



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Efecto de la adición de sulfuroso en la composición fenólica del vino.

Autor/es

ALMUDENA ANTÓN LÁZARO

Director/es

LAURA MONFORTE LÓPEZ, ENCARNACIÓN NÚÑEZ OLIVERA y MARÍA ÁNGELES DEL CASTILLO ALONSO

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

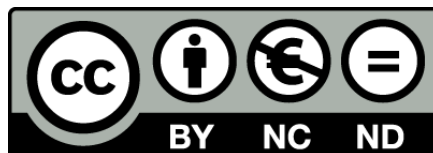
Grado en Enología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2019-20



***Efecto de la adición de sulfuroso en la composición fenólica del vino.***, de  
ALMUDENA ANTÓN LÁZARO  
(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative  
Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.  
Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los  
titulares del copyright.



**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE SULFUROSO EN LA  
COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL VINO.**



**UNIVERSIDAD  
DE LA RIOJA**

**Almudena Antón Lázaro**

Curso Académico 2019-2020



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Facultad de Ciencia y Tecnología

## TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Enología

Efecto de la adición de sulfuroso en la composición fenólica  
del vino.

Realizado por:

Almudena Antón Lázaro

Tutelado por:

Encarnación Núñez Olivera

Laura Monforte López

M<sup>a</sup> Ángeles del Castillo Alonso

Logroño, Julio 2020

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<i>Vitis vinifera</i> cv. Tempranillo .....	3
Compuestos fenólicos .....	5
El anhídrido sulfuroso y su empleo en la enología.....	6
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
Sitio de estudio.....	10
Vinificación .....	10
Análisis enológico.....	11
Análisis de compuestos fenólicos.....	11
Tratamiento estadístico .....	12
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>13</b>
Parámetros enológicos.....	13
Análisis de grupos fenólicos .....	15
Análisis compuestos fenólicos individuales .....	17
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>23</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	<b>24</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>27</b>

## RESUMEN

El anhídrido sulfuroso ( $\text{SO}_2$ ) ha sido utilizado en la elaboración de vinos desde tiempos remotos como antiséptico y antioxidante. Dado que esta adición puede provocar efectos adversos para la salud de personas sensibles, en los últimos años se ha contemplado la necesidad de prescindir o sustituir el  $\text{SO}_2$  durante la vinificación. Aunque es conocido que la adición de  $\text{SO}_2$  tiene efectos sobre algunas características del vino, como el color, no se conoce exactamente cómo afecta a los distintos compuestos fenólicos. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la adición de  $\text{SO}_2$  sobre la composición fenólica de vinos de la variedad Tempranillo. Para ello, en una bodega perteneciente a la D.O.Ca. Rioja, se elaboraron dos tipos de vino que se diferenciaban únicamente en la adición de  $\text{SO}_2$ . Los vinos se analizaron tras la maceración post-fermentativa y antes de realizar la fermentación maloláctica.

Entre los parámetros enológicos analizados, la adición de  $\text{SO}_2$  produjo un pequeño incremento de la acidez volátil, mientras que disminuyeron los parámetros relacionados con el color del vino, como el índice de color, y los compuestos fenólicos globales. El pH y el grado alcohólico no se vieron modificados. En cuanto a la composición fenólica, la adición de  $\text{SO}_2$  no indujo cambios cualitativos, aunque sí grandes cambios cuantitativos. Así, en ambos vinos se identificaron los mismos compuestos fenólicos: 9 flavonoles, 6 flavanoles, 2 estilbenos, 5 ácidos fenólicos y 15 antocianos. Sin embargo, el vino sin  $\text{SO}_2$  tenía mayor cantidad de la mayoría de los grupos fenólicos: antocianos, estilbenos, ácidos fenólicos y flavanoles. Únicamente los flavonoles no mostraron diferencias entre los dos tratamientos. En cuanto a los compuestos individuales, todos los flavanoles, estilbenos y ácidos fenólicos mostraron valores más altos en el vino sin  $\text{SO}_2$ . Entre los flavonoles la respuesta fue dispar: mientras que las miricetinas, a excepción de la aglicona, no cambiaron entre tratamientos, las quercetinas estaban más concentradas en el vino con  $\text{SO}_2$ , y el resto de flavonoles lo estaba en el vino sin  $\text{SO}_2$ . Aproximadamente la mitad de los antocianos mostraron cambios significativos entre tratamientos, siempre con mayores concentraciones en el vino sin  $\text{SO}_2$ . Entre los antocianos más afectados por el  $\text{SO}_2$  se encontraban las tres peonidinas, mientras que ninguna de las cianidinas cambió significativamente.

En conclusión, la adición de  $\text{SO}_2$  produjo importantes cambios tanto en los compuestos fenólicos directamente responsables del color como en aquellos implicados en la copigmentación. Estos cambios podrían tener gran trascendencia en el color y la estabilidad de los vinos, por lo que sería interesante profundizar en este estudio analizando el vino en etapas posteriores de elaboración, para tener una mejor comprensión de los efectos a lo largo de la vida del vino.

## ABSTRACT

Sulphur dioxide (SO<sub>2</sub>) has been used as antiseptic and antioxidant in wine elaboration for a long time. This addition can cause adverse effects in the health of sensitive people. Thus, the possibility of replacing or eliminating SO<sub>2</sub> in winemaking has been considered in the last years. Even though SO<sub>2</sub> addition is known to have effects on some wine features, like colour, it is unknown how SO<sub>2</sub> exactly affects the different phenolic compounds. Therefore, the aim of this work was to analyse the effects of SO<sub>2</sub> addition on the phenolic composition of wines elaborated with the variety "Tempranillo". For this aim, we made two types of wine with only one difference between them, the addition of SO<sub>2</sub>, in a cellar of the Rioja Qualified Denomination of Origin. Both wines were analysed after the post-fermentative maceration and before the malolactic fermentation.

Among the oenological parameters analysed, SO<sub>2</sub> addition caused a small increase of volatile acidity, whereas the parameters related to wine colour, such as the colour index, and the total phenolic compounds, decreased. Alcoholic grade and pH did not show any change. Regarding phenolic composition, SO<sub>2</sub> addition did not induce qualitative but great quantitative changes. Hence, the same phenolic compounds were identified in both wines: 9 flavonols, 6 flavanols, 2 stilbenes, 5 phenolic acids and 15 anthocyanins. Nevertheless, the wine without SO<sub>2</sub> had greater amounts of most phenolic groups: anthocyanins, stilbenes, phenolic acids and flavanols. Only flavonols did not show any difference between both treatments. Regarding individual compounds, all the flavanols, stilbenes and phenolic acids showed higher values in the wine without SO<sub>2</sub>. Among flavonols, responses were diverse: while myricetins, with the exception of the aglycone, did not change between treatments, quercetins were more concentrated in the wine with SO<sub>2</sub>, and the remaining flavonols in the wine without SO<sub>2</sub>. Around a half of anthocyanins showed significant changes between treatments, always with higher concentration in the wine without SO<sub>2</sub>. The three peonidins were among the anthocyanins most affected by SO<sub>2</sub>, while no cyanidin changed significantly.

In conclusion, SO<sub>2</sub> addition caused important changes in both the phenolic compounds directly responsible for wine colour and those involved in copigmentation. These changes could have great importance in the colour and stability of wines, and thus it would be interesting to study in depth the characteristics of wine in later stages of elaboration, in order to have a better understanding of the effects along wine life.

## INTRODUCCIÓN

### *Vitis vinifera* cv. Tempranillo

Tempranillo es una variedad de uva originaria de la zona limítrofe entre La Rioja y Burgos. Esta variedad se ha extendido siguiendo la ruta de los monasterios cistercienses por toda España, llegando así a Madrid, Valdepeñas, Cataluña, Extremadura y toda la ribera del río Duero. Es una variedad que necesita una zona relativamente fresca, ya que, en zonas cálidas tiene un problema de escasa acidez debido a la absorción elevada de potasio. Como consecuencia de esto, aumenta el pH.

Con respecto a su morfología, Tempranillo es una variedad con hoja de tamaño grande de color verde tirando a oscuro y con el peciolo de tamaño grande también (Figura 1). Esta hoja tiene el limbo largo con los 5 lóbulos muy marcados, además, su seno peciolar es cerrado en forma de U. Esta variedad presenta lanas abundantes en el envés de la hoja.



**Figura 1:** Hoja de *Vitis vinifera* cv. Tempranillo.

Con respecto al racimo, cabe destacar que tiene un tamaño mediano tirando a grande y un elevado grado de compacidad. Las bayas tienen un tamaño mediano, son esféricas y poseen un color negro azulado (Figura 2).





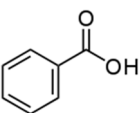
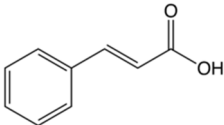
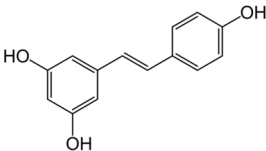
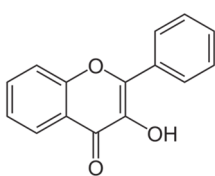
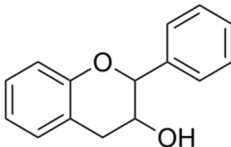
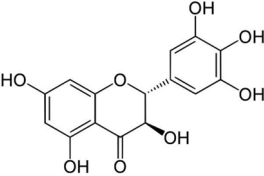
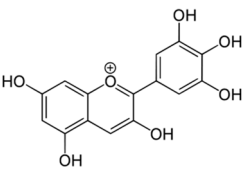
**Figura 2:** Racimo de *Vitis vinifera* cv. Tempranillo.

Tempranillo es la variedad tinta con mayor número de hectáreas en la Península Ibérica, en España y en la Denominación de Origen Calificada Rioja (DOCa Rioja). (Martínez De Toda *et al.*, 2012). En 1990 había alrededor de 45.000 hectáreas, pero con el paso de los años la superficie de esta variedad ha ido aumentando, alcanzando en el año 2009 una superficie cultivada aproximadamente de 214.000 hectáreas. Esta variedad, se encuentra repartida en 16 Comunidades Autónomas (CCAA), siendo las principales productoras: Castilla La-Mancha con un 36%, Castilla y León con un 17%, La Rioja con un 16%, País Vasco con un 6% y Navarra con un 5%.

Esta variedad produce vinos tintos de colores intensos con un grado alcohólico medio de 14,5° y una acidez de aproximadamente 5,5 g/l. Da lugar a vinos jóvenes muy aromáticos, tanto en elaboración normal como en maceración carbónica. En DOCa Rioja abundan los vinos jóvenes elaborados con Tempranillo en maceración carbónica y, además, también son característicos de esta zona los vinos destinados a crianza en bodega elaborados en su mayor parte con Tempranillo, pero realizando “coupages” junto con Mazuelo y Graciano.

## Compuestos fenólicos

Con respecto a su estructura química, los compuestos fenólicos están constituidos por un anillo bencénico unido, al menos, a un grupo funcional hidroxilo. Estos compuestos se dividen en dos grupos: flavonoides y no flavonoides. Los compuestos fenólicos no flavonoides se caracterizan por poseer un único anillo de 6 carbonos (C6). Estos compuestos, a su vez, se clasifican en ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos) y estilbenos. Por otro lado, los compuestos fenólicos flavonoides se caracterizan por presentar dos anillos de 6 carbonos unidos a un heterociclo central de 3 carbonos (C6-C3-C6). En este grupo podemos encontrar; flavonoles, flavanoles, flavanonoles y antocianos (Tabla 1).

NO FLAVONOIDES			
ÁCIDOS FENÓLICOS		ESTILBENOS	
BENZOICOS	CINÁMICOS	Ejemplo: Resveratrol	
			
FLAVONOIDES			
FLAVONOLES	FLAVANOLES	FLAVANONOLES	ANTOCIANOS
			

**Tabla 1:** Clasificación de los principales grupos de compuestos fenólicos en *Vitis vinifera*.

Los compuestos fenólicos son un producto del metabolismo secundario de las plantas. En las plantas tienen diversas funciones, como la protección frente a la radiación ultravioleta o su carácter antioxidante, que protege a otros componentes de la planta susceptibles de ser oxidados, como los lípidos de membrana (Taiz y Zeiger, 2006).

El contenido en compuestos fenólicos en la vid depende tanto de la variedad de uva y el rendimiento de la cosecha, como de las condiciones edafoclimáticas y técnicas culturales aplicadas al viñedo (Chamkha *et al.*, 2003). La importancia de los compuestos fenólicos en la enología se halla en su implicación en la calidad del vino. Su papel es especialmente importante cuando el destino del vino es la crianza en barrica, ya que la capacidad de envejecimiento de los vinos está relacionada en gran medida con su

composición fenólica. Son responsables del color rojo, del color amarillo y del gusto amargo, así como de la astringencia y del cuerpo del vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Además, los compuestos fenólicos son de gran interés para la salud humana, por sus propiedades antioxidantes y cardioprotectoras (Calabriso *et al.*, 2016).

### El anhídrido sulfuroso y su empleo en la enología.

Llamamos sulfito a un compuesto químico formado por dos moléculas de oxígeno y una de azufre, también denominado dióxido de azufre, cuya fórmula molecular es SO<sub>2</sub>.

El anhídrido sulfuroso o dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) es un gas producido por la combustión del azufre en el aire, siendo conocido desde muy antiguo como desinfectante de locales, y utilizado por los romanos en la higienización de las bodegas y los envases vinarios. Sus propiedades como conservante de los vinos fueron también conocidas durante siglos, pero su utilización en las operaciones prefermentativas de las vendimias es bastante más reciente, remontándose a finales del siglo XIX. (Hidalgo Togoeres, 2011).

El anhídrido sulfuroso está presente en el vino en varias formas. Se puede encontrar en forma de SO<sub>2</sub> libre y en forma de SO<sub>2</sub> combinado. La suma de ambos nos dará como resultado el contenido en SO<sub>2</sub> total presente en el vino.

Dentro de las propiedades positivas del sulfuroso, cabe destacar, los efectos antioxidante y antioxidásico, sus propiedades antimicrobianas selectivas especialmente frente a las bacterias lácticas, el retardo en el arranque de la fermentación alcohólica que posibilita el desfangado de los mostos blancos, la intensa acción degradante sobre los hollejos que permite una mayor maceración en las vinificaciones en tinto, su papel en la mejora o mantenimiento de los aromas de los vinos, etc. (Hidalgo Togoeres, 2011). Sin embargo, los sulfitos pueden causar efectos indeseables en la salud de personas sensibles: dolores de cabeza, reacciones alérgicas... En este sentido, la Organización Mundial de la Salud ha recomendado limitar su uso e incluso eliminarlo en el tratamiento de alimentos. Por estos motivos, en la actualidad existe un gran interés en el estudio de sustancias o técnicas alternativas que puedan reemplazar y/o complementar la acción del SO<sub>2</sub>, haciendo posible reducir su concentración en los vinos. (López *et al.*, 2012).

Por lo tanto, a lo largo de los últimos años se han utilizado diversos aditivos alternativos al SO<sub>2</sub> (Tabla 2). A pesar de que ninguna de estas alternativas tiene actividad antimicrobiana (como el SO<sub>2</sub>), la oportunidad de reducir el sulfito en vinos, mediante su utilización está despertando cada vez más interés entre los enólogos. Sin embargo, a pesar de la cantidad de trabajos que informan los efectos antioxidantes de estas sustancias, la mayoría de los documentos se refieren a soluciones modelo y, además, actualmente es difícil prever en qué medida es posible reemplazar los sulfitos con cada una de estas alternativas, preservando la calidad del vino, debido a la falta de

comparaciones directas con base científica, entre sus efectos y los del sulfuroso. (Comuzzo *et al.*, 2015).

ANTIOXIDANTES	MICROBICIDAS	ANTIOXIDANTES MICROBICIDAS	MÉTODOS FÍSICOS
Ácido ascórbico	Ácido sórbico	Polifenoles	Altas presiones
Lías de vinificación	Dicarbonato de dimetilo (DCDM)	Qitosano	Ultrasonidos
Autolizados de levaduras	Lisozima		Radiación UV
Glutation	Bacteriocinas		Campos eléctricos pulsados
	Plata metálica		

**Tabla 2:** Aditivos alternativos al uso de anhídrido sulfuroso.

Por otro lado, con respecto a la normativa relacionada con el contenido en anhídrido sulfuroso cabe destacar que, en el caso de la DOCa Rioja, no se podrán sobrepasar los siguientes límites máximos de anhídrido sulfuroso total (expresados en miligramos por litro (mg/L)):

- Vinos tintos con menos de 5 g/L de azúcares: 140 mg/L.
- Vinos tintos con 5 o más g/L de azúcares: 180 mg/L.

Una vez finalizado el proceso de fermentación, la cantidad máxima permitida de anhídrido sulfuroso total en fase de calificación en vino tinto seco será de 100 mg/L. En el caso de vinos tintos semisecos o con 5 o más g/L de azúcares el contenido máximo permitido de anhídrido sulfuroso será de 180 mg/L.

En la industria enológica, el Reglamento (CE) N.º 1493/1999 del Consejo a 17 de mayo de 1999, y el Reglamento (CE) N.º 1622/2000 a 24 de julio de 2000 establecen una concentración de anhídrido sulfuroso total de hasta 160 mg/L en el caso de vinos tintos. La dosis máxima permitida por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) es de 150 a 400 mg/L dependiendo del tipo de vino y del contenido de éste en materias reductoras (OIV, 2011). Por último, la legislación europea (Reglamento 1991/2004) obliga a los elaboradores, a añadir en la etiqueta de los respectivos vinos “contiene sulfitos”, cuando el anhídrido sulfuroso está presente en concentraciones superiores a 10 mg/L expresado como SO<sub>2</sub>.

Existen multitud de trabajos que analizan los efectos del sulfuroso en vinos blancos. Se conoce que el anhídrido sulfuroso tiene un efecto sobre el color del vino tinto, tanto por su efecto sobre la extracción de algunos grupos de flavonoides durante la fermentación, como por su efecto sobre el mantenimiento del color durante el envejecimiento del vino. (Santos *et al.*, 2012; Gobantes, 2016).

## OBJETIVOS

El objetivo principal de este TFG es observar el efecto de la adición o no de anhídrido sulfuroso en la composición fenólica de vinos de Tempranillo elaborados exactamente de la misma manera, con uva procedente de la misma parcela y con un estado de maduración y sanitario similares.

Este objetivo global se puede dividir en los siguientes objetivos parciales:

- Analizar el efecto que la adición de  $\text{SO}_2$  provoca en diversos parámetros enológicos, como pH, acidez volátil o grado alcohólico y los relacionados con la composición fenólica del vino como el IPT, la intensidad colorante y la tonalidad.
- Analizar el efecto de la adición de  $\text{SO}_2$  tanto en el contenido global de compuestos fenólicos, como en cada uno de los compuestos fenólicos individuales identificados en los dos vinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio de estudio

El experimento se realizó en el 2019 con uva procedente de un viñedo de *Vitis vinifera* cv. Tempranillo situado en el término municipal de Ausejo (Rioja Baja).

La variedad estaba injertada sobre R-110 en cepas de aproximadamente 20 años y conducidas en vaso. El marco de plantación es de 2,8 m x 1,2 m. La poda se efectúa dejando 4-5 pulgares por cepa. En la parcela no se realiza deshojado ni tampoco cuenta con sistema de riego.

La temperatura media de 2019 que se registró fue de 15,9 °C. La temperatura media del mes de septiembre fue de 18,8 °C. Las temperaturas máximas y mínimas de este mes fueron de 30,1 °C y 6,4 °C. Con respecto a las precipitaciones, en el año 2019 la precipitación anual fue de 629 mm. Este valor fue un 3% inferior al valor medio anual, según el periodo de referencia 1981-2010. Las precipitaciones correspondientes al mes de septiembre fueron de 47 mm.

### Vinificación

La uva fue vendimiada manualmente y despalillada a la entrada de la bodega. Se realizaron dos vinificaciones distintas correspondientes a cada uno de los siguientes tratamientos:

1. Tratamiento “con sulfuroso” (vinificación con adición de anhídrido sulfuroso).
2. Tratamiento “sin sulfuroso” (sin adición de anhídrido sulfuroso).

El momento de adición de sulfuroso fue a la entrada de la uva, en el mosto, añadiendo la cantidad de 50 g/L. El mosto pasó a depósitos de 50.000 Kg a través de las tuberías de vendimia. El vino permaneció encubado durante 16 días. La fermentación alcohólica tuvo una duración de 7 días, realizándose una maceración post-fermentativa hasta final del descube. Cabe destacar que, en ambas vinificaciones, se utilizó Osiris. El sistema Osiris absorbe el propio CO<sub>2</sub> generado en la fermentación alcohólica. Posteriormente este CO<sub>2</sub> se inyecta con una lanza generando un caudal superior al de un remontado normal. El sombrero se rompe de forma efectiva, consiguiendo una mayor extracción de los componentes de la uva.

Se recogieron tres réplicas por cada tratamiento. Cuando se recogieron las muestras de los distintos depósitos, el vino no había realizado todavía la fermentación maloláctica y, además, estaba sin filtrar.

## Análisis enológico

Una vez terminada la maceración post-fermentativa, se realizaron los análisis de los siguientes parámetros enológicos:

El pH se midió con un pH-metro. La acidez volátil se analizó mediante el método de García-Tena (García *et al.*, 2005). De forma abreviada, el método consiste en disponer 11 mL de vino, desprovisto de CO<sub>2</sub>, en un matraz esférico y se ajusta el aparato de destilación, a la vez que se coloca la probeta de 5,1 mL debajo del refrigerante. Seguidamente, se abre la entrada al agua refrigerante y se enciende el mechero. Una vez llena la probeta de 5,1 mL se desecha y se coloca la probeta de 3,2 mL. Una vez llena esta probeta, se vierte en un Erlenmeyer y se valora con hidróxido de sodio 0,02 M, añadiendo también unas gotas de indicador fenolftaleína. El volumen gastado se multiplica por un número y se obtiene el resultado.

El grado alcohólico se analizó mediante ebuliometría. El anhídrido sulfuroso se analizó mediante el método de Ripper. Para realizar el análisis de anhídrido sulfuroso libre se añaden 50 mL de vino en un Erlenmeyer junto con 1 mL de almidón y 5 mL de ácido sulfúrico. Se valora con iodo 0,02 N hasta alcanzar una coloración azul persistente. Para realizar el análisis de sulfuroso total se vierten 20 mL de vino, se añaden 25 mL de hidróxido de sodio 1 N y se deja reposar durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se añade 1 mL de almidón, 10 mL de ácido sulfúrico y se valora con iodo 0,02 N hasta alcanzar una coloración azul persistente.

La intensidad de color (IC), la tonalidad y el índice de polifenoles totales (IPT) fueron analizados de acuerdo con los métodos oficiales. (Reglamento (CEE) n° 2676/90).

## Análisis de compuestos fenólicos

El contenido de compuestos fenólicos globales (CFG) se midió en los vinos mediante el método de cálculo del área bajo la curva de absorbancia en el intervalo de 280-400 nm (AUC<sub>280-400</sub>) de acuerdo con Del Castillo Alonso *et al.*, 2016 usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer λ35 (Perkin-Elmer, Wilton, CT, EE. UU.).

Los compuestos fenólicos individuales se analizaron, por UPLC utilizando un sistema WatersAcquity Ultra Performance LC (WatersCorporation, Milford, USA), basándose en Del Castillo Alonso *et al.*, 2015. Los disolventes fueron: A, agua/ácido fórmico (0,1%), y B, acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1%. El programa de gradiente empleado fue: 0-7 min, 99.5 a 80% A; 7-9 min, 80 a 50% A; 9-11.7 min, 50-0% A; 11.7-15 min, 0 a 99,5% A. El sistema UPLC se acopló a un espectrómetro de masas de alta resolución micrOTOFII (Bruker Daltonik, Alemania) equipado con una fuente multimodo Apolo II ESI/APCI y controlado por el software Bruker Daltonics Data Analysis. La fuente electrospray se hizo funcionar en el modo negativo para todos los compuestos excepto para los antocianos,



que se hizo funcionar en modo positivo. El potencial capilar se estableció en 4 kV; la temperatura del gas de secado fue de 200 °C y su flujo 9 l min<sup>-1</sup>; el gas nebulizador se estableció en 3,5 bar y 25 °C. Los espectros se obtuvieron entre m/z 120 y 1505 en el modo negativo y positivo. Los diferentes compuestos fenólicos analizados se identificaron de acuerdo a su orden de elución y a los tiempos de retención de los compuestos puros: catequina, epicatequina, galato de catequina, galato de epicatequina, miricetina, quercetina, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y *t*-resveratrol (Sigma, St. Louis , USA); malvidina-3,5-di-*O*-glucósido, procianidina B1, quercetina, kaempferol, isorhamnetina-glucósido, y kaempferol-3-rutinósido (EXTRASYNTHÈSE, Genay, Francia); quercetina-3-*O*-rutinósido, isorhamnetina y quercetina-3-*O*-galactósido (Fluka, Buchs, Alemania).

La cuantificación de cada uno de los fenoles se hizo con compuestos comerciales y en los casos que no se disponía de ellos, se llevó a cabo usando las curvas de calibración del compuesto más similar: ácido cafeico para el ácido *p*-cafeoil-tartárico; ácido *p*-cumárico para el ácido *p*-cumaroil-tartárico; *t*-resveratrol para su glucósido; y malvidina-3,5-di-*O*-glucósido para los antocianos.

### Tratamiento estadístico

Para analizar el efecto de la adición de sulfuroso en los parámetros enológicos y en los compuestos fenólicos de los vinos elaborados se realizó un análisis de *t* de Student. Previamente se comprobaron los requisitos de normalidad (test de Shapiro-Wilks) y homocedasticidad (test de Levene). Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con SPSS 26.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Parámetros enológicos

Como podemos observar, el pH, el grado alcohólico y el índice de polifenoles totales (IPT) no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, mientras que la intensidad de color (IC) y los compuestos fenólicos globales (CFG) tuvieron mayores valores en el vino elaborado sin sulfuroso. Por el contrario, la tonalidad y la acidez volátil tuvieron mayores valores en el vino elaborado con sulfuroso (Tabla 3, Figura 3).

	Con sulfuroso	Sin sulfuroso	Nivel de significación
Acidez volátil	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,01	*
pH	3,63 ± 0,01	3,61 ± 0,01	ns
Grado alcohólico	14,4 ± 0,0	14,5 ± 0,0	ns
IC	9,69 ± 0,10	11,2 ± 0,0	***
Tonalidad	0,65 ± 0,00	0,61 ± 0,00	**
IPT	63,4 ± 1,4	62,6 ± 1,2	ns
CFG (AUC <sub>(280-400)</sub> )	3176 ± 20	3343 ± 21	**

**Tabla 3:** Parámetros enológicos medidos al final de la vinificación en los dos tipos de vinos elaborados: con sulfuroso y sin sulfuroso. Se muestra el valor medio y el error típico de las tres réplicas, así como el nivel de significación obtenido con el análisis de t-Student (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ; ns, diferencias no significativas).

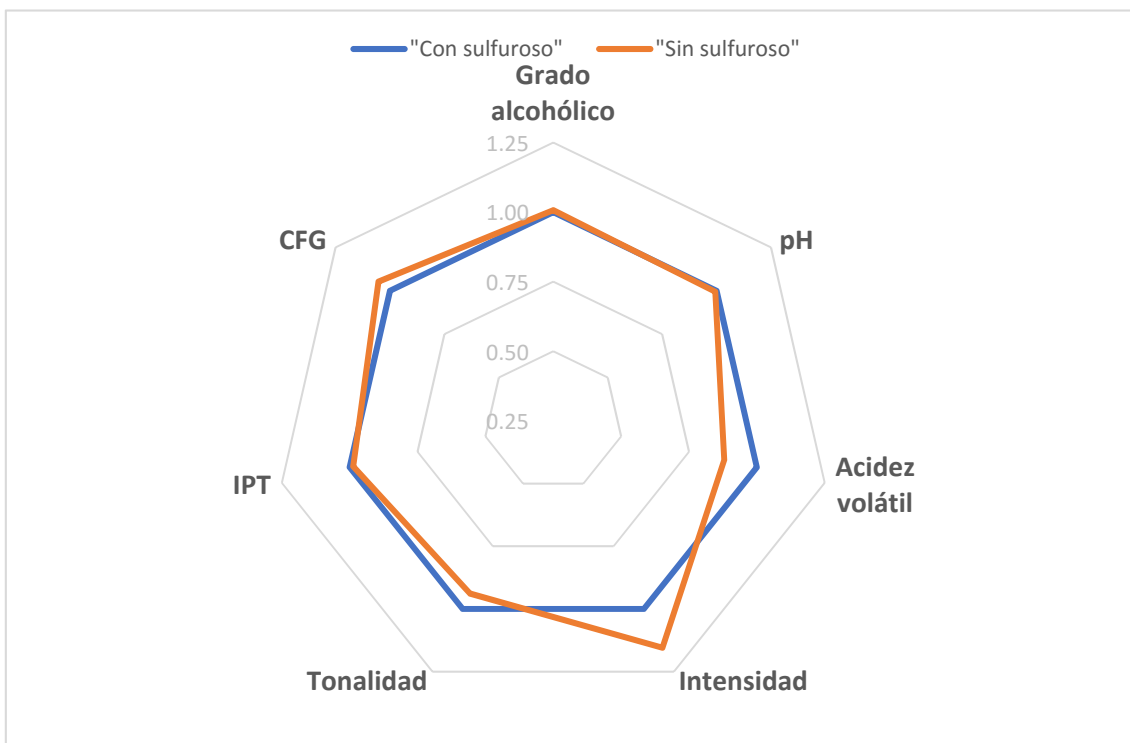
El vino sin sulfuroso tuvo valores superiores de intensidad colorante posiblemente porque la ausencia de anhídrido sulfuroso evita la combinación de este con distintos compuestos fenólicos, evitando la decoloración del vino. Las reacciones que se producen entre el anhídrido sulfuroso y algunos de los compuestos fenólicos, tienen como consecuencia la decoloración de ciertos compuestos fenólicos, lo que supone una pérdida temporal de la intensidad colorante. (Somers, 1971; Glories, 1984).

La tonalidad de un vino se corresponde con la relación que existe entre los compuestos responsables del color amarillo (absorbancia a 420 nm) y los compuestos responsables del color rojo del vino (absorbancia a 520 nm). La tonalidad del vino con sulfuroso es mayor, ya que el contenido en antocianos en el vino con sulfuroso es menor que en el vino sin sulfuroso. Esto hace que el resultado del cociente entre color amarillo y rojo sea mayor en el vino con sulfuroso. (Glories, 1978).

La acidez volátil de ambos tratamientos presentaba unos valores propios de un vino con la fermentación alcohólica recién terminada, vinificado con una uva que tenía un estado sanitario correcto. Por lo tanto, la diferencia existente entre ambos tratamientos con

respecto a la acidez volátil puede ser debida al margen de error existente cuando se realiza un análisis enológico en un laboratorio.

Tanto el índice de polifenoles totales como los compuestos fenólicos globales son medidas que sirven para medir la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el vino. Sin embargo, los IPT no muestran diferencias significativas entre los dos tratamientos, mientras que los CFG presentan valores más altos en el vino sin sulfuroso. Esta aparente contradicción puede explicarse porque cada parámetro utiliza una forma de medir distinta. Ambas medidas se basan en la propiedad de los compuestos fenólicos en absorber la radiación ultravioleta (RUV), cada uno con máximos de absorción a distintas longitudes de onda. Mientras que el IPT se obtiene midiendo la absorbancia del vino a una única longitud de onda, los CFG miden la absorbancia en todo el rango de absorción y por tanto es un índice más integrador de cambios en los compuestos fenólicos individuales (Del Castillo Alonso *et al.*, 2016).

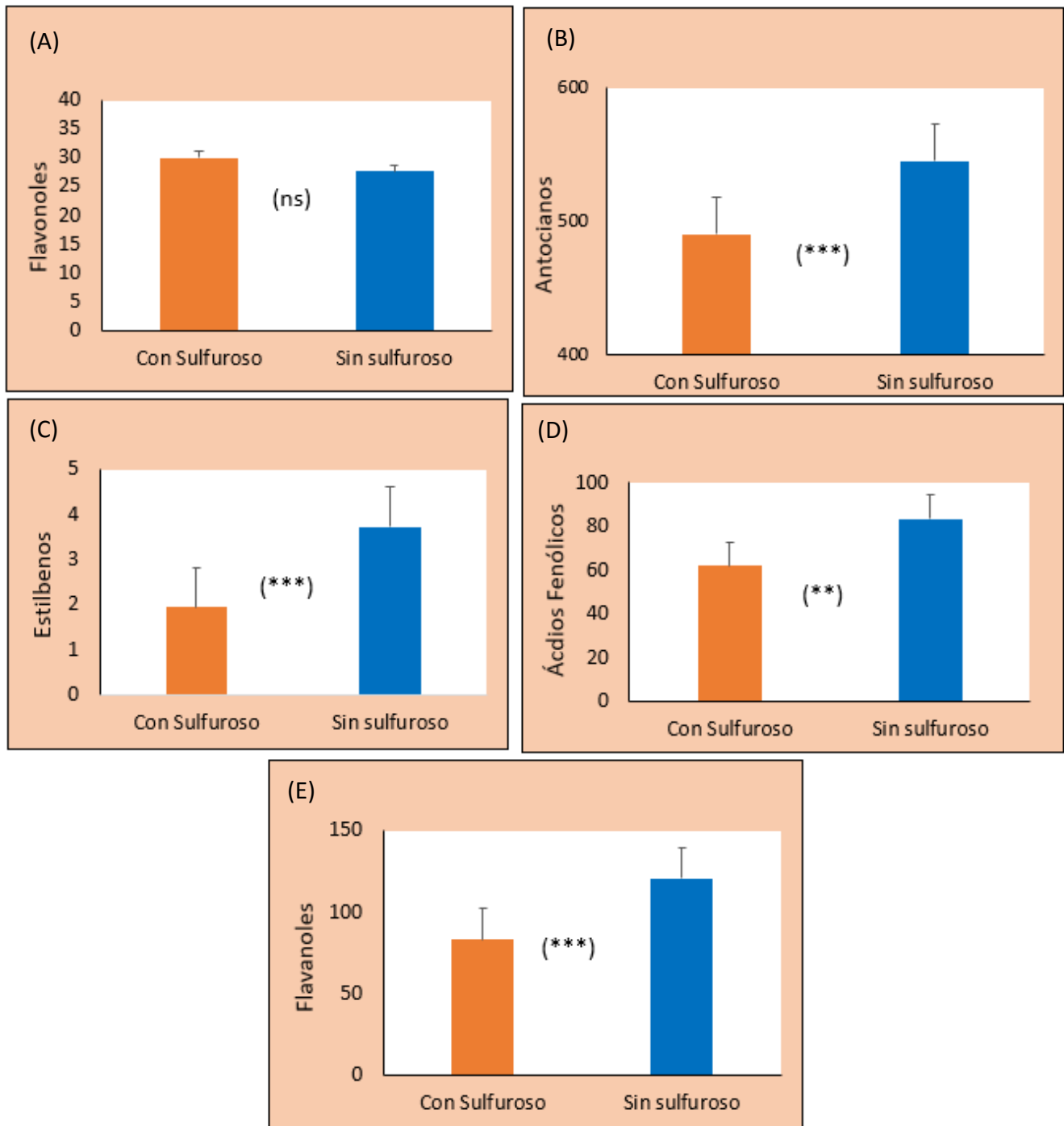


**Figura 3:** Parámetros enológicos de ambos tratamientos representados con unidades relativas.

## Análisis de grupos fenólicos

El grupo de compuestos fenólicos mayoritario en ambos vinos fue el de los antocianos, que representan cerca del 70% del total de compuestos fenólicos presentes en ambos vinos. Esto es lo esperado, ya que estos vinos están vinificados con variedades de uva tinta, cuyo color está proporcionado por estos compuestos. El segundo grupo fue el de los flavanoles (éstos representan aproximadamente el 12% del total), ácidos fenólicos (aproximadamente un 9% del total) y flavonoles (aproximadamente un 4% del total). Los estilbenos fueron el grupo minoritario, representando aproximadamente un 0,3% del total de compuestos fenólicos presentes en ambos vinos.

Todos los grupos fenólicos, con la excepción de los flavonoles mostraron diferencias significativas entre los dos tipos de vino, con valores más altos en los vinos sin sulfuroso (Figura 4).



**Figura 4:** Diferentes grupos fenólicos analizados en los vinos en mg L<sup>-1</sup>. Se representan las Medias ± E.T. Entre paréntesis se muestra la significación entre tratamientos (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ; ns, diferencias no significativas).

Los antocianos fueron significativamente mayores sin sulfuroso. Este hecho puede ser debido a que pequeñas cantidades de SO<sub>2</sub> pueden decolorar grandes cantidades de antocianos (Timberlake y Bridle, 1967). El ión bisulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) reacciona rápidamente con el flavilium. Esto se debe al hecho de que el SO<sub>2</sub> existe en un equilibrio en el vino y cuando el pH baja, este equilibrio cambia de la forma bisulfito, que es la que reacciona

con los antocianos, a la forma molecular  $\text{SO}_2$ , que es la que no reacciona (Hernán *et al.*, 2009). Los iones  $\text{HSO}_3^-$  se combinan con los antocianos de forma reversible, lo que explica la decoloración de los vinos tintos después del sulfitado (Girard, 2004) (Figura 4, B), y explica que el vino sin sulfuroso tenga un mayor contenido en antocianos que el vino con sulfuroso, a pesar de la habilidad del  $\text{SO}_2$  para extraer antocianos. Esta cualidad del  $\text{SO}_2$  es conocida desde hace tiempo y es debida a que ayuda a la degradación de las estructuras de la piel por lo que muchos métodos de obtención de antocianos de los orujos utilizan grandes cantidades de  $\text{SO}_2$  (Mazza, 1995). A pesar de que los flavonoles no cambian, los antocianos se polimerizan con ellos, dando lugar a estructuras más resistentes a la degradación y menos sensibles a la decoloración (Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995), por tanto, su formación representa un incremento de la estabilidad del color en los vinos.

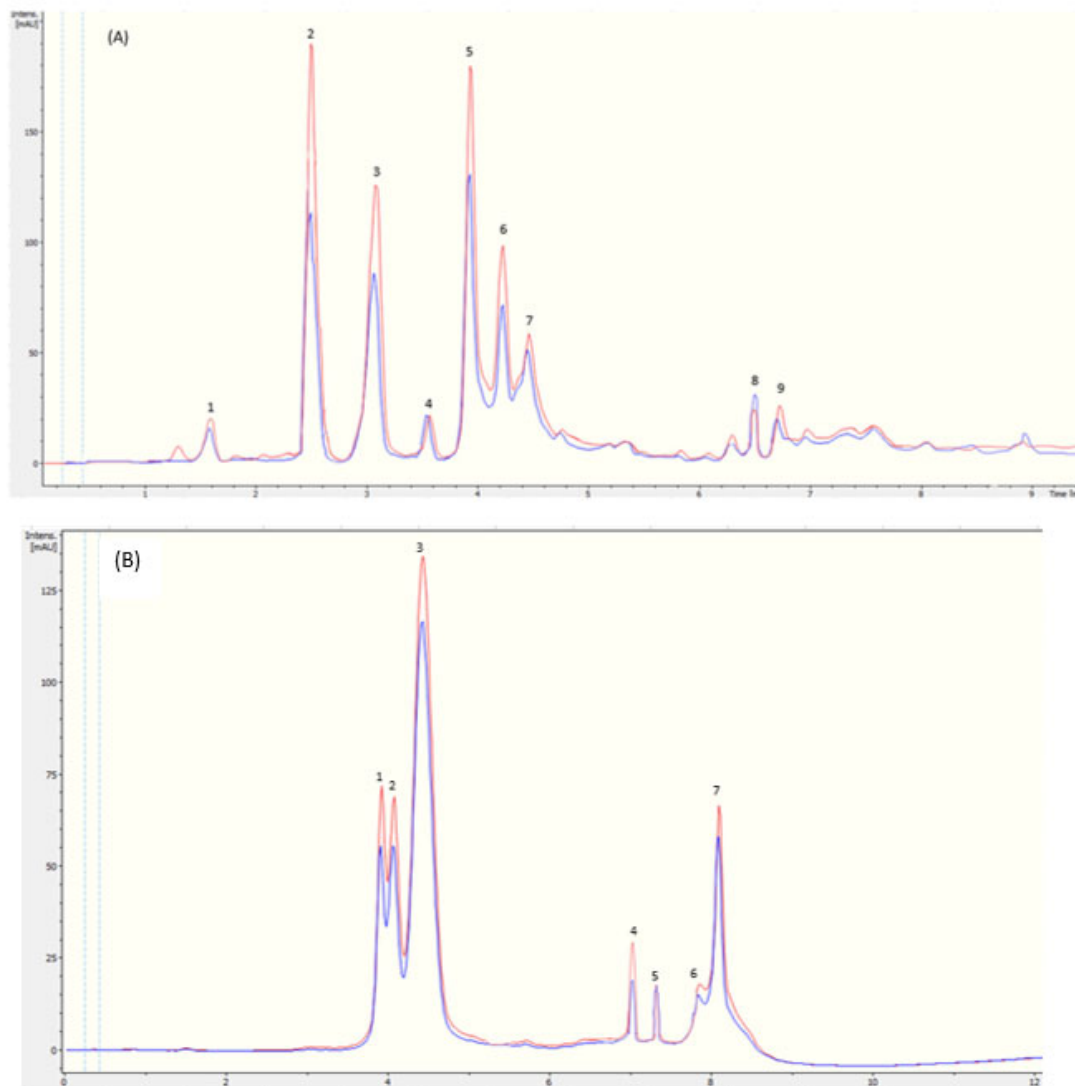
En cuanto a los estilbenos, (Figura 4, C) cabe destacar, que no se pudo encontrar información acerca de cómo afectaba la adición de anhídrido sulfuroso a este grupo fenólico.

Por otro lado, el vino sin sulfuroso tuvo mayor contenido de ácidos fenólicos que el vino con sulfuroso. Esto puede ser debido al hecho de que los ácidos fenólicos también participan en fenómenos de copigmentación junto con los antocianos (Aleixandre, 2012). Estos ácidos al estar en contacto con el anhídrido sulfuroso sufren una oxidación, teniendo como consecuencia la presencia de formas incoloras (Figura 4, D).

Como podemos observar (Figura 4, E), el vino sin sulfuroso tiene mayor contenido de flavanoles que el vino con sulfuroso. En presencia de anhídrido sulfuroso, el ión bisulfito se va a combinar con los antocianos, evitando así la polimerización de antocianos con flavanoles, esto, por tanto, tendrá como consecuencia la decoloración del vino. Esto explica por qué el vino sin sulfuroso tiene mayor contenido de flavanoles que el vino con sulfuroso (Figura 4, E).

### Análisis compuestos fenólicos individuales

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó en función de sus tiempos de retención y a sus propiedades espectrales. En la Figura 5 se muestra un cromatograma con los principales compuestos fenólicos cuantificados en los dos tipos de vinos elaborados. Se puede observar que, aunque los flavonoles como grupo no mostró diferencias significativas entre tratamientos, hay ciertas especies que sí mostraron diferencias entre tratamientos. En general el vino sin sulfuroso presenta mayor contenido de todas las especies de flavonoles y flavanoles analizadas, salvo las quercetinas, que fueron mayoritarias en el vino con sulfuroso (Figura 6).



**Figura 5:** Cromatogramas obtenidos por UPLC/MS-DAD a 324nm (A) y 520nm (B) respectivamente. En rojo el tratamiento sin sulfuroso; en azul el tratamiento con sulfuroso. Picos: (A) 1. Ácido gálico. 2. Galocatequina. 3. Ácido caftárico. 4. Procianidina B1. 5. Ácido cutárico. 6. Catequina. 7. Epicatequina. 8. Quercetina-3-*O*-galáctosido. 9. Quercetina-3-*O*-glucúronido. (B) 1. Delfinidina-3-*O*-glucósido. 2. Petunidina-3-*O*-glucósido. 3. Malvidina-3-*O*-glucósido. 4. Malvidina-3-*O*-(6'-acetil) glucósido. 5. Delfinidina-3-*O*-(6'-*p*-cumaroil) glucósido. 6. Petunidina-3-*O*-(6'-*p*-cumaroil) glucósido. 7. Malvidina-3-*O*-(6'-*p*-cumaroil) glucósido.

El tratamiento sin SO<sub>2</sub> también tuvo mayor cantidad de todos los antocianos, salvo cianidinas, que fueron similares en ambos tratamientos. Esto puede ser debido a que el sulfuroso agregado al vino como antiséptico y antioxidante se liga a los antocianos rápidamente dando un compuesto incoloro que, a pesar de ser un proceso reversible, puede ocasionar una pérdida de color en el vino (Aleixandre, 2012).

En cuanto a las especies de no flavonoides, tales como estilbenos y ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, todas fueron mayoritarias también en el vino sin sulfuroso (Figura 6). Esto puede ser debido a que los ácidos fenólicos, influyen en el color del vino porque participan en fenómenos de copigmentación junto con los antocianos.

En cuanto a los compuestos individuales, observamos que el vino sin sulfuroso tiene mayor contenido de miricetina aglicona y su derivado la laricitrina glucósido, así como de siringetina glucósido, que el vino con sulfuroso. En cambio, es el vino con sulfuroso el que tiene mayor cantidad de todas las quercetinas identificadas (Tabla 4).

Con respecto a los flavanoles, observamos que todos los compuestos muestran diferencias significativas. A nivel general, los valores son más altos en el vino sin sulfuroso. La catequina y epicatequina corresponden a las formas más abundantes de este grupo, así como los derivados de la epicatequina en forma de éster gálico. Los oligómeros y polímeros de estos flavanoles se conocen con el término de proantocianidinas. Dentro de éstas, reciben el nombre de procianidinas aquéllas que derivan de la catequina y epicatequina (Romero Cascales, 2008). Los antocianos bajo su forma catiónica ( $A^+$ ) reaccionan con las posiciones negativas de los taninos, formando un flaveno incoloro (A-T), el cual, posteriormente, se puede colorear de color rojo ( $A^+-T$ ), estableciéndose un estado de equilibrio entre ambas formas (Santos-Buelga *et al.*, 1995). El color de estos compuestos es parecido al de los antocianos. Pero los compuestos  $A^+-T$  serán más resistentes a la decoloración por el sulfuroso que los compuestos  $T-A^+$  que están más expuestos al efecto del sulfuroso y a la hidratación (Palacios López-Montenegro, 2014).

Le extracción de taninos se ve favorecida por altos niveles de  $SO_2$ , que permeabiliza las membranas celulares (Hernán, 2009). Sin embargo, en nuestro caso, podemos observar que el vino con sulfuroso tenía menor contenido de procianidinas que el vino sin sulfuroso. No se ha podido encontrar ningún tipo de información que pudiera aclarar o explicar esto.

Con respecto a los estilbenos, podemos observar que el resveratrol no muestra diferencias significativas en ambos vinos, sin embargo, el contenido de resveratrol-3-O-glucósido es mayor en el vino sin sulfuroso.

Los ácidos fenólicos se dividen en dos grupos: ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. En nuestro caso, dentro de los ácidos hidroxibenzoicos encontramos el ácido protocatéquico y el ácido gálico. El vino sin sulfuroso tenía mayor contenido de ácidos hidroxibenzoicos que el vino con sulfuroso. Por otro lado, dentro de los ácidos hidroxicinámicos encontramos el ácido caftárico y el ácido cutárico. El vino sin sulfuroso tenía mayor contenido de ácidos hidroxicinámicos que el vino con sulfuroso.

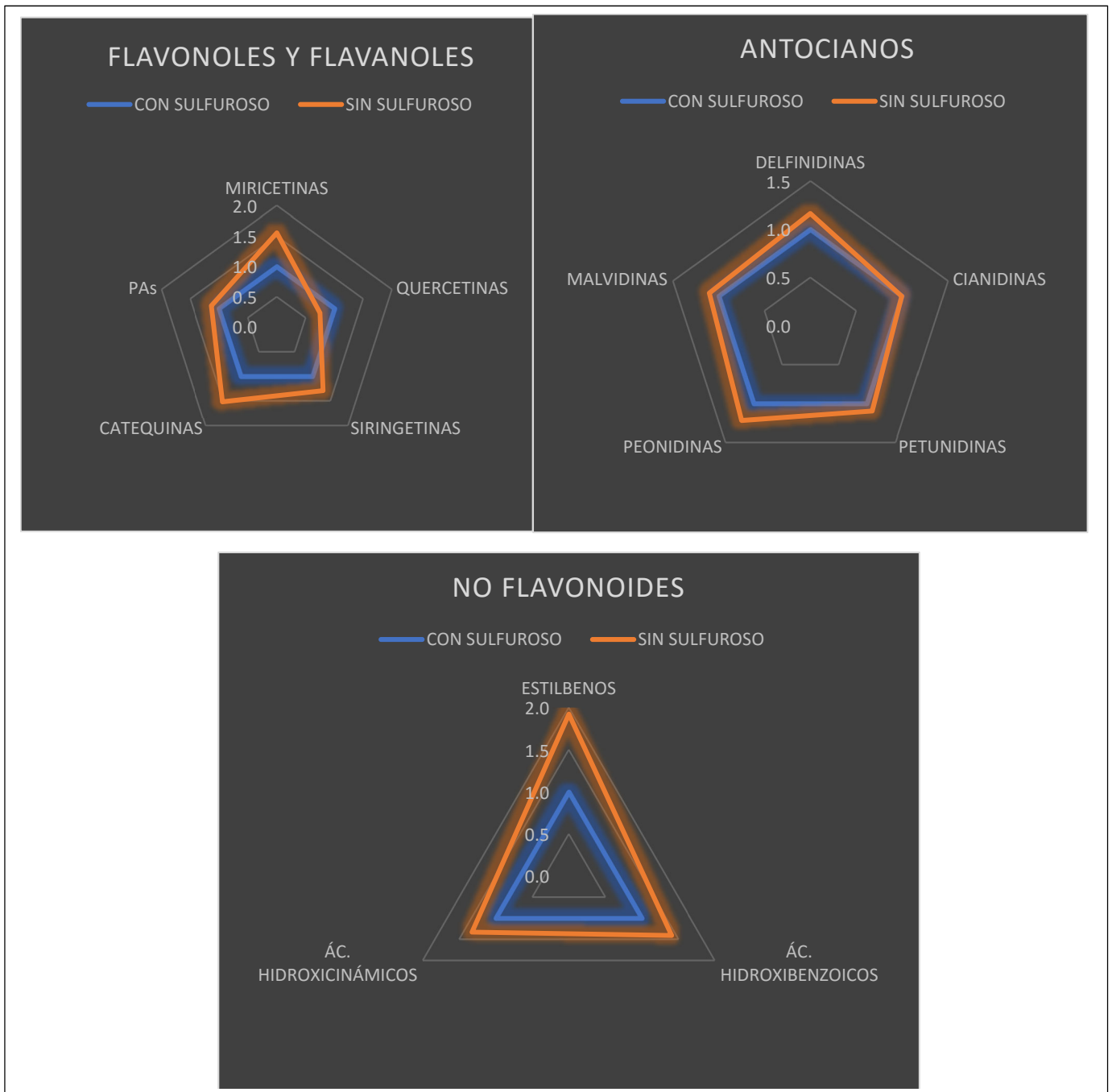
Estos compuestos participan en la acilación de las antocianinas (ácidos *p*-cumárico y cafeico), e influyen indirectamente en el color del vino a través de su participación en el fenómeno de copigmentación (Dimitric-Markovic *et al.*, 2000; Darias-Martín *et al.*, 2002). Los mayores contenidos de ácidos hidroxicinámicos en el vino sin sulfuroso podrían ayudar al mantenimiento e incremento del color que ha resultado en los vinos sin sulfuroso.



Por último, observamos que el éster etílico del ácido cafeico es el compuesto que menor concentración tiene en ambos vinos, esto es debido, a que la concentración de ésteres hidroxicinámicos disminuye durante el desarrollo de la baya y se estabiliza en la madurez enológica de la misma (Romeyer *et al.*, 1983).

Como también podemos observar en la Tabla 4, no todos los antocianos presentes en los vinos muestran diferencias significativas, ya que sólo observamos diferencias en ambos vinos en los siguientes antocianos: peonidina-3-*O*-glucósido, malvidina-3-*O*-glucósido, delphinidina-3-*O*-(6'-acetil) glucósido, petunidina-3-*O*-(6'-acetil) glucósido, peonidina-3-*O*-(6'-acetil) glucósido, malvidina-3-*O*-(6'-acetil) glucósido y peonidina-3-*O*-(6'-*p*-cumaroil) glucósido. Podemos observar que las antocianinas acetiladas, a excepción de la cianidina, son las que muestran mayores diferencias entre ambos tratamientos. También, se puede observar, que las antocianinas glucosiladas son aquellas que muestran menos diferencias entre ambos tratamientos.

Por último, cabe destacar, que la antocianina mayoritaria de este grupo como es la malvidina glucosilada presenta pocas diferencias entre ambos tratamientos.



**Figura 6:** Representación de las diferencias entre tratamientos (con sulfuroso y sin sulfuroso) de las distintas especies de compuestos fenólicos en unidades relativas.

	Con sulfuroso	Sin sulfuroso	Nivel de significación
<b>Flavonoles</b>			
Miricetina	1,93 ± 0,12	4,91 ± 0,19	***
Miricetina-3- <i>O</i> -glucósido	1,07 ± 0,03	0,93 ± 0,03	ns
Miricetina-3- <i>O</i> -glucurónido	2,32 ± 0,00	2,58 ± 0,07	ns
Laricitrina-3- <i>O</i> -glucósido	0,58 ± 0,01	0,76 ± 0,03	**
Siringetina-3- <i>O</i> -glucósido	1,86 ± 0,01	2,42 ± 0,05	**
Quercetina	2,34 ± 0,05	0,81 ± 0,07	***
Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	2,56 ± 0,08	0,77 ± 0,02	***
Quercetina-3- <i>O</i> -galactósido	11,1 ± 0,40	7,98 ± 0,33	**
Quercetina-3- <i>O</i> -glucurónido	5,22 ± 0,21	6,38 ± 0,18	ns
<b>Flavanoles</b>			
Catequina	20,0 ± 0,2	24,4 ± 0,7	**
Epicatequina	15,7 ± 0,2	20,3 ± 0,5	**
Galocatequina	27,6 ± 0,3	48,8 ± 0,8	***
Epigalocatequina galato	3,25 ± 0,05	8,27 ± 0,23	***
Procianidina B1	10,5 ± 0,1	11,7 ± 0,1	**
Procianidina B2	6,36 ± 0,10	7,45 ± 0,06	**
<b>Estilbenos</b>			
Resveratrol	0,05 ± 0,00	0,10 ± 0,01	ns
Resveratrol-3- <i>O</i> -glucósido	1,89 ± 0,06	3,64 ± 0,10	***
<b>Ácidos fenólicos</b>			
Ácido protocátequico	0,84 ± 0,03	1,05 ± 0,03	**
Ácido gálico	10,1 ± 0,4	14,4 ± 0,5	**
Ácido caftárico	23,0 ± 0,8	32,6 ± 1,1	**
Ácido cutárico	27,9 ± 1,1	34,8 ± 2,0	ns
Éster etílico del ácido cafeico	0,25 ± 0,01	0,60 ± 0,01	***
<b>Antocianos</b>			
Delfinidina-3- <i>O</i> -glucósido	32,4 ± 1,1	37,7 ± 1,7	ns
Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido	2,03 ± 0,03	2,15 ± 0,03	ns
Petunidina-3- <i>O</i> -glucósido	46,3 ± 0,3	50,1 ± 1,3	ns
Peonidina-3- <i>O</i> -glucósido	7,87 ± 0,19	9,36 ± 0,02	**
Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido	292 ± 0	319 ± 3	**
Delfinidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil) glucósido	9,5 ± 0,3	12,6 ± 0,4	**
Cianidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil) glucósido	0,77 ± 0,00	0,74 ± 0,04	ns
Petunidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil) glucósido	4,03 ± 0,11	5,40 ± 0,15	**
Peonidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil) glucósido	1,14 ± 0,03	1,83 ± 0,03	***
Malvidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil) glucósido	15,9 ± 0,4	21,5 ± 0,4	**
Delfinidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil) glucósido	11,0 ± 0,5	11,7 ± 0,2	ns
Cianidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil) glucósido	2,13 ± 0,06	2,04 ± 0,05	ns
Petunidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil) glucósido	9,24 ± 0,29	9,62 ± 0,15	ns
Peonidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil) glucósido	5,15 ± 0,12	6,04 ± 0,12	**
Malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil) glucósido	50,6 ± 0,7	54,9 ± 0,8	ns

**Tabla 4.** Compuestos fenólicos individuales identificados en los vinos. Se muestra el valor medio (mg L<sup>-1</sup>) y el error típico de las tres réplicas de cada tratamiento, así como el nivel de significación obtenido con el análisis de t-Student (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ; ns, diferencias no significativas).

## CONCLUSIONES

- Los tratamientos realizados en este TFG cumplieron con los objetivos planteados, ya que se pudieron observar diferencias entre los vinos elaborados con y sin anhídrido sulfuroso.
- La adición de SO<sub>2</sub> no modificó sustancialmente las características enológicas de los vinos, aunque sí produjo cambios en la mayoría de los parámetros relacionados con el color.
- El vino elaborado con anhídrido sulfuroso tenía menor concentración de la mayor parte de los grupos fenólicos presentes en los vinos: flavanoles, estilbenos, flavonoles, ácidos fenólicos y antocianos. Los flavonoles no mostraron diferencias entre tratamientos.
- La adición de SO<sub>2</sub> no provocó cambios cualitativos en la composición fenólica y en ambos vinos se identificaron los mismos compuestos. Sí se produjeron cambios cuantitativos importantes. Todos los flavanoles, estilbenos y ácidos fenólicos mostraron valores más altos en el vino sin SO<sub>2</sub>. Los diferentes flavonoles respondieron de manera dispar, sin cambios, como las miricetinas, aumentando en el caso de las quercetinas o disminuyendo como la siringetina.
- Aproximadamente la mitad de los antocianos mostraron cambios significativos entre tratamientos, siempre con mayores concentraciones en el vino sin SO<sub>2</sub>. Entre los antocianos más afectados por el SO<sub>2</sub> se encontraban las tres peonidinas, mientras que ninguna de las cianidinas cambió significativamente.
- En conclusión, la adición de SO<sub>2</sub> produjo importantes cambios tanto en los compuestos fenólicos directamente responsables del color como en aquellos implicados en la copigmentación. Estos cambios podrían tener gran trascendencia en el color y la estabilidad de los vinos, por lo que sería interesante profundizar en este estudio analizando el vino en etapas posteriores de elaboración, para tener una mejor comprensión de los efectos a lo largo de la vida del vino.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

**Agencia Estatal de Meteorología (AEMET).**

**Aleixandre Tudó, J. L. (2012).** Efecto de la adición de copigmentos sobre la composición fenólica de vinos tintos de Tempranillo elaborados con diferentes técnicas de vinificación. Valencia.

**Cabello Sáenz de Santa María F., Ortiz J.M., Muñoz G. (2011).** Variedades de vid en España. Ed: Agrícola Española S.A. 204-206.

**Calabriso, N., Scoditti, E., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Ingrosso, I., Giovino, G., & Carluccio, M.A. (2016).** "Multiple anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties of red wine polyphenolic extracts: differential role of hydroxycinnamic acids, flavonols and stilbenes on endothelial inflammatory gene expression." *European Journal of Nutrition* **55**: 477-489.

**Chamkha, M., Cathala, B., Cheynier, V., & Douillard, R. (2003).** "Phenolic composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot Noir vintages." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 3179-3184.

**Comuzzo, P., Battistutta, F., Vendrame, M., Silvina Páez, M., Luisi, G., & Zironi, R. (2015).** Antioxidant properties of different products and additives in White wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **168**: 107-114.

**Darias-Martín, J., Martín-Luis, B., Carrillo-López, M., Lamuela-Raventós, R., Díaz-Romero, C., & Boulton, R. (2002).** Effect of caffeic acid on the color of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2062-2067.

**Del-Castillo-Alonso, M. A., Diago, M. P., Monforte, L., Tardáguila, J., Martínez Abaigar, J., & Núñez-Olivera, E. (2015).** Effects of UV exclusion on the physiology and phenolic composition of leaves and berries of *Vitis vinifera* cv. Graciano. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 409–416.

**Del-Castillo-Alonso, M. A., Diago, M. P., Tomás-Las-Heras, R., Monforte, L., Soriano, G., Martínez-Abaigar, J., & Núñez-Olivera, E. (2016).** Effects of ambient solar UV radiation on grapevine leaf physiology and berry phenolic composition along one entire season under Mediterranean field conditions. *Plant Physiol. Biochem.* **109**, 374–386.

**Dimitric-Markovic, J., Petranovic, N.A., & Baranac, J.M. (2000).** A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 5530-5536.

**Gambini, J., López-Gruoso, R., Olaso-González, G., Inglés, M., Abdelazid, K., El alami, M., Bonet-Costa, V., Borrás, C., & Viña, J. (2013).** *Revista española de geriatría y gerontología*. Volumen 48, Issue 2, March–April 2013, Pages 79-88

**García, J., Xirau, M., & Azorín, R. (2005).** Técnicas usuales de análisis en Enología. Panreac Química S.A, Barcelona.

**Glories, Y. (1978).** Recherches sur la matière colorante des vins rouges. Thèse a L'Université de Bordeaux II.

**Glories, Y. (1984).** La couleur des vins roses. 2ème partie. Mesure, origine et interpretation. Connaissance Vigne Vin, 18, 253-271.

**Gobantes San Martín, S. (2016).** Evaluación de los cambios en la composición fenólica en vinificaciones de vinos tintos realizadas en bodegas comerciales.

**Guillaume Girard (2004).** Bases científicas y tecnológicas de la enología. Páginas 24-26. Editorial Acribia, S.A.

**Hernán F. Vila, Silvia C. Paladino, Jorge J. B. Nazrala y Claudia C. Lucero (2009).** Manual de técnicas analíticas para la evaluación de compuestos fenólicos y otros componentes de la uva.

**Hidalgo Togores, J. (2011).** Tratado de Enología, tomo 1, páginas 477 Ed. Mundi-Prensa Libros.

**La Rioja. Org (Estaciones meteorológicas)**

**López R, López I, González L, Garijo P, Garde T & Santamaría P. (2012).** Cuaderno de campo, ISSN 1137-2095, N.º 50, págs. 35-39

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

**Martínez De Toda, F., Ibañez, J., & Balda, P. (2012).** "Genetic and ampelographic identification of different grape varieties known as 'Tempranillo' in Rioja (Spain)". Vitis 51 (1), 39-40.

**Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV).**

**Osiris for wine.** <https://osirisforwine.com/sistema-osiris/>

**Palacios López-Montenegro, B., (2014).** Contribución a la estabilización del color de vinos mediante la adición de taninos de distinto origen.

**Pliego de condiciones de la DOCa Rioja.** (<https://www.riojawine.com/wp-content/uploads/1/2018/10/PLIEGO-DE-CONDICIONES-OCT-2018-UNICO-DOCUMENTO-PARA-WEB.pdf>)

**Reglamento (CE) N° 2676/90.** Del 17 de septiembre de 1990, por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino.

**Reglamento (CE) N° 1493/1999** Del Consejo a 17 de mayo de 1999. Anexo V sección A.

**Reglamento (CE) N° 1622/2000** Del Consejo a 24 de julio de 2000. Anexo XII.

**Reglamento (CE) N° 1991/2004** Del 19 de noviembre de 2004. Artículo 1 punto 1 sección B.

**Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2003).** Tratado de enología. Tomo 2. Química del vino. Estabilizaciones y tratamientos. Buenos Aires, hemisferio sur S.A.

**Rivas-Gonzalo, J., C. Santos Buelga y O. Lock, (2003).** Química y Estabilidad. pp.26-59. In: Muñoz, O (Ed). Antocianos y Betalainas, colorantes naturales de aplicación industrial CYTED. Editorial Salesianos, Santiago, Chile.

**Romero Cascales, I. (2008).** Extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino. Papel de los enzimas de maceración.

**Romeyer, F, M., Macheix, J.J., Goiffon, J.J., Reminiac, C.C., Sapis, J.C. (1983).** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 31, 346.

**Santos-Buelga, C.; Bravo-Haro, S.; Rivas-Gonzalo, J. C. (1995).** Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in models solutions. Z Lebensm Unters Forsch, 201: 269-274.

**Santos, M.C., Nunes, C., Saraiva, J.A., & Coimbra, M.A. (2012).** Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations.

**Somers, T. C. (1971).** The polymeric nature of wine pigments. Phytochemistry 10:2175-2186.

**Taíz, L. y E. Zeiger (2006).** Plant Physiology, Fourth Edition. U.S.A., Sinauer Associates.

**Timberlake, C.F. y Bridle, P. (1967).** Flavylum salts, anthocyanidins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. Am. K. Enol. Vitic. 27:97-105.

## AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras Encarna, Laura y Marian, por su gran apoyo, sus consejos, su esfuerzo y sobre todo su enorme paciencia, ya que, sin todo ello este trabajo no hubiera sido posible.

A S.C. Bodega San Miguel (Ausejo) y en concreto a su enólogo, Roberto Monforte, por facilitarnos los vinos y prestarnos toda su atención para poder realizar este trabajo.

A la Universidad de La Rioja, por prestar sus instalaciones para poder realizar los análisis.

Por último, agradecer a mi familia y compañeros todo el ánimo que me han brindado.