

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO**

MEMORIA DE TÍTULO

**CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN FLAVÁNICA DE VINOS
ARGENTINOS DE LOS CULTIVARES MALBEC Y CABERNET SAUVIGNON
CON DISTINTO PRECIO DE MERCADO**

BASTIÁN MATÍAS BRAVO CUADRA

**SANTIAGO – CHILE
2012**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO**

MEMORIA DE TÍTULO

**CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN FLAVÁNICA DE VINOS
ARGENTINOS DE LOS CULTIVARES MALBEC Y CABERNET SAUVIGNON
CON DISTINTO PRECIO DE MERCADO**

**FLAVANIC FRACTION CHARACTERIZATION OF ARGENTINEAN MALBEC
AND CABERNET SAUVIGNON WINES WITH DIFFERENT PRICE SEGMENTS**

BASTIÁN MATÍAS BRAVO CUADRA

**SANTIAGO – CHILE
2012**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO**

**CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN FLAVÁNICA DE VINOS
ARGENTINOS DE LOS CULTIVARES MALBEC Y CABERNET SAUVIGNON
CON DISTINTO PRECIO DE MERCADO**

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Agrónomo
Mención Enología y Vitivinicultura.

BASTIÁN MATÍAS BRAVO CUADRA

PROFESOR GUÍA

Calificación

Sr. Álvaro Peña Neira.
Ingeniero Agrónomo Enólogo, Dr.

6,8

PROFESORES EVALUADORES

Sr. Elías Obreque Slér.
Ingeniero Agrónomo Enólogo, Dr.

6,5

Sr. Ricardo Marchant Silva
Ingeniero Agrónomo, MSc.

6,0

**SANTIAGO – CHILE
2012**

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que agradezco su colaboración, no solo en la realización de esta memoria de título, sino además, con todo la ayuda, cariño y amistad que me brindaron en estos largos años de universidad, empezando por mis padres, Verónica y Pirincho por su amor incondicional a su único hijo, a mi abuela María que es mi segunda madre, a mis grandes amigos que hice desde el inicio, Eduardo, Manuel, Felipe, Víctor, Ricardo, Cristian, Rafael, Juan Pablo, Camila, Natalia, Viviana, Maribel y sin duda agradecer por la fortuna de encontrar a mi compañera de vida que ha estado siempre a mi lado, María Paz.

Son años que recordaré con cariño, son años en que aprendí muchísimo y logré formarme como persona y como profesional. Doy gracias a los profesores Álvaro, Élias y Eduardo por la vocación y por el apego que tienen por la Enología que logra plasmarse en los estudiantes. Asimismo, agradezco haber estudiado en la mejor universidad del país y la mejor escuela de Agronomía.

Esta investigación fue financiada por los proyectos FONDECYT 1080559 y FONDECYT 1110832. Gratifico además, al Dr. Martín Fanzone del INTA-Mendoza, Argentina y a las bodegas colaboradoras Septima, Nieto Senetiner, Tapiz, Cap Vistalba, Catena Zapata, Mendel, Cobos, Chandon por su colaboración.

ÍNDICE

ABREVIACIONES.....	1
RESUMEN.....	2
Palabras Claves.....	2
ABSTRACT	3
Key Words.....	3
INTRODUCCIÓN	4
Objetivo	7
MATERIALES Y MÉTODO	8
Lugar de estudio	8
Materiales	8
Muestras.....	8
Equipamiento de laboratorio.....	9
Reactivos.....	9
Metodología.....	10
Tratamientos y Diseño Experimental	10
Procedimiento.....	10
Variables a medir	10
Fraccionamiento de taninos.	11
Análisis Estadístico.....	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
Fenoles totales	15
Taninos totales.....	16
Antocianos totales	18
Fraccionamiento de taninos.....	19
Floroglucinólisis	22
CONCLUSIÓN	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26
APÉNDICES.....	32

ABREVIACIONES

°C	: Grados Celsius.
nm	: Nanómetro.
µm	: Micrómetro.
mm	: Milímetro.
ha	: Hectárea.
mL	: Mililitro.
L	: Litro.
mg	: Milígramo.
g	: Gramo.
USD	: United States Dollar.
rpm	: Revoluciones por minuto.
HPLC	: Cromatografía líquida de alta eficacia.
DE	: Desviación Estándar.
Mv3GL	: Malvidina-3-glucósido.
FI	: Monómeros de flavan-3-oles.
FII	: Oligómeros de flavan-3-oles.
FIII	: Polímeros de flavan-3-oles.
EAG	: Equivalente de Ácido gálico.
mDP	: Grado medio de polimerización.
aMW	: Peso molecular promedio.
% G	: Porcentaje de galoilación.
C	: (+)-catequina.
C-F	: (+)-catequina unida a floroglucinol.
EC	: (-)-epicatequina.
EC-F	: (-)-epicatequina unida a floroglucinol.
ECG-F	: (-)-epicatequina-3- <i>O</i> -galato unida a floroglucinol.
EGC-F	: (-)-epigalocatequina unida a floroglucinol.
MBB	: Malbec categoría de precio baja.
MBM	: Malbec categoría de precio media.
MBA	: Malbec categoría de precio alta.
CSB	: Cabernet Sauvignon categoría de precio baja.
CSM	: Cabernet Sauvignon categoría de precio media.
CSA	: Cabernet Sauvignon categoría de precio alta.

RESUMEN

La variedad Malbec es producida principalmente en Mendoza, Argentina y se considera emblemática en la vitivinicultura del país; siendo una cepa tinta rica en taninos, que produce rendimientos moderados y por ende, vinos de gran carácter y con buen potencial de guarda.

Actualmente, solo existe una caracterización de la fracción antociánica y de compuestos de bajo peso molecular en vinos Malbec realizada por Fanzone *et al.* (2010), pero se desconoce información respecto a las fracciones flavánicas responsables de conferir atributos positivos para el vino, los cuales inciden en el precio de mercado. Por el contrario, la variedad Cabernet Sauvignon ha sido ampliamente analizada (Lisoni, 2001; Monagas *et al.*, 2003; Kusch, 2005; Narváez, 2010; Gálvez, 2011) y fue incluida en este estudio de manera complementaria. Por lo tanto, el objetivo de esta memoria es caracterizar la fracción flavánica de vinos argentinos de los cultivares Malbec y Cabernet Sauvignon con distinto precio de mercado.

Se evaluaron 30 vinos representativos de tres categorías de precio “a consumidor”, categoría baja (<7 USD), media (15-20 USD) y alta (>40 USD). A la totalidad de las muestras se les determinaron las fracciones monoméricas (FI), oligoméricas (FII) y poliméricas (FIII) de flavanoles, grado medio de polimerización (mDP), peso molecular promedio (aMW) y porcentaje de galoilación (% G), a través de la técnica analítica de fraccionamiento de taninos y floroglucinólisis por medio de HPLC – DAD. Además, se realizaron análisis espectrofotométricos de fenoles totales, antocianos totales y taninos totales.

En general, los promedios de los parámetros medidos se mostraron siempre más altos mientras aumentaba el precio de los vinos en ambas variedades. Se comprobaron las diferencias significativas entre tratamientos mediante el uso del análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples de Tukey, proporcionando información relevante sobre la composición tánica y la relación con la calidad enológica de los vinos, que se ven representadas por su valor comercial.

Palabras Claves

Compuestos fenólicos
Cartuchos Sep-Pak C₁₈
Fraccionamiento de taninos
Floroglucinólisis
Flavan-3-oles

ABSTRACT

There is only one characterization of the anthocyanin fraction and low molecular weight phenolic compounds in Malbec wines made by Fanzone *et al.* (2010), but there is a lack of knowledge about flavanic fractions, which are the main responsible for a significant positive attributes for wine, parameters related with the final quality of wine, which is expressed in market price. Instead Cabernet Sauvignon has been extensively analyzed (Lisoni, 2001; Monagas *et al.*, 2003; Kusch, 2005; Narváez, 2010, Gálvez, 2011) and has been included in this study in a complementary way. Therefore the objective of this study was to characterize argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines from different price segments.

Thirty wines representative of three retail price segments, low (<7 USD), medium (15-20 USD) and high (>40 USD) were evaluated. Monomeric (FI), oligomeric (FII) and polymeric fractions (FIII) of flavanols, mean degree of polymerization (mDP), average molecular weight (aMW) and galloilation percentage (% G) were measured for all samples using the technique of tannins fractionation and floroglucinolysis by HPLC-DAD, also conducted a complementary spectrophotometric analysis of total phenols, total anthocyanins and total tannins.

In general, the averages of all measured parameters were higher while increasing commercial value of wines in both grape varieties, providing relevant information about tannic composition and its relation with wines final quality which are reflected in their commercial value.

Key Words

Phenolic compounds
C₁₈ Sep-Pak cartridge
Tannin fractionation
Phloroglucinolysis
Flavan-3-ols

INTRODUCCIÓN

Argentina es considerado un país productor de vinos, que posee alrededor de 230.000 ha de viñedos, los cuales representan aproximadamente el 3,0% de la superficie mundial. Mendoza es la principal provincia productora de vinos con un 70-75% de la superficie total del país dedicada solo a la industria vitivinícola (INV, 2009).

En Mendoza la superficie de producción total abarca 161.000 ha, dentro de las cuales un 15% corresponde a Malbec y 8% a Cabernet Sauvignon. El cultivar Malbec (*Vitis vinifera* L.) se considera actualmente la variedad emblemática de la vitivinicultura argentina, siendo una cepa tinta rica en taninos, con rendimientos moderados, que produce vinos de gran carácter y con buen potencial de envejecimiento. Es una variedad de origen francés, que se ha adaptado muy bien a las condiciones edafoclimáticas de la zona de Mendoza, produciendo vinos de un color rojo-violáceo intenso y aromas a frutos rojos, tales como ciruela, cereza y mora (INV, 2009).

En vista de las necesidades y demandas del mercado vitivinícola actual, se hace cada vez más necesario producir vinos de la mayor aptitud posible. La calidad final del vino está determinada en su conjunto por diversos componentes, entre los cuales destacan alcoholes, azúcares, ácidos orgánicos, proteínas, sales minerales y compuestos fenólicos. No obstante, estos últimos son vistos como un parámetro por sobre los otros mencionados al momento de juzgar las características de las uvas, mostos en fermentación y vinos terminados (Zoecklein *et al.*, 2000; Monagas *et al.*, 2005).

Los compuestos fenólicos derivan del metabolismo secundario de los vegetales a partir de la ruta fenilpropanoide (Khanbabaee y Van Ree, 2001; Geny *et al.*, 2003) y son responsables de propiedades de gran relevancia como el color, aroma, amargor y astringencia. Además, debido a sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y anticancerígenas, estos se asocian a muchos efectos beneficiosos que derivan del consumo moderado de vino (Kennedy *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2002; Pérez-Magariño y González-San José, 2004; Matus *et al.*, 2009; Obreque-Slier *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos se caracterizan por presentar un anillo bencénico formado por seis átomos de carbono (C6) unido a uno o varios radicales hidroxilos (-OH). Según su estructura química, estos se dividen en dos grupos: no flavonoides y flavonoides (Gawel, 1998; Valls *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2006; Bordeu y González, 2008; Lückner *et al.*, 2010).

Dentro de los primeros, se encuentran los compuestos formados por solo un anillo bencénico (C6), tales como los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos) y los estilbenos (Monagas *et al.*, 2005). Adicionalmente, los compuestos flavonoides están formados por dos anillos de seis átomos de carbono (C6), anillo A y B, unidos por un heterociclo central de tres átomos de carbono (C3) o anillo C,

lo que en forma esquemática se puede resumir como una estructura C6-C3-C6 (Peña-Neira, 2005). A este grupo pertenecen los flavonoles, pigmentos amarillos ubicados en el hollejo de la baya, principalmente como heterósidos (Obreque-Slier, 2010), son responsables del color de la piel de las uvas blancas y, evidentemente, de una parte del color del vino blanco (Zamora, 2003). Los principales flavonoles son kaempferol, quercetina, mirecítina e isoramnetina (Monagas *et al.*, 2005).

Dentro de los flavonoides también se encuentran las antocianinas, responsables del color de los vinos tintos. Están constituidas por un aglicón (molécula de antocianidina) a la cual se le adiciona una o dos moléculas de glucosa, formando antocianinas monoglucosiladas o diglucosiladas respectivamente. En *Vitis vinifera* L. solo se encuentran monoglucosiladas en el carbono 3 del anillo central B (Obreque-Slier, 2010). Las antocianinas identificadas en las pieles y vinos de *Vitis vinifera* L. corresponden a 3-*O*-monoglucósidos acilados de cinco antocianidinas: cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina, las cuales difieren entre sí por la ubicación y número de grupos hidroxilos y metoxilos localizados en el anillo B de la molécula (Monagas *et al.*, 2005). De igual forma la glucosa se puede encontrar unida al ácido acético (conocidas como antocianinas acetiladas) y otras unidas al ácido ρ -coumárico, conocidas como antocianinas ρ -coumariladas, dando un total de 15 antocianinas (Peña-Neira, 2005). En el género *Vitis*, la antocianina más importante en todos los cultivares es la Mv3GL (Ryan y Revilla, 2003; Blouin y Guimberteau, 2004; Alcalde-Eon *et al.*, 2005; Ríó *et al.*, 2008).

Por último, los flavanoles, compuestos más abundantes en el fruto de la vid, están presentes en el hollejo, semilla y raquis (Kennedy *et al.*, 2001), específicamente en vacuolas tánicas ubicadas en la zona del hollejo y en las capas que recubren a las semillas (Peña-Neira, 2006); su importancia radica en otorgar amargor, astringencia y estabilización de la materia colorante de los vinos (Obreque-Slier, 2010) y se les puede encontrar como monómeros, oligómeros o polímeros (Monagas *et al.*, 2005); FI, FII, FIII respectivamente.

Existen dos grandes grupos de monómeros de flavanol (flavan-3-oles): las procianidinas representadas por (+)-catequina y su diastereoisómero (-)-epicatequina, además las prodelfinidinas (-)-galocatequina y (-)-epigalocatequina (Peña-Neira, 2006). Sin embargo, diversos autores señalan que en la uva son mayoritarias la (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-*O*-galato (Gawel, 1998; Kennedy *et al.*, 2006; Obreque-Slier *et al.*, 2010). No obstante lo anterior, es importante destacar que los monómeros de flavanol representan tan solo una pequeña proporción, ya que en el vino la mayor parte se encuentran polimerizados (Zoecklein *et al.*, 2000; Jackson, 2008; Terrier *et al.*, 2009). La forma oligomérica o polimérica, también se conoce como taninos condensados o proantocianidinas y corresponden a polímeros de diferente número de monómeros de flavanol (subunidades de flavan-3-oles) unidos entre sí, mediante enlaces C4-C8 o C4-C6 (Khanbabaee y Van Ree, 2001; Terrier *et al.*, 2009) y a partir de ellos es posible encontrar una amplia variedad de compuestos de diversos pesos moleculares (Kennedy *et al.*, 2006).

El análisis de los compuestos fenólicos y específicamente de la familia de los taninos condensados ha tomado gran importancia en el campo de la enología y vitivinicultura

debido a su rol en la estabilidad de color, cuerpo, potencial de envejecimiento (González-Manzano *et al.*, 2003). Sin embargo, poseen características sensoriales que pueden resultar negativas cuando son excesivas, como la astringencia y el amargor (Peña-Neira, 2006; Kennedy, 2008).

El grado de polimerización de las moléculas de compuestos fenólicos también influye en su percepción, de esta manera los monómeros se presentan más amargos y menos astringentes que los polímeros (Peleg *et al.*, 1999; Broussaud *et al.*, 2001), mostrando una relación inversa a medida que aumentan de tamaño (grado de polimerización), disminuyendo el amargor pero aumentando su astringencia. Sin embargo, la polimerización posterior conduce a la insolubilidad y por lo tanto a una pérdida de la sensación (Jackson, 2009; Peña-Neira, 2009).

Asimismo, los compuestos base de los taninos pueden estar unidos al ácido gálico, llamados taninos galoilados, mientras mayor sea éste, mayor será el amargor que presenta (Gawel, 1998). Además, a mayor grado de polimerización y menor grado de galoilación (número de moléculas de ácido gálico unido al tanino), el compuesto es menos astringente y amargo (Kennedy *et al.*, 2000; Jordao *et al.*, 2001; Downey *et al.*, 2003).

Dada la diversidad y complejidad de estructuras químicas encontradas y el hecho de que en la matriz del vino estos compuestos se encuentran junto a otro tipo de moléculas que poseen similares grupos funcionales, la cuantificación y caracterización de los taninos condensados es un problema verdaderamente complejo, por lo tanto su análisis representa un verdadero desafío para el ámbito de la investigación científica (Mercurio y Smith, 2008).

Últimamente, se han desarrollado nuevas metodologías que permiten conocer características cualitativas de los taninos, como el grado medio de polimerización de éstos (mDP), el peso molecular promedio (aMW), el porcentaje de galoilación (% G) (Kennedy *et al.*, 2001) y las concentraciones de las fracciones monoméricas (FI), oligoméricas (FII) y poliméricas (FIII) (Sun *et al.*, 1998a).

A la fecha solo existe una caracterización de las fracciones antociánicas y de compuestos fenólicos de bajo peso molecular de vinos Malbec de diferentes zonas de Mendoza (Fanzone *et al.*, 2010), pero no existe información respecto a las fracciones de flavan-3-oles de vinos argentinos Malbec y Cabernet Sauvignon de distintos precios de mercado.

En esta investigación se analizaron vinos del cepaje Malbec, utilizando además de manera complementaria muestras de la variedad Cabernet Sauvignon, cuyos vinos han sido ampliamente estudiados (Lisoni, 2001; Monagas *et al.*, 2003; Kusch, 2005; Narváez, 2010; Gálvez, 2011).

En consideración a estos antecedentes se hace indispensable caracterizar la fracción flavánica, responsables de conferir atributos positivos para el vino, parámetros que están relacionados con su calidad enológica, que en la mayoría de los casos se ve expresado en el

precio de mercado. Consecuentemente, este estudio tiene como finalidad relacionar el precio del vino con la calidad flavánica del mismo.

Por las razones expuestas con anterioridad, se ha propuesto el siguiente trabajo de investigación.

Objetivo

Caracterizar la fracción flavánica de vinos argentinos de los cultivares Malbec y Cabernet Sauvignon con distinto precio de mercado.

MATERIALES Y MÉTODO

Lugar de estudio

El trabajo experimental y las determinaciones analíticas se realizaron en el Laboratorio de Química Enológica y de Cromatografía del Departamento de Agroindustria y Enología, de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en la Comuna de La Pintana, ciudad de Santiago, Región Metropolitana, Chile.

Materiales

Muestras

Se analizaron vinos argentinos de las variedades Malbec y Cabernet Sauvignon provenientes de bodegas colaboradoras que producen vinos monovarietales, garantizando de esta manera su pureza (100% monovarietales). En el Apéndice 1 se muestra el listado de vinos según variedad, categoría de precio, año y bodega.

El número total de muestras fue de 30 botellas (750 mL), correspondientes a distintas categorías de precio, para las dos variedades mencionadas. Las categorías de precio a utilizar fueron: categoría baja (<7 USD), media (>15 USD y <20 USD) y alta (>40 USD), USD observado en Enero del 2011.

Las muestras de vinos para el estudio se obtuvieron por parte del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Mendoza, Argentina, donde fueron embotelladas en condiciones controladas y almacenadas en oscuridad a temperaturas entre 12 y 15 °C, abriéndose cada botella solo previo al análisis. Debido al tiempo requerido para completar toda la metodología analítica (alrededor de dos meses), las muestras de vino fueron envasadas en botellas color ámbar e inertizadas con N₂ para evitar posibles oxidaciones y así asegurar su correcta preservación.

Equipamiento de laboratorio

Para realizar los análisis experimentales del presente trabajo se emplearon: Cartuchos Waters modelo Sep-Pak Environmental tC18 37-55 μm y Sep-Pak Plus tC18 37-55 μm ; una bomba de vacío marca Boeco modelo R-300; un baño ultrasónico de 2,8 L marca Branson modelo 2510; un agitador Vortex Mixer marca Boeco modelo V1 Plus; un espectrofotómetro UV/VIS de doble haz marca Jasco modelo V-530; una balanza marca Denver Instrument modelo XL-3100; un rotavapor marca Buchi modelo R-210, provisto de una bomba de vacío modelo V700 y de un baño maría modelo B-491; una centrífuga marca Hareaus modelo Labouge 400; un pH-metro marca Hanna modelo pH-21; un desionizador de agua Millipore; un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC) marca Agilent Technologies 1200 Series, este equipo estaba constituido por un inyector automático modelo L-7200, un detector de arreglo de fotodiodos alineados modelo L-7455. Para los análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular se utilizó una columna Waters Nova-Pak C₁₈ (4 μm , 3,9 mm de diámetro interno por 300 mm de largo). Asimismo para los estudios de Floroglucinol por HPLC-DAD, se empleó una columna LiChro Cart 100 RP-18 (4 mm de diámetro interno por 250 mm de largo). Además equipo básico de laboratorio como matraces corazón, kitazato, Erlenmeyer y aforados; tubos de ensayo, gradillas, columna de vidrio con base porosa de vidrio y válvula, algodón, limadura de vidrio, probetas, vasos precipitados, baquetas, soportes, trípodes; embudo de decantación, mangueras, refrigerantes, pipetas, pisetas, probetas, micropipetas, puntas de micropipeta, tubos eppendorf, viales, jeringas de filtración, filtros de 0,22 μm y 0,45 μm y sistema de arrastre con N₂.

Reactivos

Como reactivos para los análisis espectrofotométricos y cromatográficos se empleó: Agua destilada, metanol puro, tampón fosfato (Buffer pH 7), acetato de etilo, éter dietílico, vainillina, ácido sulfúrico, agua bi-destilada, etanol, ácido trifluoroacético, acetona, fractogel (Toyopearl HW-40F), floroglucinol, ácido ascórbico, ácido clorhídrico fumante 37%, metabisulfito al 15% (p/v) y acetato de sodio.

Metodología

Tratamientos y Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado que consideró 2 ensayos independientes entre sí, uno para cada variedad, con 3 tratamientos por ensayo correspondiente a las categorías de precio baja, media y alta, que consta con 5 repeticiones por tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variedad empleada, categoría de precio y el número de repeticiones.

	VARIEDAD	TRATAMIENTOS	CATEGORÍA	Nº DE REPETICIONES
Ensayo 1 (n=15)	Malbec	MBB	Baja	5
		MBM	Media	5
		MBA	Alta	5
Ensayo 2 (n=15)	Cabernet Sauvignon	CSB	Baja	5
		CSM	Media	5
		CSA	Alta	5

Procedimiento

La totalidad de las muestras, equivalentes a 30 botellas de vino (750 mL), fueron conservadas en oscuridad a temperaturas entre 12 y 15°C y filtradas con una membrana de 0,22 µm en el momento previo al análisis.

VARIABLES A MEDIR

Al conjunto de las muestras se le realizaron las siguientes determinaciones analíticas, (en el Apéndice II se detalla la metodología empleada).

Fenoles totales. Mediante espectrofotometría, expresado en mg EAG/L (Bordeu y Scarpa, 1998).

Antocianos totales. Mediante decoloración con bisulfito sódico, expresado en mg equivalentes de Mv3GL/L (García-Barceló, 1990).

Taninos totales. Mediante la reacción de Bate-Smith, que consistió en la transformación de los taninos en antocianidinas por calentamiento en un medio ácido (Bate-Smith, 1981; Zoecklein *et al.*, 2000), expresados en g/L de (+)-catequina.

Floroglucinólisis. Se determinó el grado medio de polimerización de los taninos mediante una catálisis ácida en presencia de floroglucinol (Figura 1), (Kennedy y Jones, 2001).

Fraccionamiento de taninos. Se determinó mediante la separación de las procianidinas a través del uso de cartuchos Sep-Pak C₁₈, en monómeros, oligómeros y polímeros (Figura 2). El contenido de cada fracción fue determinado por reacción con vainillina (Figura 3) (Monagas *et al.*, 2003), posterior análisis espectrofotométrico a 500 nm y expresado en mg (+)-catequina/L (Sun *et al.*, 1998a).

Análisis Estadístico

La unidad muestral para el análisis estadístico corresponde a una botella de 750 mL. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante Análisis de Varianza (ANDEVA) con 95% de confianza, con el objetivo de determinar diferencias entre los tratamientos descritos para cada variedad estudiada. Un valor $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

En caso de observar diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó el Test de Tukey. Para ejecutar los análisis se utilizó el software estadístico Minitab®16. Las figuras y gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.

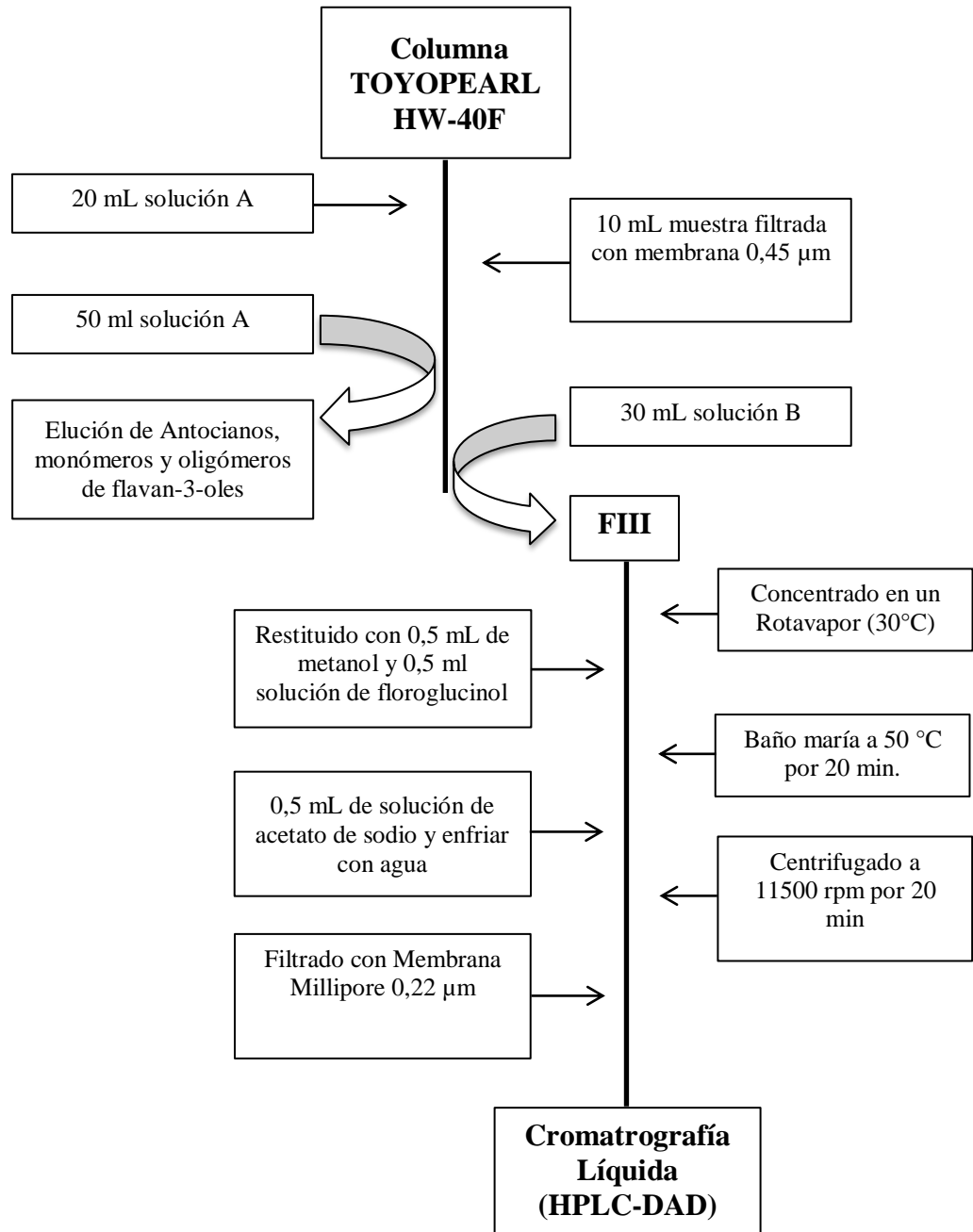


Figura 1. Esquema análisis, catálisis ácida en presencia de floroglucinol.

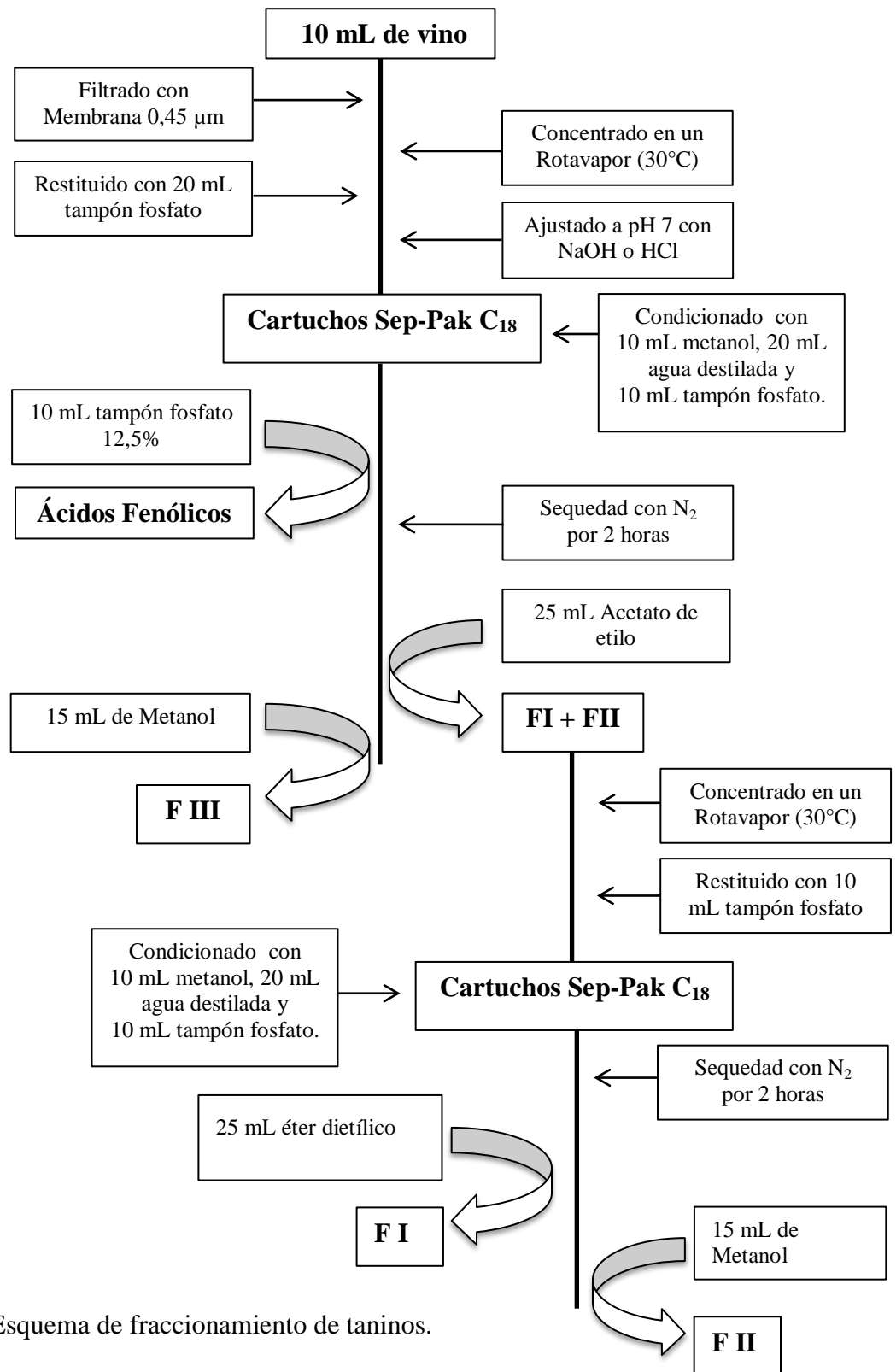


Figura 2. Esquema de fraccionamiento de taninos.

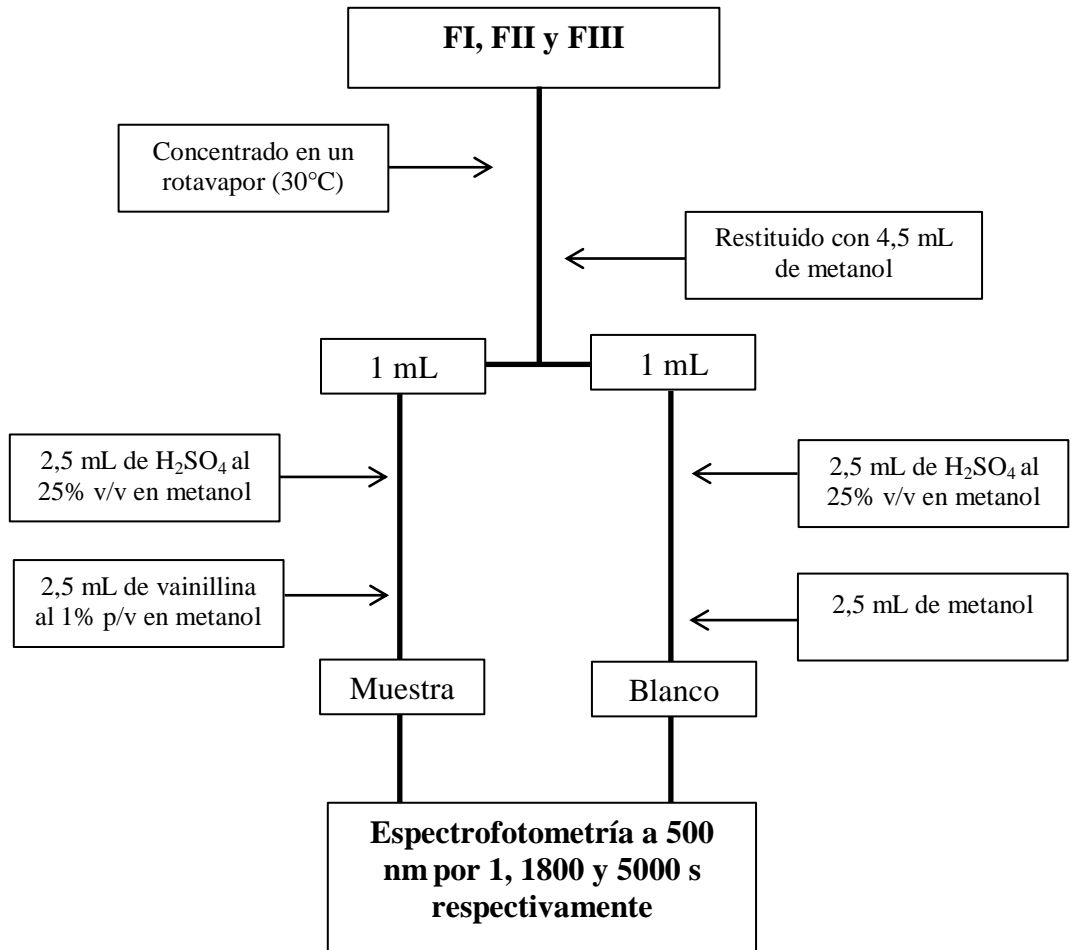


Figura 3. Esquema ensayo de la vainillina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenoles totales

El análisis de fenoles totales indica la concentración de compuestos fenólicos, sin detallar sobre las familias específicas presentes (Zamora, 2003). Según el mismo autor, los compuestos fenólicos totales en vinos tintos poseen una concentración porcentual promedio de ácidos fenólicos (9,4 %); flavonoles (6,4%); taninos hidrolizables (5,5%); flavanoles (65,0%) y antocianos (13,7%). Todos los compuestos fenólicos poseen de cierto modo, propiedades organolépticas definidas (Monagas *et al.*, 2005), pero desde la perspectiva sensorial son los flavanoles y los antocianos son los que tienen mayor relevancia en el vino tinto y por ende determinan fuertemente sus características positivas (Gawel, 1998).

Como se observa en la Figura 4, es posible destacar diferencias entre las categorías de precio; en promedio los vinos de la categoría de precio alta mostraron mayores concentraciones de fenoles totales, mientras que el menor contenido se observó siempre en la categoría baja para ambas variedades. Los resultados se sitúan entre 2667,5 a 3905,0 mg/L y 2765,3 a 3944,3 mg/L de ácido gálico en Malbec y Cabernet Sauvignon respectivamente (Cuadro 2, Apéndice III). Estos resultados son similares a los publicados por otros autores en vinos de las mismas variedades (Fanzone *et al.*, 2010; Ginjom *et al.*, 2010).

Los resultados del análisis de varianza concluyó que existen diferencias significativas entre las categorías de precio, para ambas variedades, donde existe una influencia positiva de estos compuestos con respecto al valor comercial, que muestra un contenido significativamente mayor en la categoría alta y media con respecto a la categoría baja (Figura 4).

Estos resultados tienen una explicación asumiendo que los vinos pertenecientes a la categoría de precio alta y media provienen de uvas cosechadas en madurez fenólica, de viñedos de menor rendimiento y que fueron elaborados bajo procesos de vinificación donde el tiempo de contacto de las partes sólidas con el mosto o vino y la temperatura son los factores más importantes durante el proceso, otorgando características que definen a este tipo de vinos en función de su calidad enológica, como son estabilización del color, el cuerpo y la estructura, entre otros (Kovac *et al.*, 1992; Zimman *et al.*, 2002). Además, producto de la guarda en barrica ocurre una extracción de taninos hidrolizables (polímeros del ácido gálico y elálgico) que provocan que el contenido de fenoles totales de este tipo de vinos sea mayor que en vinos de categoría de precio baja, en donde los procesos extractivos son menores y no necesariamente pasan por un proceso de envejecimiento en madera.

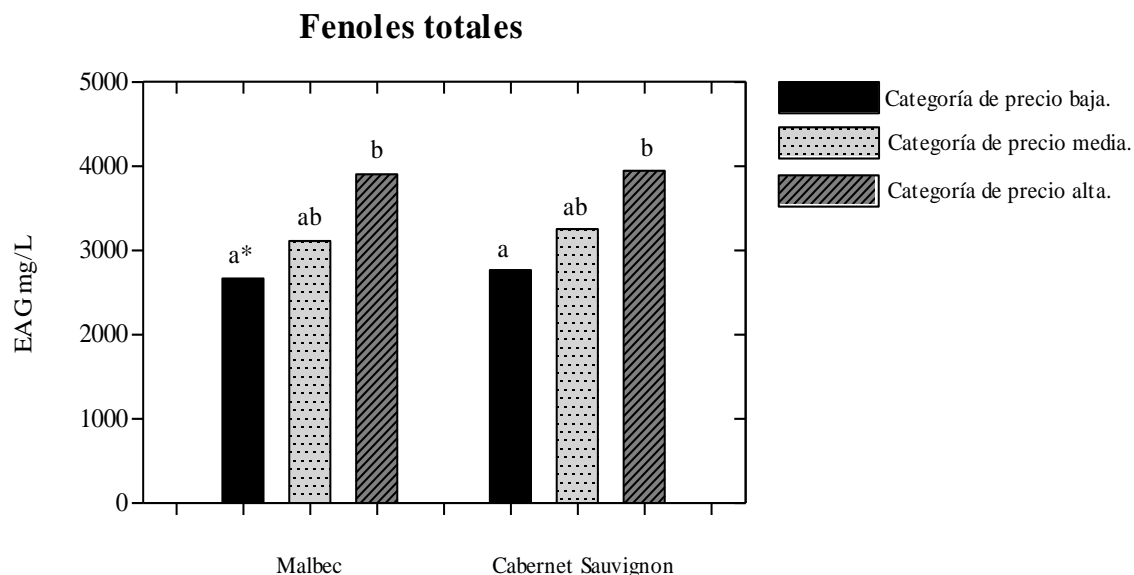


Figura 4. Contenido de fenoles totales (mg EAG/L). (*) Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre categorías de precios para la misma variedad ($p \leq 0,05$ Test de Tukey).

Taninos totales

Los taninos totales fueron los compuestos más abundantes identificados en todas las muestras, los cuales se exponen gráficamente en la Figura 5.

Los resultados se sitúan en un rango entre 4502,3 a 6222,1 y 4688,9 a 4947,8 mg/L de (+)-catequina, en Malbec y Cabernet Sauvignon respectivamente, valores mayores a los encontrados por Narváez (2010) en variedad Cabernet Sauvignon y utilizando la misma metodología (Cuadro 2, Apéndice III).

El resultado del análisis de varianza concluyó que existen diferencias significativas entre las categorías de precio solo para el ensayo de Malbec, en donde existe una influencia positiva de estos compuestos en el valor comercial, que muestra un contenido significativamente mayor en la categoría alta y media con respecto a la categoría baja, mientras que en los vinos del cultivar Cabernet Sauvignon no se encontraron diferencias significativas para este parámetro (Figura 5).

Las concentraciones normales y esperadas de encontrar en un vino tinto varían entre 1500 y 5000 mg/L de (+)-catequina, dependiendo, entre otros factores, de la variedad de la uva, su grado de madurez, técnicas de vinificación enfocados para lograr una mayor extracción de

las bayas como maceraciones prolongadas, alto contenido de etanol, que solubiliza a estos compuestos, altos niveles de SO₂ que permeabiliza las membranas celulares, frecuencia e intensidad de remontajes, temperatura de fermentación y edad del vino (Zoecklein *et al.*, 2000; Monagas *et al.*, 2005; Sacchi *et al.*, 2005).

Por otra parte, es necesario considerar que los taninos presentan cambios por precipitación, ruptura de aquellos de gran tamaño y formación de otros de tamaño medio (polimerización), lo que modificará las propiedades sensoriales de astringencia y amargor (Gawel *et al.*, 2001; Jackson, 2008).

Estas reacciones, asociadas frecuentemente a un medio oxidativo se ven favorecidas en el caso de la formación de nuevos pigmentos y polimerización de taninos, por la presencia de etanal (acetaldehído) el cual sirve de puente entre las moléculas (uniones tanino-antociano y tanino-tanino), y que se forma por la oxidación de etanol durante la guarda en bodega o cuando el vino se somete a tratamientos como la microoxigenación (Peña-Neira, 2009).

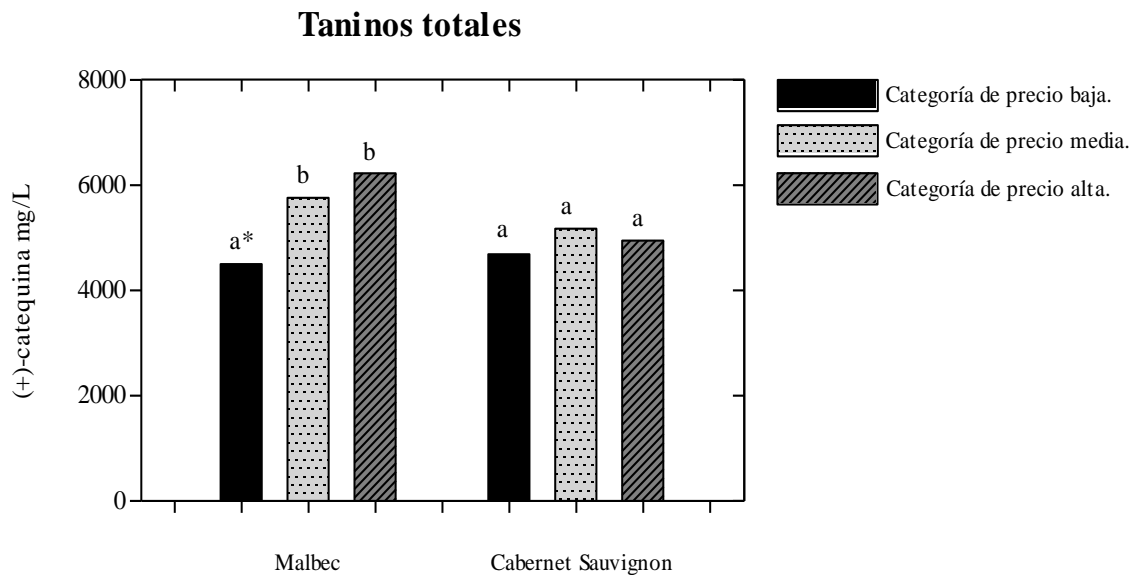


Figura 5. Contenido de taninos totales expresado en g equivalentes de (+)-catequina/L. (*) Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre categorías de precios para la misma variedad ($p \leq 0,05$ Test de Tukey).

Antocianos totales

Los Antocianos presentes en las pieles de las uvas tintas aportan el color al vino, primera característica que se evalúa al momento de degustar un vino, además, junto con la astringencia y amargor, son parámetros organolépticos relacionados con la calidad final del vino tinto (García-Puente, 2006). Asimismo, a través del color es posible asociarlos con el potencial de guarda, edad, concentración tánica, estado de conservación e incluso defectos (Jaffré *et al.*, 2009).

Durante la vinificación, la manera en que se conduce la fermentación y maceración influye mayoritariamente sobre la cantidad de antocianos presentes en el vino (Kennedy, 2008). Por otra parte, la extractabilidad de los antocianos es también un factor principal que determina su concentración, condición que aumenta mientras mayor sea el grado de madurez de la uva (Kennedy *et al.*, 2001; Canals *et al.*, 2005).

Los resultados se ubican en un rango entre 324,8 a 411,0 mg/L de Mv3GL en Malbec que concuerda con lo expuesto por Fanzone *et al.* (2010) y 216,4 a 320,7 mg/L de Mv3GL en Cabernet Sauvignon, valor inferior al resultado obtenido por Gálvez (2011) en la misma variedad y metodología (Cuadro 2, Apéndice III).

El resultado del análisis de varianza concluyó que existen diferencias significativas entre las categorías de precio solo para el ensayo de Cabernet Sauvignon, en donde existe una influencia positiva de estos compuestos con respecto a su valor comercial, mientras que en el cultivar Malbec no se encontró diferencias significativas para este parámetro (Figura 6). No obstante, en promedio los vinos de la categoría alta para ambas variedades mostraron mayores concentraciones de antocianos totales. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores en vinos de las mismas variedades (Fanzone *et al.*, 2010; Kontoudakis *et al.*, 2011).

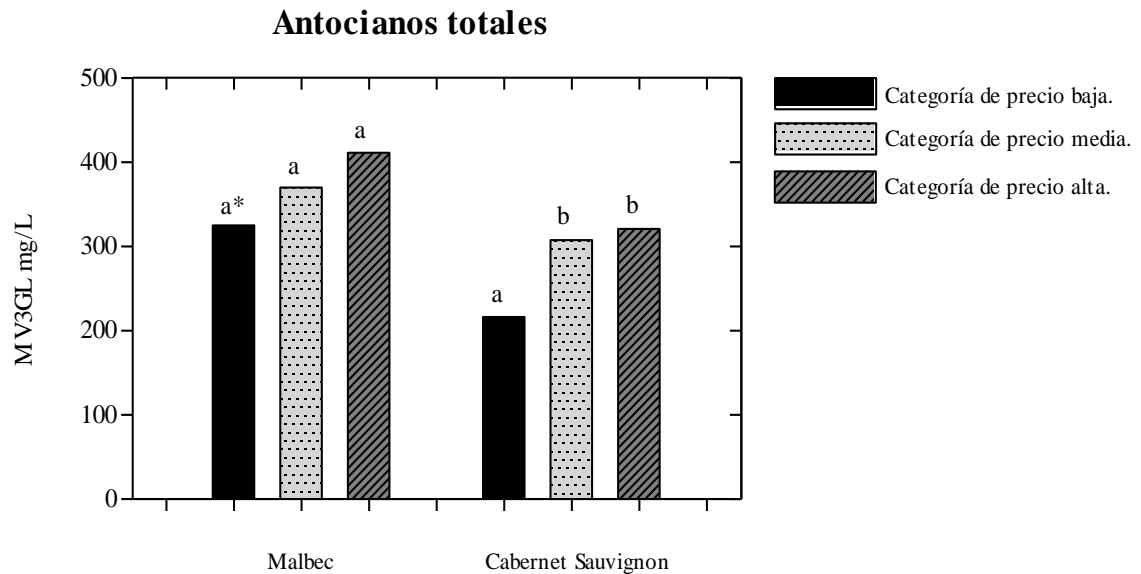


Figura 6. Contenido de antocianos totales expresado en Mv3GL mg/L. (*) Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre categorías de precios para la misma variedad ($p \leq 0,05$ Test de Tukey).

Fraccionamiento de taninos

Los flavan-3-oles se pueden encontrar como monómeros, oligómeros o polímeros, siendo las dos últimas formas también conocidas como proantocianidinas o taninos condensados, los que se pueden clasificar según el número de unidades monoméricas que las conforman.

Actualmente no existe un criterio unánime que indique el número de unidades monoméricas de flavan-3-oles que forman un oligómero o un polímero. Según Monagas *et al.* (2005), un oligómero tiene un grado medio de polimerización entre 2 y 5 unidades que no pueden ser separadas dado el alto número de posibles isómeros. Sin embargo, es importante recalcar que esta definición es subjetiva y varía según el sustrato, técnica empleada o autor (Monagas *et al.*, 2005). A modo de ejemplo, Souquet *et al.* (1996) definen a los oligómeros como aquellos compuestos que poseen entre 2 a 10 unidades y a los polímeros con un mDP mayor a 10.

Sun *et al.* (1998a) indican que la fracción monomérica (FI) consta sólo de (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-*O*-galato, mientras que la fracción oligomérica (FII) está formada por dímeros y trímeros de proantocianidina y la fracción polimérica (FIII) se compone de las proantocianidinas poliméricas. En este aspecto Zamora (2003), señala que

los flavanoles monoméricos tienen una tendencia clara a polimerizar y formar estructuras cada vez más complejas, conforme avanza el proceso de vinificación y además frente a un aumento en la edad del vino.

Para la concentración monomérica los rangos se disponen entre 7,3 a 10,0 mg/L de (+)-catequina para la variedad Malbec y 11,6 a 14,8 mg/L de (+)-catequina en Cabernet Sauvignon, valor bastante inferior a los resultados obtenidos por Narváez (2010) en la misma variedad (Cuadro 3, Apéndice III).

El resultado del análisis de varianza concluyó que existen diferencias significativas entre las categorías de precio solo para la variedad Malbec. No obstante, el promedio de FI para ambas variedades mostró siempre una disminución en vinos de categoría de precio alta (Figura 7 y Figura 8).

Esto tiene una explicación debido a las técnicas enológicas empleadas y al envejecimiento en barrica, ya que a medida que avanza la vinificación los monómeros de flavan-3-oles tienden a unirse entre sí y a formar oligómeros y polímeros. Además, pueden acoplarse con antocianos otorgando estabilidad del color, que consecuentemente hacen disminuir su concentración. De esta manera es esperable que vinos de categorías de precio alta (generalmente relacionado a vinos de guarda) presenten bajas concentraciones de flavan-3-oles monoméricos (Noble, 1994; Gawel, 1998; Centeno, 2006).

En relación a la concentración de oligómeros (Cuadro 3, Apéndice III), el resultado del análisis de varianza concluyó que no existen diferencias significativas entre las categorías de precio en ninguna de las variedades estudiadas y por ende no existe influencia de los oligómeros en el valor comercial del vino.

Los resultados de la fracción polimérica se sitúan en un rango que va desde 1307,7 a 1601,0 y 1603,8 a 2049,4 mg/L de (+)-catequina, en Malbec y Cabernet Sauvignon respectivamente (Cuadro 3, Apéndice III).

Con respecto a la concentración de polímeros, el resultado del análisis de varianza concluyó que existen diferencias significativas solo para la variedad Cabernet Sauvignon, en donde se comprueba una influencia positiva de estos compuestos en el valor comercial, que mostró un contenido significativamente mayor en la categoría alta con respecto a la categoría media y baja. Asimismo, el promedio de la FIII siempre tendió a aumentar en vinos de categoría de precio alta, tanto en Malbec y Cabernet Sauvignon (Figura 7 y Figura 8).

El contenido relativo de las diversas fracciones obtenidas en este trabajo coincide con los resultados obtenidos por Monagas *et al.*, (2003).

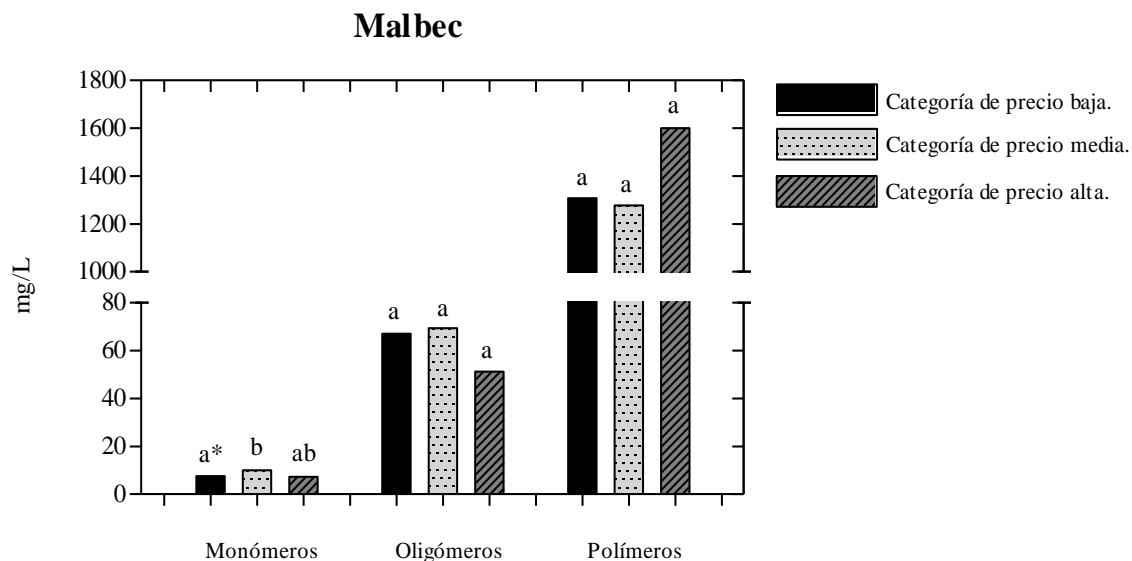


Figura 7. Fraccionamiento de taninos expresado en mg/L de monómeros, oligómeros y polímeros. (*) Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre categorías de precios para la misma variedad ($p \leq 0,05$ Test de Tukey).

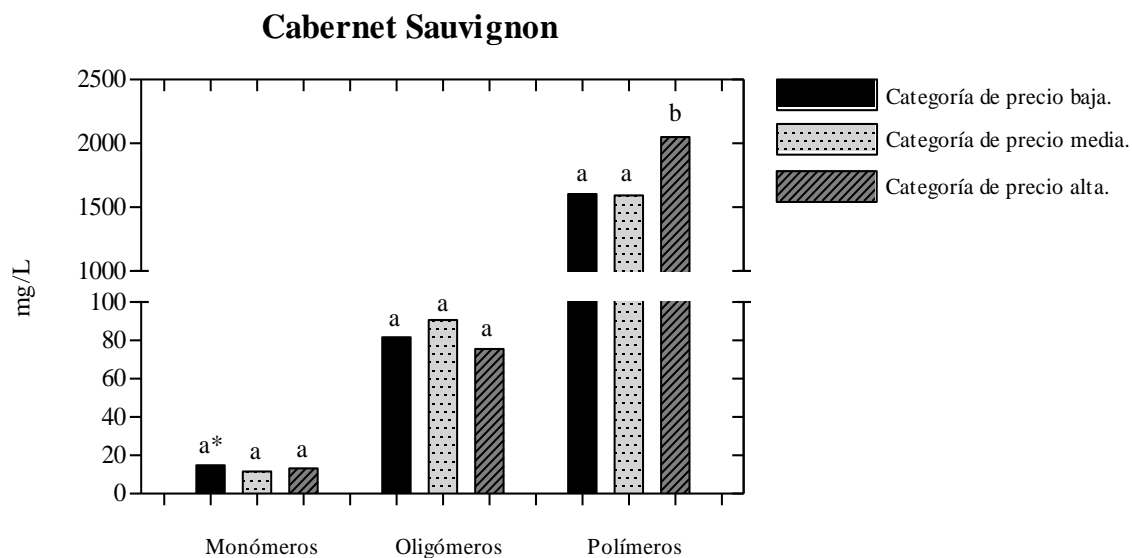


Figura 8. Fraccionamiento de taninos expresado en mg/L de monómeros, oligómeros y polímeros. (*) Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre categorías de precios para la misma variedad ($p \leq 0,05$ Test de Tukey).

Floroglucinólisis

El Cuadro 5 (Apéndice III), muestra los resultados de los análisis de las proantocianidinas en vinos Malbec y Cabernet Sauvignon a través de una catálisis ácida en presencia de floroglucinol.

En relación a mDP, que representa el número medio de unidades monoméricas de proantocianidinas. Según Monagas *et al.*, (2003) el valor promedio de mDP en un vino tinto varía entre 6,9 y 13. El rango de mDP obtenido va desde 4,5 hasta 6,1 y 4,7 a 5,3 en Malbec y Cabernet Sauvignon respectivamente (Cuadro 5, apéndice III), valores menores a los encontrados por Coronado (2011) en la misma variedad; el resultado del análisis de varianza concluyó que existen diferencias significativas entre las categorías de precio solo para vinos de la variedad Malbec, en donde se comprueba que el grado medio de polimerización aumenta en vinos de alto valor comercial. Asimismo, el promedio es siempre mayor mientras aumenta el valor comercial del vino para ambas variedades (Figura 9).

Con respecto a aMW, el resultado del análisis de varianza concluyó que existen diferencias significativas entre las categorías de precio tanto en Malbec como en Cabernet Sauvignon, donde se comprueba una influencia positiva entre aMW y el valor comercial, que mostró un contenido significativamente mayor en la categoría de precio alta con respecto a la categoría media y baja (Figura 10).

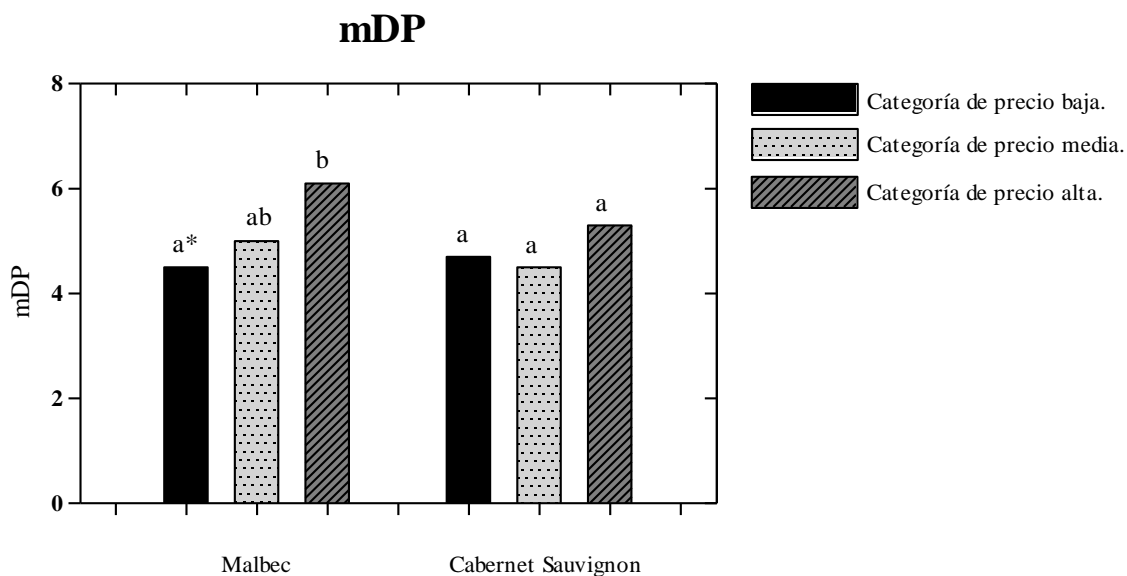


Figura Grado medio de polimerización (mDP). (*) Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre categorías de precios para la misma variedad ($p \leq 0,05$ Test de Tukey).

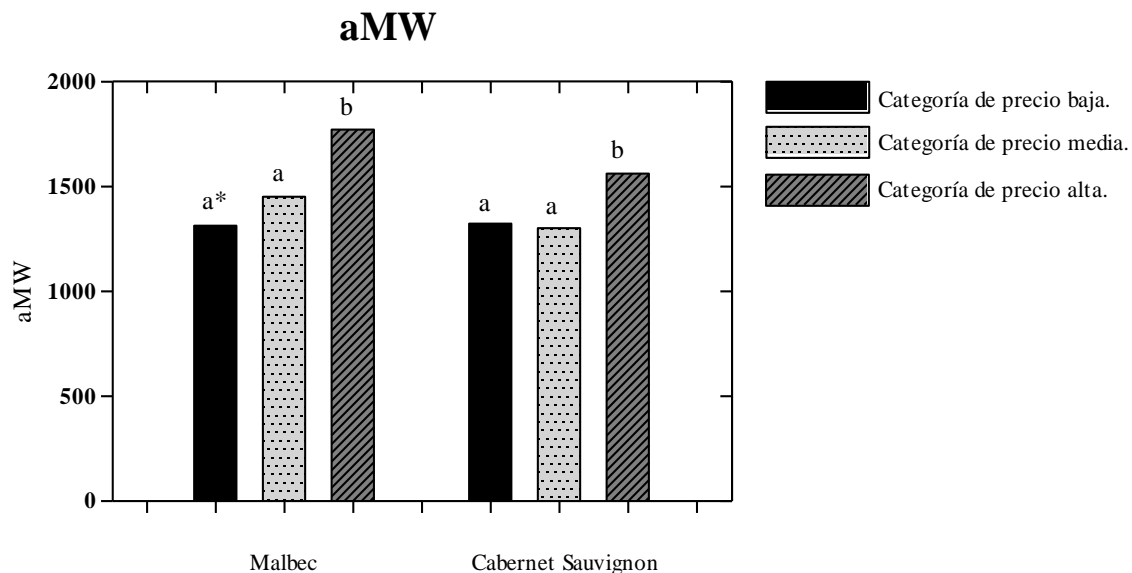


Figura 10. Peso molecular promedio (aMW). (*) Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre categorías de precios para la misma variedad ($p \leq 0,05$ Test de Tukey).

El nivel de astringencia y amargor que aporta un tanino esta dado como se ha dicho por el porcentaje de galoilación, pero también por su tamaño o grado de polimerización, es decir a mayor grado de polimerización y menor porcentaje de galoilación, el tanino es menos astringente y amargo (Kennedy *et al.*, 2000; Jordao *et al.*, 2001; Downey *et al.*, 2003; Jackson, 2009).

Con respecto al % G, los resultados se situaron entre 1,6 a 1,8 % en Malbec y 1,8 a 2,2 % en Cabernet Sauvignon (Cuadro 5, Apéndice III), valores bajos en comparación con el % G promedio de 3,4 encontrados por Monagas *et al.* (2003) en Cabernet Sauvignon. El resultado del análisis de varianza concluyó que no existen diferencias significativas para ninguna de las variedades estudiadas (Figura 11).

Fue interesante encontrar bajo porcentaje de galoilación en las categorías baja, media y alta, ya que a mayor presencia de ácido gálico unida al tanino, mayor amargor y astringencia, parámetros negativos desde el punto de vista sensorial, por lo que se concluye que ninguna categoría de precio presenta dichas características.

El grado de galoilación disminuye con el período de maduración de las bayas, aumentando por otra parte el grado de polimerización. Por lo tanto para elaborar vinos finos con taninos de buena calidad enológica, se hace indispensable realizar una cosecha cada vez más tardía esperando una mayor madurez fenólica, tomando en cuenta aspectos como la senescencia de las bayas que podría afectar a otros compuestos de importancia como son los aromas, o

bien aumentar la susceptibilidad a la aparición de hongos asociados a cuadros de senescencia de bayas (Zoecklein *et al.*, 2000; Peña-Neira, 2006).

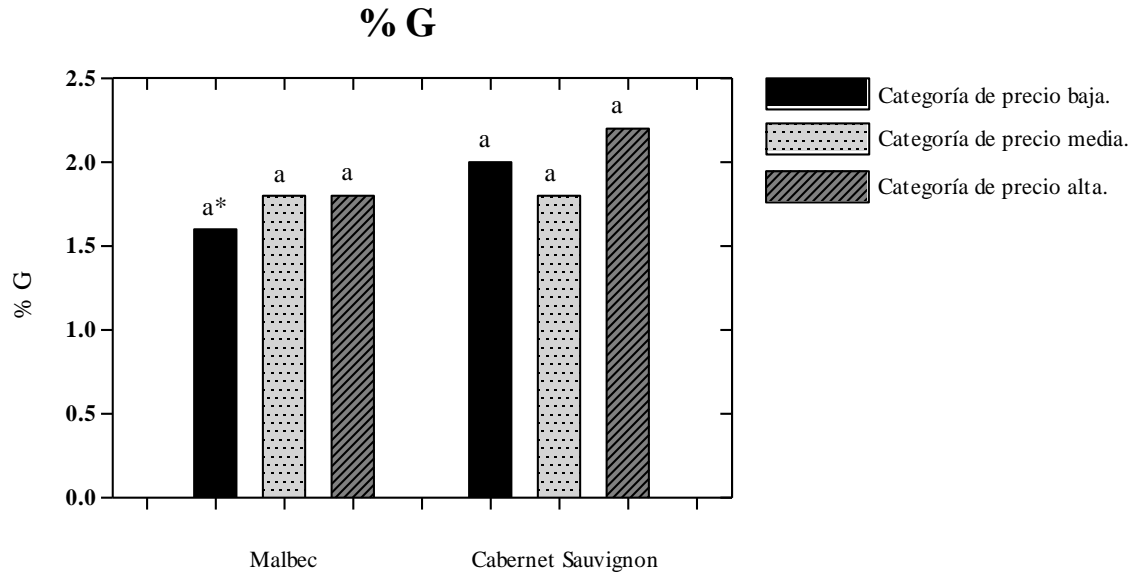


Figura 11. Porcentaje de galactilación (%G). (*) Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre categorías de precios para la misma variedad ($p \leq 0,05$ Test de Tukey).

CONCLUSIÓN

De acuerdo a las condiciones empleadas en este estudio, se puede concluir que:

- Se pudo caracterizar las diversas fracciones flavánicas de vinos argentinos de los cultivares Malbec y Cabernet Sauvignon con distinto precio de mercado.
- En general para las variables analizadas en este estudio, se observó que los valores promedios fueron mayores en vinos de categoría de precio alta, por ende se logró constatar que existe una relación entre la concentración de los compuestos mencionados y el valor comercial del vino. Por lo tanto se concluye en base a los resultados obtenidos que vinos de categorías altas de precio, tanto para la variedad Malbec y Cabernet Sauvignon revelan una riqueza flavánica y gran potencial para producir vinos de la más alta calidad enológica y sugiere un avance en el conocimiento sobre vinos argentinos de la variedad Malbec para la industria enológica a nivel mundial.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcalde-Eon, C., M. T. Escribano-Bailón, C. Santos-Buelga, and J. C. Rivas-Gonzalo. 2005. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta* 563: 238-254.
- Bate-Smith, E. 1981. Astringent tannins of the leaves of geranium species. *Phytochemistry* 20: 211-216.
- Blouin, J. y G. Guimberteau. 2004. *Maduración y madurez de la uva*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 149p.
- Bordeu, E. y A. González. 2008. Calidad fenólica del vino tinto (I parte). *Revista Vendimia* (Mayo): 62-66.
- Bordeu, E y J. Scarpa. 1998. *Análisis químico del vino*. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 253p.
- Broussaud, F., V. Cheynier and A. Noble. 2001. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 7: 33-39.
- Canals, R., M. C. Laudy, J. Valls, J. M. Canals, and F. Zamora. 2005. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53 (10): 4019-4025.
- Coronado, C. 2011. Efecto de diferentes momentos de cosecha sobre la composición fenólica del vino de la variedad Cabernet Sauvignon. *Memoria Ingeniero Agrónomo*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 45p.
- Downey, M.O., J.S. Harley and S.P. Robinson. 2003. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal Grape Wine Research* 9: 15-27.
- Fanzone, M., A. Peña-Neira, V. Jofré, M. Assof, and F. Zamora. 2010. Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). *Journal Agricultural and Food Chemistry* 58: 2388-2397.
- Gálvez, A. 2011. Caracterización de la fracción tánica de bayas y vinos del cv Cabernet Sauvignon de distinta calidad enológica según precio. *Memoria Ingeniero Agrónomo*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 45p.

- García-Barceló, J. 1990. Técnicas analíticas para vinos. Ediciones FAB. Barcelona, España. 1713p.
- García-Puente, E., C. Alcalde-Eon, C. Santos-Buelga, J.C Rivas-Gonzalo and M. T. Escribano-Bailón. 2006. Behaviour and characterization of the color during red wine making and maturation. *Analytica Chimica Acta* 563: 215-222.
- Gawel, R. 1998. Red wine astringency. *Australian Journal of grape and wine research* 4: 74-95.
- Gawel, R., P. G. Iland and I. L. Francis. 2001. Characterizing the astringency of red wine: a case study. *Food Quality and Preference* 12 (1): 83-94.
- Geny, L., C. Saucier, S. Bracco, F. Daviaud and Y. Glories. 2003. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:8051-8054.
- Ginjom, I., B. D'Arcy, N. Caffin, and M. Gidley. 2010. Phenolic contents and antioxidant activities of major Australian red wines throughout the winemaking process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:10133-10142.
- González-Manzano, S., J.C. Rivas-Gonzalo and C. Santos-Buelga. 2003. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta* 513: 283-289.
- González-Neves, G., D. Charamelo, J. Balado, L. Barreiro, R. Bochicchio, G. Gatto, G. Gil, A. Tessore, A. Carbonneau and M. Moutounet. 2004. Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition *Analytica Chimica Acta* 513: 191-196.
- Herderich, M. J., and P. A. Smith. 2005. Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11:205-214.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura, Argentina (INV) 2009. http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/REGISTRO_VINEDOS2009_JULIO.pdf. Leído el 20 de Enero del 2011.
- Jackson, R. 2008. Wine science, principles and applications. 3^a Ed. Elsevier. Canada. 789p.
- Jackson, R. 2009. Wine tasting, a professional handbook. 2^a Ed. Elsevier. USA. 499p.
- Jaffré, J., D. Valentin, C. Dacremont and D. Peyron. 2009. Burgundy red wines: Representation of potential for aging. *Food Quality and Preference* 20:505-513.

- Jordao, A. M., J. M. Ricardo Da Silva and O. Laureano. 2001. Evolution of proanthocyanidins in bunch stems during Berry development (*Vitis vinifera* L). *Vitis* 40 (1): 17-22.
- Kennedy, J. A., M. A. Mathews and A. L. Waterhouse. 2000. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Photochemistry* 55:77-85.
- Kennedy, J. A., Y. Hayasaka, S. Vidal, E. J. Waters and G. P. Jones. 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49:5348-5355.
- Kennedy, J. A., and G. P. Jones. 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1740-1746.
- Kennedy, J. A., M. A. Matthews and A. L. Waterhouse. 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture* 53:4
- Kennedy, J., C. Saucier and Y. Glories. 2006. Grape and wine phenolics: History and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture* 57:239-248.
- Kennedy, J. 2008. Grape and wine phenolics: observations and recent findings. *Ciencia e Investigación Agraria* 35(2): 107-120.
- Kontoudakis, N., M. Esteruelas, F. Fort, J. M. Canals, V. De Freitas and F. Zamora. 2011. Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chemistry* 124:767-774.
- Kovac, V., E. Alonso, M. Bourzeix and E. Revilla. 1992. Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 40 (10): 1953-1957.
- Li, H., A. Guo and H. Wang. 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry* 108:1-13.
- Lisoni, N. 2001. Efecto del vigor y del grado de madurez de las bayas sobre la fracción polifenólica de los hollejos en el cv. Cabernet Sauvignon. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 57p.
- Lücker, J., S. Martens and S. T. Lund. 2010. Characterization of a *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon 3',5'-O-methyltransferase showing strong preference for anthocyanins and glycosylated flavonols. *Phytochemistry* 71: 1474-1484.

- Matus, J. M., R. Loyola, A. Vega, A. Peña, E. Bordeu, P. Arce-Johnson and J. A. Alcalde. 2009. Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera* L. *Journal Experimental Botany* 3:853-867.
- Mercurio, M., and P. Smith. 2008. Tannin quantification in red grapes and wine: comparison of polysaccharide- and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 5528-5537.
- Monagas, M., C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, O. Lureano and J. M. Ricardo-da Silva. 2003. Monomeric, oligomeric and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6475-6481.
- Monagas, M., B. Bartolomé and C. Gómez-Cordovés. 2005. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 85-118.
- Narváez, J. 2010. Comparación de tres métodos de medición de taninos totales y su relación con la astringencia y el amargor percibidos por un panel de degustación especializado. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 84p
- Noble, A. C. 1994. Bitterness in wine. *Physiology and Behavior* 56: 1251-1255.
- Obreque-Slier, E. 2010. Caracterización de uvas del cultivar Carménère y su relación con la sensación de astringencia. Tesis Doctoral. Facultad d'Enología, Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, España. 240p.
- Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira, R. López-Solís, F. Zamora, J.M. Ricardo da Silva and O. Laureano. 2010. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 58(6): 3591-3599.
- Peleg, H., K. Gacon, P. Schlinch and A. Noble. 1999. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1123-1128.
- Peña-Neira, A. 2005. En uvas tintas factores que regulan el color. *Revista vendimia*, (Diciembre): 12-14.
- Peña-Neira, A. 2006. En la calidad de uvas y vino: los taninos y su importancia. *Revista Vendimia* (Abril): 18-20.

Peña-Neira, A. 2009. Composición fenólica de uvas y vinos. *Revista Vendimia* (Mayo): 26-27.

Khanbabaee, K. and T. Van Ree. 2001. Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports* 18: 641-649.

Kusch, C. 2005. Caracterización del crecimiento vegetativo y de la fotosíntesis en la vid cv. Cabernet Sauvignon, en el valle del Maipo. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 42p.

Río, S.S., V. E. Soto and E. D. Losada. 2008. Influence of ripeness grade on accumulation and extractability of grape skin anthocyanins in different cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 599-607.

Ryan, J. and E. Revilla. 2003. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3372-3378.

Sacchi, K. L., L. F. Bisson, and D.O. Adams. 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 56 (3): 197-206.

Souquet, J. M., V. Cheynier, F. Brossaud, and M. Moutounet. 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* 43:509-512.

Sun, B. S., C. Leandro, J. M. Ricardo da Silva, and I. Spranger, 1998a. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1390-1396.

Sun, B. S., J. M. Ricardo da Silva, and I. Spranger, 1998b. Critical factors of the vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4267-4274.

Terrier, N., C. Poncet-Legrand and V. Cheynier. 2009. Flavanols, flavonols and dihydroflavonols. 33p. In: Moreno-Arribas, M.V. y M.C. Polo (Ed). *Wine chemistry and biochemistry*. Springer. New York, Usa. 728p.

Valls, J., M. Lampreave, M. Nadal, L. Arola. 2000. Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Alimentación, equipos y tecnología*. 2:119-124.

Zamora, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Editorial Mundi-Prensa, Madrid, España. 224 p.

Zimman, A., W.S. Joslin, M.L Lyon, J. Meier and A.L. Waterhouse. 2002. Maceration variables affecting phenolic composition in commercial-scale Cabernet Sauvignon winemaking trials. *American Journal of Enology and Viticulture*. 53 (2): 93-98.

Zoecklein, B., K. Fugelsang, B. Gump y F. Nury. 2000. *Análisis y producción de vino*. Editorial Acrivia S.A, Zaragoza, España. 613 p.

APÉNDICES

Apéndice I

Listado de vinos según variedad, categoría de precio, año y bodega.

Variedad	Categoría	Año	Bodega
MB	Baja	2008	Séptima
MB	Baja	2008	Nieto Senetiner
MB	Baja	2009	Tapiz
MB	Baja	2008	Cap Vistalba
MB	Baja	2009	Catena Zapata
MB	Media	2008	Nieto Senetiner
MB	Media	2008	Mendel
MB	Media	2008	Séptima
MB	Media	2008	Tapiz
MB	Media	2008	Cobos
MB	Alta	2008	Mendel
MB	Alta	2008	Tapiz
MB	Alta	2008	Nieto Senetiner
MB	Alta	2009	Cap Vistalba
MB	Alta	2008	Catena Zapata
CS	Baja	2008	Nieto Senetiner
CS	Baja	2008	Septima
CS	Baja	2009	Catena Zapata
CS	Baja	2009	Chandon
CS	Baja	2009	INTA
CS	Media	2008	Nieto Senetiner
CS	Media	2008	Septima
CS	Media	2008	Tapiz
CS	Media	2009	Cap Vistalba
CS	Media	2008	Chandon
CS	Alta	2008	Catena Zapata
CS	Alta	2008	Chandon
CS	Alta	2009	Mendel
CS	Alta	2008	Tapiz
CS	Alta	2008	Nieto Senetiner

Apéndice II

Detalle de la metodología empleada.

Fenoles totales. La determinación de fenoles totales se realizó mediante análisis espectrofotométrico a 280 nm con respecto a un blanco de agua, en cubetas de cuarzo de 10 mm de paso óptico, previa dilución de las muestras en agua destilada (1:100). La absorbancia obtenida se multiplicó por la dilución (100) y por el factor 28,9. La concentración de fenoles totales obtenidos se expresó en mg/L de ácido gálico (EAG) (Bordeu y Scarpa, 1998).

Antocianos totales. La determinación de antocianos totales se realizó mediante la decoloración con bisulfito sódico (García-Barceló, 1990). En un matraz Erlenmeyer se mezcló 1 mL de la muestra de vino con 1 mL de HCL al 0,1% p/v en etanol al 95% y 20 mL de una solución acuosa de HCL al 2% p/v. La mezcla anterior se separó en dos tubos de ensayo A y B (10 mL para cada uno). Adicionalmente se agregó al tubo A, 4 mL de NaHSO₃ al 15% p/v en agua y al tubo B, 4 mL de agua destilada. Transcurridos 20 minutos se leyó el valor de la absorbancia a 520 nm contra un blanco de agua, en cubetas de 10 mm de paso óptico. Posteriormente la diferencia de las absorbancias de cada tubo se multiplicó por el factor 865. La concentración de antocianos totales obtenidos se expresó en mg/L de Mv3GL.

Taninos totales. La determinación de taninos totales se realizó mediante la reacción de Bate-Smith, que consistió en la transformación de los taninos en antocianidinas por calentamiento en un medio ácido (Bate-Smith, 1981; Zoecklein *et al.*, 2000). La muestra de vino se diluyó en agua destilada (1:50). Luego a dos tubos de ensayo A y B, cada uno con 4 mL de la dilución anterior, se les adicionó 2 mL de agua destilada y 6 mL de HCl al 37% v/v para cada tubo. El tubo A se colocó en un baño de agua a 100 °C durante 30 minutos, mientras el tubo B se dejó a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez fríos los tubos, se les adicionó 1 mL de etanol al 95%. Después se midió la absorbancia a 550 nm contra un blanco de agua, en cubetas de 10 mm de paso óptico. Posteriormente la diferencia de las absorbancias de cada tubo se multiplicó por el factor 19,3. La concentración de taninos totales obtenidos se expresaron en g/L de (+)-catequina.

Las mediciones de fenoles totales, antocianos totales y taninos totales se efectuaron en un espectrofotómetro UV-vis Jasco modelo V-530.

Floroglucinólisis. El grado medio de polimerización de los taninos se determinó mediante una catálisis ácida en presencia de floroglucinol (Figura 1), (Kennedy y Jones, 2001). Para aislar los polímeros de flavan-3-oles de cada muestra se utilizó una columna preparada a base de fractogel Toyopearl HW-40F. El procedimiento consistió en realizar un lavado con 20 mL de una solución de etanol al 55% v/v con 0,05% v/v de ácido trifluoroacético y 45% de agua bidestilada (Solución A). Posteriormente se adicionaron 10 mL de la muestra

previamente filtrada y luego se descartaron los antocianos, monómeros y oligómeros de flavan-3-oles, entre otros, con 50 mL de la solución descrita anteriormente. La fracción polimérica se obtuvo con 30 mL de una solución de acetona al 60% v/v en agua bidestilada (Solución B). Los polímeros de flavan-3-oles aislados se concentraron en un rotavapor a 30°C. Luego se mezcló 0,5 mL de metanol con 0,5 mL de una solución 0,1 N de HCl en metanol con 50 g/L de floroglucinol y 10 g/L de ácido ascórbico (Solución de Floroglucinol). Las proantocianidinas de interés reaccionaron en esta solución a 50 °C durante 20 minutos a baño maría. Transcurrido este tiempo se agregó 0,5 mL de acetato de sodio para detener la reacción y se enfrió inmediatamente con agua fría. Por último la muestra se centrifugó a 11500 rpm en un tiempo de 20 minutos. Finalmente la muestra se filtró en una jeringa provista de membranas Millipore de 0,22 µm, posteriormente se midió en un cromatógrafo líquido (HPLC-DAD) modelo Agilent 1200.

Los diferentes compuestos fueron identificados con sus espectros de absorción y se compararon los tiempos de retención con los indicados en la literatura. La cuantificación se realizó utilizando los siguientes estándares externos: EGC para EGC unida a floroglucinol (EGC-F), C para C unida a floroglucinol (C-F), y EC para EC unida a floroglucinol (EC-F) y ECG para ECG unida a floroglucinol (ECG-F).

El grado medio de polimerización (mDP) se obtuvo por la división entre la totalidad de las subunidades identificadas (proantocianidinas terminales y extensión) y las proantocianidinas terminales. En el caso del porcentaje de galoilación (% G) se consiguió por división entre la totalidad de proantocianidinas galoiladas y la totalidad de las proantocianidinas identificadas, multiplicado por 100. Finalmente, el peso molecular promedio (aMW) se logró del resultado de la ecuación $mDP * [288 + (152 * \%G / 100)] + 2$.

Fraccionamiento de taninos. La separación de los taninos se realizó mediante cartuchos Waters Sep-Pak C₁₈ (Monagas *et al.*, 2003), como se detalla en la Figura 2. La muestra de 10 mL de vino previamente filtrada con una membrana de celulosa de 0,45 µm, se concentró hasta sequedad en un rotavapor a 30 °C, luego se restituyó con 20 mL de tampón fosfato pH 7,0. Cuando fue necesario, se ajustó el pH a 7,0 con soluciones de NaOH o HCl. Dos cartuchos Sep-Pak C₁₈ fueron conectados en serie, en la parte superior se colocó un cartucho Waters Sep-Pak tC₁₈ Environmental y en la parte inferior un Waters Sep-Pak Plus tC₁₈, estos fueron condicionados con 10 mL de metanol, 20 mL de agua destilada y 10 mL de tampón fosfato pH 7,0. Posteriormente se agregaron las muestras a través de los cartuchos e inmediatamente los ácidos fenólicos se eliminaron por elución con 10 mL de tampón fosfato pH 7,0 al 12,5% v/v en agua destilada. Después de secar los cartuchos durante dos horas con N₂, la elución de los monómeros y oligómeros de flavan-3-oles (fracciones FI y FII, respectivamente) se realizó con 25 mL de acetato de etilo, seguida por la elución de las proantocianidinas poliméricas (fracción FIII) con 15 mL de metanol. Para separar las fracciones FI y FII, el acetato de etilo se concentró hasta la sequedad en un rotavapor a 30°C, luego se restituyó en 10 mL de tampón fosfato pH 7,0 y finalmente se redepositó en la misma serie de cartuchos reacondicionada como se describió anteriormente. Éstos nuevamente se secaron con N₂ durante 2 horas y los monómeros se

separaron de los oligómeros por elución secuencial con 25 mL de éter dietílico (FI) y 15 mL de metanol (FII). Las tres fracciones fueron concentradas hasta la sequedad en un rotavapor a 30°C y redisueltas en 4,5 mL de metanol. El contenido total de cada fracción se determinó mediante el ensayo de la vainillina.

Ensayo de la vainillina. La concentración de las fracciones obtenidas (FI, FII y FIII) se determinaron según el método descrito por Sun *et al.* (1998b), detallado en la Figura 3. La muestra seca se restituyó con 4,5 mL de metanol, posteriormente en un tubo de ensayo se adicionó 1 mL de la muestra restituida, más 2,5 mL de H₂SO₄ al 25% v/v en metanol y 2,5 mL de vainillina al 1% p/v en metanol. Se preparó simultáneamente un blanco de la misma forma, pero sustituyendo la vainillina al 1% p/v en metanol, por metanol puro. En el caso de la FI la absorbancia se midió a 500 nm de manera inmediata previo baño maría a 30°C por 15 minutos. Para las fracciones FII y FIII, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y la lectura se realizó por 1800 y 5000 s respectivamente. Todas las mediciones se realizaron en el espectrofotómetro UV-vis Jabco modelo V-530.

Apéndice III

Cuadro 2. Análisis de fenoles totales, taninos totales y antocianos totales.

Tratamiento	Fenoles totales ⁽¹⁾	Taninos totales ⁽²⁾	Antocianos totales ⁽³⁾
	Prom ± DE	Prom ± DE	Prom ± DE
MBB	2667,5 ^{a*} ± 87,6	4502,3 ^a ± 138,9	324,8 ^a ± 26,9
MBM	3110,6 ^{ab} ± 274,4	5759,1 ^b ± 145,8	369,9 ^a ± 24,4
MBA	3905,0 ^b ± 267,8	6222,1 ^b ± 352,7	411,0 ^a ± 37,4
CSB	2765,3 ^a ± 115,9	4688,9 ^a ± 206,7	216,4 ^a ± 13,8
CSM	3251,6 ^{ab} ± 256,0	5171,4 ^a ± 406,5	307,3 ^b ± 18,7
CSA	3944,3 ^b ± 348,3	4947,8 ^a ± 448,3	320,7 ^b ± 18,9

Prom: Promedio de 5 repeticiones; DE: Desviación Estándar. (*) Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre categorías de precios para la misma variedad, de acuerdo al test de Tuckey con respecto a la interacción entre la variedad y la categoría de precio, considerándose significativa cuando ($p \leq 0,05$).

(1)Expresado en mg EAG/L

(2)Expresado en (+)-catequina mg/L

(3)Expresado en Mv3GL mg/L

Cuadro 3. Análisis de fraccionamiento de taninos.

Tratamiento	Monómeros ⁽¹⁾	Oligómeros ⁽²⁾	Polímeros ⁽³⁾
	Prom ± DE	Prom ± DE	Prom ± DE
MBB	7,5 ^{a*} ± 0,2	67,1 ^a ± 5,7	1307,7 ^a ± 101,7
MBM	10,0 ^b ± 1,2	69,4 ^a ± 8,5	1277,0 ^a ± 134,4
MBA	7,3 ^{ab} ± 1,0	51,3 ^a ± 5,2	1601,0 ^a ± 126,7
CSB	14,8 ^a ± 2,0	81,7 ^a ± 6,40	1603,8 ^a ± 102,7
CSM	11,6 ^a ± 1,7	90,7 ^a ± 10,5	1592,3 ^a ± 94,7
CSA	13,2 ^a ± 0,6	75,6 ^a ± 3,50	2049,4 ^b ± 31,4

Prom: Promedio de 5 repeticiones; DE: Desviación Estándar. (*) Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las categorías de precio para la misma variedad, de acuerdo al Test de Tuckey con respecto a la interacción entre la variedad y la categoría de precio, considerándose significativa cuando ($p \leq 0,05$).

(1), (2), (3); FI, FII, FIII respectivamente, expresados en (+)-catequina mg/L.

Cuadro 4. Análisis de fraccionamiento de taninos expresado en porcentaje.

Tratamiento	Polímeros ⁽¹⁾	Oligómeros ⁽²⁾	Monómeros ⁽³⁾
	Prom ± DE	Prom ± DE	Prom ± DE
MBB	94,5 ^{ab*} ± 0,5	4,9 ^a ± 0,5	0,56 ^a ± 0,05
MBM	93,9 ^a ± 0,9	5,3 ^a ± 0,9	0,78 ^a ± 0,17
MBA	96,4 ^b ± 0,4	3,1 ^a ± 0,3	0,48 ^a ± 0,09
	94,9 ^{**}	4,5	0,6
CSB	94,3 ^{ab} ± 0,3	4,8 ^{ab} ± 0,3	0,86 ^a ± 0,07
CSM	94,0 ^a ± 0,7	5,4 ^b ± 0,6	0,70 ^a ± 0,10
CSA	95,8 ^b ± 0,1	3,5 ^a ± 0,1	0,62 ^a ± 0,02
	94,7	4,6	0,7

Prom: Promedio de 5 repeticiones; DE: Desviación Estándar. (*) Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las categorías de precio para la misma variedad, de acuerdo al Test de Tuckey con respecto a la interacción entre la variedad y la categoría de precio, considerándose significativa cuando ($p \leq 0,05$). (**)Promedio de las 3 categorías de precio.

(1), (2), (3); FIII, FII, FI respectivamente, expresados en porcentaje (%).

Cuadro 5. Resultados de Floroglucinólisis.

Tratamiento	mDP ⁽¹⁾	aMW ⁽²⁾	% G ⁽³⁾
	Prom ± DE	Prom ± DE	Prom ± DE
MBB	4,5 ^a ± 0,3	1312,9 ^a ± 72,6	1,6 ^a ± 0,1
MBM	5,0 ^{ab} ± 0,2	1450,7 ^a ± 54,5	1,8 ^a ± 0,1
MBA	6,1 ^b ± 0,4	1770,7 ^b ± 89,7	1,8 ^a ± 0,1
CSB	4,7 ^a ± 0,3	1323,8 ^a ± 79,3	2,0 ^a ± 0,2
CSM	4,5 ^a ± 0,1	1302,0 ^a ± 39,4	1,8 ^a ± 0,2
CSA	5,3 ^a ± 0,4	1561,5 ^b ± 52,3	2,2 ^a ± 0,1

Prom: Promedio de 5 repeticiones; DE: Desviación Estándar. (*) Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las categorías de precio para la misma variedad, de acuerdo al Test de Tuckey con respecto a la interacción entre la variedad y la categoría de precio, considerándose significativa cuando ($p \leq 0,05$).

(1) Grado medio de polimerización.

(2) Peso molecular promedio.

(3) Porcentaje de galoilación.

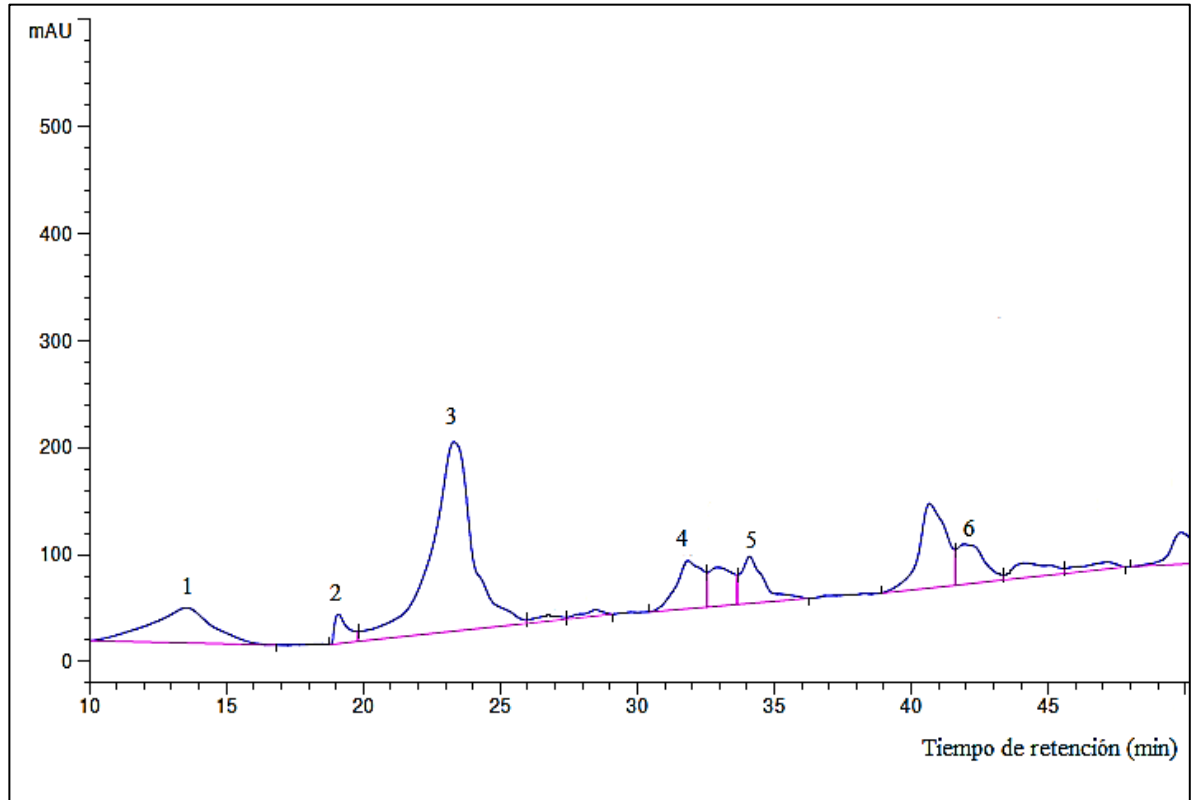


Figura 9. Cromatograma tipo (280nm) por HPLC-DAD, análisis de floroglucinólisis en vino de variedad Malbec. Los picos corresponden a: (1) (-)-epigallocatequina unida a floroglucinol (EGC-F); (2) (+)-catequina unida a floroglucinol (C-F); (3) (-)-epicatequina unida a floroglucinol (EC-F); (4) (+)-catequina; (5) (-)-epicatequina-3-O-galato unida a floroglucinol; (6) (-)-epicatequina.