

# COMPOSICIÓN QUÍMICA DE HOLLEJOS Y PEPITAS DE UVAS CABERNET SAUVIGNON EN RELACIÓN A DIFERENTES NIVELES DE RIEGO. CARACTERIZACIÓN DEL GRADO MEDIO DE POLIMERIZACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN.

Joaquín Gastaminza Amodeo, Victoria Lizama Abad.

## RESUMEN

En el presente trabajo se pretende encontrar si existe un efecto marcado entre distintos niveles de riego en vides de la variedad Cabernet Sauvignon y si los mismos se reflejan en los parámetros analíticos de laboratorio al realizarle algunos análisis de rutina a hollejos y pepitas de dichas uvas. Además se caracterizó el grado medio de polimerización de proantocianidinas en pepitas de estas mismas uvas mediante una catálisis ácida en presencia de floroglucinol (1, 3, 5 trihidroxibenceno) en exceso. Los resultados obtenidos reflejan en su mayoría una influencia prácticamente nula del control de estrés hídrico en los valores de antocianos, taninos y contenido de polifenoles totales, pero hay una disminución significativa del grado medio de polimerización de taninos en las semillas que pertenecen a las parcelas con mayor aporte hídrico.

**Palabras Clave:** Proantocianidinas, taninos, uvas, floroglucinólisis, antocianos, grado medio de polimerización (mDP), HPLC.

## ABSTRACT

In the present paper was treated to find if there is a marked effect between different levels of hydration in grapes of Cabernet Sauvignon and if this levels are reflected in the laboratory analytical parameters when some of the routine analysis are performed in skin and seeds of this grapes. Furthermore will attempt to characterize the polymerization degree of proanthocyanidins in grape seeds by an acid-catalysis in presence of excess Phloroglucinol. The results of the work give us a nule influence of the hydric control in the levels of anthocianins, tannins and total polyphenols, but there is a significant decrease in médium degree of polymerization of seed tanins who belong to the parcel with high level of irrigation.

**Key Words:** Proanthocyanidins, tannins, grapes, phloroglucinolisis, anthocyanins, average degree of polymerization (mDP), HPLC.

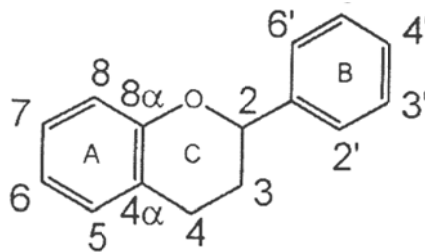
## RESUM

En aquest treball es pretén trobar si hi ha un efecte marcat entre diferents nivells de reg en vinyes de la varietat Cabernet Sauvignon i si aquests es reflecteixen en els paràmetres analítics de laboratori al realitzar-li algunes anàlisis de rutina a pells i llavors d'aquestes raïms. A més es va caracteritzar el grau mitjà de polimerització de proantocianidines en llavors d'aquestes mateixes raïm mitjançant una catàlisi àcida en presència de floroglucinol (1, 3, 5 trihidroxibenzè) en excés. Els resultats obtinguts reflecteixen en la seva majoria una influència pràcticament nul·la del control d'estrès hídric en els valors de antocians, tanins i contingut de polifenols totals, però hi ha una disminució significativa del grau mitjà de polimerització de tanins en les llavors que pertanyen a les parcel·les amb major aportació hídrica.

**Paraules clau:** Proantocianidines, tanins, raïm, floroglucinólisis, antocians, grau mitjà de polimerització (mDP), HPLC.

## INTRODUCCIÓN

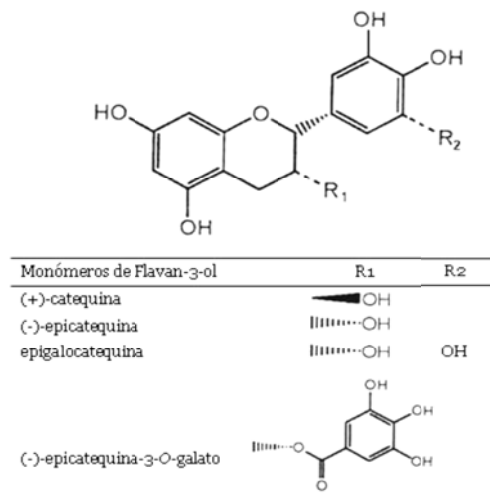
Los compuestos fenólicos flavonoides constituyen una porción significativa del material fenólico presente en bayas y existen varias clases con un esqueleto estructural similar (**FIGURA 1**). Los compuestos fenólicos flavonoides de importancia enológica están agrupados en antocianinas, flavonoles y flavanoles.



**FIGURA 1.** Numeración y estructura de los compuestos flavonoides.

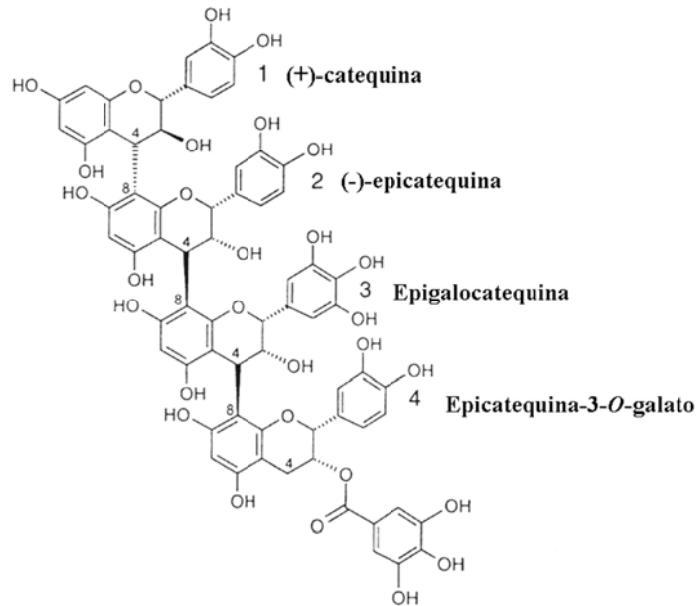
Los taninos condensados o proantocianidinas (PAs) son flavonoides poliméricos compuestos por subunidades flavan-3-ol y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (**FIGURA 2**), donde juegan un papel crucial en los mecanismos naturales de defensa, dándoles protección contra patógenos y actuando como repelentes de depredadores. Las proantocianidinas también pueden encontrarse en alimentos de origen vegetal en particular en frutas, legumbres, cereales y distintas infusiones (té, vino, chocolate, sidra), en los cuales poseen propiedades funcionales y sensoriales. La característica que mejor define a las proantocianidinas es su capacidad para unirse a sustancias tales como proteínas, polisacáridos, alcaloides, radicales libres e iones metálicos. Muchas de sus actividades biológicas derivan de esta propiedad reactiva- antioxidante. Estos

compuestos están presentes en las uvas, *Vitis vinifera*, y son los responsables principales de las propiedades astringentes del vino tinto, ya que son capaces de precipitar las proteínas de la saliva. En uvas se encuentran principalmente en pepitas, hollejos y tallo y pasan directamente al vino durante la vendimia. En el vino estas moléculas son responsables de varias propiedades sensoriales tales como el cuerpo del vino, el amargor y la astringencia y además contribuyen en otros como el color a través de interacciones con las antocianinas. El proceso de copigmentación con antocianinas y la formación de nuevos pigmentos en los cuales PAs están involucradas son fenómenos necesarios para la estabilidad y definición de color rojizo del vino.



**FIGURA 2.** Estructura de flavan-3-oles encontrados en bayas *Vitis vinifera*.

Entre las unidades monoméricas más importantes que conforman las proantocianidinas encontramos (+)-catequina, (-)-epicatequina, epigallocatequina y (-)-epicatequina-3-O galato, (**FIGURA 3**). Estos flavon-3-oles son sintetizados antes del envero y cambian su composición y concentración durante la maduración.



**FIGURA 3.** Proantocianidinas hipotética formada por cuatro subunidades: (+)-catequina, (-)-epicatequina, epigallocatequina y (-)-epicatequina-3-O-galato.

Un tetrámero hipotético formado por subunidades que comprenden la mayoría de los taninos, se muestra en la **FIGURA 3**. En esta figura, la (+)-catequina, (-)-epicatequina y epigallocatequina son las subunidades de “extensión”, debido a que ellos muestran puentes interflavánicos entre sus carbonos 4 y 8 de sus subunidades adyacentes. Por su parte, la (-)-epicatequina-3-O-galato es la unidad “terminal” y tiene su posición del carbono 4 libre, pero con el ácido gálico esterificado al grupo hidroxil en el carbono 3. Generalmente, los monómeros de (+)-catequina y (-)-epicatequina constituyen la mayoría de las unidades de extensión en los taninos de las bayas, donde (-)-epicatequina es usualmente mayoritaria entre las dos. Los taninos varían en tamaño desde dímeros hasta polímeros de más de 30 subunidades. Los taninos de los hollejos difieren de los taninos de las semillas en que los primeros poseen mayor tamaño promedio de polimerización que los taninos de las semillas y que además los taninos de los hollejos poseen epigallocatequina mientras que la semilla carece de ella (Adams, 2006). Por el contrario, los taninos de las semillas poseen subunidades de (-)-epicatequina-3-O-galato, mientras que este monómero está débilmente presente en los taninos del hollejo (Cheynier, 2005).

### Factores reguladores de la biosíntesis de flavonoides

Diversos factores afectan la biosíntesis de flavonoides en las plantas, tales como nutrición, vigor, suelo, agua, reguladores del crecimiento, ataque de microorganismos, presencia de heridas, altitud, luz, temperatura, humedad y cultivar. Muchos de estos factores han sido estudiados en *Vitis vinifera*, pero la gran mayoría con un enfoque en las antocianinas.

Las características físicas del suelo (composición nutricional, estructura y textura) pueden también afectar la acumulación de los flavonoides, pues tienen un significativo efecto sobre el crecimiento de la planta. Sin embargo la mayor consecuencia del tipo de suelo está referida a la capacidad de retención de agua del mismo (Russel, 1961; Marschner, 1995). La irrigación puede aliviar las reducciones relacionadas con el estrés hídrico en el desarrollo y crecimiento de la planta, aunque diversas investigaciones sugieren que el déficit hídrico aumenta la síntesis de antocianinas y taninos en bayas (Cortell *et al.*, 2005). En el caso de las células de las bayas, la biosíntesis de antocianinas es extremadamente sensible al estrés osmótico (Nadal y Arola, 1995). Contrariamente, mientras algunas investigaciones sugieren que la excesiva aplicación de agua disminuye el contenido de taninos, otros mencionan que el déficit hídrico tiene un nulo o bajo efecto sobre la acumulación de antocianinas y taninos en las bayas de vid (Kennedy *et al.*, 2000a). Más bien el efecto del déficit hídrico estaría relacionado con las disminuciones del tamaño de la baya y la relación del peso hollejo/ peso baya lo cual afectaría la concentración de taninos y antocianinas en la baya (Downey *et al.*, 2006). A pesar de lo anterior, investigaciones recientes indican que los cambios en la estructura y desarrollo de los hollejos son responsables de este efecto, más que algún efecto directo en la biosíntesis de los flavonoides (Roby *et al.*, 2004). La dificultad de interpretar el impacto de la disponibilidad de agua, es que ésta tiene un efecto sobre un amplio rango de procesos de la planta aparte de la biosíntesis de los flavonoides, tales como el cierre/apertura estomática, fotosíntesis, acumulación de fotoasimilados, crecimiento vegetativo y radicular, entre otros.

### **Efectos del riego deficitario en vid y la composición de la uva.**

El riego en vid es una de las prácticas más importantes en el viñedo, de su gestión dependerá la calidad y la producción de la vendimia. La forma de manejar el riego, la época de aplicar la dosis y la eficiencia en general serán elementos capitales para la producción. El riego puede llegar a ser obligatorio en zonas semiáridas. La escasez de precipitaciones en el momento de producción hace que sea necesario un aporte hídrico para regular la pérdida de agua debida a la transpiración de las cepas. Además la gestión del mismo vendrá influenciada por factores como la climatología, el tipo de suelo o la estructura del mismo. La maduración de la uva se ve afectada en gran medida por la disponibilidad de agua en la planta. Se ha estudiado que el efecto del riego afecta la madurez tecnológica de la uva, encontrando una clara relación entre la irrigación y los cambios composicionales de la uva, principalmente en glucosa, fructosa, ácidos orgánicos y elementos minerales (Esteban *et al.*, 1999), también se ha observado una gran influencia del sistema de riego en la concentración de antocianos y polifenoles totales, (Sipiora y Gutierrez, 1998). Por ende el

manejo del riego es un factor crítico para la respuesta agronómica del viñedo y la composición de la uva.

La práctica de riego aplicada a viñedos destinados a la elaboración de vinos de calidad es una técnica discutida, al menos en los países viticultores del viejo mundo. Habiéndose realizado numerosos estudios con muy distintos resultados y conclusiones en algunos casos hasta aparentemente contradictorios, debido principalmente a lo difícil que se hace comparar zonas con condiciones edafo- climáticas tan dispares.

En relación a los compuestos fenólicos, generalmente se habla de que con la aplicación de un déficit hídrico aumenta la concentración de antocianos y el índice de polifenoles totales (IPT), (Bravdo, 1985).

Nadal y Arola (1995) observaron en Cabernet Sauvignon que tras un estrés hídrico post- envero se encontraron diferencias significativas entre las cepas en secano y las regadas. En las vides con menor estrés hídrico se obtuvieron menores contenidos de compuestos fenólicos, antocianos y taninos; posteriormente, Ojeda *et al.*, 2002, en un cultivar Syrah observó que un déficit hídrico fuerte antes del envero provocaba un amplio descenso en la síntesis de antocianos, también una experiencia que sigue esta idea, como la de Giner Gonzalbez (2007) en Cabernet Sauvignon, mostraba que la síntesis de antocianos aumentó más tras un estrés hídrico aplicado después del envero que antes del mismo.

Como ya hemos comentado la amplia diversidad del clima, suelo, cultivares, patrones, conducciones, momentos de aplicación del riego, densidades, técnicas de cultivo, diferencias de temperaturas y precipitaciones entre años en una misma parcela, accidentes meteorológicos y prácticamente cualquier parámetro que pueda afectar a la calidad de la uva, hace que sea difícil de prever la composición de la baya a priori.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Materiales.** Estándares de (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-O-galato fueron adquiridos de Extrasynthese, Lyon Nord, France. El floroglucinol y ácido trifluoroacético se adquirieron de Merck, Madrid, España. El metanol, ácido clorhídrico y solventes grado HPLC y pro-análisis fueron comprados a Panreac, Barcelona, España.

**Instrumentación.** Para las determinaciones analíticas, se empleó un espectrofotómetro JASCO V- 630 UV- Visible y un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC-DAD) marca JASCO serie MD-2010 Plus, equipado con un detector Diodo Array LC-Net II/ADC (Tokyo, Japón). La columna cromatográfica utilizada fue Gemini NX (Phenomenex, Torrance, CA), 250 mm x 4,6 mm de 5 µm de tamaño de partícula.

**Ensayo de riego.** El ensayo fue realizado con plantas *Vitis vinifera*, Cabernet Sauvignon (CS) plantadas en el año 2000. Se trata de un cultivar con muy buenas aptitudes enológicas, dando buenos vinos jóvenes y

excelentes vinos de crianza. Las uvas fueron recogidas de los viñedos de la finca de Les Alcusses, propiedad de Celler del Roure, ubicada a unos 12 Km del municipio de Moixent (Valencia). La finca está situada en la ladera norte de la Serra Grossa (L'Ombria), con una altitud aproximada de 600 metros por sobre el nivel del mar y una extensión de 40 hectáreas.

Para la realización del ensayo el viñedo se particionó en 12 parcelas, y a 3 de cada una de ellas se le aplicó un tratamiento de riego sectorizado. Para poder regar independientemente cada repetición según las diferentes estrategias, el riego localizado se llevó a cabo por goteo, con un gotero por cada cepa, separados 1,25 m y cada uno de ellos emitiendo un volumen por hora particular. Estos riegos diferenciados comenzaron a aplicarse en el momento del envero, concretamente a partir del 2 de agosto de 2011, por lo que en el periodo desde brotación hasta envero todos los tratamientos se mantuvieron en secano. Es importante señalar que en años anteriores al estudio todo el viñedo se regaba de manera deficitaria aportando en los años más secos pequeños volúmenes de riego (30- 50 mm). Para los análisis, se tomaron 400 bayas al azar de cada una de las parcelas y se las almacenó a -18 °C hasta ser analizadas.

Los diferentes tratamientos, llamados T1, T2, T3 y T4 y sus respectivas repeticiones quedan definidos en la **FIGURA 4**.

T1 I	T3 I	T4 II	T4 I
T2 II	T4 III	T2 I	T1 II
T3 III	T3 II	T1 III	T2 III

**FIGURA 4.** Esquema ejemplificativo del reparto de las parcelas y sus respectivos tratamientos de riego. Siendo T1: Secano, T2: Riego medio, T3: Riego bajo o pobre, T4: Riego alto.

Todas las determinaciones analíticas se realizaron por duplicado, trabajando posteriormente con la media de los resultados obtenidos.

**Preparación del extracto de hollejos.** Los hollejos fueron separados de la baya manualmente, se lavaron, pesaron y se extrajeron con una solución hidroalcohólica conformado por 90 % etanol, 10 % agua y 5 g/L de ácido tartárico, se los dejó por 2 horas a 50 °C y con agitación (75 rpm). La proporción de extracción fue 1: 9 (hollejos: solvente).

**Preparación de extracto de semillas.** Las semillas fueron separadas manualmente de cada baya, lavadas con agua destilada y pesadas. Una

alícuota de 50 mL de una solución de acetona/ agua (2:1) fue adicionada a cada muestra (10 g de semillas) y se dejaron 24 horas con agitación y a temperatura ambiente. Para minimizar la oxidación de proantocianidinas las soluciones fueron rociadas con nitrógeno y las extracciones se llevaron a cabo en oscuridad. El extracto fue filtrado con lana de vidrio y se llevo a un rotavapor para eliminar la acetona mediante presión reducida a unos 35 °C, el extracto acuoso se llevo a volumen final 25 mL con agua destilada y unos 10 mL fueron llevados a -40 °C para luego ser liofilizados hasta polvo seco. El resto se utilizó para los pertinentes análisis.

**Parámetros analíticos.** A cada extracto de hollejos y de semillas se le realizaron los siguientes análisis: Taninos condensados totales y determinación de antocianos totales e índice de polifenoles totales (IPT).

**Índice de polifenoles totales (IPT)**, (Riberéau Gayon 1974). El índice de Polifenoles Totales valora la totalidad de los compuestos polifenólicos de los vinos por medición de la absorbancia a la longitud de onda que escinde el grupo fenol.

La metodología consiste en diluir previamente el vino por un factor de 100 y medir la absorbancia de la muestra a 280 nm bajo un paso óptico de 1 cm en cubeta de cuarzo, frente al agua. El núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de onda.

**Determinación de antocianos totales** (Ojeda *et al.*, 2002). A 0,1 mL de muestra se le añaden 10 mL de ácido clorhídrico 0,1 M, se esperan 3 horas y se lee la absorbancia a 520 nm, utilizando blanco HCl 0,1M.

**Determinación de taninos condensados totales** (Riberéau Gayon y Stonestreet 1966). Las proantocianidinas tienen la propiedad de ser transformables parcialmente en antocianidinas rojas por calentamiento en medio ácido. Este calentamiento conduce a la ruptura de ciertas uniones y a la formación de carbocationes que se transforman parcialmente en cianidina y catequinas si el medio es suficientemente oxidante (reacción de Bate-Smith). Este método consiste en utilizar esta propiedad para la detección de taninos en el medio. Esta reacción tiene lugar tanto con las formas monómeras (catequinas) como con las formas polimerizadas (proantocianidinas), en este último caso la reacción provoca la ruptura por hidrólisis de ciertas uniones que luego se transforman en antocianidinas y son éstas las que se determinan en medición por colorimetría.

**Grado medio de polimerización de proantocianidinas en semillas** (Kennedy- Jones 2001). Una solución de 0,1 N HCl en MeOH, conteniendo 50 g/L de floroglucinol y 10 g/L de ácido ascórbico fue preparada para hacer reaccionar con las proantocianidinas en forma de polvo seco (5 g/L) a una temperatura de 50 °C y por 20 minutos, para finalizar la reacción se adicionaron 5 volúmenes de una solución de acetato de sodio 40 mM.

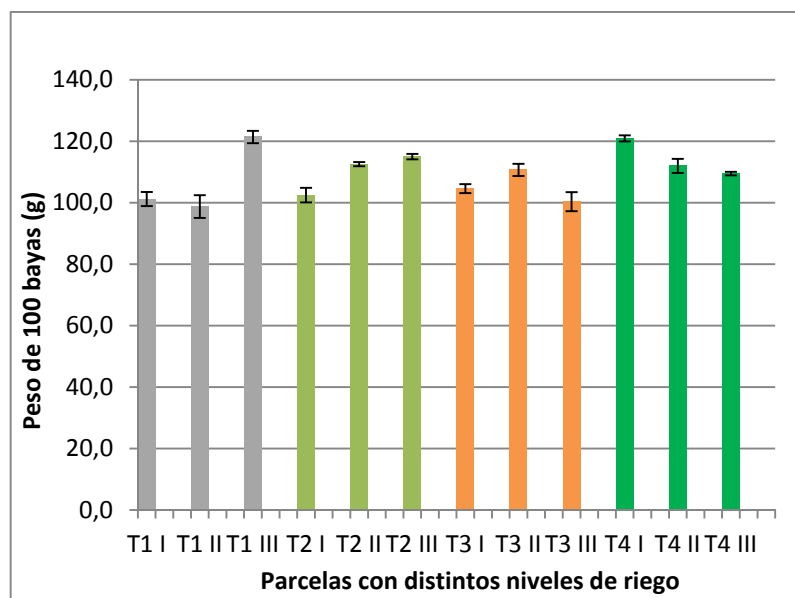


Los aductos de floroglucinol fueron analizados por HPLC en fase reversa. El método utiliza un gradiente binario, siendo la fase móvil A una solución de ácido acético acuoso al 1% v/v y la fase móvil B, metanol 100%. Los picos eluidos se monitorearon a 280 nm. Las condiciones de elución fueron de 1.0 mL/min; 5 % B por 10 minutos, un gradiente linear de 5 a 20 % de B en 20 minutos, un gradiente linear de 20 a 40 % de B en 25 minutos. La columna se lava finalmente con 90% de B por 10 minutos y se reequilibra con 5 % B por 5 minutos antes de la siguiente inyección. El grado medio de polimerización (mDP) fue obtenido 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 obtuvo 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 obtuvo del resultado de la ecuación  $mDP \cdot [288 + (152 \cdot \%G / 100)] + 2$ .

**Análisis estadístico.** El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el programa Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp. Estados Unidos), se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para detectar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de riego. El límite de confianza utilizado fue del 95 % y se tomo un valor-  $p < 0.05$  como indicativo de diferencias significativas.

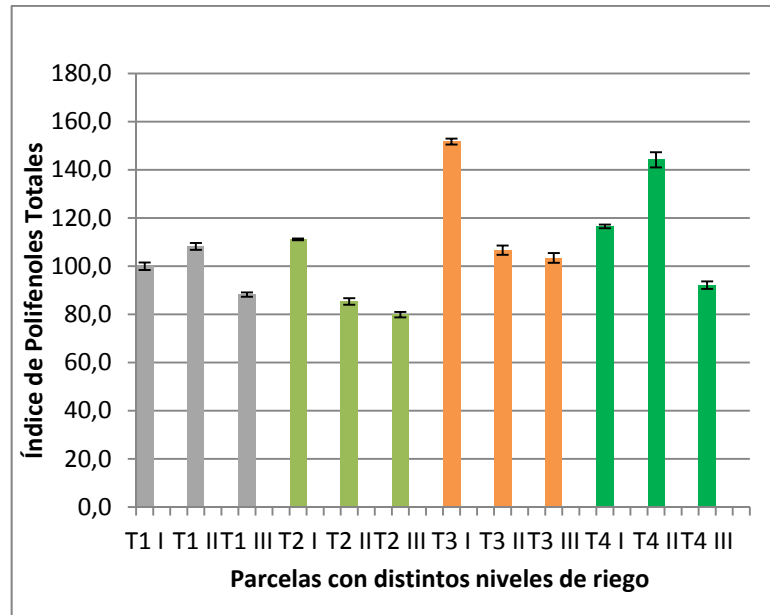
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Efecto del riego en el peso de las bayas.** Como puede observarse en la **FIGURA 5**, los diferentes tratamientos hídricos no presentan un efecto significativo en el peso de los granos de la uva ( $p > 0.05$ ), tampoco se observa una tendencia hacia un mayor tamaño de grano al sufrir una mayor hidratación. Si bien el aporte hídrico no se aplica durante todo el año y por esto puede ser que no se refleje el efecto esperado, también es sabido que dependiendo el periodo vegetativo en que se encuentren las vides el estrés hídrico puede afectar de manera notoria o no. En este sentido McCarthy (1997), estudió los efectos hídricos transitorios en el crecimiento de la baya en diferentes periodos después de la floración y observó que el déficit hídrico durante el periodo inmediatamente posterior a la floración producía la mayor reducción del peso de la baya en comparación con el de vides bien regadas. Por otro lado, el déficit hídrico después del envero tenía un efecto mínimo en el peso de la baya en maduración, las bayas fueron insensibles al déficit hídrico durante el mes previo a vendimia. Las bayas muestreadas corresponden al periodo de vendimia y es probable que no reflejen una diferencia en su peso por el momento en que se han recolectado.

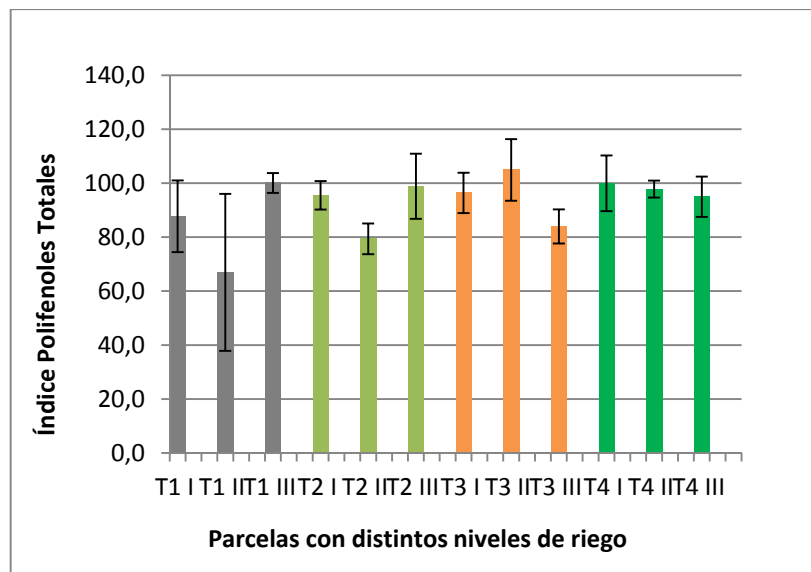


**FIGURA 5.** Representación gráfica de la relación entre los distintos tratamientos hídricos (distintos colores indican distinto estrés hídrico) y el peso de 100 bayas de la uva Cabernet Sauvignon.

**Efecto del riego sobre el índice de polifenoles totales.** El índice de polifenoles totales (IPT) representa la mayor parte de los compuestos fenólicos en la uva. En las **FIGURAS 6 y 7** puede observarse que los valores de IPT obtenidos tanto en hollejos como en semillas de la uva Cabernet Sauvignon no presentan una tendencia asociable a los distintos riegos, si bien investigadores anteriores han encontrado que algunos componentes de la uva como antocianos, fenoles e incluso el color decrecen con la aplicación del riego debido sobre todo a un incremento en el peso de la baya (Ginestar *et al.*, 1998b), aquí no vemos ese efecto reflejado.



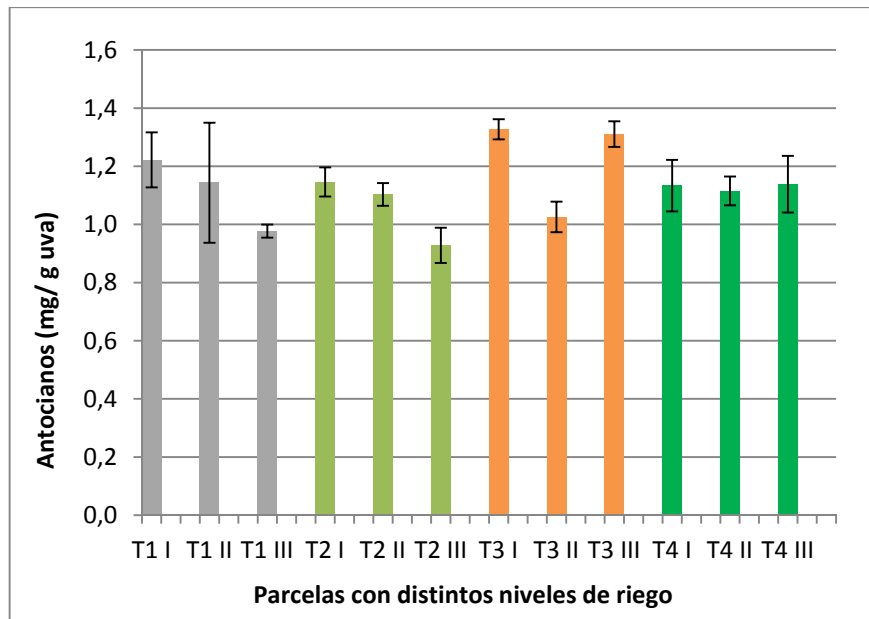
**FIGURA 6.** Representación gráfica del índice de polifenoles totales (IPT) en función de los diferentes tratamientos hídricos, (mismo color indica mismo tratamiento).



**FIGURA 7.** Representación gráfica del IPT para semillas y los distintos riegos.

**Efecto del riego en la concentración de antocianos.** Ginestar *et al.*, (1998b) observaron que la concentración de antocianos decrece con la aplicación del riego y lo relacionaron con el aumento de peso y tamaño de la baya, lo que provoca la disminución de la relación hollejo/ pulpa y agravan los procesos de dilución. Analizando nuestros resultados vemos que no

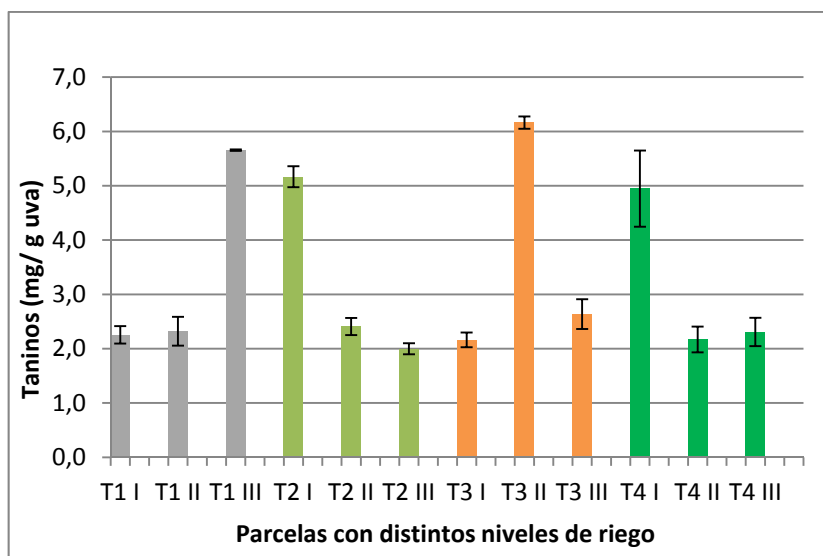
existe una diferencia significativa entre los distintos tratamientos hídricos, si bien se observa una menor concentración de antocianos en el grupo T4, es decir en el grupo de mayor aporte de agua.



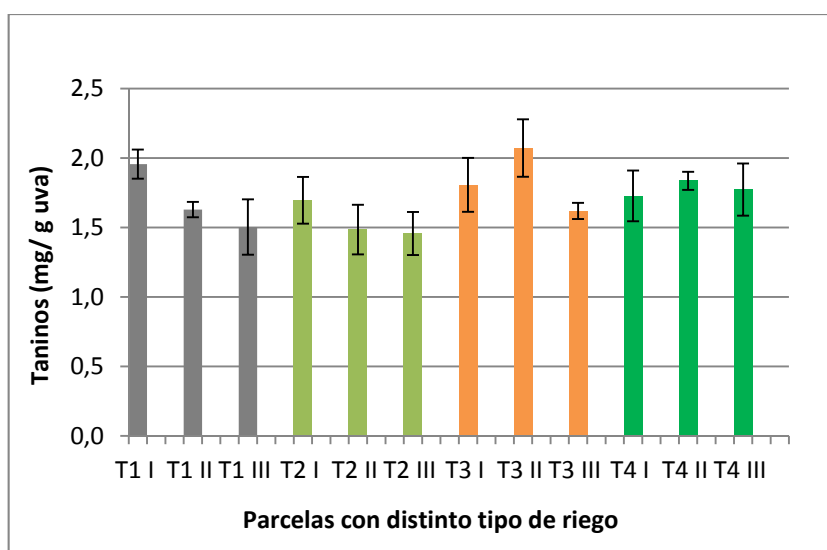
**FIGURA 8.** Representación gráfica de concentración de antocianos de las distintas parcelas frente los distintos niveles de estrés hídrico.

**Efecto del riego en la concentración de taninos en hollejos y semillas.**

Siguiendo el razonamiento de autores como (García- Escudero *et al.*, 1997) y Lissarrague (1986), se esperaría una disminución de la concentración de taninos principalmente en las parcelas más regadas (T4) y un leve aumento hacia parcelas menos regadas, pero los resultados muestran una importante variabilidad que no nos permite encontrar una tendencia clara, o al menos relacionarlo con los distintos tratamientos hídricos aplicados. En el caso de los hollejos se observa demasiada variabilidad entre las parcelas, pero en el gráfico de las semillas, se observa que la concentración no presenta diferencias significativas entre las distintas parcelas. **(FIGURAS 9 y 10).**

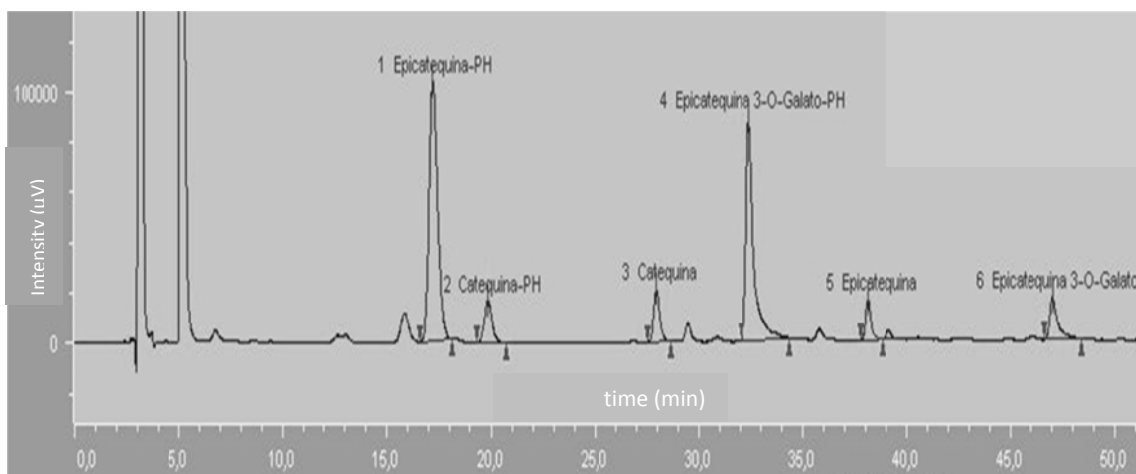


**FIGURA 9.** Representación gráfica que muestra como varía la concentración de taninos de hollejos (mg/ g uva) con los distintos niveles de riego.



**FIGURA 10.** Representación gráfica que muestra como varía la concentración de taninos de semillas (mg/ g uva) con los distintos niveles de riego.

**Efecto del riego en el grado medio de polimerización (mDP).** En la **FIGURA 11** puede observarse uno de los cromatogramas obtenidos de uno de los extractos de taninos en semillas, en el pueden observarse tanto las unidades terminales (flavanoles sin floroglucinol) como las unidades de extensión flavanoles con floroglucinol), cada uno de ellos identificados mediante patrones comerciales. La **TABLA 1** muestra los picos identificados y sus tiempos de retención aproximados.

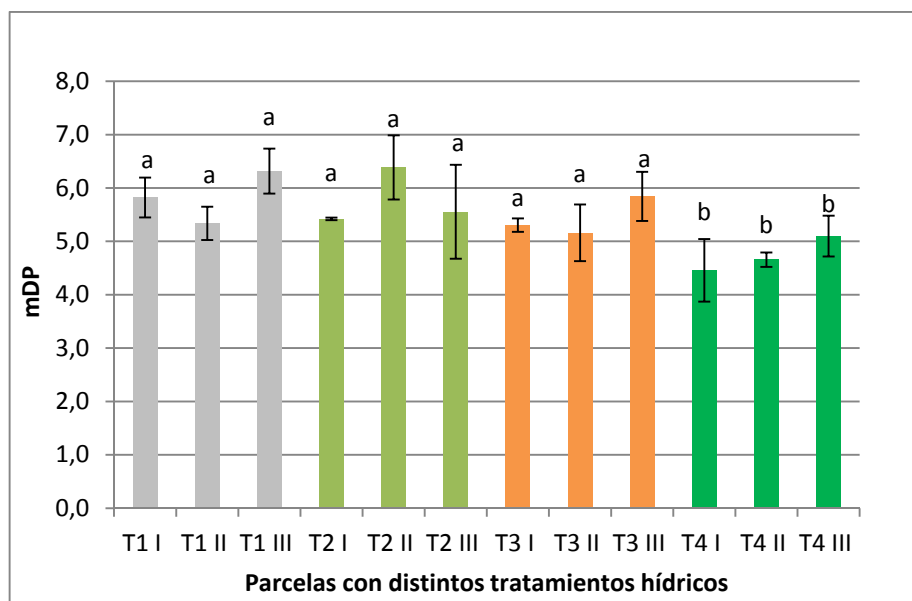


**FIGURA 11.** Cromatograma obtenido a  $\lambda = 280$  nm, donde se muestran los picos de los monómeros de proantocianidinas con y sin floroglucinol (PH) de uno de los extractos de taninos de semillas.

Compuesto	Tiempo retención (min)
1. Epicatequina-floroglucinol	17.160
2. Catequina-floroglucinol	19.840
3. Catequina	27.947
4. Epicatequina 3-O-Galato-floroglucinol	32.400
5. Epicatequina	38.080
6. Epicatequina 3-O-Galato	46.987

**TABLA 1.** Tabla donde se muestran los compuestos flavan-3-oles identificados en una de las muestras y sus tiempos de retención.

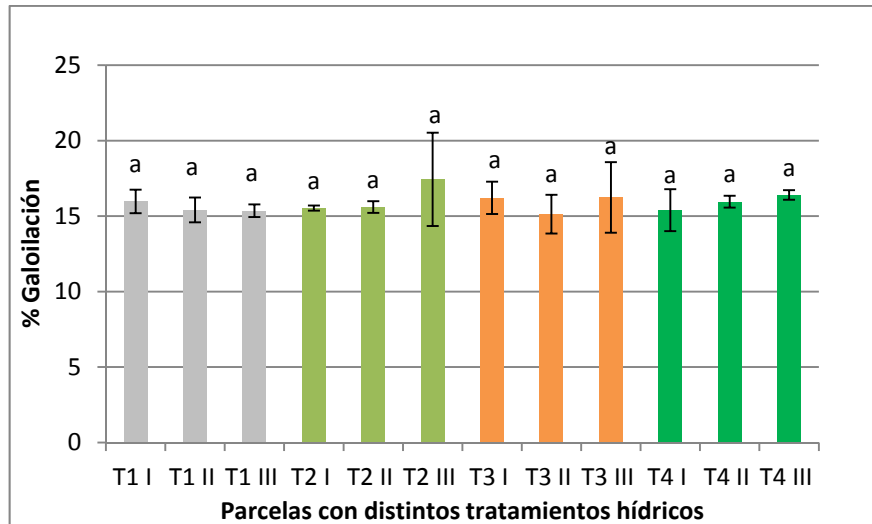
Distintos reportes indican que el grado medio de polimerización (mDP) es menor que 10 en las semillas y que los polímeros están constituidos por (+)-catequina y (-)-epicatequina con una menor proporción de (-)-epicatequina galato. Tal como muestra la FIGURA 12, se determinó el grado medio de polimerización (mDP) de las fracciones flavánicas de las semillas en estudio, mediante una catálisis ácida en presencia del nucleófilo floroglucinol. Concerniente a valores de mDP, la literatura muestra valores entre 2,3 y 15,1, dependiendo de la técnica de fraccionamiento empleada y del cultivar en estudio (Downey *et al.*, 2003; Monagas *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2000b; Moreno *et al.*, 2008; Prieur *et al.*, 1994). En este estudio, se pudo observar que las semillas de todos los cultivares presentan valores de mDP comprendidos entre 4,5 y 6,4. Además existe una diferencia significativa entre los cultivares T1, T2 y T3 con respecto al cultivar T4, el cual es el que ha recibido el menor estrés hídrico.



**FIGURA 12.** Representación gráfica del grado medio de polimerización (mDP) de proantocianidinas en semillas de Cabernet Sauvignon en función del riego.

Los valores de polimerización obtenidos son congruentes con las bases teóricas y empíricas ya que las semillas presentan taninos con bajos niveles de polimerización (menores a 10) lo que los hace visiblemente más astringentes y diferenciables de los taninos de los hollejos (poseen valores de polimerización mayor a 20) que al ser de mayor tamaño poseen menor astringencia.

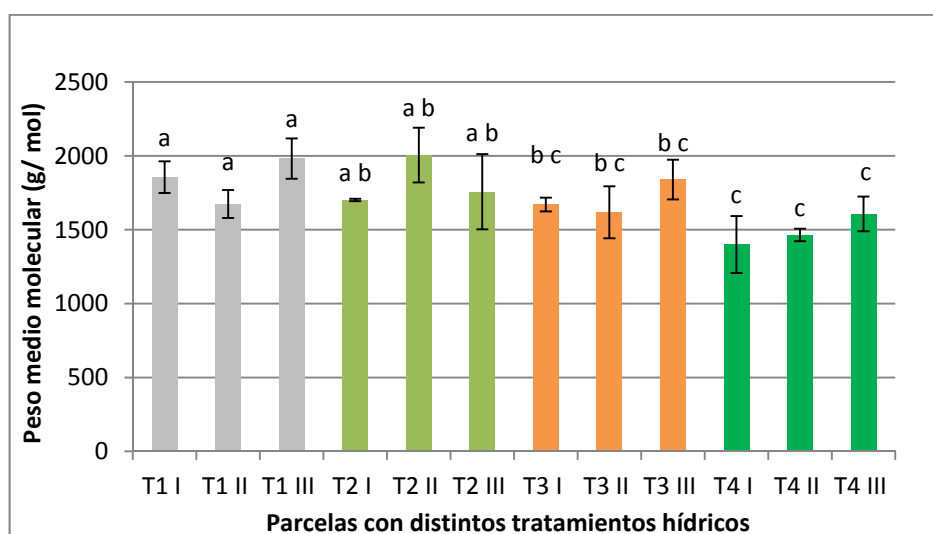
Los compuestos que forman la base de las estructuras de los taninos pueden tener unido otro elemento, el ácido gálico, éste ácido fenólico es muy relevante porque a mayor presencia del mismo en las estructuras de los taninos, es decir, a mayor grado o porcentaje de galoilación, mayor amargor y astringencia presenta un tanino. Puede observarse en la **FIGURA 13** el porcentaje de galoilación obtenido de taninos de semillas y su relación con el nivel de riego.



**FIGURA 13.** Representación gráfica del % de Galoílación frente a diferentes niveles de riego.

Como puede observarse en la gráfica 12, los valores de galoílación obtenidos no varían significativamente entre las parcelas (rondan el 15 %) y no se observa una variación del porcentaje de ácido gálico unido a taninos analizando el estrés hídrico de las plantas.

Por otra parte, hemos obtenido en este trabajo el peso medio molecular (aMW) de los taninos condensados. En la **FIGURA 14** se observa que las parcelas con mayor riego (T4) poseen los polímeros con menor peso molecular, cosa lógica ya que poseen el menor mDP, a su vez puede observarse gracias a las letras sobre las barras, que el grupo T1 no presenta diferencias significativas con T2 (riego medio), pero sí con T3 (riego pobre) y por supuesto con T4. Los ensayos T2 y T3 no presentan diferencias significativas entre sí, pero si existe una diferencia significativa entre T3 y T4.



**FIGURA 14.** Gráfico que relaciona aMW con nivel de riego.



Si nos centramos en los grupos T1 (secano) y T4 (riego exceso) se puede ver claramente un efecto del nivel de hidratación de las vides tanto en su mDP como en aMW, es decir, en el grupo que no ha recibido riego sistematizado (T1) el grado medio de polimerización y el peso medio molecular de los taninos condensados es mayor que en el grupo que más irrigación ha recibido (T4). Dicha tendencia no se observa en los grupos con riego intermedio (T2 y T3) posiblemente porque la cantidad de agua aplicada no es lo suficiente como para crear una diferencia detectable en las muestras analizadas.

En la **TABLA 2** se muestran los valores de mDP, aMW y %Galoilación con sus respectivas desviaciones estándares. En cada columna se ubican también letras, las cuales indican si existe o no diferencia significativa entre las parcelas.

	mDP	% Galoilación	aMW (g/ mol)
T1 I	5,8 ± 0,4 a	16,0 ± 0,8 a	(1,9 ± 0,1) × 10 <sup>3</sup> a
T1 II	5,3 ± 0,3 a	15,4 ± 0,8 a	(1,67 ± 0,09) × 10 <sup>3</sup> a
T1 III	6,3 ± 0,4 a	15,4 ± 0,4 a	(1,98 ± 0,1) × 10 <sup>3</sup> a
T2 I	5,4 ± 0,1 a	15,5 ± 0,2 a	(1,700 ± 0,008) × 10 <sup>3</sup> ab
T2 II	6,4 ± 0,6 a	15,6 ± 0,4 a	(2,0 ± 0,2) × 10 <sup>3</sup> ab
T2 III	5,6 ± 0,9 a	17 ± 3 a	(1,8 ± 0,2) × 10 <sup>3</sup> ab
T3 I	5,3 ± 0,1 a	16 ± 1 a	(1,67 ± 0,04) × 10 <sup>3</sup> bc
T3 II	5,2 ± 0,5 a	15 ± 1 a	(1,6 ± 0,2) × 10 <sup>3</sup> bc
T3 III	5,8 ± 0,5 a	16 ± 2 a	(1,8 ± 0,1) × 10 <sup>3</sup> bc
T4 I	4,5 ± 0,6 b	15 ± 1 a	(1,4 ± 0,2) × 10 <sup>3</sup> c
T4 II	4,7 ± 0,1 b	16,0 ± 0,4 a	(1,46 ± 0,04) × 10 <sup>3</sup> c
T4 III	5,1 ± 0,4 b	16,4 ± 0,3 a	(1,6 ± 0,1) × 10 <sup>3</sup> c

**TABLA 2.** Valores de mDP, aMW y % Galoilación obtenidos. En la vertical, distintas letras indican que existen diferencias significativas entre los valores en un 95 % de significancia.

## CONCLUSIONES

El propósito del trabajo presentado fue relacionar la composición de taninos condensados de semillas y hollejos del cultivar Cabernet Sauvignon con distintos niveles de irrigación. Además se puso a punto un método para obtener el grado medio de polimerización de proantocianidinas en semillas y relacionar sus valores con el riego. Se intentó realizar lo mismo en hollejos pero la matriz mucho más compleja de los mismos no nos permitió obtener un extracto de taninos lo suficientemente puro como para obtener buenos resultados.

Con respecto a los resultados obtenidos en las analíticas de taninos, antocianos e IPT podemos decir que no se ha observado una diferencia significativa entre los distintos niveles de riego. Se esperaba que a mayores niveles de irrigación los compuestos de las bayas tuviesen una concentración menor, y que en el grupo T1 (secano) se obtuviesen las máximas concentraciones ya que al recibir menos cantidad de agua sus bayas serían las más pequeñas y sus componentes estarían más concentrados, pero esto no se ve reflejado en los resultados obtenidos, si bien es cierto que la concentración de antocianos en el grupo T4 es menor que en el resto, la ausencia de una relación proporcional e inversa entre nivel de riego y concentración de taninos, antocianos o polifenoles puede explicarse si analizamos en qué momento del ciclo de vida de la vid se realizan las irrigaciones. Como las mismas han sido regadas en un tiempo cercano al vendimiado es muy probable que el efecto del riego no se refleje tanto como si hubiesen sido regadas en etapas anteriores al envero.

Los resultados obtenidos en grado medio de polimerización muestran que no hay diferencias significativas entre los cultivares de los grupos T1, T2 y T3, pero sí que las parcelas del grupo T4 (más irrigadas) poseen un grado medio de polimerización menor que el resto, esto no puede ser asignado exclusivamente al nivel de riego elevado ya que no tenemos suficientes pruebas o conocimiento para adjudicarlo, pero sí que es importante notar como en las 3 parcelas donde hay mayor nivel de riego se producen taninos condensados de menor polimerización que el resto y con una diferencia significativa en un intervalo de confianza del 95 %.

## REFERENCIAS

- Adams, D. 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (3), 249-256.
- Bravdo, B.; Hepner, Y.; Loinger, C.; Cohen, S. 1985. Effect of crop level and crop load on growth, yield, must and wine composition and quality of Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 125- 131.
- Cheyrier, V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 223-229.
- Cortell, J.; Halbleib, M.; Gallagher, A.; Righetti, T.; Kennedy, J. 2005. Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir) and wine proanthocyanidins. *J. Agric Food Chem.* 53, 5798-5808.
- Downey, M.; Harvey, J.; Robinson, S. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2003, 9, 15-27.
- Downey, M.; Dokoozlian, N.; Krstic, M. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grape and wine: A review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.* 2006, 57 (3), 257-268.
- Esteban, M. A.; Villanueva M. J. y Lissarrague J. R. 1999. Effect of irrigation in berry composition of Tempranillo during maturation. Sugars, organic acids and mineral elements. *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (4): 418- 434.
- Esteban, M. A., M. J. Villanueva y J. R. Lissarrague. 2001. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*V. vinifera*, L.) grape berries during ripening. *J. Sci. Food and Agric.* 82: 1- 11.

- Giner Gonzalbez, J. F., M. Giménez, S. García, M. A. Oltra, M. Ferrandez, J. Niñerola, L. Arciniega y C. Martín. 2007. Efecto del estrés hídrico aplicado en distintos periodos de desarrollo de la vid cv. Cabernet Sauvignon en la producción y calidad del vino.
- Ginestar, C, et al. 1998b. Use of sap-flow sensors to schedule vineyard irrigation. H. Effects of post-veraison water déficits on composition of Shiraz grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 49 (4): 421-428.
- Graciano. 2003. Tempranillo, and Cabernet sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6475-6481.
- Kennedy, J.; Troup, G.; Pilbrow, J.; Hutton, D.; Hewitt, D.; Hunter, C.; Ristic, R.; Iland P.; Jones, G. 2000a. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 244-254.
- Kennedy, J. 2000b. Matthews, M.; Waterhouse, A. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochem.* 55, 77–85.
- Kennedy, J. A.; Jones, G. P. 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid- catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1740- 1746.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2<sup>a</sup> Ed. Academic press, London. 889 p.
- McCarthy, M. G. 1997. "The effect of transient water deficit on berry development of cv. Shiraz (*Vitis vinifera* L.)," *Australian Journal of Grape & Wine Research* 3(3): 102-108.
- Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Ricardo da Silva, J. 2003. Monomeric, oligomeric and polimeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv.
- Moreno, J.; Cerpa-Calderón, F.; Cohen, S.; Fang, Y.; Qian, M.; Kennedy, J. 2008. Effect of postharvest dehydration on the composition of pinot noir grapes (*Vitis vinifera* L.) and wine. *Food Chem.* 109, 755-762.
- Nadal, M.; Arola, L. 1995. Effects of limited irrigation on the composition of must and wine of Cabernet Sauvignon under semi- arid conditions. *Vitis* 34 (3). 151- 154.
- Ojeda H., Andary C., Kraeva E., Carbonneau A., Deloire A. 2002. Influence of pre and post-veraison water deficit on the synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* L., cv Shiraz. *Am. J. of Enol. and Vitic.* 53: 261-267.
- Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochem.* 36, 781–784.
- Ribéreau- Gayon J.; Stonestreet E. 1966. *Chim. Anal* 48: 188- 196.
- Ribéreau-Gayon P. 1974. The cheminsry of red wine color. *The Chemistry of Winemaking.* A. D. Webb. Washington.
- Roby, G.; Harbertson, J.; Adams, D.; Matthew, M. 2004. Berry size and vine water déficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. *Aust. J. Grape Wine. Res.* 10, 100–107.
- Russel, E. 1961. Soil conditions and plant growth. Longmans, Green and Co., London. 263 p.
- Sipiora, M. J.; Gutiérrez, M. J. 1998. Effects of pre-veraison irrigation cutoff and skin contact time of the composition, color, and phenolic content of young Cabernet Sauvignon wines in Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 49 (2), 152-161.