

# **Extracción de compuestos fenólicos de uva tinta cv.Cabernet Sauvignon mediante ultrasonidos**

Ana Belén Bautista-Ortín<sup>1</sup>, Ricardo Jurado<sup>2</sup>, Juan Alberto Iniesta<sup>2</sup>, Irene Manzanero<sup>2</sup>, Miguel Martínez<sup>2</sup>, María Dolores Jiménez<sup>1</sup>, Encarna Gómez-Plaza<sup>1</sup>

1. Dep. Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30071 Murcia
2. Agrovín S.A., Avenida de los vinos s/n, 13600 Alcazar de San Juan, Ciudad Real.

## **RESUMEN**

En la actualidad hay un gran interés por parte de las bodegas en elaborar a un menor coste vinos tintos mediante tecnologías que respeten la calidad de la uva. Debido a la mecanización de la vendimia, las bodegas se ven obligadas a procesar gran cantidad de uva en un menor tiempo, por ende, las inversiones son elevadas para poder procesar tal cantidad de materia prima. En los últimos años han aparecido en el mercado tecnologías que aceleran la elaboración de vinos tintos debido a una rápida extracción de compuestos fenólicos pero, en muchos casos, renunciando a la calidad de los mismos.

Este trabajo evalúa el potencial que tienen los ultrasonidos en la extracción de compuestos fenólicos de uvas tintas sin necesidad de aplicar altas temperaturas o enzimas enológicas para aumentar la eficacia del proceso. Los resultados muestran una aceleración en el proceso de extracción de compuestos fenólicos reduciendo la maceración a 2 días en aquellas uvas sonicadas frente a los 7 días que necesitaron los vinos elaborados de forma tradicional. Además, se evaluó la estabilidad de la materia colorante tras la fermentación maloláctica y 2 meses en botella, obteniendo una evolución de color similar entre los vinos elaborados mediante ultrasonidos y aquellos que se produjeron de forma tradicional.

## **PALABRAS CLAVE**

Cavitación, compuestos fenólicos, optimización, ultrasonidos.

## **INTRODUCCIÓN**

La primera sensación que percibimos en una copa de vino es su aspecto visual. Es precisamente la inmediatez de la visión la que otorga capital importancia a su apariencia. Su transparencia, su brillo y sobre todo su color son algunos de los atributos más determinantes de la calidad no solo por las evidentes implicaciones sobre su imagen, sino también porque son indicadores de otros aspectos relacionados con su aroma y sabor.

Especial interés tiene el color en vinos tintos y rosados, debido a los recursos económicos que se han de emplear para extraer la fracción fenólica del hollejo, lugar donde se almacenan los responsables de la coloración, los **compuestos fenólicos**. Bajo el nombre de compuestos fenólicos se agrupan sustancias heterogéneas, de todas ellas son los antocianos y los pigmentos derivados de ellos, producidos mediante procesos de copigmentación o

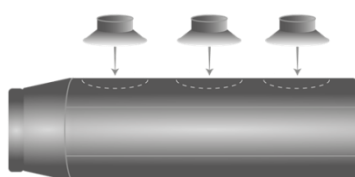
condensación, los compuestos que más influyen en la coloración de los vinos tintos y rosados dando lugar a coloraciones anaranjadas, rojas, violáceas o azules.

La transferencia de los fenoles responsables del color desde la parte sólida (hollejo) hacia la líquida (mosto o vino) después de un proceso de estrujado, está íntimamente relacionado con la materia prima y las técnicas de vinificación empleadas. Para conseguir un color estable y adecuado, se va a requerir un cierto tiempo de maceración del mosto con los hollejos, para así promover la extracción de antocianos y taninos, así como también de compuestos aromáticos del hollejo. El proceso de maceración se inicia en el momento del estrujado y se facilita cuando en el medio empieza a aparecer etanol (Sacchi et al., 2005). Para facilitar el contacto de las partes sólidas con el mosto, se realizan remontados frecuentemente. Normalmente son necesarios varios días de maceración (3-7) para lograr la extracción deseada de compuestos fenólicos. Pero a veces, y para grandes bodegas, ocurre que, a mitad de la vendimia, la capacidad de la bodega puede verse sobrepasada, debido a la gran entrada de uvas en la bodega y esta se ve forzada a reducir el tiempo de maceración y por tanto la calidad del vino que puede llegar a conseguir y su potencial de envejecimiento. Para controlar este problema, diferentes estrategias se han ido utilizando, para acortar la maceración y mantener el contenido fenólico. Estas técnicas se basan, casi todas ellas, en facilitar la disgregación de las paredes celulares del hollejo para facilitar la extracción de los compuestos localizados en el interior de las células. Entre estas técnicas podemos encontrar el uso de enzimas de maceración (Bautista-Ortín et al., 2005; Romero-Cascales et al., 2008, 2012) y el uso de tecnologías físicas como la termovinificación (Ribereau-Gayon et al., 1998; Jackson, 2000; de Andrade Neves et al., 2014) o la flash-expansión (Morel-Salmi et al., 2006).

Una novedad en este campo enológico es el uso de ultrasonidos de alta potencia para conseguir acelerar la extracción de los compuestos fenólicos de las uvas.

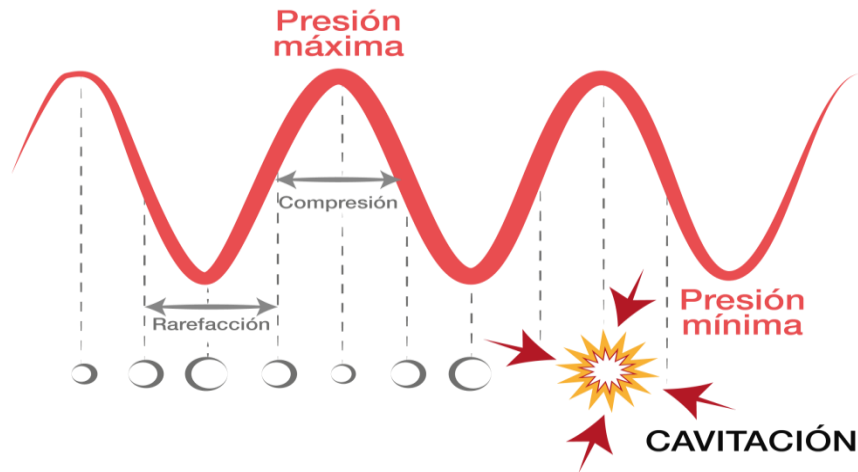
La tecnología de ultrasonidos está basada en ondas mecánicas que operan a frecuencias superiores al oído humano (>16 kHz) y que se transmiten a través de cualquier sustancia que tenga propiedades elásticas (Ferraretto et al., 2013). Los ultrasonidos de alta potencia (16-100 kHz) pueden romper células y dispersar material agregado. En enología pueden incrementar la extracción de compuestos intracelulares de los hollejos. Este incremento en la extracción se produce debido al proceso de la cavitación. Dicho proceso consiste en la producción sistemática de pequeñas burbujas que tienden a colisionar entre sí y a liberar su energía. Esa colisión agresiva de las burbujas junto con el proceso de implosión asociado, generan el desgaste del tejido del hollejo produciendo la liberación de los compuestos fenólicos que lo componen. De esta manera se consigue un mosto con un índice de color elevado. Al tratar la pasta de uva de forma mecánica en vez de térmica, se pretende conseguir un producto final de alta calidad sin aromas propios de los tratamientos térmicos.

AGROVIN S.A. ha diseñado una celda de cavitación compuesta por una tubería de acero inoxidable a la que se adosaron los transductores también denominados sonoplatos tal y como se muestra en la **figura 1**.



**Figura 1:** celda de cavitación

Un elemento indispensable en el proceso es el generador. Su función consiste en transmitir la energía eléctrica a cada uno de los sonoplatos con el objetivo de que el material piezocerámico que compone el sonoplatos se deforme generando en el medio colindante el proceso de **cavitación**.



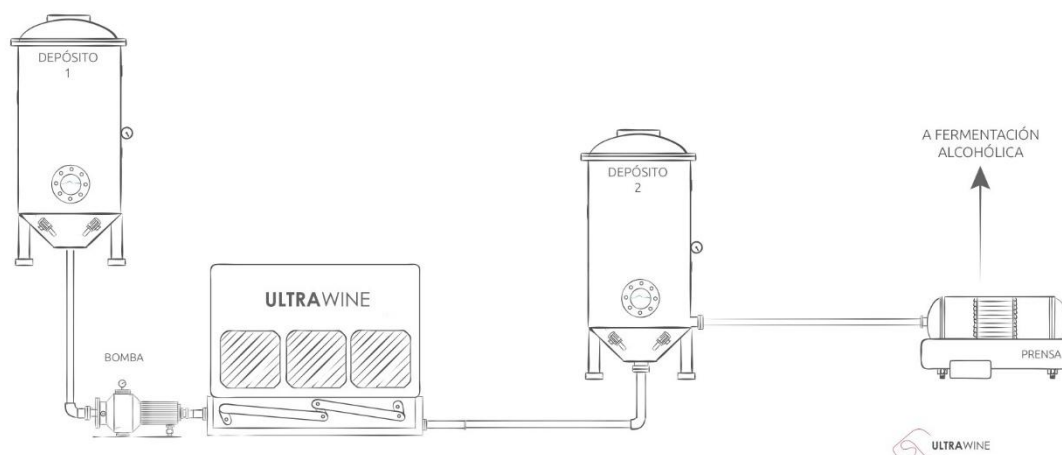
**Figura 2:** cavitación ultrasónica (Soria y Villamiel, 2010)

En este trabajo se muestran los resultados de la aplicación de ultrasonidos a la masa estrujada de uvas de la variedad Cabernet Sauvignon y los parámetros cromáticos finales del vino obtenido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La uva escogida para este trabajo procede de viñedos seleccionados de Cabernet Sauvignon situados en la localidad de Villacañas (Toledo). En el momento de la recogida, la uva presentaba un grado de maduración óptimo, imprescindible para un mejor rendimiento del equipo.

Para el tratamiento se empleó el sistema de trabajo que se indica en la **figura 3**.



**Figura 3.** Esquema de trabajo con ULTRAWINE para vinos tintos. Tras el estrujado y despallado de la uva, la pasta generada es tratada mediante el ultrasonido y depositada en el tanque de maceración 2 . Tras la maceración correspondiente, la pasta de uva se lleva a prensa y se realiza la fermentación del mosto sonicado.

Se realizaron las siguientes vinificaciones:

- Una vinificación control, donde se aplicó un tiempo de maceración de 7 días
- Tres vinificaciones utilizando ULTRAWINE y con cuatro diferentes tiempos de maceración, 24h, 48h, 72h y 7 días.

#### **Determinaciones espectrofotométricas**

Todas las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro HELIOS  $\alpha$  (TermoSpectronic, USA) a partir de las diferentes muestras filtradas usando filtros de nylon de 0,45 micras.

#### **Índice de polifenoles totales (IPT)**

Se obtiene por medida de la absorbancia a 280 nm del vino diluido 100 veces con cubetas de 1 cm de paso óptico.

$$IPT = A_{280} + 100$$

#### **Antocianos totales y antocianos poliméricos**

Se obtiene tras la adición de 20 mL de HCL 0,1 N a 0,5 mL de vino. Pasados 30 minutos se mide la absorbancia a 520 nm (Cayla et al., 2002) en cubetas de 1cm de paso óptico.

$$\text{Antocianos Totales } \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = A_{520} + 22,76 \times \text{dilución}$$

Los antocianos poliméricos se determinaron mediante la adición de 160  $\mu\text{L}$  de  $\text{SO}_2$  al 5% a 2 mL de muestra. La muestra fue agitada y tras 1 minuto se midió la absorbancia a 520 nm en cubetas de 0,2 cm de paso óptico (Boulton, 2001).

$$\text{Antocianos poliméricos } \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{Ab_{520} \times 529 + 5 + 1000}{28000}$$

### Taninos totales

La determinación de taninos totales se llevó a cabo por el método de la metilcelulosa. Para ello, a 50  $\mu\text{L}$  de vino se le adicionan 600  $\mu\text{L}$  de una solución de metil-celulosa (0,04%), se deja reposar 2-3 minutos y a continuación se le adicionan 400  $\mu\text{L}$  de una solución saturada de sulfato de amonio y 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . La muestra se agita y se deja reposar 10 minutos. Después se centrifuga a 10.000 rpm durante 5 minutos y se mide la absorbancia a 280 nm. Una muestra control sin metilcelulosa es requerida para determinar la absorbancia correspondiente a los taninos. La concentración de estos compuestos se expresa en mg/L utilizando la (-)-epicatequina como patrón externo.

### Intensidad de color (IC) y Tono

Se determina a través de la suma de la absorbancias a 620 nm (componente azul), 520 nm (componente roja) y 420 nm (componente amarilla) la intensidad de color del vino sin diluir mediante cubetas de 0,2 cm de paso óptico (Glories, 1984).

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

El tono se obtiene como el cociente entre las absorbancias a 420 y 520 nm.

$$\text{Tono} = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

### Determinación de taninos por HPLC

La determinación de taninos también se llevó a cabo por HPLC, mediante la optimización del método propuesto por Pastor del Río (2006).

Para ello, se concentraron en un centrivap a 50°C durante 12 horas 5 mL de cada vino. Tras este tiempo, los extractos fueron redisueltos en 3 mL de agua pasados a través de cartuchos Sep-Pak C18 (1g, Waters, Mildford, USA) acondicionados previamente con 10 mL de metanol y 15 mL de agua. Después se eliminaron los compuestos interferentes (ácidos fenólicos, azúcares, etc) lavando con 15 mL de agua los cartuchos. Los compuestos de interés se eluyeron con 10 mL de metanol. Finalmente, el extracto metanólico fue concentrado de nuevo en el centrivap a 35°C durante 10 horas, liofilizado y redisuelto posteriormente en 1 mL de metanol.

Para obtener la información sobre el contenido, composición y grado medio de polimerización de las proantocianidinas (Gpm) se utiliza el método de la fluoroglucinolisis propuesto por Kennedy y Jones (2001) basado en la ruptura de los enlaces interflavánicos en medio ácido y en presencia de un agente nucleófilo, el fluoroglucinol, seguido de un análisis de HPLC de los productos de reacción. Por tanto, a 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras de extracto metanólico se le añade 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de fluoroglucinolisis, el cual presenta una composición de 100 g/L de fluoroglucinol y 20 g/L de ácido ascórbico en HCL 0,2 N en metanol. La reacción se produjo a 50°C durante 20 minutos, tras ello se le añadió 200  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio (200 mM) para la reacción. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 10 min a 1000 rpm y se colocaron en sus correspondientes viales para poder introducirlos en el HPLC.

Para la separación de los productos de reacción (unidades terminales y aductos con fluoroglucinol) se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido Waters 2695 (Waters, PA, USA), equipado con un detector diodo-array Waters 2696. La columna utilizada fue una Atlantis C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula) protegida con una precolumna del mismo material (20 x 250 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula) (Waters, Milford, MA).

Los disolventes utilizados fueron ácido fórmico al 2% (A) y una mezcla de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O/fórmico (B) (80:18:2) con un flujo de 0,8 mL/min, con un volumen de muestra inyectada de 10 µL a una temperatura de 30°C. Las condiciones de elución fueron aquellas informadas por Busse-Valverde et al. (2010).

Los compuestos se determinaron a 280 nm y como patrón de cuantificación se utilizó la (+)-catequina, de manera que los productos obtenidos tras la ruptura se estiman usando los factores de respuesta relativos a ella.

### Análisis sensorial

Se realizó un análisis sensorial descriptivo, comparando el vino testigo, tras dos meses en botella y el vino obtenido de pasta sonicada con 48 horas de maceración y tras dos meses en botella.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los datos espectrofotométricos muestran que los vinos elaborados de pasta sonicada alcanzan tan solo con 48 horas una intensidad de color y un contenido en taninos similar al vino testigo elaborado con siete días de maceración (tabla 1).

**Tabla 1.** Características cromáticas de los vinos testigo y sonicados al final de la fermentación maloláctica y tras dos meses en botella.

Muestras	IC	±SD	Tono	±SD	IPT	±SD	AT	±SD	AP	±SD	TT	±SD
<b>FML</b>												
Testigo 7 dm	8,7	0,8	0,61	0,01	43,9	2,8	425,0	5,6	24,4	2,6	931,6	17,8
Sonicado 24h mac.	6,2	0,4	0,62	0,00	30,6	0,9	256,6	2,4	22,8	1,3	524,4	47,7
Sonicado 48h mac.	8,9	0,1	0,57	0,00	35,9	1,2	252,6	14,5	32,1	1,1	929,9	42,1
Sonicado 72h mac.	10,9	0,7	0,56	0,00	43,8	1,9	290,2	12,9	37,7	2,7	1195,6	13,2
Sonicado 7dm	10,8	0,1	0,57	0,00	57,2	0,3	413,1	8,0	30,4	0,0	1768,2	7,4
<b>2 meses en botella</b>												
Testigo 7 dm	7,1	0,3	0,70	0,00	44,0	3,1	347,8	6,7	41,7	4,4	982,2	2,2
Sonicado 24h mac.	5,3	0,1	0,69	0,01	29,7	0,2	211,3	8,8	34,3	0,7	481,3	35,2
Sonicado 48h mac.	7,3	0,3	0,63	0,01	35,6	1,2	227,8	12,9	50,1	0,7	917,7	11,6
Sonicado 72h mac.	8,2	0,4	0,64	0,01	44,7	0,4	302,4	16,2	58,0	4,3	1114,1	5,4
Sonicado 7dm	9,0	0,0	0,66	0,00	59,0	0,6	348,0	3,5	59,1	0,7	1464,7	26,0

IC: intensidad de color, IPT: índice de polifenoles totales, AT: antocianos totales (mg/L), AP: antocianos poliméricos (mg/L), TT: taninos totales determinados por el método de la metil celulosa (mg/L).

\*dm: días de maceración

Si observamos los resultados de los vinos que se han elaborado con pasta sonicada y con 72 horas de maceración, estos presentan valores cromáticos superior al testigo en todos los casos. Además, es muy significativo señalar que estas características cromáticas son estables y se mantienen las diferencias tras dos meses en botella. Está claro que la sonicación de las uvas estrujadas facilitó la ruptura de las estructuras celulares y facilitó la extracción de compuestos fenólicos, de una forma mucho más rápida que en el caso de la pasta no sonicada.

Es en los taninos totales donde se han encontrado las mayores diferencias y el mayor efecto de la sonicación del mosto. Al final de la fermentación maloláctica, la cantidad de taninos es similar en el vino control (con siete días de maceración) y el vino elaborado con pasta sonicada y macerado solamente 48 horas. Si la maceración de la pasta sonicada dura 7 días, el contenido en taninos es muy superior.

Para tener más información sobre el tipo de taninos extraídos, éstos también fueron analizados por cromatografía líquida, utilizando el método de la fluoroglucinolisis, que nos da información de la cantidad total de taninos que se despolimerizan, el grado de polimerización de esos taninos, su porcentaje de galoilación y la cantidad de epigallocatequina, una subunidad que solamente puede provenir de los taninos de las pieles de las uvas (tabla 2). Tal y como ya se observó cuando se midieron los taninos por el método de la metilcelulosa, los vinos elaborados con pasta sonicada muestran concentraciones similares de taninos con tiempos de maceración mucho más cortos que los empleados en el vino control. El grado de polimerización de los taninos es ligeramente superior en el vino testigo pero la cantidad de epigallocatequina (subunidad que solamente puede provenir del hollejo de la uva) en los vinos con siete días de maceración es superior al vino testigo, poniendo de manifiesto la mayor contribución de los taninos de hollejo al perfil tánico de estos vinos y mostrando que la sonicación promueve una mayor liberación de los taninos del hollejo. La galoilación solo sufre ligeras fluctuaciones para vinos de pasta sonicada y pocos días de maceración, aunque este parámetro sí que se ve más incrementado en vino de pasta sonicada y 7 días de maceración, indicando que quizás, y para esta variedad, cuando se incrementa mucho el tiempo de maceración también se ve favorecido la extracción del tanino de semilla.

**Tabla 2.** Composición cuantitativa y cualitativa de los taninos de los vinos, determinados por el método de la fluoroglucinolisis.

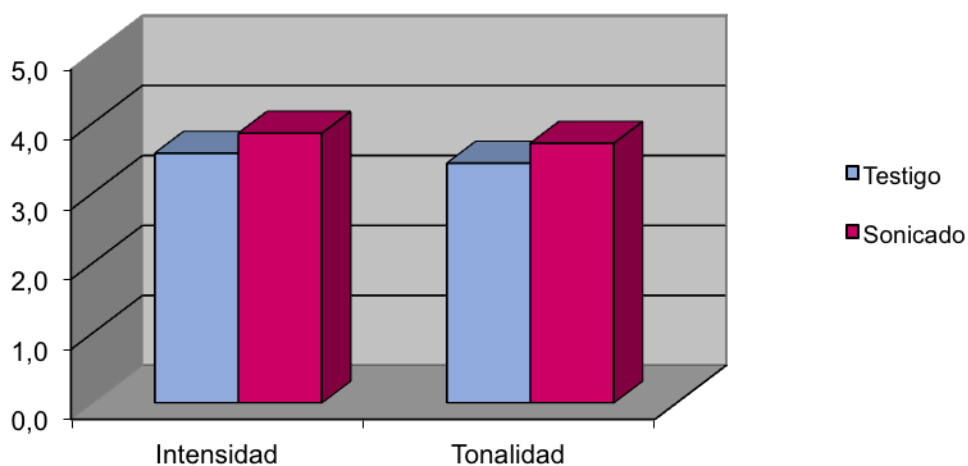
Muestras	TT_F	±SD	GPm	±SD	%Galoilación	±SD	EGCAT	±SD
<i>FML</i>								
Testigo 7 dm	622,4	23,6	4,5	0,3	3,2	0,5	1616,0	68,8
Sonicado 24h mac.	330,7	15,3	3,4	0,0	4,0	0,1	493,2	33,9
Sonicado 48h mac.	375,9	105,1	3,5	0,0	3,7	0,2	580,0	171,6
Sonicado 72h mac.	650,9	20,3	3,9	0,0	3,3	0,1	1104,2	71,6
Sonicado 7dm	1288,6	29,3	3,9	0,3	6,7	0,1	1924,2	122,1

TT: taninos totales (mg/l), GPm: grado medio de polimerización, EGCA: epigallocatequina (µM)

\*dm: días de maceración

Dado que el vino más prometedor podría ser el elaborado con pasta sonicada y macerado durante solamente 48 horas, ya que se consiguen unas características cromáticas similares al vino testigo y con cinco días menos de maceración, estos dos vinos, el control y el elaborado con pasta sonicada y macerado durante 48 horas fueron evaluados sensorialmente. Un vino de Cabernet “tipo” posee en la fase visual un color rojo oscuro, rubí con notas violáceas. Entre los aromas que ofrece el vino Cabernet destacar la pimienta negra, grosella, cedro, coco, mora y mina de lápiz. En boca se aprecian sabores a pino, cedro, grafito, chocolate negro y aceitunas. En los vinos que se han evaluado, la fase visual entre el tratado y testigo no presentan grandes diferencias, una leve mejora de intensidad y tonalidad se detecta en el vino tratado con ULTRAWINE (*figura 4*).

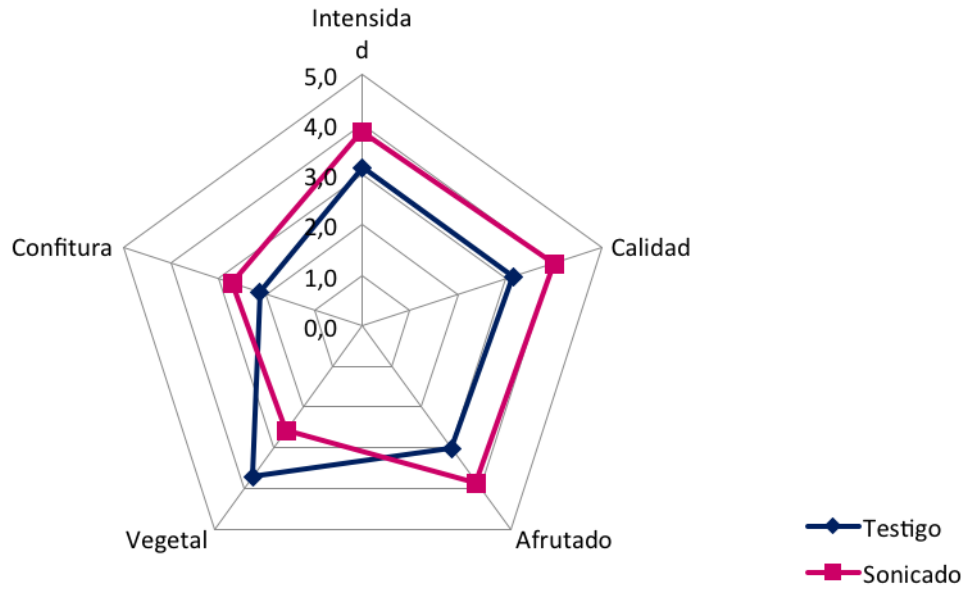
**Figura 4.** Evaluación sensorial de los parámetros intensidad y tonalidad del color de los vinos testigo y sonicado con 48 horas de maceración, tras dos meses en botella



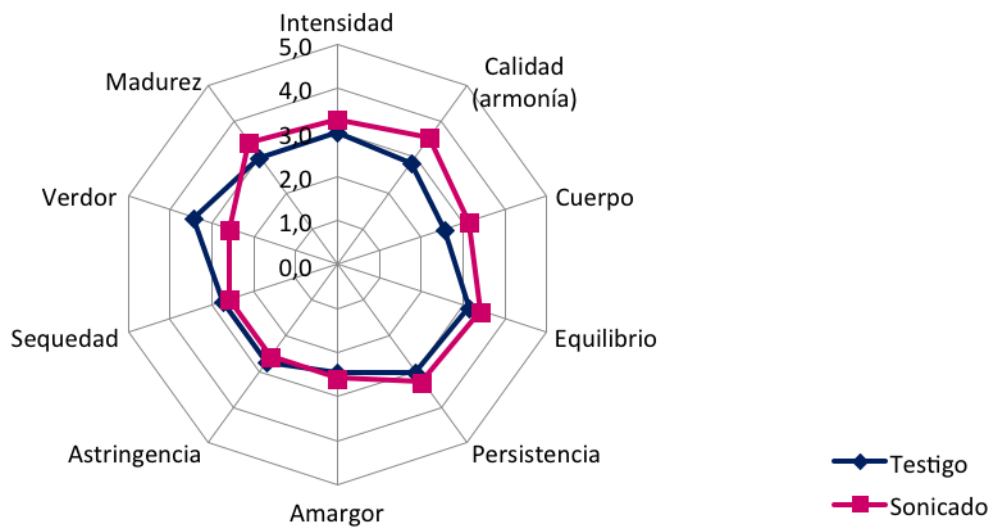
Realmente donde si existen grandes diferencias entre el vino testigo y tratado es en la fase olfativa y gustativa, donde se destaca en el vino elaborado con pasta sonicada, la persistencia, equilibrio, cuerpo e intensidad. En el vino obtenido mediante sonicación no se detecta verdores ni aromas o sabores propios de la pirazinas como es el pimiento verde (*figuras 5 y 6*)



**Figura 5.** Evaluación sensorial del aroma de los vinos testigo y sonicado con 48 horas de maceración, tras dos meses en botella



**Figura 6.** Evaluación sensorial del gusto de los vinos testigo y sonicado con 48 horas de maceración, tras dos meses en botella



Los resultados de la aplicación de esta tecnología a uvas de Cabernet Sauvignon ha mostrado que realmente la tecnología es eficaz para facilitar la extracción de compuestos fenólicos desde la fracción sólida (hollejos) a la fracción líquida (mosto). Es una tecnología que se puede aplicar como un pretratamiento continuo a las uvas estrujadas, antes de que estas pasen al tanque de maceración, representando una posibilidad de optimizar la capacidad de la bodega, reduciendo el tiempo de maceración necesario para alcanzar una adecuada extracción de compuestos fenólicos. Además, es una tecnología limpia, económica y mejora no solo el color del vino sino también su evaluación olfativa y gustativa.

**Agradecimientos:** Este trabajo está financiado por el Instrumento PYME del programa Horizonte 2020 de la Comisión Europea.

## REFERENCIAS

- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Cutillas, A., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2005). Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 1-12.
- Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I., & Bautista-Ortín, A. B. (2010). Effect of different enological practices on skin and seed proanthocyanidins in three varietal wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11333-11339.
- de Andrade Neves, N., de Araujo Pantoja, L., & dos Santos, A. (2014). Thermovinification of grapes from the Cabernet Sauvignon and Pinot Noir varieties using immobilized yeasts. *European Food Research and Technology*, 238, 79-84.
- Ferraretto, P., Cacciola, V., Ferran Batlo, I., & Celotti, E. (2013). Ultrasound application in winemaking: grape maceration and yeast lysis. *Italian Journal of Food Science*, 25, 160-168.
- Jackson, R. (2000). *Wine Science: Principles, practice and perception*. Academic Press, San Francisco.
- Pastor del Rio, J. L. & Kennedy, J. A. (2006). Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 125-132.
- Morel-Salmi, C., Souquet, J. M., Bes, M., & Cheynier, F. V. (2006). Effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 4270-4276.
- Romero-Cascales, I., Fernández-Fernández, J. I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2008). Characterisation of the main enzymatic activities present in six

commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1295-1305.

Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2012). The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. *Food Chemistry*, 130, 626-631.

Sacchi, K., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 197-206.