



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

**CARACTERIZACIÓN FENÓLICA DE LAS SEMILLAS DE UVA DE
CABERNET FRANC, MALBEC, PETIT VERDOT, SANGIOVESE,
TEMPRANILLO Y CARMÉNÈRE DURANTE LA MADURACIÓN**

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de
Magíster en Ciencias Agropecuarias

NATALIA ANDREA ROGAZI DÍAZ

Directores de Tesis
Elías Obreque y Remigio López

Profesores consejeros
Álvaro Peña
Mariona Gil

SANTIAGO - CHILE
2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

CARACTERIZACIÓN FENÓLICA DE LAS SEMILLAS DE UVA DE
CABERNET FRANC, MALBEC, PETIT VERDOT, SANGIOVESE, TEMPRANILLO Y
CARMÉNÈRE DURANTE LA MADURACIÓN

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de
Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias

NATALIA ANDREA ROGAZI DÍAZ

Calificaciones Calificaciones
(Memoria de Título) (Tesis de Grado)

DIRECTORES DE TESIS

Elías Obreque Slier

Ingeniero Agrónomo, MS, Ph.D.

Remigio López

Bioquímico

PROFESORES CONSEJEROS

Álvaro Peña Neira

Ingeniero Agrónomo, MS, Ph.D.

Mariona Gil

Licenciada en química y enología, MS, Ph.D.

Santiago, Chile
2020

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	9
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Ubicación del estudio	12
Material biológico	12
Equipamiento	13
Tratamientos y diseño experimental	13
Manejo del experimento.....	14
Variables a medir	14
Análisis químico general.....	14
Análisis de polifenoles	14
Análisis estadístico.....	15
RESULTADOS	16
Análisis generales.....	16
Composición fenólica de las semillas de uva durante la maduración	17
Identificación de parámetros CIElab y variables colorimétricas	19
Concentración de fenoles de bajo peso molecular cuantificados por HPLC-DAD	21
Concentración de las fracciones mono, oligo y poliméricas de flavan-3-oles	24
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	30
LITERATURA CITADA	31

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Parámetros analíticos generales en bayas durante la maduración.....	16
Cuadro 2. Contenido de fenoles de bajo peso molecular durante la maduración (mg/kg) .	21

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la concentración de fenoles totales y taninos totales en semillas de cultivar Cabernet Franc, Carménère, Malbec, Petit Verdot, Sangiovese y Tempranillo durante la maduración	18
Figura 2. Evolución de los parámetros del color en extractos de semillas de cultivar Cabernet Franc, Carménère, Malbec, Petit Verdot, Sangiovese y Tempranillo durante la maduración	20
Figura 3. Evolución de la concentración de las diversas fracciones de flavan-3-oles en los extractos de semillas de los cultivares Cabernet Franc, Petit Verdot, Tempranillo, Carménère, Malbec y Sangiovese durante la maduración	25

RESUMEN

Chile es un importante productor y exportador de vino a nivel mundial. Sin embargo, la oferta varietal de vinos chilenos se encuentra limitada a variedades tradicionales, entre ellas Carménère, Cabernet Sauvignon y Merlot. Durante los últimos años, ciertas variedades de *Vitis vinifera* L. han experimentado un crecimiento importante, pero no existe información acerca de la composición química de estas variedades bajo las condiciones medioambientales nacionales. El objetivo de este estudio fue comparar la concentración de las fracciones de flavan-3-ol y de fenoles de bajo peso molecular en semillas de las variedades Carménère, Cabernet Franc, Petit Verdot, Sangiovese, Tempranillo y Malbec durante la maduración. Para ello, fueron muestreadas las bayas en 3 momentos durante la maduración y se realizó una extracción total de polifenoles con las semillas trituradas, mediante maceración con mezclas de solventes orgánicos y agua por un periodo de dos horas. Posteriormente estos extractos fueron analizados mediante técnicas espectrofotométricas y de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD). Los resultados demostraron que estos extractos presentan una concentración diferencial de polifenoles durante la madurez. No obstante, existe una gran similitud composicional entre los cultivares estudiados, que no permite detectar un carácter fenólico específico y diferenciador entre las variedades. Finalmente, se reporta que las variedades utilizadas en este estudio presentan un patrón fenólico similar a Carménère, lo que implicaría su potencial uso extensivo en el terruño nacional.

Palabras clave: HPLC-DAD, flavonoides, fraccionamiento de flavan-3-oles, *Vitis vinifera* L.

ABSTRACT

Chile is an important producer and exporter of wine worldwide. However, the varietal offer of Chilean wines is limited to traditional varieties, including Carménère, Cabernet Sauvignon and Merlot. During the last years, certain varieties of *Vitis vinifera* L. have experienced significant growth, but there is no information about the chemical composition of these varieties under national environmental conditions. The objective of this study was to compare the concentration of the flavan-3-ol and low molecular weight phenol fractions in seeds of the Carménère, Cabernet Franc, Petit Verdot, Sangiovese, Tempranillo and Malbec varieties during ripening. For this, the berries were sampled at 3 moments during ripening and a total extraction of polyphenols was carried out with the crushed seeds, by maceration with mixtures of organic solvents and water for a period of two hours. These extracts were subsequently analyzed using spectrophotometric and high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) techniques. The results showed that these extracts present a differential concentration of polyphenols during maturity. However, there is a great compositional similarity between the cultivars studied, which does not allow detecting a specific and differentiating phenolic character between the varieties. Finally, it is reported that the varieties used in this study present a phenolic pattern similar to Carménère, which would imply their potential extensive use in the national terroir.

Keywords: HPLC-DAD, flavonoids, flavanol fractionation, *Vitis vinifera* L.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios presentes en diversas especies vegetales y ampliamente distribuidos en los tejidos de las bayas de *Vitis vinifera* L. (Dohadwala y Vita, 2009). Estos compuestos cumplen un rol relevante en las cualidades sensoriales de los vinos y otros productos derivados de la vid (Somers y Vérette, 1988; Flanzy, 2003). Los polifenoles se clasifican generalmente en dos familias: No flavonoides y flavonoides. En el caso de los flavonoides, los componentes de mayor concentración presentes en los vinos son los flavonoles, antocianos y flavan-3-oles (Zamora, 2003). Entre estos últimos se encuentran los monómeros de (+)-catequina, (-)-epicatequina y sus posibles formas isoméricas, galoiladas y polimerizadas (Cheynier *et al.*, 2000; Zamora, 2003).

Las semillas poseen principalmente monómeros de (+)-catequina y (-)-epicatequina, los cuales forman parte de la familia de compuestos más abundantes reportados en las bayas y el vino (Prieur *et al.*, 1994; Waterhouse, 2002; Cadot *et al.*, 2006). Estos compuestos se encuentran mayoritariamente presentes en las capas superficiales de las semillas, el integumento externo y las primeras capas de la membrana interna de las semillas, y en menor medida en racimos, tallos y pieles de las bayas (Thorngate y Singleton, 1994; Zoeckelin *et al.*, 2001; Braidot *et al.*, 2008). El carácter principal que aportan los polímeros de flavan-3-oles (taninos condensados o proantocianidinas) se vincula con la sensación de astringencia, los cuales, al combinarse con las glicoproteínas de la saliva, provocan una pérdida de su propiedad lubricante (WatreLOT *et al.*, 2020). Además, se les ha asociado al gusto amargo y se ha estudiado su participación en la textura o cuerpo relacionado con la sensación en boca del vino y la estabilización del color a través del proceso de copigmentación (Pérez y González, 2004; Chira *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2014).

Uno de los factores que afectan significativamente la concentración fenólica en las bayas es el proceso de maduración. En particular, los taninos son sintetizados durante las primeras etapas del desarrollo de la baya hasta fechas cercanas a enero. Luego, se ha observado un cambio en la expresión de los genes que codifican para enzimas en la ruta de síntesis, dando paso a la formación de otros compuestos (Downey *et al.*, 2003). Flanzy (2003), expone que, en el transcurso de la maduración, las capas de la semilla refuerzan su estructura, a diferencia de las paredes de la piel, la cual sufre un proceso de hidrólisis de compuestos estructurales, como las pectinas. Del mismo modo, los taninos condensados de las semillas, compuestos que carecen de color, sufren un proceso de oxidación a medida que avanza la maduración, otorgándole un color café oscuro a las semillas conforme se lignifican (Cadot *et al.*, 2006; Braidot *et al.*, 2008).

Otro factor importante que influye en la disponibilidad de polifenoles corresponde a la variedad de uva vinífera. Dado que, entre las distintas variedades de uva difiere sustancialmente su capacidad de acumulación de fenoles, existen diferencias varietales importantes en los perfiles polifenólicos (Rodríguez *et al.*, 2006). Particularmente, se han observado que las distintas variedades tintas presentarían distinta concentración de taninos totales, grado medio de polimerización y de galoilación, así como una conformación

diferencial de sus procianidinas durante la maduración (Núñez *et al.*, 2006; Fanzone *et al.*, 2011; Rockenback *et al.*, 2011; Obreque-Slier *et al.*, 2012; Pantelić *et al.*, 2016).

Específicamente, se ha observado que las semillas de uva de Carménère muestran un contenido menor de flavan-3-oles monoméricos y (+)-catequina, y un mayor contenido de (-)-epicatequina y ácido gálico, con respecto a Cabernet Sauvignon (Obreque-Slier *et al.*, 2010). Esta última variedad presentaría un menor grado de polimerización de los flavan-3-oles de las semillas que su símil Carménère. En otro estudio complementario realizado en semillas, se observó que las variedades Carménère, Merlot, Cabernet Franc y Cabernet Sauvignon presentaron marcadas diferencias polifenólicas, siendo Cabernet Franc la variedad que resaltó por una mayor concentración de ácido gálico y galatos de procianidina (Obreque-Slier *et al.*, 2012). Otros estudios internacionales han respaldado esta diferenciación fenólica entre las semillas de bayas de *Vitis vinifera*. De este modo, Lacopini *et al.* (2008) reportan contenidos diferenciales de flavan-3-oles, específicamente en la fracción polimérica, así como de fenoles totales en semillas de 7 variedades, entre ellas Cabernet Sauvignon y 4 clones distintos de Sangiovese. Por su parte, Torchio *et al.* (2016), destacaron la diferencia cuantitativa en los fenoles de bajo peso molecular en las semillas de algunas variedades, entre ellas, Cabernet Sauvignon, Petit Verdot y Sangiovese. Por otro lado, Ramhari *et al.* (2019) analizaron las concentraciones de fenoles totales y taninos presentes en las semillas de diversas variedades y encontraron que las semillas de la variedad Cabernet Franc mostraban un mayor contenido en ambos parámetros en comparación a Tempranillo (Ramhari *et al.*, 2019). Por otro lado, Pérez-Navarro *et al.* (2019) encontraron importantes similitudes composicionales entre las semillas de Tempranillo y Tinto Fragoso y Moribel. Según estos autores, estas variedades se diferenciaban específicamente en la proporción de compuestos fenólicos. Esta observación es reforzada por un estudio reciente, en el cual se encontraron diferencias sustanciales en las concentraciones de taninos totales en semillas para todas las variedades analizadas, entre ellas Tempranillo, Cabernet Sauvignon y Merlot (Gombau *et al.*, 2020). En conjunto, estos antecedentes acentúan la idea del efecto sustancial de la variedad como uno de los factores con alta incidencia en la concentración y composición fenólica de las bayas.

A partir de lo mencionado anteriormente, es posible observar que en Chile los estudios de polifenoles en semillas se han desarrollado principalmente en variedades ampliamente distribuidas en territorio nacional. La oferta chilena de variedades se centra en Cabernet Sauvignon (41.098,6 ha), Merlot (11.843,8 ha), País (10.236,5 ha) y Carménère (10.646,8 ha), las cuales representan en conjunto un 73,1% de la superficie cultivada de variedades tintas (SAG, 2018). No obstante, algunas variedades tintas cultivadas en Chile han presentado un crecimiento importante en el último periodo. Así, Sangiovese, Tempranillo, Petit Verdot, Malbec y Cabernet Franc han presentado una tasa de crecimiento del 10,8; 33,6; 20,8; 18,2 y 7,4% entre los años 2012 y 2018, respectivamente. Actualmente, estas variedades alcanzan una superficie cultivada de 135,3; 130,0; 871,8; 2.340,2; 1.646,3 hectáreas, respectivamente. A pesar de la importancia internacional de estas últimas variedades, existe limitada información acerca del comportamiento fenológico de las semillas de variedades menos extendidas en el territorio nacional. Es por ello, que el propósito de este estudio es aportar información actualizada sobre el comportamiento de los polifenoles de las semillas provenientes de estas variedades cultivadas en condiciones edafoclimáticas propias de Chile.

HIPÓTESIS

Las semillas de las variedades Malbec, Tempranillo, Sangiovese, Petit Verdot, Cabernet Franc y Carménère cultivadas en Chile, presentan una composición y concentración fenólica diferenciadora durante la maduración.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la fracción fenólica total de semillas de las variedades Sangiovese, Tempranillo, Petit Verdot, Malbec, Cabernet Franc y Carménère (*Vitis vinifera* L.) en distintas etapas fenológicas de la maduración y hallar alguna característica propia de cada una de ellas.

Objetivos específicos

Describir la evolución de los compuestos fenólicos totales de las semillas de las bayas de Sangiovese, Tempranillo, Petit Verdot, Malbec, Cabernet Franc y Carménère durante la maduración.

Comparar la concentración y composición fenólica total de las semillas de las bayas de Sangiovese, Tempranillo, Petit Verdot, Malbec, Cabernet Franc y Carménère en distintos estados fenológicos para hallar algún rasgo o compuesto diferenciador entre las variedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio

El estudio se realizó en las dependencias de la empresa Agrícola Teno Ltda., ubicada en la Región del Libertador Bernardo O'Higgins, Valle de Cachapoal, específicamente en el kilómetro 69 de la Ruta 5 Sur (coordenadas 34°09'57,87'' S y 70°46'10,51'' O). Los análisis se realizaron en los laboratorios de Análisis Enológico y de Análisis Cromatográfico del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Material biológico

En el estudio se utilizaron semillas provenientes de las uvas de seis cultivares de *Vitis vinifera* L.: Sangiovese, Tempranillo, Petit Verdot, Malbec, Cabernet Franc y Carménère de la temporada 2019. Las semillas fueron obtenidas de los racimos de plantas de 8 años, establecidas en un marco de plantación de 2 metros entre hilera y 1 metro sobre hilera, bajo un sistema de conducción en espaldera.

Los viñedos se encontraron bajo similares condiciones hídricas, ambientales y agronómicas. Las plantas estaban cultivadas en suelos pertenecientes a la serie Graneros, los cuales son de origen aluvial, estratificados, constituidos por gravas y piedras con matriz arenosa y con una profundidad efectiva variable entre 70-120 cm. Además, son suelos de baja pendiente (0-1%), con una capacidad de drenaje moderado y de permeabilidad moderadamente rápida con un lento escurrimiento superficial. El riego se suministró mediante mangueras con goteros de 4 litros/hora y se aplicaron alrededor de 650 litros de agua/planta entre octubre y abril. Durante la temporada 2018 la precipitación media fue de 96,2 mm concentrados principalmente en invierno (mes de junio). Las temperaturas medias parciales fluctuaron entre 1,8 a 23,6 °C, con una acumulación de horas frío ($T^{\circ} < 7^{\circ}\text{C}$) de 940 UF, sin heladas en brotación (5 de septiembre) y una evapotranspiración total de 4,4 mm/día promedio a lo largo del año.

El terreno presentó una extensión de 24 hectáreas (4 ha cada variedad) y la producción de uva varió entre 12 y 14 ton/ha. Las plantas fueron manejadas con un protocolo fitosanitario estándar que consideró la aplicación temprana a principios de brotación (10 cm de brote) del ingrediente activo Topas (Syngenta) de modo preventivo y según instrucciones de la etiqueta. Posteriormente, se realizaron aplicaciones de azufre en polvo cada 7 a 10 días, dependiendo de las condiciones de humedad, entre brotación y cuaja para el control de enfermedades producidas por especies de hongos pertenecientes a los géneros *Oidium*. No fueron necesarias otro tipo de controles para *Botrytis cinerea*. A las plantas del ensayo no se les aplicó ningún manejo de canopia (deshojes o desbrotes). Para cada una de las variedades se seleccionó un

grupo de 200 bayas por planta en cada muestreo; 100 de ellas utilizadas para los análisis básicos y las 100 bayas restantes utilizadas para realizar los análisis de polifenoles.

Equipamiento

El equipamiento utilizado fue un potenciómetro (Thermo Scientific, modelo Orion Star A211, Massachusetts, EE. UU.), un vórtex (Mixer, modelo VM-2000, Taiwan), una centrífuga (Hettich, modelo Universal 320, Alemania), un equipo de ultrasonido (Tecnigen modelo, YJ5120-1), un rotavapor (Buchi, modelo R-300, Suiza). Para el fraccionamiento se utilizaron cartuchos de 400 y 900 mg de sorbente (marca Waters Sep-Pak® tC18, Dublín, Irlanda), adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania). Para las mediciones espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro marca Shimadzu (modelo UV-1800 Pharma Spec, Kioto, Japón). Para el análisis de los fenoles de bajo peso molecular se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC-DAD) marca Agilent Technologies modelo 1200, constituido por un detector de arreglo de fotodiodos alineados (DAD) modelo G1315B, una bomba cuaternaria modelo G1311A, un inyector automático modelo AL1329A y una columna Nova-Pak C18 (tamaño de partícula 4 µm, 300 x 3,9 mm). Los reactivos grado pro-análisis y grado HPLC fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania), mientras que los estándares de compuestos de bajo peso molecular se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, EE. UU.).

Tratamientos y diseño experimental

Este estudio fue realizado con un diseño completamente aleatorizado (DCA) con estructura de parcelas divididas, en donde los factores correspondieron a la variedad y al estado fenológico de cosecha. Se realizaron 18 tratamientos que constaron del factor variedad, con 6 niveles, correspondientes a cada una de las cepas (Carménère, Cabernet Franc, Malbec Tempranillo, Petit Verdot y Sangiovese). El factor tiempo presentó 3 niveles correspondientes a los 3 momentos de la maduración en los cuales fueron colectadas las bayas: Carménère, Cabernet Franc y Petit Verdot (15, 43 y 64 días después de plena pinta); Sangiovese, Tempranillo y Malbec (15, 50 y 68 días después de plena pinta). Además, se efectuaron 3 repeticiones por tratamiento correspondientes a una hilera cada una, con una hilera de separación entre repetición (20 plantas/repetición). La unidad experimental correspondió a un grupo de 20 plantas y la unidad muestral a las semillas de 100 bayas.

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente: $Y_{ijk} = \mu + V_i + T_j + (VT)_{ij} + P_i + \epsilon_{ijk}$. Donde Y_{ijk} correspondió a la variable de respuesta medida en la ijk -ésima unidad experimental; μ a la media general; V_i al efecto de la variedad (tratamiento de parcela grande); T_j al efecto del estado fenológico (tratamiento de parcela pequeña); $(VT)_{ij}$ al efecto de la interacción variedad y estado fenológico; P_i al error de parcela grande; ϵ_{ijk} al error de parcela pequeña $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ $j = 1, 2, 3$.

Manejo del experimento

Para cada una de las variedades, fueron seleccionados de forma aleatorizada 5 racimos por planta, a partir de los cuales se apartaron 2 bayas de distintas partes del racimo, con un total de 10 bayas por cada 20 plantas (200 bayas por repetición). Las bayas fueron cosechadas con su pedicelo, seleccionadas manualmente y depositadas inmediatamente en un depósito refrigerado de modo de mantenerlas en condiciones adecuadas. Luego de su transporte al laboratorio, las muestras destinadas a los análisis de polifenoles fueron almacenadas a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras las muestras para los análisis básicos fueron analizadas inmediatamente. Una vez cosechadas la totalidad de las muestras del estudio, las bayas para los análisis de polifenoles fueron descongeladas. A continuación, se extrajeron manualmente las semillas con la ayuda de pinzas, para luego ser secadas con un papel y pesadas. Posteriormente, fueron preparados los extractos necesarios para realizar las evaluaciones.

Variables a medir

Análisis químico general

Los análisis globales fueron realizados según lo descrito por Bordeau y Scarpa (1998):

- a. pH, mediante potenciometría.
- b. Acidez de titulación, mediante titulación con NaOH 0,1N.
- c. Sólidos solubles, mediante refractometría.

Análisis de polifenoles

Los polifenoles fueron extraídos desde las semillas según la metodología propuesta por Izquierdo-Hernández *et al.* (2015), la cual es descrita como altamente eficiente en la extracción y se ha utilizado para estudiar la cantidad total de polifenoles en semillas y hollejos. Para ello, se utilizó un matraz Erlenmeyer en el cual fueron mezclados 5 gramos de semillas previamente trituradas con 100 mL de solución metanol/agua 1/1 (v/v) ajustada a pH 3.0 con HCl. Se dejó macerar durante 1 hora a 20°C mediante agitación mecánica, y luego de apartar este primer extracto en un vaso precipitado, el mismo material vegetal se mezcló con 100 mL de una solución de acetona/agua 4/1 (v/v) ajustada a pH 3.0 con HCl y se maceró durante una hora a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, igualmente mediante agitación mecánica. Se mezclaron ambos extractos (200 mL) y se centrifugó la muestra compuesta a 800 g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de tamaño de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Finalmente, el extracto obtenido se evaporó bajo presión reducida a 30°C , para posteriormente ser reconstituido a 200 mL con agua destilada. Los análisis realizados con este extracto fueron los siguientes:

1. Análisis espectrofotométricos:

- a. Fenoles totales. Se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda 280 nm (García-Barceló, 1990).

- b. Taninos totales. Esta determinación se realizó mediante el uso de metilcelulosa (Mercurio *et al.*, 2007).
- c. Intensidad colorante. Se realizó por espectrofotometría midiendo las absorbancias a 420 nm, 520 nm, 620 nm (Glories, 1978).
- d. Matiz del color. Se realizó por espectrofotometría estimando la relación entre las absorbancias a 420 nm/520 nm (Glories, 1978).
- e. Coordenadas cromáticas (Espacio CIElab). Se realizó por análisis espectrofotométrico a distintas longitudes de onda para determinar los parámetros L* (luminosidad), a* (de rojo a verde), b* (de amarillo a azul) (OIV, 2006).
- f. Fraccionamiento de taninos. Se realizó mediante la separación flavánica en columnas y posterior reacción con vainillina en medio ácido, de acuerdo el método descrito por Sun *et al.* (1998) y Monagas *et al.* (2003).

2. Análisis por HPLC-DAD:

- a. Compuestos fenólicos de bajo peso molecular. La evaluación se realizó mediante el método utilizado por Obreque-Slier *et al.* (2010).

Análisis estadístico

Los resultados de las evaluaciones fueron sometidos a un análisis de “modelos lineales mixtos” (MLM) con un $p \leq 0,05$ para detectar diferencias significativas entre los tratamientos. En el caso de encontrarse diferencias significativas estadísticas entre los tratamientos se llevó a cabo una prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher, con un nivel de significancia del 5%, para determinar diferencias entre los tratamientos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software InfoStat.

RESULTADOS

Análisis generales

En el Cuadro 1 se muestran los valores y la evolución de distintos parámetros estudiados de las bayas de las variedades Carménère, Cabernet Franc, Malbec, Petit Verdot, Sangiovese y Tempranillo.

Cuadro 1. Parámetros analíticos generales en bayas de durante la maduración.

		Análisis básicos								
		1° Muestreo			2° Muestreo			3° Muestreo		
Peso de baya (g/50 bayas)	Carménère	88,6 ±	4,0 A	a	91,1 ±	4,0 A	a	88,0 ±	7,3 A	ab
	Cabernet Franc	51,8 ±	2,9 AB	c	52,8 ±	3,1 A	c	46,1 ±	3,3 B	d
	Malbec	51,1 ±	6,2 B	c	74,1 ±	7,7 A	b	80,3 ±	5,4 A	bc
	Petit Verdot	46,4 ±	6,5 A	c	46,7 ±	3,8 A	c	44,4 ±	0,7 A	d
	Sangiovese	73,3 ±	11,4 A	b	74,7 ±	10,1 A	b	75,1 ±	8,1 A	c
	Tempranillo	82,0 ±	4,0 B	ab	83,0 ±	3,8 B	ab	92,9 ±	4,4 A	a
Diámetro (promedio en 50 bayas)	Carménère	1,33 ±	0,0 A	a	1,33 ±	0,1 A	a	1,33 ±	0,0 A	ab
	Cabernet Franc	1,09 ±	0,0 A	c	1,06 ±	0,0 A	c	1,09 ±	0,0 A	c
	Malbec	1,12 ±	0,1 A	bc	1,17 ±	0,1 A	b	1,15 ±	0,1 A	bc
	Petit Verdot	1,05 ±	0,1 A	c	1,02 ±	0,1 A	c	1,08 ±	0,1 A	c
	Sangiovese	1,23 ±	0,1 A	ab	1,16 ±	0,0 A	b	1,22 ±	0,0 A	abc
	Tempranillo	1,31 ±	0,0 A	a	1,27 ±	0,0 A	a	1,35 ±	0,1 A	a
pH	Carménère	3,57 ±	0,0 C	a	3,93 ±	0,1 B	a	4,05 ±	0,0 A	a
	Cabernet Franc	3,24 ±	0,0 C	b	3,69 ±	0,0 B	b	3,93 ±	0,1 A	b
	Malbec	2,89 ±	0,0 C	d	3,60 ±	0,0 B	b	3,72 ±	0,1 A	c
	Petit Verdot	2,97 ±	0,1 B	c	3,30 ±	0,2 A	c	3,53 ±	0,0 A	d
	Sangiovese	2,88 ±	0,0 B	d	3,41 ±	0,1 A	c	3,34 ±	0,0 A	e
	Tempranillo	3,25 ±	0,0 C	b	3,86 ±	0,0 B	a	3,95 ±	0,1 A	b
Sólidos solubles (°Brix)	Carménère	20,5 ±	0,6 C	b	25,0 ±	0,4 B	d	26,6 ±	0,5 A	c
	Cabernet Franc	22,0 ±	0,2 C	a	27,5 ±	0,1 B	a	29,3 ±	0,7 A	a
	Malbec	16,5 ±	0,4 B	d	23,8 ±	0,5 A	e	24,4 ±	0,5 A	d
	Petit Verdot	21,4 ±	0,5 C	a	26,7 ±	0,5 B	b	27,9 ±	0,3 A	b
	Sangiovese	17,9 ±	0,6 C	c	26,3 ±	0,3 B	bc	28,2 ±	0,6 A	b
	Tempranillo	18,5 ±	0,4 C	c	23,6 ±	0,5 B	cd	27,5 ±	0,3 A	bc
Acidez de titulación (g AT/L)	Carménère	9,5 ±	0,8 A	d	6,7 ±	1,0 B	bc	5,6 ±	0,6 B	b
	Cabernet Franc	13,8 ±	0,4 A	c	6,6 ±	0,8 B	bc	6,0 ±	1,4 B	b
	Malbec	17,1 ±	0,5 A	b	8,2 ±	0,4 B	b	7,3 ±	0,8 B	b
	Petit Verdot	21,9 ±	4,9 A	a	14,3 ±	1,1 B	a	10,8 ±	0,5 B	a
	Sangiovese	14,1 ±	0,6 A	bc	13,4 ±	1,9 A	a	12,7 ±	2,8 A	a
	Tempranillo	13,0 ±	2,5 A	c	6,0 ±	0,1 B	c	5,4 ±	0,1 B	b

Promedios ± desviación estándar (n=3). Letras minúsculas distintas en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre las variedades en cada muestreo. Letras mayúsculas distintas en sentido horizontal indican diferencias significativas para una misma variedad en los distintos tiempos de muestreo (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$). AT: ácido tartárico.

Durante la maduración, el diámetro de las bayas no varió entre las variedades, ni se observaron diferencias en el peso de las bayas a excepción de las variedades Tempranillo y Malbec, en las cuales este último parámetro aumentó hacia el tercer muestreo. De cualquier modo, los mayores valores en el peso y diámetro de baya fueron registrados para la variedad Carménère y Tempranillo. Por otro lado, el pH y °Brix de las bayas de todas las variedades estudiadas aumentó durante el estudio, mientras que la acidez de titulación disminuyó, a excepción de Sangiovese que se mostró inalterable. Comparativamente, Carménère presentó los mayores valores de pH y Sangiovese los menores valores durante la maduración, mientras que esta última variedad junto a Petit Verdot presentaron los mayores valores de acidez en el último muestreo. Por último, las bayas de Cabernet Franc y Malbec presentaron los mayores y menores contenidos de sólidos solubles, respectivamente.

Composición fenólica de las semillas de uva durante la maduración

En la Figura 1, se muestra la evolución de la concentración de fenoles y taninos totales de las semillas estudiadas. Durante la maduración las variedades Carménère, Cabernet Franc, Petit Verdot, Sangiovese y Tempranillo presentaron un comportamiento decreciente en la concentración de fenoles, mientras que, en el caso del contenido de taninos totales, no se observaron diferencias cuantitativas entre el primer y tercer muestreo, a excepción de Petit Verdot. Al realizar un análisis comparativo entre las variedades, se observó que, en los últimos dos muestreos, las semillas de Cabernet Franc y Petit Verdot presentaron los mayores contenidos de fenoles totales, mientras que Sangiovese los menores contenidos de estos metabolitos. Asimismo, las semillas de Cabernet Franc presentaron el mayor contenido de taninos totales en los últimos muestreos, mientras que Sangiovese presentó los menores contenidos de estos compuestos durante todo el estudio.

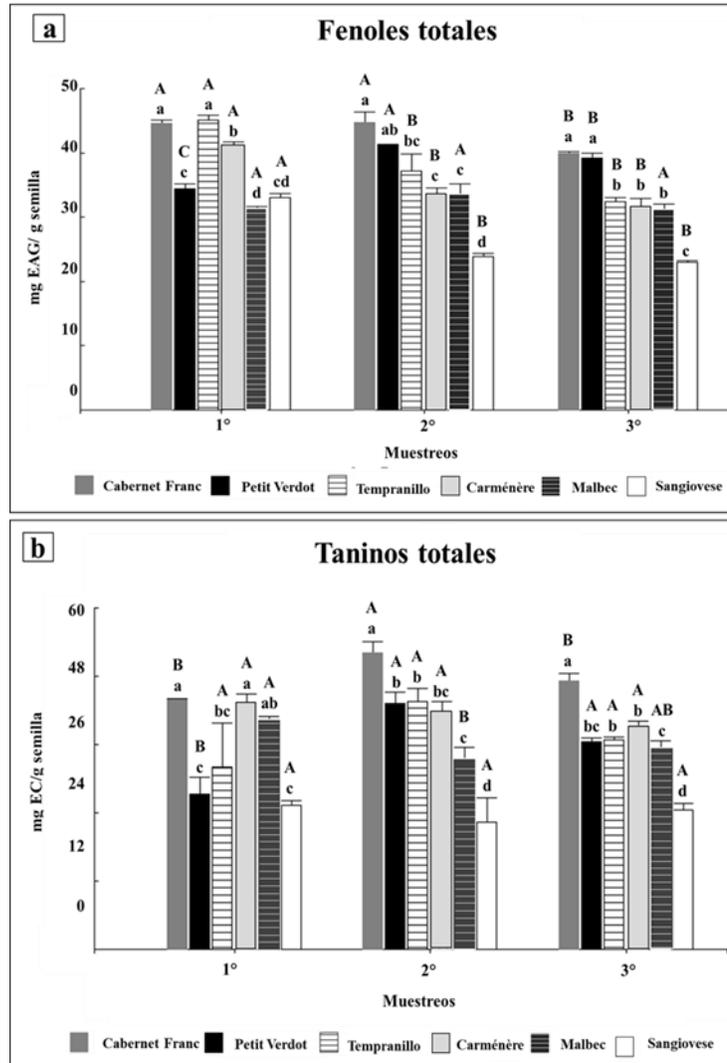


Figura 1. Evolución de la concentración de fenoles totales (a) y taninos totales (b) en semillas de los cultivares Cabernet Franc, Petit Verdot, Tempranillo, Carménère, Malbec y Sangiovese durante la maduración. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las variedades en cada muestreo. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas para una misma variedad en los distintos tiempos de muestreo (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$). EAG, equivalentes de ácido gálico; EC, equivalente de (+)-catequina.

Identificación de parámetros CIElab y variables colorimétricas

La Figura 2, muestra la evolución de los parámetros de intensidad colorante, matiz y parámetros CIElab, L^* [luminosidad (100: blanco perfecto y 0: negro)], a^* [varía entre el color rojo (+) al verde (-)] y b^* [varía entre el color amarillo (+) al azul (-)], determinados en los extractos de semillas de los cultivares del estudio.

Durante la maduración solo las variedades Carménère, Cabernet Franc y Sangiovese mostraron incrementos en los valores de luminosidad (L^*). Asimismo, los valores de la coordenada a^* disminuyeron solo en Cabernet Franc, Malbec y Sangiovese mientras que se observó que el valor de b^* disminuyó gradualmente en los extractos de Carménère, Cabernet Franc y Sangiovese. En el resto de las variedades de uva no se observaron cambios significativos en los parámetros CIElab.

El análisis comparativo entre las variedades demostró que los extractos no presentaron valores diferenciales de luminosidad durante los distintos muestreos. Por otro lado, los extractos de las semillas de Carménère, Cabernet Franc, y Tempranillo mantuvieron los valores más altos de a^* , mientras que Malbec y Petit Verdot los menores de este parámetro en los muestreos extremos. Finalmente, Sangiovese presentó los valores más altos de b^* , mientras que los extractos de Malbec y Tempranillo los valores más bajos en esta coordenada.

En el caso de otras variables colorimétricas, se observó que los valores de intensidad colorante de los extractos de Carménère, Cabernet Franc, Malbec y Sangiovese disminuyeron gradualmente hacia el final del estudio, mientras que en los extractos de Petit Verdot y Tempranillo no se observaron cambios. Por el contrario, los valores de matiz detectados en los extractos de Cabernet Franc y Sangiovese aumentaron significativamente durante el estudio y en el resto de las variedades no se observó variación alguna. Al comparar ambos parámetros entre las variedades, se detectó que los extractos de Sangiovese y Malbec presentaron una mayor y menor intensidad de color respectivamente en la tercera fecha de muestreo. Del mismo modo, los extractos de Sangiovese presentaron el mayor matiz, mientras que las semillas de Tempranillo y Carménère los menores valores en el último muestreo.

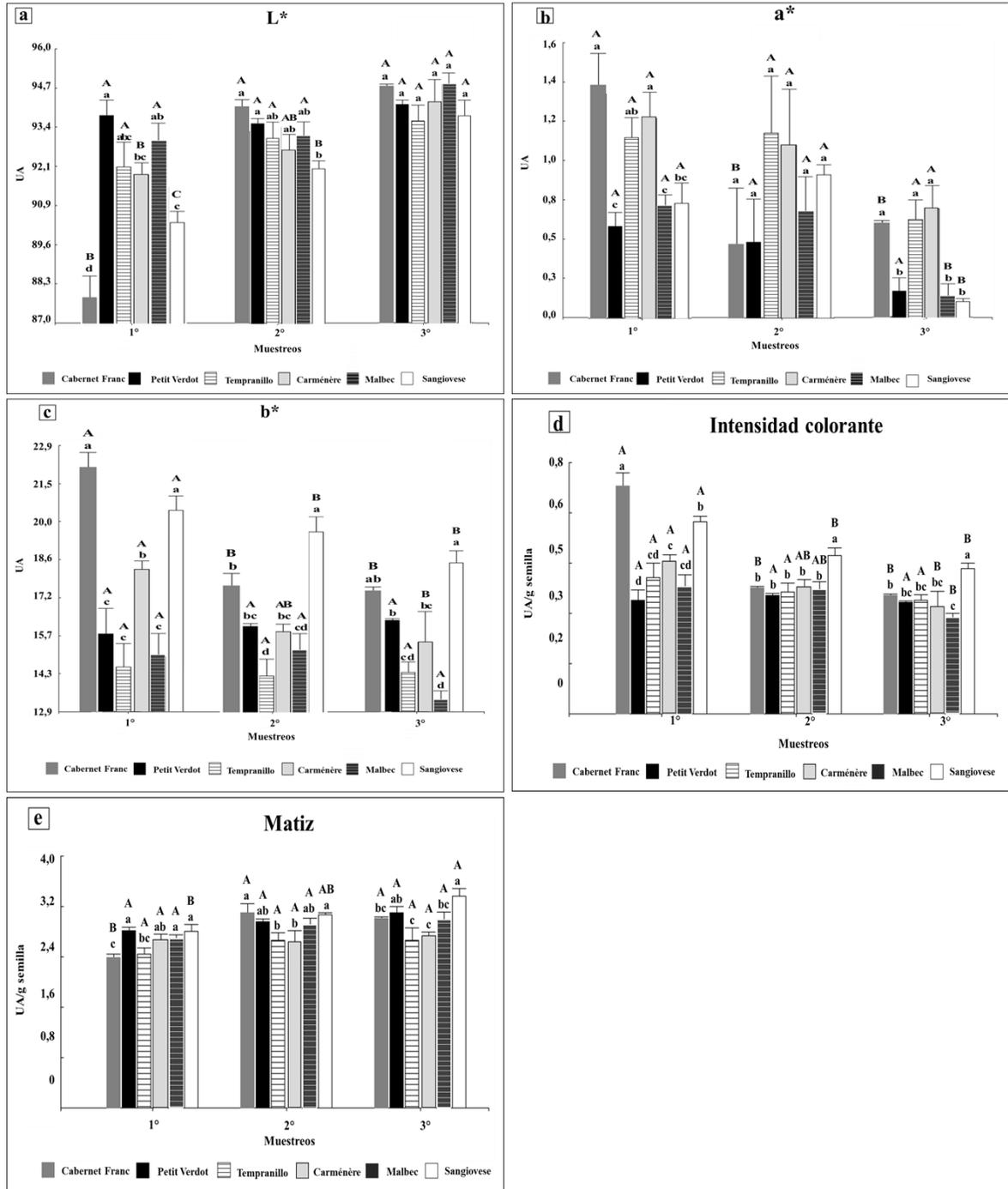


Figura 2. Evolución de los parámetros del color en extractos de semillas de cultivar Cabernet Franc, Carménère, Malbec, Petit Verdot, Sangiovese y Tempranillo durante la maduración. (a) coordenada cromática L*, luminosidad; (b) coordenada cromática a*; (c) coordenada cromática b*; (d) intensidad colorante y (d) matiz. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las variedades en cada muestreo. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas para una misma variedad en los distintos tiempos de muestreo (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$). UA, Unidades de absorbancia.

Concentración de fenoles de bajo peso molecular cuantificados por HPLC-DAD

El Cuadro 2 muestra la concentración de los distintos compuestos fenólicos de bajo peso molecular identificados y cuantificados por HPLC-DAD. En general, se observó que la concentración de la mayoría de los fenoles identificados disminuyó durante el estudio, con excepción del dímero de proantocianidina B2 (epicatequina-(4 β →8)-epicatequina) el cual mostró un aumento en las variedades Cabernet Franc, Malbec, Petit Verdot, y Sangiovese. Sin embargo, diversos fenoles de bajo peso se mantuvieron inalterables durante la maduración, para algunas variedades tales como, Sangiovese en ácido gálico; Cabernet Franc, Carménère y Petit Verdot en dímeros B1, B3 y B4, trímero C1, B4-3'-*O*-galato y procianidinas galoiladas; Carménère, Petit Verdot y Malbec en las concentraciones de galatos de procianidina dimérica; Tempranillo y Carménère en el contenido del dímero B2; Carménère y Petit Verdot en (-)-epicatequina, y B1-3'-*O*-Galato en esta última variedad.

Cuadro 2. Contenido de fenoles de bajo peso molecular durante la maduración (mg/kg).

		1° Muestreo			2° Muestreo			3° Muestreo		
GA	Carménère	47,4 ±	4,4 A	c	37,2 ±	2,9 B	d	40,5 ±	5,7 AB	d
	Cabernet Franc	79,8 ±	6,7 A	b	67,8 ±	3,4 B	b	81,3 ±	4,3 A	b
	Malbec	114,5 ±	18,7 A	a	62,1 ±	3,8 B	b	57,2 ±	4,5 B	c
	Petit Verdot	106,4 ±	10,8 A	a	96,6 ±	4,7 A	a	103,8 ±	10,2 A	a
	Sangiovese	67,1 ±	5,7 A	b	64,9 ±	8,0 A	b	61,7 ±	6,3 A	c
	Tempranillo	100,3 ±	3,8 A	a	47,0 ±	5,6 B	c	35,9 ±	6,0 C	d
C	Carménère	589,6 ±	146,5 A	d	338,8 ±	50,4 B	d	283,2 ±	119,0 B	d
	Cabernet Franc	2183,8 ±	149,3 A	b	1307,8 ±	81,4 B	b	1272,7 ±	129,9 B	b
	Malbec	5040,5 ±	441,8 A	a	1450,2 ±	185,5 B	b	1232,5 ±	193,3 B	b
	Petit Verdot	5092,7 ±	416,8 A	a	4273,5 ±	234,3 B	a	3995,7 ±	457,2 B	a
	Sangiovese	2695,2 ±	242,4 A	b	773,2 ±	127,0 B	c	704,8 ±	101,7 B	c
	Tempranillo	1332,6 ±	172,3 A	c	326,4 ±	35,3 B	d	195,1 ±	70,6 B	d
EC	Carménère	781,9 ±	133,6 A	e	597,7 ±	69,8 A	c	568,6 ±	192,3 A	c
	Cabernet Franc	1838,9 ±	191,3 A	c	1394,3 ±	79,9 B	b	1439,2 ±	40,4 B	b
	Malbec	3651,2 ±	211,9 A	a	1411,5 ±	176,3 B	b	1296,3 ±	108,0 B	b
	Petit Verdot	2531,9 ±	224,4 A	b	2455,3 ±	53,5 A	a	2300,3 ±	447,6 A	a
	Sangiovese	3658,9 ±	138,7 A	a	1539,3 ±	229,2 B	b	1500,3 ±	220,2 B	b
	Tempranillo	1208,6 ±	120,4 A	d	371,6 ±	45,4 B	c	267,2 ±	70,6 B	c
ECG	Carménère	401,4 ±	49,0 A	c	207,5 ±	19,2 B	b	123,8 ±	6,2 C	bc
	Cabernet Franc	828,6 ±	114,8 A	b	232,5 ±	29,4 B	b	147,2 ±	40,2 B	b
	Malbec	924,2 ±	90,9 A	b	129,6 ±	3,8 B	cd	84,4 ±	31,4 B	cd
	Petit Verdot	1034,8 ±	269,8 A	b	495,7 ±	76,9 B	a	391,2 ±	25,2 B	a
	Sangiovese	1564,1 ±	406,8 A	a	192,4 ±	15,7 B	bc	113,3 ±	8,1 B	bc
	Tempranillo	441,7 ±	41,0 A	c	121,6 ±	13,1 B	d	64,6 ±	11,0 C	d
B1	Carménère	78,7 ±	5,8 A	c	62,6 ±	9,4 A	c	61,5 ±	26,1 A	cd
	Cabernet Franc	96,7 ±	2,0 A	bc	83,3 ±	9,8 A	b	95,4 ±	12,1 A	b
	Malbec	149,7 ±	6,3 A	a	76,5 ±	4,0 B	bc	64,4 ±	12,8 B	c
	Petit Verdot	169,6 ±	19,8 A	a	170,3 ±	14,9 A	a	190,0 ±	6,1 A	a
	Sangiovese	115,5 ±	10,2 A	b	42,1 ±	4,7 B	d	36,9 ±	1,4 B	e
	Tempranillo	95,1 ±	20,5 A	bc	68,8 ±	6,4 B	bc	38,6 ±	7,5 C	de

B2	Carménère	259,1 ± 27,5	A	ab	325,4 ± 20,1	A	a	346,5 ± 130,5	A	ab
	Cabernet Franc	260,3 ± 17,8	C	ab	338,6 ± 26,9	B	a	396,1 ± 23,0	A	a
	Malbec	251,1 ± 12,8	B	ab	374,1 ± 64,3	A	a	371,8 ± 44,5	A	ab
	Petit Verdot	265,6 ± 44,2	B	a	380,1 ± 13,9	A	a	423,9 ± 48,4	A	a
	Sangiovese	217,1 ± 27,6	B	b	265,3 ± 21,3	A	b	265,1 ± 9,5	A	bc
	Tempranillo	124,7 ± 15,0	A	c	185,4 ± 28,1	A	c	165,7 ± 43,2	A	c
B3	Carménère	82,1 ± 6,7	A	d	71,5 ± 9,3	A	c	62,5 ± 26,1	A	c
	Cabernet Franc	128,6 ± 4,2	A	c	118,8 ± 10,0	A	b	131,5 ± 10,1	A	b
	Malbec	173,4 ± 15,0	A	b	134,2 ± 8,0	B	b	116,7 ± 24,5	B	b
	Petit Verdot	274,6 ± 27,8	A	a	307,5 ± 24,6	A	a	313,9 ± 21,2	A	a
	Sangiovese	81,2 ± 4,0	A	d	57,5 ± 8,4	B	c	53,2 ± 4,5	B	c
	Tempranillo	142,8 ± 26,0	A	c	67,5 ± 9,3	B	c	45,1 ± 15,7	B	c
B4	Carménère	103,6 ± 14,8	A	c	107,0 ± 6,9	A	e	103,6 ± 44,3	A	c
	Cabernet Franc	156,7 ± 11,3	A	b	154,7 ± 15,6	A	c	178,2 ± 10,1	A	b
	Malbec	277,5 ± 10,8	A	a	233,3 ± 20,6	AB	b	212,0 ± 32,8	B	b
	Petit Verdot	269,3 ± 50,7	A	a	323,3 ± 22,1	A	a	338,5 ± 38,7	A	a
	Sangiovese	159,1 ± 5,8	A	b	139,2 ± 19,1	A	cd	108,0 ± 6,4	B	c
	Tempranillo	165,9 ± 37,2	A	b	114,7 ± 9,0	AB	de	86,2 ± 25,5	B	c
B1G	Carménère	189,5 ± 14,0	A	cd	130,1 ± 22,3	B	c	116,2 ± 25,9	B	c
	Cabernet Franc	267,8 ± 24,1	A	b	195,1 ± 16,9	B	b	191,1 ± 14,2	B	b
	Malbec	284,9 ± 18,4	A	b	85,1 ± 3,7	B	de	73,5 ± 19,7	B	de
	Petit Verdot	388,9 ± 85,2	A	a	393,0 ± 25,3	A	a	392,8 ± 35,3	A	a
	Sangiovese	254,3 ± 7,4	A	bc	100,0 ± 11,3	B	d	92,5 ± 3,4	B	cd
	Tempranillo	183,9 ± 25,2	A	d	69,8 ± 11,2	B	e	46,8 ± 4,3	B	e
B4G	Carménère	76,2 ± 4,9	A	b	71,1 ± 3,2	A	c	64,6 ± 10,7	A	c
	Cabernet Franc	91,9 ± 2,6	A	ab	89,6 ± 4,5	A	b	91,0 ± 12,1	A	b
	Malbec	73,3 ± 4,5	A	b	64,8 ± 2,2	AB	c	56,9 ± 13,2	B	c
	Petit Verdot	111,4 ± 23,4	A	a	137,7 ± 7,8	A	a	138,0 ± 6,4	A	a
	Sangiovese	52,3 ± 2,8	A	c	49,0 ± 2,6	A	d	41,8 ± 2,4	B	d
	Tempranillo	74,9 ± 14,5	A	b	46,5 ± 5,2	B	d	34,9 ± 6,1	B	d
GPs	Carménère	17,6 ± 0,4	A	c	16,7 ± 1,4	A	c	15,5 ± 2,7	A	c
	Cabernet Franc	32,8 ± 1,3	A	a	22,3 ± 2,0	B	a	23,4 ± 3,7	B	a
	Malbec	5,3 ± 1,2	A	d	0,0 ± 0,0	A	d	0,0 ± 0,0	A	d
	Petit Verdot	20,5 ± 1,0	A	bc	20,0 ± 0,7	A	b	20,9 ± 1,5	A	ab
	Sangiovese	15,1 ± 0,1	A	c	15,9 ± 0,8	A	c	0,0 ± 0,0	B	d
	Tempranillo	26,2 ± 4,7	A	ab	22,0 ± 1,3	AB	ab	17,2 ± 2,5	B	bc
C1	Carménère	42,8 ± 4,7	A	d	40,8 ± 4,2	A	c	35,1 ± 15,0	A	c
	Cabernet Franc	64,6 ± 3,9	A	c	57,3 ± 7,4	A	b	61,7 ± 9,1	A	b
	Malbec	85,2 ± 4,4	A	b	59,8 ± 7,9	B	b	53,9 ± 8,3	B	b
	Petit Verdot	107,9 ± 15,1	A	a	107,9 ± 6,0	A	a	119,2 ± 7,7	A	a
	Sangiovese	54,6 ± 2,1	A	cd	39,7 ± 3,0	B	c	33,5 ± 1,6	C	c
	Tempranillo	54,9 ± 10,5	A	cd	40,3 ± 3,0	B	c	28,8 ± 5,4	B	c

	Carménère	534,4 ± 28,9 A b	510,5 ± 69,6 A b	410,4 ± 128,7 A b
	Cabernet Franc	741,5 ± 54,0 A a	697,6 ± 87,2 A a	738,3 ± 61,5 A a
Ps	Malbec	86,5 ± 23,6 A d	32,0 ± 4,1 B f	55,7 ± 34,1 AB d
	Petit Verdot	338,5 ± 126,3 A c	399,1 ± 21,1 A c	367,2 ± 88,6 A b
	Sangiovese	194,3 ± 8,6 A d	135,2 ± 11,1 B e	127,0 ± 8,4 B cd
	Tempranillo	503,4 ± 85,5 A b	302,2 ± 39,0 B d	28,8 ± 5,4 B c

Promedios ± desviación estándar (n=3). Letras minúsculas distintas en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre las variedades en cada muestreo. Letras mayúsculas distintas en sentido horizontal indican diferencias significativas para una misma variedad en los distintos tiempos de muestreo (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$). GA, ácido gálico; C, (+)-catequina; EC, (-)-epicatequina; ECG, (-)-epicatequina 3'-O-galato; B1, epicatequina-(4 β →8)-catequina; B2, epicatequina-(4 β →8)-epicatequina; B3, catequina-(4 α →8)-catequina; B4, catequina-(4 α →8)-epicatequina; B1G, epicatequina 3'-O-galato-(4 β →8)-catequina; B4G, catequina-(4 α →8)-epicatequina 3'-O-galato; GPs, galatos de procianidina dimérica; C1, epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina; Ps, otras proantocianidinas galoiladas.

Con respecto a las diferencias cuantitativas entre variedades, se observó que, en los dos últimos muestreos, Petit Verdot presentó las concentraciones más altas de ácido gálico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina 3'-O-galato y proantocianidinas B1, B4 y B4G, B1G, B3 y C1 a lo largo de toda la maduración. Por su parte, Cabernet Franc presentó los mayores contenidos de galatos de procianidinas y otras procianidinas galoiladas en a lo menos dos muestreos. Contrariamente, algunas variedades destacaron por sus bajas concentraciones en ciertos fenoles de bajo peso molecular. Así, en la variedad Malbec, se registraron las menores concentraciones de estos últimos compuestos (galatos de procianidinas y procianidinas galoiladas) en toda la maduración. Asimismo, se observó que las semillas de Carménère mantuvieron las concentraciones más bajas de ácido gálico y (+)-catequina en todos los muestreos respecto a las demás variedades. Del mismo modo, las semillas de Tempranillo destacaron por las concentraciones más bajas de (-)-epicatequina 3'-O-galato y procianidinas B2 y B1G durante los 3 muestreos. En Tempranillo y Carménère, los compuestos de (-)-epicatequina y dímero B4 fueron los más bajos en dos y tres muestreos, respectivamente. En cuanto a las semillas de la variedad Sangiovese, estas solo se distinguieron por presentar bajas concentraciones durante la maduración en algunos compuestos, tales como B3, C1 y B4G. Sin embargo, esta tendencia también se observó en otras variedades, como Carménère (B3 y C1) y Tempranillo (C1 y B4G). Puntualmente, los galatos de procianidina dimérica desaparecieron abruptamente en el segundo y tercer muestreo en las variedades Malbec y Sangiovese respectivamente. Nótese que las semillas de Carménère, Cabernet Franc, Malbec y Petit Verdot presentaron similares contenidos de procianidina B2 durante todo el estudio.

Concentración de las fracciones mono, oligo y poliméricas de flavan-3-oles

En la Figura 3, se muestra la concentración de las distintas fracciones flavánicas de los extractos de semillas de las variedades estudiadas. Cuantitativamente, se observó que la fracción polimérica fue la más abundante, seguida de la oligomérica y monomérica en todos los extractos de semillas.

En la mayoría de las variedades se observó una disminución de todas las fracciones de flavan-3-oles a lo largo del estudio. Excepcionalmente, las semillas de la variedad Tempranillo presentaron un aumento de la fracción polimérica hacia el final del estudio. Por otro lado, las semillas de Carménère no mostraron diferencias significativas en el contenido de la fracción oligomérica de proantocianidinas, mientras que las semillas de las variedades Malbec y Petit Verdot mantuvieron concentraciones homogéneas de polímeros de proantocianidinas durante la maduración.

Comparativamente, se observó que las semillas de Petit Verdot presentaron las concentraciones más altas de monómeros y oligómeros de flavan-3-ol, mientras que Tempranillo las concentraciones más bajas de ambas fracciones. Por otro lado, la variedad Cabernet Franc destacó por los valores más altos de polímeros de proantocianidinas, al contrario de las semillas de Sangiovese que se distinguieron por sus valores más bajos de estos compuestos.

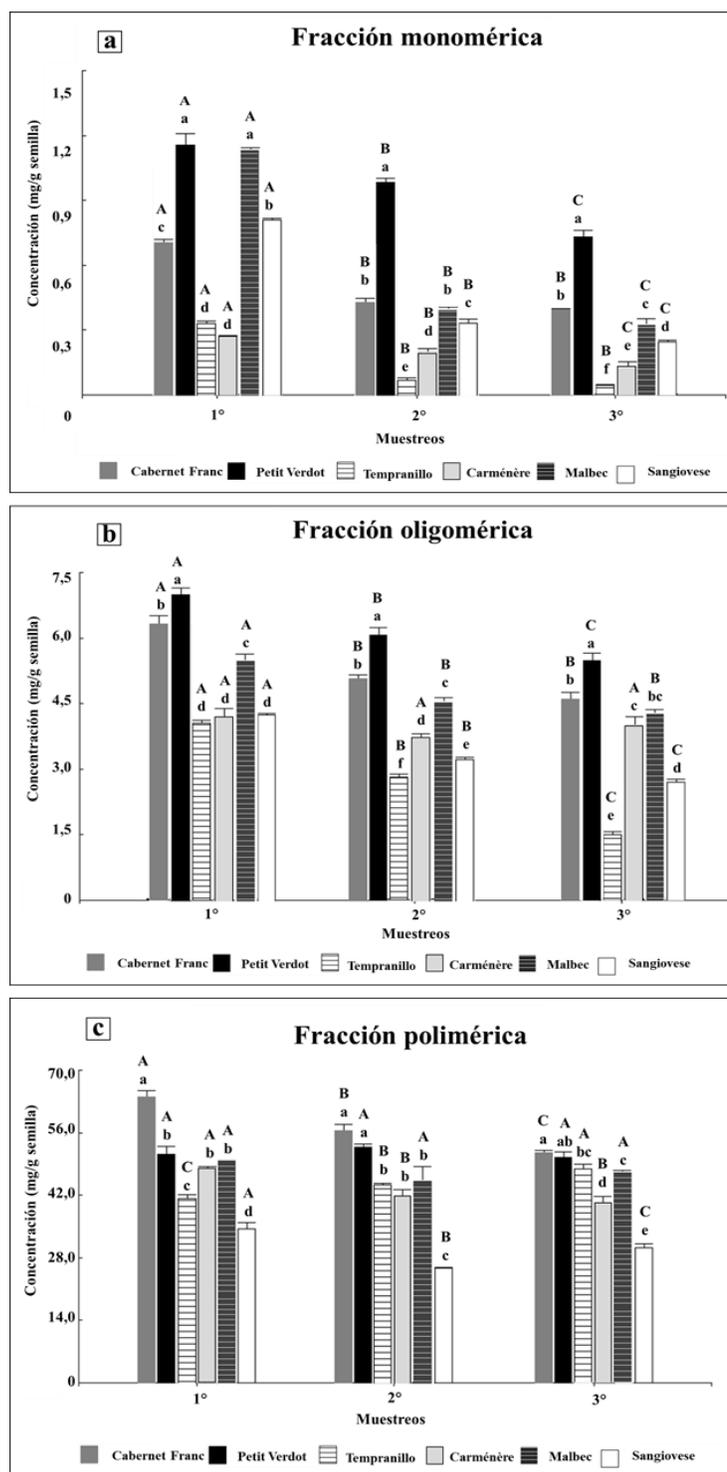


Figura 3. Evolución de la concentración de las diversas fracciones de flavan-3-oles en los extractos de semillas de los cultivares Cabernet Franc, Petit Verdot, Tempranillo, Carménère, Malbec y Sangiovese durante la maduración. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las variedades en cada muestreo. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas para una misma variedad en los distintos tiempos de muestreo (Test LSD Fisher, $p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

En este estudio se realizó una caracterización fenólica de las semillas de uva vinífera de las variedades Cabernet Franc, Petit Verdot, Tempranillo, Carménère, Malbec y Sangiovese durante la maduración. Actualmente, estas variedades de uva poseen una escasa superficie cultivada en Chile, pero han sido históricamente relevantes en los mercados internacionales. Además, en los últimos años estas variedades han mostrado un crecimiento importante en superficie de cultivo en Chile. El análisis químico de las semillas se realizó monitoreando su comportamiento durante distintas etapas fenológicas, para así reportar potenciales diferencias entre las variedades del estudio. Las semillas se obtuvieron de bayas, cuyas plantas fueron cultivadas bajo similares condiciones experimentales. Complementariamente, se incluyó la variedad Carménère, la cual ha sido propuesta como la cepa emblemática de la vitivinicultura chilena debido a su alta adaptabilidad al terroir nacional.

Inicialmente, se estudió la evolución general de la composición de las bayas de las distintas variedades del estudio durante la maduración. Para ello, se evaluaron parámetros globales que han sido utilizados ampliamente como indicadores de madurez de cosecha, tales como el contenido de sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix), pH y acidez total. Según la evolución en el aumento de sólidos solubles las variedades Petit Verdot, Cabernet Franc y Carménère alcanzaron la madurez comercial durante el primer muestreo, mientras que las variedades Sangiovese, Tempranillo y Malbec alcanzaron este punto en el segundo muestreo. En el caso de la acidez, se observó una disminución progresiva de la acidez de titulación de las bayas de todas las variedades del estudio, mientras que el valor del pH y el contenido de sólidos solubles aumentó significativamente hacia los últimos muestreos. Estos resultados son coincidentes con lo descrito en diversos estudios previos (Penso *et al.*, 2014; Alegro *et al.*, 2016; Talaverano *et al.*, 2016). Es interesante notar que, durante la maduración, el diámetro de las bayas de las distintas variedades se mantuvo inalterable, lo que indicaría que este parámetro morfológico no es dependiente del proceso de maduración ni de la variedad de uva. Asimismo, se observó que el peso de las bayas aumentó solo en dos variedades de uva, mientras que en el resto se mantuvo un peso invariable, lo que implicaría su estrecha relación con las características intrínsecas de la cepa cultivada.

Una segunda observación, con respecto del efecto de la maduración en la composición química de la semilla, está relacionada con la potencial variación en concentración de los compuestos fenólicos en la semilla de uva. Aunque no se observó un comportamiento contundente y repetitivo en todas las variedades del estudio, se observó una tendencia decreciente hacia el final del estudio en diversos parámetros fenólicos en al menos 4 variedades, entre ellos, fenoles totales, intensidad colorante, fracciones monomérica y oligomérica de flavanol, (+)-catequina, (-)-epicatequina, epicatequina-3'-*O*-galato y B1-3'-*O*-galato. No obstante, algunos parámetros no sufrieron variación durante la maduración en al menos 4 variedades del estudio (taninos totales, matiz, h^* , ácido gálico y procianidinas galoiladas). Solo se observó una tendencia creciente durante la maduración en el valor de L^* y el contenido de procianidina B2 en 3 y 4 variedades del estudio, respectivamente. Algunos autores, han descrito comportamientos similares referente a los cambios en la composición y concentración fenólica en semillas (Obrique-Slier *et al.*, 2012; Talaverano *et al.*, 2016; Allegro *et al.*, 2016).

Los antecedentes anteriormente descritos revelarían que el comportamiento de algunos parámetros fenólicos serían dependientes del tiempo o proceso de maduración, lo cual concuerda con reportes previos, mientras que otros parámetros fenólicos (en ciertas variedades) no serían afectados de modo alguno por este proceso fisiológico (Fanzone *et al.*, 2011; Piñeiro *et al.*, 2011; Obreque-Slier *et al.*, 2012; Allegro *et al.*, 2016; Talaverano *et al.*, 2016). Esto expondría que el proceso de maduración sería algo selectivo para afectar a ciertos polifenoles de las semillas de *Vitis vinifera* L., pero su efecto estaría fuertemente ligado a la cepa de uva.

Tal como se ha indicado previamente, uno de los factores que ha demostrado afectar significativamente la composición fenólica y que ha sido ampliamente estudiado corresponde a la variedad de uva vinífera (Rodríguez-Montealegre *et al.*, 2006; Lacopini *et al.*, 2008; Pantelic *et al.*, 2016). Por esta razón, en paralelo al estudio de polifenoles durante la maduración, se realizó un estudio comparativo de la concentración y composición de polifenoles en semillas para estas seis variedades.

En primer lugar, los resultados de este estudio permiten demostrar que la composición fenólica de las semillas de las seis variedades estudiadas es idéntica, es decir, no se observó una composición diferencial de polifenoles entre las cepas del estudio. Esta observación fue respaldada por el análisis de HPLC-DAD, en donde los compuestos cuantificados fueron identificados en todos y cada uno de los extractos de semillas. Esta afirmación es respaldada por diversos estudios que demuestran que no existiría un fenol propio de una cepa de uva, sino que las diferencias entre las variedades estarían vinculadas a la concentración de estos metabolitos (Rockenbach *et al.*, 2011; Pantelic *et al.*, 2016; Torchio *et al.*, 2016; Pérez-Navarro *et al.*, 2019).

Una segunda deducción, derivada de los resultados de este estudio, refuerza la idea de que la semilla es la fuente más relevante de proantocianidinas en la uva. Los flavan-3-oles (+)-catequina y (-)-epicatequina representaron alrededor de un 35 y 30% de la totalidad de compuestos detectados por HPLC-DAD, respectivamente. Asimismo, el ácido gálico correspondió al único compuesto de tipo no flavonoide identificado coincidiendo con otros estudios (Fanzone *et al.*, 2011; Kotseridis *et al.*, 2012). Una investigación paralela, que analizó los hollejos de las bayas de estas variedades, mostró contenidos de (+)-catequina, y ácido gálico significativamente más bajos (cerca de 95%) que los encontrados en la presente investigación (Rojas, 2020). La (-)-epicatequina ni siquiera fue detectada en los hollejos de estas variedades. Esto último reforzaría la noción de que la participación fundamental de compuestos fenólicos provenientes de la semilla se trata de compuestos flavonoides de tipo flavan-3-oles, los cuales son aportados en proporciones mucho mayores de lo que permiten los hollejos y que consecuentemente podrían participar en propiedades sensoriales como el amargor, astringencia y estabilización del color en vinos (Downey *et al.*, 2003; Rodríguez-Montealegre *et al.*, 2006; Obreque *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2014). Sin embargo, el método de extracción utilizado en este estudio no permite asegurar esta última idea, ya que se trata de una metodología altamente eficaz en la extracción de polifenoles, que no es realizada en un medio similar al vino, por lo cual no podría reflejar lo que ocurriría durante la vinificación, sino más bien, es una caracterización del contenido total de polifenoles de las semillas.

Una tercera observación, y algo que ha sido reportado largamente en la bibliografía reciente, corresponde a la evidente concentración fenólica diferencial entre las semillas de distintas cepas de uva vinífera. Diversos estudios han mencionado que algunas cepas de uvas tendrían una concentración destacada de algunos polifenoles que le permitirían diferenciarse del resto (Fernández *et al.*, 2007; Boido *et al.*, 2011; Pantelic *et al.*, 2016; Huaman-Castilla *et al.*, 2017; Gombau *et al.*, 2020). Los resultados de este estudio avalan esa idea, puesto que, por ejemplo, las semillas de Cabernet Franc presentaron los mayores contenidos de fenoles totales, taninos totales, galatos de procianidina dimérica y polímeros de flavan-3-ol con respecto del resto de las variedades (Obreque *et al.*, 2012; Ramhari *et al.*, 2019). Por su parte, en las semillas de las bayas de Petit Verdot se observaron las mayores concentraciones de diez de los trece fenoles de bajo peso molecular cuantificados por HPLC-DAD y los mayores contenidos de las fracciones mono y oligoméricas de flavan-3-oles en comparación del resto de variedades (Torchio *et al.*, 2016; Somkuwar *et al.*, 2018). Asimismo, los extractos de semillas de Sangiovese presentaron altos niveles en los distintos parámetros de color evaluados (CIElab, intensidad colorante y matiz) y bajas cantidades de la fracción polimérica de flavan-3-oles, fenoles y taninos totales (Lacopini *et al.*, 2008; Torchio *et al.*, 2016). Finalmente, los extractos de semillas de Tempranillo destacaron por presentar los valores y contenidos más bajos en 15 de los 25 parámetros fenólicos analizados (Monagas *et al.*, 2003; Piñeiro *et al.*, 2011; Baca-Bocanegra *et al.*, 2018). Nótese que los extractos de semillas de Tempranillo, Malbec y Carménère, no destacaron por una concentración o valor distintivo de algún parámetro fenólico evaluado, sino más bien algunas de ellas destacaron por sus exiguos contenidos de algunos fenoles de bajo peso molecular.

Una cuarta observación que se desprende de la anterior está relacionada con la coherencia de estos resultados con los descritos en estudios previos. Así, existen fuertes concordancias con los contenidos sobresalientes registrados en las semillas de Cabernet Franc, Petit Verdot y Sangiovese con aquellos reportados por otros autores (Lacopini *et al.*, 2008; Obreque *et al.*, 2012; Torchio *et al.*, 2016; Ramhari *et al.*, 2019). No obstante, algunos resultados de este estudio no coinciden con lo observado en bibliografía reciente. Por ejemplo, Pantelic *et al.* (2016) observaron algunas diferencias sobre lo descrito para Cabernet Franc y Sangiovese en oposición con el presente estudio, por ejemplo, mayores concentraciones de ácido gálico y concentraciones sustancialmente más bajas de (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina galato. Además, a diferencia del reciente estudio, estos autores reportaron un contenido de fenoles totales en las semillas de Cabernet Franc muy por debajo de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Sangiovese. Por otra parte, Talaverano *et al.* (2016), caracterizaron el comportamiento de Tempranillo durante la maduración y reportan contenidos significativamente mayores de procianidinas B1 y B2 que los declarados en este estudio. Del mismo modo, Torchio *et al.* (2016) determinaron concentraciones en la variedad Petit Verdot que contrastan cuantitativamente con lo determinado en este escrito, como es el caso de los menores contenidos de flavan-3-oles (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-3-*O'*-galato y dímeros de procianidina B1 y B2. No obstante, lo anterior, esta última investigación muestra algunas altas concentraciones en fenoles particulares ((-)-epicatequina, dímero B1 y B2) en Petit Verdot, de la misma manera que fueron reportados en este estudio. Finalmente, Piñeiro *et al.* (2011), obtienen concentraciones significativamente mayores que las reportadas en este estudio en la variedad Tempranillo.

Un aspecto no menor, que aporta a la incongruencia entre los resultados de este estudio con investigaciones previas, está vinculado a aspectos metodológicos, pues no existe un método estandarizado de extracción de polifenoles ni tampoco metodologías estrictas para identificación y cuantificación de estos compuestos, lo cual provoca una distorsión cuando se desea comparar los resultados de distintos estudios. De cualquier modo, la discordancia descrita previamente, respondería además a la gran diversidad de factores que influyen en la composición fenólica de semillas, donde las características intrínsecas serían solo una más de las infinitas relaciones que pudiesen permitir la mayor o menor síntesis de estos compuestos en la semilla (Barnuud *et al.*, 2013; Gutiérrez-Gamboa y Moreno-Simunovic, 2018; Wei *et al.*, 2020).

En conjunto, las observaciones descritas anteriormente demuestran que la disponibilidad específica de ciertos polifenoles en semillas, de determinadas variedades de uva vinífera, estaría relacionada no tan solo con las características intrínsecas de las variedades, sino que a un gran número de factores que impediría definir un estándar fenólico para cada cepa de uva. Así, los efectos de los innumerables manejos vitivinícolas e infinitas condiciones edafomedio ambientales propias de cada terruño, permitirían una diversidad tal que imposibilitaría la expresión de marcadores fenólicos propios de cada variedad de uva vinífera, lo que nuevamente aportaría a la incongruencia de los resultados presentados en este estudio con otros mencionados anteriormente, ya que todas estas diferencias dificultarían realizar una comparación objetiva y eficaz de los resultados.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permiten aceptar parcialmente la hipótesis planteada, puesto que las semillas de las variedades Malbec, Tempranillo, Sangiovese, Petit Verdot, Cabernet Franc y Carménère, presentan una concentración fenólica diferencial durante el proceso de maduración. Sin embargo, la matriz fenólica de las semillas del estudio fue similar, lo que impidió detectar un compuesto fenólico específico y único en cada una de las variedades del estudio.

Una vez finalizada la tesis, como recomendación para una futura investigación se considera interesante replicar este estudio con una metodología de extracción diferente, que se asemeje más a la sintética de extracción durante una vinificación y de esta forma conocer su posible influencia en el vino. También sería interesante estudiar cómo se comportan estas variedades en otras localidades en Chile.

LITERATURA CITADA

- Allegro, G., G. Chiara-Pastore, E. Valentini, E. Muzzi, and I. Filippetti. 2016. Influence of berry ripeness on accumulation, composition and extractability of skin and seed flavonoids in cv. Sangiovese (*Vitis vinifera* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96: 4553-4559.
- Baca-Bocanegra, B., J. Nogales-Bueno, F. Heredia, and J. Hernández-Hierro. 2018. Estimation of total phenols, flavanols and extractability of phenolic compounds in grape seeds using vibrational spectroscopy and chemometric tools. *Sensors*, 18: 2426-2438.
- Barnuud, N.N., A. Zerihun, M. Gibberd, and B. Bates. 2013. Berry composition and climate: responses and empirical models. *International Journal of Biometeorology*, 58: 1207-1223.
- Boido, E., M. García-Marino, E. Dellacassa, F. Carrau, J.C. Rivas-Gonzalo, and M.T. Escribano-Bailón. 2011. Characterization and evolution of grape polyphenol profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat during ripening and vinification. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17: 383-393.
- Bordeau, E., and J. Scarpa. 1998. Análisis químico del vino. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
- Braidot, E., M. Zancani, E. Petrusa, C. Peresson, A. Bertolini, S. Patui, F. Macrì, and A. Vianello. 2008. Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signaling and Behavior*, 3: 626-632.
- Cadot, Y., M.T. Miñana-Catello, and M. Chevalier. 2006. Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet franc during fruit development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9206-9215.
- Cheynier, V., M. Moutounet, and P. Sarni-Manchado. 2000. Los compuestos fenólicos. p. 114-136. In: Flanzy, C. (ed.) *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones. Madrid, España.
- Chira, K., G. Schmauch., C. Saucier., S. Fabre, and P. Teissedre. 2009. Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 545-553.
- Dohadwala, M., and J. Vita. 2009. Grapes and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition*, 139: 1788-1793.
- Downey, M.O., J. Harvey, and S. Robinson. 2003. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9: 110-121.

- Fanzone, M. 2011. Phenolic composition of Malbec grape skins and seeds from Valle de Uco (Mendoza, Argentina) during ripening. Effect of cluster thinning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 6120-6136.
- Fernández, K., J.A. Kennedy, and E. Agosin. 2007. Characterization of *Vitis vinifera* L. cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3675-3680.
- Flanzy, C. 2003. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- García-Barceló, J. 1990. *Técnicas analíticas para vinos*. Ediciones FAB. Barcelona, España.
- Glories, Y. 1978. *Recherches sur la matière colorante des vins rouges*. Thèse doctorat d'état, Université de Bordeaux II.
- Gombau, J., P. Pons-Mercadé, M. Conde, L. Asbiro, O. Pascual, S. Gómez-Alonso, and F. Zamora. 2020. Influence of grape seeds on wine composition and astringency of Tempranillo, Garnacha, Merlot and Cabernet Sauvignon wines. *Food Science and Nutrition*, 00:1-14.
- Gutiérrez-Gamboa, G., and Y. Moreno-Simunovic. 2018. Location effects on ripening and grape phenolic composition of eight 'Carignan' vineyards from Maule Valley (Chile). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 78: 139-149.
- Izquierdo-Hernández, A., Á. Peña-Neira, R. López-Solís, and E. Obreque-Slier. 2015. Comparative determination of anthocyanins, low molecular weight phenols, and flavanol fractions in *Vitis vinifera* L. cv Carménère skins and seeds by differential solvent extraction and high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, 49: 1127-1142.
- Lacopini, P., M. Baldi, P. Storchi, and L. Sebastiani. 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 589-598.
- Ma, W., G. Anque, Y. Zhang, W. Hua, L. Ye, and L. Hua. 2014. A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends in Food Science and Technology*, 40: 6-19.
- Mercurio, M.D., R.G. Damberg, M.J. Herderich, and P.A. Smith. 2007. High throughput analysis of red wine and grape phenolics adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified Somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4651-4657.
- Monagas, M., C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, O. Laureano, 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.

Núñez, V., C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, Y. Hong, and A.E. Mitchell. 2006. Non-galloylated and galloylated proanthocyanidin oligomers in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 915-921.

OIV (Organisation International de la Vigne et du Vin). 2006. *Récueil de méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*. Paris : Edition Officielle.

Obreque-Slier, E., Á. Peña-Neira, R. López-Solís, F. Zamora-Marín, 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: 3591-3599.

Obreque-Slier, E., R. López-Solís, L. Castro-Ulloa, C. Romero-Díaz, and Á. Peña-Neira. 2012. Phenolic composition and physicochemical parameters of Carménère, Cabernet Sauvignon, Merlot and Cabernet Franc grape seeds (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Food Science and Technology*, 48: 134-141.

Pantelić, M., D. Dabić, S.M. Davidović, S.R. Todić, Z.S. Bešlić, U.M. Gašić, and M. Natić. 2016. Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds in 13 grapevine varieties grown in Serbia. *Food Chemistry*, 211: 243-252.

Penso, A.G., I. Citadin, L. Aparecida, M. Castilho, S. Silvia, A. Chicoki, and R. Ambrosio. 2014. Evolução da maturação de uvas finas (*Vitis vinifera* L.), no município de Dois Vizinhos - Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, 6: 3085-3098.

Pérez-Navarro, J., P.M. Izquierdo-Cañas, A. Mena-Morales, J. Martínez-Gascueña, J.L. Chacón-Vozmediano, E. García-Romero, and S. Gómez-Alonso. 2019. Phenolic compounds profile of different berry parts from novel *Vitis vinifera* L. red grape genotypes and Tempranillo using HPLC-DAD-ESI-MS/MS: a varietal differentiation tool. *Food Chemistry*, 295: 350-360.

Piñeiro, Z., D. Canepa, M. Palma, and C. Barroso. 2011. Evolution of grape seed flavan-3-ols during ripening of different grape cultivars. *Journal of Food Science and Technology*, 47: 40-46.

Prieur, C., J. Rigaud, V. Cheynier, and M. Moutounet. 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36: 781-784.

Ramhari, G., P. Dadasaheb, and A. Kumar. 2019. Studies on biochemical composition of different parts of berries and wine quality of wine grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8: 155-164.

Rockenbach, I.I., L.V. Gonzaga, V.M. Rizelio, A.E. Gonçalves, and R. Fett. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International*, 44: 897-901.

- Rodríguez-Montealegre, R., R. Romero-Peces, J.L. Chacón-Vozmediano, J. Martínez-Gascuña, and E. García-Romero. 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 687-693.
- Rojas, S. 2020. Caracterización polifenólica de hollejos de las variedades Sangiovese, Malbec, Tempranillo, Petit Verdot, Cabernet Franc y Carménère durante maduración (Temporada 2019). 40 p. Tesis Magister. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago, Chile.
- SAG. 2018. Catastro vitícola nacional. Servicio Agrícola Ganadero. Santiago, Chile. Disponible en <http://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/catastro-viticola-nacional/1490/publicaciones> (Consultado en julio de 2020).
- Somers, T.C., and E. Vérette. 1988. Phenolic composition of natural wine types. p. 219-253. In: Linskens, H. F., and J. F. Jackson. (eds.) *Wine analysis*. Springer, Berlin, Germany.
- Somkuwar, R., M. Bhange, D. Sharma, and T. Ahammed-Shabeer. 2018. Estimation of polyphenols by using HPLC–DAD in red and white wine grape varieties grown under tropical conditions of India. *Journal of Food Science and Technology*, 55: 4994-5002.
- Sun, B., J.M. Ricardo-da Silva, and I. Spranger. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4267-4274.
- Talaverano, M., D. Moreno, F. Rodríguez-Pulido, M. Valdés, E. Gamero, M. Jara-Palacios, and F. Heredia. 2016. Effect of early leaf removal on *Vitis Vinifera* L. cv. Tempranillo seeds during ripening based on chemical and image analysis. *Scientia Horticulturae*, 209: 148-155.
- Thorngate, J.H., and V.L. Singleton. 1994. Localization of procyanidins in grape seeds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 259-262.
- Torchio, F., S. Giacosa, R. Segade, V. Sangioveseeri, and L. Rolle. 2013. Berry heterogeneity as a possible factor affecting the potential of seed mechanical properties to classify wine grape varieties and estimate flavanol release in wine-like solution. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35: 20-42.
- Waterhouse, A.L. 2002. Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957: 21-36.
- WatreLOT, A.A., and E.L. Norton. 2020. Chemistry and reactivity of tannins in *vitis* spp.: A review. *Molecules*, 25: 2110.
- Wei, X., Y. Ju, T. Ma, J. Zhang, Y. Fang, and X. Sun. 2020. New perspectives on the biosynthesis, transportation, astringency perception and detection methods of grape proanthocyanidins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-27.

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

Zoeckelin, B., K. Fugelsang, B. Gump, and F. Nury. 2001. *Análisis y producción de vino*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.