



**UNIVERSIDAD DE TALCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Efecto de la aplicación taninos enológicos y ultrasonido sobre la concentración  
de compuestos fenólicos y color de un vino Cabernet Sauvignon**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**Kevin Yerel Ibáñez Hernández**

**Talca, Chile**

**2020**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2020

## APROBACIÓN



Handwritten signature of Felipe Laurie Gleisner in blue ink, underlined.

---

Profesor Guía: Felipe Laurie Gleisner, Ingeniero Agrónomo. M.S. Ph.D)



Handwritten signature of María Asunción Navarro Fernández in black ink, enclosed in a large oval.

---

Profesor informante: (María Asunción Navarro Fernández, Licenciada en ciencia y tecnología de los alimentos. Ph.D)

Fecha de presentación de la Defensa de Memoria: 29/05/2020

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer al profesor Felipe Laurie por guiarme en este proyecto de investigación, por su tiempo y dedicación para entregar conocimiento para mi desarrollo personal y para realización de este escrito. A mi pareja Vixania Faundez y mi hija por acompañarme y ayudarme en este importante proceso de mi vida entregándome amor incondicional y una gran paciencia.

Dar gracias igualmente a mis padres por darme la oportunidad de cumplir uno de mis objetivos y apoyarme en cada decisión tomada a lo largo de toda mi vida aportando educación y valores. Finalmente agradecer los conocimientos y ayuda entregada por María Navarro, Liudis Pino y Paula Peña para realizar mis ensayos y llevar a cabo mi investigación.

## **ABSTRAC**

To this date, several studies have reported that the use of ultrasound produces changes in the polyphenol concentration in wine. Although, there is not yet reports about the combined use of ultrasound and the tannins used in winemaking, and tier effect over phenolic composition on them. The present study looks to evaluate the use of ultrasound with the application on tannins, and in this way visualize the behavior of the polyphenol concentration, and the copigmentation of a wine of Cabernet Sauvignon variety. The treatments had different conditions, altering the ultrasound to frequency of 20 kHz and an amplitude of 40%, while the winemaking tannin application was of 0,2g. The results indicate that for the case of total polyphenols there was a significant increase in total concentration, while in the tannins, there was no statistical differences shown. Moreover, the copigmentation in the wines showed an increase of the total amount of anthocyanins and the color due to polymer pigments, but a decrease in the color due to anthocyanins copigmented. However, it is necessary to realize more studies to determine the behavior of the results in a longer period of time, realizing future investigations related to our experiment.

## RESUMEN

A la fecha, varios estudios han reportado que la aplicación de ultrasonido provoca cambios en la concentración de los polifenoles en el vino. Sin embargo, todavía no existen reportes del uso combinado de taninos enológicos con ultrasonido en vinos tintos, y sus efectos sobre la composición fenólica de los mismos. El presente estudio busca evaluar el uso del ultrasonido con la aplicación de taninos, y de esta manera visualizar el comportamiento de las concentraciones de los polifenoles y la copigmentación de un vino de la variedad Cabernet Sauvignon. Los tratamientos tuvieron diferentes condiciones alternado el uso del ultrasonido con una frecuencia de 20 kHz y una amplitud del 40%, mientras que la aplicación de taninos enológicos fue de 0,2 g. Los resultados indicaron que para el caso de polifenoles totales se produjeron aumentos significativos en la concentración total, mientras que, en el caso de los taninos, estos no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, la copigmentación de los vinos demostró aumentos en el caso de antocianinas totales y el color debido a pigmentos poliméricos, pero una disminución en el color debido a antocianinas copigmentadas. De todos modos, es necesario realizar más estudios para determinar el comportamiento de los resultados en una mayor cantidad de tiempo, efectuando futuras investigaciones relacionadas con nuestro ensayo.

# ÍNDICE

<b>Capítulos</b>	<b>Página</b>
<b>1. Introducción</b>	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivo general	3
1.3 Objetivos específicos	3
<b>2. Revisión bibliográfica</b>	4
2.1 Importancia de la vid en Chile	4
2.2 Variedad Cabernet Sauvignon	4
2.3 Proceso de vinificación	5
2.4 Compuestos fenólicos	6
2.4.1 Fenoles no flavonoides	6
2.4.2 Fenoles flavonoides	6
2.5 Taninos presentes en el vino	7
2.6 Taninos enológicos comerciales TECs	7
2.7 Ultrasonido	8
2.8 Ultrasonido en el vino	8
<b>3. Materiales y métodos</b>	10
3.1 Ubicación	10
3.2 Materiales	10
3.3 Métodos	12
3.4 Análisis estadístico	15
<b>4. Resultados y discusión</b>	16
<b>5. Conclusión</b>	25
<b>6. Bibliografía</b>	26
<b>7. Anexos</b>	35

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Descripción de los tratamientos con respectivas abreviaciones.....	12
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Concentración de polifenoles totales de los tratamientos T0, T1, T2 y T3, en cuatro tiempos de medición correspondientes al día 1, 15, 35 y 70 después de efectuados los tratamientos. ....	16
<b>Figura 2.</b> Contenido de taninos totales de los tratamientos T0, T1, T2 y T3, medidos en tres tiempos distintos (día 1, 35 y 70) posterior a la aplicación del tratamiento (T0, T1, T2, y T3 respectivamente). ....	18
<b>Figura 3.</b> Resultado de absorbancias correspondiente a las antocianinas totales de cuatro tratamientos (T0, T1, T2 y T3) efectuados durante tres tiempos de medición diferentes (días 1, 15 y 35) una vez aplicados los tratamientos. ....	20
<b>Figura 4.</b> Absorbancias obtenidas para color debido a antocianinas copigmentadas medidas a través del método de la Copigmentación correspondiente a los tratamientos T0, T1, T2 y T3 medidos en tres tiempos distintos (días 1, 15 y 35). ....	22
<b>Figura 5.</b> Absorbancias conseguidas para la medición del color debido a pigmentos poliméricos de cuatro tratamientos T0, T1, T2 y T3 medidos en tres tiempos distintos (días 1, día 15 y día 35). ....	23

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Cuadro de medias y desviaciones estándar de la concentración polifenoles totales. .....	35
<b>Anexo 2.</b> Cuadro de medias de concentración y desviaciones de la concentración de taninos totales. ....	35
<b>Anexo 3.</b> Cuadro de medias de absorbancias y desviaciones estándar de antocianinas totales. .....	35
<b>Anexo 4.</b> Cuadro de medias de absorbancias y desviaciones estándar del color debido a antocianinas copigmentadas.....	36
<b>Anexo 5.</b> Cuadro de medias de absorbancias y desviaciones estándar del color debido a antocianinas copigmentadas.....	36
<b>Anexo 6.</b> Tabla ANOVA sobre la medición de concentración de polifenoles totales.....	36
<b>Anexo 7.</b> Tabla ANOVA respecto de la concentración de taninos totales. ....	36
<b>Anexo 8.</b> Tabla ANOVA de absorbancias de antocianinas totales.....	37
<b>Anexo 9.</b> Tabla ANOVA de absorbancias respecto del color debido a antocianinas copigmentadas.....	37
<b>Anexo 10.</b> Tabla ANOVA de absorbancias sobre el color debido a pigmentos poliméricos .	37

## 1. INTRODUCCIÓN

En Chile la variedad Cabernet Sauvignon se caracteriza por presentar una cantidad importante de polifenoles (Xu et al., 2010), los que están divididos en dos grupos: Los de tipo flavonoides y los no flavonoides. Estas sustancias son responsables de la astringencia del vino (Vidal, 2003), atributo gustativo que afecta la aceptabilidad y el consumo de este tipo de bebidas (Bruwer et al., 2011, Gawel et al., 2000, Vidal et al., 2004). La astringencia del vino varía según la estructura de los polímeros complejos (taninos), o aquellos de alto peso molecular (Cala et al., 2011), situación que los hace particularmente relevantes a la hora de desarrollar investigaciones enológicas.

Además de aquellos taninos que ocurren naturalmente en la fruta, en la vinificación de las uvas de la vid se han utilizado una gran diversidad de taninos enológicos comerciales (TECs), los que pueden tener dos orígenes: (a) Aquellos elaborados en base a extractos de polifenoles de diferentes órganos de la planta, tales como pieles y semillas de uva, y que se denominan taninos condensados; y (b) polifenoles extraídos de la madera de roble llamados taninos hidrolizables (Malacarne et al., 2016).

Químicamente, los compuestos fenólicos presentan un núcleo bencénico substituido por uno o varios grupos hidroxilos y una cadena lateral funcional (Peña-Neira, 2006), y se clasifican en dos grandes grupos: no flavonoides y flavonoides. Estas sustancias se encuentran en distintas partes del racimo de la vid, principalmente en las pieles y semillas de la baya, de donde algunos de los compuestos fenólicos son extraídos durante la vinificación (Nadal et al., 1995). Los compuestos fenólicos contribuyen directamente a algunas de las características sensoriales que en la etapa de vinificación son los responsables de aportar el sabor, aroma, astringencia, amargor y color al vino (Cheynier et al., 1990). El color de los vinos tintos envejecidos se debe casi exclusivamente a compuestos fenólicos poliméricos cuyas unidades constitutivas son extraídas durante las etapas tempranas de la vinificación, y transformados a estructuras más complejas a medida que avanza el proceso de producción del vino (González-Neves et al., 2003).

En el último tiempo, autores como Masuzawa et al., (2000) han estudiado la aplicación de nuevas tecnologías que provocan la polimerización de compuestos polifenólicos en vino tinto promovido por ultrasonido a bajos niveles de presión sonora. Esta tecnología aplicada en el área enológica busca acelerar la extracción de los compuestos fenólicos de las bayas y además es considerado uno de los métodos alternativos potenciales para mejorar la calidad de algunos vinos (Zhang et al., 2016). Los ultrasonidos ejercen su acción a través del fenómeno de la cavitación, el cual ocurre cuando se aplican ultrasonidos de alta energía en un líquido que posea propiedades elásticas. La expansión de las moléculas del líquido, por la fuerza de los ultrasonidos, genera burbujas o cavidades que colapsan (implosionan) formando presiones locales capaces de alterar la estructura de los tejidos vegetales y favorecer así la extracción de los compuestos intracelulares (Bautista-Ortín et al., 2017).

El presente estudio busca evaluar indirectamente la capacidad de formación de complejos moleculares entre antocianinas y taninos del vino, evaluando la concentración de polifenoles totales, taninos, y color del vino a través del uso de la tecnología del ultrasonido en combinación de taninos enológicos durante el proceso de almacenamiento en botella.

## **1.1 Hipótesis**

La aplicación de tecnologías de ultrasonido de alta potencia en conjunto de taninos enológicos en el proceso de envejecimiento de un vino de la variedad Cabernet Sauvignon aumenta la concentración de polifenoles y copigmentación del vino.

## **1.2 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la aplicación de ultrasonidos en combinación con taninos enológicos sobre el contenido de compuestos fenólicos de un vino Cabernet Sauvignon

## **1.3 Objetivos específicos**

Evaluar la concentración de polifenoles, taninos, y copigmentación de un vino Cabernet Sauvignon posterior a la aplicación de ultrasonidos en combinación con taninos enológicos.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Importancia de la vid en Chile**

En Chile existe una superficie total de 135.907 hectáreas de *Vitis vinifera L.*, de las cuales la mayoría se encuentran en la región del Maule y O'Higgins, logrando un total de 72% de la superficie nacional. En los últimos años, la producción de vino ha llegado a un total que ha variado entre 1.100 y 1.200 millones de litros. Por otra parte, Chile se ha posicionado como el primer exportador de vinos del nuevo mundo y el cuarto exportador mundial, con una gran parte de vinos a granel (ODEPA, 2019).

### **2.2 Variedad Cabernet Sauvignon**

Según el Catastro Vitícola Nacional del 2018 del Servicio Agrícola y Ganadero reportó que se plantaron 41.098 hectáreas de la variedad tinta Cabernet Sauvignon, mientras que su producción de vinos con denominación de origen fue de un 34,8 %. La variedad Cabernet Sauvignon produce bayas negras y pequeñas, firmemente adheridas a los pedicelos, poseen pieles gruesas que determinan un sabor altamente astringente, un alto contenido de taninos, acidez y color oscuro. Su vino generalmente necesita envejecimiento o mezcla para reducir o suavizar amargura (Galet, 1998). Además, posee un color profundo y una notable concentración de complejos fenólicos que en algunos casos requiere de un envejecimiento prolongado en barril o botella, produciendo un vino con mucha estructura y desarrollando aromas y sabores deseados (Robinson, 2006).

### **2.3 Proceso de vinificación**

El proceso de elaboración del vino es denominado vinificación en donde encontramos dos procesos importantes, la fermentación alcohólica de los vinos y su envejecimiento. En primer lugar, la fermentación alcohólica es el proceso en donde las levaduras transforman el azúcar proveniente del mosto en etanol y CO<sub>2</sub> (Jara, 2013). En la mayoría de los vinos tintos, se realiza además una segunda fermentación (fermentación maloláctica) conducida por bacterias lácticas, encargada de aportar estabilidad microbiana y desacidificación del vino. Durante el envejecimiento del vino, ocurren reacciones químicas complejas que involucran azúcares, ácidos y compuestos fenólicos (principalmente taninos y antocianinas), estos pueden producir algunos efectos significativos en el vino como reducir la astringencia y el amargor, originando de esta manera un vino más elegante, con un color estable, aroma más complejo y de mejor sabor, generando una mejor aceptación del paladar del consumidor (Zhang, et al., 2016). El envejecimiento tradicionalmente se realiza en barricas o botellas; sin embargo, estos procesos demoran demasiado tiempo y son costosos por los que en los últimos años han sido estudiado nuevos métodos tecnológicos como el ultrasonido que han sido ensayados para acelerar las reacciones dentro del vino o para aumentar la extracción de compuestos fenólicos (García Martín y Sol, 2013).

## **2.4 Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos varían ampliamente en su estructura química, con diferencias importantes entre los más simples (monómeros y oligómeros) y hasta los polímeros complejos de peso molecular alto (taninos). Se han identificado más de 4000 compuestos polifenólicos individuales, los cuales se han dividido en dos grandes grupos: los no flavonoides y los flavonoides (Vázquez-Flores et al., 2012). Estos compuestos son aportados desde las uvas al vino incorporando polifenoles de tipo flavonoides, específicamente, antocianos, flavonoles y flavanoles (Martelo-Vidal y Vázquez, 2014), y su concentración está influenciada por diferentes variables tales como manejos enológicos y agrícolas (Monagas et al., 2005), aspectos de edafología (Keller, 2003), aspectos varietales (Rodríguez-Montealegre et al., 2006; Obreque-Slier et al., 2010) y el clima (Nicholasa et al., 2011).

### **2.4.1 Fenoles no flavonoides**

Estas sustancias están compuestas por fenoles primarios definidos como ácidos fenólicos; ácidos hidroxicinámicos (cafeico, p-cumárico, ferúlico) y ácidos benzoicos (ácido gálico, p-hidroxibenzoicos y siríngico), mayoritariamente esterificados con azúcares, ácidos orgánicos o alcoholes (Zoecklein et al., 2001). Del mismo modo, a este grupo pertenecen los estilbenos (resveratrol) y los taninos del tipo hidrolizable (elagitaninos y galotaninos) (Zamora, 2003).

### **2.4.2 Fenoles flavonoides**

Los polifenoles de tipo flavonoide poseen un esqueleto químico que consta de tres porciones: dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico oxigenado. Los flavonoides son el grupo más variado estructuralmente, debido a que su estructura base tiene variadas posibilidades de sustitución por grupos hidroxilo (-OH), metoxilo (-O-CH<sub>3</sub>), acilo (-CO), y glucósidos (Dai y Mumper., 2010; Quideau et al., 2011). En el caso de *V. vinifera*, estos

últimos se encuentran glucosilados en la posición tres del anillo central, y además pueden encontrarse acetilados, cumarilados o unidos al ácido caféico (Sáenz et al., 2009).

## **2.5 Taninos presentes en el vino**

Los compuestos polifenólicos varían ampliamente en su estructura (Vazquez et al., 2012). Los taninos en el vino son aquellos polímeros de flavanoles (taninos condensados) y no flavanoles (taninos hidrolizables), que son extraídos de bayas o la madera, y que se alteran estructuralmente durante el proceso de elaboración del vino (Kennedy et al., 2001). Químicamente, los taninos condensados están formados por la condensación de catequina con uniones directas de carbono-carbono entre sus moléculas en la posición 4-8 o en 4-6 y no contienen azúcares en su estructura (Peña-Neira, 2006). Por otra parte, los taninos cumplen un rol fundamental en la enología, debido a su contribución esencial a las propiedades sensoriales del vino, como el color, astringencia, amargor y a su papel en el envejecimiento (Spranger et al., 2004).

## **2.6 Taninos enológicos comerciales (TECs)**

Son definidas como aquellas sustancias de origen vegetal enriquecidas de compuestos polifenólicos procedentes de una misma especie (Sanz et al., 2008) o mezclas de varias especies, incluyendo uvas, roble, quebracho, castaño, tara y galla, que se pueden clasificar en taninos condensados e hidrolizables (Serghei, 2013; Enológica Vason, 2001; Obrequeslier et al., 2009). Los TECs se dividen en diferentes grupos, los cuales poseen variaciones en la concentración de compuestos tánicos (condensados e hidrolizables) (Serghei, 2013; Frangipane et al., 2007).

En la industria enológica, los TECs son utilizados debido a sus diversas propiedades tales como su capacidad antioxidante, la cual se ha relacionado con la captura de radicales libres (Arlegui, 2014), y por consiguiente con el control del estrés oxidativo (Teissedre et al., 1996, citado por Arlegui, 2014), y la capacidad de envejecimiento de los vinos. Además, estos contribuirían a una mejor estructura y estabilización del color en el tiempo

(Baker y Ross, 2014). Esto se produce mediante las uniones indirectas (mediadas a través de un puente de etilo y la mediación del etanal) y condensaciones directas entre los antocianos y proantocianidinas, cuyas uniones generan distintos grados de polimerización durante la vinificación y maduración del vino tinto (García-Puente et al., 2005). Asimismo, son utilizados como clarificantes en mostos y vinos, ya que son capaces de formar complejos coloidales con proteínas, polisacáridos y tanino (Zanchi et al., 2007). Finalmente, se ha indicado que estas sustancias contribuirían con propiedades biológicas como su capacidad antioxidante (Hartzfeld et al., 2002), propiedades sensoriales, tales como estabilizadores del color y moduladores de la astringencia (Sanz et al., 2008; Laghi et al., 2010).

## **2.7 Ultrasonido**

La tecnología del ultrasonido se basa en ondas mecánicas a una frecuencia superior al límite de audición humana (>16 kHz), el cual es transmitido por sustancias que tengan propiedades elásticas (Ferraretto et al., 2013). En la industria alimentaria el ultrasonido posee dos rangos de frecuencia: ultrasonido de alta frecuencia desde los 100 kHz hasta 1 MHz y ultrasonido de potencia (16-100 kHz). El ultrasonido de alta frecuencia comúnmente es aplicado como una técnica analítica para proporcionar información sobre las propiedades fisicoquímicas de los alimentos como la madurez, el contenido de azúcar y la acidez (Demirdoven y Baysal, 2008), mientras que el ultrasonido de potencia puede ser utilizado para generar uniones, romper células y dispersar materiales agregados (Knorr et al., 2004; Tiwari et al., 2010). Además, en los últimos años, se han realizado variados estudios sobre el uso del ultrasonido para la estabilización microbiana del vino y para la aceleración de procesos de envejecimiento del vino (Lukić et al., 2019).

## **2.8 Ultrasonido en el vino**

Mediante la aplicación de ultrasonido en el vino, ocurre un proceso de cavitación acústica (aparición de micro-burbujas que implosionan) que provoca un aumento en las temperaturas y presiones del líquido, favoreciendo reacciones químicas y aumentando la

velocidad de reacciones que generalmente se encuentran en el proceso de envejecimiento del vino (Zhang et al., 2015). Los investigadores Masuzawa, Ohdaira y Ide (2000) demostraron el efecto de ultrasonido sobre los compuestos fenólicos del vino tinto, los cuales obtuvieron un efecto de polimerización de compuestos polifenólicos en vino tinto promovido por ultrasonido a bajos niveles de presión sonora. A su vez, los autores Zhang et al., (2015), informaron que diferentes condiciones de tratamiento ultrasónico cambiaron significativamente la concentración de los compuestos fenólicos totales y la conductividad eléctrica. Por ello, esta tecnología física, modifica las características de vino tinto, lo que podría ser un nuevo método efectivo para acelerar el proceso de crianza del vino (García Martín y Sol, 2013).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Ubicación**

El estudio fue realizado en el laboratorio de enología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Talca.

#### **3.2 Materiales**

El vino se obtuvo de la bodega Casa Silva ubicada en Hijuelas Norte S/N, en la localidad de San Fernando. La variedad de vino utilizada fue Cabernet Sauvignon de la calidad gran reserva del año 2019, proveniente del Valle de Colchagua, desde el viñedo Los Lingues. Se ocuparon aproximadamente 15 litros, los cuales fueron divididos en 64 botellas de 300 mL, (4 tratamientos, 4 repeticiones y 4 tiempos de medición) las que posteriormente permanecieron cubiertos con papel aluminio y puestos en oscuridad hasta su respectiva medición.

El TEC escogido es denominado Tanin VR SUPRA de la marca Laffort preparado en base a taninos proantocianídicos ricos en catequinas, taninos de uva y de taninos elágicos de roble destinados a la elaboración y envejecimiento de vinos tintos. Se utilizaron 15 g aproximadamente, que fueron repartidos en 32 botellas (16 botellas de T1 y 16 botellas para T3) con una dosis de 80 g/hl, y fue aplicado posterior a la caracterización inicial del vino.

Al momento de realizar los análisis para determinar las absorbancias correspondientes a los métodos "Metil-celulosa", "Folin-Ciocalteu" y "Copigmentación" (los que serán descritos en la próxima sección) se utilizó el espectrofotómetro (SPECTRQUANT, Pharo 300, Alemania) que tiene la capacidad de medir longitudes de onda que van desde los 190 nm a los 1100 nm, el cual fue utilizado para medir las absorbancias correspondiente al método de "Folin-Ciocalteu" y "Copigmentación", mientras que para medir las

absorbancias del método de “Metil-celulosa” fue utilizado el Lector de microplacas (EPOCH, Winooski, EE. UU.).

Para la aplicación de pulsos de ultrasonido (Vibra-Cell <sup>TM</sup>, VC 750W, EE. UU), se utilizó el instrumento. Con una sonda de 1/2” con punta reemplazable de 13 mm. El cual libera pulsos de ultrasonido de alta frecuencia con una potencia de 750 w juntamente con una frecuencia de 20 kHz, y se utilizó para la aplicación de pulsos de ultrasonido en los tratamientos T2 y T3.

### **Desarrollo experimental**

El desarrollo experimental consistió en cuatro tratamientos donde se combinó el uso de ultrasonido y taninos, además de un control sin tratamiento (cuadro 1), de acuerdo al siguiente detalle: El tratamiento 0, “T0”, constó de 4 repeticiones en botellas de 300 mL de vino Cabernet Sauvignon al cual no se aplicó ningún tipo de tratamiento; el tratamiento “T1” correspondió a una muestra de vino tratada con 0,2 g (dosis: 80 g/hl) de TECs Tanin VR SUPRA de la marca Laffort preparado en base a taninos proantocianídicos ricos en catequinas, taninos de uva y de taninos elágicos de roble; el tratamiento “T2” consideró una muestra de 300 mL de vino Cabernet Sauvignon con la aplicación de pulsos de ultrasonido cada 5 segundos durante 5 minutos con una potencia de 20 kHz y una amplitud del 40%; “T3” correspondió una muestra de 300 mL de vino Cabernet Sauvignon con la utilización de 0,2 g de TECs más el efecto de la aplicación de ultrasonido, bajo las mismas condiciones antes descritas para los tratamientos T1 y T2. Posterior a la aplicación de los tratamientos estos fueron medidos en cuatro oportunidades (día 1, día 15, día 35 y día 70 de guarda) en el caso de la medición de polifenoles totales. Por otro lado, la medición de taninos fue realizada durante tres tiempos (día 1, 35 y 70). Finalmente, para el método de color por Copigmentación se realizaron 3 mediciones (día 1, 15 y 35).

**Cuadro 1.** Descripción de los tratamientos con respectivas abreviaciones.

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>ABREBIACIONES</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Tratamiento 0	T0	300 mL de vino Cabernet Sauvignon
Tratamiento 1	T1	300 mL de vino Cabernet Sauvignon + 0,2 g de tanino VR SUPRA
Tratamiento 2	T2	300 mL de vino Cabernet Sauvignon + 5 minutos de ultrasonido 20 Khz y 40% amplitud.
Tratamiento 3	T3	300 mL de vino Cabernet Sauvignon + 0,2 g de tanino VR SUPRA + 5 minutos de ultrasonido 20 Khz y 40% amplitud.

### 3.3 Métodos

#### Determinación de polifenoles totales

##### *Método de Folin-Ciocalteu*

Los fenoles totales se analizaron por el método planteado por Singleton y Rossi (1965), utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual se reduce al oxidar los fenoles formando en la solución una coloración de tono azul, lo cual puede ser medido a una absorbancia de 765 nm.

Primeramente, se prepararon dos soluciones:

**Solución madre de ácido gálico.** En un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron 0,5 g de ácido gálico en 10 mL de etanol y se diluyo con agua para luego almacenarlo en un refrigerador hasta por dos semanas sellado.

**Solución de carbonato de sodio.** Se diluyeron 200 g de carbonato de sodio en 800 mL de agua y fue hervido. Posteriormente se dejó enfriar, y se agregaron algunos cristales de carbonato de sodio, después de 24 horas, fue filtrado y se agregó 1 L de agua.

Se preparó una curva de calibración, agregando 0, 1, 2, 3, 5 y 10 mL de la solución madre de fenol en matraces volumétricos de 100 mL y luego se diluyó al volumen con agua. Estas soluciones tuvieron concentraciones de fenol de 0, 50, 100, 150, 250 y 500 mg/L de ácido gálico.

De cada solución de calibración, muestra en blanco, se pipetearon 20 µL en cubetas separadas, y se agregaron 1.58 mL de agua a cada una, luego se agregaron 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se mezclaron entre los 30 segundos y 8 minutos, posteriormente se agregaron 300 µL de la solución de carbonato de sodio y se agitó. Las soluciones se debieron dejar a 20 ° C durante 2 horas y se determinó la absorbancia de cada solución a 765 nm contra el blanco (la solución "0 mL"). Finalmente se trazó la absorbancia en función de la concentración.

## **Determinación taninos totales**

### *Método de Metil celulosa*

Método propuesto por (Sarneckis et al. (2006), el cual consiste en la cuantificación de taninos mediante la precipitación con metil-celulosa. Se llevo a cabo incorporando 25 µL de solución de metilcelulosa a 25 µL de vino tinto y se agitó ligeramente para posteriormente sellarlo y se dejó reposar aproximadamente 2 a 3 minutos. Luego en un matraz de cierre de tornillo se incorporaron 500 mL de agua desionizada y cristales de sulfato de amonio con agitación, hasta en exceso. Se mantuvo la solución hasta obtener aproximadamente 1,5 cm de cristales de sulfato de amonio en el fondo de matraz. Una vez finalizada esta solución se agregaron 200 µL de solución saturada de sulfato de amonio para posteriormente realizar un volumen de hasta 10 mL con agua desionizada y se procedió a mezclar. Esta solución se mantuvo en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego fue centrifugada durante 5 minutos a 10.000 rpm (Eppendorf, 5415 R, China). Finalmente fue pipeteada con cuidado el sobrenadante en una cubeta y se anotó la absorbancia de la solución a 280nm: A280 (sobrenadante).

Calcular el resultado de taninos totales mediante la siguiente formula;

$$A280 (\text{tanino}) = A280 (\text{control}) - A280 (\text{sobrenadante})$$

## Determinación del color

*Método de copigmentación (Boulton, 2001).*

Para realizar este método, en primer lugar, se debió realizar un ajuste en el pH a 3,6 (HANNA, HI2002, Woonsocket, EE. UU.) además de filtrar a través de membranas (tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m) para realizar las determinaciones.

Antocianinas totales

$$[TA] = (A^{20} - A^{SO_2})$$

Color debido a pigmentos poliméricos

$$Ep[P] = (A^{SO_2})$$

Color debido a antocianinas copigmentadas

$$[C] = (A^{acet} - A^{20})$$

$A^{20}$ : 100  $\mu$ L de muestra de vino se colocaron en 1900  $\mu$ L del tampón en una cubeta de 10 mm. Después de unos minutos, la absorbancia se midió a 520 nm y la lectura se corrigió para la dilución multiplicándola por 20.

$A^{SO_2}$ : Se adicionaron 160  $\mu$ L de solución de  $SO_2$  al 5% a 2 mL de muestra de vino en una cubeta de 10 mm. Luego la absorbancia fue medida a 520 nm.

$A^{acet}$ : Se añadieron 20  $\mu$ L de solución de acetaldehído al 10% a 2 mL de muestra de vino en una cubeta de plástico de 10 mm. Después de 45 minutos, la muestra se colocó en una cubeta de 2 mm y se midió la absorbancia a 520 nm. La lectura fue corregida multiplicando por 5.

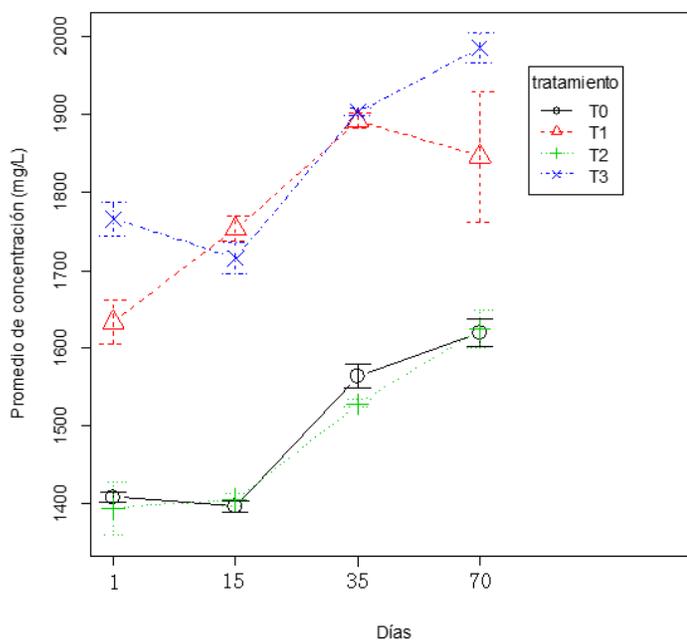
### 3.4 Análisis estadístico

El estudio consistió en 5 ensayos independientes entre sí. Cada ensayo se realizó con una distribución de los tratamientos en un diseño completamente al azar (DCA), con tratamientos y 3 o 4 fechas de medición, además de 4 repeticiones para cada uno. Cada unidad experimental constó de una botella de 300 mL. Para el análisis de los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial con un nivel de confianza del 95%, utilizando como variable independiente la concentración en mg/L (para los ensayos de Metil-celulosa y Folin-Ciocalteu) y la absorbancia en UA 520 nm (para los ensayos de color debido a antocianinas copigmentadas, antocianinas totales y color debido a pigmentos poliméricos). Además, se utilizaron como factores los tratamientos y fechas de medición. Para analizar las comparaciones múltiples se utilizó el test de 'Tukey', mediante el paquete de R 'multcomp' (Hothorn et al., 2016), con un nivel de confianza del 95% ( $P \leq 0,05$ ). Todos los modelos estadísticos fueron analizados con el software libre R, versión 3.6.2 (R Development Core Team, 2019).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Polifenoles totales (Determinados por el método de Folin-Ciocalteu)

En los resultados expuestos en la figura 1 se puede observar las concentraciones de polifenoles totales obtenidas a partir del método de “Folin-Ciocalteu”, en cuatro tiempos de medición post-tratamiento.



**Figura 1.** Concentración de polifenoles totales de los tratamientos T0, T1, T2 y T3, en cuatro tiempos de medición correspondientes al día 1, 15, 35 y 70 después de efectuados los tratamientos.

Las concentraciones resultantes para los tratamientos T0 y T2 mantuvieron valores similares a lo largo de las distintas mediciones, iniciando el día 1 con concentraciones de 1409 y 1394 mg/L de equivalentes de ácido gálico respectivamente. Posteriormente, los valores se conservaron con bajas variaciones entre ellos, mostrando aumentos al día 35 y 70, los que llegaron a valores cercanos a 1600 mg/L. En el caso de los tratamientos T1 y

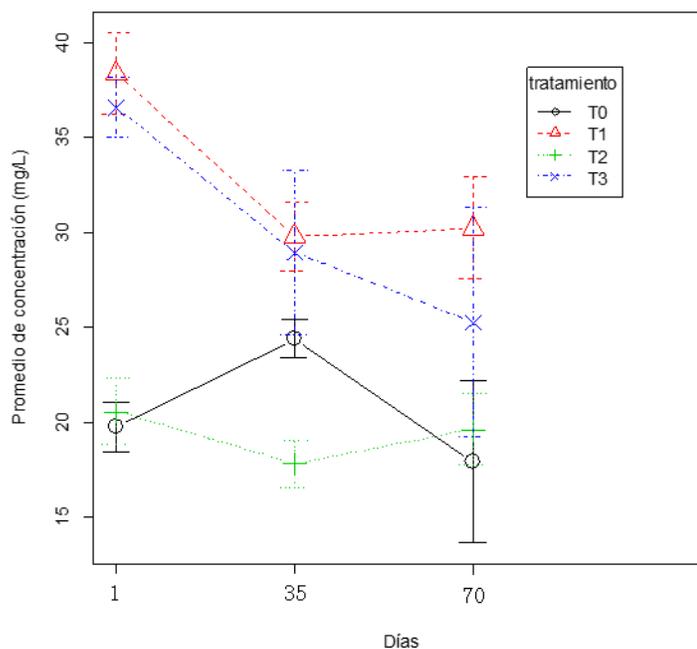
T3, estos comenzaron con concentraciones de 1634 mg/L y 1766 mg/L respectivamente, las que aumentaron con ciertas variaciones, llegando al día 70 con 1766 mg/L y 1985 mg/L de equivalentes de ácido gálico respectivamente. El análisis estadístico de estos resultados reveló un valor  $p$  de 0,042, el que indicó diferencias estadísticamente significativas en la concentración de compuestos fenólicos totales entre los tratamientos para cada fecha de medición, así como diferencias significativas entre los distintos días de medición para cada uno de los tratamientos (Anexo 6.1).

Cabe mencionar que los tratamientos T1 y T3 alcanzaron valores de concentración fenólica más altos que T0 y T2 debido a la aplicación de taninos enológicos, los cuales influyen directamente en la concentración de polifenoles totales (Mercurio et al., 2010). Sin embargo, el tratamiento T3, que combinó los pulsos de ultrasonido con la adición de taninos enológicos, fue el que presentó una mayor concentración final de fenoles totales. Lo anterior es explicado por los autores Aadil et al., (2013) y Masuzawa et al., (2000), indicando que esto podría deberse a la adición del grupo hidroxilo producido por el ultrasonido al anillo aromático de los compuestos fenólicos, provocando de esta forma un valor mayor en la absorbancia. Respecto a los tratamientos T0 y T2, estos se comportaron de forma equivalente durante las cuatro mediciones, por lo cual se concluyó que la aplicación de ultrasonido por sí sola no provocó cambios estadísticamente significativos.

Por lo tanto, la observación del aumento del contenido de compuestos fenólicos cuando se combinan taninos enológicos y ultrasonido deberá ser confirmada en una futura investigación.

#### 4.2. Taninos totales (Determinados por el método de metil-celulosa).

Para realizar las determinaciones de taninos totales, las muestras de vino de cada tratamiento fueron al método basado en la precipitación de este tipo de sustancias a partir de su reacción con metil-celulosa. La figura 2 muestra las concentraciones obtenidas de los cuatro tratamientos, y en tres diferentes oportunidades de medición.



**Figura 2.** Contenido de taninos totales de los tratamientos T0, T1, T2 y T3, medidos en tres tiempos distintos (día 1, 35 y 70) posterior a la aplicación del tratamiento (T0, T1, T2, y T3 respectivamente).

Las mediciones correspondientes a T0 mostraron una concentración de 19,7 mg/L de taninos totales al día 1, las que luego aumentaron en 4,65 mg/L al día 35, para finalmente alcanzar la menor concentración de los cuatro tratamientos con un total de 17,9 mg/L al día 70. Los valores iniciales y finales correspondientes al tratamiento T2 mantuvieron similares concentraciones en un rango desde 20,5 mg/L hasta 19,6 mg/L, las que sin embargo presentaron una importante variación al día 35. Al observar la figura 2 podemos

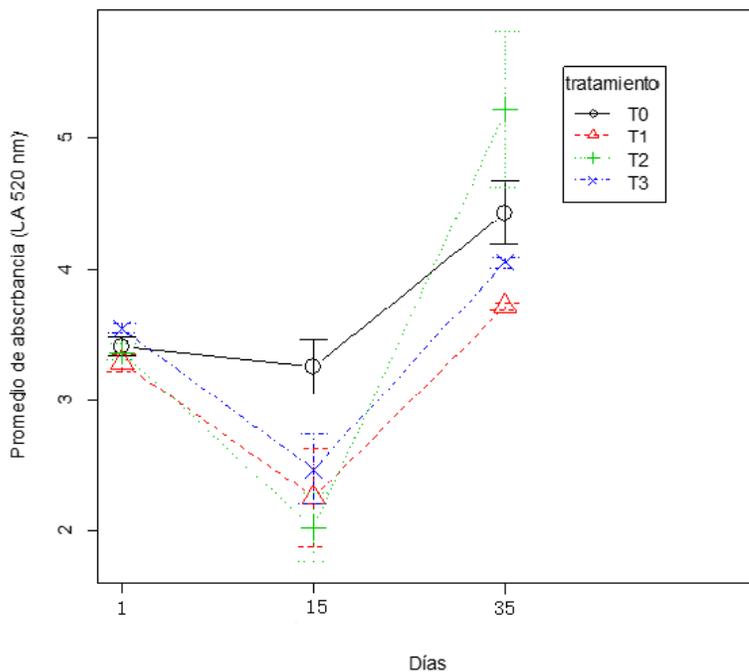
verificar que los tratamientos T1 y T3 presentaron una disminución en la concentración de taninos. Por un lado, T1 disminuyó su concentración desde 38,4 mg/L a 30,24 mg/L, mientras T3 redujo su concentración desde 36,6 mg/L hasta 25,2 mg/L, siendo la combinación de pulsos de ultrasonido y taninos enológicos el tratamiento con mayor incidencia en la reducción de la concentración de taninos.

El análisis estadístico demostró diferencias significativas sólo para la concentración entre los tratamientos y la concentración entre los días, pero no hubo diferencias significativas en la concentración con la interacción de ambos (ANEXO 6.7). Según los resultados reportados por Puértolas et al., (2010) se podrían observar disminuciones en la concentración de los taninos totales durante el almacenamiento en botella. La disminución de taninos fue alcanzada iniciando el mes número cuatro de almacenamiento en botella. Por lo que una mayor duración del estudio podría originar cambios significativos en los resultados. Alternativamente se ha descrito que los tratamientos con ultrasonido podrían contribuir a la despolimerización de taninos (Osete-Alcaraz et al., 2019). Todo lo anterior, tendrá que ser corroborado en una futura investigación.

### 4.3. Color por el método de “Copigmentación”.

#### 4.3.1. Antocianinas totales.

Resultados de absorbancias medidas a través del método de la Copigmentación en el cual fueron analizadas las antocianinas totales (Figura 3), el color debido a antocianinas copigmentadas (Figura 4) y el color debido a pigmentos poliméricos (Figura 5). Todas las absorbancias fueron medidas en tres oportunidades (día 1, 15 y 35) y constaban de cuatro tratamientos (T0, T1, T2 y T3).

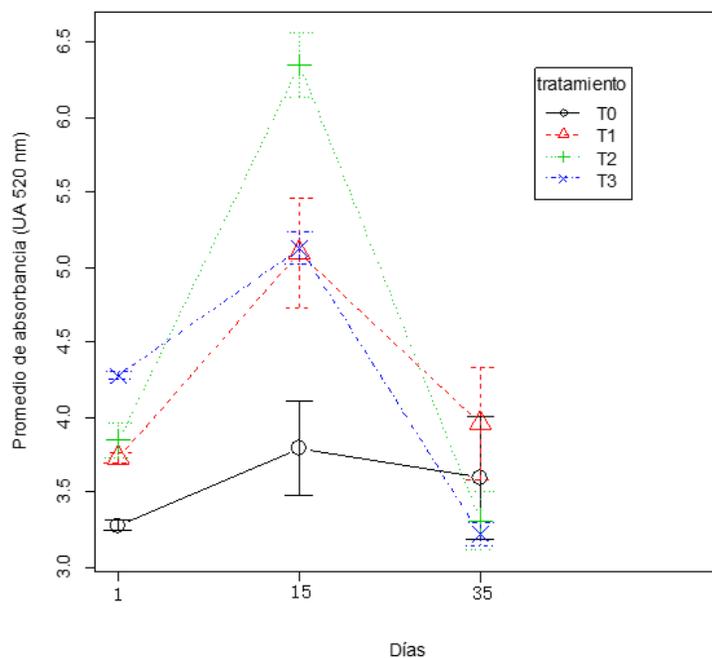


**Figura 3.** Resultado de absorbancias correspondiente a las antocianinas totales de cuatro tratamientos (T0, T1, T2 y T3) efectuados durante tres tiempos de medición diferentes (días 1, 15 y 35) una vez aplicados los tratamientos.

Para el caso de las antocianinas totales, los resultados de los análisis de varianza practicados indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y

entre los distintos días de medición y en la interacción de ambos (ANEXO 6.8). En la figura 3 se observa un aumento de la absorbancia en el último tiempo de medición. T0 por un lado inició con una absorbancia de 3,4 para luego en la medición final aumentar a un valor de 4,4. Por su parte, T2 fue el tratamiento con la mayor absorbancia (5,2), medida el día 35 con un aumento desde el día 15 en 3,1. Por otro lado, los tratamientos T1 y T3 revelaron resultados similares disminuyendo del día 1 al día 15 para luego aumentar su absorbancia hasta 3,7 T1 y 4,05 T3, el día final de medición. Este aumento en los contenidos de antocianinas mostradas por la aplicación del ultrasonido en T2, fueron similares a los resultados reportados por Masuzawa et al., (2000), donde sometieron al vino a 10 días de la aplicación de ultrasonido resultando en una mayor cantidad de antocianinas. Por otro lado, la aplicación de taninos y el uso combinado con ultrasonido no provocó cambios en la absorbancia del contenido de antocianinas totales.

### 4.3.2. Color debido a antocianinas copigmentadas.

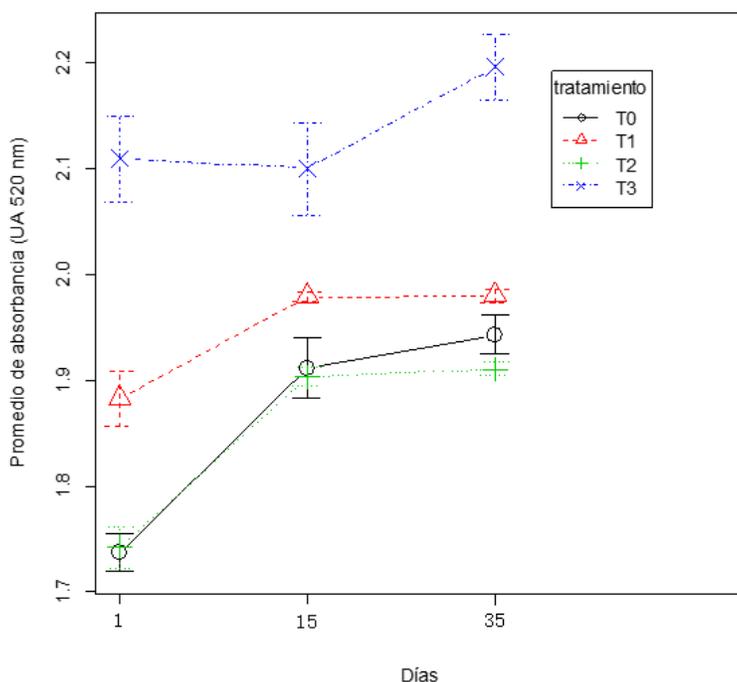


**Figura 4.** Absorbancias obtenidas para color debido a antocianinas copigmentadas medidas a través del método de la Copigmentación correspondiente a los tratamientos T0, T1, T2 y T3 medidos en tres tiempos distintos (días 1, 15 y 35).

Los resultados para el caso del color debido a antocianinas copigmentadas muestran diferencias significativas demostrando una predisposición a aumentar al día 15 y luego disminuir en el día 35 de medición destacando los tratamientos T2 y T3 con la mayor baja, desde 6,3 a 3,3 en el caso de T2 y desde 5,1 a 3,2 en T3 siendo valores más bajos que los iniciales (día 1). En el caso de los tratamientos T0 y T1, estos aumentaron en la medición del día 15 sin embargo en la medición del día 35 estos obtuvieron valores similares a los iniciales. Por lo cual, se infiere que la aplicación de taninos no provocó cambios significativos. Por otro lado, T2 fue nuevamente el tratamiento con una mayor caída en la absorbancia demostrando que la aplicación de taninos por si sola provoca cambios significativos. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Heras-Roger et al., (2014)

quienes demuestran que el envejecimiento natural induce una disminución en el color debido a antocianinas copigmentadas.

### 4.3.3. Color debido a pigmentos poliméricos.



**Figura 5.** Absorbancias conseguidas para la medición del color debido a pigmentos poliméricos de cuatro tratamientos T0, T1, T2 y T3 medidos en tres tiempos distintos (días 1, día 15 y día 35).

El color debido a pigmentos poliméricos obtuvo resultados con diferencias estadísticamente significativas. El tratamiento T3 (taninos + ultrasonido) posee los valores más altos desde el día 1 (2,11) al día 35 (2,19), mientras que el tratamiento T1 (sólo con adición de tanino) presentó una absorbancia de 1,88 al día 1, 1,97 al día 15, y finalmente una absorbancia de 1,98 al día 35, que no consigue alcanzar los valores vistos en T3. Por otro lado, los tratamientos T0 y T2 mantuvieron la tendencia de aumentar con valores similares desde 1,74 a 1,94 aproximadamente, sin embargo, estos valores fueron inferiores a los tratamientos con la aplicación de taninos y aún más por debajo al tratamiento con el

uso combinado de ultrasonido y tanino. En consecuencia, los aumentos en las absorbancias conseguidas en T0, T1, T2 y T3 se acercan a los obtenidos por Heras-Roger et al., (2014) el cual reporta un aumento del color debido a pigmentos poliméricos. Cabe mencionar que estos resultados poseían al menos 1 año de envejecimiento natural, mientras que los vinos tratados con ultrasonido y tanino solo han sido almacenados por 35 días, por lo que una mayor conservación en botella de los tratamientos podría provocar mayores cambios en el color debido a pigmentos poliméricos.

## **5. CONCLUSIÓN**

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la aplicación de ultrasonido y taninos enológicos en un vino de la variedad Cabernet Sauvignon generó cambios significativos en la composición fenólica de los vinos, los que incluyeron cambios estadísticamente significativos en la concentración de polifenoles totales y color por el método de la Copigmentación, pero no se distinguieron cambios significativos en la concentración de taninos totales. Se observaron cambios promisorios sobre la composición de los vinos bajo las condiciones descritas, sin embargo, se necesitan más investigaciones con el fin de confirmar resultados obtenidos en nuestro estudio.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

**Aadil, R., Zeng, X., Han, Z., & Sun, D. (2013).** Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 141(3):3201-3206.

**Arlegui, M. (2014).** Efectos de los chips de roble sobre la actividad antioxidante y composición fenólica de un vino tempranillo. Tesis Master universitario en tecnología y calidad en las industrias agroalimentarias. Iruia, España. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra.

**Avello, M., y Suwalsky, M. (2006).** Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Universidad de Concepción.

**Baker, A. and Ross, C. (2014).** Wine finish in red: The effect of ethanol and tannin concentration. *Food Quality and Preference*, 38:65-74

**Bautista-Ortin, A., Jurado, R., Iniesta, J., Jiménez, M., y Gómez-Plaza, E. (2017).** Aplicación de ultrasonidos de alta potencia para acortar los tiempos de maceración de los vinos tintos. *Revista de enología científica y profesional*, 163:1697-4123

**Boulton, R. (2001).** The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal Of Enology And Viticulture*, 52(2):67-87.

**Bruwer J, A. Saliba, B. Miller (2011).** Consumer behaviour and sensory preference differences: Implications for wine product marketing. *Journal of Consumer Marketing*, 28 (1) (2011), pp. 5-18

**Cala, O., Fabre, S., Pinaud, N., Dufourc, E., Fouquet, E., Laguerre, M., Pianet, I. (2011).** Towards a Molecular Interpretation of Astringency: Synthesis, 3D Structure, Colloidal State, and Human Saliva Protein Recognition of Procyanidins. *Planta Med* 11:1116-1122.

**Cheyrier, V., Rigaud, J., Souquet, J., Duprat, F., and Moutounet, M. (1990).** Must browning in relation to behaviour of phenolic compounds during oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41:346-349.

**DAI, J., Mumper, R. (2010).** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 10:7313-7352.

**Demirdoven, A. & Baysal, T. (2008).** The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. *Food Reviews International*, 25:1–11

**Duthie, S., Jenkinson, A., Crozier, A., Mullen, W., Pirie, L., Kyle, J., Duthie, G. (2006).** The effects of cranberryjuice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *European Journal of Nutrition*, 45:113–122.

**Ferraretto, P., Cacciola, V., Ferran Batlo, I. and Celotti, E. (2013).** Ultrasound application in winemaking: grape maceration and yeast lysis. *Italian Journal of Food Science*, 25:160-168.

**Frangipane, M., Santis, D., and Ceccarelli, A. (2007).** Influence of oak wood of different geographical origins on quality of wine aged in barriques and using oak chips. *Food Chemistry*, 103:46-54.

**Frangipane, M., Santis, D., and Ceccarelli, A. (2007).** Influence of oak wood of different geographical origins on quality of wine aged in barriques and using oak chips. *Food Chemistry*, 103:46-54.

**Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., Cheyrier, V. (2006).** Phenolic reactions during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57:289-297.

**García Martín, J., and Sun, D. (2013).** Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends in Food Science & Technology*, 33(1):40-53.

**Galet P., (1998).** Cépages et Vignobles de France, Tome 1. Les Vignes Américaines, 2nd ed. Imprimerie Charles Déhan, Montpellier, France

**García-Puente, E., Alcalde, C., Santos, C., Rivas, J., and Escribano, M. (2005).** Behavior and characterization of the color during red wine making and maturation. *Analytica Chimica Acta*, 563:215-222.

**Gawel R., A. Oberholster, I.L. Francis (2000).** A 'Mouth-feel Wheel': Terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6 (3) (2000), pp. 203-207

**González-Neves, G., Balado, J., Barreiro, L., Bochicchio, R., Gatto, G., Gil, G., Tessore, A., y Ferrer, M. (2003).** Efecto de algunas prácticas de manejo del viñedo y de la vinificación en la composición fenólica y el color de los vinos tintos. In X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia. Bento Gonçalves, Brasil.

**Hartzfeld, P., Forkner, R., Hunter, M., and Hagerman, E. (2002).** Determination of hydrolyzable tannins (Gallotannins and Ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:1785-1790.

**Heras-Roger, Pomposo-Medina, Díaz-Romero, and Darias-Martín. (2014).** Copigmentation, colour and antioxidant activity of single-cultivar red wines. *European Food Research and Technology*, 239(1):13-19.

**Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P. (2016).** Package 'multcomp': Simultaneous inference in general parametric models.

**Jackson, R. (1994).** Wine science. Principles and applications. San Diego, USA: Academic Press.

**Jancis, R. (2006).** The Oxford Companion to Wine. 3d ed. Oxford University Press. Oxford, England.

**Jara, C. (2013).** Microorganismos de Origen Enológico. Universidad de Chile. 1-49h.

**Keller, M. (2003).** Grapevine anatomy and physiology. Washington State University Editions, Washington, United States. 282h.

**Kennedy, J., and Jones, P. (2001).** Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49:1740-1746.

**Knorr, D., Zenker, M., Heinz, v. & Lee, D. (2004).** Applications and potential of ultrasonics in food processing. Trends in Food Science & Technology, 15:261-266.

**Laghi, L., Parpinello, G., Del Rio, D., Calani, L., Mattioli, A., and Versari, A. (2010).** Fingerprint of enological tannins by multiple techniques approach. Food Chemistry, 121:783-788.

**Lukić, K., Brnčić, M., Ćurko, N., Tomašević, M., Valinger, D., Denoya, G., Ganić, K. (2019).** Effects of high-power ultrasound treatments on the phenolic, chromatic and aroma composition of young and aged red wine. Ultrasonics Sonochemistry, 59:104725.

**Malacarne, M., Nardin, T., Bertoldi, D., Nicolini, G., and Larcher, R. (2016).** Verifying the botanical of commercial tannins through sugar and simple phenols profiles. Food Chemistry, 206:274-283.

**Martelo-Vidal, M., and Vásquez, M. (2014).** Determination of polyphenolic compounds of red wine by UV-VIS-NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chemistry*, 158:28-34.

**Masuzawa, N., Ohdaira, E., and Ide, M. (2000).** Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Japanese Journal of Applied Physics*, 39:2978-2979.

**Mercurio, M., Damberg, R., Cozzolino, D., Herderich, M., & Smith, P. (2010).** Relationship between red wine grades and phenolics. 1. Tannin and total phenolics concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12313-12319.

**Monagas, M., Bartolomé, B., and Gómez-Cordovés, C. (2005).** Update knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42:485-118.

**Moreno, Y., y Vallarino, J. (2011).** Manual de consulta de cultivares y portainjertos de vides para vinificación, primera edición, Gutenberg, Talca, Chile, 96 p.

**Müller, K. (2004).** Chile vitivinícola en pocas palabras. Facultad de Ciencias Agronómicas. Departamento de Agroindustria y Enología, Universidad de Chile, Santiago de Chile.

**Nadal, M., and Arola, L. (1995).** “Effects of limited irrigation on the composition of must and wine of Cabernet Sauvignon under semiarid conditions”. *Vitis*. 34:151-154.

**Nicholasa, K., Mathews, M., Lobell, D., Willits, N., and Field, C. (2011).** Effect of vineyard scale climate variability on Pinot Noir phenolic composition. *Agricultural and Forest Meteorology*. 151:1556-1567.

**Obreque-Slier, E., Peña, A., López, R., Ramírez, C., and Zamora, F. (2009).** Phenolic characterization of commercial enological tannins. *European Food Research Technology*. 229:859-866.

**Obreque-Slier, E., Peña-Neira, A., and López-Solís, R. (2010).** Enhancement of both salivary Protein-Enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 58:3729-3735.

**Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). (2019).** Boletín vides, avance 2019. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. [En línea] Recuperado en: <<http://www.odepa.gob.cl>>. Consultado el 05 de junio del 2019.

**Osete-Alcaraz, A., Bautista-Ortín, A., Ortega-Regules, B., & Gómez-Plaza, E. (2019).** Combined Use of Pectolytic Enzymes and Ultrasounds for Improving the Extraction of Phenolic Compounds During Vinification. *Food and Bioprocess Technology*, 12(8), 1330-1339.

**Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). (2019).** Boletín vides, avance 2019. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. [En línea] Recuperado en: <<http://www.odepa.gob.cl>>. Consultado el 05 de junio del 2019.

**Peña-Neira, A. (2006).** En la calidad de uvas y vino los taninos y su importancia. Informe enológico, Universidad de Chile, Santiago, Chile. 3 p. Recuperado en: <<http://www.gie.uchile.cl/publicaciones/index.html>>. Consultado en: mayo de 2019.

**Pierre, G. (1998).** Grape Varieties and Rootstock Varieties. Oenoplurimedia sarl. Chaintré, France.

**Puértolas, E., Saldaña, G., Condón, S., Álvarez, I., and Raso, J. (2010).** Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chemistry*. 119(3), 1063-1070.

**R Development Core Team (2019).** The comprehensive R Archive Network. [en línea] disponible en &lt; <http://cran.r-project.org/> &gt; Consultado: 15 de enero, 2020.

**Rodríguez-Montealegre, R., Romero-Peces, R., Chacón-Vozmediano, J., Martínez-Gascuña, J., and Romero, E. (2006).** Phenolic compounds in skins and seed of *Vitis vinífera* varieties grow in a warm climate. *Journal of Food Composition Analysis*. 19:687-693.

**Sanz, M., Martínez, I., and Moreno, M. (2008).** Identification of the origin of commercial enological tannins by the analysis of monosaccharides and polyalcohols. *Food Chemistry*. 111:778-783.

**Sáenz, M., Tena, M., and Zurbano, F. (2009).** Study of hydroxycinnamic acids and malvidin 3-monoglucoside derivatives using capillary zone electrophoresis and ultraperformance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 115:766-774.

**Sarneckis, C.; Damberg, R. G.; Jones, P.; Mercurio, M.; Herderich, M. J.; Smith, P. (2006).** Quantification of Condensed Tannins by Precipitation with Methyl Cellulose: Development and Validation of an Optimised Tool for Grape and Wine Analysis. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12:39-49

**Serghei, S. (2013).** Ensaio com alternativas de madeira e taninos enológico sem vinho tinto: Efeitos na composição química e análise sensorial. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre Viticultura e Enologia. Lisboa, Portugal. Universidad de Lisboa. 61 p.

**Singleton, V., and Rossi, Jr. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.

**Spranger, M., Climaco, M., Sun, B., Eiriz, N., Fortunato, C., Nunes, and A., Belchior, A. (2004).** Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Analytica Chimica Acta*, 513:151-161.

**Tao, Y., García, J., and Sun, D. (2014).** Advances in wine aging technologies for Enhancing wine quality and accelerating wine aging process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54:817-835.

**Teissedre, P., Frankel, E., Waterhouse, A., Peleg, H., and German, J. (1996).** Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolics antioxidants from grapes and wine. *Journal Science Food Agriculture*, 70:55-61.

**Tiwari, B., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P. & O'Donnell, C. (2010).** Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17:598-604.

**Vásquez-Flores, A., Álvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J., Wall-Medrano, A., y De la Rosa, L. (2012).** Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo.

**Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M. (2003).** The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric*, 83:564-573.

**Vidal, S., Courcoux, L. Francis, M. Kwiatkowski, R. Gawel, P. Williams, V. Cheynier (2004).** Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, 15 (3) (2004), pp. 209-217

**Xu, C., Zhang, Y., Cao, L., & Lu, J. (2010).** Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 119(4):1557-1565.

**Zamora, F. (2003).** Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos prácticos. Primera edición, Madrid, España. Ediciones Mundi Prensa. 225 p.

**Zanchi, D., Vernhet, A., Poncet-Legrand, C., Cartalade, D., Tribet, C., Schweins, R., and Cabane, B. (2007).** Colloidal dispersions of tannins in water-ethanol solutions.

**Zhang, Q. A., Shen, H., Fan, X. H., Shen, Y., Wang, X., and Song, Y. (2015).** Changes of gallic acid mediated by ultrasound in a model extraction solution. *Ultrasonics Sonochemistry*. 22:149-154.

**Zhang, Q., Shen, Y., Fan, X., and García Martín, J. (2016).** Preliminary study of the effect of ultrasound on physicochemical properties of red wine. *CyTA-Journal of Food*. 14:55-64.

**Zoecklein, B., Kenneth, C., Gump, B., and Nury, F. (2001).** Análisis y producción de vino. Primera edición, Zaragoza, España. Aspen Publishers, Inc. 634 p.

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Cuadro de medias y desviaciones estándar de la concentración polifenoles totales.

	T0		T2		T2		T3	
	Conc. (mg/L)	SD	Conc. (mg/L)	SD	Conc. (mg/L)	SD	Conc. (mg/L)	SD
D1	1.409	13,3	1.634	58,1	1.394	69,77	1.766	44,3
D15	1.397	15,2	1.753	31,9	1.406	17,04	1.715	39,5
D35	1.564	31,5	1.892	20,3	1.528	10,21	1.903	10,7
D70	1.620	35,3	1.846	167,4	1.623	48,43	1.985	38,3

**Anexo 2.** Cuadro de medias de concentración y desviaciones de la concentración de taninos totales.

	T0		T2		T2		T3	
	Conc. (mg/L)	SD	Conc. (mg/L)	SD	Conc. (mg/L)	SD	Conc. (mg/L)	SD
D1	19,74	2,69	38,39	4,3	20,55	3,51	36,61	3,12
D35	24,39	2,01	29,80	3,58	17,80	2,53	28,95	8,68
D70	17,91	8,63	30,24	5,38	19,60	3,74	25,25	12,1

**Anexo 3.** Cuadro de medias de absorbancias y desviaciones estándar de antocianinas totales.

	T0		T2		T2		T3	
	Absorb.	SD	Absorb.	SD	Absorb.	SD	Absorb.	SD
D1	3,409	0,13	3,288	0,12	3,368	0,11	3,545	0,07
D15	3,258	0,41	2,256	0,74	2,027	0,52	2,475	0,53
D35	4,427	0,48	3,720	0,06	5,220	1,19	4,054	0,08

**Anexo 4.** Cuadro de medias de absorbancias y desviaciones estándar del color debido a antocianinas copigmentadas.

	T0		T2		T2		T3	
	Absorb.	SD	Absorb.	SD	Absorb.	SD	Absorb.	SD
D1	3,275	0,06	3,728	0,07	3,843	0,22	4,273	0,05
D15	3,788	0,62	5,095	0,72	6,350	0,42	5,125	0,21
D35	3,593	0,82	3,955	0,75	3,305	0,39	3,218	0,15

**Anexo 5.** Cuadro de medias de absorbancias y desviaciones estándar del color debido a antocianinas copigmentadas.

	T0		T2		T2		T3	
	Absorb.	SD	Absorb.	SD	Absorb.	SD	Absorb.	SD
Día 1	1,737	0,03	1,883	0,05	1,743	0,03	2,110	0,08
Día 15	1,912	0,05	1,979	0,008	1,903	0,017	2,101	0,080
Día 35	1,943	0,03	1,981	0,01	1,911	0,012	2,197	0,061

**Anexo 6.** Tabla ANOVA sobre la medición de concentración de polifenoles totales.

	Sum SQ	Df	F valor	Pr(F)
Días	573793	3	63,5093	***
Tratamiento	16612290	3	183,8771	***
Días:Tratamientos	58334	9	2,1522	0,04276*
Residuos	144557	48		

**Anexo 7.** Tabla ANOVA respecto de la concentración de taninos totales.

	Sum SQ	Df	F valor	Pr(F)
Días	255,43	2	3,7299	0,03372 *
Tratamiento	1648,22	3	16,0454	***
Días:Tratamientos	305,51	6	1,4871	0,21038
Residuos	1232,67	36		

**Anexo 8.** Tabla ANOVA de absorbancias de antocianinas totales.

	Sum SQ	Df	F valor	Pr(F)
Días	27,4175	2	54,7882	***
Tratamiento	2,4664	3	3,2858	0,031642 *
Días:Tratamientos	6,0979	6	4,0618	0,003284
Residuos	9,0077	36		

**Anexo 9.** Tabla ANOVA de absorbancias respecto del color debido a antocianinas copigmentadas.

	Sum SQ	Df	F valor	Pr(F)
Días	22,6958	2	51,6300	***
Tratamiento	5,9167	3	8,9731	***
Días:Tratamientos	10,5705	6	8,0155	***
Residuos	7,9126	36		

**Anexo 10.** Tabla ANOVA de absorbancias sobre el color debido a pigmentos poliméricos

	Sum SQ	Df	F valor	Pr(F)
Días	0,17013	2	35,4314	***
Tratamiento	0,61789	3	85,7865	***
Días:Tratamientos	0,04875	6	3,3845	0,00947 **
Residuos	0,086443	36		