorben a esta longitud de onda, la absorción más importante se produce por parte de los picos que aparecen entre los 31 y 35 minutos, como se ha comentado anteriormente. Por ello, es razonable pensar que la mayor contribución al incremento del color de las disoluciones podría ser atribuida a estos compuestos, de acuerdo con lo mostrado por FABIOS *et*



al. (2000) y BONILLA *et al.* (2001) estudiando el pardeamiento de vinos blancos. Dado que su resolución cromatográfica es pobre, y por ello difícil su cuantificación individual, deben de corresponder a estructuras de alta masa molecular y/o baja polaridad de acuerdo con lo señalado por OSZMIANSKI AND LEE (1990), GUYOT *et al.* (1995) y OSZMIANSKI *et al.* (1996) para la oxidación de flavanos por vías enzimática y no enzimática. Asimismo, no debe descartarse la contribución en esta zona del cromatograma de oligómeros amarillentos procedentes de la condensación de flavanos con ácido glioxílico antes apuntada.

Al objeto de observar la evolución de este conjunto para las distintas experiencias realizadas, fueron sumadas las áreas correspondientes a los diferentes picos solapados obtenidos entre 31 y 35 minutos de tiempo de retención y expresados en su flavano correspondiente. La Figura siguiente muestra las concentraciones de estos Picos Agrupados procedentes respectivamente de las disoluciones de (+)-catequina (CPA) y (-)-



epicatequina (EPA) a lo largo del periodo estudiado.

Los resultados muestran que en ausencia de levadura las concentraciones de CPA y EPA aumentaron progresivamente con el periodo de incubación, alcanzando valores finales de 28.5 y 39.0 mg/L para la CPA y EPA respectivamente, confirmando la contribución de estos compuestos al aumento de color de las disoluciones antes mencionado.

Las disoluciones que contenían inicialmente levaduras, mostraron únicamente unos moderados incrementos de CPA y EPA, con una tendencia similar a la observada para las absorbancias a 420 y 520 nm. Por otro lado, las experiencias en las que se añadieron levaduras después de la tercera semana revelaron nuevamente un comportamiento diferente para los dos flavanos ensayados. En tanto que para las disoluciones de (-)-epicatequina se observaron moderados crecimientos de EPA con similar tendencia a los de las disoluciones que inicialmente contenían levaduras, en las correspondientes disoluciones de (+)-catequina se observaron descensos en los CPA. El hecho de que estos descensos sean particularmente acusados entre la tercera y cuarta semana sugieren, además de una inhibición al pardeamiento, una retención por las levaduras de polímeros pardos ya formados. De hecho, han sido descritas este tipo de retenciones por parte de las liás de levaduras para ácidos grasos de cadena media (RIBEREAU-GAYON, 1985), antocianos (BOURZEIX AND HEREDIA, 1986; AUGUSTIN, 1986; CUINIER, 1988) y productos pardos del pardeamiento (BONILLA *et al.*, 2001).

En conjunto, las experiencias realizadas adicionando levadura a soluciones hidroalcohólicas modelo de (+)-catequina y (-)-epicatequina, en presencia de ácido tartárico y  $Fe^{+2}$ , mostraron una parcial inhibición en la degradación de estos flavanos con formación mucho más lenta de compuestos pardos. En términos de control del color de las disoluciones, la presencia de levaduras mostró una mayor eficacia hacia los compuestos de degradación de la (+)-catequina, particularmente afectando a aquellos que absorben a 520 nm. Estos resultados pueden contribuir a explicar la resistencia al incremento de color de algunos vinos sometidos a procesos de envejecimiento biológico mediante levaduras de velo (vinos tipo sherry).

En este sentido, debe señalarse que tradicionalmente se ha atribuido la resistencia al pardeamiento de estos vinos durante su envejecimiento a un efecto protector frente al oxígeno atmosférico ejercidos por las levaduras de velo creciendo en la superficie del vino. Sin embargo, la presente experiencia muestra una inhibición en el mecanismo de degradación de los flavanos estudiados, bien en su ruta de oxidación catalítica, bien en la correspondiente a condensación con compuestos de oxidación

del ácido tartárico. Esta inhibición no excluye el anteriormente mencionado efecto protector, por lo que durante el envejecimiento biológico del vino fino es razonable pensar que puedan superponerse, protegiendo ambos el color de estos vinos. Por otro lado, este mecanismo de inhibición no debería ser atribuido a vías metabólicas desarrolladas por las levaduras, puesto que las usadas no crecieron como consecuencia de que la disolución modelo no poseía ningún componente propio de un medio de cultivo, además de un alto porcentaje de etanol. Ello sugiere que este efecto de inhibición sea debido a algunos compuestos o fracciones excretados por las células de levadura en condiciones incipientes de lisis. Estos compuestos podrían bloquear el efecto catalítico de  $\text{Fe}^{+2}$ , con lo que la velocidad de pardeamiento sería más lenta. También ayuda a explicar este efecto una hipótesis de competencia levaduras-fenoles en el consumo de oxígeno disuelto (SALMON *et al.*, 2000).

Ciertamente, las concentraciones de (+)-catequina y (-)-epicatequina usadas en este trabajo fueron muy superiores a la que habitualmente se encuentran en el vino, a fin de poder observar mejor los cambios producidos durante su degradación. Por ello, a las concentraciones normales en flavanos de los vinos, debe esperarse una mayor eficacia de las levaduras, explicando de esta forma, al menos parcialmente, gran parte de los resultados obtenidos en los distintos capítulos de este trabajo, así como el mantenimiento del pálido color de los finos durante años de crianza bajo levadura de velo.

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el estudio de la evolución de disoluciones hidroalcohólicas modelo de (+)-catequina y (-)-epicatequina, catalizadas por iones  $\text{Fe}^{2+}$  en presencia y ausencia de levadura, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

17. La presencia de levadura provoca una parcial inhibición de los mecanismos de degradación de los flavanos estudiados. Esta interacción se origina desde el momento de su adición, manteniendo o disminuyendo ligeramente las concentraciones existentes en ese punto frente a los descensos más acusados observados en ausencia de levadura.
18. Los compuestos coloreados formados a partir de la degradación de (+)-catequina presentaron en ausencia de levadura un mayor tono rojizo y una menor absorbancia a 420 nm que los correspondientes a su flavano isómero.

19. La (-)-epicatequina muestra una mayor velocidad de degradación que la (+)-catequina, lo que se traduce en un tono pardo más acusado de las disoluciones de aquella para un mismo tiempo de incubación. Por otro lado, en términos de A<sub>420</sub>, para las disoluciones de ambos flavanos, las levaduras mostraron una eficacia similar en el control de la formación de compuestos pardos que absorben a esta longitud de onda. Sin embargo, el control en la formación de compuestos de tono rojizo, medido a 520 nm fue mayor para las disoluciones de (+)-catequina.



# **RESUME**

Les vins *finos* sont typiques de l'A.O. (l'appellation d'origine) Montilla-Morilles et Jerez-Xerez-Sherry, et sont obtenus à travers des années de procès de vieillissement biologique. Traditionnellement, on a attribué la faible brunissement que subit les vins durant le vieillissement à l'effet protecteur de la voile de levure, qui se forme à la surface, par rapport au contact avec l'oxygène atmosphérique. D'autre part, on a pu constater récemment la capacité de ces levures de fixer les composés qui proviennent du brunissement, contrôlant de cette façon l'augmentation de la concentration de ceux-ci ainsi que l'évolution négative de la couleur. Pour cette raison, le premier objectif de la présente mémoire a été l'étude de l'évolution de la couleur et des composés phénoliques des vins *finos* durant le vieillissement biologique. Tout en gardant constants quelques-uns des facteurs qui interviennent dans ce type de vieillissement, à fin de pouvoir attribuer les changements observés à un numéro minimum de causes. À cet effet, les essais s'effectuent à l'aide d'un contrôle de température dans des récipients en verre, et avec l'inoculation de culture purs de levure de voile.

En absence de levure de voile, on a pu observer une augmentation considérable de l'absorption à 420 et à 520 nm, conséquence du brunissement progressif que le vin est entrain d'acquérir. Cependant, en présence de levure, ces absorptions n'ont pratiquement pas subit de variation pendant les 18 mois d'étude, ce qui explique l'effet protecteur de celles-ci sur le vin. Le contenu en acides gallique, caféique, férulique, *t*-caftarique ainsi qu'en tyrosol a augmenté durant le procès de vieillissement biologique. Par contre, en absence de levure il n'a subit presque pas de variation. Le reste des acides phénoliques et d'esthers des acides hydroxycinnamiques n'a subit pratiquement pas de changement dans les deux cas, avec ou sans levure. Les contenus en monomères dérivés du flavane-3-ol, [+]-catéchine et [-]-épicatéchine ont augmenté dans une majeur proportion durant le vieillissement biologique par rapport au cas où il y avait absence de levure. Par contre, les procyanidines ont conservé toujours des concentrations inférieures dans les vins contenant le voile de *flor*. En dernier lieu, et à propos de ce qu'on appelle *Picos Agrupados* [produits de dégradation colorés élués en CLHP à des hautes  $t_R$ ], on a pu constater une augmentation considérable de leurs concentrations dans les vins sans levure, pareil à celle qu'a subit l'absorption à 420 nm. Cependant, en présence de levure, la formation de ces composés est ou bien trop inhibée, ou bien le même voile qui croît à la surface du vin fixe les composés après leur formation.

En vues des résultats antérieurs, on a proposé comme un second objectif la possibilité d'utiliser les levures de panification comme agents qui préviennent le brunissement des vins blancs *finos*, pour ainsi pouvoir diminuer la vitesse de ce procès et, par conséquent, prolonger la durée de

stockage et/ou de consommation des vins. À cet effet, on a effectué une étude du brunissement accélérée, en présence et en absence de levures de panification, par un suivie de l'évolution de la couleur et celle des composés phénoliques.

La présence de cellules libres de levure retarde l'effet du brunissement du vin, à cause du freinage que subit la vitesse d'augmentation de la couleur. Ainsi le temps de stockage par rapport à celui des vins sans levure peut être supérieur. En plus, la vitesse d'augmentation de l'absorption à 420 nm est très petite durant les étapes initiales, ce qui permet de maintenir pendant les premiers jours la couleur inchangée. En ce qui concerne aux doses de levure utilisées dans cette étude, la concentration la plus grande (2 g/L) montre une plus haute efficacité, puisqu'elle a permis de conserver le vin stocké pendant un temps supérieur en dessous de la valeur fixée comme limite d'absorption à 420 nm [0.180 u.a.]. Cependant, il n'y a aucune évidence d'exister une fonction linéaire entre retard de brunissement et doses de levure utilisée. C'est ce qu'on peut déduire au moins des résultats presque similaires obtenus entre les concentrations 1.0 et 1.5 g/L. En ce qui concerne les acides phénoliques, la présence de levure n'apporte pas de changement important dans la composition du vin, tandis que, tant en présence comme en absence de levure, ces composés ont tendance à augmenter leurs concentrations avec le temps de stockage. Par contre, les contenus en tyrosol diminuent pendant la durée de l'essai, en présence ou en absence de levure. Les concentrations en monomères de flavane-3-ol et en procyanidine B3 ont augmenté pendant le stockage du vin, en absence et en présence de levure, probablement dû à l'hydrolyse des autres flavanols oligomères, excepté la [+]-catéchine dont la concentration diminue en absence de levure. Durant tout l'étude, la concentration de *Picos Agrupados* et d'autres pics non connus est inférieure en présence de levure. Ceci nous mène à penser que les levures fixent ces composés bruns où, qu'en quelque sorte interviennent dans le procès de brunissement du vin en provoquant une inhibition dans sa formation, sinon de tous les composés du moins d'une partie.

Néanmoins, la capacité des levures de panification de retarder le brunissement des vins blancs, présente l'inconvénient de provoquer une turbidité non désirée. Par conséquent, cette technique ne serait applicable que pour la conservation du vin dans la cave où un traitement d'ultrafiltration lui rend la transparence nécessaire. À fin d'éviter cet inconvénient, on a pensé à la possibilité d'utiliser les cellules de levure immobilisées dans un gel de  $\kappa$ -carragen comme agent qui prévient le brunissement de ces vins.

Les résultats obtenus nous permettent de conclure que ces cellules de levure immobilisées sont efficaces pour retarder la brunissement accélérée du vin, donnant un résultat meilleur les grains de gel de grande épaisseur [3 mm]. Cet effet est probablement dû à des facteurs tels que la porosité de la structure du gel, et à la moindre tendance de ces grains à se tasser dans ce cas. Les deux phénomènes ensemble permettent un contact majeur vin-levure. De même que dans le cas des cellules libres, en présence de cellules immobilisées la vitesse de brunissement du vin évolue d'une façon exponentielle, ce qui permet maintenir la couleur pendant les premiers stades du stockage. Lorsque tous les vins ont atteint le même niveau de brunissement [A420 de 0.185 u.a], on a observé une augmentation du contenu des polyphénols total existant dans le vin [A280] à conséquence de la présence de levure immobilisée et/ou d'un temps supérieur de stockage. D'autre part, les valeurs enregistrées d'absorption à 520 nm sont inférieures dans ce cas, ce qui pourraient être attribué à une formation de produits différents en présence de levure. Les contenus en acides gallique, syringique, *p*-coumarique et en esters des acides hydroxycinnamiques ne subissent pas de variation significative sous aucunes des conditions de stockage. Le reste des acides phénoliques, et surtout l'acide protocatéchique, ont tendance à augmenter, tant en présence qu'en absence de levure. Cette augmentation est de plus en plus grande avec le prolongement du temps d'essai. Cependant, les contenus en tyrosol diminuent dans les deux cas, sans variations significatives en fonction de l'épaisseur de grains de gel. En absence de levure les concentrations de [-]-épicatéchine et de procyanidine B4 restent presque inchangées, par contre celles de B2 et B3 augmentent légèrement. Contrairement aux résultats obtenus en présence des cellules libres, les levures immobilisées provoquent la diminution des contenus en [-]-épicatéchine et en procyanidine B3 par rapport au vin initial. Ceci suppose que l'interaction de la levure avec les polyphénols du vin n'est pas exactement la même lorsqu'elle est occlue dans des filets du polysaccharide. De même qu'en présence des levures libres, la concentration de *Picos Agrupados* et d'autres pics non connus, est inférieure en présence de cellules immobilisées qu'en absence de celles-ci, pendant le temps de stockage. Ceci montre encore une fois la capacité d'interaction des levures avec le procès de brunissement, provoquant ainsi le retard du même.

Comme on a signalé, les études réalisées sur le brunissement des vins en absence et en présence de levure, libre ou immobilisée, a été effectués par une accélération du procès de brunissement à l'aide d'une augmentation de température. Ce qui fait, qu'on ne peut aboutir à des conclusions sur le prolongement de la durée de stockage dans les conditions réelles du marché, ni en ce qui concerne les variations des caractéristiques organoleptiques du vin à conséquence de la présence des cellules de levure pendant des durées plus prolongées. Pour cette raison, une

nouvelle expérience on a réalisé avec le stockage du vin à température ambiante [18-20°C] dans le but de vérifier s'il est possible de prolonger la durée de vie du produit sans modifier les caractéristiques organoléptiques. En plus, il était nécessaire de vérifier la stabilité des grains de gel lorsqu'ils sont stockés en contact avec le vin pendant un temps considérable. C'est pourquoi l'objectif suivant a été d'étudier l'efficacité des cellules de levure, libres ou immobilisées, en ce qui concerne leur capacité de retarder le brunissement pendant un an dans des conditions semblables à celles qu'on utilise habituellement pour conserver le vin.

À partir des résultats obtenus on peut conclure que les vins embouteillés sans levure, ouverts régulièrement pour extraire les échantillons, atteignent une valeur d'absorption telle, que les consommateurs refusent de les prendre. Par contre, en présence de cellules de levure immobilisées, ces absorptions ne change pratiquement pas, ce qui signifie que les grains de gel sont très utiles pour retarder le brunissement. Cependant, les vins traités possèdent des caractéristiques sensorielles d'arôme et de saveur différente par rapport aux vins du même genre mais qui ont récemment été embouteillés, marquant ainsi un profil sensoriel un peu moins équilibré, même si agréable et avec des traces de saveur douceâtre. De même, les cellules de levure libres sont aussi efficaces pour retarder le brunissement du vin, mais dans une moindre mesure. L'absorbance après un an de stockage peut être comparée à celle du vin qui a été conservé hermétiquement fermé pendant le même temps. L'analyse sensoriel du vin qui a été conservé avec des levures libres montre aussi un arôme différent par rapport aux vins qui ont été récemment embouteillés, et une saveur acceptable par une grande majorité des dégustateurs. Cependant, les plus experts le qualifient comme ayant un arôme non agréable, moins intense et avec des notes qui ressemblent aux défauts propres des vins *finos*.

Une fois connue la capacité des levures de retarder le brunissement des vins *finos*, et sachant que ce processus résulte de plusieurs réactions d'oxydation chimique et/ou de condensation dans lesquelles, directe ou indirectement, participent des composés phénoliques surtout les flavanols, nous nous sommes proposés comme dernier objectif d'étudier les possibles effets d'inhibition des cellules des levures sur quelques de ces mécanismes. À cet effet, on a observé l'évolution des dissolutions modèle hydroalcooliques de [+] -catéchine et de [-] -épicatéchine en présence d'acide tartrique et en utilisant comme catalyseur  $Fe^{2+}$ .

Les résultats montrent que la présence de levure provoque une inhibition partielle des mécanismes de dégradation des flavanols étudiés. Cette interaction se déclenche dès l'addition de la levure, en maintenant ou en diminuant légèrement les concentrations présents dans ce point

par rapport au plus grande diminution observé en absence de levure. Les composés colorés obtenus à partir de la dégradation de la [+]-catéchine ont présenté en absence de levure une coloration rougeâtre plus intense et une absorbance à 420 nm inférieure à celles obtenues pour son flavanol isomère. D'autre part, la [-]-épicatéchine montre une vitesse de dégradation plus grande que celle de la [+]-catéchine, ceci se traduit par une couleur brune plus intense des dissolutions du premier flavanol par rapport au deuxième, à une même durée d'incubation. D'autre part, en termes de A420, pour les deux dissolutions de flavanols, les levures ont montré la même efficacité lors du contrôle de la formation des composés bruns qui absorbent à cette longueur d'onde. Cependant, le contrôle sûr la formation des composés de teinte rougeâtre, mesurés à 520 nm, a été plus grand pour les dissolutions de [+]-catéchine. En résumé, ces essais démontrent que les cellules de levures ont une capacité d'inhiber le mécanisme de dégradation des flavanols, soit de leur procès d'oxydation catalytique ou soit lors de la condensation effectuée en présence des composés d'oxydation de l'acide tartrique. Cette action des levures ne devrait pas être attribuée aux procès métaboliques, puisqu'elles ont été utilisées mortes, mais à l'action de quelques composés ou fractions excrétés par elles et qui pourraient inhiber l'effet catalyseur de Fe<sup>2+</sup>, ce qui expliquerait la diminution en la vitesse de brunissement, et/ou la concurrence avec des phénols dans la consommation de l'oxygène dissous.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- ALONSO, E.; ESTRELLA, M.I.; HERNANDEZ, M.T. AND REVILLA, E. **1988**. Análisis cuantitativo de diversos compuestos fenólicos de bajo peso molecular en vinos de las denominaciones de origen Rioja, Valdepeñas y La Mancha. *Anal. Bromatol.*, 40 (1): 29-40.
- ANTON, R. **1988**. Flavonoids and tradicional medicine. In: Cody, V.; Middleton, E.; Harborne, J. R.; Berez, A. *Progress in Clinical and Biological Research. Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*. Alan. R. Liss, Inc, New York, 423-439.
- ANTON, R. AND BEREZ, A. **1990**. *Bull Acad. Natl. Méd*, 174: 709-711.
- AUGUSTIN, M.M. **1986**. Étude de l'influence de certains facteurs sur les composés phénoliques du raisin et du vin. *Thèse Doc. Université Bordeaux*.
- BAKKER, J.; PICINELLI, A. AND BRIDLE, P. **1993**. Model wine solutions: Colour and composition changes during ageing. *Vitis*, 32: 111-118.
- BAKKER, J. AND TIMBERLAKE, C.F. **1997**. Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1): 35-43.
- BARON, R. **1997**. Evolución de polifenoles durante la crianza, clarificación postfermentativa y almacenamiento en botella de vinos finos. *Tesis Doctoral Univ. Cordoba*.
- BARON, R.; MAYEN, M.; MERIDA, J. AND MEDINA, M. **1997**. Changes in phenolic compounds and browning during biological aging of sherry wine. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (2): 1682-1685.
- BARON, R.; MAYEN, M.; MERIDA, J. AND MEDINA, M. **2000**. Comparative study of browning and flavan-3-ols during the storage of sherry wines treated with different fining agents. *J. Sci. Food Agric.*, 80 (2): 226-230.
- BONILLA, F.; MAYEN, M; MERIDA, J. AND MEDINA M. **2001**. Yeast used as fining treatment to correct browning in white wines. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (4): 1928-1933.
- BONILLA, F. **2002**. Corrección de pardeamiento en vinos blancos mediante el uso de levaduras. *Tesis Doctoral Univ. Cordoba*.
- BOULTON, R.B.; SINGLETON, V.L.; BISSON, L.F. AND KUNKEE, R.E. **1996**. The maturation and ageing of wines. *Principles and practices of winemaking*. New York: Chapman & Hall. pp. 382-426.

- BOURZEIX, M.; WEYLAND, D. AND HEREDIA, N. **1986**. Etude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bulletin de L'O.I.V.*, 669: 1173-1253.
- BOURZEIX, M. AND HEREDIA, N. **1986**. Étude des colorants anthocyaniques fixés par les levures de vinification. *C.R. Acad. Agric.*, 1976, 750-753.
- BROSSAUD, F.; CHEYNIER, V. AND NOBLE, A.C. **2001**. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian J. Grape Wine Research*, 7: 33-39.
- BRUN, S. **1995**. Les propriétés biologiques des constituants non alcooliques du vin. *Cah. Nutr. Diét.*, 30: 224-229.
- CACHO, J.; CASTELLS, J.E. ESTEBAN, A.; LAGUNA, B. AND SAGRISTÁ, N. **1995**. Iron, copper, and manganese influence on wine oxidation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46 (3): 380-384.
- CASAS LUCAS, J. **1985**. Descripción resumida de la técnica enológica de los vinos de Jerez. *III Jorn. Univ. Jerez*.
- CHEYNIER, V.; TROUSDALE, E.K.; SINGLETON, V.L.; SALGUES, M.J. AND WYLDE, R. **1986**. Characterization of 2-S-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J. Agric. Food Chem.*, 34: 217-221.
- CHEYNIER, V. AND VAN HULST, M.W.J. **1988**. Oxidation of trans-caftaric acid and 2-S-glutathionylcaftaric acid in model solutions. *J. Agric. Food Chem.*, 36: 10-15.
- CHEYNIER, V.; OSSE, C. AND RIGAUD, J. **1988**. Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *J. Food Sci.*, 53: 1729-1732.
- CHEYNIER, V.; BASIRE, N. AND RIGAUD, J. **1989**. Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 37: 1069-71.
- CHEYNIER, V.; RIGAUD, J. SOUQUET, J.M. ; DUPRAT, F. AND MOUTOUNET, M. **1990**. Must browning in relation to the behavior of phenolic compounds during oxidation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41: 346-349.
- CHEYNIER, V. AND RICARDO DA SILVA, M. **1991**. Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyltartaric acid and polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 39: 1047-49.

- CHEYNIER, V.; FULCRAND, H.; GUYOT, S.; OSZMIANSKI, J. AND MOUTOUNET, M. **1995**. In: Enzymatic browning and its prevention. Eds. C.Y. Lee and J.R. Whitaker. *ACS Symposium Series 600*: 130-143.
- CILLIERS, J.J.L. AND SINGLETON, V.L. **1989**. Nonenzymic autoxidative phenolic browning. Reactions in a caffeic acids model system. *J. Agric. Food Chem.*, 37: 890-896.
- CILLIERS, J.J.L. AND SINGLETON, V.L. **1991**. Characterization of the products of non-enzymic autoxidative phenolic reactions in a caffeic acids model system. *J. Agric. Food Chem.*, 39: 1298-1303.
- CIOLINO, H.P.; DASHNER, P. J. AND YEH, G. C. **1998**. Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 *in vitro* by preventing activation of the aryl hydrocarbon effector. *Cancer Res.*, 58: 5707-5712.
- CORTES, M.B.; MORENO, J.J.; ZEA, L.; MOYANO, L. AND MEDINA, M. **1998**. Changes in aroma compounds of sherry wines during their biological aging carried out by *Saccharomyces cerevisiae* races *bayanus* and *capensis*. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (6): 2389-2394.
- CORTES, M.B.; MORENO, J.J.; ZEA, L.; MOYANO, L. AND MEDINA, M. **1999**. Response of the aroma fraction in Sherry wines subjected to accelerated biological aging. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (8): 3297-3302.
- CRAPISI, A.; NUTI, M.P.; ZAMORANI, A. AND SPETTOLI, P. **1987**. *Am. J. Enol. Vitic.* 38: 310.
- CROWELL, E.A. AND OUGH, C.S. **1979**. A modified procedure for alcohol determination by dicromate oxidation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 30: 61-63.
- CUINIER, C. **1988**. Influence of yeasts on the phenolic compounds of wine. *Bull. O.I.V.*, 61: 596-601.
- DALLAS, C.; RICARDO-DA-SILVA, J.M. AND LAUREANO, O. **1995**. Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation. *Vitis*, 34 (1):51-56.
- DE RIJKE, Y.B.; DEMACKER, P.N.; ASSEN, N.A; SLOOTS, L.M.; KATAN, M.B. AND STALENHOF, A.F. **1996**. Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoprotein volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63: 329-334.
- DOMECQ, P. **1989**. Sherry: state of art on a very special fermentation product. *Proc. Int. Symp. Yeasts (Issy XIII)*, pp.15-35, Belgium.

- DUBOURDIEU, D. **1995**. Intérêts oenologiques et risques associés à l'élevage des vins blancs sur lies en barriques. *Rev. Fr. OEnol.*, 155: 30-35.
- DUCIMETIERE, P. **1995**. Le paradoxe français: mythe ou réalité?. *Cah. Nutr. Diét.*, 30: 78-81.
- ELATTAR, T.M. AND VIRJI, A.S. **1999**. Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation. *Anticancer Drugs*, 10: 187-193.
- ESCRIBANO-BAILON, M.T.; DANGLES, O. AND BROUILLARD, R. **1996**. Coupling reactions between flavylum ions and catechin. *Phytochem.*, 41: 1583.
- ES-SAFI, N.D.; FULCRAND, H.; CHEYNIER, V. AND MOUTOUNET, M. **1999a**. Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde induced polymerization of flavanols. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (5): 2088-2095.
- ES-SAFI, N.E.; FULCRAND, H.; CHEYNIER, V. AND MOUTOUNET, M. **1999b**. Studies on the acetaldehyde-induced condensation of (-) epicatechin and malvidin 3-O-glucoside in a model solution system. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (5): 2096-2102.
- ES-SAFI, N. E.; GUERNEVE, C.; FULCRAND, H.; CHEYNIER, V. AND MOUTOUNET, M. **1999c**. New polyphenolic compounds with xanthylium skeletons formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 5211-5217.
- ES-SAFI, N. E.; GUERNEVE, C.; LABARBE, B.; FULCRAND, H.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. **1999d**. Structure of a new xanthylium derivative. *Tetrahedron Lett.*, 40, 5869-5872.
- ES-SAFI, N.E.; GUERNEVE, C.; CHEYNIER, V. AND MOUTOUNET, M. **2000a**. New phenolic compounds formed by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic solution and their implication in color changes of grape-derived foods. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (9): 4233-4240.
- ES-SAFI, N.E.; LE GUERNEVE, C.; FULCRAND, H.; CHEYNIER, V. AND MOUTOUNET, M. **2000b**. Xanthylium salts formation involved in wine colour changes. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 35: 63-74.
- ES-SAFI, N.E.; CHEYNIER, V. AND MOUTOUNET, M. **2000c**. Study of the reactions between (+)-catechin and furfural derivatives in the presence or absence of anthocyanins and their implication in food color change. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (12): 5946-5954.

FABIOS, M.; LOPEZ-TOLEDANO, A.; MAYEN, M.; MERIDA, J AND MEDINA, M. **2000**. Phenolic compounds and browning in Sherry wines subjected to oxidative and biological ageing. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (6): 2155-2159.

FERNANDEZ-ZURBANO, P.; FERREIRA, V.; PEÑA, C.; ESCUDERO, A.; SERRANO, F. AND CACHO, J. **1995**. Prediction of oxidative browning in white wines as a function of their chemical composition. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 2813-2817.

FORNAIRON-BONNEFOND, C.; CAMARASA, C.; MOUTOUNET, M. AND SALMON, J.M. **2001**. État des connaissances scientifiques actuelles sur le phénomène d'autolyse des levures et l'élevage des vins sur lies. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 35 (2): 57-78.

FUHRMANN B.; LAVY, A. AND AVIRAM M. **1995**. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clinical Nutrition*, 61: 549-554.

FULCRAND, H.; CHEMINAT, A.; BROUILLARD, R. AND CHEYNIER, V. **1994**. Characterization of compounds obtained by chemical oxidation of caffeic acid in acidic conditions. *Phytochemistry*, 35 (2): 499-505.

FULCRAND, H.; DOCO, T.; ES-SAFI, N; CHEYNIER, V. AND MOUTONET, M. **1996**. Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography- ion spray mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 752: 85-91.

FULCRAND, H.; CHEYNIER, V.; OSZMIANSKI, J. AND MOUTOUNET, M. **1997**. An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytochemistry*, 46 (2): 223-227.

GABOR, M. **1988**. Szent-Gyorgyi and the bioflavonoids: new results and perspectives of pharmacological research into benzopyrene derivatives. In: Cody, V.; Middlenton, E.; Harborne, J. R.; Berez, A. *Progress in Clinical and Biological Research. Plant flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*. Alan. R. Liss, Inc, New York, 1-15.

GARCÍA-BARROSO, C.G.; CELA, R.T. AND PEREZ-BUSTAMANTE, J.A. **1986**. Evolution of phenolic acids and aldehydes during the different production process of "Fino" Sherry wine. *Z. Lebensm Unters Forsch.*, 182: 413-418.

GARCÍA-BARROSO, C.G.; CELA, R.T. AND PEREZ-BUSTAMANTE, J.A. **1987**. *Z. Lebensm Unters Forsch.*, 185, 307.

GARCÍA-BARROSO, C.G.; GALVEZ, M.C.; MORENO M.V.G. AND PEREZ-BUSTAMANTE, J.A. **1994**. *Bull. L. Group Polyphenol*.

GARCIA GARCÍA, I.; MARTÍN MARTÍN, A.; ORTEGA RUIZ, J.M. AND CHICA PÉREZ, A. **1989**. Kinetic study of the production of ethanol with *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on Berl Saddles. *The Chem. Engineering J.*, 42: (B1-B7).

GARCIA-VIGUERA, C.; BRIDLE, P. AND BAKKER, J. **1994**. The effect of pH on the formation of coloured compounds in model solutions containing anthocyanins, catechin and acetaldehyde. *Vitis*, 33: 37-40.

GOODENOUGH, P.W.; KESSEL, S.; LEA, A.G.H. AND LOEFFLER, T. **1983**. Mono- and diphenolase activity from fruit of *Malus pumila*. *Phytochemistry*, 22: 359-363.

GORINSTEIN, S.; GOLDBLUM, A.; KITOV, S.; DEUTSCH, J.; LOINGEY, C.; COHEN, S.; TABAKMAN, H.; STILLER, A. AND ZYKERMAN, A. **1985**. The relationship between metals, polyphenols, nitrogenous substance and treatment of red and white wines. *Am. J. Enol. Agric.*, 35: 9-15.

GRIFFITHS, L. A. **1982**. Mammalian metabolism of flavonoids. In: Harborne Ir, I.B.; Mabry, T. J. *The flavonoids: Advances in Research*. Chapman and Hall. Lt, London, New York, 681-718.

GUNATA, Y.; PINEAU, J. AND CORDONNIER, R. **1987**. Determination de la qualite de la vendage par sa richesse en composés phenoliques. Applications a la vinification. *R.F. OE.*, 187: 7-13.

GUYOT, S. **1994**. Obtention et caractérisation de produits d'oxydation enzymatique de la (+)-catéchine et de l'acide caféoiltartrique. Inhibition d'enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides pariétaux. *Thèse, Université de Rennes I*.

GUYOT, S.; CHEYNIER, V.; SOUQUET, J.M. AND MOUTOUNET, M. **1995**. Influence of pH on the enzymatic oxidation of (+)-catechin in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 2458-2462.

GUYOT, S.; VERCAUTEREN, J. AND CHEYNIER, V. **1996**. Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxydase. *Phytochemistry*, 42 (5): 1279-1288.

HASLAM, E. **1980**. In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*, 19: 2577-2582.

- HASLAM, E. AND LILLEY, T.H. **1988**. Natural astringency in foodstuffs. A molecular interpretation. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 27: 1.
- HOCKING, M. B. AND INTIHAR, D. J. **1985**. Oxidation of phenol by aqueous hydrogen peroxide catalysed by ferric ion-catechol complexes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 35A, 365-381.
- HSIEH, T.C. AND WU, J.M. **1999**. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res.*, 249: 109-115.
- IBEAS, J.I.; LOZANO, I.; PERDIGONES, F. AND JIMENEZ, J. **1997**. Effects of ethanol and temperature of the biological aging of sherry wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48 (1): 71-74.
- JANG, M. AND PEZZUTO, J. M. **1999**. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs Exptl. Clin. Res*, 25 (2/3): 65-77.
- JAWORSKI, A. AND LEE, C.Y. **1987**. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 35: 257-259.
- JIMENEZ, M. AND GARCIA-CARMONA, F. **1999**. Oxidation of the flavonol quercetin by polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 47.
- KALYANAMARAN, B.; SEALY, R.C. AND SIVARAJAH, K. **1984**. An electron spin resonance study of *o*-semiquinones formed during the enzymatic and autoxidation of catechol estrogens. *J. Biol. Chem.*, 259: 14018-14022.
- LAZARO, I.; ALMELA, L.; JAVALOY, S. AND LOPEZ, J.M. **1990**. Les acides phénoliques dans l'élaboration de vins de cv. Monastrell. *Sci. Aliments.*, 10: 89-98.
- LEA, A.G.H.; BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. AND SINGLETON, V.L. **1979**. The Procyanidins of white grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 30 (4): 289-300.
- LEA, A.G.H. **1990**. Bitterness and astringency: the procyanidins of fermented apple ciders. In: *Bitterness in food and beverages. Developments in Food Science*. Ed. R.L. Roussef (Elsevier, Amsterdam). 25: 123-143.
- LOPEZ-TOLEDANO, A.; MAYEN, M.; MERIDA, J. AND MEDINA, M. **2002**. Yeast-induced inhibition of (+)-catechin and (-)-epicatechin degradation in model solutions. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (6): 1631-1635.

- LU, R. AND SERRERO, G. **1999**. Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibit antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cell. *J. Cell Physiol*, 179:297-304.
- MACHEIX, J.J.; SAPIS, J.C. AND FLEURIET, A. **1991**. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 30 (3): 441-486.
- MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.; PÉREZ, L. AND CARO, I. **1987**. Variations of the major volatiles through aging of sherry. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38 (4): 293-297.
- MARTINEZ DE LA OSSA, E.; PEREZ, L. AND BENITEZ, T. **1997**. Evolution of flor yeast population during the biological aging of fino Sherry wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48: 160-168.
- MARTÍNEZ-ORTEGA, M.V.; GARCIA-PARRILLA, M.C. AND TRONCOSO, A.M. **2000**. Resveratrol content in wines and musts from the south of Spain. *Nahrung-Food*, 44 (4): 253-256.
- MARTINEZ-ORTEGA, M.V.; GARCIA-PARRILLA, M.C. AND TRONCOSO, A.M. **2001**. Changes in phenolic composition of wines submitted to *in-vitro* dissolution tests. *Food Chem.*, 73 (1): 11-16.
- MAYEN, M.; MERIDA, J. AND MEDINA, M. **1995**. Effect of hyperoxidation and sulphitation of musts on the catechin and procyanidin contents in sherry wines. *Acta Horticulturae*, 388: 261-267.
- MAYEN, M.; MERIDA, J. AND MEDINA, M. **1996**. Influence of the addition of sulphur dioxide and must hyperoxidation on the phenolic fractions during vinification of sherry wines. *Food Chem.*, 56 (1): 7-13.
- MCDONALD, P.D. AND HAMILTON, G.A. **1973**. Mechanisms of phenolic oxidative coupling reactions. In: *Oxidation in organic chemistry*, B. Trahanovsky, W.S. Ed. Academic Press. New York. 97-134.
- MIDDLETON, E. AND KANDASWAMI, C. **1992**. *Biochem. Pharmacol*, 43: 1167-1179.
- NAGEL, C.W. AND WULF, L.W. **1979**. Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.*, 30 (2): 111-116.
- NAGEL, C.W.; BARANOWOSKI, J.D.; WULF, L.W. AND POWERS, J.R. **1979**. The hydroxycinnamic acid tartaric acid esters content of musts and grape varieties grown in the pacific northeast. *Am. J. Enol. Vitic.*, 30 (3): 198-201.

- NIGAM, J.N. **2000**. Continuous ethanol production from pineapple can- nery waste using immobilized yeast cells. *J. Biotechnol.*, 80: 189-193.
- NOBLE, A.C. **1990**. Bitterness and astringency in wine. In: *Bitterness in food and beverages. Developments in Food Science*. Ed. R.L. Roussef (El- sevier, Ámsterdam). 25: 145-148.
- NOBLE, A.C. **1998**. Why do wines taste bitter and feel astringent?. In: *Wine flavor*. Eds. A. Waterhouse and S. Ebeler. American Chemical Soci- ety Symposium Series, 174: 156-165.
- O'MALLEY, D.M.; WHETTEN, R.; BAO, W.; CHEN, C.L. AND SEDEROFF, R.R. **1993**. *Plant J.*, 4: 751-757.
- OSZMIANSKI, J.; SAPIS, J.C. AND MACHEIX, J.J. **1985**. Changes in grape seed phenols as affected by enzymic and chemical oxidation in vitro. *J. Food Sci.*, 50: 1505-1506.
- OSZMIANSKI, J.; RAMOS, T. AND BOURZEIX, M. **1988**. Fractionation of phe- nolics compounds in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39: 259-262.
- OSZMIANSKI, J. AND LEE, Y. **1990**. Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1202- 1204.
- OSZMIANSKI, J.; CHEYNIER, V. AND MOUTOUNET, M. **1996**. Iron-catalized oxidation of (+)-catechin in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (7): 1712-1715.
- PARTHASARATHY, S AND RANKIN, S.M. **1992**. *Prog. Lipid Res*, 31: 127-143.
- PELEG, H.; GACON, K.; SCHLICH, P. AND NOBLE, A. **1999**. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimmers and trimers. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 1123-1128.
- PETER, M.G. **1989**. Chemical modifications of biopolymers by quinones and quinone methides. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 28: 555-570.
- PUECH, L. **1987**. Influencia de la madera de roble en los aguardientes y los vinos. *IV Jornadas Universitarias de Viticultura y Enología en Jerez*: 33-45.
- RIBEREAU-GAYON, P. **1985**. New Developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.*, 36 (1): 1-10.

RICHARD, J.L.; CAMBIEN, F. AND DUCIMETIERE, P. **1981**. *Press Med.*, 10: 1111-1114.

RICHARD, J.L. **1987**. *Arch. Mal. Cœur*, n° special avril, 17-21.

RICHARD-FORGET, F.C.; ROUET-MAYER, M.A.; GOUPY, P.M.; PHILIPPON, J. AND NICOLAS, J. **1992**. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 2114-2122.

RICHARD-FORGET, F.; AMIOT, M.I.; GOUPY, P. AND NICOLAS, J. **1995**. Evolution of chlorogenic acid o-quinones in model solution. *ACS Symp series*, 600: 144-158.

RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; SOUQUET, J.H. AND MOUTOUNET, M. **1991**. Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics. *J. Sci. Food Agric.*, 57: 55-63.

RODGERS, E.H. AND GRANT, M.H. **1998**. The effects of the flavonoid quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cell. *Chem. Biol. Interact.*, 116: 213-228.

ROMANO, P.; SUZZI, G.; TURBANTE, L. AND POLSINELLI, M. **1994**. Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 118: 213-218.

ROSSI, J.A. (JR.) AND SINGLETON, V.L. **1966**. Contributions of grape phenols to oxygen absorption and browning of wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 17: 231-239.

ROUET-MAYER, M.A.; RALAMBOSOA, J. AND PHILIPPON, J. **1990**. Roles of o-quinones and their polymers in the enzymic browning of apples. *Phytochemistry*, 29 (2): 435-440.

SALMON, J.M.; FORNAIRON-BONNEFOND, C.; MAZAURIC, J.P. AND MOUTOUNET, M. **2000**. Oxygen consumption by wine lees: impact on lees integrity during wine ageing. *Food Chem.*, 71: 519-528.

SALMON, J.M.; FORNAIRON-BONNEFOND, C. AND MAZAURIC, J.P. **2002**. Interactions between wine lees and polyphenols: influence on oxygen consumption during simulation of wine aging. *J. Food. Sci.* (En prensa)

SARNI-MANCHADO, P.; FULCRAND H.; SOUILLOL V.; SOUQUET J.M. AND CHEYNIER V. **1995**. Mechanisms of anthocyan degradation in grape must-like model solutions. *J. Sci. Food Agric.*, 69: 385-391.

- SARNI-MANCHADO, P.; CHEYNIER V. AND MOUTONET, M. **1997**. Reactions of polyphenoloxidase generated caftaric acid o-quinone with malvidin 3-O-glucoside. *Phytochemistry*, 45 (7): 1365-1369.
- SAUCIER, C.; GUERRA, C.; PIANET, I.; LAGUERRE, M. AND GLORIES, Y. **1997**. (+)-Catequin-acetaldehyde condensation products in relation to wine-ageing. *Phytochemistry*, 46 (2): 229-234.
- SHARPE, P.C.; MCGRANT, L.T.; MCCLEAN, E.; YOUNG, I.S. AND ARCHBOLD, G.P. **1995**. Effect of red wine consumption on lipoprotein (a) and other risk factors for arteriosclerosis. *QJM*, 88: 101-108.
- SHOSKES, D.A. **1998**. Effects of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation*, 66: 147-152.
- SIMPSON, R.F. **1982**. Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis*, 21 (3): 233-9.
- SINGLETON V. L. AND NOBLE, A.C. **1976**. Wine flavour and phenolic substances. In: Phenolic, sulfur and nitrogen compounds in food flavours. Eds. G.Charalambous and I. Katz, *ACS Symposium Series*, 26: 47-70.
- SINGLETON, V.L.; TIMBERLAKE, C.F. AND LEA, A.G.H. **1978**. The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *J. Sci. Food Agric.*, 29: 403-410.
- SINGLETON, V.L.; SALGUES, M; ZAYA, J. AND TROUSDALE, E. **1985**. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 36 (1): 50-56.
- SINGLETON, V.L. **1987**. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38 (1): 69-77.
- SODINI, I.; BOQUIEN, C.Y.; CORRIEU, G. AND LACROIX, C. **1997**. Use of an immobilized cell bioreactor for the continuous inoculation of milk in fresh cheese manufacturing. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 18 (1): 56-61.
- SOMERS, T.C.; VERETTE, E. AND POCOCK, K.F. **1987**. Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.*, 40: 67-78.
- SPEIER, G. **1986**. Copper catalyzed oxidation of catechol by dioxygen. *J. Mol. Catal.*, 37: 259-267.

- STERJADES, R.; DEAN, J.F.D. AND ERIKSON, K.E.L. **1993**. *Plant Physiol.*, 99: 1162-1168.
- SURH, Y.J.; HURH, Y.J.; KANG, J.Y.; LEE, E.; KONG, G. AND LEE, S.J. **1999**. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, linepromyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett*, 140: 1-10.
- SUZUKAWA, M.; ISHIKAWA, T.; YOSHIDA, H.; HOSOAI, K.; NISHIO, E.; YAMASHITA, T.; NAKAMURA, H.; HASHIZUME, N. AND SUZUKI, K. **1994**. Effect of alcohol consumption on antioxidant content and susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification. *J. Am. Coll. Cardiol.* 13: 237-242.
- TIMBERLAKE, C.F. AND BRIDLE, P. **1976**. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 27: 97-105.
- TULYATHAN, V. **1984**. Oxidation of phenolics common to foods and wines. *Thesis, University of California, Davis*.
- U.E. **1990**. Comunidad Europea. Diario Oficial L 272 de Octubre.
- UNE 87-022-92 (ISO 3591-1977). Análisis sensorial. Utensilios. Copa para la degustación de vinos.
- UNE 87-024-1-95 (ISO 8586-1-1993). Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y control de jueces. Parte 1: Catadores.
- UNE 87-005-92 (ISO 5495-1983). Análisis sensorial. Prueba de comparación por parejas.
- UNE 87-020-93 (ISO 4121-1987). Análisis sensorial. Metodología. Evaluación de los productos alimentarios por métodos que utilizan escalas.
- UDDIN, S. AND CHOUDHRY, M.A. **1995**. Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the DNA synthesis of human leukaemia cells. *Biochem Mol. Biol. Int.*, 36: 545-550.
- VASSEROT, Y.; CAILLET, S. AND MAUJEAN, A. **1997**. Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48 (4): 433-437.
- VIRIOT C.; SCALBERT, A.; LAPIERRE, C. AND MOUTOUNET, M. **1993**. Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *J. Agric. Food Chem.*, 41: 1872-1879.

WEINGES, K. AND EBERT, W. **1968**. Isolation of crystalline dehydrogenated dimers of (+)-catechin. *Phytochem.*, 7: 153-155.

WEINGES, K.; EBERT, W.; HUTHWELKER, D.; MATTAUCH, H. AND PERNER, J. **1969**. Oxidative coupling of phenols. II. Structure and mechanisms of the formation of dehydrocatechin A. *Liebigs Ann. Chem.*, 726: 114-124.

WEINGES, K. **1971**. Enzymic dehydrogenation of (+)-catechins. *Acta Phys. Chim. Debrecina*, 17: 265-272.

WESCHE-EBELING, P. AND MONTGOMERY, M.W. **1990**. Strawberry polyphenoloxidase: its role in anthocyanin degradations. *J. Food Sci.*, 55: 731-734, 745.

WILDENRADT, H.L. AND SINGLETON, V.L. **1974**. The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, 25: 119-126.

## **ANEXO**

Tabla 1: Evolución de los valores de absorbancia del vino con envejecimiento biológico y sin levadura de velo.

	Testigo	6 meses		12 meses		18 meses	
		Sin Velo	Con Velo	Sin Velo	Con Velo	Sin Velo	Con Velo
A280	7.23	6.98	6.64	8.07	8.22	8.63	9.38
	7.24	7.38	6.71	8.08	8.23	8.71	9.08
	7.25	7.14	6.75	8.24	8.12	8.51	9.36
	$\bar{x}$	7.24	7.17	6.70	8.13	8.19	8.62
s	0.01	0.20	0.06	0.10	0.06	0.10	0.17
A420	0.137	0.165	0.105	0.216	0.119	0.251	0.149
	0.138	0.167	0.105	0.215	0.117	0.262	0.146
	0.137	0.169	0.105	0.248	0.118	0.262	0.151
	$\bar{x}$	0.137	0.167	0.105	0.226	0.118	0.258
s	-.-	0.001	-.-	0.018	0.001	0.006	0.002
A520	0.036	0.040	0.017	0.058	0.018	0.064	0.024
	0.035	0.040	0.018	0.055	0.018	0.069	0.027
	0.035	0.043	0.018	0.060	0.019	0.078	0.027
	$\bar{x}$	0.035	0.040	0.017	0.057	0.018	0.070
s	-.-	0.001	-.-	0.002	-.-	0.007	0.001

Tabla 2: Evolución de la concentración de Ácidos Fenólicos (mg/L) en el vino con levadura de velo y sin ella.

	Inicial	6 meses		12 meses		18 meses		
		Sin Velo	Con Velo	Sin Velo	Con Velo	Sin Velo	Con Velo	
Gálico	12.2	8.35	9.90	9.02	12.0	10.3	13.7	
	12.2	9.21	10.7	9.20	11.7	10.8	13.3	
	12.3	10.6	10.8	9.55	11.6	9.79	13.8	
	$\bar{x}$	12.2	9.38	10.5	9.26	11.8	10.3	13.6
	s	0.1	1.14	0.5	0.27	0.2	0.5	0.3
Protocatéquico	3.72	3.30	3.00	5.09	5.85	2.06	3.14	
	3.60	4.29	2.34	5.59	7.11	2.53	3.34	
	3.16	4.62	3.25	6.96	6.98	1.74	3.25	
	$\bar{x}$	3.49	4.07	2.86	5.88	6.65	2.11	3.24
	s	0.30	0.69	0.47	0.96	0.69	0.40	0.10
Siríngico	0.565	0.873	0.895	0.743	1.00	0.981	1.26	
	0.623	1.20	1.13	0.736	0.970	1.01	1.25	
	0.655	1.14	0.834	0.714	0.915	0.947	1.23	
	$\bar{x}$	0.614	1.07	0.953	0.731	0.962	0.978	1.25
	s	0.045	0.17	0.156	0.015	0.043	0.030	0.02
Cafeico	0.287	1.17	1.08	1.14	1.83	0.713	1.63	
	0.264	1.03	1.28	0.913	1.86	0.603	1.68	
	0.328	1.18	0.999	0.961	1.93	0.663	1.40	
	$\bar{x}$	0.292	1.13	1.12	1.00	1.87	0.659	1.57
	S	0.032	0.08	0.15	0.12	0.05	0.055	0.15
<i>p</i> -Cumárico	0.532	0.570	0.309	0.514	1.42	0.499	0.517	
	0.577	0.639	0.398	0.413	1.07	0.659	0.499	
	0.678	0.519	0.405	0.500	1.23	0.610	0.500	
	$\bar{x}$	0.595	0.576	0.370	0.475	1.24	0.589	0.505
	s	0.074	0.060	0.053	0.054	0.17	0.081	0.010
Ferúlico	0.255	0.277	0.368	0.392	0.679	0.430	0.935	
	0.285	0.351	0.467	0.419	0.632	0.450	0.939	
	0.309	0.339	0.425	0.432	0.595	0.422	0.987	
	$\bar{x}$	0.283	0.322	0.420	0.414	0.635	0.434	0.953
	s	0.027	0.039	0.049	0.020	0.042	0.014	0.028

Tabla 3: Evolución de la concentración de Ésteres de Ácidos Hidroxicinámicos (mg/L) y Tirosol (mg/L) en el vino con levadura de velo y sin ella.

	Inicial	6 meses		12 meses		18 meses		
		Sin Velo	Con Velo	Sin Velo	Con Velo	Sin Velo	Con Velo	
<i>t</i> -Caftárico	12.0	8.58	9.79	5.83	11.5	6.50	14.6	
	12.9	12.2	10.3	8.33	11.6	6.66	12.3	
	12.8	9.80	13.0	7.54	11.9	6.75	16.9	
	$\bar{x}$	12.6	10.2	11.0	7.23	11.7	6.63	14.6
	s	0.5	1.8	1.7	1.28	0.2	0.13	2.3
<i>c</i> -Cutárico	12.7	13.5	12.0	15.8	18.4	12.6	11.6	
	14.0	13.4	13.8	17.9	18.9	12.5	10.8	
	17.2	15.6	11.8	13.1	20.7	12.4	14.4	
	$\bar{x}$	14.6	14.2	12.5	15.6	19.3	12.5	12.2
	s	2.4	1.2	1.1	2.4	1.2	0.1	1.9
Tirosol	54.9	57.1	77.0	69.8	91.6	65.5	93.4	
	58.0	65.6	69.0	51.5	95.5	71.5	89.9	
	55.9	70.8	72.0	53.1	87.2	70.4	97.5	
	$\bar{x}$	56.3	64.5	72.6	58.1	91.4	69.2	93.6
	s	1.6	6.9	4.0	10.1	4.1	3.2	3.8

Tabla 4: Evolución de la concentración de los Derivados del Flavan-3-ol (mg/L) en el vino con levadura de velo y sin ella.

	Inicial	6 meses		12 meses		18 meses		
		Sin Velo	Con Velo	Sin Velo	Con Velo	Sin Velo	Con Velo	
(+) - Catequina	23.9	20.2	23.8	18.9	34.6	20.2	30.1	
	19.8	20.7	23.5	17.1	37.6	20.5	31.8	
	19.1	21.0	23.0	19.4	37.0	20.1	32.2	
	$\bar{x}$	19.6	20.4	23.4	18.5	36.4	20.2	31.4
	s	0.4	0.4	0.3	1.2	1.6	0.2	1.1
(-) - Epicatequina	9.12	10.5	10.6	10.8	12.0	11.4	12.9	
	9.54	10.1	10.8	10.4	12.5	11.2	13.4	
	8.98	10.2	10.9	10.1	12.6	10.2	13.8	
	$\bar{x}$	9.21	10.3	10.8	10.2	12.2	11.0	13.4
	s	0.29	0.2	0.2	0.2	0.4	0.6	0.5
Procianidina B1	11.3	10.3	10.6	10.4	8.10	12.8	8.04	
	11.9	10.9	10.6	10.8	8.60	10.4	8.69	
	11.9	10.3	10.5	10.2	9.20	11.0	8.95	
	$\bar{x}$	11.7	10.5	10.5	10.5	8.63	11.4	8.56
	s	0.3	0.3	0.0	0.3	0.55	1.0	0.47
Procianidina B2	4.57	6.64	5.93	8.72	8.06	7.89	6.99	
	5.64	7.95	5.91	9.10	6.78	7.83	6.66	
	5.39	7.24	5.31	7.77	7.23	7.10	6.83	
	$\bar{x}$	5.20	7.27	5.71	8.53	7.35	7.61	6.65
	s	0.56	0.66	0.35	0.69	0.65	0.44	0.34
Procianidina B3	11.2	8.50	8.34	7.37	5.02	8.67	6.20	
	10.6	8.60	7.49	8.50	6.22	10.1	6.00	
	10.4	8.31	7.45	7.73	5.11	8.44	6.96	
	$\bar{x}$	10.7	8.47	7.76	7.86	5.45	9.08	6.05
	s	0.4	0.15	0.50	0.58	0.66	0.91	0.13
Procianidina B4	6.01	8.23	5.76	8.39	3.98	8.64	4.44	
	7.89	5.75	5.76	6.51	4.73	7.81	4.19	
	6.43	7.68	4.19	6.91	4.95	9.24	4.08	
	$\bar{x}$	6.78	7.22	5.24	7.27	4.55	8.56	4.24
	s	0.99	1.30	0.91	0.99	0.51	0.72	0.18

Tabla 5: Evolución de la concentración de los Compuestos Desconocidos (mg/L) en el vino con levadura de velo y sin ella.

	Inicial	6 meses		12 meses		18 meses	
		Sin Velo	Con Velo	Sin Velo	Con Velo	Sin Velo	Con Velo
Pico 3	1.37	4.48	2.10	6.45	2.85	9.09	3.12
	1.59	5.38	1.98	6.63	2.98	9.56	3.45
	1.49	5.05	1.84	8.12	2.90	9.50	3.05
$\bar{x}$	1.48	4.97	1.97	7.07	2.91	9.38	3.21
s	0.11	0.46	0.13	0.92	0.06	0.26	0.21
P. Agrupados	19.8	26.7	21.4	34.2	22.3	38.7	21.2
	20.3	27.6	21.2	33.1	20.0	38.1	23.4
	21.9	27.5	21.6	32.6	21.2	37.2	22.9
$\bar{x}$	20.6	27.3	21.4	33.3	21.2	38.0	22.5
s	1.1	0.5	0.2	0.8	1.2	0.8	1.2
Pico A	4.80	6.22	5.57	9.39	12.3	10.3	17.0
	5.16	7.68	5.33	9.59	12.7	11.6	15.1
	4.51	6.85	5.79	9.77	8.65	13.7	16.9
$\bar{x}$	4.82	6.92	5.56	9.58	11.2	11.9	16.3
s	0.32	0.73	0.23	0.19	2.2	1.7	1.1
Pico B	3.26	6.65	12.5	8.47	3.86	6.80	3.92
	3.87	6.04	8.68	8.23	3.98	8.49	3.10
	3.16	6.83	10.2	7.45	3.94	7.09	3.30
$\bar{x}$	3.43	6.51	10.5	8.05	3.93	7.46	3.44
s	0.38	0.41	1.9	0.54	0.06	0.90	0.43

Tabla 6: Evolución de los valores de absorbancia a 280 nm de las muestras de vino Sin levadura y con diferentes dosis de levadura añadida.

DÍAS	280 nm			
	SIN LEV.	1.0 g/L	1.5 g/L	2.0 g/L
0	7.37	7.37	7.37	7.37
	7.47	7.47	7.47	7.47
	7.34	7.34	7.34	7.34
$\bar{x}$	7.39	7.39	7.39	7.39
s	0.07	0.07	0.07	0.07
3	7.28	7.46	7.61	7.49
	7.34	7.47	7.61	7.43
	7.39	7.49	7.57	7.76
$\bar{x}$	7.34	7.47	7.60	7.56
s	0.06	0.02	0.02	0.18
6	7.59	7.73	7.75	7.99
	7.55	7.73	7.84	7.95
	7.48	7.70	7.84	7.90
$\bar{x}$	7.54	7.72	7.81	7.95
s	0.06	0.02	0.05	0.04
9	7.71	7.82	7.85	8.08
	7.81	7.86	8.02	8.11
	7.73	7.78	7.96	7.95
$\bar{x}$	7.75	7.82	7.94	8.05
s	0.05	0.04	0.09	0.08
15	7.82	7.84	7.83	7.88
	7.81	8.51	7.91	7.79
	7.87	7.79	7.96	8.01
$\bar{x}$	7.83	8.05	7.90	7.89
s	0.03	0.40	0.06	0.11
18	8.08	7.86	7.90	8.09
	7.97	8.08	8.10	7.99
	7.88	8.06	8.04	8.00
$\bar{x}$	7.98	8.00	8.01	8.03
s	0.10	0.12	0.10	0.05

Tabla 7: Evolución de los valores de absorbancia a 420 nm de las muestras de vino Sin levadura y con diferentes dosis de levadura añadida.

DÍAS	SIN LEV.	420 nm		
		1.0 g/L	1.5 g/L	2.0 g/L
0	0.133	0.133	0.133	0.133
	0.131	0.131	0.131	0.131
	0.132	0.132	0.132	0.132
$\bar{x}$	0.132	0.132	0.132	0.132
s	0.001	0.001	0.001	0.001
3	0.141	0.129	0.129	0.130
	0.139	0.130	0.131	0.130
	0.140	0.131	0.129	0.130
$\bar{x}$	0.140	0.130	0.130	0.130
s	0.001	-.-	0.001	-.-
6	0.152	0.139	0.139	0.135
	0.152	0.141	0.138	0.134
	0.152	0.138	0.137	0.134
$\bar{x}$	0.152	0.139	0.138	0.134
s	-.-	0.001	-.-	-.-
9	0.157	0.142	0.140	0.134
	0.157	0.140	0.139	0.134
	0.157	0.139	0.138	0.133
$\bar{x}$	0.157	0.140	0.139	0.134
s	-.-	0.001	-.-	-.-
15	0.169	0.152	0.146	0.142
	0.167	0.147	0.144	0.138
	0.169	0.145	0.144	0.140
$\bar{x}$	0.168	0.148	0.145	0.140
s	0.001	0.003	0.001	0.002
18	0.184	0.157	0.155	0.149
	0.182	0.156	0.155	0.147
	0.183	0.155	0.154	0.150
$\bar{x}$	0.183	0.156	0.155	0.149
s	-.-	-.-	-.-	0.001

Tabla 8: Evolución de los valores de absorbancia a 520 nm de las muestras de vino Sin levadura y con diferentes dosis de levadura añadida.

DÍAS	520 nm			
	SIN LEV.	1.0 g/L	1.5 g/L	2.0 g/L
0	0.028	0.028	0.028	0.028
	0.028	0.028	0.028	0.028
	0.028	0.028	0.028	0.028
	$\bar{x}$	0.028	0.028	0.028
s	-.-	-.-	-.-	-.-
3	0.029	0.025	0.026	0.028
	0.029	0.026	0.026	0.027
	0.029	0.026	0.025	0.027
	$\bar{x}$	0.029	0.026	0.026
s	-.-	-.-	-.-	-.-
6	0.032	0.027	0.027	0.027
	0.032	0.027	0.027	0.026
	0.032	0.027	0.027	0.027
	$\bar{x}$	0.032	0.027	0.027
s	-.-	-.-	-.-	-.-
9	0.032	0.024	0.022	0.021
	0.031	0.023	0.022	0.021
	0.032	0.022	0.022	0.021
	$\bar{x}$	0.032	0.023	0.022
s	-.-	0.001	-.-	-.-
15	0.036	0.030	0.026	0.025
	0.035	0.027	0.025	0.024
	0.035	0.026	0.026	0.025
	$\bar{x}$	0.035	0.028	0.026
s	-.-	0.002	-.-	-.-
18	0.042	0.030	0.030	0.029
	0.042	0.031	0.032	0.029
	0.043	0.031	0.031	0.030
	$\bar{x}$	0.042	0.031	0.031
s	-.-	-.-	0.001	-.-

Tabla 9: Evolución de los valores de absorbancia del vino tratado con una dosis de Levadura de 1.0 g/L durante toda la experiencia.

VINO con LEVADURA 1.0 g/L			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
0	7.52	0.133	0.025
	7.44	0.132	0.023
	7.56	0.129	0.021
$\bar{x}$	7.51	0.131	0.023
s	0.06	0.002	0.001
3	7.55	0.136	0.027
	7.52	0.134	0.025
	7.48	0.133	0.025
$\bar{x}$	7.52	0.134	0.026
s	0.03	0.001	0.001
6	7.68	0.136	0.020
	7.73	0.141	0.024
	7.59	0.135	0.021
$\bar{x}$	7.67	0.137	0.022
s	0.07	0.003	0.002
9	7.84	0.147	0.027
	7.71	0.146	0.027
	7.78	0.143	0.026
$\bar{x}$	7.78	0.145	0.027
s	0.06	0.002	-.-
12	7.73	0.149	0.026
	7.90	0.149	0.026
	7.77	0.145	0.025
$\bar{x}$	7.80	0.148	0.026
s	0.09	0.002	-.-
15	7.95	0.159	0.031
	7.85	0.160	0.032
	7.78	0.154	0.030
$\bar{x}$	7.86	0.158	0.031
s	0.09	0.003	0.001

Tabla 9: (Continuación).

VINO con LEVADURA 1.0 g/L			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
18	8.07	0.161	0.031
	7.91	0.160	0.031
	7.87	0.155	0.029
$\bar{x}$	7.95	0.159	0.030
s	0.10	0.003	0.001
21	7.91	0.167	0.034
	7.94	0.166	0.033
	7.87	0.162	0.032
$\bar{x}$	7.91	0.165	0.033
s	0.04	0.002	0.001
24	7.97	0.174	0.037
	8.13	0.172	0.036
	8.00	0.166	0.034
$\bar{x}$	8.03	0.171	0.036
s	0.08	0.004	0.001
27	8.12	0.177	0.036
	8.19	0.175	0.035
	8.11	0.170	0.034
$\bar{x}$	8.14	0.174	0.035
s	0.04	0.003	0.001
33	8.26	0.189	0.038
	8.26	0.185	0.037
	8.09	0.179	0.035
$\bar{x}$	8.20	0.184	0.037
s	0.10	0.005	0.001

Tabla 10: Evolución de los valores de absorbancia del vino tratado con Levadura a una dosis de 1.5 g/L durante toda la experiencia.

VINO con LEVADURA 1.5 g/L			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
0	7.52	0.133	0.025
	7.44	0.132	0.023
	7.56	0.129	0.021
$\bar{x}$	7.51	0.131	0.023
s	0.06	0.002	0.001
3	8.03	0.138	0.029
	7.85	0.134	0.027
	7.66	0.134	0.027
$\bar{x}$	7.85	0.135	0.028
s	0.18	0.002	0.001
6	7.48	0.139	0.024
	7.72	0.138	0.023
	7.69	0.137	0.024
$\bar{x}$	7.63	0.138	0.024
s	0.13	-.-	-.-
9	7.89	0.142	0.025
	7.87	0.142	0.026
	7.82	0.142	0.026
$\bar{x}$	7.86	0.142	0.026
s	0.04	-.-	-.-
12	8.01	0.146	0.024
	7.93	0.145	0.024
	7.83	0.143	0.025
$\bar{x}$	7.92	0.145	0.024
s	0.09	0.001	-.-
15	8.01	0.155	0.030
	7.95	0.153	0.030
	7.89	0.153	0.030
$\bar{x}$	7.95	0.154	0.030
s	0.06	0.001	-.-
18	8.06	0.159	0.030
	7.96	0.155	0.028
	8.04	0.155	0.028
$\bar{x}$	8.02	0.156	0.029
s	0.05	0.002	0.001

Tabla 10: (Continuación).

VINO con LEVADURA 1.5 g/L			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
21	8.27	0.164	0.032
	7.99	0.161	0.032
	8.04	0.162	0.032
$\bar{x}$	8.10	0.162	0.032
s	0.15	0.001	-.-
24	8.22	0.168	0.034
	8.13	0.165	0.033
	7.99	0.165	0.034
$\bar{x}$	8.11	0.166	0.034
s	0.12	0.001	-.-
27	8.39	0.176	0.035
	8.10	0.170	0.034
	8.19	0.173	0.035
$\bar{x}$	8.23	0.173	0.035
s	0.15	0.003	-.-
33	8.31	0.182	0.036
	8.24	0.177	0.035
	8.17	0.183	0.038
$\bar{x}$	8.24	0.181	0.036
s	0.07	0.003	0.001
36	8.04	0.176	0.034
	8.08	0.177	0.035
	8.18	0.180	0.037
$\bar{x}$	8.10	0.178	0.035
s	0.07	0.002	0.001
39	8.41	0.186	0.035
	8.30	0.182	0.034
	8.19	0.185	0.035
$\bar{x}$	8.30	0.184	0.035
s	0.11	0.002	-.-

Tabla 11: Evolución de los valores de absorbancia del vino tratado con Levadura en una dosis de 2.0 g/L durante toda la experiencia.

VINO con LEVADURA 2.0 g/L			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
0	7.52	0.133	0.025
	7.44	0.132	0.023
	7.56	0.129	0.021
$\bar{x}$	7.51	0.131	0.023
s	0.06	0.002	0.001
3	7.64	0.128	0.024
	7.69	0.128	0.024
	7.70	0.129	0.024
$\bar{x}$	7.68	0.128	0.024
s	0.03	-.-	-.-
6	7.80	0.136	0.025
	7.79	0.131	0.022
	7.91	0.140	0.024
$\bar{x}$	7.83	0.136	0.024
s	0.07	0.004	0.001
9	7.94	0.137	0.024
	8.18	0.135	0.024
	7.89	0.138	0.025
$\bar{x}$	8.00	0.137	0.024
s	0.16	0.001	-.-
12	7.78	0.140	0.023
	8.00	0.138	0.023
	7.92	0.140	0.023
$\bar{x}$	7.90	0.139	0.023
s	0.11	0.001	-.-
15	8.12	0.147	0.028
	7.92	0.144	0.027
	8.03	0.148	0.029
$\bar{x}$	8.02	0.146	0.028
s	0.10	0.002	0.001

Tabla 11: (Continuación).

VINO con LEVADURA 2.0 g/L			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
18	7.88	0.144	0.025
	7.89	0.144	0.025
	8.03	0.148	0.026
$\bar{x}$	7.93	0.145	0.025
s	0.08	0.002	-.-
21	7.97	0.154	0.030
	8.07	0.150	0.029
	8.08	0.154	0.030
$\bar{x}$	8.04	0.153	0.030
s	0.06	0.002	-.-
24	7.87	0.151	0.030
	7.87	0.152	0.030
	8.06	0.157	0.031
$\bar{x}$	7.93	0.153	0.030
s	0.11	0.003	-.-
27	8.23	0.160	0.031
	8.02	0.154	0.030
	8.08	0.159	0.031
$\bar{x}$	8.11	0.158	0.031
s	0.11	0.003	-.-
33	8.20	0.166	0.033
	8.08	0.160	0.031
	8.11	0.165	0.031
$\bar{x}$	8.13	0.164	0.032
s	0.06	0.003	0.001
36	8.08	0.168	0.033
	8.12	0.163	0.032
	8.15	0.169	0.032
$\bar{x}$	8.12	0.167	0.032
s	0.04	0.003	-.-

Tabla 11: (Continuación).

VINO con LEVADURA 2.0 g/L			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
39	8.24	0.171	0.030
	8.14	0.166	0.029
	8.19	0.170	0.030
$\bar{x}$	8.19	0.169	0.030
s	0.05	0.002	-.-
42	8.21	0.174	0.033
	8.11	0.170	0.032
	8.36	0.176	0.032
$\bar{x}$	8.23	0.173	0.032
s	0.12	0.003	-.-
45	7.71	0.167	0.032
	8.23	0.175	0.034
	8.52	0.183	0.035
$\bar{x}$	8.15	0.175	0.034
s	0.41	0.007	0.001
48	8.15	0.176	0.034
	8.23	0.181	0.036
	8.36	0.190	0.038
$\bar{x}$	8.25	0.182	0.036
s	0.11	0.007	0.001

Tabla 12: Contenidos en Ácidos Fenólicos (mg/L) del vino Inicial, Sin Levadura y Con Levadura (2.0 g/L) a los 18 días del pardeamiento.

	INICIAL	SIN LEVADURA	CON LEVADURA
Gálico	4.10	4.49	4.09
	4.70	4.44	3.53
	4.48	4.28	3.96
	$\bar{x}$	4.43	4.40
	s	0.30	0.09
Protocatéquico	5.85	8.35	7.61
	6.10	8.70	7.04
	5.61	8.57	8.00
	$\bar{x}$	5.85	8.52
	s	0.24	0.14
Vanílico	0.926	1.09	1.09
	1.05	1.08	0.992
	0.957	1.08	1.31
	$\bar{x}$	0.978	1.08
	s	0.064	0.00
Siríngico	1.95	1.88	1.99
	2.04	1.89	1.56
	1.88	1.93	2.21
	$\bar{x}$	1.96	1.88
	s	0.08	0.02
Cafeico	0.319	0.410	0.385
	0.342	0.401	0.338
	0.366	0.413	0.448
	$\bar{x}$	0.342	0.405
	s	0.023	0.005
<i>p</i> -Cumárico	0.531	0.592	0.650
	0.687	0.591	0.470
	0.620	0.598	0.679
	$\bar{x}$	0.613	0.591
	s	0.078	0.003
Ferúlico	1.52	1.48	1.48
	1.60	1.43	1.21
	1.60	1.44	1.68
	$\bar{x}$	1.57	1.45
	s	0.05	0.02

Tabla 13: Contenidos en Ésteres de Ácidos Hidroxicinámicos (mg/L) y Tirosol (mg/L) del vino Inicial, Sin Levadura y Con Levadura (2.0 g/L) a los 18 días del pardeamiento.

	INICIAL	SIN LEVADURA	CON LEVADURA
<i>t</i> -Caftárico	17.5	15.0	17.4
	18.0	15.1	18.2
	17.0	15.3	19.1
$\bar{x}$	17.5	15.1	18.2
s	0.5	0.1	0.8
<i>c</i> -Cutárico	10.2	13.3	12.8
	11.2	13.0	13.1
	10.7	12.7	14.3
$\bar{x}$	10.7	13.0	13.4
s	0.5	0.2	0.8
Tirosol	68.3	52.6	52.9
	68.5	52.6	52.5
	69.1	52.7	53.1
$\bar{x}$	68.6	52.6	52.8
s	0.4	0.0	0.3

Tabla 14: Contenidos en Derivados de Flavan-3-ol (mg/L) del vino Inicial, Sin Levadura y Con Levadura (2.0 g/L) a los 18 días del pardeamiento.

	INICIAL	SIN LEVADURA	CON LEVADURA
(+)-Catequina	34.6	31.8	37.7
	34.1	32.1	38.9
	33.5	31.8	39.1
$\bar{x}$	34.1	31.9	38.6
s	0.6	0.2	0.8
(-)-Epicatequina	14.3	16.7	18.6
	14.3	16.5	20.5
	15.8	16.1	19.0
$\bar{x}$	14.8	16.6	19.4
s	0.9	0.3	1.0
Procianidina B1	10.6	10.5	10.2
	9.63	10.1	9.16
	9.80	10.1	10.6
$\bar{x}$	10.0	10.3	9.99
s	0.5	0.2	0.74
Procianidina B2	7.43	6.13	5.20
	6.81	6.15	4.77
	6.94	5.80	5.69
$\bar{x}$	7.06	6.02	5.22
s	0.33	0.20	0.46
Procianidina B3	13.9	18.8	18.6
	13.5	18.2	17.8
	14.7	18.7	19.8
$\bar{x}$	14.0	18.5	18.7
s	0.6	0.3	1.0
Procianidina B4	5.58	4.53	5.03
	6.59	4.61	4.80
	5.55	4.55	5.19
$\bar{x}$	5.91	4.57	5.01
s	0.59	0.04	0.20

Tabla 15: Contenidos en Compuestos Desconocidos (mg/L) del vino Inicial, Sin Levadura y Con Levadura (2.0 g/L) a los 18 días de pardeamiento.

	INICIAL	SIN LEVADURA	CON LEVADURA
P. Agrupados	4.72	9.35	7.93
	4.59	9.78	7.77
	4.36	9.35	6.94
$\bar{x}$	4.55	9.49	7.53
S	0.18	0.25	0.53
Pico 1	4.67	5.01	4.94
	5.62	4.76	4.02
	4.30	4.75	5.40
$\bar{x}$	4.86	4.88	4.79
S	0.68	0.18	0.70
Pico 2	1.70	2.11	1.90
	1.67	2.18	1.48
	1.58	2.34	1.69
$\bar{x}$	1.65	2.14	1.69
S	0.06	0.05	0.21
Pico 3	4.35	3.26	2.87
	3.79	3.36	2.73
	4.48	3.52	3.01
$\bar{x}$	4.21	3.38	2.87
S	0.37	0.13	0.14
Pico 4	1.00	0.728	0.805
	1.03	0.652	0.680
	1.06	0.719	0.555
$\bar{x}$	1.03	0.699	0.680
s	0.03	0.042	0.125

Tabla 15: (Continuación).

	INICIAL	SIN LEVADURA	CON LEVADURA
Pico 6	0.600	0.479	0.563
	0.636	0.516	0.420
	0.533	0.492	0.492
$\bar{x}$	0.590	0.495	0.492
s	0.052	0.019	0.071
Pico 7	0.567	0.624	0.626
	0.706	0.609	0.518
	0.496	0.639	0.724
$\bar{x}$	0.590	0.616	0.623
s	0.106	0.011	0.103
Pico 10	1.15	0.934	0.883
	1.04	0.945	1.02
	1.11	0.934	0.895
$\bar{x}$	1.10	0.938	0.933
S	0.06	0.006	0.075
Pico A	0.898	0.688	0.747
	0.788	0.657	0.725
	0.879	0.697	0.769
$\bar{x}$	0.855	0.672	0.747
S	0.058	0.022	0.022
Pico B	2.22	1.78	3.13
	2.85	1.89	2.64
	2.63	1.85	2.69
$\bar{x}$	2.57	1.84	2.82
S	0.32	0.06	0.27

Tabla 16: Contenidos en Ácidos Fenólicos (mg/L) del vino Inicial, y de todas las muestras de vino al final de la experiencia.

	INICIAL	SIN LEV.	1.0 g/L	1.5 g/L	2.0 g/L
Gálico	4.10	4.49	4.11	3.81	3.38
	4.70	4.44	3.52	3.76	3.60
	4.48	4.28	4.03	3.74	3.61
$\bar{x}$	4.43	4.40	3.89	3.77	3.53
s	0.30	0.09	0.32	0.04	0.13
Protocatéquico	5.85	8.35	13.1	14.5	15.8
	6.10	8.70	14.0	14.1	15.8
	5.61	8.57	14.4	14.1	16.0
$\bar{x}$	5.85	8.52	13.8	14.2	15.9
s	0.24	0.14	0.7	0.2	0.1
Vaníllico	0.926	1.09	1.36	1.51	1.38
	1.05	1.08	1.30	1.30	1.42
	0.957	1.08	1.29	1.33	1.44
$\bar{x}$	0.978	1.08	1.33	1.38	1.41
s	0.064	0.00	0.03	0.11	0.03
Siríngico	1.95	1.88	2.23	2.35	2.08
	2.04	1.89	2.63	2.23	2.16
	1.88	1.93	1.93	2.20	2.21
$\bar{x}$	1.96	1.88	2.26	2.26	2.15
s	0.08	0.02	0.35	0.08	0.06
Cafeico	0.319	0.410	0.609	0.645	0.541
	0.342	0.401	0.508	0.560	0.566
	0.366	0.413	0.496	0.570	0.616
$\bar{x}$	0.342	0.405	0.538	0.592	0.574
s	0.023	0.005	0.062	0.046	0.038
<i>p</i> -Cumárico	0.531	0.592	0.664	0.750	0.663
	0.687	0.591	0.544	0.671	0.674
	0.620	0.598	0.639	0.638	0.696
$\bar{x}$	0.613	0.591	0.616	0.686	0.678
s	0.078	0.003	0.063	0.057	0.016
Ferúlico	1.52	1.48	1.46	1.48	1.51
	1.60	1.43	1.31	1.41	1.57
	1.60	1.44	1.29	1.44	1.51
$\bar{x}$	1.57	1.45	1.35	1.44	1.53
s	0.05	0.02	0.09	0.04	0.03

Tabla 17: Contenidos en Ésteres de Ácidos Hidroxicinámicos (mg/L) y Tirosol (mg/L) del vino Inicial, y de todas las muestras de vino al final de la experiencia.

	INICIAL	SIN LEV.	1.0 g/L	1.5 g/L	2.0 g/L
<i>t</i> -Caftárico	17.5	15.0	16.6	16.1	17.2
	18.0	15.1	15.7	15.4	15.5
$\bar{x}$	17.0	15.3	16.2	15.0	15.4
	17.5	15.1	16.2	15.5	16.0
s	0.4	0.1	0.4	0.5	0.8
<i>c</i> -Cutárico	10.2	13.3	12.6	12.8	12.1
	11.2	13.0	10.8	12.2	12.7
$\bar{x}$	10.7	12.7	12.4	11.8	12.4
	10.7	13.0	11.9	12.3	12.4
s	0.5	0.2	1.0	0.5	0.3
Tirosol	68.3	52.6	54.2	58.2	54.4
	68.5	52.6	53.1	56.9	53.5
$\bar{x}$	69.1	52.7	52.7	57.4	53.4
	68.6	52.6	53.3	57.5	53.8
s	0.4	0.0	0.8	0.6	0.6

Tabla 18: Contenidos en Derivados del Flavan-3-ol (mg/L) del vino Inicial, y de todas las muestras de vino al final de la experiencia.

	INICIAL	SIN LEV.	1.0 g/L	1.5 g/L	2.0 g/L
(+)-Catequina	34.6	31.8	36.2	38.3	36.3
	34.1	32.1	34.4	36.7	36.3
$\bar{x}$	33.5	31.8	35.9	37.4	35.2
	34.1	31.9	35.3	37.5	35.9
s	0.6	0.2	0.8	0.6	0.6
(-)-Epicatequina	14.3	16.7	17.4	21.1	16.2
	14.3	16.5	16.5	18.8	16.6
$\bar{x}$	15.8	16.1	16.4	20.0	16.9
	14.8	16.6	16.8	19.9	16.6
s	0.9	0.3	0.6	0.9	0.4
Procianidina B1	10.6	10.5	9.21	8.93	9.67
	9.63	10.1	9.07	8.91	9.60
$\bar{x}$	9.80	10.1	9.22	7.97	9.01
	10.0	10.3	9.17	8.60	9.43
s	0.5	0.2	0.08	0.55	0.36
Procianidina B2	7.43	6.13	6.65	7.05	5.82
	6.81	6.15	6.79	6.05	5.74
$\bar{x}$	6.94	5.80	6.31	5.98	5.58
	7.06	6.02	6.58	6.36	5.71
s	0.33	0.20	0.25	0.60	0.12
Procianidina B3	13.9	18.8	20.9	21.0	18.4
	13.5	18.2	19.8	21.5	19.0
$\bar{x}$	14.0	18.7	21.0	20.4	19.2
	13.8	18.5	20.3	21.0	18.9
s	0.3	0.3	0.6	0.6	0.4
Procianidina B4	5.58	4.53	5.66	4.88	5.46
	6.59	4.61	4.56	5.68	5.32
$\bar{x}$	5.55	4.55	5.51	5.51	5.09
	5.91	4.57	5.24	5.36	5.29
s	0.59	0.04	0.60	0.42	0.19

Tabla 19: Contenidos en Compuestos Desconocidos (mg/L) del vino Inicial, de todas las muestras de vino al final de la experiencia.

	INICIAL	SIN LEV.	1.0 g/L	1.5 g/L	2.0 g/L
P. Agrupados	4.72	9.35	7.91	8.86	8.50
	4.59	9.78	7.43	7.88	8.35
	4.36	9.35	9.10	7.22	8.26
$\bar{x}$	4.55	9.49	8.15	7.99	8.37
s	0.18	0.25	0.86	0.82	0.12
Pico 1	4.67	5.01	4.82	5.50	5.21
	5.62	4.76	4.52	5.14	5.34
	4.30	4.75	5.11	4.93	5.43
$\bar{x}$	4.86	4.88	4.82	5.19	5.33
s	0.68	0.18	0.30	0.29	0.11
Pico 2	1.70	2.11	1.44	1.34	1.79
	1.67	2.18	1.34	1.52	1.56
	1.58	2.34	1.54	1.16	1.34
$\bar{x}$	1.65	2.14	1.44	1.34	1.56
s	0.06	0.05	0.10	0.18	0.22
Pico 3	4.35	3.26	5.78	4.72	4.48
	3.79	3.36	5.14	4.23	4.42
	4.48	3.52	5.78	4.72	4.58
$\bar{x}$	4.21	3.38	5.57	4.56	4.49
s	0.37	0.13	0.37	0.28	0.08
Pico 4	1.00	0.728	0.961	0.716	0.484
	1.03	0.652	0.935	0.788	0.555
	1.06	0.719	0.954	0.752	0.520
$\bar{x}$	1.03	0.699	0.950	0.752	0.520
s	0.03	0.042	0.013	0.035	0.035

Tabla 19: (Continuación).

	INICIAL	SIN LEV.	1.0 g/L	1.5 g/L	2.0 g/L
Pico 6	0.600	0.479	0.918	0.854	0.847
	0.636	0.516	0.910	0.703	0.818
	0.533	0.492	0.903	0.710	0.800
$\bar{x}$	0.590	0.495	0.910	0.756	0.822
s	0.052	0.019	0.007	0.085	0.023
Pico 7	0.567	0.624	0.622	0.677	0.713
	0.706	0.609	0.535	0.644	0.746
	0.496	0.639	0.604	0.590	0.734
$\bar{x}$	0.590	0.616	0.587	0.637	0.731
s	0.106	0.011	0.045	0.043	0.016
Pico 10	1.15	0.934	0.875	0.985	0.894
	1.04	0.945	0.824	0.902	0.842
	1.11	0.934	0.927	0.962	0.744
$\bar{x}$	1.10	0.938	0.875	0.949	0.827
s	0.06	0.006	0.051	0.043	0.076
Pico A	0.898	0.688	1.07	1.09	1.06
	0.788	0.657	1.05	1.10	1.05
	0.879	0.697	1.09	1.04	1.04
$\bar{x}$	0.855	0.672	1.07	1.08	1.05
s	0.058	0.022	0.02	0.03	0.01
Pico B	2.22	1.78	3.93	3.60	3.02
	2.85	1.89	3.03	3.45	3.18
	2.63	1.85	2.93	3.34	2.44
$\bar{x}$	2.57	1.84	3.30	3.46	2.88
s	0.32	0.06	0.55	0.13	0.39

Tabla 20: Evolución de los valores de absorbancia para el vino Sin Levadura.

VINO SIN LEVADURA			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
0	7.19	0.103	0.019
	7.53	0.104	0.020
	7.24	0.102	0.020
$\bar{x}$	7.32	0.103	0.020
s	0.18	-.-	-.-
3	7.11	0.108	0.021
	7.28	0.108	0.021
	7.25	0.107	0.021
$\bar{x}$	7.21	0.108	0.021
s	0.09	-.-	-.-
6	7.32	0.117	0.023
	7.53	0.118	0.023
	7.45	0.116	0.022
$\bar{x}$	7.43	0.117	0.023
s	0.10	-.-	-.-
12	7.55	0.142	0.028
	7.66	0.142	0.028
	7.64	0.134	0.025
$\bar{x}$	7.62	0.139	0.027
s	0.06	0.004	0.001
15	7.57	0.144	0.031
	7.99	0.149	0.032
	7.94	0.144	0.031
$\bar{x}$	7.83	0.146	0.031
s	0.23	0.002	-.-

Tabla 20: (Continuación).

DÍAS	VINO SIN LEVADURA		
	280 nm	420 nm	520 nm
18	7.99	0.158	0.035
	8.19	0.157	0.035
	8.05	0.151	0.034
$\bar{x}$	8.08	0.155	0.035
s	0.10	0.003	-.-
21	7.86	0.161	0.035
	8.09	0.173	0.039
	7.86	0.155	0.033
$\bar{x}$	7.93	0.163	0.035
s	0.13	0.009	0.003
24	8.20	0.184	0.042
	8.41	0.179	0.039
	8.24	0.171	0.038
$\bar{x}$	8.28	0.177	0.039
s	0.11	0.006	0.002
27	8.33	0.194	0.044
	8.26	0.185	0.042
	8.26	0.176	0.039
$\bar{x}$	8.28	0.185	0.041
s	0.04	0.008	0.002

Tabla 21: Evolución de los valores de absorbancia para el vino tratado con Cuentas de 1 mm.

VINO con CUENTAS 1 mm			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
0	7.19	0.103	0.019
	7.53	0.104	0.020
	7.24	0.102	0.020
$\bar{x}$	7.32	0.103	0.020
s	0.18	-.-	-.-
3	7.07	0.092	0.016
	6.90	0.096	0.017
	6.61	0.094	0.017
$\bar{x}$	6.86	0.094	0.017
s	0.23	0.001	-.-
6	6.90	0.094	0.015
	6.77	0.093	0.015
	6.78	0.092	0.015
$\bar{x}$	6.82	0.093	0.015
s	0.07	0.001	-.-
12	7.18	0.102	0.015
	7.11	0.101	0.015
	7.24	0.102	0.016
$\bar{x}$	7.18	0.102	0.015
s	0.06	-.-	-.-
15	7.40	0.110	0.020
	7.23	0.106	0.018
	7.07	0.105	0.018
$\bar{x}$	7.23	0.107	0.019
s	0.16	0.002	0.001
18	7.49	0.113	0.022
	7.39	0.112	0.022
	7.40	0.113	0.022
$\bar{x}$	7.43	0.113	0.022
s	0.06	-.-	-.-

Tabla 21: (Continuación).

VINO con FICHAS 1 mm			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
21	7.28	0.115	0.021
	7.54	0.115	0.020
	7.29	0.115	0.020
$\bar{x}$	7.37	0.115	0.020
s	0.15	-.-	-.-
24	7.73	0.122	0.022
	7.91	0.125	0.023
	7.73	0.127	0.024
$\bar{x}$	7.79	0.124	0.023
s	0.10	0.002	0.001
27	7.81	0.126	0.023
	7.85	0.124	0.022
	7.66	0.125	0.022
$\bar{x}$	7.77	0.125	0.022
s	0.10	0.001	-.-
30	8.20	0.135	0.025
	8.12	0.135	0.025
	7.88	0.143	0.031
$\bar{x}$	8.06	0.137	0.027
s	0.17	0.004	0.003
33	7.54	0.147	0.036
	8.05	0.139	0.027
	8.21	0.141	0.027
$\bar{x}$	7.93	0.142	0.030
s	0.35	0.004	0.005

Tabla 21: (Continuación).

VINO con CUENTAS 1 mm			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
36	7.79	0.153	0.037
	8.41	0.144	0.028
	8.21	0.143	0.027
$\bar{x}$	8.13	0.146	0.030
s	0.32	0.005	0.005
39	8.07	0.169	0.033
	8.39	0.174	0.031
	8.30	0.150	0.032
$\bar{x}$	8.25	0.164	0.032
s	0.16	0.012	0.001
45	8.34	0.165	0.036
	8.83	0.168	0.036
	8.50	0.162	0.032
$\bar{x}$	8.55	0.165	0.034
s	0.25	0.003	0.002
48	8.38	0.173	0.036
	9.00	0.179	0.038
	8.77	0.171	0.032
$\bar{x}$	8.71	0.174	0.035
s	0.31	0.004	0.003
51	9.52	0.187	0.032
	9.22	0.184	0.036
	9.06	0.181	0.036
$\bar{x}$	9.26	0.184	0.034
s	0.23	0.003	0.002

Tabla 22: Evolución de los valores de absorbancia para el vino tratado con cuentas de 2 mm.

VINO con CUENTAS 2 mm			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
0	7.19	0.103	0.019
	7.53	0.104	0.020
	7.24	0.102	0.020
$\bar{x}$	7.32	0.103	0.020
s	0.18	-.-	-.-
3	7.11	0.106	0.022
	7.26	0.101	0.019
	7.28	0.099	0.018
$\bar{x}$	7.22	0.102	0.020
s	0.09	0.003	0.002
6	6.94	0.100	0.018
	6.76	0.094	0.016
	6.68	0.091	0.015
$\bar{x}$	6.79	0.095	0.016
s	0.13	0.004	0.001
12	7.55	0.099	0.014
	7.02	0.099	0.014
	6.62	0.092	0.014
$\bar{x}$	7.06	0.097	0.014
s	0.47	0.004	-.-
15	7.05	0.104	0.018
	7.06	0.103	0.018
	7.32	0.103	0.018
$\bar{x}$	7.14	0.103	0.018
s	0.15	-.-	-.-
18	7.43	0.109	0.021
	7.31	0.109	0.021
	7.19	0.107	0.021
$\bar{x}$	7.31	0.108	0.021
s	0.12	0.001	-.-

Tabla 22: (Continuación).

VINO con CUENTAS 2 mm			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
21	7.28	0.109	0.019
	7.37	0.113	0.020
	7.15	0.108	0.019
$\bar{x}$	7.26	0.110	0.019
s	0.11	0.002	-.-
24	7.55	0.116	0.021
	7.46	0.117	0.021
	7.50	0.116	0.022
$\bar{x}$	7.50	0.116	0.021
s	0.04	-.-	-.-
27	7.53	0.117	0.022
	7.30	0.117	0.021
	7.71	0.113	0.019
$\bar{x}$	7.51	0.115	0.020
s	0.20	0.002	0.001
30	7.85	0.123	0.022
	7.72	0.125	0.022
	7.76	0.122	0.020
$\bar{x}$	7.77	0.123	0.021
s	0.07	0.001	0.001
33	8.02	0.133	0.025
	7.95	0.133	0.024
	7.94	0.132	0.025
$\bar{x}$	7.97	0.132	0.024
s	0.04	-.-	-.-
36	8.07	0.139	0.027
	8.18	0.142	0.029
	8.04	0.133	0.025
$\bar{x}$	8.09	0.138	0.027
s	0.07	0.004	0.001

Tabla 22: (Continuación).

VINO con CUENTAS 2 mm			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
39	8.13	0.146	0.030
	8.52	0.144	0.027
	8.24	0.141	0.027
$\bar{x}$	8.29	0.143	0.027
s	0.20	0.002	0.001
45	8.56	0.159	0.032
	8.76	0.157	0.030
	8.70	0.156	0.031
$\bar{x}$	8.67	0.157	0.031
s	0.10	0.001	0.001
48	8.79	0.164	0.031
	8.78	0.165	0.029
	8.65	0.163	0.029
$\bar{x}$	8.74	0.163	0.029
s	0.08	0.001	0.001
51	8.93	0.172	0.033
	9.15	0.176	0.034
	9.05	0.170	0.030
$\bar{x}$	9.04	0.172	0.032
s	0.11	0.003	0.002
54	9.15	0.172	0.035
	9.18	0.184	0.037
	9.11	0.177	0.035
$\bar{x}$	9.14	0.177	0.035
s	0.04	0.006	0.001
57	8.93	0.178	0.036
	9.22	0.190	0.039
	9.39	0.187	0.038
$\bar{x}$	9.17	0.185	0.037
s	0.23	0.006	0.001

Tabla 23: Evolución de los valores de absorbancia del vino tratado con cuentas de 3 mm.

VINO con CUENTAS 3 mm			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
0	7.19	0.103	0.019
	7.53	0.104	0.020
	7.24	0.102	0.020
$\bar{x}$	7.32	0.103	0.020
s	0.18	-.-	-.-
3	7.00	0.102	0.023
	7.28	0.103	0.019
	6.88	0.099	0.018
$\bar{x}$	7.05	0.101	0.020
s	0.20	0.002	0.002
6	6.98	0.105	0.020
	7.29	0.108	0.020
	7.05	0.104	0.019
$\bar{x}$	7.11	0.106	0.020
s	0.16	0.002	-.-
12	7.28	0.112	0.018
	7.07	0.107	0.016
	7.15	0.104	0.016
$\bar{x}$	7.17	0.108	0.017
s	0.11	0.004	0.001
15	7.16	0.107	0.020
	7.10	0.107	0.020
	7.07	0.104	0.019
$\bar{x}$	7.11	0.106	0.020
s	0.04	0.001	-.-
18	7.32	0.108	0.021
	7.15	0.109	0.021
	7.27	0.106	0.021
$\bar{x}$	7.25	0.108	0.021
s	0.09	0.001	-.-
21	7.04	0.106	0.018
	7.08	0.110	0.021
	7.14	0.106	0.019
$\bar{x}$	7.08	0.107	0.019
s	0.05	0.002	0.001

Tabla 23: (Continuación).

VINO con CUENTAS 3 mm			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
24	7.33	0.115	0.021
	7.29	0.115	0.022
	7.37	0.112	0.020
$\bar{x}$	7.33	0.114	0.021
s	0.04	0.001	-.-
27	7.27	0.111	0.019
	7.38	0.113	0.019
	7.33	0.110	0.018
$\bar{x}$	7.32	0.111	0.018
s	0.06	0.001	-.-
30	7.48	0.117	0.020
	7.50	0.119	0.020
	7.63	0.123	0.022
$\bar{x}$	7.53	0.119	0.020
s	0.08	0.003	0.001
33	7.86	0.126	0.023
	7.75	0.129	0.025
	7.58	0.124	0.022
$\bar{x}$	7.73	0.126	0.023
s	0.14	0.002	0.001
36	7.81	0.133	0.027
	7.81	0.136	0.028
	7.82	0.128	0.025
$\bar{x}$	7.81	0.132	0.026
s	-.-	0.004	0.001
39	8.13	0.134	0.025
	7.96	0.140	0.027
	7.85	0.135	0.026
$\bar{x}$	7.98	0.136	0.026
s	0.14	0.003	-.-

Tabla 23: (Continuación).

VINO con CUENTAS 3 mm			
DÍAS	280 nm	420 nm	520 nm
45	8.25	0.145	0.028
	8.26	0.152	0.029
	8.21	0.145	0.028
$\bar{x}$	8.24	0.147	0.028
s	0.03	0.004	-.-
48	8.44	0.145	0.024
	8.56	0.158	0.029
	8.33	0.150	0.026
$\bar{x}$	8.44	0.151	0.026
s	0.12	0.006	0.002
51	8.57	0.151	0.026
	8.52	0.153	0.030
	8.66	0.155	0.028
$\bar{x}$	8.58	0.153	0.027
s	0.07	0.002	0.002
54	8.71	0.164	0.032
	8.89	0.178	0.037
	8.68	0.165	0.032
$\bar{x}$	8.76	0.169	0.033
s	0.11	0.007	0.002
57	8.84	0.170	0.034
	9.10	0.183	0.038
	8.90	0.173	0.035
$\bar{x}$	8.94	0.175	0.035
s	0.14	0.006	0.002
60	8.94	0.183	0.037
	9.05	0.188	0.038
	9.48	0.181	0.037
$\bar{x}$	9.16	0.184	0.037
s	0.28	0.003	-.-

Tabla 24: Contenidos en Ácidos Fenólicos (mg/L) del vino Inicial, Sin Levadura y tratado con diferentes tipos de cuentas de gel a los 27 días de iniciada la experiencia.

	INICIAL	SIN LEV.	1 mm	2 mm	3 mm
Gálico	5.33	4.56	3.57	3.81	3.98
	4.31	4.13	3.29	3.42	3.94
	3.83	4.43	3.30	2.93	3.92
$\bar{x}$	4.49	4.37	3.38	3.38	3.94
s	0.77	0.22	0.16	0.44	0.03
Protocatéquico	4.08	5.73	5.68	5.42	3.90
	3.00	7.09	5.05	4.03	4.19
	2.98	6.50	4.31	5.09	4.07
$\bar{x}$	3.35	6.44	5.01	4.84	4.05
s	0.63	0.68	0.68	0.73	0.14
Vaníllico	3.00	1.45	1.16	1.06	1.01
	2.64	1.22	1.13	1.07	1.30
	2.75	1.42	1.14	0.830	1.00
$\bar{x}$	2.79	1.36	1.14	0.990	1.10
s	0.18	0.12	0.02	0.136	0.17
Siringico	1.33	1.45	1.07	0.940	1.12
	1.19	1.22	1.03	0.890	1.08
	1.12	1.30	1.02	0.863	1.12
$\bar{x}$	1.21	1.32	1.04	0.897	1.10
s	0.11	0.12	0.03	0.039	0.02
Cafeico	0.573	0.562	0.411	0.404	0.416
	0.479	0.495	0.407	0.389	0.398
	0.509	0.556	0.418	0.305	0.406
$\bar{x}$	0.520	0.537	0.412	0.366	0.406
s	0.048	0.037	0.005	0.053	0.009
<i>p</i> -Cumárico	0.714	0.601	0.593	0.510	0.554
	0.557	0.535	0.431	0.495	0.550
	0.676	0.557	0.428	0.459	0.553
$\bar{x}$	0.649	0.564	0.484	0.488	0.552
s	0.081	0.033	0.094	0.026	0.002
Ferúlico	2.38	1.56	1.37	1.67	1.47
	1.59	1.48	1.33	1.44	1.55
	1.92	1.21	1.42	1.50	1.41
$\bar{x}$	1.96	1.41	1.37	1.53	1.47
s	0.40	0.18	0.04	0.12	0.07

Tabla 25: Contenidos en Ésteres Hidroxicinámicos y Tirosoles (mg/L) del vino Inicial, Sin Levadura y tratado con diferentes tipos de cuentas de gel a los 27 días de iniciada la experiencia.

	INICIAL	SIN LEV.	1 mm	2 mm	3 mm
<i>t</i> -Caftárico	19.7	18.0	13.8	14.3	14.7
	15.8	16.0	12.9	12.7	15.3
	15.9	17.7	13.0	12.7	14.5
$\bar{x}$	17.1	17.2	13.2	13.2	14.8
S	2.2	1.1	0.5	0.9	0.4
<i>c</i> -Cutárico	10.3	9.04	6.59	7.99	9.24
	8.13	7.68	6.13	6.78	7.59
	7.92	9.04	6.16	5.43	7.30
$\bar{x}$	8.78	8.58	6.29	6.73	8.04
s	1.32	0.78	0.26	1.28	1.05
Tirosoles	76.7	79.8	67.1	72.4	70.8
	69.2	78.5	62.2	59.6	69.0
	73.3	83.6	59.2	58.8	67.6
$\bar{x}$	73.0	80.6	62.8	63.6	69.1
s	3.8	2.6	4.0	7.6	1.6

Tabla 26: Contenidos en Derivados del Flavan-3ol (mg/L) del vino Inicial, Sin Levadura y tratado con diferentes tipos de cuentas de gel a los 27 días de iniciada la experiencia.

	INICIAL	SINLEV.	1 mm	2 mm	3 mm
(+)-Catequina	29.6	26.8	29.9	29.2	28.3
	27.8	27.1	28.4	28.3	29.6
$\bar{x}$	28.0	26.8	27.0	28.4	29.8
	28.5	26.9	28.4	28.6	29.2
s	1.0	0.2	1.4	0.5	0.8
(-)-Epicatequina	13.6	13.5	9.10	8.78	9.36
	11.8	12.3	9.10	8.64	8.82
$\bar{x}$	12.1	14.0	8.24	7.76	8.97
	12.5	13.2	8.81	8.39	9.05
s	1.0	0.9	0.50	0.55	0.28
Procianidina B1	14.9	13.3	13.4	12.2	12.5
	12.2	13.8	12.5	11.8	10.7
$\bar{x}$	11.9	13.1	11.2	12.4	13.4
	13.0	13.4	12.3	12.1	12.2
s	1.6	0.4	1.1	0.3	1.4
Procianidina B2	4.91	6.16	4.25	5.26	5.66
	3.83	5.41	4.61	5.21	4.91
$\bar{x}$	4.69	7.11	4.88	4.86	6.16
	4.47	6.22	4.58	5.11	5.57
s	0.57	0.85	0.32	0.22	0.63
Procianidina B3	12.4	12.4	10.8	11.0	9.36
	10.7	11.9	10.2	9.17	11.6
$\bar{x}$	10.3	12.9	9.88	9.28	9.07
	11.1	12.4	10.2	9.81	10.0
s	1.1	0.5	0.5	1.03	1.4
Procianidina B4	6.22	6.38	5.28	5.16	4.73
	6.05	5.65	5.11	4.36	4.09
$\bar{x}$	6.33	6.23	4.37	4.73	5.16
	6.20	6.08	4.92	4.75	4.66
s	0.14	0.38	0.48	0.40	0.54

Tabla 27: Contenidos en Compuestos Desconocidos (mg/L) del vino Inicial, Sin Levadura y tratado con diferentes tipos de cuentas de gel a los 27 días de iniciada la experiencia.

	INICIAL	SIN LEV.	1 mm	2 mm	3 mm
P. Agrupados	5.44	8.81	8.41	8.68	8.25
	6.10	9.45	7.99	8.40	8.26
	6.39	9.81	8.54	8.09	8.39
$\bar{x}$	5.97	9.36	8.31	8.39	8.30
s	0.49	0.51	0.29	0.30	0.08
Pico 1	5.28	5.14	4.28	4.08	3.59
	4.25	4.83	3.94	3.69	4.41
	4.45	4.26	3.92	3.44	3.54
$\bar{x}$	4.66	4.74	4.04	3.73	3.84
s	0.55	0.45	0.20	0.32	0.49
Pico 2	2.29	1.59	1.05	1.29	1.55
	1.81	1.64	1.45	1.22	1.15
	1.85	1.39	1.47	1.39	1.49
$\bar{x}$	1.98	1.54	1.32	1.30	1.40
s	0.27	0.13	0.24	0.08	0.22
Pico 3	3.13	3.20	2.92	2.86	2.88
	2.68	2.80	2.89	2.58	2.40
	2.54	3.05	2.71	2.47	2.82
$\bar{x}$	2.78	3.01	2.84	2.63	2.70
s	0.31	0.20	0.11	0.20	0.26
Pico 4	1.33	0.932	0.619	0.576	0.760
	1.27	0.910	0.604	0.703	0.723
	1.12	0.880	0.638	0.557	0.693
$\bar{x}$	1.24	0.907	0.620	0.612	0.725
s	0.11	0.026	0.017	0.079	0.034
Pico 6	0.818	0.986	0.634	0.761	0.705
	1.25	0.836	0.600	0.741	0.669
	1.02	0.921	0.611	0.515	0.700
$\bar{x}$	1.02	0.914	0.614	0.672	0.691
s	0.22	0.075	0.017	0.136	0.020

Tabla 27: (Continuación).

	INICIAL	SIN LEV.	1 mm	2 mm	3 mm
Pico 7	0.617	0.630	0.458	0.415	0.464
	0.614	0.540	0.440	0.425	0.480
	0.497	0.574	0.451	0.381	0.446
$\bar{x}$	0.576	0.581	0.449	0.406	0.463
s	0.068	0.045	0.009	0.023	0.017
Pico 8	1.88	2.13	1.39	1.52	1.31
	1.46	1.77	1.33	1.25	1.29
	1.39	2.33	1.35	1.26	1.40
$\bar{x}$	1.57	2.07	1.35	1.34	1.33
s	0.26	0.28	0.03	0.15	0.06
Pico 9	1.38	1.79	1.48	1.35	1.29
	1.09	1.72	1.40	1.48	1.45
	1.60	1.98	1.42	1.58	1.86
$\bar{x}$	1.35	1.83	1.43	1.47	1.53
s	0.26	0.13	0.04	0.12	0.29
Pico 10	1.15	0.998	1.10	1.07	0.817
	0.938	1.03	1.08	0.891	0.985
	1.09	1.20	0.884	0.995	1.02
$\bar{x}$	1.05	1.07	1.02	0.985	0.940
s	0.11	0.11	0.12	0.089	0.108
Pico A	0.880	0.985	0.946	0.936	0.878
	0.824	0.921	0.912	1.03	0.857
	0.977	0.894	0.960	0.895	0.861
$\bar{x}$	0.893	0.933	0.939	0.953	0.865
s	0.077	0.046	0.024	0.069	0.011
Pico B	2.53	2.38	2.50	2.05	2.29
	2.75	2.48	2.31	2.06	1.88
	2.49	2.69	1.90	1.98	2.24
$\bar{x}$	2.59	2.51	2.23	2.03	2.13
s	0.14	0.16	0.31	0.04	0.22

Tabla 28: Contenidos en Ácidos Fenólicos (mg/L) en el vino Inicial, Sin Levadura y tratado con diferentes tipos de cuentas de gel, al final de la experiencia.

	INICIAL	SIN LEV.	1 mm	2 mm	3 mm
Gálico	5.33	4.56	4.57	4.41	4.50
	4.31	4.13	3.34	4.37	3.75
	3.83	4.43	4.39	3.67	4.10
	$\bar{x}$	4.49	4.37	4.10	4.15
s	0.77	0.22	0.66	0.42	0.38
Protocatéquico	4.08	5.73	9.53	9.52	9.35
	3.00	7.09	10.5	9.32	8.75
	2.98	6.50	11.3	8.09	9.00
	$\bar{x}$	3.35	6.44	10.4	8.97
s	0.63	0.68	0.89	0.77	0.30
Vanílico	3.00	1.45	2.20	2.10	1.82
	2.64	1.22	2.13	1.98	2.03
	2.75	1.42	2.08	2.31	1.99
	$\bar{x}$	2.79	1.36	2.13	2.13
s	0.18	0.12	0.06	0.17	0.11
Siringico	1.33	1.45	1.14	1.12	1.03
	1.19	1.22	0.753	1.27	1.15
	1.12	1.30	1.07	1.17	1.27
	$\bar{x}$	1.21	1.32	0.987	1.18
s	0.11	0.12	0.206	0.08	0.12
Cafeico	0.573	0.562	0.630	0.677	0.601
	0.479	0.495	0.660	0.629	0.620
	0.509	0.556	0.705	0.662	0.594
	$\bar{x}$	0.520	0.537	0.665	0.655
s	0.048	0.037	0.037	0.024	0.013
<i>p</i> -Cumárico	0.714	0.601	0.688	0.661	0.635
	0.557	0.535	0.484	0.654	0.509
	0.676	0.557	0.666	0.705	0.562
	$\bar{x}$	0.649	0.564	0.612	0.673
s	0.081	0.033	0.111	0.027	0.063
Ferúlico	2.38	1.56	1.30	1.20	1.21
	1.59	1.48	1.07	1.19	1.06
	1.92	1.21	1.26	1.18	1.15
	$\bar{x}$	1.96	1.41	1.21	1.19
s	0.40	0.18	0.12	0.01	0.08

Tabla 29: Contenidos en Ésteres de Ácidos Hidroxicinámicos (mg/L) y Tirosoles (mg/L) del vino Inicial, Sin Levadura y tratado con diferentes tipos de cuentas de gel, al final de la experiencia.

	INICIAL	SIN LEV.	1 mm	2 mm	3 mm
<i>t</i> -Caftárico	19.7	18.0	15.4	14.2	14.9
	15.8	16.0	15.1	13.9	12.7
	15.9	17.7	14.9	13.8	13.2
$\bar{x}$	17.1	17.2	15.1	13.9	13.6
S	2.2	1.1	0.2	0.2	1.2
<i>c</i> -Cutárico	10.3	9.04	7.16	6.53	5.07
	8.13	7.68	7.25	6.44	6.91
	7.92	9.04	7.71	6.53	6.05
$\bar{x}$	8.78	8.58	7.37	6.50	6.01
s	1.32	0.78	0.30	0.05	0.92
Tirosoles	76.7	79.8	68.0	77.3	60.6
	69.2	78.5	59.1	74.7	50.3
	73.3	83.6	69.8	76.2	66.3
$\bar{x}$	73.0	80.6	65.6	76.0	59.0
s	3.8	2.6	5.7	1.3	8.1

Tabla 30: Contenidos en Derivados del Flavan-3-ol (mg/L) del vino Inicial, Sin Levadura y tratado con diferentes tipos de cuentas de gel, al final de la experiencia.

	INICIAL	SIN LEV.	1 mm	2 mm	3 mm
(+)-Catequina	29.6	26.8	27.4	28.4	29.5
	27.8	27.1	29.0	29.8	29.6
	28.0	26.8	28.9	27.6	27.1
$\bar{x}$	28.5	26.9	28.4	28.6	28.7
s	1.0	0.2	0.9	1.1	1.4
(-)-Epicatequina	13.6	13.5	10.1	11.7	11.0
	11.8	12.3	10.8	11.4	10.3
	12.1	14.0	9.77	10.1	10.9
$\bar{x}$	12.5	13.2	10.2	11.1	10.7
s	1.0	0.9	0.5	0.8	0.4
Procianidina B1	14.9	13.3	14.4	12.6	12.9
	12.2	13.8	15.5	14.7	15.7
	11.9	13.1	14.1	15.1	15.8
$\bar{x}$	13.0	13.4	14.6	14.1	14.8
s	1.6	0.4	0.7	1.3	1.6
Procianidina B2	4.91	6.16	6.15	6.84	5.74
	3.83	5.41	5.84	6.85	5.70
	4.69	7.11	6.31	6.52	6.33
$\bar{x}$	4.47	6.22	6.10	6.74	5.92
s	0.57	0.85	0.24	0.19	0.35
Procianidina B3	12.4	12.4	10.6	10.5	10.0
	10.7	11.9	10.6	10.5	9.53
	10.3	12.9	9.90	10.4	9.89
$\bar{x}$	11.1	12.4	10.4	10.4	9.80
s	1.1	0.5	0.4	0.1	0.24
Procianidina B4	6.22	6.38	6.90	8.37	7.83
	6.05	5.65	7.41	8.17	7.83
	6.33	6.23	7.48	7.98	7.42
$\bar{x}$	6.20	6.08	7.26	8.17	7.69
s	0.14	0.38	0.32	0.20	0.24

Tabla 31: Contenidos en Compuestos Desconocidos (mg/L) del vino Inicial, Sin Levadura y tratado con diferentes tipos de cuentas de gel, al final de la experiencia.

	INICIAL	SIN LEV.	1 mm	2 mm	3 mm
P. Agrupados	5.44	8.81	9.66	9.62	9.55
	6.10	9.45	9.24	9.84	9.88
	6.39	9.81	10.9	10.1	9.92
$\bar{x}$	5.97	9.36	9.93	9.85	9.78
s	0.49	0.51	0.86	0.24	0.20
Pico 1	5.28	5.14	5.35	5.44	5.75
	4.25	4.83	5.05	5.73	5.95
	4.45	4.26	4.74	4.82	5.02
$\bar{x}$	4.66	4.74	5.04	5.33	5.57
s	0.55	0.45	0.30	0.46	0.49
Pico 2	2.29	1.59	2.81	2.82	2.60
	1.81	1.64	3.05	2.78	2.39
	1.85	1.39	3.52	2.77	2.95
$\bar{x}$	1.98	1.54	3.12	2.79	2.64
s	0.27	0.13	0.36	0.03	0.28
Pico 3	3.13	3.20	3.73	3.74	3.80
	2.68	2.80	3.25	3.53	3.39
	2.54	3.05	3.79	3.79	3.64
$\bar{x}$	2.78	3.01	3.59	3.68	3.61
s	0.31	0.20	0.30	0.14	0.21
Pico 4	1.33	0.932	1.16	1.12	0.910
	1.27	0.910	0.995	0.782	0.910
	1.12	0.880	0.840	1.05	0.955
$\bar{x}$	1.24	0.907	0.998	0.983	0.925
s	0.11	0.026	0.160	0.178	0.026
Pico 6	0.818	0.986	1.04	1.16	1.11
	1.25	0.836	1.01	1.15	1.45
	1.02	0.921	1.01	1.11	1.35
$\bar{x}$	1.02	0.914	1.02	1.14	1.30
s	0.22	0.075	0.02	0.03	0.17

Tabla 31: (Continuación).

	INICIAL	SIN LEV.	1 mm	2 mm	3 mm
Pico 7	0.617	0.630	0.489	0.476	0.487
	0.614	0.540	0.400	0.436	0.417
	0.497	0.574	0.528	0.476	0.347
$\bar{x}$	0.576	0.581	0.472	0.462	0.416
s	0.068	0.045	0.065	0.023	0.070
Pico 8	1.88	2.13	2.89	2.45	2.35
	1.46	1.77	2.75	2.83	1.95
	1.39	2.33	2.16	2.01	2.50
$\bar{x}$	1.57	2.07	2.60	2.43	2.26
s	0.26	0.28	0.39	0.41	0.28
Pico 9	1.38	1.79	1.51	1.35	1.46
	1.09	1.72	1.32	1.49	1.52
	1.60	1.98	1.84	1.64	1.35
$\bar{x}$	1.35	1.83	1.55	1.49	1.44
s	0.26	0.13	0.26	0.14	0.09
Pico 10	1.15	0.998	1.42	1.22	1.56
	0.938	1.03	1.06	1.43	1.41
	1.09	1.20	1.43	1.22	1.16
$\bar{x}$	1.05	1.07	1.30	1.29	1.37
s	0.11	0.11	0.21	0.12	0.20
Pico A	0.880	0.985	0.744	0.836	0.985
	0.824	0.921	1.02	0.867	0.670
	0.977	0.894	0.857	0.919	0.857
$\bar{x}$	0.893	0.933	0.873	0.874	0.837
s	0.077	0.046	0.138	0.041	0.158
Pico B	2.53	2.38	2.48	2.45	2.48
	2.75	2.48	2.45	2.47	2.05
	2.49	2.69	2.55	2.59	2.69
$\bar{x}$	2.59	2.51	2.49	2.50	2.40
s	0.14	0.16	0.05	0.08	0.33

Tabla 32: Evolución de los valores de absorbancia a 280 nm en el vino almacenado durante un año.

Meses	MUESTRAS				
	Vino Sin Levadura	Levadura 2 g/L	Cuentas 1 mm	Cuentas 2 mm	Cuentas 3 mm
0	7.19	7.19	7.19	7.19	7.19
	7.53	7.53	7.53	7.53	7.53
	7.24	7.24	7.24	7.24	7.24
	7.32	7.32	7.32	7.32	7.32
	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
3	7.06	7.23	6.69	6.60	6.49
	7.40	7.75	6.68	6.64	6.49
	7.41	7.83	6.70	6.71	6.75
	7.29	7.60	6.69	6.65	6.57
	0.20	0.32	0.01	0.06	0.15
6	6.63	6.98	6.42	6.35	6.38
	6.50	6.64	6.66	6.61	6.69
	6.79	6.76	6.47	6.56	6.43
	6.64	6.79	6.51	6.50	6.50
	0.14	0.17	0.13	0.14	0.17
9	7.56	7.39	6.33	6.73	6.66
	7.74	7.93	6.46	6.78	6.62
	7.49	8.02	6.83	6.75	6.78
	7.59	7.78	6.54	6.75	6.68
	0.13	0.34	0.26	0.02	0.08
12	7.82	8.32	7.13	7.61	6.84
	7.92	8.36	6.96	7.08	6.90
	7.90	8.28	6.99	6.91	6.91
	7.88	8.32	7.02	7.20	6.88
	0.05	0.04	0.09	0.36	0.04

Tabla 33: Evolución de los valores de absorbancia a 420 nm en el vino almacenado durante un año.

Meses	MUESTRAS				
	Vino Sin Levadura	Levadura 2 g/L	Cuentas 1 mm	Cuentas 2 mm	Cuentas 3 mm
0	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103
	0.104	0.104	0.104	0.104	0.104
	0.102	0.102	0.102	0.102	0.102
	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103
	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-
3	0.134	0.112	0.094	0.099	0.098
	0.130	0.117	0.096	0.098	0.103
	0.128	0.114	0.098	0.098	0.104
	0.130	0.114	0.095	0.098	0.101
	0.003	0.002	0.002	-.-	0.003
6	0.140	0.136	0.100	0.089	0.094
	0.144	0.129	0.093	0.097	0.099
	0.136	0.129	0.092	0.096	0.096
	0.140	0.131	0.095	0.094	0.096
	0.003	0.004	0.004	0.004	0.002
9	0.167	0.119	0.094	0.092	0.092
	0.170	0.130	0.099	0.096	0.092
	0.164	0.132	0.095	0.098	0.094
	0.167	0.127	0.096	0.095	0.092
	0.003	0.006	0.002	0.003	0.001
12	0.185	0.155	0.101	0.104	0.106
	0.185	0.152	0.103	0.106	0.103
	0.186	0.151	0.105	0.104	0.103
	0.185	0.152	0.102	0.104	0.103
	-.-	0.002	0.002	0.001	0.001

Tabla 34: Evolución de los valores de absorbancia a 520 nm en el vino almacenado durante un año.

Meses	MUESTRAS				
	Vino Sin Levadura	Levadura 2 g/L	Cuentas 1 mm	Cuentas 2 mm	Cuentas 3 mm
0	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019
	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020
	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020
	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019
	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-
3	0.026	0.017	0.011	0.013	0.012
	0.022	0.017	0.012	0.012	0.015
	0.021	0.015	0.012	0.012	0.014
	0.023	0.016	0.011	0.012	0.013
	0.002	0.001	-.-	-.-	0.001
6	0.037	0.027	0.019	0.014	0.017
	0.030	0.023	0.016	0.019	0.020
	0.033	0.024	0.016	0.016	0.016
	0.033	0.024	0.017	0.016	0.017
	0.003	0.002	0.001	0.002	0.002
9	0.036	0.019	0.012	0.014	0.013
	0.037	0.021	0.012	0.014	0.012
	0.035	0.021	0.013	0.016	0.013
	0.036	0.020	0.012	0.014	0.012
	0.001	0.001	-.-	0.001	-.-
12	0.045	0.029	0.020	0.017	0.017
	0.041	0.028	0.018	0.017	0.017
	0.041	0.028	0.017	0.018	0.017
	0.042	0.028	0.018	0.017	0.017
	0.002	-.-	0.001	-.-	-.-

Tabla 35: Evolución de los valores de absorbancia para la disolución modelo de (+)-catequina con y sin levadura.

SEMANAS	280 nm		420 nm		520 nm				
	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con			
0	6.16	6.16	0.019	0.019	0.001	0.001			
	5.90	5.90	0.015	0.015	0.001	0.001			
	6.00	6.00	0.015	0.015	0.001	0.001			
$\bar{x}$	6.02	6.02	0.016	0.016	0.001	0.001			
s	0.13	0.13	0.002	0.002	-.-	-.-			
1	6.36	6.17	0.079	0.059	0.027	0.041			
	5.93	5.64	0.075	0.071	0.026	0.049			
	6.00	6.23	0.072	0.068	0.026	0.043			
$\bar{x}$	6.10	6.01	0.075	0.066	0.026	0.044			
s	0.23	0.32	0.003	0.006	-.-	0.004			
2	6.71	6.68	0.268	0.147	0.103	0.094			
	6.52	6.16	0.259	0.142	0.096	0.097			
	6.27	5.88	0.265	0.115	0.100	0.077			
$\bar{x}$	6.50	6.24	0.264	0.134	0.099	0.089			
s	0.22	0.40	0.004	0.017	0.003	0.010			
3	6.37	6.59	0.454	0.155	0.180	0.073			
	6.60	6.26	0.479	0.163	0.184	0.083			
	6.37	6.51	0.491	0.184	0.192	0.087			
$\bar{x}$	6.45	6.45	0.474	0.167	0.185	0.081			
s	0.13	0.17	0.018	0.014	0.006	0.007			
	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con
4	6.65	6.31	6.41	0.690	0.435	0.215	0.285	0.167	0.080
	6.82	6.55	6.22	0.718	0.462	0.218	0.288	0.177	0.089
	6.53	6.21	6.35	0.686	0.445	0.255	0.270	0.178	0.100
$\bar{x}$	6.67	6.36	6.33	0.698	0.447	0.229	0.281	0.174	0.089
s	0.14	0.17	0.10	0.017	0.013	0.022	0.009	0.006	0.010
5	7.01	6.47	6.74	0.768	0.433	0.278	0.316	0.160	0.095
	7.03	6.30	6.37	0.805	0.442	0.274	0.356	0.159	0.099
	6.86	6.37	6.40	0.847	0.466	0.319	0.347	0.166	0.112
$\bar{x}$	6.97	6.38	6.50	0.806	0.447	0.290	0.339	0.161	0.102
s	0.09	0.08	0.20	0.039	0.017	0.024	0.020	0.003	0.008
6	6.76	5.98	6.86	0.958	0.475	0.343	0.407	0.148	0.109
	6.80	6.05	6.80	0.943	0.460	0.336	0.409	0.148	0.115
	6.97	5.98	6.82	0.993	0.469	0.398	0.410	0.153	0.135
$\bar{x}$	6.84	6.00	6.83	0.964	0.468	0.359	0.408	0.149	0.119
s	0.11	0.04	0.03	0.025	0.007	0.033	0.001	0.002	0.013
8	6.19	5.92	6.81	0.934	0.515	0.394	0.352	0.160	0.121
	6.23	5.91	6.82	0.937	0.547	0.414	0.352	0.165	0.133
	6.20	5.96	6.95	0.924	0.540	0.470	0.355	0.162	0.150
$\bar{x}$	6.21	5.93	6.86	0.931	0.534	0.426	0.353	0.162	0.134
s	0.02	0.03	0.08	0.006	0.016	0.039	0.001	0.002	0.014

Tabla 36: Evolución de los contenidos en (+)-catequina y Picos Agrupados (mg/L) con y sin levadura en la disolución modelo de (+)-catequina medidos a 280 nm.

SEMANAS	(+)-catequina		Picos Agrupados			
	Sin	Con	Sin	Con		
0	512	512	0.001	0.001		
	507	507	0.001	0.001		
	505	505	0.001	0.001		
	$\bar{x}$	508	508	0.001	0.001	
s	3.5	3.5	-.-	-.-		
1	494	437	0.655	0.001		
	489	433	0.701	0.001		
	491	431	0.914	0.001		
	$\bar{x}$	492	434	0.756	0.001	
s	2.5	3.0	0.138	-.-		
2	443	395	9.12	0.940		
	405	398	7.88	0.919		
	420	394	6.99	0.880		
	$\bar{x}$	423	397	8.00	0.912	
s	19.1	2.3	1.07	0.030		
3	327	396	19.3	1.12		
	326	386	19.1	1.04		
	312	390	18.6	1.03		
	$\bar{x}$	322	391	19.0	1.06	
s	8.4	5.0	0.4	0.05		
	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con
4	295	318	381	25.3	11.2	3.37
	284	335	395	29.2	14.1	2.41
	286	321	411	26.9	13.7	2.80
	$\bar{x}$	288	325	396	27.1	13.0
s	5.9	9.1	15.0	1.7	1.6	0.48
5	231	295	375	29.8	12.9	1.73
	235	307	385	32.1	12.7	1.29
	248	299	363	30.1	15.4	1.48
	$\bar{x}$	238	300	374	30.7	13.6
s	8.9	6.1	11.0	1.2	1.5	0.22
6	277	325	398	27.8	13.5	9.90
	260	330	380	28.6	16.1	10.0
	279	309	399	30.1	16.0	10.4
	$\bar{x}$	272	321	392	28.8	15.2
s	10.4	11.0	10.7	1.2	1.5	0.3
8	233	310	394	29.9	12.2	12.2
	226	279	415	26.4	11.8	12.7
	220	281	398	29.2	11.4	9.70
	$\bar{x}$	226	290	402	28.5	11.8
s	6.5	17.3	11.2	1.8	0.4	1.6

Tabla 37: Evolución de los contenidos en Picos Agrupados (unidades de área) con y sin levadura en la disolución modelo de (+)-catequina medidos a 420 nm.

SEMANAS	Picos Agrupados		
	Sin	Con	Con
0	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
$\bar{x}$	-.-	-.-	-.-
$s$	-.-	-.-	-.-
1	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
$\bar{x}$	-.-	-.-	-.-
$s$	-.-	-.-	-.-
2	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
$\bar{x}$	-.-	-.-	-.-
$s$	-.-	-.-	-.-
3	102390	0.001	0.001
	105295	0.001	0.001
	108828	0.001	0.001
	105504	0.001	0.001
$\bar{x}$	3224	-.-	-.-
$s$	-.-	-.-	-.-
	Sin	Con	Con
4	156770	0.001	0.001
	163887	0.001	0.001
	178542	0.001	0.001
	166400	0.001	0.001
$\bar{x}$	11101	-.-	-.-
$s$	-.-	-.-	-.-
5	182632	114582	0.001
	182318	104860	0.001
	249420	123969	0.001
	204790	114470	0.001
$\bar{x}$	38651	9555	-.-
$s$	-.-	-.-	-.-
6	506378	393993	322805
	467710	377552	322805
	394483	448933	334356
	456190	406826	326655
$\bar{x}$	56830	37380	6669
$s$	-.-	-.-	-.-
8	369619	335583	164820
	239232	214027	100299
	310273	275161	128827
	306375	274924	131315
$\bar{x}$	65280	60778	32332
$s$	-.-	-.-	-.-

Tabla 38: Evolución de los contenidos en Picos Desconocidos (mg/L) con y sin levadura en la disolución modelo de (+)-catequina medidos a 280 nm.

SEMANAS	Pico 1		Pico 2		Pico 4				
	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con			
0	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
$\bar{x}$	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
s	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-			
1	2.30	2.67	0.001	1.56	3.19	2.78			
	1.90	2.58	0.001	1.55	3.32	2.59			
	2.76	2.90	0.001	1.71	3.20	3.72			
$\bar{x}$	2.32	2.72	0.001	1.60	3.24	3.03			
s	0.43	0.17	-.-	0.09	0.07	0.60			
2	4.62	1.98	1.30	1.56	5.99	2.35			
	4.36	1.43	1.15	1.53	5.64	1.84			
	3.87	1.44	0.991	1.39	5.12	1.75			
$\bar{x}$	4.28	1.62	1.15	1.49	5.59	1.98			
s	0.38	0.32	0.15	0.09	0.44	0.32			
3	3.55	1.56	1.73	1.60	3.36	1.41			
	3.42	1.46	1.43	1.56	3.03	1.42			
	3.76	1.94	1.47	1.62	3.34	1.63			
$\bar{x}$	3.58	1.65	1.54	1.59	3.24	1.49			
s	0.17	0.26	0.16	0.03	0.18	0.12			
	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con
4	2.76	3.09	1.58	1.74	2.33	1.53	2.03	1.93	1.55
	2.82	3.12	1.28	1.80	2.42	1.32	2.11	2.21	1.20
	3.20	3.01	1.73	1.70	2.09	1.74	2.24	2.07	1.30
$\bar{x}$	2.92	3.07	1.53	1.75	2.28	1.53	2.12	2.07	1.35
s	0.24	0.06	0.23	0.05	0.17	0.21	0.10	0.14	0.18
5	2.05	2.53	1.17	1.81	2.16	1.80	1.75	1.60	0.629
	2.91	2.84	1.21	2.56	3.02	2.40	2.31	1.72	0.726
	2.81	2.61	1.22	2.40	2.97	2.17	2.38	1.56	0.681
$\bar{x}$	2.59	2.66	1.20	2.26	2.72	2.12	2.15	1.62	0.678
s	0.47	0.16	0.02	0.39	0.49	0.30	0.34	0.09	0.048
6	2.40	2.07	1.31	1.72	2.90	0.791	2.09	0.780	1.33
	2.68	2.36	1.21	2.97	4.47	0.837	2.04	0.866	1.19
	2.18	2.29	1.67	2.43	1.99	0.992	2.07	0.865	0.725
$\bar{x}$	2.42	2.24	1.39	2.37	3.12	0.873	2.07	0.837	1.08
s	0.25	0.15	0.24	0.63	1.25	0.105	0.02	0.049	0.32
8	1.86	1.46	1.10	1.09	0.810	0.001	1.88	0.001	0.001
	1.80	1.29	1.25	1.09	0.798	0.001	1.50	0.001	0.001
	1.77	1.32	1.18	1.12	0.819	0.001	1.70	0.001	0.001
$\bar{x}$	1.81	1.35	1.17	1.10	0.809	0.001	1.69	0.001	0.001
s	0.04	0.09	0.08	0.02	0.010	-.-	0.19	-.-	-.-

Tabla 38: (Continuación).

SEMANAS	Pico 5			Pico 6			Pico 7		
	Sin	Con		Sin	Con		Sin	Con	
0	0.001	0.001		0.001	0.001		0.001	0.001	
	0.001	0.001		0.001	0.001		0.001	0.001	
	0.001	0.001		0.001	0.001		0.001	0.001	
	0.001	0.001		0.001	0.001		0.001	0.001	
$\bar{x}$	0.001	0.001		0.001	0.001		0.001	0.001	
s	--	--		--	--		--	--	
1	0.001	0.001		1.30	0.001		0.001	0.001	
	0.001	0.001		1.34	0.001		0.001	0.001	
	0.001	0.001		1.60	0.001		0.001	0.001	
	0.001	0.001		1.41	0.001		0.001	0.001	
$\bar{x}$	0.001	0.001		1.41	0.001		0.001	0.001	
s	--	--		0.16	--		--	--	
2	1.27	0.001		2.39	0.001		1.32	0.001	
	1.11	0.001		2.40	0.001		1.27	0.001	
	1.09	0.001		2.37	0.001		1.01	0.001	
	1.16	0.001		2.39	0.001		1.20	0.001	
$\bar{x}$	1.16	0.001		2.39	0.001		1.20	0.001	
s	0.10	--		0.02	--		0.17	--	
3	1.70	0.001		3.80	1.08		1.88	0.001	
	1.61	0.001		3.63	1.01		1.73	0.001	
	1.47	0.001		3.03	1.35		1.75	0.001	
	1.59	0.001		3.49	1.14		1.78	0.001	
$\bar{x}$	1.59	0.001		3.49	1.14		1.78	0.001	
s	0.12	--		0.40	0.18		0.08	--	
	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con
4	1.80	1.34	0.001	2.08	2.56	1.71	2.18	1.67	0.001
	1.94	1.50	0.001	2.37	2.83	1.41	2.20	1.77	0.001
	1.88	1.38	0.001	2.52	2.95	1.50	1.98	1.50	0.001
	1.87	1.41	0.001	2.32	2.78	1.54	2.12	1.65	0.001
$\bar{x}$	1.87	1.41	0.001	2.32	2.78	1.54	2.12	1.65	0.001
s	0.07	0.08	--	0.22	0.20	0.15	0.12	0.14	--
5	1.87	1.45	0.001	2.36	2.95	1.85	2.30	1.47	0.619
	2.06	1.84	0.001	2.96	3.22	1.93	2.65	1.79	0.653
	2.55	1.88	0.001	2.77	3.81	2.14	2.42	1.36	0.630
	2.16	1.72	0.001	2.70	3.33	1.97	2.46	1.54	0.634
$\bar{x}$	2.16	1.72	0.001	2.70	3.33	1.97	2.46	1.54	0.634
s	0.35	0.24	--	0.31	0.44	0.15	0.18	0.22	0.017
6	4.75	1.56	1.77	4.15	4.79	3.04	3.65	1.95	1.06
	5.77	2.23	1.79	4.76	5.49	2.97	3.68	2.72	1.01
	5.91	4.28	2.17	4.72	5.15	3.71	3.83	1.89	1.30
	5.47	2.69	1.91	4.54	5.14	3.24	3.72	2.19	1.12
$\bar{x}$	5.47	2.69	1.91	4.54	5.14	3.24	3.72	2.19	1.12
s	0.63	1.42	0.22	0.34	0.35	0.41	0.09	0.46	0.16
8	5.57	1.30	3.40	4.12	3.50	3.32	4.83	1.07	1.64
	6.33	1.19	3.94	3.70	3.42	3.56	4.20	1.02	1.75
	6.03	1.61	3.19	3.24	3.35	3.40	3.59	0.891	1.70
	5.97	1.37	3.51	3.69	3.42	3.43	4.21	0.992	1.70
$\bar{x}$	5.97	1.37	3.51	3.69	3.42	3.43	4.21	0.992	1.70
s	0.38	0.22	0.38	0.44	0.08	0.12	0.62	0.091	0.06

Tabla 38: (Continuación).

SEMANAS	Pico 8		Pico 9			
	Sin	Con	Sin	Con		
0	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	0.001	0.001	0.001	0.001		
s	-.-	-.-	-.-	-.-		
1	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	0.001	0.001	0.001	0.001		
s	-.-	-.-	-.-	-.-		
2	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	0.001	0.001	0.001	0.001		
s	-.-	-.-	-.-	-.-		
3	2.07	0.001	0.001	0.001		
	3.60	0.001	0.001	0.001		
	2.24	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	2.64	0.001	0.001	0.001		
s	0.84	-.-	-.-	-.-		
	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con
4	2.50	1.68	0.001	0.001	0.001	0.001
	3.51	3.57	0.001	0.001	0.001	0.001
	4.26	2.99	0.001	0.001	0.001	0.001
$\bar{x}$	3.43	2.75	0.001	0.001	0.001	0.001
s	0.88	0.97	-.-	-.-	-.-	-.-
5	3.41	3.08	1.28	1.13	0.001	1.52
	4.54	4.13	1.59	1.36	0.001	1.14
	3.96	3.21	1.52	1.19	0.001	1.35
$\bar{x}$	3.97	3.47	1.46	1.23	0.001	1.34
s	0.57	0.58	0.16	0.12	-.-	0.19
6	8.91	6.48	2.98	1.79	0.763	1.66
	9.64	7.44	2.97	1.45	1.82	1.93
	10.3	6.88	4.04	1.04	1.77	1.79
$\bar{x}$	9.61	6.94	3.33	1.43	1.45	1.79
s	0.69	0.48	0.62	0.38	0.60	0.14
8	3.80	2.39	3.78	1.20	0.001	1.40
	3.09	1.69	4.13	1.30	0.001	1.63
	4.58	2.40	3.85	1.41	0.001	1.52
$\bar{x}$	3.82	2.16	3.92	1.30	0.001	1.52
s	0.74	0.41	0.18	0.11	-.-	0.11

Tabla 39: Evolución de los valores de absorbancia para la disolución modelo de (-)-epicatequina con y sin levadura.

SEMANAS	280 nm		420 nm			520 nm			
	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	
0	6.07	6.15	0.010	0.015	0.002	0.004			
	6.17	6.15	0.010	0.018	0.003	0.004			
	6.09	6.15	0.009	0.013	0.001	0.004			
$\bar{x}$	6.11	6.15	0.009	0.015	0.002	0.003			
s	0.05	-.-	-.-	0.002	-.-	-.-			
1	5.43	6.26	0.068	0.044	0.019	0.025			
	5.46	6.39	0.077	0.044	0.020	0.024			
	5.47	6.33	0.064	0.039	0.018	0.021			
$\bar{x}$	5.45	6.33	0.069	0.042	0.018	0.023			
s	0.02	0.06	0.006	0.002	0.001	0.002			
2	6.40	6.67	0.208	0.090	0.049	0.033			
	6.56	6.57	0.251	0.103	0.059	0.036			
	6.65	6.73	0.246	0.121	0.058	0.038			
$\bar{x}$	6.54	6.66	0.235	0.104	0.055	0.035			
s	0.13	0.08	0.023	0.015	0.005	0.002			
3	6.26	6.37	0.420	0.162	0.102	0.042			
	6.65	6.19	0.485	0.168	0.112	0.043			
	6.73	6.42	0.489	0.168	0.113	0.041			
$\bar{x}$	6.55	6.33	0.464	0.166	0.109	0.042			
s	0.25	0.12	0.038	0.003	0.006	0.001			
	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con
4	6.76	5.90	6.27	0.657	0.519	0.235	0.154	0.138	0.054
	6.94	6.54	6.43	0.732	0.515	0.237	0.167	0.138	0.048
	6.83	6.62	6.31	0.752	0.524	0.24	0.173	0.139	0.047
$\bar{x}$	6.84	6.35	6.34	0.713	0.519	0.237	0.164	0.138	0.049
s	0.09	0.39	0.08	0.050	0.004	0.002	0.009	-.-	0.003
5	6.16	6.00	6.37	0.945	0.582	0.306	0.208	0.170	0.066
	6.69	6.73	6.57	0.922	0.657	0.322	0.206	0.176	0.067
	6.98	6.42	6.54	0.991	0.639	0.330	0.232	0.164	0.068
$\bar{x}$	6.61	6.38	6.49	0.953	0.625	0.319	0.215	0.170	0.067
s	0.42	0.37	0.11	0.035	0.039	0.012	0.014	0.006	-.-
6	6.96	6.51	6.54	1.17	0.688	0.381	0.258	0.155	0.078
	6.83	6.55	6.81	1.17	0.674	0.406	0.242	0.158	0.082
	7.19	6.57	6.79	1.21	0.686	0.410	0.265	0.156	0.083
$\bar{x}$	6.99	6.54	6.71	1.18	0.682	0.399	0.255	0.156	0.081
s	0.18	0.03	0.15	0.023	0.007	0.015	0.011	0.001	0.002
8	5.90	6.23	6.59	1.20	0.751	0.490	0.236	0.168	0.101
	6.25	6.22	6.53	1.16	0.751	0.531	0.253	0.163	0.112
	6.19	6.28	6.54	1.21	0.773	0.547	0.262	0.162	0.111
$\bar{x}$	6.11	6.24	6.55	1.19	0.758	0.522	0.250	0.164	0.108
s	0.19	0.03	0.03	0.026	0.012	0.029	0.013	0.003	0.006

Tabla 40: Evolución de los contenidos en (-)-epicatequina y Picos Agrupados (mg/L) con y sin levadura en la disolución modelo de (-)-epicatequina medidos a 280 nm.

SEMANAS	(+)-catequina		Picos Agrupados			
	Sin	Con	Sin	Con		
0	498	498	0.001	0.001		
	502	502	0.001	0.001		
	503	503	0.001	0.001		
$\bar{x}$	501	501	0.001	0.001		
s	2.6	2.6	-.-	-.-		
1	472	479	1.80	0.001		
	470	470	1.86	0.001		
	486	475	1.72	0.001		
$\bar{x}$	476	475	1.79	0.001		
s	8.7	4.5	0.07	-.-		
2	434	463	6.98	1.30		
	418	451	10.3	1.18		
	426	485	9.48	1.37		
$\bar{x}$	426	466	8.92	1.28		
s	8.0	17.2	1.73	0.09		
3	330	450	9.03	1.05		
	280	463	9.39	0.990		
	322	463	9.75	1.04		
$\bar{x}$	311	459	9.39	1.02		
s	26.8	7.5	0.36	0.03		
	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con
4	275	351	456	13.8	11.4	5.64
	279	362	442	15.4	10.1	5.19
	278	356	435	17.1	12.7	4.74
$\bar{x}$	277	356	444	15.4	11.4	5.19
s	2.1	5.4	10.7	1.7	1.3	0.44
5	227	353	432	22.7	14.1	6.83
	227	338	427	27.2	14.7	7.23
	230	324	430	27.2	13.6	7.64
$\bar{x}$	228	338	430	25.7	14.1	7.23
s	1.7	14.7	2.4	2.6	0.5	0.40
6	148	354	410	24.7	19.9	8.68
	138	326	413	27.4	18.7	8.69
	146	320	411	29.5	18.5	9.25
$\bar{x}$	144	333	411	27.2	19.0	8.87
s	5.3	18.1	1.5	2.4	0.7	0.32
8	201	314	373	32.7	22.6	12.7
	196	314	349	38.8	23.1	9.20
	200	315	362	45.6	22.8	11.0
$\bar{x}$	197	314	361	39.0	22.8	11.0
s	2.6	0.6	12.0	6.5	0.28	1.8

Tabla 41: Evolución de los contenidos en Picos Agrupados (unidades de área) con y sin levadura en la disolución modelo de (-)-epicatequina medidos a 420 nm.

SEMANAS	Picos Agrupados		
	Sin	Con	Con
0	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
$\bar{x}$	-.-	-.-	-.-
$s$	-.-	-.-	-.-
1	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
$\bar{x}$	-.-	-.-	-.-
$s$	-.-	-.-	-.-
2	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
$\bar{x}$	-.-	-.-	-.-
$s$	-.-	-.-	-.-
3	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
	0.001	0.001	0.001
$\bar{x}$	-.-	-.-	-.-
$s$	-.-	-.-	-.-
4	565830	348192	0.001
	436963	338589	0.001
	646932	358574	0.001
	549918	348452	0.001
$\bar{x}$	86443	8161	-.-
$s$	86443	8161	-.-
5	840694	439735	346928
	869609	407912	381915
	855151	471558	364421
	855151	439735	364421
$\bar{x}$	14457	31826	17493
$s$	14457	31826	17493
6	660236	382640	303826
	632490	363327	331465
	687983	392647	323462
	660236	379538	319884
$\bar{x}$	27746	12169	11612
$s$	27746	12169	11612
8	1638571	621877	337828
	1478436	608291	351539
	1558503	594705	344682
	1558503	608291	344682
$\bar{x}$	80067	13586	6857
$s$	80067	13586	6857

Tabla 42: Evolución de los contenidos en Picos Desconocidos (mg/L) con y sin levadura en la disolución modelo de (-)-epicatequina medidos a 280 nm.

SEMANAS	Pico 1		Pico 2		Pico 4				
	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con			
0	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
$\bar{x}$	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
s	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-			
1	1.80	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
	1.93	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
	1.65	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
$\bar{x}$	1.79	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001			
s	0.14	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-			
2	3.53	1.25	3.25	0.001	0.001	0.001			
	3.70	1.16	3.12	0.001	0.001	0.001			
	3.99	1.60	2.93	0.001	0.001	0.001			
$\bar{x}$	3.74	1.34	3.10	0.001	0.001	0.001			
s	0.23	0.23	0.16	-.-	-.-	-.-			
3	1.75	1.41	2.28	3.25	0.001	0.001			
	1.61	1.67	2.69	3.17	0.001	0.001			
	1.68	1.64	3.09	3.19	0.001	0.001			
$\bar{x}$	1.68	1.57	2.69	3.21	0.001	0.001			
s	0.07	0.14	0.40	0.04	-.-	-.-			
	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con
4	2.55	1.45	1.48	2.38	2.26	3.01	1.93	1.22	0.853
	2.43	1.37	1.31	3.27	2.25	2.94	1.65	1.29	0.853
	2.67	1.85	1.28	2.41	2.79	2.73	2.20	1.36	0.815
$\bar{x}$	2.55	1.56	1.36	2.69	2.43	2.89	1.93	1.29	0.840
s	0.12	0.26	0.10	0.50	0.31	0.14	0.27	0.07	0.021
5	2.61	1.61	1.26	6.27	5.48	4.75	1.91	1.74	0.580
	2.95	1.38	1.29	5.65	4.96	4.73	2.13	1.76	0.646
	3.07	1.57	1.36	5.71	5.69	4.72	2.22	1.96	0.612
$\bar{x}$	2.88	1.52	1.30	5.88	5.37	4.73	2.09	1.82	0.612
s	0.24	0.12	0.05	0.34	0.38	0.02	0.16	0.12	0.033
6	1.01	1.26	1.46	2.27	5.93	4.64	1.56	2.18	1.50
	1.27	1.36	1.62	2.49	4.13	5.46	1.67	2.26	1.54
	1.26	1.46	1.30	2.58	5.02	5.21	1.44	2.35	1.47
$\bar{x}$	1.18	1.36	1.46	2.45	5.02	5.10	1.56	2.26	1.50
s	0.14	0.10	0.16	0.16	0.90	0.42	0.11	0.09	0.03
8	1.64	1.50	1.00	3.80	6.08	4.23	1.64	2.94	0.925
	1.45	1.40	0.868	3.83	6.21	3.02	1.72	3.26	0.975
	1.54	1.49	0.732	4.14	6.38	3.63	1.98	2.67	0.876
$\bar{x}$	1.54	1.46	0.867	3.92	6.23	3.63	1.78	2.96	0.925
s	0.09	0.05	0.135	0.19	0.15	0.60	0.18	0.29	0.049

Tabla 42: (Continuación).

SEMANAS	Pico 5		Pico 6				
	Sin	Con	Sin	Con	Con		
0	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
s	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-		
1	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
s	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-		
2	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
s	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-		
3	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
s	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-		
4	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con	
	1.20	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	
	1.01	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	
	1.39	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	
	$\bar{x}$	1.20	0.001	0.001	0.001	0.001	
	s	0.18	-.-	-.-	-.-	-.-	
	5	1.53	1.61	0.001	0.001	0.001	0.001
1.84	1.69	0.001	0.001	0.001	0.001		
1.93	1.53	0.001	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	1.77	1.61	0.001	0.001	0.001	0.001	
s	0.21	0.08	-.-	-.-	-.-	-.-	
6	0.619	1.54	0.730	0.001	0.001	0.001	
	0.775	1.54	0.685	0.001	0.001	0.001	
	0.830	1.54	0.776	0.001	0.001	0.001	
	$\bar{x}$	0.741	1.54	0.730	0.001	0.001	0.001
	s	0.109	-.-	0.045	-.-	-.-	-.-
8	1.79	2.04	1.47	1.10	1.13	0.001	
	1.93	2.22	1.28	1.07	1.27	0.001	
	2.52	2.59	1.10	1.30	1.26	0.001	
	$\bar{x}$	2.08	2.29	1.28	1.16	1.22	0.001
	s	0.38	0.28	0.18	0.12	0.08	-.-

Tabla 43: Evolución de los contenidos en Picos Desconocidos (unidades de área) con y sin levadura en la disolución modelo de (-)-epicatequina medidos a 420 nm.

SEMANAS	Pico 2		Pico 4				
	Sin	Con	Sin	Con	Con		
0	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-		
$s$	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-		
1	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-		
$s$	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-		
2	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-		
$s$	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-		
3	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001		
$\bar{x}$	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-		
$s$	-.-	-.-	-.-	-.-	-.-		
4	Sin	Con	Con	Sin	Con	Con	
	138473	0.001	0.001	125207	0.001	0.001	
	140274	0.001	0.001	128210	0.001	0.001	
	136712	0.001	0.001	126103	0.001	0.001	
	138486	0.001	0.001	126506	0.001	0.001	
	1454	-.-	-.-	1259	-.-	-.-	
	$\bar{x}$	144731	148066	0.001	120358	112121	0.001
$s$	168909	157872	0.001	106619	120223	0.001	
5	181056	152969	0.001	115592	129482	0.001	
	164899	152969	0.001	114190	120609	0.001	
	15098	4903	-.-	5696	7093	-.-	
	$\bar{x}$	108235	206422	0.001	127049	0.001	
	$s$	110936	225548	0.001	101597	0.001	
	109347	244674	0.001	140855	0.001		
	109506	225548	0.001	123167	0.001		
1108	19126	-.-	16260	-.-			
6	236455	278910	114328	108855	108871	0.001	
	232579	313185	137663	105554	136249	0.001	
	240332	362372	103858	107204	122560	0.001	
	236456	318156	118616	107204	122560	0.001	
	3876.5	34254	14130	1650	13689	-.-	
	$\bar{x}$	236455	278910	114328	108855	108871	0.001
	$s$	232579	313185	137663	105554	136249	0.001