



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

**Efecto de la adición de madera y tratamientos de ultrasonido sobre la
composición fenólica de un vino Carmenère**

MEMORIA DE TÍTULO

IGNACIO PATRICIO CHAMORRO WARNKEN

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:



Profesor Guía: Felipe Laurie Gleisner
Ing. Agr., M.S., Ph. D.
Facultad de ciencias Agrarias
Universidad de Talca



Profesor informante María Asunción Navarro Fernández
Lic. ciencia y tecnología de los alimentos, Ph.D.
Facultad de ciencias química
Universidad de Castilla la Mancha

Fecha de presentación de la Defensa de Memoria: 30/10/2020

Agradecimientos

Me gustaría agradecer al equipo del Laboratorio de Química del Vino de la Facultad de Ciencias Agrarias. A las Dras. María Navarro, Liudis Pino, y a Paula Peña por tener siempre una sonrisa y un ambiente grato, y por enseñarme y apoyarme cada vez que requerí de su ayuda. Mis agradecimientos al profesor Felipe Laurie por sus clases durante la carrera, las que me acercaron al mundo del vino, por su ayuda con esta investigación, y por invitarme a participar de su proyecto FONDECYT 1190301.

Agradecer a mis amigos, compañeros de muchas historias y momentos a lo largo de estos años, los que permitieron que esta etapa de la vida pasara más rápido de lo que hubiese preferido. En especial, agradezco a mis amigos Marcelo Navarro y Osvaldo Palma, quienes me permitieron conocer al Dr. Sebastián Yanez, a Diego Peñafiel y el gran Alexis Muñoz, los que siempre me acompañaron y transmitieron sus años de experiencia, sin los cuales no hubiese sido lo mismo terminar este escrito.

Agradecer a una vida de paciencia de mi familia, desde mis padres a mis hermanos, quienes ya podrán estar más tranquilos, luego de que se cumpla esta etapa de mi vida.

Para terminar, agradezco a una motivación inesperada, que sin duda me ayudo a encontrar concentración en los momentos en que se veía imposible, a acelerar el paso cuando fue requerido, a pasar largas jornadas en el laboratorio escuchando por horas el agradable sonido del equipo de ultrasonido. Mis agradecimientos a Elise por todo esto y por ser parte del final de una gran etapa, y quizás el comienzo de la próxima.

Resumen

En esta investigación se evaluó el efecto de la aplicación de pulsos de ultrasonido sobre la composición fenólica (fenoles totales, taninos condensados y taninos hidrolizables) de un vino tinto Carmenère en contacto con trozos de madera de roble. El ultrasonido se aplicó mediante el equipo VCX-750 con una sonda sólida de 19 mm parcialmente inmersa en el líquido, y operando a una frecuencia de 20 kHz, con amplitudes variables de 40% y 80%, y dos tiempos de exposición, de 10 y 20 min. El tratamiento con madera consistió en la adición de 100 g de cubos de madera de roble americano tostado medio (10 x 10 x 20 mm, Tonelería nacional, ambrosia flavour boost). El contenido de fenoles del vino se evaluó luego de 7 días de transcurridos los tratamientos. Los resultados del estudio no mostraron diferencias significativas en la concentración de fenoles totales, ni en la concentración de taninos condensados. Sin embargo, se demostró que la aplicación de ultrasonido sobre vinos tratados con madera de roble aumentó significativamente la concentración de taninos hidrolizables, siendo el tratamiento de 80% de amplitud de onda, aplicado por 20 min, el que alcanzó la mayor concentración de dichas sustancias (172,2 mg EAE/L en contraste con los 111,5 mg EAE/L obtenidos en el tratamiento control). La aplicación de ultrasonido parece ser una alternativa válida para aumentar la extracción taninos hidrolizables desde la madera; sin embargo, debieran desarrollarse nuevos experimentos que permitan entender la dinámica de los cambios químicos que se generan debido a la aplicación de ultrasonido al vino.

Abstract

This research evaluated the effects of ultrasound pulses on the phenolic composition (total phenols, condensed tannins and hydrolysable tannins) of a Carmenère red wine in contact with pieces of oak wood. Ultrasound was applied using a VCX-750 equipment with a 19 mm solid probe partially immerse in the wine, and operating at a frequency of 20 kHz, with variable amplitudes of 40% and 80%, and two exposure times, 10 and 20 minutes. The wood treatment consisted on the addition of 100 g of medium tan oak wood cubes (10 x 10 x 20 mm, Tonelería nacional, ambrosia flavour boost). The content of phenolics was evaluated seven days after the treatments .The results of the study did not show significant differences in the concentration of total phenols, nor in the concentration of condensed tannins. However, it was shown that the use of ultrasound over wines treated with oak wood significantly increased the extraction of hydrolysable tannins. The treatment reaching the highest concentration of hydrolysable tannins was the one with 80% wave amplitude, applied for 20 minutes (172.2 mg EAE / L in contrast to the 111.5 mg EAE / L obtained in the control wine). The application of ultrasound seems to be a valid alternative to increase the extraction of hydrolysable tannins from wood; however, new experiments should be developed to understand the dynamics of chemical changes that are generated due to the application of ultrasound to wine.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivo general	3
1.3 Objetivos específicos	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Composición química del vino	4
2.2 Compuestos fenólicos	5
2.3 Crianza del vino	6
2.4 Aportes de la madera	6
2.5 Chips como alternativa al uso de barricas	7
2.6 Ultrasonido.....	8
2.7 Mecanismo de acción del ultrasonido.....	8
2.8 Tiempo de aplicación del ultrasonido.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Vino	11
3.2 Maderas	11
3.3 Equipo de ultrasonido	11
3.4 Diseño experimental y metodología.....	12
3.5 Medición de fenoles totales	13
3.5.1 Curva de calibración de fenoles totales.....	14
3.6 Medición de taninos condensados.....	14
3.6.1 Curva de calibración para taninos condensados.....	15
3.7 Medición de taninos hidrolizables	15
3.7.1 Curva de calibración para taninos hidrolizables	16
3.8 Análisis estadístico	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1 Concentración de fenoles totales mg EAG/L	17
4.2 Concentración de taninos condensados mg EC/L	19

4.3 Concentración de taninos hidrolizables mg EAE/L	20
5. CONCLUSIÓN	23
6. BIBLIOGRAFÍA	24

Índice de cuadros

Cuadro 4.1	Análisis factorial de fenoles totales	18
Cuadro 4.2	Análisis factorial de taninos hidrolizables	22

Índice de figuras

Figura 1.	Diseño experimental del estudio	15
Figura 2.	Contenido de fenoles totales	18
Figura 3.	Contenido de taninos condensados	20
Figura 4.	Contenido de elagitaninos totales	22

1.Introducción

Chile es uno de los países productores de vino más relevantes en el mundo. De acuerdo a cifras de la Organización Internacional de la Viña y el Vino, OIV, nuestro país ocupa el sexto lugar de los principales productores, con una producción total de 12,9 millones de hL de vino (International Organisation of Vine and Wine, 2019).

Según el catastro vitivinícola nacional, realizado por el Servicio Agrícola y Ganadero, SAG, la superficie plantada con vides viníferas en Chile alcanzó las 137.191,12 ha en 2018, con un incremento del 0,9% con relación al año anterior (SAG, 2018). Respecto a la producción de vinos, el último informe ejecutivo del SAG indica que en el 2019 la cantidad producida alcanzó a 11,9 millones de hL., cifra inferior en un 7,4% respecto a la del año 2018. En cuanto a las variedades más producidas: Cabernet sauvignon, Sauvignon blanc, Merlot, Chardonnay, Carmenère y Syrah son las principales (SAG, 2019). Por su parte, en la región del Maule se produjeron 5,4 millones de hL, y esta sigue siendo la región vitivinícola con el mayor aporte a la producción total de vinos del país.

En términos de exportaciones, Chile comercializa alrededor del 70% de su producción en el extranjero, lo que la convierte en la industria más globalizada a nivel mundial; no obstante, y a pesar de sus bajos precios de venta, el país tiene una gran cantidad de competidores en los distintos mercados de destino, por lo que uno de sus grandes desafíos es posicionarse como un país productor de vinos *premium*, lograr subir sus precios y mejorar su sostenibilidad de largo plazo (Felzensztein, 2014).

Adicionalmente, para sostener el volumen de vinos exportados en las categorías de precios de entrada o intermedios, se debe ofrecer productos de la mejor

calidad posible, prestando especial atención a sus propiedades enológicas, microbiológicas, y antioxidantes, las cuales dependen de las particularidades de la uva, las prácticas de vinificación y crianza empleadas para su producción.

En cuanto a las prácticas de elaboración que producen un efecto determinante sobre la calidad de los vinos, se destaca el uso de barricas de roble. El envejecimiento del vino en este tipo de depósito es el método más utilizado en el mundo para desarrollar el proceso de crianza; sin embargo, este presenta algunas desventajas como los largos periodos de guarda, altos costos, y la sostenibilidad del proceso, debido al uso de madera, entre otros.

Alternativamente, en las últimas décadas se han reportado nuevas técnicas de envejecimiento de vinos, entre las que destacan el uso de fragmentos de madera, técnicas de microoxigenación, y la aplicación de algunos métodos físicos para la obtención de compuestos fenólicos (Tao et al., 2014).

Algunas de estas tecnologías para favorecer la extracción de compuestos fenólicos desde materiales sólidos, son: maceración, extracción asistida por microondas o ultrasonido, y la utilización de alta presión, entre otras. Dentro de estas, el ultrasonido se destaca debido a su alta eficiencia de extracción, fácil manejo, bajo costo y contaminación ambiental (Tao et al., 2014). Algunos autores sugieren que durante el uso del ultrasonido, se debiera optimizar ciertas variables críticas, como la temperatura y tiempo de exposición, de forma de reducir la potencial de degradación de los compuestos fenólicos de interés (Zhang et al., 2015).

En el presente estudio se evaluó el efecto de tratamientos de ultrasonido sobre la composición de compuestos fenólicos en vino Carmenère, en contacto con fragmentos de madera de roble, utilizando distintas amplitudes de onda y tiempos de exposición del vino al ultrasonido.

1.1 Hipótesis

La aplicación de pulsos de ultrasonido en vino Carmenère, en contacto con fragmentos de madera de roble, facilita la extracción de taninos hidrolizables desde la madera al vino.

1.2 Objetivo general

- Evaluar el efecto de dos amplitudes de onda (40% y 80%) y tiempos de exposición a pulsos de ultrasonido (10 y 20 min) sobre la composición de compuestos fenólicos en vino Carmenère en contacto con fragmentos de madera de roble.

1.3 Objetivos específicos

- Cuantificar el contenido de fenoles totales, taninos condensados e hidrolizables en vino Carmenère tratado con fragmentos de madera de roble y pulsos de ultrasonido.

2.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Composición química del vino

En el vino existe una gran cantidad de moléculas, cuyo conjunto determina sus propiedades sensoriales y complejidad aromática-gustativa. De hecho, se han identificado alrededor de 4000 diferentes moléculas que podrían influir de manera benéfica, perjudicial, o no influir en la calidad del producto. Parte de esta gran cantidad de moléculas se explica por la diversidad de cepas y climas en los que se cultivan las vides, los que influyen en el metabolismo de las plantas, y en la composición química de las uvas (Cuadros-Inostroza, 2010). El agua es el constituyente mayoritario del vino, con alrededor de 75-90%. Esta variación también se explica por la cantidad de fenoles, ácidos orgánicos, minerales, sales y pectinas que conforman el extracto del vino. Con respecto al alcohol etílico, este podría variar entre un 8 y un 13%, dependiendo de la concentración inicial de azúcares de la fruta y el tipo de levaduras utilizados (Dominé et al., 2004).

En el caso de los metabolitos secundarios, la piel y las semillas de las uvas aportan un gran número de metabolitos, principalmente fenólicos, y cuya cantidad es mayor en vinos tintos, los que, a diferencia de los blancos, se vinifican en contacto con las partes sólidas de las bayas. Los compuestos fenólicos contribuyen al color, al sabor del vino y la capacidad de envejecimiento de este. Por otro lado, los compuestos volátiles derivados de moléculas de la pulpa y en algunos casos de las pieles, contribuyen principalmente al aroma de los vinos (Lund & Bohlmann, 2006).

2.2 Compuestos fenólicos

Desde una perspectiva química, los compuestos fenólicos se caracterizan por contener un núcleo bencénico, que lleva uno o varios grupos hidroxilos acoplados, y que en muchos casos está substituida por una cadena lateral funcional (Peña-Neira, 2006).

Dentro de los compuestos fenólicos solubles se observan dos grupos de moléculas: los flavonoides y los no-flavonoides. Los fenoles de tipo no-flavonoides presentan sólo un anillo de seis carbonos, y algunos de los más importantes corresponden a los ácidos fenólicos (benzoico y cinámico). Además, dentro de este grupo, se incluyen otros derivados fenólicos como los estilbenos, los cuales se consideran importantes por sus propiedades antioxidantes (Waterhouse, 2002a).

Respecto a los ácidos benzoicos presentes en la uva, encontramos principalmente el ácido gálico y el ácido elágico, los que también pueden formar parte de los taninos hidrolizables, los cuales proceden mayoritariamente del contacto del vino con madera roble (*Quercus sp.*)(Obreque-Slér et al., 2009).

En cuanto a los compuestos fenólicos flavonoides, estos se caracterizan por estar conformados por dos anillos de seis carbonos unidos por un heterociclo central de tres carbonos (C6-C3-C6). Dentro de este grupo encontramos a los flavonoles, flavonas, antocianos y flavanoles. Estos dos últimos son responsables del color en vinos tintos y rosados, así como también del amargor y astringencia tanto en sus formas libres como polimerizadas, contribuyendo a la percepción en boca del vino. Durante la vinificación de vinos tintos, aproximadamente la mitad de estas sustancias se obtienen por maceración del jugo en contacto con las pieles y semillas de las bayas (Waterhouse, 2002a).

2.3 Crianza del vino

Tradicionalmente, la guarda del vino y algunos destilados se ha llevado a cabo en barriles de roble, fundamentalmente debido a los beneficios sensoriales que dicho material proporcionaría al vino. Entre ellos, los efectos más comunes que se observan son aumento de la estabilidad colorante, la clarificación espontánea y un incremento en la complejidad aromática. Esta última debido a una extracción de ciertos compuestos desde la madera durante la guarda del vino, tales como whiskylactona, Vainillina, Guayacol, Eugenol y otros compuestos que aportan a la complejidad sensorial del vino (Mosedale & Puech, 1998), junto con las reacciones químicas que ocurren una vez que entra oxígeno a la barrica a través de los poros de las duelas (Gómez et al., 2012).

2.4 Aportes de la madera

La madera de roble está compuesta principalmente por tres polímeros insolubles: celulosa, hemicelulosa y lignina. Adicionalmente podemos encontrar otros compuestos como ácidos volátiles y no volátiles, azúcares, terpenos, fenoles volátiles y lactonas, los cuales pueden ser extraídos en el vino debido a su naturaleza hidroalcohólica (Nykanen, 1983). El factor más determinante en la composición química de la madera es el origen geográfico y los tratamientos a los que esta es sometida, tales como el tostado (Towey, 1996). Entre los compuestos de la madera de roble, las whisky lactonas (cis y trans oak lactonas) son las que tienen el impacto sensorial más importante (Masson et al., 1996). Estas se generan a partir de la oxidación lipídica de la madera, y su concentración aumenta una vez que la madera es sometida a procesos de tostado (Weeks & Sefton, 1999).

Desde un punto de vista económico, el origen de la madera es un factor determinante en el precio de las barricas, debido fundamentalmente a la manera

en la que se trabajan. Una barrica de roble francés puede costar el doble que una americana, fundamentalmente debido a las grandes pérdidas de madera resultantes del hendidado del roble francés, debido a su estructura irregular y mayor nivel de porosidad (Waterhouse & Towey, 1994).

Debido a su alto costo, nuevas técnicas de vinificación han sido acogidas por muchas bodegas para limitar el uso de barricas de roble. Entre ellas el uso de fragmentos de madera (ej. chips) los cuales tienen la ventaja de exponer completamente su superficie al vino, cuestión que no ocurre con las barricas que sólo tienen aproximadamente el 40% de su superficie expuesta al vino (Stutz, 1999).

2.5 Chips como alternativa al uso de barricas

La mayoría de los estudios concluyen que el uso de fragmentos de madera puede mejorar la extracción de compuestos volátiles y acelerar el proceso de envejecimiento del vino. Por un lado, el tamaño pequeño de estos fragmentos permite la completa adsorción del vino mientras que en la barrica esto ocurre sólo en los primeros milímetros de la cara interior de la misma, lo cual limitaría la difusión de compuestos de la madera hacia el vino (Stutz, 1999).

No obstante, el uso de chips no puede reemplazar del todo al envejecimiento en barricas, especialmente en guardas prolongadas (Tao et al., 2014). Esto debido a que después de tres meses de contacto la sesión de compuestos volátiles hacia el vino se vuelve constante e incluso comienza a decrecer. Esto no sucede así con las barricas donde usualmente, la extracción de compuestos fenólicos se mantiene por algunos años (Bautista-Ortín et al., 2008). Adicionalmente, la guarda del vino en barricas contribuye a la concentración del vino, por efecto de la evaporación parcial de etanol y parte del agua que contiene, así como a una serie de reacciones de oxidación y estabilidad del color derivadas del ingreso de pequeñas cantidades de oxígeno al vino.

2.6 Ultrasonido

La importancia biológica de los polifenoles ha dado lugar a un gran número de estudios enfocados a su extracción. Estas tecnologías se han desarrollado con el objetivo de ofrecer altos rendimientos en el proceso, reduciendo tiempos, costos, pero esencialmente que sean amigables con el medio ambiente (Soria & Villamiel 2010; Vieira et al. 2013). Algunos de los anteriores son: tratamientos de maceración, extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido, y extracción de alta presión, entre otras.

Respecto al vino, el uso de ondas de ultrasonido podría promover e incluso aumentar el contenido de compuestos fenólicos, teniendo como resultado una mejora en su maduración (Masuzawa et al., 2000). No obstante, a pesar de ciertos resultados positivos, también se han reportado algunos efectos indeseados como la degradación de compuestos fenólicos y disminución del pH (Zhang et al., 2015), por lo cual aún no está del todo claro la forma en la que debiese usarse esta tecnología para obtener resultados óptimos.

2.7 Mecanismo de acción del ultrasonido

Los efectos del ultrasonido sobre un sistema líquido se deben principalmente al fenómeno de cavitación. La cavitación acústica se define como un fenómeno que genera microburbujas (cavidades) en un líquido durante la rarefacción, o presión negativa (Karimi et al., 2014). Esta última es producida por la concentración de energía difusa de sonido. Cuando se genera presión negativa lo suficientemente grande, el aumento de la distancia entre las moléculas resulta en huecos o cavidades y por consiguiente se forman burbujas de cavitación. A medida que aumenta la energía o presión negativa, las burbujas crecen hasta alcanzar un tamaño crítico, luego del cual colapsan e implosionan, dando como resultado una rápida liberación de energía almacenada, donde se generan temperaturas de 3700 °C y una presión de 1000 atm (temperatura y presión, depende del fluido,

frecuencia utilizada, amplitud de onda, entre otros factores). Este colapso puede ser transitorio o estable dependiendo de la frecuencia y del medio (líquido) sobre el cual se está trabajando. A frecuencias bajas (20-100 KHz), la naturaleza de la cavitación es transitoria y el colapso de las burbujas suele ser violento (Jayant & Ram, 2005). Al contrario, al trabajar a altas frecuencias (> 200 kHz) la cavitación suele ser más estable y las burbujas son capaces de mantener un tamaño adecuado para soportar cientos de ciclos de altas y bajas presiones antes de alcanzar un tamaño que las haga implosionar (Mason et al., 2005).

Respecto a la relación entre el ultrasonido y la madera algunos autores como (Karimi et al., 2014) sostienen que los efectos físicos de la aplicación de ultrasonido, en comparación con los químicos, pueden ser mucho más violentos en sistemas heterogéneos que involucran sistemas sólido-líquidos como el caso de la hidrólisis de materiales ligno-celulósicos (madera). La irradiación con ultrasonido es capaz de fracturar las paredes celulares y desgarrar la pared secundaria, incrementando el paso de celulosa a fibras de celulosa (Yu et al., 2009). Esto, debido al colapso generado por la cavitación del líquido circundante en las paredes de la madera.

2.8 Tiempo de aplicación del ultrasonido

Respecto al tiempo de aplicación del ultrasonido, algunos autores experimentaron con intervalos de tiempo que van desde los 10 hasta los 150 min, obteniendo los mejores resultados con un tiempo mayor de exposición (Tao et al., 2014). Sin embargo, es importante mencionar que los factores más influyentes sobre la migración de compuestos fenólicos desde los chips al vino son la densidad de la energía acústica y la temperatura, siendo esta última la que más influiría. Otro estudio sobre araticú (*Annona crassiflora mart.*), un tipo de fruta popular en Brasil, concluyó que una breve aplicación (< 5 min), a una alta potencia de ultrasonido (> 100 kHz), era lo más efectivo en la recuperación de fenoles desde la piel del araticú, siendo algunos de los compuestos recuperados

epicatequina, rutina, ácido clorogénico, catequina y ácido ferúlico (Arruda et al., 2019).

La información actual no es concluyente, para algunas matrices de alimentos como el jugo de mora, la exposición al ultrasonido puede disminuir significativamente el contenido de antocianinas (Engmann et al., 2015). Otros autores han reportado que una aplicación de ultrasonido de entre 10 y 30 min a temperaturas promedio de 40-43 °C pueden mejorar la disponibilidad de la mayoría de los compuestos bio-activos en jugo de naranja en comparación con grupos de control sin aplicación de ultrasonido (Guerrouj et al., 2016).

3. MATERIALES Y METODOS

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de química del vino de la Universidad de Talca, durante el año 2020.

3.1 Vino

La vinificación se realizó con uvas de la variedad Carmenère, obtenidas desde la Viña Santa Carolina S.A. proveniente de su predio ubicado en la comuna de Rengo. El proceso se realizó según los protocolos de la (OIV). Se produjeron 56 litros de vino, el cual fue almacenado en botellas de vidrio de 300 mL , en una cámara de frío a una temperatura de 0 °C.

3.2 Maderas

La madera utilizada en este ensayo proviene de Tonelería Nacional (Santiago, Chile), y corresponde al producto ambrosia flavour boost, roble americano con tostado medio (*Quercus Alba L.*). Dicha madera se adicionó al vino en la forma de cubos de aproximadamente 10 x 10 x 20 mm cada uno de acuerdo con lo indicado en la sección 3.4.

3.3 Equipo de ultrasonido

Se utilizó el equipo de ultrasonido de la marca SONICS (Washington, USA), modelo VCX-750, el cual posee una potencia de 750 watt y una frecuencia fija de 20 kHz. La sonda utilizada fue de 19mm sólida, especial para solventes orgánicos(marca SONICS, modelo 306b, para volúmenes de entre 50-500 mL).

3.4 Espectrofotómetro

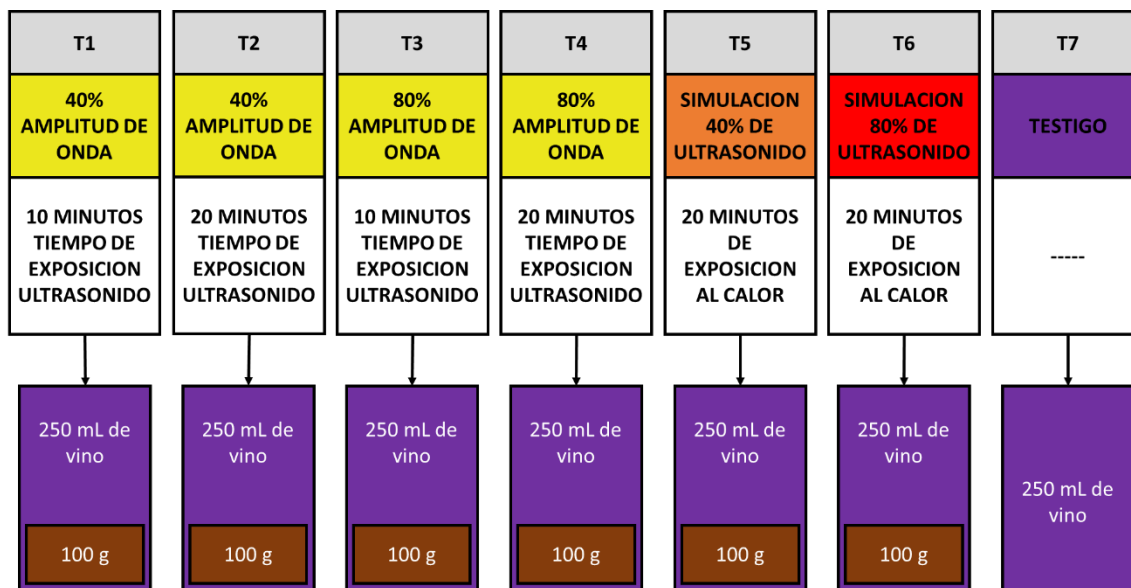
Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un lector de placas UV-vis Epoch de la marca BIOTEK (Winooski, USA). Este equipo permite analizar absorbancias de entre 200 a 900 nm, y en este experimento se utilizaron placas de 96 pozos (marca AGILENT de polipropileno).

3.5 Diseño experimental y metodología.

Se utilizaron 28 muestras de 250 mL de vino Carmenère, a 24 de las cuales se le adicionó 100 g de fragmentos de madera, de acuerdo diseño experimental indicado en la Figura 1.

Debido a que los tratamientos de ultrasonido producen un aumento de temperatura de las muestras tratadas, se decidió incluir tratamientos adicionales donde se realizó una simulación del calor generado por el ultrasonido a 40% y 80% de amplitud. Esto, de forma de evaluar tanto el efecto de la temperatura alcanzada luego de la aplicación de ultrasonido, separado del efecto del aumento de temperatura sin el tratamiento por ultrasonido (Figura 1). La fuente de calor utilizada correspondió a un baño termo-regulado (modelo hh-s8 , marca JINTAN MEDICAL INSTRUMENT FACTORY, Jiangsu, China). Para definir las temperaturas alcanzadas por los tratamientos de ultrasonido y diseñar los tratamientos de simulación térmica, se realizaron una serie de experimentos preliminares donde se determinó que la temperatura a regular correspondió a una temperatura inicial de 12 °C para llegar hasta 24 °C, en el caso de a simulación del ultrasonido a 40% amplitud de onda y de 12 °C hasta 30 °C para simular el tratamiento de ultrasonido a 80% de amplitud de onda. Adicionalmente, se utilizó como testigo el vino Carmenère sin ningún tratamiento.

Todos los tratamientos anteriormente descritos se realizaron por cuadruplicado y bajo las mismas condiciones ambientales (19 °C y 98% de humedad relativa).



x4 repeticiones

Fig 1. Diseño experimental

3.6 Medición de fenoles totales

Este análisis se llevó a cabo a través del método de Folin-Ciocalteu adaptado para volúmenes pequeños. El método permite analizar el contenido de fenoles totales en vino y otras soluciones similares, basado en la reducción química del reactivo del mismo nombre (una mezcla de óxidos de tungsteno y molibdeno) por contacto con los fenoles del vino. El producto de la reacción de oxido reducción de los metales tiene un color azul, y la intensidad de este color es proporcional a la concentración de fenoles de la muestra (Waterhouse, 2002b).

El procedimiento utilizado se resume a continuación:

- Se diluyeron 100 μ l de vino con 900 μ L de agua destilada en un tubo de 1,5 mL
- Luego en un tubo de 2 mL, se agregaron 20 μ L de vino diluido. Adicionalmente, se agregaron 1,58 mL de agua destilada. Se agregaron 100 μ L de reactivo de Folin, se agitó y esperó 5 min.

- Finalmente se agregaron 300 μL de carbonato de sodio. Se agitaron las muestras y se dejaron en el horno a 40 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos

Pasados 30 min se sacaron las muestras de la estufa, se tomaron 300 μL y se leyó la absorbancia a 765 nm en una placa de 96 pocillos. Se interpolaron las absorbancias en la curva de calibración de ácido gálico y se multiplicaron por un factor de dilución de 10.

3.6.1 Curva de calibración ácido gálico

Se preparó una solución madre de ácido gálico de concentración 5000 mg/L en etanol al 10% en agua. Se utilizó ácido gálico MERCK de 98% de pureza.

A partir de la solución madre se prepararon diluciones de ácido gálico en el rango de 0 a 250 mg/L (0, 50, 100, 150, 250 mg/L) en agua. Posteriormente en un tubo de 2 mL, se agregaron 20 μL de cada dilución. Adicionalmente, se agregaron 1,58 mL de agua destilada. Se agregaron 100 μL de reactivo de Folin, se agitó y esperó 5 min. Finalmente se agregaron 300 μL de carbonato de sodio. Se agitaron las muestras y se dejaron en el horno a 40 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos

Se midió la absorbancia a 765 nm utilizando como blanco el punto 0 mg/L de ácido gálico.

3.7 Medición de taninos condensados

Se cuantificaron los taninos condensados mediante el método de la precipitación de metil-celulosa (MCP) (Sarneckis et al., 2006). El método se basa en la interacción de taninos con el polímero metilcelulosa los que posteriormente precipitan.

En resumen, se agregaron 25 μL de vino en cada tubo de 1,5 mL. Se prepararon tres tubos correspondientes a las muestras y tres tubos correspondientes a los

controles del método. Luego, se adicionaron 300 μL de polímero MCP a las muestras. Se agitó y se dejó reposar por 3 min.

Posteriormente se agregaron 200 μL de sulfato de amonio a muestras y controles. Se adicionaron 475 μL de agua a las muestras y 775 μL de agua a los controles del método. Luego de 10 min, se centrifugaron todos los tubos a 10.000 rpm por 7 minutos. Finalmente se tomaron 300 μL y se leyó la absorbancia a 280 nm en una placa uv de 96 pocillos.

A las absorbancias de los controles se le restó las absorbancias de las muestras. Se interpolaron las absorbancias obtenidas en la curva de calibración de catequina (sección 3.7.1) y se multiplicó por un factor de dilución de 40.

3.7.1 Curva de calibración para taninos condensados

Se preparó una solución madre de catequina con una concentración 1000 mg/L en agua. Se utilizó hidrato de catequina SIGMA-ALDRICH de 98% de pureza.

A partir de la solución stock se prepararon diluciones de catequina en el rango de 10 a 200 mg/L (10, 25, 50, 100, 150, 200 mg/L) en agua. Se midió la absorbancia a 280 nm utilizando como blanco agua destilada.

3.8 Medición de taninos hidrolizables

Este análisis se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Isaza y colaboradores (2007) con algunas modificaciones. El método se basa en la determinación del ácido elágico liberado mediante la hidrolisis ácida de los taninos hidrolizables.

El procedimiento fue el siguiente:

Se agregó 1 mL de vino a un tubo de ensayo de 10 mL, luego se adicionaron 950 μ L de metanol, se agitó y se agregaron 1050 μ L de ácido clorhídrico, HCl 12 N. Posteriormente, se agitó nuevamente y se dejó reposar las muestras en el horno a 90 °C por 150 min esperando la hidrolización.

Mientras tanto se prepararon tubos eppendorf de 2 mL con diluciones 1:5 de los vinos sin hidrolizar, como control del método, tomando 800 μ L de agua y 200 μ L de vino. Luego de los 150 min se preparan disoluciones 1:5 con el vino hidrolizado. Finalmente se midió la absorbancia a 368 nm de las muestras de vino hidrolizado junto con las muestras de vino sin hidrolizar, estas absorbancias se restaron para luego ser interpoladas en la curva de calibración de ácido elágico y se multiplicó por un factor de dilución de 5.

3.8.1 Curva de calibración para taninos hidrolizables

Se preparó una solución madre de ácido elágico de concentración 1000 mg/L en DMSO. Se utilizó ácido elágico SIGMA-ALDRICH de 95 % de pureza.

A partir de la solución stock se prepararon diluciones de ácido elágico en el rango de 1 a 50 mg/L (1, 5, 10, 25, 50 mg/L) en la mezcla etanol al 12% en agua. Se midió la absorbancia a 368 nm utilizando como blanco la mezcla de solventes.

3.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron en el *software* estadístico *Statgraphics Centurion 18*. Inicialmente se compararon los siete tratamientos con ANDEVA de una vía. Posteriormente se realizó un análisis factorial, relacionando la amplitud de onda de ultrasonido y el tiempo de exposición. Se trabajo con un nivel de confianza del 95 por ciento y se realizó pruebas de comparaciones múltiples de Tukey cuando existieron diferencias estadísticamente significativas.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Concentración de Fenoles totales

De acuerdo con los resultados del ANDEVA, ninguno de los tratamientos realizados produjo una diferencia significativa en la concentración de fenoles totales del vino (figura 2).

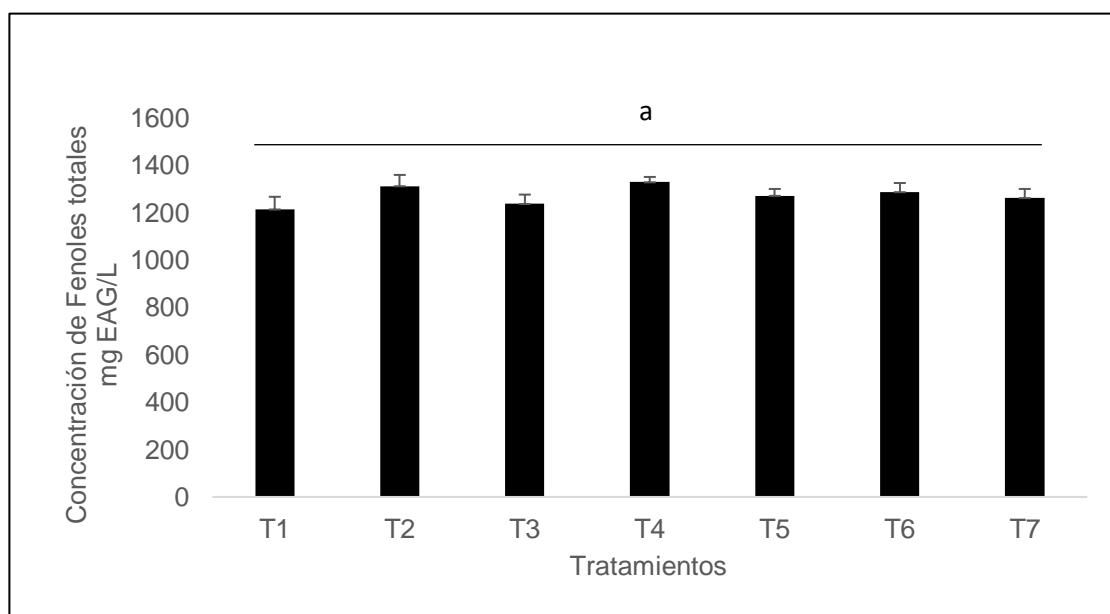


Figura 2. Contenido de fenoles totales en vino Carmenère tratado con pulsos de ultrasonido y madera de roble, Donde: T1: Ultrasonido 40% amplitud de onda durante 10 min; T2: Ultrasonido 40% amplitud de onda durante 20 min; T3: Ultrasonido 80% amplitud de onda durante 10 mi; T4: Ultrasonido 80% amplitud de onda durante 20 min; T5: Simulación calor producido por ultrasonido a 40% de amplitud de onda; T6: Simulación calor producido por ultrasonido a 80% de amplitud de onda; T7: Vino base. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). EAG, equivalente ácido gálico.

En cuanto al análisis factorial realizado, el tiempo de exposición de ultrasonido, tiene un efecto significativo sobre la concentración de fenoles totales (Cuadro 4.1)

Cuadro 4.1 Análisis factorial de la concentración de fenoles totales

Fuente	Suma de Cuadrados	Valor- <i>p</i>
EFECTOS PRINCIPALES		
A: Ultrasonido (amplitud de onda)	4700,5	0,637 ^{ns}
B:Tiempo de exposición (minutos)	107826	0,028*
INTERACCIONES		
AB	117,2	0,941
RESIDUOS	918281	
TOTAL (CORREGIDO)	1,03092 x 10 ⁶	
Tiempo de exposición (minutos)	HSD	
10	1226,5 mg EAG/L b	
20	1321,3 mg EAG/L a	

Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). EAG, equivalente ácido gálico. *significancia estadística, $p < 0,05$. ^{ns} no existe significancia estadística, $p < 0,05$.

El tiempo de exposición al ultrasonido mostró un efecto determinante en la concentración de fenoles totales en comparación con la amplitud de onda del ultrasonido, presentando mayores concentraciones de fenoles totales los tratamientos expuesto a 20 min, con una media de 1321,3 mg EAG/L, superior a los 1226,5 mg EAG/L presentes en el vino luego de 10 min de ultrasonido.

Los estudios de Lukić et al., (2019), demostraron que frente a diferentes amplitudes y duración de tratamientos de ultrasonido no existe una tendencia clara en cuanto a los cambios de la composición fenólica del vino tratado. Esto debido a la posibilidad de ocurrencia tanto de reacciones de polimerización como de despolimerización, copigmentación, isomerización y descomposición durante el tratamiento de ultrasonido. García et al., (2016) observó que los cambios en los fenoles totales eran erráticos, y no seguían una tendencia clara a lo largo de sus tratamientos, en donde varió frecuencias, amplitudes, tiempos de exposición, y temperaturas. En adición a estos autores, Tao et al., (2014) llegó a la conclusión que el ultrasonido de bajas frecuencias como 20Khz no es suficiente para afectar la composición fenólica.

4.2 Concentración de Taninos condensados

De acuerdo con el resultado del análisis estadístico realizado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre algunos tratamientos. El tratamiento T5 presentó la menor concentración de taninos condensados con 201,8 mg EC/L. Este tratamiento presentó diferencias significativas con los tratamientos T1, T2, T4 y T6.

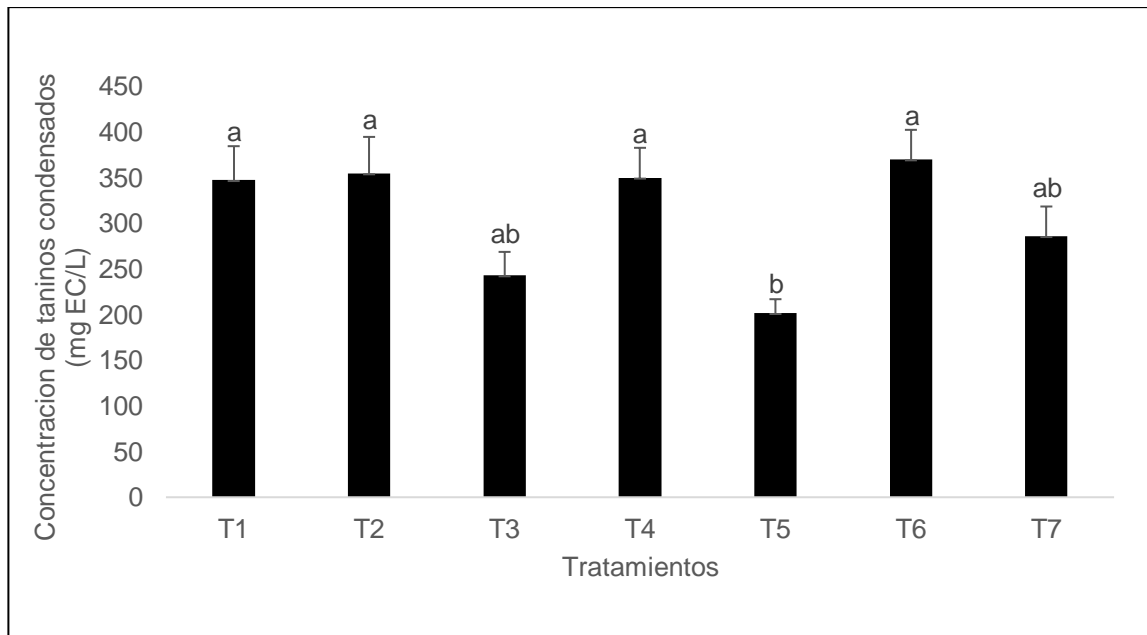


Figura 3. Contenido de taninos condensados en vino Carmenère tratado con pulsos de ultrasonido y madera de roble, Donde: T1: Ultrasonido 40% amplitud de onda durante 10 min; T2: Ultrasonido 40% amplitud de onda durante 20 min; T3: Ultrasonido 80% amplitud de onda durante 10 min; T4: Ultrasonido 80% amplitud de onda durante 20 min; T5: Simulación calor producido por ultrasonido a 40% de amplitud de onda; T6: Simulación calor producido por ultrasonido a 80% de amplitud de onda; T7: Vino base. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). EC, equivalente catequina.

En cuanto al análisis factorial, ningún factor determinó un efecto significativo sobre la concentración de taninos condensados. En contraste con lo establecido por Lukić et al., (2019), quien sostuvo que para taninos condensados como por ejemplo el flavan-3-ol, el factor más determinante sería el tiempo de exposición.

No obstante, las frecuencias utilizadas por Lukić fueron más altas (HPU) que las de este estudio. Otros autores como Ferraretto & Celotti, (2016), utilizaron una frecuencia de 20 kHz y concluyeron que la concentración de taninos condensados no se vio alterada.

4.3 Concentración de Taninos hidrolizables

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir del ANDEVA junto con la prueba de Tukey. La mayor extracción de taninos hidrolizables se obtuvo en el tratamiento T4 con 172,2 mg EAE/L, mientras que la menor es encontró en el tratamiento T7 con 111,5 mg EAE/L (Figura 4).

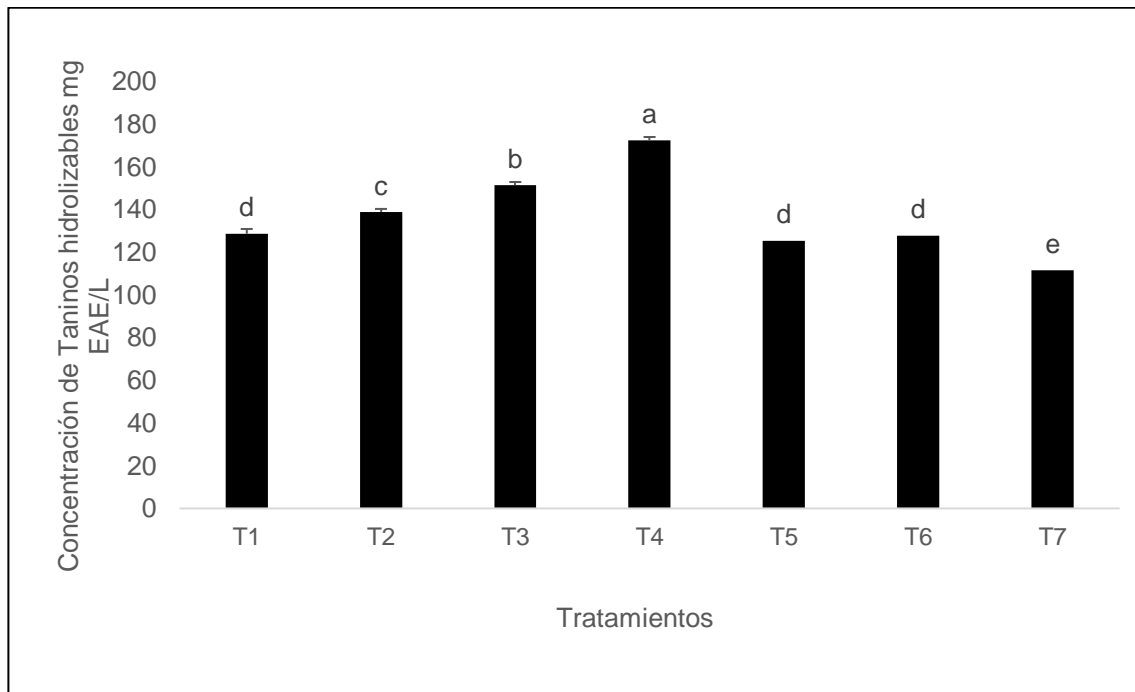


Figura 4. Contenido de taninos hidrolizables en vino Carmenère tratado con pulsos de ultrasonido y madera de roble, Donde: T1: Ultrasonido 40% amplitud de onda durante 10 min; T2: Ultrasonido 40% amplitud de onda durante 20 min; T3: Ultrasonido 80% amplitud de onda durante 10 min; T4: Ultrasonido 80% amplitud de onda durante 20 min; T5: Simulación calor producido por ultrasonido a 40% de amplitud de onda; T6: Simulación calor producido por ultrasonido a 80% de amplitud de onda; T7: Vino base. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). EAE, equivalente ácido elágico.

De acuerdo con los resultados del análisis factorial, ambos factores, junto con la interacción de estos, presentaron efectos significativos sobre la concentración de taninos hidrolizables (Cuadro 4.2)

Cuadro 4.2 Análisis factorial taninos hidrolizables

Fuente	Suma de Cuadrados	Valor-p
EFFECTOS PRINCIPALES		
A: Ultrasonido (amplitud)	9477,9	0,0000*
B:Tiempo de exposición (minutos)	2880,5	0,0000*
INTERACCIONES		
AB	336,6	0,0037*
RESIDUOS		
TOTAL (CORREGIDO)	14271,3	
Tiempo de exposición (minutos)	HSD	
10	140,0 mg EAE/L b	
20	155,5 mg EAE/L a	
Ultrasonido (amplitud)	HSD	
US 40% amplitud	133,7 mg EAE/L b	
US 80% amplitud	161,8 mg EAE/L a	

Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). EAE, equivalente ácido eláxico. *significancia estadística, $p < 0,05$.

Los tratamientos con ondas de ultrasonido produjeron un mayor contenido de taninos hidrolizables, en comparación con los tratamientos en los que no se aplicó ultrasonido. Junto con esto se observa que mientras más tiempo de aplicación y más potencia de ultrasonido, la extracción de taninos hidrolizables es mayor. Lo anterior es concordante con los resultados de Lukić et al. (2019) y Ferraretto & Celotti (2016). En el último estudio, se afirma que los factores amplitud de ultrasonido y tiempo de exposición influyen favorablemente sobre la extracción de este tipo de compuestos, lo cual se apoya en los resultados obtenidos en el análisis multifactorial (Cuadro 4.2).

Tanto el tiempo de ultrasonido como la potencia de este generan efectos significativos sobre la extracción de taninos hidrolizables. Junto con esto, la interacción de los dos factores favorece aún más la extracción. Por otro lado Lukić et al., (2019), afirmó que respecto a taninos hidrolizables el factor que más influía

era la amplitud de ultrasonido utilizada, similar respuesta a los resultados obtenidos en este estudio , donde los tratamientos donde se aplicó ultrasonido a 80% de amplitud de onda obtuvieron la mayor concentración de taninos hidrolizables.

5. CONCLUSIÓN

Aunque el ultrasonido a 80% de amplitud de onda permitió una mayor extracción de taninos hidrolizables desde la madera, no se encontraron diferencias concluyentes sobre el efecto del ultrasonido en la concentración de fenoles totales ni taninos condensados.

Por lo tanto, se puede afirmar que el tratamiento de ultrasonidos de baja potencia (40% amplitud de onda) y tiempos de exposición de 10 min utilizados no permiten una extracción superior a lo obtenido luego de aumentar la temperatura del vino por otros medios físicos.

La dinámica de los cambios químicos luego de aplicar ultrasonido al vino sigue siendo una interrogante, en cuanto a la magnitud del cambio, la naturaleza de las reacciones y la selectividad de los compuestos afectados, por lo que sin duda se requieren más investigaciones para validar el ultrasonido como una técnica alternativa válida al envejecimiento convencional en barricas de roble.

6. BIBLIOGRAFÍA

- A. Waterhouse. (2002). Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1–8.
- Arruda, H. S., Silva, E. K., Pereira, G. A., Angolini, C. F. F., Eberlin, M. N., Meireles, M. A. A., & Pastore, G. M. (2019). Effects of high-intensity ultrasound process parameters on the phenolic compounds recovery from araticum peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 50(August 2018), 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.09.002>
- Bautista-Ortín, A. B., Lencina, A. G., Cano-López, M., Pardo-Mínguez, F., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2008). The use of oak chips during the ageing of a red wine in stainless steel tanks or used barrels: Effect of the contact time and size of the oak chips on aroma compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14(2), 63–70. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00008.x>
- Engmann, F. N., Ma, Y., Tchabo, W., & Ma, H. (2015). Ultrasonication Treatment Effect on Anthocyanins, Color, Microorganisms and Enzyme Inactivation of Mulberry (*Moraceae nigra*) Juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 854–862. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12296>
- Felzensztein, C. (2014). The Chilean wine industry: new international strategies for 2020. *Emerald Emerging Markets Case Studies*, 4(2), 1–12. <https://doi.org/10.1108/20450621111115578>
- Ferraretto, P., & Celotti, E. (2016). Preliminary study of the effects of ultrasound on red wine polyphenols. *CYTA - Journal of Food*, 14(4), 529–535. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1149520>
- García, J. F. (2016). Ultrasound for accelerating the wine ageing process: A winetaster's view. *Applications of Ultrasound in the Beverage Industry*, June, 111–114.

- Gómez García-Carpintero, E., Gómez Gallego, M. A., Sánchez-Palomo, E., & González Viñas, M. A. (2012). Impact of alternative technique to ageing using oak chips in alcoholic or in malolactic fermentation on volatile and sensory composition of red wines. *Food Chemistry*, 134(2), 851–863. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.194>
- Guerrouj, K., Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R. M., & Marín-Iniesta, F. (2016). Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. *Food and Bioproducts Processing*, 99, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.03.007>
- International Organisation of Vine and Wine. (2013). *Statistical report on world vitiviniculture*. 28. <http://www.oiv.int/oiv/info/enstatsro>
- Jayant, B., & Ram, B. (2005). *Surface modification of lignocellulosic fibers using high-frequency ultrasound*.
- Karimi, M., Jenkins, B., & Stroeve, P. (2014). Ultrasound irradiation in the production of ethanol from biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40, 400–421. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.151>
- Lukić, K., Brnčić, M., Ćurko, N., Tomašević, M., Valinger, D., Denoya, G. I., Barba, F. J., & Ganić, K. K. (2019). Effects of high power ultrasound treatments on the phenolic, chromatic and aroma composition of young and aged red wine. *Ultrasonics Sonochemistry*, 59(July). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104725>
- Lund, S. T., & Bohlmann, J. (2006). The molecular basis for wine grape quality - A volatile subject. *Science*, 311(5762), 804–805. <https://doi.org/10.1126/science.1118962>
- Mason, T. J., Riera, E., Vercet, A., & Lopez-buesa, P. (2005). *Ultrasound*. 0–12.
- Masuzawa, N., Ohdaira, E., & Ide, M. (2000). Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers and Short Notes and Review Papers*, 39(5 B), 2978–2979. <https://doi.org/10.1143/jjap.39.2978>

- Obreque-Sl er, E., Peña-Neira, A., López-Sol s, R., Ramírez-Escudero, C., & Zamora-Marín, F. (2009). Phenolic characterization of commercial enological tannins. *European Food Research and Technology*, 229(6), 859–866. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1121-1>
- Peña-Neira, A. (2006). Los taninos y su importancia en la calidad de uvas y vino. *Vendimia*, 18–20.
- SAG. (2018). *Catastro Vit cola Nacional 2018* (Vol. 20022020, Issue 2).
- SAG. (2019). *Informe Ejecutivo. Producción de Vinos 2019*.
- Sarneckis, C. J., Damberg, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2006). Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: Development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(1), 39–49. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00042.x>
- Tao, García, & Sun. (2014). Advances in Wine Aging Technologies for Enhancing Wine Quality and Accelerating Wine Aging Process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(6), 817–835. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.609949>
- Tao, Y., Zhang, Z., & Sun, D. W. (2014). Experimental and modeling studies of ultrasound-assisted release of phenolics from oak chips into model wine. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(5), 1839–1848. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.03.016>
- Waterhouse, A. L. (2002). Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 21–36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x>
- Yu, J., Zhang, J., He, J., Liu, Z., & Yu, Z. (2009). Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresource Technology*, 100(2), 903–908. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.025>

Zhang, Q. A., Shen, H., Fan, X. H., Shen, Y., Wang, X., & Song, Y. (2015).
Changes of gallic acid mediated by ultrasound in a model extraction solution.
Ultrasonics Sonochemistry, 22, 149–154.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.06.010>