

## Evaluación y control de polifenoles en mosto y vino tinto

### Evaluation and control of polyphenols in grape must and red wine

R. Riquelme<sup>1</sup>, M. Berradre<sup>2</sup>, G. Páez<sup>3</sup> y B. Sulbarán<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigaciones Piscícolas. Facultad Experimental de Ciencias. Departamento de Biología. LUZ. Maracaibo. Venezuela.

<sup>2</sup>Laboratorio de Alimentos. Facultad de Ciencias. LUZ. Maracaibo. Venezuela.

<sup>3</sup>Laboratorio de Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería. LUZ. Maracaibo. Venezuela.

### Resumen

Se evaluó el contenido de polifenoles totales y catequinas en el mosto de uva, *Vitis vinifera*, var Tempranillo, a diferentes tratamientos térmicos y el efecto del tratamiento sobre el contenido de estos en el vino obtenido y almacenado 20, 40 y 60 días, para el control de la oxidación de los mostos. Los tratamientos térmicos aplicados al mosto consistieron en temperaturas de 45°C, 55°C y 65°C durante 2 y 5 minutos. El contenido de catequinas y polifenoles se determinó por espectrofotometría, el primero a una longitud de onda de 500 nm y el segundo por el método Folin-Ciocalteu a una longitud de onda de 765 nm. Los resultados obtenidos fueron analizados a través del diseño de mediciones repetidas para un nivel de significancia del 1%. Se obtuvo un efecto altamente significativo del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de catequinas y polifenoles totales. También se observó una interacción significativa entre la concentración de polifenoles totales, tiempo de almacenamiento y temperatura, así como entre la concentración de polifenoles totales, tiempo de almacenamiento y tiempo de tratamiento térmico. La mejor combinación de tiempo-temperatura que garantiza el control de la oxidación de las catequinas y polifenoles totales se obtuvo con 5 min a 65°C.

**Palabras clave:** polifenoles, catequinas, tempranillo, *Vitis vinifera*.

## Abstract

The content of catechins and total polyphenols in must, *Vitis vinifera*, var Tempranillo was evaluated, subjected to different heat treatments and the treatment effect on the catechin's content and polyphenols in the wine obtained and stored in 20, 40 and 60 days, to control the oxidation of musts. The heat treatments were applied to the wort in temperatures of 45°C, 55°C and 65°C for 2 and 5 minutes. The content of catechins and polyphenols was determined by spectrophotometry, the first one at a wavelength of 500 nm, and the second using the Folin-Ciocalteu's method at a wavelength of 765 nm. The results were analyzed through the design of repeated measurements to a significance level of 1%. It won a highly significant effect of storage time on the content of catechins and total polyphenols. There was also significant interaction between the concentration of polyphenols total storage time and temperature, as well as between the concentration of polyphenols total storage time and time of heat treatment. The best combination of time-temperature ensures that the control of the oxidation of polyphenols and catechins was achieved with 5min at 65°C.

**Key words:** polyphenols, catechins, tempranillo, *Vitis vinifera*.

## Introducción

El vino es la bebida que resulta de la fermentación alcohólica del jugo de uvas y por extensión la obtenida a partir de otros frutos o materiales vegetales. Su elaboración consta de 3 fases principales: obtención del mosto, su fermentación y por último su conservación y envejecimiento (Martínez-Ortega *et al.*, 2001).

El envejecimiento de un vino no es más que un proceso de oxidación, por lo que parece obvio pensar que esta fase de envejecimiento depende de su capacidad para hacer frente a dicha oxidación, esta no solo se encuentra íntimamente relacionada con el contenido polifenólico, sino también con la calidad y el equilibrio de sus componentes. Un vino con una gran cantidad de polifenoles no equilibrados perderá con facilidad su color con el tiempo (Martínez-Ortega *et al.*, 2001). Exis-

## Introduction

Wine is a beverage from the result of the alcoholic fermentation of grape juice, thus, obtained after other fruits and vegetal materials. Its elaboration has 3 important phases: obtaining of the must, its fermentation and finally, its conservation and ageing (Martínez-Ortega *et al.*, 2001).

Ageing of a wine is not more than an oxidation process, and it seems obvious that this ageing phase depends on its capacity to face such oxidation, which is not only closely related to the polyphenolic content but also to the quality and equilibrium of its components. A wine with a great quantity of unbalanced polyphenols will easily lose its color with the time (Martínez-Ortega *et al.*, 2001). There are researches carried out with the aim of avoiding the ageing of wine through the addition of lysozyme, which is

ten estudios que buscan evitar el envejecimiento del vino a través de la adición de lisozima, la cual es eficaz en corregir y prevenir la fermentación heteroláctica y para controlar el desarrollo de las bacterias del ácido láctico y así prolongar la vida de los vinos (Lasanta *et al.*, 2010). Otras técnicas como la microoxigenación antes de la fermentación maloláctica ha dado buenos resultados en la composición fenólica de vinos tintos (Perez-Magariño *et al.*, 2008).

En este sentido, se hace necesario evaluar el tipo y la concentración de componentes que intervienen directamente en la capacidad de oxidación y envejecimiento de los vinos, componentes que son indicadores de que el producto final, mantiene su calidad en el tiempo, siendo estos conocidos como polifenoles. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el contenido de polifenoles totales y catequinas presentes en el mosto de uva, *Vitis vinifera*, así como, establecer la mejor combinación de tiempo-temperatura para el tratamiento térmico en el mosto, para garantizar la reducción de la oxidación de los vinos producidos, analizando su estabilidad a durante diferentes periodos de almacenamiento.

## Materiales y métodos

### Preparación del mosto

El mosto se preparó a partir de uvas de la variedad Tempranillo provenientes de la granja los Cruces ubicada en el municipio Mara del estado Zulia, seleccionando las uvas en mejor estado y con la madurez adecuada (20 °brix), para un total de 40 kilos de uvas. El mosto obtenido se maceró 2

effective in correcting and preventing the heterolactic fermentation and to control the development of the bacteria of the lactic acid to extend the life of wines (Lasanta *et al.*, 2010). Other techniques such as micro-oxygenation before the malolactic fermentation have given good results in the phenolic composition of red wines (Perez-Magariño *et al.*, 2008).

On this sense, it is necessary to evaluate the type and the concentration of components that intervene directly in the capacity of oxygenation and ageing of wines, components which indicate that the final product keeps its quality in the time, known as polyphenols. The aim of this research was to evaluate the content of total polyphenols and catechins present in grape must, *Vitis vinifera*, as well as to establish the best combination of time-temperature for the thermal treatment in must, to guarantee the oxidation reduction of wines produced, analyzing their stability during different storing periods.

## Materials and methods

### Preparation of the must

The must was prepared with grapes of the variety Tempranillo coming from the farm Los Cruces, located in Mara county, Zulia state, selecting grapes in the best conditions and with the adequate ripeness (20 °brix), for a total of 40 kg of grapes. The must obtained was macerated for 2 days with the skin (Gonzalez-Neves *et al.*, 2003), later, the thermal treatment was done and 2L of must samples were taken from 1L of each.

días junto con el hollejo (Gonzalez-Neves *et al.*, 2003) y luego se realizó el tratamiento térmico; luego se tomaron 2L muestras de mosto, de 1 L cada una. Posterior a los tratamientos térmicos se maceró el mosto tratado térmicamente durante 2 días más.

**Preparación del “pie de cuba”:** Se emplearon 2,5 litros de mosto sin tratar térmicamente, a los cuales se les midió previamente los °Brix. El mosto fue calentado con agitación hasta una temperatura de 40°C, y se le agregó 0,3 g.L<sup>-1</sup> de levadura *S. cerevisiae*. La preparación se tapó y se dejó reposar durante 24 horas a temperatura ambiente (25°C) para la activación de la levadura.

#### **Tratamientos térmicos aplicados al mosto y proceso de fermentación para elaboración de vino tinto**

A cada botella previamente esterilizada e identificada se le agregó 1 litro de mosto, tanto para el blanco (botella control) como para las muestras a las que se le aplicaron los tratamientos en un baño térmico (45°C por 2 min, 45°C por 5 min, 55°C por 2 min, 55°C por 5 min, 65°C por 2 min, 65°C por 5 min). Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado, utilizando en total 21 botellas. Luego de realizados los tratamientos térmicos se maceraron las muestras por dos días más y se realizó la fermentación, la cual duró 8 días. Se agregaron 90 mL de pie de cuba a cada una de las botellas con el mosto. Durante el proceso de fermentación para corroborar la transformación de azúcares en alcohol y asegurar la obtención del vino, se midieron los °Brix, con un refractómetro Bausch and Lomb.

After the thermal treatments, the must treated thermally for 2 days was macerated.

**Preparation of the pre-ferment agent:** 2.5 liters of must without any thermal treatment were employed, to which were measured the °Brix. The must was heated with agitation until reaching a temperature of 40°C, and 0.3 g.L<sup>-1</sup> of yeast *S. cerevisiae* was added. The preparation was covered and set aside for 24 hours at an environment temperature (25°C) for activating the yeast.

#### **Thermal treatments applied to the must and fermentation process for elaborating the red wine**

1 L of must was added to each bottle, which were previously sterilized and identified, for both the blank (control bottle) and the samples to which were applied the treatments in a thermal bath (45°C for 2 min, 45°C for 5 min, 55°C for 2 min, 55°C for 5 min, 65°C for 2 min, 65°C for 5 min). All the treatments were done by triplicate, using a total of 21 bottles. After carried the thermal treatments, the samples macerated for two more days and the fermentation were done, which lasted 8 days. 90 ml of the pre-fermented agent were added to each of the bottles with the must. During the fermentation process, and in order to corroborate the transformation of sugar in alcohol and to affirm the obtaining of wine, were measured the °Brix, with a refractometer Bausch and Lomb.

**Characterization of musts and wines:** the following parameters were determined in the samples of musts and wine: pH, total acidity,

**Caracterización de mostos y vinos:** A las muestras de mosto y vino se les determinaron los siguientes parámetros: pH, acidez total, grado alcohólico, °Brix, catequinas y polifenoles totales.

Para la determinación del pH se siguió el método establecido por la norma COVENIN: 1315-79 (Covenin, 1979). La determinación de la acidez total se realizó siguiendo la norma COVENIN: 3286:1997 (Covenin, 1997). El grado alcohólico se determinó a través de un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem XL, con una columna 0070V-225 de sílice fundida (30 m x 530  $\mu$ m).

El contenido de catequinas se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 500 nm y el contenido de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu a una longitud de onda de 765 nm (Amerine y Ought, 1976). Las curvas de calibración realizadas tanto para el contenido de catequinas como para los polifenoles totales se realizaron una vez culminado el vino, luego a los 20, 40 y 60 días de almacenamiento.

### Diseño del Experimento

Se diseñó el experimento para determinar la mejor combinación de tiempo-temperatura aplicada sobre las botellas con mosto de uva, buscando garantizar la inhibición de la enzima polifenoloxidasas, mejorar la concentración de polifenoles en el vino, con el fin de controlar la oxidación, y obtener un vino con propiedades organolépticas y nutritivas recomendables. Se aplicaron a las botellas con mosto de uva, seis tratamientos térmicos, además de un blanco muestra control al cual no se le aplicó ningún tratamiento (Kuehl, 2001).

alcoholic degree, °Brix, catechins and total polyphenols.

For determining the pH was followed the method established by the COVENIN: 1315-79 norm (Covenin, 1979). The determination of the total acidity was done following the COVENIN: 3286:1997 norm (Covenin, 1997). The alcoholic degree was determined after a gas chromatograph Perkin Elmer Autosystem XL, with a fused silica column 0070V-225 (30 m x 530  $\mu$ m).

The catechins content was determined by spectrophotometry at a wavelength of 500 nm, and the content of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method, at a wavelength of 765 nm (Amerine and Ought, 1976). The calibration curves done for the catechins content and the total polyphenols were made once finished the wine, and 20, 40 and 60 days after the storage.

### Experimental design

An experimental design was carried out to determine the best combination of time-temperature applied on the bottles with grape must, with the purpose of guaranteeing the inhibition of the polyphenoloxidase enzyme in the wine, with the aim of controlling the oxidation and obtaining a wine with organoleptic and nutritive recommendable properties. Six thermal treatments were applied to the bottles with grape must, besides of a blank control sample to which none treatment was applied (Kuehl, 2001).

The experiment was done at random with replicated measures; the bottles with grape must were assigned at random to the treatments in a completely randomized design. A

El experimento fue completamente al azar con medidas repetidas; las botellas de mosto de uva se asignaron al azar a los tratamientos en un diseño totalmente aleatorizado. Un baño térmico ajustable a las temperaturas asignadas para los tratamientos fue el medio que se utilizó para alcanzar la temperatura de cada tratamiento, considerando que la aplicación de temperaturas más elevadas y la obtención de alto contenido de polifenoles fue indicio de una completa inhibición de la enzima polifenoloxidasasa. El contenido de polifenoles fue utilizado como variable de respuesta.

### **Análisis de los datos**

Los resultados obtenidos fueron analizados a través del diseño de mediciones repetidas. Las mediciones repetidas en cada unidad experimental proporcionan información sobre la tendencia en tiempo de la variable respuesta (polifenoles totales) bajo diferentes condiciones de tratamiento (combinaciones de tiempo y temperatura). Las tendencias en el tiempo pueden revelar que tan rápido responden las unidades al tratamiento o en cuanto tiempo se manifiestan los efectos del tratamiento en las unidades de estudio. Con esto también es posible evaluar las diferencias entre las tendencias de los tratamientos (Kuehl, 2001).

Los diseños de mediciones repetidas se pueden escribir en términos del diseño intersujetos y el diseño intrasujetos. Los diseños intersujetos se refieren a los diseños en que una unidad experimental se asigna a un tratamiento. En este específico el diseño tiene siete tratamientos, los cuales se realizaron por triplicado, en un diseño totalmente aleatorizado para el

thermal bath adjusted to the temperatures assigned for all the treatments was the mean used to reach the temperature of each treatment, considering that the application of the highest temperatures and the obtaining of high content of polyphenols indicated a complete inhibition of the polyphenoloxidase enzyme. The polyphenol content was used as a response variable.

### **Analysis of the data**

The results obtained were analyzed using the replicated measurement design. The measures replicated on each experimental unit provided the information about the tendency, in the time, of the response variable (total polyphenols) under different treatment conditions (combinations of time and temperature). The tendencies, in the time, might reveal how fast the units respond to the treatment or in how long time the effects of the treatment, in the units under study, are shown. With this, it is possible to evaluate the differences between the tendencies of the treatments (Kuehl, 2001).

The designs of the replicated measures can be set in terms of the inter-subject design and the intra-subject design. The inter-subjects design refers to the designs where an experimental unit is assigned to a treatment. On this matter, the design has seven treatments, which were done by triplicate in a completely randomized design for the inter-subject design. The intra-subject design refers to the different measures on each experimental unit. On this sense, it consists on the replicated measures of total polyphenols done on each bottle

diseño intersujetos. Los diseños intrasujeto se refieren a las diferentes mediciones en cada unidad experimental. El diseño intrasujetos en este específico consiste en las mediciones repetidas de polifenoles totales realizadas en cada botella para los 0, 20, 40 y 60 días de almacenamiento (Kuehl, 2001).

## Resultados y discusión

El cuadro 1 muestra el consumo de azúcares (°Brix) durante el proceso de vinificación del mosto tratado y no tratado (Blanco) y el grado alcohólico en el vino. El mayor consumo de azúcar y la mayor producción de alcohol se obtuvo con el mosto tratado a 65°C por 2 min.

La concentración final del azúcar en los vinos estuvo entre 7,20 y 8,07 °brix lo que define a estos como vinos semisecos según la norma COVENIN 3285-97 (Covenin, 1997). Además Patz *et al.* (2004), obtuvo valores similares de azúcar que variaron entre 6,5-23,8 g.L<sup>-1</sup> en 327 vinos típi-

at 0, 20, 40 and 60 days of storage (Kuehl, 2001).

## Results and discussion

Table 1 shows the consumption of sugars (°Brix) during the winemaking process of the treated and untreated must (blank), and the alcoholic degree in the wine. The highest consumption of the sugar and the highest production of the alcohol were obtained with the treated must at 65°C for 2 min.

The final concentration of the sugar in the wines was from 7.20 to 8.07 °brix, which defines these as demi-sec wines, according to the COVENIN 3285-97 norm (Covenin, 1997). Also, Patz *et al.*, (2004) obtained similar values of sugar, which varied from 6.5-23.8 g.L<sup>-1</sup> in typical German wines evaluated during the period 1989-2001. The alcoholic degree obtained at the end of the fermentation, averaged in 12°G.L, are accepted by the minimal requirements according to the COVENIN 3042-93 norm, which

### Cuadro 1. Consumo de azúcar por la levadura *S. cerevisiae* durante el proceso de vinificación del mosto.

Table 1. Consumption of sugar by yeast *S. cerevisiae* during the winemaking process of the must.

Tratamientos	%de consumo	°G.L.
Blanco	63,83±4,69	11±0,816
45°C, 2 min	59,04±4,28	11±0,000
45°C, 5 min	61,35±1,23	12±0,816
55°C, 2 min	56,14±1,02	12±0,000
55°C, 5 min	65,23±3,95	12±0,816
65°C, 2 min	66,29±1,06	13±0,816
65°C, 5 min	64,59±1,93	12±0,471

cos alemanes evaluados durante el periodo 1989-2001.

El grado alcohólico obtenido al finalizar la fermentación, valor que en promedio es 12°G.L, son aceptados por los requisitos mínimos según la norma COVENIN 3042-93 que establece que el grado alcohólico de un vino debe tener un rango entre 7°G.L. y 14°G.L (Covenin, 1993). Estos valores también coinciden con los obtenidos por Ortega-Herasa *et al.* (2007), el cual fue 13,27.

Las figuras 1 y 2 muestran el consumo de azúcar por la levadura *S. cerevisiae* durante el proceso de vinificación en el mosto tratado a 2 min y 5min, respectivamente. El consumo del azúcar en los primeros dos días fue rápido, la cual se corresponde con la fase exponencial de crecimiento de la levadura a una velocidad de crecimiento máxima. Esta velocidad de consumo se

establishes that the alcoholic degree of a wine must have a rank from 7°G.L. and 14°G.L (Covenin, 1993). These values also agree to those obtained by Ortega-Herasa *et al.* (2007), which was 13.27.

Figures 1 and 2 show the consumption of sugar by the *S. cerevisiae* yeast, during the winemaking process in the must treated at 2 min and 5 min, respectively. The consumption of sugar in the first two days was very fast, which corresponds to the exponential phase of the yeast growth at a maximum grow velocity. This consumption velocity reduced in the following three days until reaching a stationary phase. The total time of fermentation was of 8 days (Peynau, 1977).

On table 02 are observed the values of acidity and pH at the beginning and

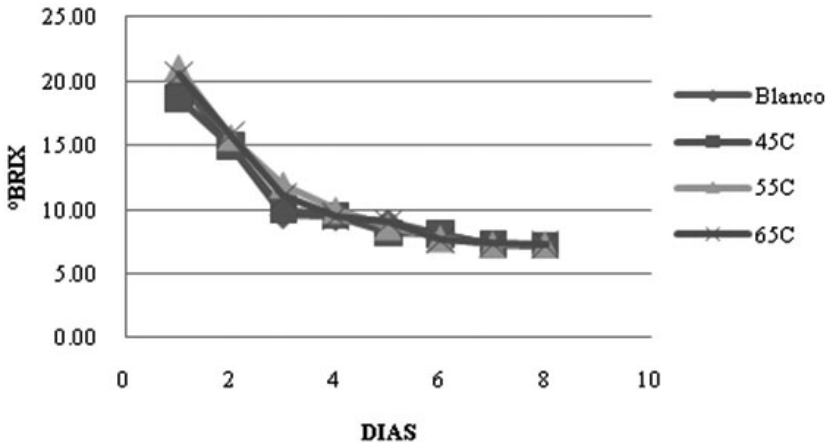
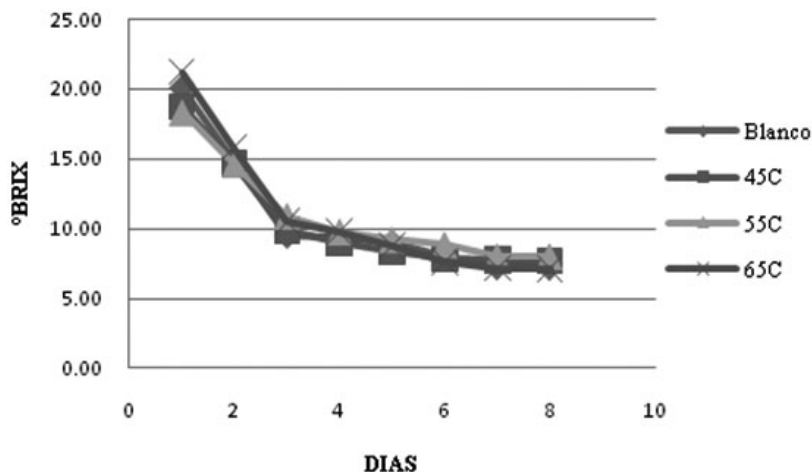


Figura 1. Consumo de sustrato de la levadura *S. cerevisiae* en el proceso de vinificación en mosto tratado térmicamente por 2 min.

Figure 1. Substrate Consumption of *S. cerevisiae* yeast in the winemaking process in must treated thermally for 2 min.





**Figura 2. Consumo de sustrato de la levadura *S. cerevisiae* en el proceso vinificación en mosto con tratamiento térmico por 5 min.**

**Figure 2. Substrate Consumption of *S. cerevisiae* yeast in the winemaking process in must treated thermally for 5 min.**

redujo en los siguientes tres días hasta que finalmente se alcanza una fase estacionaria. El tiempo total de la fermentación fue de 8 días. (Peynaud, 1977).

En el cuadro 2 se observan los valores de acidez y de pH tanto al inicio como al final de la vinificación. La uva es fruta, y por tal, ácida, los ácidos de la uva pasan al vino durante la vinificación se generan otros ácidos, algunos de ellos producidos por la fermentación maloláctica, la cual reduce la acidez del vino, transformando el ácido málico en ácido láctico. Por otra parte, durante este proceso también se forman compuestos volátiles, los cuales enriquecen el vino de calidad aromáticos (Moreno-Arribas *et al.*, 2008).

En las figuras 3 y 4 se observa que los valores de la acidez durante la vinificación se mantuvieron constan-

at the end of the winemaking process. The grape is a fruit, therefore it is acid, the acids of the wine go through the wine, and during the winemaking generate other acids, and some of them are produced by the malolactic fermentation, which reduces the acidity of the wine, transforming the malic acid into lactic acid. On the other hand, during this process are also transformed volatile compounds, which enrich the aromatic quality wine (Moreno-Arribas *et al.*, 2008).

On figures 3 and 4 are observed that the acidity values, during the winemaking, kept constant during all the process, with an average of 4.65 g of tartaric acid.L<sup>-1</sup>, value that is on the rank allowed for wines in the COVENIN 3286-97 norm, which establishes a minimum of 4 g of tartaric acid.L<sup>-1</sup>. (Covenin, 1997).

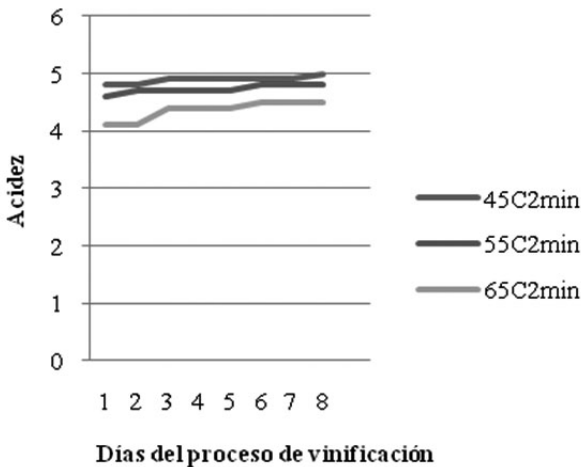
**Cuadro 2. Valores de acidez (g de ácido tartárico) y pH, durante el proceso de vinificación para el mosto tratado y sin tratar.**

**Table 2. Acidity values (g of tartaric acid) and pH, during the winemaking process for treated and untreated must.**

Tratamientos	Día 1		Día 8	
	pH	Acidez	pH	Acidez
Blanco	3,25±0,014	4,5±0,047	3,31±0,005	4,7±0,000
45°C, 2 min	3,17±0,005	4,8±0,047	3,34±0,008	5±0,082
45°C, 5 min	3,19±0,000	4,8±0,125	3,33±0,012	4,7±0,082
55°C, 2 min	3,16±0,008	4,6±0,000	3,29±0,005	4,6±0,000
55°C, 5 min	3,15±0,000	4,5±0,000	3,33±0,012	4,6±0,082
65°C, 2 min	3,15±0,012	4,1±0,125	3,38±0,005	5,0±0,047
65°C, 5 min	3,19±0,012	4,4±0,082	3,37±0,000	4,6±0,047

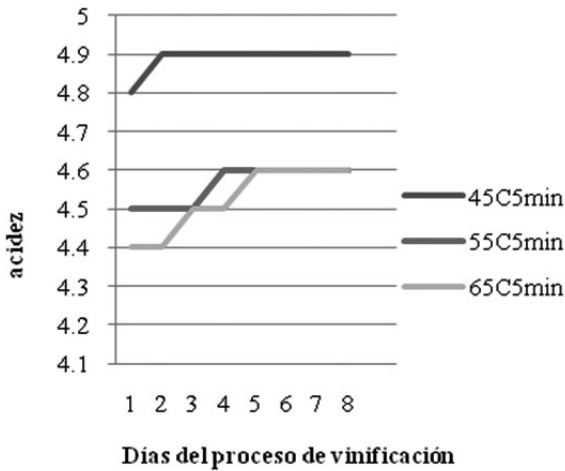
tes durante todo el proceso con un promedio de 4,65 g de ácido tartárico.L<sup>-1</sup> valor que se encuentra dentro del rango permitido para vinos en la norma COVENIN 3286-97, el cual establece un

The grape, when ripens, accumulates sugar that transforms, using yeasts, into alcohol; and at the same time it losses acidity. On this matter, it is understandable that



**Figura 3. Variación de acidez en el proceso de vinificación en mosto tratado térmicamente por 2 min.**

**Figure 3. Acidity variation in the winemaking process in must treated thermally for 2 min.**



**Figura 4. Variación de acidez en el proceso de vinificación en mosto tratado térmicamente por 5 min.**

**Figure 4. Acidity variation in the winemaking process in must treated thermally for 5 min.**

mínimo de 4 g de ácido tartárico.L<sup>-1</sup>. (Covenin, 1997).

La uva, al madurar, acumula azúcar que se transforma, mediante levaduras, en alcohol; y a la vez que madura pierde acidez. De este modo se entiende que los vinos de más grado alcohólico sean los menos ácidos. Una medida complementaria de la acidez total es el pH porque nos permite medir la fuerza de los ácidos que contienen. Durante la fermentación de los vinos tintos puede ocurrir un ascenso del pH, para vinos tintos el pH se sitúa generalmente entre 3,0 y 3,5 lo cual coincide con el comportamiento obtenido durante el proceso de vinificación, como se observa en las figuras 5 y 6, a 2 min y 5 min, respectivamente. Se observa que los valores de pH se incrementaron en el transcurso de los días.

En el cuadro 3 se muestra el diseño de experimento de mediciones re-

wines, with the highest alcoholic degree, are less acid. A complementary measure of the total acidity is the pH, because allows measuring the acids. During the fermentation of red wines, an increment of the pH may take place, for red wines the pH is generally from 3.0 to 3.5, which agree to the behavior obtained during the winemaking process, as observed in figures 5 and 6, at 2 min and 5 min respectively. It is observed that the pH values increased with the days.

On table 3 is presented the experimental design of replicated measures for the catechins content in red wines with thermal treatments of 45°C, 55°C and 65°C during 2 and 5 min for the 4 analysis done. The statistical analysis showed that there is a highly significant effect of the storing time on the catechins content for a significance level of 1%.

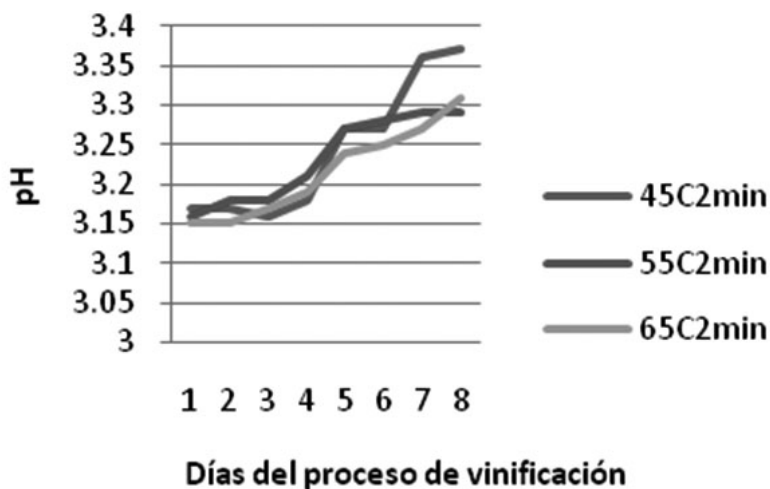


Figura 5. Variación de pH en el proceso de vinificación en mosto tratado térmicamente por 2 min.

Figure 5. pH variation in the winemaking process in must treated thermally for 2 min.

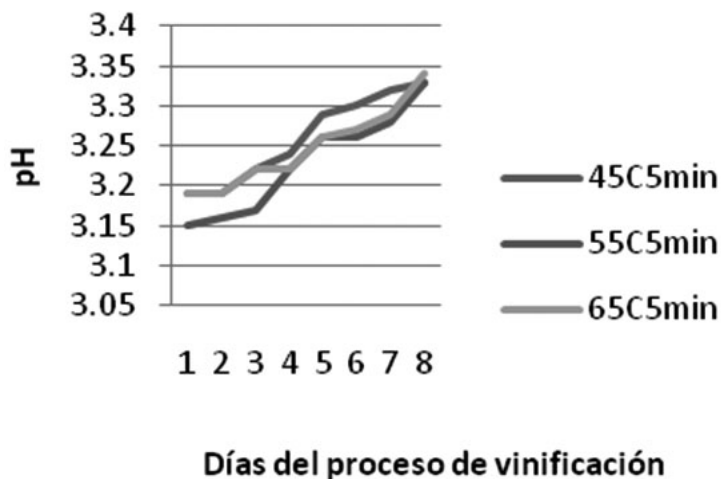


Figura 6. Variación de pH en el proceso de vinificación en mosto tratado térmicamente por 5 min.

Figure 6. Ph variation in the winemaking process in must thermally for 5 min.

petidas para el contenido de catequinas en el vino tinto con tratamientos térmicos de 45°C, 55°C y 65°C durante 2 y 5 min para los 4 análisis realizados. El análisis estadístico muestra que hay un efecto altamente significativo del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de catequinas para un nivel de significancia del 1%.

En la figura 7 se observa que hubo un marcado aumento de la concentración de catequinas en los vinos tintos para todos los tratamientos térmicos aplicados, así como también en el vino control (blanco) al cual no se le realizó ningún tratamiento, esto como consecuencia que el contenido de estos compuestos en vinos, aumentan con el envejecimiento. También se aprecia que las concentraciones de catequinas aumentaron progresivamente durante el tiempo de almacenamiento para todos los tratamientos térmicos aplicados. Se obtuvo al inicio del almacenamiento (0 días) una concentración promedio de catequinas de  $1,21 \pm 0,21$ , que aumentó hasta  $1,99 \pm 1,22$  a los 60 días de almacenamiento; igual comportamiento se observó en vinos blancos tratados térmicamente, al aumentar la concentración de catequinas de  $0,77 \pm 0,06$  hasta  $1,49 \pm 0,07$  a los 3 meses de almacenamiento, tal y como lo reportan Berradre *et al.* (2007).

Valores más altos reporta Kallithraka *et al.* (2006), para veinte vinos evaluados ( $55,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), preparados bajo las mismas prácticas enológicas. En ambos casos se trabajó con vinos jóvenes en los cuales la concentración de catequina no está alterada por el envejecimiento.

La menor concentración de catequinas para todos los análisis se

En figure 7 is observed that there is a marked increment of the concentration of catechins in red wines for the applied thermal treatments, as well as in the control wine (blank), to which none treatment was applied, as a consequence that the content of these compounds in wines increased with ageing. It is also evidenced that the concentrations of catechins increased progressively during the storing time for all the applied thermal treatments.

At the beginning of the storing (0 days) was obtained an average concentration of catechins of  $1.21 \pm 0.21$  that increased until  $1.99 \pm 1.22$  within 60 days of storing; the same behavior was observed in white wines treated thermally, when increasing the concentration of catechins from  $0.77 \pm 0.06$  to  $1.49 \pm 0.07$ , 3 months after storing as reported by Berradre *et al.*, (2007).

Kallithraka *et al.* (2006) report higher values, for twenty wines evaluated ( $55.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), prepared under the same oenological practices. In both cases, was worked with young wines, where the catechin concentration was not altered by ageing.

The lowest concentration for all the analysis was obtained in the thermal treatment of 45°C and 5min. This tendency agrees to the results obtained by Berradre *et al.* (2007), for wines with 3 months of storage, to which were always obtained the lowest concentration of catechins at 45°C in combination with the time of 5 min.

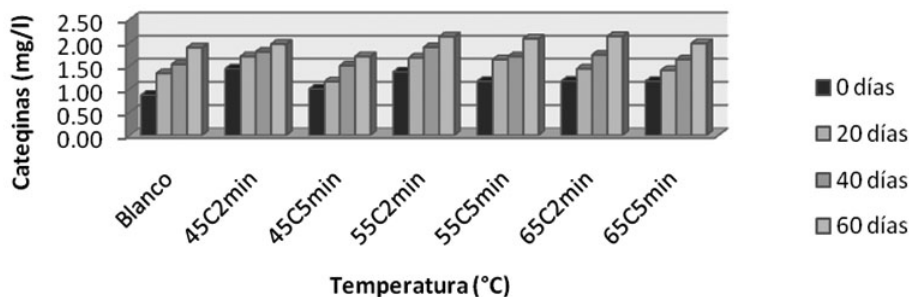
As observed in figure 8, there was an increment of catechins in relation to the blank, however, in the treatment of 45°C and 5 min was

## Cuadro 3. Diseño de mediciones repetidas para la concentración de catequinas en vino tinto.

Table 3. Design of replicated measures for the catechins concentration in red wine.

Tratamiento		Tiempo de almacenamiento (días)				
Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Botella	0	20	40	60
2	45	1	1,4	1,7	1,5	1,80
		2	1,3	1,5	2	2,10
		3	1,6	1,9	1,9	2,00
		Media	1,43±0,12	1,70±0,16	1,80±0,22	1,97±0,12
5	55	1	1,3	1,7	1,8	2,00
		2	1,4	1,9	2	2,08
		3	1,4	1,4	1,9	2,30
		Media	1,37±0,05	1,67±0,21	1,90±0,08	2,13±0,13
5	65	1	1	1,1	1,4	1,90
		2	1,3	1,9	2	2,20
		3	1,2	1,3	1,8	2,30
		Media	1,17±0,12	1,43±0,34	1,73±0,25	2,13±0,17
5	45	1	1	1,2	1,5	1,60
		2	0,7	0,88	1,6	1,60
		3	1,3	1,4	1,4	1,90
		Media	1,00±0,24	1,16±0,21	1,50±0,08	1,70±0,14
5	55	1	0,9	1,7	1,5	1,90
		2	1,3	1,6	1,7	1,90
		3	1,3	1,6	1,9	2,45
		Media	1,17±0,19	1,63±0,05	1,70±0,16	2,08±0,26
5	65	1	1,2	1,5	1,6	2,00
		2	1,3	1,4	1,9	2,05
		3	1	1,3	1,4	1,90
		Media	1,17±0,12	1,40±0,08	1,63±0,21	1,98±0,06

### Concetración de catequinas



**Figura 7. Contenido de catequinas ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en vino tinto obtenido con mosto sometido a tratamiento térmico y sin tratamiento en los diferentes tiempos de almacenamiento.**

**Figure 7. Catechins content ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in wine obtained with must submitted to thermal and un-thermal treatment during the different storing time.**

obtuvo en el tratamiento térmico de  $45^{\circ}\text{C}$  y 5 min. Esta tendencia coincide con los resultados obtenidos por Berradre *et al.* (2007), para vinos con 3 meses de almacenamiento, en los cuales, se obtuvo siempre menor concentración de catequinas a  $45^{\circ}\text{C}$  en combinación con el tiempo de 5min.

Como se observa en la figura 8 hubo un aumento de catequinas en relación al blanco, sin embargo, en el tratamiento de  $45^{\circ}\text{C}$  y 5 min se obtuvo la menor concentración ( $1,0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), este resultado coincide con lo reportado por Burns *et al.* (2001), los cuales indican que el incremento de temperaturas en el mosto produce una liberación de los fenoles desde las uvas hacia el vino.

Sin embargo, en este estudio, las concentraciones de polifenoles y catequinas no solo fue afectada por la temperatura aplicada, sino también por la maceración realizada al inicio de la vinificación. Este tiempo de contacto entre hollejos y semillas, permi-

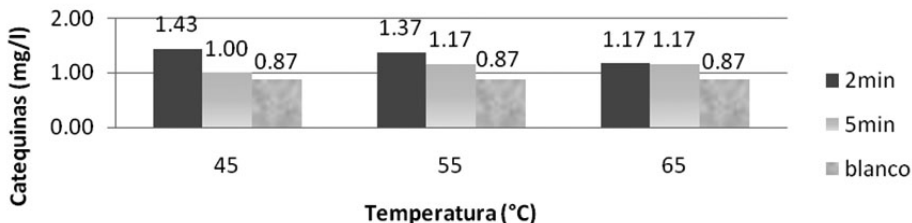
obtuvo the lowest concentration ( $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), this result agrees to the reported by Burn *et al.* (2001), which indicate that the increment of the temperatures in the must produce a release of phenols from the grapes to the wine.

However, on this research, the concentrations of polyphenols and chatechins were not only affected by the temperature applied, but also by the maceration done at the beginning of the winemaking. This time of contact between the skin and seeds allowed an increment in the quantity of polyphenols (Gonzalez-Neves *et al.*, 2003).

In table 04 are observed the replicated measures for the content of total polyphenols in red wines, treated at temperatures of  $45^{\circ}\text{C}$ ,  $55^{\circ}\text{C}$  and  $65^{\circ}\text{C}$  for 2 and 5 min in 0 days, 20 days, 40 days and 60 days.

The statistical analysis showed a highly significant effect in the storing time of red wines on the content of to-

**Concentración de catequinas. 1er. análisis**



**Figura 8. Contenido de catequinas (mg.L<sup>-1</sup>) en vino tinto obtenido con mosto tratado térmicamente a los 0 días de almacenamiento.**

**Figure 8. Catechins content (mg.L<sup>-1</sup>) in wine obtained with must thermally treated within 0 days of storage.**

tió un aumento en la cantidad de polifenoles. (Gonzalez-Neves *et al.*, 2003).

En el cuadro 4 se observa el diseño de mediciones repetidas para el contenido de polifenoles totales en los vinos tintos tratados a temperaturas de 45°C, 55°C y 65°C durante 2 y 5 min para 0 días, 20 días, 40 días y 60 días.

El análisis estadístico mostró un efecto altamente significativo en el tiempo de almacenamiento de los vinos tintos sobre el contenido de polifenoles totales. Resultados similares reportaron Recamalesa *et al.* (2007), los cuales indicaron que el tiempo de almacenamiento tiene un efecto significativo ( $P < 0.001$ ) en los parámetros de color, la mayoría de los fenoles estudiados y el contenido de fenoles totales.

También se aprecia que hubo una interacción altamente significativa entre el tiempo de almacenamiento y la temperatura. Para el tiempo de almacenamiento y el tiempo de tratamiento térmico también se obtuvo una interacción significativa.

En la figura 9, se observa una alta concentración de polifenoles en el

tal polyphenols. Similar results were reported by Recamalesa *et al.*, (2007), who indicated that the storing time has a significant effect ( $P < 0.001$ ) in the color parameters, most of the studied phenols and on the content of total phenols.

It can be also observed that there was a highly significant interaction between the time of storage and the temperature. Significant interaction was also obtained for the storage time and the thermal treatment.

In figure 9, is observed a high concentration of polyphenols in the treatment of 65°C and 5min (217.47mg.L<sup>-1</sup>) at 0 days, value a lot higher than the control wine (113.93mg.L<sup>-1</sup>), different to the result obtained in day 20, where the concentration of polyphenols reduced (178.77mg.L<sup>-1</sup>) in relation to the blank (212.73mg.L<sup>-1</sup>). The same behavior was observed on day 40 (162.10mg.L<sup>-1</sup>) and 60 (129.60mg.L<sup>-1</sup>), where the lowest concentration of polyphenols was obtained. Besides the polyphenols, at high temperatures reduce the volatile compounds of the wine (D'Auria *et al.*, 2009).



**Cuadro 4. Diseño de mediciones repetidas para el contenido de polifenoles totales en vino tinto (mg.L<sup>-1</sup>).**  
**Table 4. Design of replicated measures for the content of total polyphenols in red wine (mg.L<sup>-1</sup>).**

Tratamiento		Tiempo de almacenamiento (días)				
Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Botella	0	20	40	60
2	45	1	94,4	176,90	171,70	171,10
		2	142	189,90	197,70	173,40
		3	123,4	247,40	199,40	174,60
		Media	119,93±19,5	204,73±30,6	189,60±12,68	173,03±1,45
5	55	1	106,6	203,40	222,10	187,20
		2	148,1	269,20	184,80	177,20
		3	142,7	267,80	175,80	197,20
		Media	132,47±18,4	246,80±30,6	194,23±20,04	187,20±8,16
2	65	1	157	188,60	161,90	141,30
		2	142,8	200,02	164,60	146,50
		3	135,6	146,80	159,30	176,00
		Media	145,13	178,47	161,93	154,60
5	45	1	102,6	191,30	151,60	133,70
		2	100,3	171,10	170,40	153,90
		3	98,5	181,40	134,10	136,80
		Media	100,47±1,6	181,27±8,2	152,03±14,82	141,47±8,88
2	55	1	122,7	209,10	216,20	181,20
		2	166,1	192,20	192,60	191,60
		3	145,2	191,10	190,8	174,60
		Media	144,67±17,7	197,47±8,24	199,87±11,57	182,47±7,00
5	65	1	213,7	182,30	151,20	131,70
		2	217,8	179,00	175,00	121,30
		3	220,9	175,00	160,10	135,80
		Media	217,47±2,95	178,77±2,98	162,10±9,82	129,60±24,3

tratamiento de 65°C y 5min (217,47 mg.L<sup>-1</sup>) a 0 días, valor mucho más alto que el del vino control (113,93 mg.L<sup>-1</sup>), a diferencia del resultado obtenido el día 20, en el cual la concentración de polifenoles disminuyó (178,77 mg.L<sup>-1</sup>) con relación al blanco (212,73 mg.L<sup>-1</sup>). El mismo comportamiento se observó el día 40 (162,10 mg.L<sup>-1</sup>) y el día 60 (129,60 mg.L<sup>-1</sup>), en el cual se obtuvo la menor concentración de polifenoles. Además de los polifenoles, a altas temperaturas se reducen compuestos volátiles del vino (D'Auria *et al.*, 2009).

Spigno *et al.* (2007) estudiaron como optimizar la extracción de compuestos fenólicos del orujo de uva, y al igual que en la presente investigación se obtuvo mayor concentración de polifenoles a temperaturas de 60°C.

Spigno *et al.* (2007) studied how to optimize the extraction of phenolic compounds from grape marc, and obtained the highest concentration of polyphenols at temperatures of 60°C, as happened in the current research.

Compare to the research carried out by Patz *et al.*, (2004), the polyphenols values are the highest (a mean of 570 mg·L<sup>-1</sup>), this variation in the concentration of polyphenols is due to different reasons, mainly the variety and quality of the grape, the harvest, the winemaking process (Burns *et al.*, 2001), the oenological treatments, such as the addition of yeasts, enzymes of tannins, and/or maceration temperature (Pérez-Lamela *et al.*, 2007).

One of the reasons is that age wines have high concentrations of polyphenols compared to young wines,

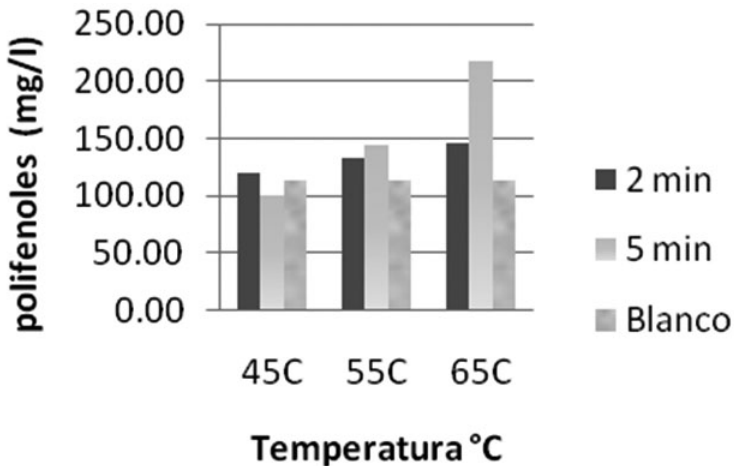


Figura 9. Contenido de polifenoles (mg.L<sup>-1</sup>) en vino tinto obtenido con mosto tratado térmicamente a los 0 días de almacenamiento.

Figure 9. Polyphenols content (mg.L<sup>-1</sup>) in wine obtained with thermally treated must within 0 days of storage.

En comparación con el trabajo de Patz *et al.*, (2004), los valores de polifenoles son más altos (una media de 570 mg.L<sup>-1</sup>), esta variación en la concentración de polifenoles se debe a diferentes razones, principalmente a la variedad y calidad de la uva, la cosecha, el proceso de vinificación (Burns, y *et al.*, 2001), los tratamientos enológicos como la adición de levaduras, enzimas o taninos, y/o temperatura de maceración (Pérez-Lamela *et al.*, 2007).

Una de las razones es que los vinos maduros poseen altas concentraciones de polifenoles en comparación con vinos jóvenes debido no solo a la formación de compuestos polímeros sino también por la oxidación, hidrólisis y otras transformaciones que pueden ocurrir durante el envejecimiento (Arnous *et al.*, 2001). Otro comportamiento similar se observó en el trabajo de López y *et al.*, (2001), para un grupo de vinos tintos comerciales, de una región de España, y los resultados del análisis de 5 muestras arrojaron una media de 2004 mg.L<sup>-1</sup>.

Youngmok *et al.*, (2009), analizaron el efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre la capacidad antioxidante y la concentración de polifenoles en Mango (*Mangifera indica* L.), indican en sus resultados que la inmersión en agua caliente no afectó los polifenoles de manera significativa, sin embargo, los fenoles solubles totales y capacidad antioxidante se vieron reducidos, la diferencia además de las propiedades de la fruta del mango en comparación con la uva, es el tiempo de tratamiento térmico que fue mucho mayor (110-120min), en comparación a las condiciones que emplea-

not only because of the formation of polymers compounds, but also by the oxidation, hydrolysis and other transformations that might occur during ageing (Arnous *et al.*, 2001). Other similar behavior was observed in the research carried out by Lopez *et al.* (2001). Another similar behavior was observed in the research done by Lopez *et al.* (2001) for a group of commercial red wine, from a region of Spain, and the results of the analysis showed a mean of 2004 mg.L<sup>-1</sup>.

Youngmok *et al.* (2009) analyzed the effects of different thermal treatments on the antioxidant capacity and on the polyphenols concentration in Mango (*Mangifera indica* L.), and indicated on their results that the immersion in hot water did not significantly affect the polyphenols, however, the total soluble phenols and the antioxidant capacity reduced. The differences, besides the properties of the mango in compared to the grape, lies on the thermal treatment, which was much higher (110-120 min), compared to the conditions applied by the authors (2 and 5 min), and this could have caused chemical modifications in the polyphenols composition.

In Figure 9 are observed that on treatment of 65°C for 5 min, was obtained the highest concentration of polyphenols (217.47 mg · L<sup>-1</sup>), mainly due to an increment of temperatures that favor their extraction to the wine in the maceration (Burns *et al.*, 2001).

In figure 10, are observed that the thermal treatments at 2 min and 5 min, the concentration of polyphenols was over the concentration of the blank, excepting the treatments at 45°C for 5 min (141.47 mg.L<sup>-1</sup>) and

ron los autores (2 y 5 min) y eso probablemente haya provocado modificaciones químicas en la composición de polifenoles.

En la figura 9 se observa que en el tratamiento de 65°C por 5min se obtuvo la más alta concentración de polifenoles (217,47 mg.L<sup>-1</sup>), posiblemente debido a que un incremento de temperaturas favorece su extracción hacia el vino en la maceración (Burns *et al.*, 2001).

En la figura 10, se observa que para los tratamientos térmicos a 2 min y 5 min la concentración de polifenoles estuvo por encima de la concentración del blanco a excepción de los tratamientos de 45°C por 5 min (141,47 mg.L<sup>-1</sup>) y de 65°C por 5 min (129,60 mg.L<sup>-1</sup>) que estuvieron por debajo de los valo-

65°C for 5min (129.60 mg.L<sup>-1</sup>), therefore, the treatment that controlled more efficiently the oxidation was the treatment of 65°C for 5 min by presenting the lowest polyphenols content.

Additionally, it was observed on this treatment during the winemaking process, a more intense color than the rest of the wines, mainly due to the anthocyanins extracted from the skins of grapes during pressing, maceration and fermentation (García-Falcón *et al.*, 2007). Ducasse *et al.* (2009), evidenced an increment in the intensity of the color in wines, due to a higher stabilization of the pigments, through the formation of derived pigments or copigmentation, caused by the concentration of anthocyanins in the must.

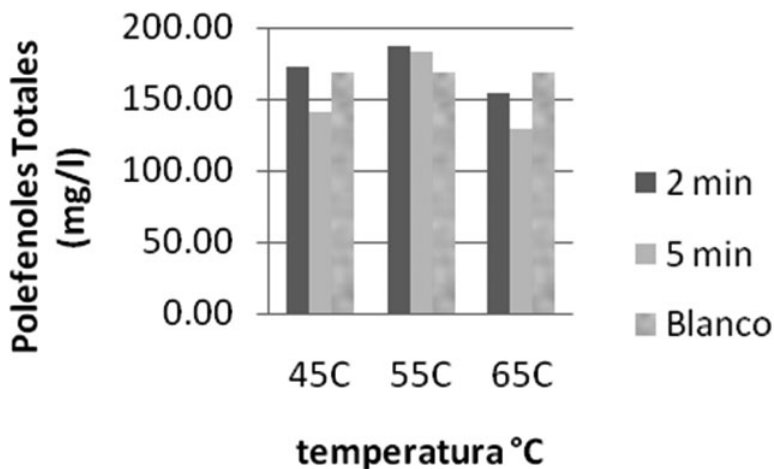


Figura 10. Contenido de polifenoles (mg.L<sup>-1</sup>) en vino tinto obtenido con mosto tratado térmicamente a los 60 días de almacenamiento.

Figure 10. Polyphenols content (mg.L<sup>-1</sup>) in wine obtained with thermally treated must within 60 days of storage.

res del vino control o blanco (169,13 mg.L<sup>-1</sup>), por lo tanto el tratamiento que controló la oxidación de manera más eficiente fue el tratamiento de 65°C por 5 min por presentar el menor contenido de polifenoles.

Adicionalmente, en este tratamiento se observó, durante el proceso de vinificación, un color más intenso que en el resto de los vinos debido principalmente a las antocianinas extraídas de la piel de las uvas durante el prensado, maceración y fermentación (García-Falcón *et al.*, 2007). Ducasse *et al.* (2009), observaron un aumento en la intensidad del color en los vinos debido a una mayor estabilización de los pigmentos, a través de la formación de pigmentos derivados o copigmentación, dado por la concentración de antocianinas en el mosto.

En la figura 11, se presenta el comportamiento de los polifenoles en los diferentes tratamientos térmicos (45, 55, 65°C) a 2 min, durante el envejecimiento del vino (60 días). Se observa que el contenido fue similar en todas las temperaturas, inicialmente se incrementó la concentración de polifenoles y luego disminuyó progresivamente, resultado similar fue reportado por Berradre *et al.* (2007), indicando que el contenido de polifenoles disminuyó luego de 3 meses de almacenamiento. En la figura 12 se observa el mismo comportamiento en todos los tratamientos menos en el de 65°C y 5 min que inicialmente fue el valor más alto de polifenoles pero disminuyó progresivamente durante los 60 días de almacenamiento, siendo la menor concentración de polifenoles.

In figure 11 is presented the behavior of the polyphenols in the different thermal treatments (45, 55, 65°C) at 2 min, during the ageing of the wine (60 days). It is seen that the content was similar in all the temperatures, initially the concentration of polyphenols increased, later, it reduced progressively. A similar result was reported by Berradre *et al.* (2007), indicating that the content of polyphenols reduced after 3 months of storage. In figure 12 is observed the same behavior in all the treatments, except in the treatment of 65°C and 5 min, which was initially the one with the highest value, but reduced progressively during 60 days of storage, thus, being the lowest concentration of polyphenols.

## Conclusions

The best oxidation control of catechins was obtained with the thermal treatment of 45°C for 5 min, meanwhile, the best oxidation control for the total polyphenols was obtained with the thermal treatment of 65°C for 5 min.

A highly significant effect was obtained in the storage time on the content of catechins and total polyphenols, for a significance level of 1%.

There was a highly significant interaction between the concentration of total polyphenols, the storage time and temperature, as well as between the concentration of total polyphenols, the storage time and the time of the thermal treatment.

*End of english version*

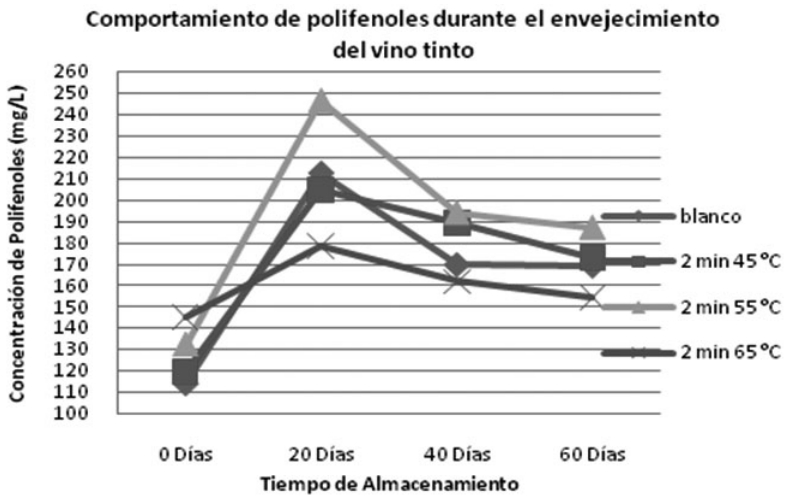


Figura 11. Comportamiento de polifenoles durante el envejecimiento de vino tinto a diferentes tratamientos térmicos por 2 min.

Figure 11. Polyphenols behavior during ageing of red wine at different thermal treatments for 2 min.

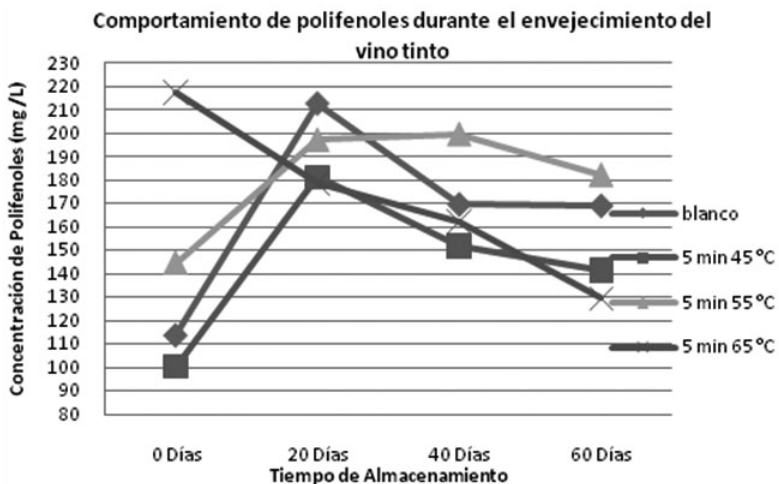


Figura 12. Comportamiento de polifenoles durante el envejecimiento de vino tinto a diferentes tratamientos térmicos por 5 min.

Figure 12. Polyphenols behavior during ageing of red wine at different thermal treatments for 5 min.

## Conclusiones

El mejor control de oxidación de las catequinas se obtuvo con el tratamiento térmico de 45°C por 5 min; mientras que para polifenoles totales el mejor control de la oxidación se logró con el tratamiento térmico de 65°C por 5 min.

Se obtuvo un efecto altamente significativo del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de catequinas y polifenoles totales, para un nivel de significancia del 1%.

Existió una interacción altamente significativa entre la concentración de polifenoles totales, el tiempo de almacenamiento y la temperatura, así como entre la concentración de polifenoles totales, el tiempo de almacenamiento y el tiempo de tratamiento térmico.

## Literatura Citada

- Amerine, M. y C. Ough. 1976. Análisis de vinos y mostos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 159 p.
- Arnous, A., D. Makris, y P. Kefalas. 2001. Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 12, 5736-5742.
- Berradre, M., G. Páez., E. Ramones, Z. Mármol y M. Ferrer. 2007. Control de oxidación de vinos blancos obtenidos bajo condiciones tropicales. *Revista de la Facultad de Agronomía - LUZ Vol. 24, Nro. 1 Enero - Marzo de 2007.*
- Burns, J., P. Gardner, D. Matthews, G. Duthie, M. Lean, y A. Crozier. 2001. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5797-5808.
- Cabanis J., M. Cabanis, V. Cheynier, y P. Teissendré. 2000. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos.* Flanzky (ed.): 218-231, AMV Ediciones y Mundi Pressa. Madrid.
- D'Auria, M., E. Emanuele, y R. Racioppi. 2009. The effect of heat and light on the composition of some volatile compounds in wine. *Food Chemistry* 117 (2009) 9-14.
- Ducasse, M., R. Canal-Llauberes, M. Lumley, P. Williams, J. Souquet, H. Fulcrand, T. Doco, y V. Cheynier. 2010. Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry* 118 (2010) 369-376.
- García-Falcón, M., C. Pérez-Lamela, E. Martínez-Carball, y J. Simal-Gándara. 2007. Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry, Volume 105, Issue 1, 2007, Pages 248-259*
- González-Neves, G., J. Balado, L. Barreiro, R. Bochicchio, G. Gatto, G. Gil, A. Tessore, M. Ferrer. 2003. Efecto de algunas prácticas de manejo del viedo y de la vinificación en la composición fenólica y el color de los vinos tintos. En actas: X Congreso Brasileiro de Viticultura y Enología.
- Kallithraka, S., S. Tsoutsouras, E. Tzourou, y P. Lanaridis. 2006. Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chemistry, Volume 99, Issue 4, Pages 784-793.*
- Kuehl, R. 2001. *Diseño de experimentos.* 2da. Edición. Edit. Thompson.
- Lasanta, C., A. Roldán, I. Caro, L. Pérez, y V. Palacios. 2010. Use of lysozyme for the prevention and treatment of heterolactic fermentation in the biological aging of sherry wines. *Food Control* 21 (2010) 1442-1447.
- López, M., F. Martínez, C. Del Valle, C. Orte, y M. Miró. 2001. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A, Volume 922, Issues 1-2, 13 July 2001, Pages 359-363.*

- Martínez-Ortega, M., M. García-Parrilla, y A. Troncoso. 2001. Changes in phenolic composition of wines submitted to in vitro dissolution tests. *Food Chemistry*. vol. 73. Issue 1, 11-16.
- Moreno-Arribas, M., C. Gómez-Cordovés, P. Martín-Alvarez. 2008. Evolution of red wine anthocyanins during malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees. *Food Chemistry*. Volume 109, Issue 1, 1 July 2008, Pages 149-158.
- Norma COVENIN (1979). Norma Venezolana COVENIN 1315-79. Alimentos. Determinación del pH (acidez iónica).
- Normas COVENIN. (1993). Norma Venezolana COVENIN 3042-93: Bebidas alcohólicas. Determinación del grado de alcohólico. 5 p.
- Normas COVENIN. (1997). Norma Venezolana. COVENIN 3285-97: Vino y sus derivados. Determinación de azúcares totales. 8 p.
- Ortega-Herasa, M., M. González-Sanjosé, y C. González-Huertaa. 2007. Consideration of the influence of aging process, type of wine and oenological classic parameters on the levels of wood volatile compounds present in red wines. *Food Chemistry*. Volume 103, Issue 4, 2007, Pages 1434-1448.
- Patz, C., A. Blicke, R. Ristow, y H. Dietrich. 2004. Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis *Analytica Chimica Acta*. Volume 513, Issue 1, 18 June 2004, Pages 81-89.
- Perez-Lamela, C., M. Garcia-Falcon, J. Simal-Gandara, y I. Orriols-Fernandez. 2007. Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines *Food Chemistry* Volume 101, Issue 2, 2007, Pages 601-606.
- Pérez-Magariño, S., M. Ortega-Heras, E. Cano-Mozo, y M. González-Sanjose. 2008. The influence of oak wood chips, micro-oxygenation treatment, and grape variety on colour, and anthocyanin and phenolic composition of red wines. *Journal of Food Composition and Analysis* 22 (2009) 204–211.
- Peynaud, E. 1977. *Enología Práctica. Conocimiento y Elaboración de Vino*. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. España. 414 p.
- Recamalesa, A., A. Sayagoa, M. González-Miretb y D. Hernanza. 2006. The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Research International*. Volume 39, Issue 2, March 2006, Pages 220-229.
- Spigno, G., L. Tramelli y D. Marco De Faveri. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, Volume 81, Issue 1, July 2007, Pages 200-208.
- Youngmok, K., A. Lounds-Singleton, y S. Talcott. 2009. Antioxidant phytochemical and quality changes associated with hot water immersion treatment of mangoes (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry* 115 (2009) 989–993.