



**CARACTERIZACION DE LA COMPOSICION FENOLICA DE UVAS Y VINOS DE LA  
VARIEDAD MALBEC (VITIS VINIFERA L.): SU RELACION CON EL ORIGEN  
GEOGRAFICO, FACTORES VITIVINICOLAS Y VALOR COMERCIAL**  
**Martin Leandro Fanzone Sánchez**

**Dipòsit Legal: T. 727-2012**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

CARACTERIZACION DE LA COMPOSICION FENOLICA DE UVAS Y VINOS DE LA VARIEDAD MALBEC (VITIS VINIFERA L.):  
SU RELACION CON EL ORIGEN GEOGRAFICO, FACTORES VITIVINICOLAS Y VALOR COMERCIAL

Martin Leandro Fanzone Sánchez

Dipòsit Legal: T. 727-2012



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACION DE LA COMPOSICION FENOLICA DE  
UVAS Y VINOS DE LA VARIEDAD MALBEC (*Vitis vinifera* L.):  
SU RELACION CON EL ORIGEN GEOGRAFICO, FACTORES  
VITIVINICOLAS Y VALOR COMERCIAL**



**Martín Fanzone**

**Tarragona**

**Mayo, 2012**

Martín Fanzone

CARACTERIZACION DE LA COMPOSICION FENOLICA DE  
UVAS Y VINOS DE LA VARIEDAD MALBEC (*Vitis vinifera* L.):  
SU RELACION CON EL ORIGEN GEOGRAFICO, FACTORES  
VITIVINICOLAS Y VALOR COMERCIAL

TESIS DOCTORAL

dirigida por los Doctores  
Alvaro Peña Neira y Fernando Zamora Marín

Departament de Bioquímica i Biotecnologia  
Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2012



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

Facultat d'Enologia de Tarragona

Departament de Bioquímica i Biotecnologia

Campus Sescelades

C/ Marcel·lí Domingo, s/n

43007 Tarragona

Tel. (977) 55 80 43

Fax. (977) 55 82 32

El Dr. Alvaro Peña Neira, professor del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile i el Dr. Fernando Zamora Marín, professor del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFIQUEN

Que aquest treball, titulat "CARACTERIZACION DE LA COMPOSICION FENOLICA DE UVAS Y VINOS DE LA VARIEDAD MALBEC (*Vitis vinifera* L.): SU RELACION CON EL ORIGEN GEOGRAFICO, FACTORES VITIVINICOLAS Y VALOR COMERCIAL", que presenta MARTIN FANZONE per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció en el Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile i en el Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili i que tots els resultats presentats són fruit de les experiències realitzades.

Tarragona, 5 de marzo de 2012

Dr. Alvaro Peña Neira

Dr. Fernando Zamora Marín

***Dedicado a***

*Mi padre, mi madre y mis hermanas*

## AGRADECIMIENTOS

*En las últimas líneas que estoy escribiendo al finalizar este manuscrito, quiero agradecer a todas aquellas personas que me acompañaron durante estos 4 años brindándome su apoyo, ayuda y cariño, pilares fundamentales para enfrentar este desafío.*

*En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a las autoridades del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por haberme brindado el soporte técnico y económico para ejecutar este trabajo, y a la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili por permitirme realizar los estudios de Doctorado.*

*A mis profesores tutores, Dr. Alvaro Peña-Neira y Dr. Fernando Zamora, por el invaluable aporte científico y la confianza depositada en mí para concretar este proyecto, son un verdadero ejemplo a seguir en el ámbito profesional y personal. Fernando, muchas gracias por recibirme en Tarragona, permitirme conocer tu hermoso grupo de trabajo y, sobretodo, por tu excelente predisposición y amabilidad en todo momento. Alvaro, que más puedo decirte que agradecerte enormemente todo lo compartido durante este tiempo, tu amistad, tus enseñanzas, tus consejos y tu apoyo incondicional en esta importante etapa de mi vida. Gracias por abrirme las puertas de Santiago y hacerme sentir como en casa.*

*A mis amigas y compañeras del día a día, Viviana Jofré y Mariela Assof, por estar siempre presentes compartiendo tantos momentos dentro y fuera del laboratorio, por la contención, la alegría, las reflexiones, los sabios consejos, y muchas otras cosas que han enriquecido mi crecimiento diario.*

*A todo el personal de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza por el tiempo compartido. A los miembros del equipo de enología y del panel sensorial por su colaboración y asistencia técnica en la producción y degustación de los vinos. Al grupo de jóvenes investigadores con los que he coincidido en mayor o menor medida, y en especial a Santiago Sari e Iván Cklic, por su amistad y buenas diversiones.*

*A Mariana de la Cruz y Eugenia Turaglio por el trabajo incansable en los ensayos a campo, en bodega y en el procesamiento de las muestras.*

*A las autoridades del Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile y del Departament de Bioquímica i Biotecnología, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili por la contribución a este estudio a través del apoyo analítico. A los profesores, alumnos y, para no olvidarme de nadie, a todos sus miembros por los conocimientos brindados, la hospitalidad y la calidez durante mis estadías en tan maravillosos lugares, que por cierto han sido muy confortables. Espero que nuestras relaciones perduren en el tiempo.*

*A la Dra. Carmen Gómez-Cordovés del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid, España), por la cooperación en la identificación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD/ESI-MS. Muchas gracias por su dedicación y largas charlas durante mi pasantía, fue una experiencia muy interesante y productiva.*

*Un agradecimiento especial a la empresa Bodegas Esmeralda S.A., representada en este caso por Fernando Buscema, Federico Rodríguez, Pablo Virgilito, Pablo Ortega y Roy Urvieta, por el interés mostrado en este trabajo, por proveer los viñedos y parte de los vinos evaluados en este estudio, y por estar siempre a nuestra disposición. Asimismo, agradezco inmensamente a todas las bodegas que colaboraron con muestras de vino para el desarrollo de esta tesis: Antigal, CAP Vistalba, Chandon, Clos de Chacras, Dominio del Plata, Escorihuela, Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCuyo, Finca La Celia, Finca La Juanita, La Casa del Rey, Lagarde, Mendel, Nieto Senetiner, Norton, Peñafior, Salentein, Séptima, Sopenhia, Tapiz, Tempus Alba, Terrasur y Trivento.*

*A vos Malena, por tu amor, aliento, comprensión y paciencia en los últimos momentos. Tu compañía fue muy importante para culminar este proceso. Gracias, también, por cuidar de mí.*

*Y por supuesto, gracias de todo corazón a mis padres, Lorenzo y Juani, por ser mis ejemplos de vida y junto a mis hermanas, Sabri y Georgi, y mi cuñado Martín por el cariño incondicional, la preocupación y la fuerza para continuar hacia adelante.*

*A mis amigos de siempre, simplemente por estar.*

*Consciente de dejar a alguien en el tintero, pido disculpas, y hago extensivo el agradecimiento a todos los que han hecho posible este trabajo.*

*Muchas gracias a todos!!!*

**Martín Fanzone**



## RESUMEN

El conocimiento de la composición química de la uva y el vino, y particularmente de la composición fenólica, constituye una herramienta clave en el monitoreo y mejoramiento de la calidad de los productos, debido a su impacto directo sobre las características organolépticas y a sus propiedades funcionales. Actualmente, la tendencia del mercado del vino tinto esta orientada hacia la elaboración de productos con un alto contenido polifenólico, es por ello que resulta fundamental la comprensión de estos parámetros de calidad y de los múltiples factores que inciden sobre los mismos. En el marco de la vitivinicultura argentina, la variedad Malbec (*Vitis vinifera* L.) es considerada el cultivar tinto emblemático del país y se encuentra ampliamente distribuida en diferentes ecosistemas, destacándose la Provincia de Mendoza con más de 85% del total. Sin embargo, a pesar de su importancia económica y cultural, existe un gran desconocimiento sobre su composición química. Teniendo en cuenta esta necesidad, el objetivo de la presente Tesis Doctoral fue caracterizar la composición fenólica (flavonoide y no-flavonoide) de uvas y vinos Malbec en relación a otros cultivares, al origen geográfico, a ciertos manejos vitivinícolas y a su valor comercial.

El estudio comparativo de uvas Malbec y Cabernet Sauvignon, provenientes de diversas zonas vitícolas de Mendoza, mostró algunas diferencias en los parámetros fenólicos determinados en hollejos, semillas y pulpa. Las bayas Malbec presentaron mayor concentración de estos compuestos en hollejo y pulpa, mientras que Cabernet Sauvignon mostró esta tendencia en semillas. Paralelamente, se observó la influencia de la región de procedencia, encontrándose niveles superiores de fenoles totales, derivados antociánicos, estilbenos y flavanoles a medida que aumenta la altitud del viñedo. Estos resultados fueron confirmados en vinos Malbec de dos vendimias diferentes, en donde la aplicación del análisis canónico discriminante permitió la correcta diferenciación y clasificación de los vinos de acuerdo a su origen, empleando como variables predictoras algunos ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoles, dihidroflavonoles y antocianinas.

Adicionalmente, se evaluaron vinos de los cultivares Malbec, Bonarda, Cabernet Sauvignon, Merlot, Shiraz y Tempranillo, y se observaron diferencias cualitativas y cuantitativas en parámetros fenólicos globales, componentes del color y perfil de flavonoides y no-flavonoides, confirmando la influencia del factor “variedad” sobre estos compuestos. Los vinos cvs. Tempranillo, Shiraz y Merlot se caracterizaron por una alta proporción de compuestos no-flavonoides y flavanoles, los vinos Bonarda y Cabernet Sauvignon por el predominio de derivados flavánicos, y los vinos Malbec por la mayor proporción de dihidroflavonoles y antocianinas. En términos cuantitativos, los vinos Malbec mostraron una mayor riqueza fenólica en comparación al resto de las variedades.

En cuanto a los manejos vitivinícolas, se estudió el efecto del aclareo de racimos y del sangrado parcial de jugo sobre la composición fenólica de uvas y vinos Malbec. En el primer caso, los tratamientos aplicados en diferentes momentos de la fase de maduración de las bayas sólo modificaron significativamente los componentes del rendimiento de las plantas, mientras que su incidencia sobre los parámetros físicos y químicos de las uvas y vinos fue moderada y debida fundamentalmente a los factores “año de cosecha y ubicación geográfica del viñedo”. En general, los aclareos realizados en etapas tempranas del desarrollo de la baya (tamaño de grano de arveja y envero) provocaron un aumento en la biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos en hollejos y semillas, trasladándose este efecto a la composición de los vinos. Por su parte, la práctica de sangrado previo a la fermentación alcohólica demostró que puede mejorar la composición fenólica de vinos de esta variedad, favoreciendo así la capacidad de envejecimiento en productos de guarda. Sin embargo, se confirmó que las diferencias producidas en la proporción sólido/líquido del mosto no se traducen en modificaciones composicionales proporcionales a la intensidad del tratamiento efectuado, y que la misma deberá seleccionarse de acuerdo a las características iniciales de la uva al momento de cosecha.

De modo complementario, se analizaron comparativamente vinos Malbec y Cabernet Sauvignon de distintos segmentos de precio, encontrándose ciertas diferencias en los parámetros fenólicos globales, en los componentes del color y en el perfil de flavonoides, no-flavonoides y polisacáridos. En general, se observó una tendencia hacia mayores concentraciones de estos compuestos con el incremento del valor comercial de los vinos. Estos resultados coincidieron con la descripción sensorial, presentándose mayores registros de los atributos visuales y gustativos en los vinos de alta gama.

Finalmente, es importante destacar la presencia de dihidroflavonoles (dihidroquercetina-3-glucósido, dihidroquercetina-3-ramnósido y dihidrokaempferol-3-glucósido) en el cultivar Malbec, representando más del 30% y del 20% del contenido total de fenoles no-antociánicos, en uvas y vinos respectivamente, lo cual podría ser considerado como un rasgo distintivo desde el punto de vista taxonómico. En todas las situaciones evaluadas, la dihidroquercetina-3-glucósido fue el compuesto mayoritario, con concentraciones superiores al resto de los flavonoides y no-flavonoides identificados en los vinos. A partir de estas observaciones, se estudió la capacidad de interacción entre dihidroquercetina y malvidina-3-glucósido obteniéndose resultados satisfactorios que permiten suponer la potencialidad de este copigmento sobre la estabilidad de las antocianinas y su contribución al color de los vinos de esta variedad.

• INTRODUCCION .....	1
1. Morfología y composición química de la uva al momento de cosecha.....	2
2. Composición fenólica de uvas y vinos .....	5
2.1. No-flavonoides .....	6
2.1.1. Acidos fenólicos .....	6
2.1.1.1. Acidos hidroxibenzoicos.....	7
2.1.1.2. Acidos hidroxicinámicos.....	7
2.1.2. Estilbenos.....	8
2.1.3. Alcoholes fenólicos y compuestos relacionados.....	8
2.2. Flavonoides.....	9
2.2.1. Flavanoles .....	10
2.2.2. Flavonoles .....	12
2.2.3. Antocianos .....	12
2.2.4. Dihidroflavonoles.....	14
2.2.5. Flavonas .....	15
3. Biosíntesis de compuestos fenólicos en las uvas .....	15
4. Fisiología de la maduración de la baya. Evolución de los compuestos fenólicos .....	18
5. Factores que afectan la biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos en las bayas .....	20
6. Evolución de los compuestos fenólicos durante la vinificación y crianza del vino tinto .....	23
6.1. Extracción de antocianinas y flavanoles durante la vinificación .....	23
6.2. Cambios en la composición fenólica durante la vinificación y crianza del vino .....	25
6.2.1. Procesos enzimáticos.....	25
6.2.2. Reacciones químicas .....	26
6.2.2.1. Copigmentación .....	26
6.2.2.2. Condensación directa antocianina-flavanol, flavanol-flavanol y antocianina- antocianina.....	28
6.2.2.3. Condensación antocianina-flavanol, flavanol-flavanol y antocianina-antocianina mediada por aldehídos .....	29
6.2.2.4. Formación de piranoantocianinas.....	30
6.2.2.5. Reacciones de condensación con otros compuestos.....	32
6.2.2.6. Interacciones entre flavonoides y otras macromoléculas del vino.....	32
7. El vino y la calidad .....	33
7.1. Composición química del vino.....	34
7.1.1. Componentes odorantes .....	34
7.1.2. Componentes gustativos .....	35
7.1.3. Otros componentes .....	36
8. La vitivinicultura argentina .....	37
8.1. Breve reseña histórica .....	37
8.2. Situación actual de contexto .....	38
8.3. Características de la cadena vitivinícola .....	39
8.4. Consideraciones generales .....	39
9. La variedad Malbec ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	40
9.1. Origen .....	40
9.2. Antecedentes en Argentina.....	41
9.3. Regiones de cultivo.....	41
9.4. Comportamiento agronómico y aptitud enológica .....	42

---

• HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	44
• RESULTADOS Y DISCUSION .....	47
<b>CAPITULO I.</b> Influencia del origen geográfico sobre la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	48
<b>Apartado I.1.</b> Caracterización de la composición fenólica de uvas Malbec cultivadas en diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (Argentina).....	50
<b>Apartado I.2.</b> Caracterización de la composición fenólica de bajo peso molecular y perfil antocianico de vinos Malbec provenientes de diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza.....	76
<b>Apartado I.3.</b> Caracterización de la fracción flavánica y otras fracciones fenólicas de vinos Malbec de diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza.....	99
<b>CAPITULO II.</b> Efecto del control de carga (aclareo o raleo de racimos), año de cosecha y ubicación geográfica del viñedo sobre la composición fenólica de uvas y vinos Malbec.....	119
<b>Apartado II.1.</b> Incidencia del raleo de racimos sobre la composición fenólica de uvas Malbec provenientes de un viñedo de Altamira (Valle de Uco, Mendoza). Evolución de estos compuestos durante el período de maduración de las bayas en dos vendimias consecutivas (2008-2009).....	121
<b>Apartado II.2.</b> Estudio comparativo del efecto del raleo de racimos sobre la composición fenólica de uvas y vinos Malbec de dos zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (Altamira y Gualtallary), durante la vendimia 2009.....	149
<b>CAPITULO III.</b> Efecto de la técnica de sangrado sobre la composición fenólica de vinos Malbec.....	181
<b>CAPITULO IV.</b> Impacto de la composición fenólica y polisacarídica en el valor comercial de vinos Malbec de la Provincia de Mendoza.....	218
<b>CAPITULO V.</b> Estudio comparativo de la composición fenólica de vinos Malbec con vinos provenientes de las otras cinco variedades tintas más cultivadas en la Provincia de Mendoza.....	251
<b>CAPITULO VI.</b> Evaluación de la dihidroquercetina y otros fenoles de importancia en vinos de la variedad Malbec como compuestos de copigmentación de malvidina-3-glucósido.....	279
• CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	294
• ANEXO I: Desarrollo Experimental. Materiales y Métodos.....	303
• ANEXO II: Publicaciones y Comunicaciones Científicas.....	324
• BIBLIOGRAFIA .....	328



## INTRODUCCION

---

## **1. Morfología y composición química de la uva al momento de cosecha**

La planta de vid posee frutos (uvas) clasificados botánicamente como “bayas”, las cuales se organizan o agrupan en un conjunto o “racimo” a través de un órgano herbáceo o leñoso conocido como “raspón o escobajo”. A su vez, cada baya se encuentra unida al escobajo por medio del “pedicelo”, por el cual ingresan los vasos conductores que suministran el agua y nutrientes a la misma (Ribéreau-Gayon et al., 2006d).

Las bayas están constituidas por un grupo de tejidos (pericarpio) que rodea y protege las semillas. El pericarpio se divide en exocarpo (hollejo o piel), mesocarpo (pulpa) y endocarpo (tejido que recubre el receptáculo de las semillas). El hollejo comprende una región heterogénea formada hacia el exterior por una cutícula, recubierta de una capa cerosa o pruina, y hacia el interior por una epidermis (zona compuesta por 2 capas de células alargadas en posición tangencial) y una hipodermis (zona compuesta por 6 a 8 capas de células inicialmente rectangulares y luego poligonales). La pulpa es la parte más voluminosa de la baya y se compone de 25-30 capas de células poligonales grandes, de paredes celulares muy delgadas; y finalmente, las semillas están formadas desde el exterior hacia el interior por una cutícula, una epidermis, y 3 tegumentos que rodean el albumen y el embrión (Ribéreau-Gayon et al., 2006d).

En las uvas cosechadas con madurez tecnológica, el peso fresco de los racimos está representado aproximadamente por el 2-8% de escobajos, 5-20% de hollejos, 1-6% de semillas y 74-90% de pulpa y jugo. Los componentes químicos que conforman las bayas son principalmente agua, azúcares, elementos minerales, ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, lípidos, sustancias odorantes y compuestos fenólicos (Boulton et al., 2002).

El agua es el componente químico mayoritario de la uva madura (75-85%), y actúa como solvente de diversos compuestos químicos (volátiles y no-volátiles) que son conducidos hacia la misma principalmente a través del floema (Keller et al., 2006). Aproximadamente el 99% del agua presente en las bayas es absorbida por las raíces desde el suelo, por lo tanto la disponibilidad de agua en el mismo afectará significativamente el crecimiento de la planta y el desarrollo de las bayas (Conde et al., 2007).

Los azúcares representan normalmente más del 90% de los sólidos solubles totales en bayas maduras, se acumulan principalmente en las células de la pulpa en concentraciones comprendidas entre 150 y 300 g/L, y constituyen la principal fuente de carbono utilizada por las levaduras durante la fermentación alcohólica. En la mayoría de los cultivares de *Vitis vinifera*, el 95-99% de estos azúcares se presentan bajo la forma de hexosas, especialmente glucosa y fructosa, y el resto se compone fundamentalmente de sacarosa, y algunas pentosas (arabinosa, ramnosa, ribosa, xilosa, maltosa y rafinosa, entre otros) (Boulton et al., 2002; Keller, 2010). Las flores y uvas inmaduras pueden contener algo de almidón, debido a su actividad fotosintética, pero el azúcar se importa

hacia las bayas en desarrollo en forma de sacarosa a través del floema, la cual se hidroliza por acción de enzimas invertasas en sus correspondientes hexosas. Adicionalmente, las bayas contienen polisacáridos, principalmente insolubles, en las paredes celulares del hollejo y otros tejidos resistentes, los cuales se componen de celulosa y pectinas con pequeñas cantidades de hemicelulosa (xiloglucanos) (Vidal et al., 2001). Las cadenas de celulosa poseen moléculas de glucosa unidas a las mismas; mientras que las pectinas y hemicelulosas también contienen otros azúcares como arabinosa, xilosa, galactosa, manosa y ramnosa, así como los ácidos glucurónico y galacturónico (Vidal et al., 2001; Doco et al., 2003).

Los ácidos tartárico y málico representan aproximadamente entre el 70 y 90% del contenido total de ácidos orgánicos presentes en bayas maduras, encontrándose pequeñas cantidades de otros ácidos como cítrico, oxálico, succínico, fumárico, láctico y acético, así como también ácidos fenólicos, aminoácidos y ácidos grasos. La mayor parte de los ácidos orgánicos se acumulan en las vacuolas de las células de la pulpa y hollejo en forma libre o formando sales, principalmente con iones  $K^+$  y  $Na^+$ . La concentración de ácidos orgánicos en un jugo de uva madura varía generalmente entre 5 y 10 g/L, la cual, junto con la relación ácido málico/ácido tartárico y el contenido de cationes metálicos presentes, determina el pH del mismo (Keller, 2010).

Con respecto al nitrógeno, en las bayas maduras y en el mosto puede encontrarse en forma mineral ( $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$  y  $NO_3^-$ ) u orgánica (aminoácidos libres, péptidos, proteínas, urea y derivados de ácidos nucleicos, entre otros), alcanzando una concentración total comprendida generalmente entre 100 y 1200 mg/L (Conde et al., 2007). Aproximadamente entre el 50 y 90% del nitrógeno se presenta bajo la forma de aminoácidos libres (Roubelakis-Angelakis y Kliewer, 1992), mientras que el resto corresponde principalmente a proteínas,  $NH_4^+$  y  $NO_3^-$  (Keller, 2010). El mosto posee alrededor de 30 aminoácidos, pero sólo algunos se encuentran en concentraciones apreciables (prolina, arginina, glutamina, alanina, glutamato, serina y treonina). Estos compuestos también pueden presentarse como polímeros, desde pequeños oligopéptidos de 2-4 aminoácidos a grandes proteínas de más de 150 KDa. Durante la vinificación, gran parte de este macronutriente es metabolizado por levaduras y bacterias lácticas observándose niveles variables en el producto final, usualmente mayores en vinos tintos comparados con vinos blancos (Conde et al., 2007).

Adicionalmente al nitrógeno, la baya posee otros macronutrientes entre los cuales se destaca el potasio, con concentraciones cercanas a 1 g/L (Rogiers et al., 2006). Este elemento cumple funciones fisiológicas muy importantes para la vid (activación enzimática, control del potencial de la membrana plasmática y regulación del potencial osmótico), pero niveles excesivos en las bayas maduras pueden afectar negativamente la calidad de la uva y el vino, debido a su participación en la disminución de acidez y aumento del pH, perjudicando las características organolépticas y la estabilidad química y microbiológica del vino (Conde et al., 2007). Otros minerales como calcio y

magnesio se han observado en bayas en concentraciones promedio de 80 mg/L (Conde et al., 2007), junto con trazas de hierro, cobre, manganeso, zinc, boro, azufre y fósforo, entre otros (Rogiers et al., 2006).

En cuanto a la composición lipídica, las bayas poseen ceras epicuticulares e intracuticulares, ácidos grasos, y lípidos de membrana en hollejo y pulpa, y aceites en las semillas. Por su parte, las semillas contienen ácidos grasos poliinsaturados, principalmente linoleico y oleico, y saturados como palmítico y esteárico. Sin embargo, el grupo más importante de lípidos en términos de calidad de uvas y vinos corresponde a los carotenoides, especialmente  $\beta$ -caroteno (provitamina A) y luteína, en adición a compuestos minoritarios como xantofilas, neoxantina, violaxantina y zeaxantina (Conde et al., 2007). La importancia de los mismos radica en su participación como precursores de norisoprenoides volátiles, a través de su degradación enzimática durante la maduración de las bayas, contribuyendo al aroma y flavor de los productos (Baumes et al., 2002).

La composición aromática de la uva comprende diversos tipos de sustancias químicas agrupadas como compuestos volátiles propios de la variedad y precursores no volátiles (Rapp y Mandery, 1986; Francis et al., 1992; Gómez et al., 1994). Los compuestos químicos volátiles se encuentran en la uva distribuidos principalmente en el hollejo y en proporciones similares entre la pulpa y el jugo (Gómez et al., 1994). La concentración de los mismos en las diferentes partes de la baya (ng/L a mg/L) depende principalmente de su naturaleza química, del grado de madurez y de la variedad de uva. Estas sustancias químicas volátiles son extraídas del fruto principalmente durante el período de maceración y se mantienen inalteradas durante todo el proceso fermentativo (Francis et al., 1992; Bayonove et al., 2000). Entre las sustancias volátiles conocidas relacionadas con la tipicidad aromática de la variedad pueden distinguirse tres familias químicas principales: los compuestos terpénicos, las pirazinas y los  $C_{13}$ -norisoprenoides. Por su parte, los precursores de aromas (componentes químicos no volátiles) se distribuyen en la baya en forma similar a las sustancias volátiles mencionadas (Gómez et al., 1994). Estos componentes inodoros, que constituyen el potencial aromático del fruto, liberan la fracción volátil, que contribuye significativamente al aroma varietal del producto final, dependiendo de diversos factores (microorganismos fermentativos y tecnologías de vinificación y crianza). Dentro de este grupo se distinguen, principalmente, los glicósidos, los carotenoides y los compuestos azufrados (Di Stefano, 1999; Bayonove et al., 2000).

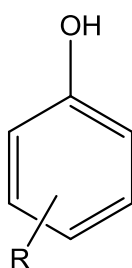
Por último, se destacan los compuestos fenólicos que constituyen un grupo químico esencial de las uvas y vinos tintos, y cuyo estudio representa el eje conductor de la presente Tesis Doctoral. A continuación se resume el estado actual de conocimientos sobre sus diferentes estructuras químicas, su biosíntesis y acumulación en las bayas, y su expresión y evolución en el vino.



## 2. Composición fenólica de uvas y vinos

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de sustancias químicas más abundantes del Reino Vegetal (Pridham, 1965). Son biosintetizados en las plantas a través del metabolismo secundario, y cumplen numerosas funciones biológicas que han permitido la adaptación y evolución de las distintas especies. Entre las mismas se encuentran, el transporte de hormonas, la atracción de agentes polinizadores, el crecimiento del tubo polínico y la fecundación, la dispersión de semillas, el establecimiento de relaciones simbióticas, la protección de los fotosistemas frente al daño oxidativo, las respuestas de defensa frente a la herbivoría y al ataque de patógenos, y la tolerancia a condiciones abióticas desfavorables (Shirley, 1996).

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos o polifenoles incluyen una gran diversidad de estructuras químicas muy heterogéneas, que se caracterizan por poseer al menos un núcleo bencénico sustituido con uno o varios grupos hidroxilos y una cadena lateral funcional (**Figura 1**). Su reactividad se debe tanto al carácter ácido de la función fenólica como al carácter nucleofílico que le confiere la alta densidad electrónica del anillo bencénico (Monagas et al., 2005a).



**Figura 1.** Estructura básica de los compuestos fenólicos

Representan importantes parámetros de calidad de uvas y vinos, debido a su influencia directa sobre las características organolépticas del producto, principalmente color, astringencia y amargor (Ribéreau-Gayon et al., 2006b; Santos-Buelga y De Freitas, 2009), si bien también se ha estudiado el impacto de algunos polifenoles sobre ciertos compuestos odorantes volátiles (Tominaga et al., 2003; Aronson & Ebeler, 2004). Aunque las propiedades cromáticas y gustativas de los polifenoles dependen primariamente de su estructura molecular, las mismas son moduladas por interacciones que tienen lugar entre dichos compuestos, como así también con otros constituyentes del vino y la saliva (Vidal et al., 2004b; Cheynier et al., 2006).

Adicionalmente, se los relaciona con efectos fisiológicos benéficos sobre la salud humana, vinculado al consumo moderado de vino tinto (Renaud y de Lorgeril, 1992; Shrikhande, 2000; Dávalos y Lasunción, 2009; Guilford y Pezzuto, 2011). Entre los mismos se pueden mencionar las propiedades antioxidantes (Alonso et al., 2002), antiinflamatorias (Bertelli et al., 2002), anticancerígenas (Park et al., 2001), y protectoras frente a enfermedades cardíacas (Gross, 2004; Yao et al., 2004), entre otras.

Estos compuestos pueden ser clasificados siguiendo varios criterios. La clasificación más común y empleada para describir la matriz fenólica de uvas y vinos se basa en la estructura de su esqueleto carbonado, dividiéndose en compuestos no-flavonoides y flavonoides. Cada grupo se divide a su vez en diferentes familias químicas, cuyas características estructurales le confieren propiedades específicas tales como color, aroma y sabor (Cheynier et al., 2006). En las uvas, los compuestos flavonoides se encuentran principalmente distribuidos en hollejos, semillas y escobajo, y en menor proporción en pulpa; mientras que los no-flavonoides se hallan esencialmente en la pulpa, en relación a otras partes de la baya (Zamora, 2003).

## 2.1. No-flavonoides

Los principales compuestos no-flavonoides presentes en la uva y el vino son los ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), en sus formas libres y esterificadas, y los estilbenos. Adicionalmente a estos compuestos, en el vino se pueden encontrar algunos alcoholes fenólicos y otros derivados relacionados.

### 2.1.1. Acidos fenólicos

Dentro de este grupo se encuentran los compuestos formados por un sólo anillo de 6 átomos de carbono, incluyendo a los ácidos hidroxibenzoicos, con una estructura del tipo  $C_6-C_1$  (Figura 2), y a los ácidos hidroxicinámicos, con una estructura  $C_6-C_3$  (Figura 3).

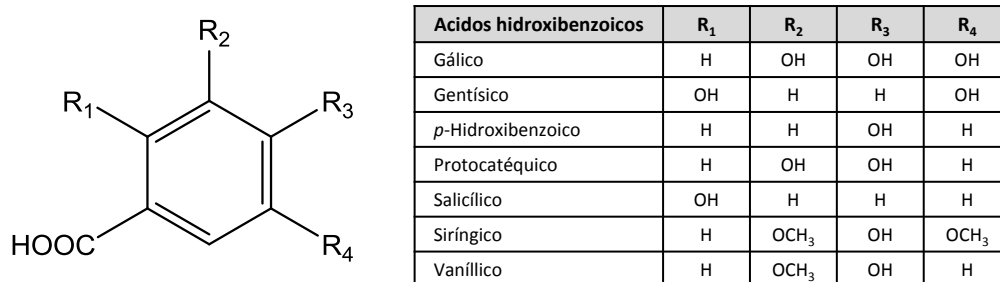


Figura 2. Estructura química de los principales ácidos hidroxibenzoicos presentes en uvas y vinos.

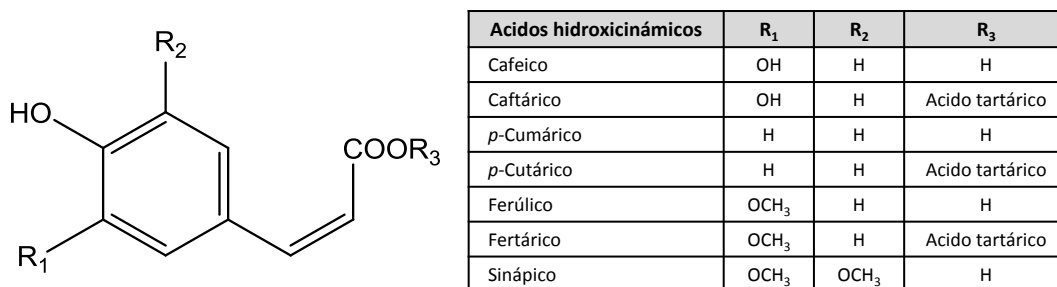


Figura 3. Estructura química de los principales ácidos hidroxicinámicos presentes en uvas y vinos.

### 2.1.1.1. Ácidos hidroxibenzoicos

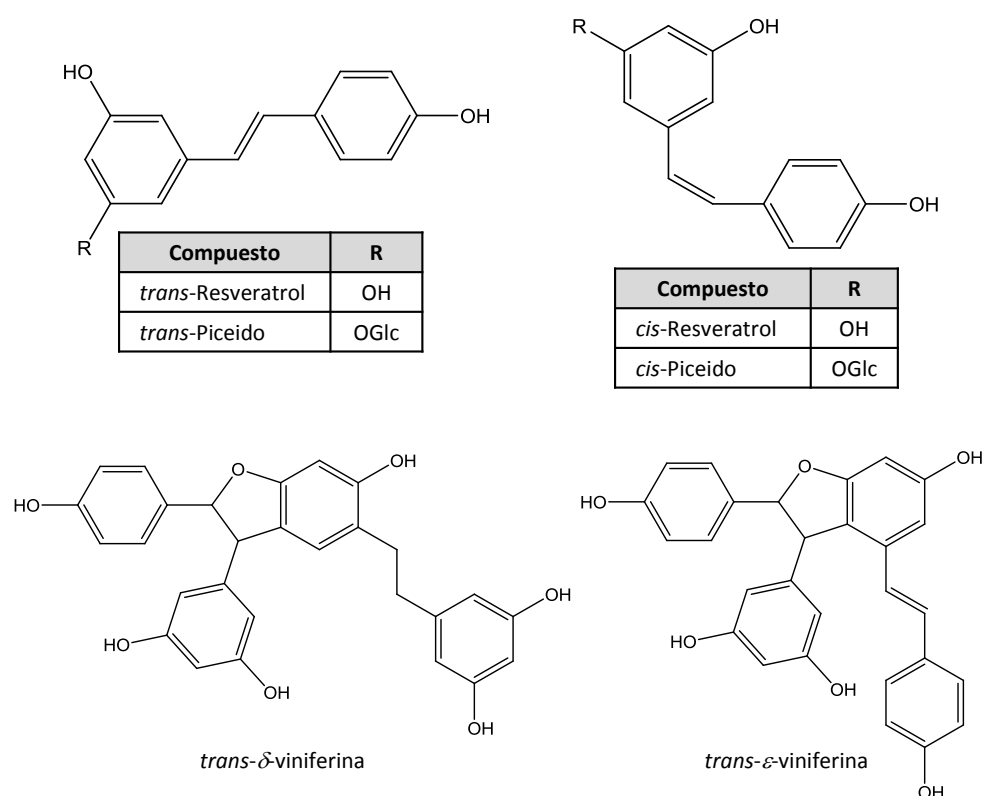
El ácido gálico es el único ácido hidroxibenzoico formalmente identificado en estado nativo en las uvas, encontrándose en la pulpa y en las partes sólidas de la baya (semilla y hollejo) en forma libre o bien como éster de flavanol ((-)-epicatequina-3-galato) (Su & Singleton, 1969). Posee propiedades gustativas amargas y astringentes (Hufnagel y Hofmann, 2008), y en forma libre se oxida muy fácilmente formando quinonas. Los principales ácidos de este grupo, identificados en uvas y vinos, se presentan en la **Figura 2**. Complementariamente a estos compuestos, se han descrito una serie de derivados en vinos blancos y tintos, incluyendo por ejemplo vanillato de etilo, *p*-hidroxibenzoato de etilo, ésteres metílicos de los ácidos vanílicos y protocatéuico, protocatecato de etilo, galato de etilo y el éster glucosilado del ácido vanílico, entre otros (Monagas et al., 2005a). Por su parte, los vinos criados en contacto con madera poseen taninos hidrolizables, que consisten en poliésteres de ácido gálico (galotaninos) o ácido elágico (elagitaninos), los cuales por hidrólisis pueden originar los correspondientes ácidos (Sanz et al., 2008).

### 2.1.1.2. Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran ubicados principalmente en las vacuolas de las células del hollejo y de la pulpa de las bayas bajo la forma de ésteres tartáricos (Monagas et al., 2005a). Los principales compuestos presentes en la uva son los isómeros *trans* del ácido caftárico (cafeiltartárico), cutárico (*p*-cumariltartárico) y fertárico (feruliltartárico), aunque también se han detectado pequeñas cantidades de los isómeros *cis* (Singleton et al., 1978; Adams, 2006), y los ésteres glucosilados de los ácidos *trans-p*-cumárico y *trans*-ferúlico (Monagas et al., 2005a). Adicionalmente a estos compuestos, en el vino se pueden encontrar las formas libres de los ácidos mencionados (Somers et al., 1987) y una serie de derivados descritos por diversos autores (Rentzsch et al., 2009). Desde el punto de vista organoléptico, estos compuestos poseen propiedades gustativas amargas, aunque pueden aportar sensaciones minoritarias de astringencia (Hufnagel y Hofmann, 2008) y acidez. Carecen de color en el espectro visible (Zamora, 2003), pero participan en la acilación de las antocianinas (ácidos *p*-cumárico y cafeico), influyen indirectamente en el color del vino a través de su participación en el fenómeno de copigmentación (Dimitric-Markovic et al., 2000; Darias-Martín et al., 2002), y actúan como precursores en la formación de piranoantocianinas (Rentzsch et al., 2009). Por su parte, los ácidos ferúlico y cumárico pueden generar defectos olfativos debido a su degradación microbiana originando fenoles volátiles (Chatonnet et al., 1992). Por otro lado, el ácido cafeico y su éster tartárico son los principales sustratos de la oxidación enzimática de los mostos, formando quinonas muy reactivas que pueden provocar la oxidación de antocianinas y taninos (Singleton, 1987). La **Figura 3** muestra la estructura química de los principales ácidos hidroxicinámicos presentes en uvas y vinos.

### 2.1.2. Estilbenos

Los estilbenos poseen una estructura molecular formada básicamente por dos anillos bencénicos separados por un puente eteno ( $C_6-C_2-C_6$ ). Son biosintetizados en las plantas de vid, especialmente en los hollejos y semillas de las bayas y en las raíces, como respuesta a condiciones de estrés (fitoalexinas), tales como infecciones fúngicas y radiación UV (Langcake y Pryce, 1976; Jeandet et al., 1991). Si bien existen en diferentes especies vegetales, las uvas y sus productos derivados se consideran la fuente dietaria más importante de estilbenos (Guebailia et al., 2006). El compuesto más abundante y estudiado en uvas y vinos es el resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), que puede encontrarse en sus formas libres (isómeros *cis* y *trans*) o glucosilados formando los denominados piceidos (**Figura 4**). Los estilbenos también pueden formar complejos oligoméricos y poliméricos denominados viniferinas (Rentsch et al., 2009). En general, no poseen propiedades sensoriales, sin embargo, según diversos estudios se los relaciona con funciones benéficas para la salud humana por sus potenciales efectos antioxidante, anticarcinogénico, cardioprotectivo y neuroprotectivo (Saiko et al., 2008).

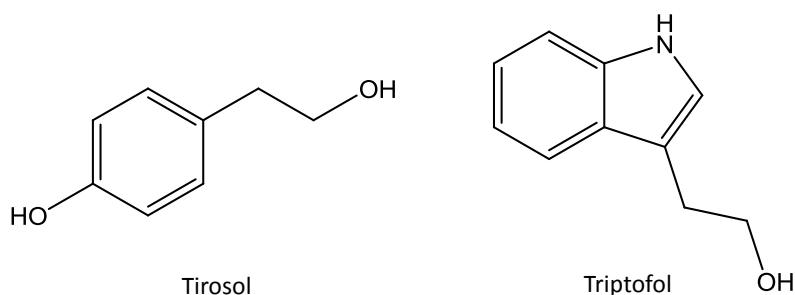


**Figura 4.** Estructura química de los principales estilbenos y derivados presentes en uvas y vinos.

### 2.1.3. Alcoholes fenólicos y compuestos relacionados

En adición a los fenoles no-flavonoides descriptos anteriormente, en el vino se pueden encontrar otros compuestos tales como el tirosol (*p*-hidroxifeniletanol) y el triptofol (indol-3-etanol)

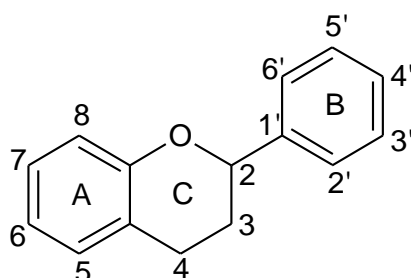
formados durante la fermentación alcohólica a partir de la tirosina (Barcenilla et al., 1989) y del triptófano (Gil y Gómez-Cordovés, 1986), respectivamente (**Figura 5**).



**Figura 5.** Estructura química del tirosol y triptofol presentes en vinos.

## 2.2. Flavonoides

Los compuestos flavonoides constituyen el grupo de polifenoles de mayor importancia tecnológica en uvas y vinos, tanto en calidad como en cantidad (Cheynier et al., 2006). Su estructura molecular básica (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) comprende dos anillos bencénicos polihidroxilados (A y B), unidos a través de un heterociclo central oxigenado (C) (**Figura 6**). El grado de insaturación del anillo C determina las distintas familias de compuestos englobados dentro de este grupo, distinguiéndose los flavanoles, flavonoles y antocianinas, y en menor proporción los dihidroflavonoles y flavonas. Dentro de cada familia, los distintos compuestos se diferencian de acuerdo al número y localización de los grupos hidroxilos y metoxilos presentes en el anillo B. Dichas estructuras básicas pueden presentarse a su vez bajo formas *O*-glicosiladas en el C3 del anillo C, y estos glicósidos a su vez pueden encontrarse acilados o no. Una característica distintiva de estos compuestos es que pueden actuar tanto como electrófilos o como nucleófilos, lo que explica su alta reactividad en la matriz del vino (Kennedy et al., 2006).



**Figura 6.** Estructura química básica de los flavonoides presentes en uvas y vinos.

### 2.2.1. Flavanoles

Los flavanoles o flavan-3-oles se encuentran ubicados en diferentes tejidos de la planta de vid (madera, hojas, escobajo) y en las partes sólidas de la baya (hollejo y semilla), como monómeros o formando oligómeros y polímeros conocidos con el nombre de proantocianidinas o taninos condensados. En uvas y vinos, el contenido de proantocianidinas es muy superior a la concentración de las unidades monoméricas (Kennedy et al., 2006). Desde el punto de vista sensorial, poseen propiedades gustativas (amargor) y táctiles (astringencia), e intervienen en la estabilización del color a través de reacciones de copigmentación y/o condensación con las antocianinas. También participan en reacciones de pardeamiento oxidativo químico y enzimático, en interacciones con otras macromoléculas del vino y en la formación de turbidez o precipitados (Terrier et al., 2009; Santos-Buelga y De Freitas, 2009).

Las unidades monoméricas comúnmente presentes en uvas de *Vitis vinifera* son la (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, y (-)-epigalocatequina (Su & Singleton, 1969). La (+)-catequina y la (-)-epicatequina se presentan ortohidroxiladas en las posiciones C3' y C4' del anillo B, en tanto que la (+)-galocatequina y la (-)-epigalocatequina poseen un tercer grupo hidroxilo en la posición C5'. En la estructura química de estos compuestos existen dos carbonos asimétricos (C2 y C3) que determinan dos pares de isómeros ópticos con una configuración 2R:3S para (+)-catequina y (+)-galocatequina, y 2R:3R para (-)-epicatequina y (-)-epigalocatequina (Monagas et al., 2005a) (**Figura 7**). En la naturaleza, estos monómeros pueden encontrarse como tal, o bajo la forma de derivados metilados, glucosilados, acilados o esterificados con ácido gálico en la posición C3. En general, los monómeros mayoritarios en uvas y vinos son la (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-galato (Cheynier et al., 2000), y en menor concentración, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina, (+)-catequina-3-galato y (+)-galocatequina-3-galato (Monagas et al., 2005a).

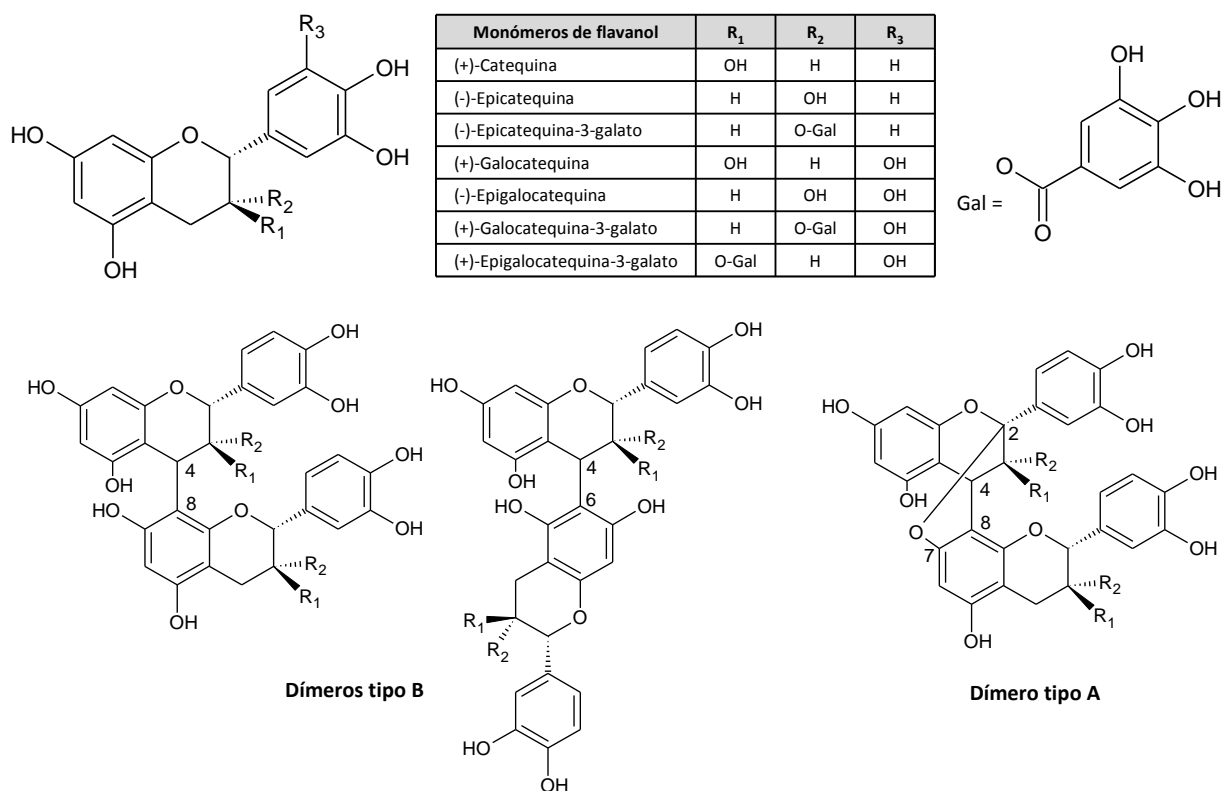
Con respecto a las proantocianidinas (oligómeros y polímeros), su denominación se refiere a la propiedad de liberar antocianidinas por calentamiento en medio ácido a partir de la ruptura del enlace interflavánico (Porter et al., 1986). En la uva se distinguen dos grupos de proantocianidinas dependiendo de la naturaleza de la antocianidina liberada (cianidina o delfinidina) en medio ácido (reacción de Bate-Smith): las procianidinas, compuestas por (+)-catequina y (-)-epicatequina, y las prodelfinidinas, compuestas por (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina. Las primeras se encuentran sólo en las semillas de las bayas, mientras que los hollejos poseen ambos grupos de compuestos (Monagas et al., 2005a).

Las proantocianidinas también se distinguen por el número de unidades de flavanoles que forman la cadena y por la naturaleza del enlace interflavánico. El término "oligómero" se refiere generalmente a moléculas con un número de unidades promedio o grado medio de polimerización (*mDP*) entre 2 y 5, mientras que los polímeros consisten en moléculas con un *mDP* > 5. Sin embargo,

estas definiciones son subjetivas y varían en función del sustrato y de la técnica de medición empleada (Waterhouse et al., 2000). En general, los hollejos se caracterizan por presentar polímeros de cadena larga, mientras que las semillas contienen proantocianidinas con un grado de polimerización menor y una mayor proporción de unidades galoiladas (13-29%) comparadas con los hollejos (3-6%) (McRae y Kennedy, 2011).

En función de la naturaleza del enlace, se encuentran las proantocianidinas de tipo B y las de tipo A (**Figura 7**). Las primeras son aquellas en que las uniones entre los monómeros están establecidas entre el C4 de la unidad superior (o de extensión) y el C6 o C8 de la unidad inferior, siendo más abundantes los dímeros C4 → C8 que los C4 → C6. Mientras que las proantocianidinas tipo A, presentan además un enlace tipo éter entre el C2 de la unidad superior y los grupos hidroxilos del C5 o C7 de la unidad inferior (Monagas et al., 2005a).

Existe una gran diversidad de oligómeros detectados en uvas y vinos, los cuales han sido reportados por diversos autores y se resumen en las revisiones bibliográficas realizadas por Monagas et al. (2005a) y Terrier et al. (2009). Por su parte, el conocimiento acerca de los polímeros presentes en dichas matrices es menor, debido a variabilidad existente en el tamaño molecular y en su composición, dificultando el análisis y la identificación.

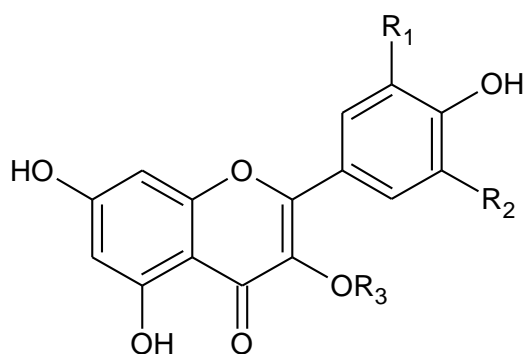


**Figura 7.** Estructura química de monómeros de flavanoles y dímeros tipo A y B presentes en uvas y vinos.

### 2.2.2. Flavonoles

Los flavonoles de la vid se localizan principalmente en los hollejos de las uvas y en las hojas (Terrier et al., 2009), aunque también se han detectado algunos compuestos en la pulpa (Pereira et al., 2006), y en los brotes e inflorescencias durante el desarrollo de la baya (Downey et al., 2003b). Se presentan principalmente bajo la forma de heterósidos (glucósidos, galactósidos, ramnósidos, rutinósidos o glucurónidos) de cuatro agliconas principales (quercetina, miricetina, kaempferol e isoramnetina) (**Figura 8**), no obstante se han identificado otros compuestos derivados de la laricitrina y siringetina (Mattivi et al., 2006; Castillo-Muñoz et al., 2007 y 2009), como así también algunos diglicósidos (Monagas et al., 2005a). Adicionalmente a estos compuestos, en el vino se pueden encontrar las formas libres, originadas probablemente por la hidrólisis de los glicósidos durante el proceso de vinificación (Cheynier et al., 2000).

Desde el punto de vista organoléptico, los flavonoles son pigmentos que contribuyen a la componente amarilla del color de los vinos, y debido a su estructura planar participan como cofactores en el fenómeno de copigmentación de las antocianinas (Boulton, 2001; Hermosín Gutiérrez et al., 2005). Con respecto a la quercetina, cuando se presenta en concentraciones elevadas en vinos tintos, puede aportar gusto amargo (Sáenz-Navajas et al., 2010c) acompañado de una cierta sensación de astringencia tipo “puckering” (Hufnagel y Hofmann, 2008).



Flavonol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Kaempferol	H	H	H
Kaempferol-3-glucósido	H	H	Glucosa
Kaempferol-3-galactósido	H	O-Gal	Galactosa
Kaempferol-3-glucurónido	OH	H	Ácido glucurónico
Quercetina	OH	H	H
Miricetina	OH	OH	H
Isoramnetina	OCH <sub>3</sub>	H	H
Laricitrina	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Siringetina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

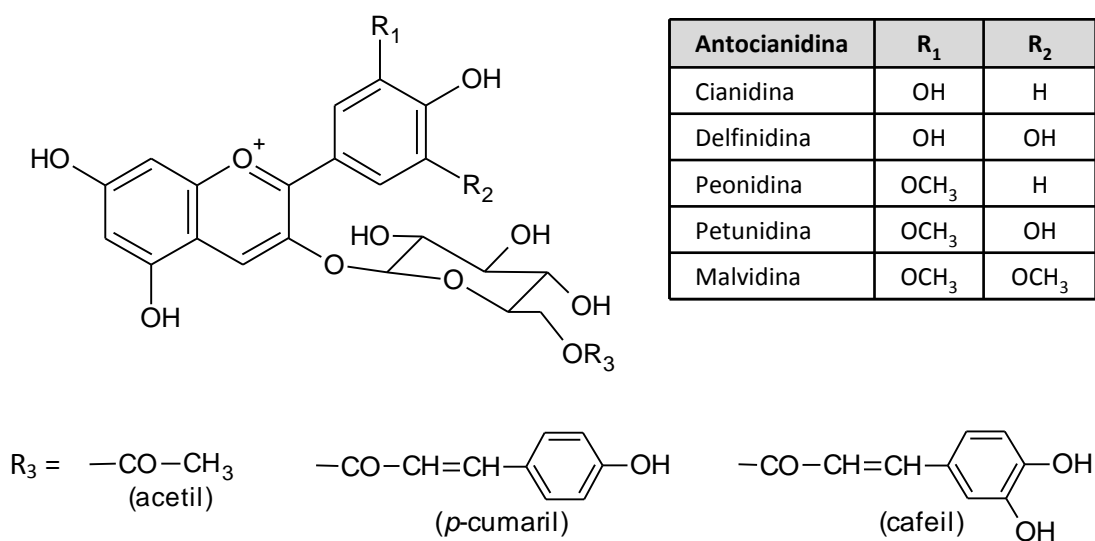
**Figura 8.** Estructura química de los principales flavonoles presentes en uvas y vinos.

### 2.2.3. Antocianinas

Las antocianinas o antocianos son los compuestos fenólicos responsables del color rojo de las uvas y vinos tintos, y se encuentran ubicados principalmente en los hollejos de las bayas, aunque también están presentes en la pulpa de algunas variedades tintoreras (Monagas y Bartolomé, 2009). En las concentraciones normalmente encontradas en los vinos tintos (0,3–1,2 g/L), las antocianinas no contribuyen intrínsecamente a la astringencia y parecen carecer de propiedades gustativas (Vidal et al., 2004a). Son pigmentos solubles en agua, formados por una aglicona (antocianidina) cuya



estructura básica comprende un anillo A (derivado del floroglucinol) unido a un heterociclo C, el cual a su vez se encuentra unido al anillo bencénico B (**Figura 9**). El anillo C posee una carga positiva situada sobre el átomo de oxígeno, la cual está deslocalizada en todo el heterociclo e incluso en los ciclos adyacentes (A y B). Esta deslocalización es la responsable de la interacción con la luz y, por lo tanto, del color rojo de la molécula (Zamora, 2003), pero también explica su inestabilidad, ya que dicha carga puede perderse por hidratación (Fulcrand et al., 2006). Las antocianinas identificadas en las uvas y vinos de *Vitis vinifera* son los 3-O-monoglucósidos y los 3-O-monoglucósidos acilados de las antocianidinas delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, las cuales difieren entre sí en el número y posición de los sustituyentes hidroxilos y metoxilos localizados en el anillo B (**Figura 9**). La acilación de estos compuestos se produce en el C6 de la molécula de glucosa por medio de la esterificación con los ácidos acético, *p*-cumárico y cafeico (Monagas y Bartolomé, 2009). Recientemente, se ha reportado en vinos la existencia de antocianinas aciladas con ácido láctico (Alcalde-Eon et al., 2006), y de compuestos derivados de la pelargonidina (Castillo-Muñoz et al., 2009). Adicionalmente, algunos autores han confirmado la presencia de 3,5- y 3,7-diglucósidos en uvas y vinos de *Vitis vinifera* (Vidal et al., 2004c; Alcalde-Eon et al., 2006; Castillo-Muñoz et al., 2009), como así también de algunos trímeros en extractos de hollejos (Vidal et al., 2004c).



**Figura 9.** Estructura química de las principales antocianinas presentes en uvas y vinos.

En medio acuoso, la mayoría de las antocianinas naturales coexisten bajo la forma de cuatro estructuras químicas en equilibrio, con características cromáticas particulares dependiendo del pH (Glories, 1984a; Mazza y Brouillard, 1987). Dichas formas son la base quinoidal de color azul, el catión flavilium de color rojo, la pseudo-base carbinol o hemiacetal incolora, y la forma chalcona, también incolora (Monagas et al., 2005a). En condiciones muy ácidas (pH < 2), las antocianinas

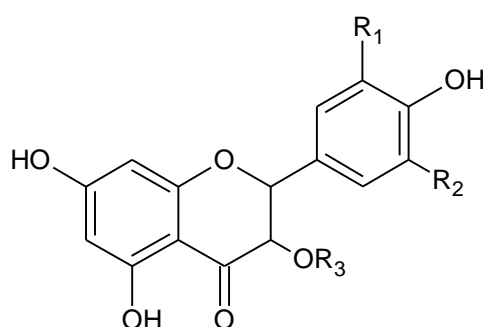
existen principalmente en la forma roja de catión flavilium. A medida que el pH aumenta, el catión flavilium desaparece debido a una rápida desprotonación, generándose las formas quinoidales de color azul. Paralelamente, también se produce la hidratación del catión flavilium dando lugar a la formación de la pseudo-base carbinol incolora. Ambas reacciones ocurren simultáneamente dependiendo de las constantes de equilibrio. Por otro lado, en condiciones levemente ácidas (pH 4-5) y temperaturas elevadas, la pseudo-base carbinol puede ser convertida a las formas *cis*- o *trans*-chalcona por medio de una reacción rápida de apertura del anillo y de un proceso lento de isomerización. Las chalconas pueden ser neutras e incoloras, o ionizarse y tomar un color levemente amarillo. La reversión a la forma flavilium por disminución del pH se produce más lentamente en el caso del isómero *trans* comparado con el *cis*, indicando que el primero puede ser irreversible. En el rango de pH de la mayoría de los vinos tintos (alrededor de 3,5), se puede considerar la existencia de un balance entre las diferentes formas. El catión flavilium de color rojo está presente en un 12,2%, estando el equilibrio desplazado mayoritariamente hacia la pseudo-base carbinol (45,2%) y la chalcona (27,6%), ambas incoloras, y minoritariamente hacia la base quinoidal de color azul (15%) (Glories, 1984b).

Además del factor pH, el color de las soluciones que contienen antocianinas también depende de la estructura y concentración del pigmento, temperatura, presencia de copigmentos, iones metálicos, enzimas, oxígeno, azúcares y sus productos de degradación, y dióxido de azufre, entre otros. Durante el proceso de vinificación, las antocianinas participan en reacciones de oxidación, hidrólisis y condensación, generándose importantes cambios en el color del vino (Monagas et al., 2005a).

#### **2.2.4. Dihidroflavonoles**

Los dihidroflavonoles o flavanonoles desempeñan un rol funcional en las plantas de vid, actuando como mecanismo de defensa ante el ataque de hongos como *Botritis* y son considerados también compuestos bioactivos capaces de promover efectos fisiológicos benéficos (antioxidantes, antimicrobianos, antibacteriales, hepatoprotectivos y quimiopreventivos, entre otros) en humanos (Vitrac et al., 2001; Landrault et al., 2002). Según la literatura, son considerados compuestos minoritarios en *Vitis vinifera*. Entre los dihidroflavonoles reportados en uvas y vinos de variedades blancas figuran la astilbina (dihidroquercetina-3-ramnósido) y la engeletina (dihidrokaempferol-3-ramnósido) (Trousdale y Singleton, 1983; Baderschneider y Winterhalter, 2001), y otros glicósidos de ambos compuestos (Masa et al., 2007; Masa y Vilanova, 2008; Vilanova et al., 2009). Mientras que en vinos tintos se han identificado dihidrokaempferol-3-glucósido, dihidromiricetina-3-ramnósido y astilbina (Vitrac et al., 2001; Landrault et al., 2002; Vitrac et al., 2002; Pozo-Bayón et al., 2003; Jeffery

et al., 2008). La **Figura 10** muestra la estructura de los principales dihidroflavonoles detectados en uvas y vinos.

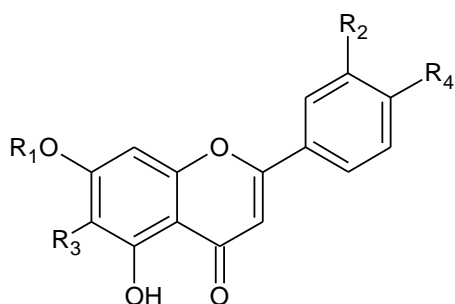


Dihidroflavonol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Dihidrokaempferol	H	H	H
Dihidrokaempferol-3-ramnósido	H	H	Ramnosa
Dihidrokaempferol-3-glucósido	H	H	Glucosa
Dihidroquercetina	OH	H	H
Dihidroquercetina-3-ramnósido	OH	H	Ramnosa
Dihidroquercetina-3-glucósido	OH	H	Glucosa
Dihidromiricetina-3-ramnósido	OH	OH	Ramnosa

**Figura 10.** Estructura química de los principales dihidroflavonoles presentes en uvas y vinos.

### 2.2.5. Flavonas

Estos compuestos constituyen una fracción minoritaria de los fenoles presentes en *Vitis vinifera*. En hojas se han identificado algunos glucósidos de apigenina y luteolina (Revilla et al., 1985; Hmamouchi et al., 1996), mientras que otros autores han detectado apigenina, baicaleina y luteolina en vinos (Wang y Huang, 2004). La **Figura 11** muestra la estructura de algunas flavonas detectadas en *Vitis vinifera*.



Flavona	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Apigenina	H	H	H	OH
Apigenina-7-O-glucósido	Glucosa	H	H	OH
Luteolina	H	OH	H	OH
Luteolina-7-O-glucósido	Glucosa	OH	H	OH
Baicaleina	H	H	OH	H

**Figura 11.** Estructura química de las principales flavonas presentes en *Vitis vinifera*.

### 3. Biosíntesis de compuestos fenólicos en las uvas

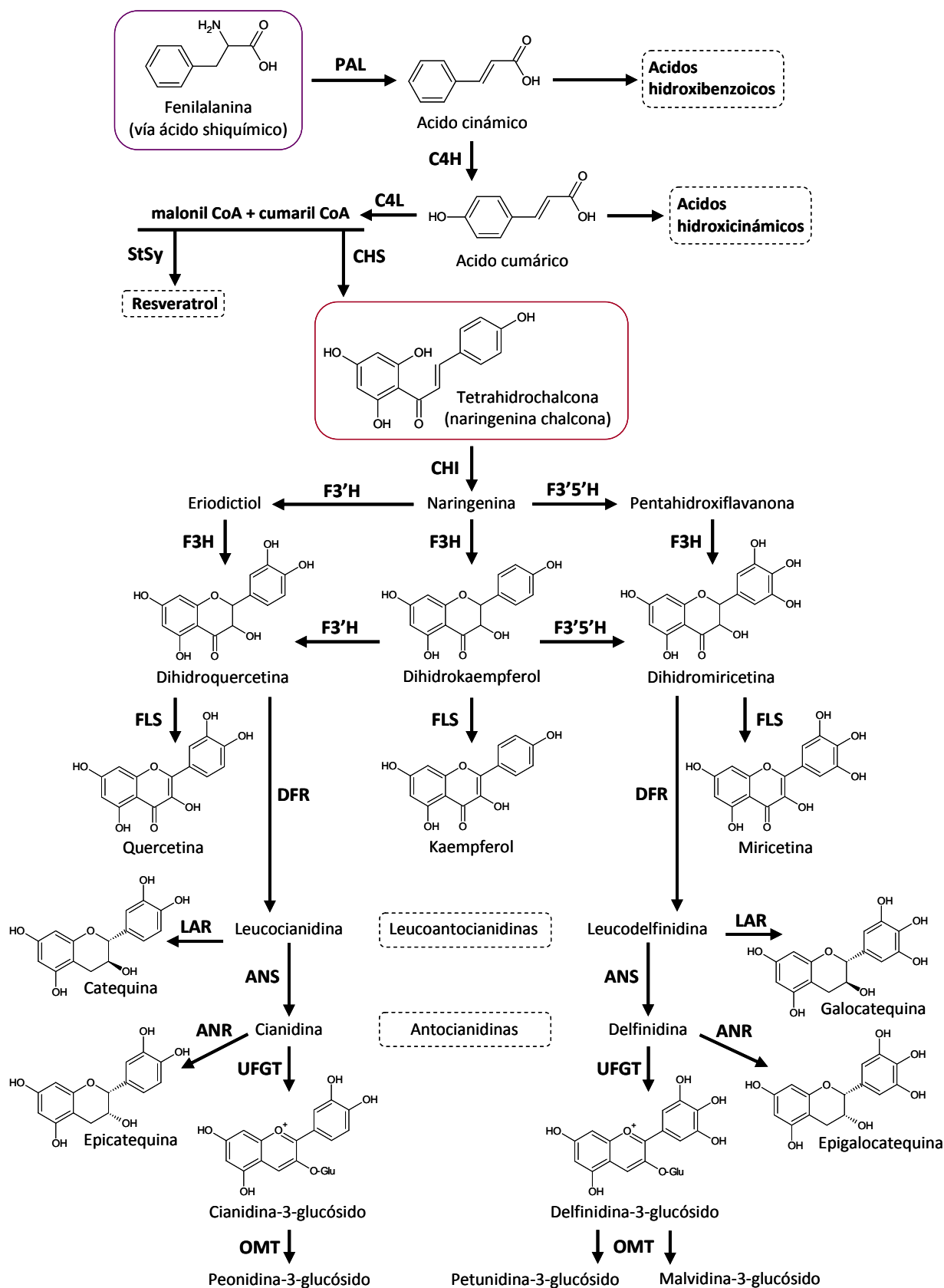
La ruta de biosíntesis de todos los compuestos fenólicos corresponde a la Vía Fenilpropanoide, cuyos precursores, fenilalanina y malonil-CoA, derivan del metabolismo primario (**Figura 12**). La misma ocurre en el citoplasma de las células, asociada al retículo endoplasmático rugoso (Hrazdina y Wagner, 1985; Poustka et al., 2007), en donde participan una gran diversidad de

enzimas tales como citocromo P450 hidroxilasas, dehidrogenasas/reductasas, *O*-metiltransferasas y glicosiltransferasas.

El primer paso clave de la ruta es llevado a cabo por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). Su actividad depende tanto del suministro del aminoácido precursor (Pirie y Mullins, 1980; Hunter et al., 1991) como también de la luz y la temperatura (Roubelakis-Angelakis y Kliewer, 1986). La segunda etapa fundamental en la regulación de la síntesis de compuestos fenólicos consiste en la actividad de la enzima chalcona sintasa (CHS) que desvía la ruta hacia la formación de flavonoides. Posteriormente, la enzima chalcona isomerasa (CHI) generará una flavanona, que actuará como intermediario en la formación de flavonas, isoflavonas y dihidroflavonoles. Estos últimos serán los precursores en la síntesis de flavonoles, flavanoles y antocianidinas (**Figura 12**). La etapa final consiste en la glicosilación del grupo 3'-hidroxilo para generar los distintos flavonoles y compuestos antociánicos. Este proceso es esencial para favorecer su solubilización, estabilidad y transporte hacia las vacuolas de las células (Marrs et al., 1995; Yoshida et al., 2000). Con respecto a los monómeros de flavanoles, se han descrito diversos mecanismos que explican su transporte a las vacuolas, previo a su polimerización en taninos condensados o proantocianidinas (Lepiniec et al., 2006; Zhao et al., 2010).

Existe una estrecha relación entre la síntesis de proantocianidinas y antocianinas. Diversos autores han reportado la producción de (+)-catequina a partir del precursor leucocianidina por acción de la enzima leucoantocianidina reductasa (LAR) (Stafford y Lester, 1984). Mientras que la (-)-epicatequina y la (-)-epigallocatequina son generadas a partir de la cianidina y delphinidina por medio de la enzima antocianidina reductasa (ANR) (Xie et al., 2003). Otros autores encontraron en las bayas, que la enzima ANR es codificada por un único gen mientras que la enzima LAR depende de dos genes estrechamente relacionados. El gen de ANR se expresa en hollejos y semillas hasta el inicio de la maduración, en tanto los genes de LAR muestran patrones de expresión diferenciales, sugiriendo la incidencia del tejido y de la regulación temporal de los mismos sobre la composición tánica de la uva durante la maduración (Bogs et al., 2005).

Finalmente, el paso que compromete la biosíntesis de antocianinas depende de la enzima UDP-glucosa flavonoide 3-*O*-glucosiltransferasa (UFGT), que cataliza la glicosilación de antocianidinas inestables (cianidina y delphinidina) en antocianinas pigmentadas (cianidina-3-glucósido y delphinidina-3-glucósido), a partir de los cuales por medio de la acción de la enzima *O*-metiltransferasa (OMT) se forman las antocianinas principales, los cuales finalmente son acumuladas en las vacuolas generando el color característico de las uvas tintas (Castellarin et al. 2007b).

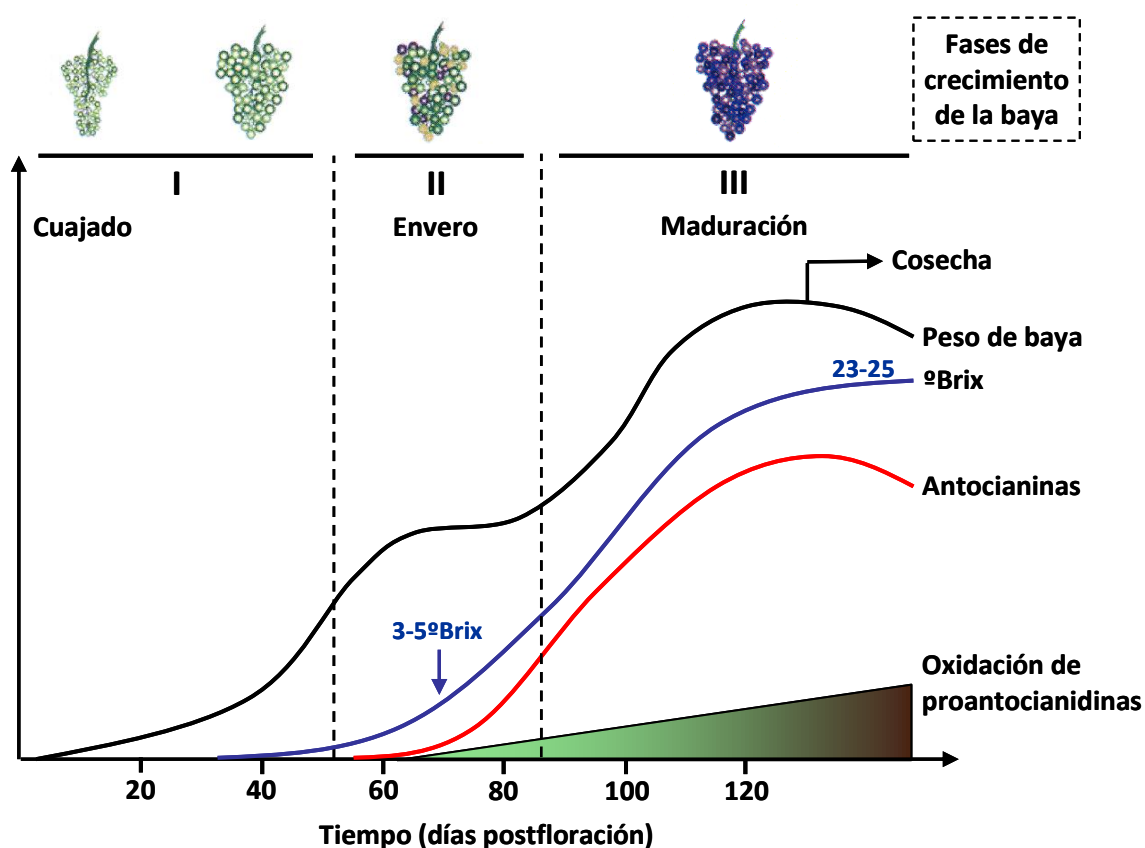


**Figura 12.** Resumen de la Vía Fenilpropanoide involucrada en la biosíntesis de compuestos no-flavonoides y flavonoides. Abreviaturas: PAL, fenilalanina amonio liasa; C4H, cinamato-4-hidroxilasa; C4L, cinamato-4-liasa; CHS, chalcona sintasa; StSy, estilbeno sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H/F3'H/F3'5'H, flavonoide hidroxilasas; FLS, flavonol sintasa; DFR, dihidroflavonol reductasa; ANS, antocianidina sintasa; ANR, antocianidina reductasa; LAR, leucoantocianidina reductasa; UFGT, UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosiltransferasa; OMT, O-metiltransferasa. Adaptada de Castellarin et al. (2007b).

#### 4. Fisiología de la maduración de la baya. Evolución de los compuestos fenólicos

En el ciclo biológico de *Vitis vinifera* se pueden distinguir dos etapas fisiológicamente bien diferenciadas, una primera en la que se destacan los procesos de crecimiento y desarrollo de los órganos vegetativos y una segunda donde predominan los procesos de acumulación de almidón, durante el agostamiento, y de azúcares, durante la maduración de las bayas.

El desarrollo de las bayas comprende 3 fases con dos períodos de crecimiento sigmoideal (**Figura 13**): una primera fase de crecimiento rápido (desarrollo en verde), una segunda fase estacionaria o de latencia, y una última fase de maduración y crecimiento en tamaño (Coombe, 1992).



**Figura 13.** Representación esquemática de las etapas de crecimiento de las bayas de vid y de los cambios en la composición de azúcares y flavonoides. El crecimiento del fruto está representado por una curva doble sigmoidea indicando el peso de baya. Adaptada de Matus Picero (2008).

La primera fase se inicia con el cuajado de las bayas y dura aproximadamente 45 a 60 días. Este período se caracteriza por una rápida división celular, inducida por la acción de las hormonas auxinas y giberelinas, seguida de alargamiento celular. A pesar de la presencia de pigmentos fotosintéticos, la producción de fotosintatos en el fruto no es suficiente para sus requerimientos, debiendo importar azúcares a través del floema (Giaquina, 1983). Durante esta etapa se sintetizan

mayoritariamente los ácidos málico y tartárico (Ruffner, 1982), y se acumulan algunos compuestos fenólicos como los ácidos hidroxicinámicos y las proantocianidinas en semillas y hollejos, hasta el momento de envero donde alcanzan sus valores máximos. (Romeyer et al., 1983 ; Kennedy et al., 2000b y 2001, Downey et al., 2003a).

Al comienzo de la segunda fase, se detiene el crecimiento en la mayoría de los tejidos de la baya, a excepción de la semilla. Se producen cambios físicos tales como la acumulación de pruina sobre la epidermis del hollejo, la disminución de la transpiración, la ruptura de los vasos del xilema y un aumento del flujo de potasio respecto de otros iones (Creasy et al., 1993). Sobre el final de esta fase, las bayas comienzan a ablandarse y a perder clorofila, siendo estos los principales indicadores de la transición a la tercera fase de desarrollo. El rápido incremento de glucosa durante esta etapa es acompañado por la síntesis de antocianinas (Kennedy et al., 2001). Este proceso de cambio de coloración de la baya denominado “envero o pinta” indica el inicio de la maduración. A partir de este momento, el transporte de agua y azúcares hacia la baya se realiza a través del floema (Coombe y McCarthy, 2000).

La tercera fase del desarrollo o maduración de la baya, implica una serie de cambios significativos en el metabolismo inducidos, en gran parte, por el ácido abscísico (ABA) (Cakir et al., 2003) y en menor medida por el etileno (Hale et al., 1970). Los mismos incluyen: acumulación de azúcares, ablandamiento del exocarpo, expansión celular, síntesis de antocianinas en hollejos de uvas tintas, reducción de los niveles de ácidos orgánicos (principalmente ácido málico), síntesis de compuestos odorantes, acumulación de aminoácidos, síntesis y transporte de fitohormonas y sustancias de crecimiento, entre otros (Coombe 1976; Nunan et al. 1998; Barnavon et al. 2000; Robinson y Davies, 2000; Giovannoni, 2001; Deluc et al., 2007). En cuanto a la evolución de los distintos compuestos fenólicos, generalmente el contenido de los no-flavonoides aumenta hasta el envero para luego disminuir durante la maduración (Romeyer et al., 1983; Obreque-Slier et al., 2010). Respecto a los flavonoides, usualmente el nivel máximo de antocianinas se alcanza dos o tres semanas antes de la cosecha, disminuyendo en forma sostenida hacia el final del proceso (Kennedy et al., 2002; Peña-Neira et al., 2004; Fournand et al., 2006). Los flavonoles suelen mostrar una tendencia similar (Peña-Neira et al., 2004; Singh Brar et al., 2008), en tanto las proantocianidinas se comportan diferencialmente de acuerdo al tejido involucrado. En el caso de las semillas, se observa una disminución desde el envero relacionada con procesos de oxidación (Kennedy et al., 2000a,b; Ristic e Iland, 2005), generando un cambio de coloración hacia tonalidades pardas y contribuyendo a una reducción de la astringencia global de las uvas al momento de cosecha. Mientras que en hollejos, la concentración de proantocianidinas disminuye levemente o permanece constante durante la maduración de la baya, observándose por el contrario un aumento en el grado medio de polimerización (Kennedy et al., 2001; Harbertson et al., 2002).

Las uvas, al igual que la mayoría de los frutos, poseen una limitada capacidad fotosintética, por lo cual los compuestos acumulados en las mismas son sintetizados a partir de azúcares y otros precursores provenientes de diferentes órganos de la planta e importados a través del floema. El conjunto de cambios que se producen durante la maduración es coordinado individualmente dentro de cada baya, pero el proceso de maduración de las distintas bayas pertenecientes a un mismo racimo no ocurre sincronizadamente (Robinson y Davies 2000). Esto da lugar a diferencias importantes entre las bayas al momento de cosecha, impactando notablemente en su calidad final.

### **5. Factores que afectan la biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos en las bayas**

La biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos durante las distintas fases del desarrollo de las bayas, depende tanto del genotipo de la planta como también de diversos factores bióticos (microorganismos estimulantes o antagonistas), abióticos (condiciones edafoclimáticas), y de las prácticas culturales realizadas en el viñedo. Si bien muchos de estos factores han sido estudiados en *Vitis vinifera*, la investigación se ha desarrollado en su mayoría empleando especies modelo como *Arabidopsis thaliana* (Downey et al., 2006).

En primer lugar, resulta importante destacar la influencia evidente del factor “variedad” sobre la composición cualitativa y cuantitativa de polifenoles. Diversos estudios han sugerido la relevancia de estos compuestos como marcadores químicos de autenticidad y diferenciación varietal de uvas y vinos. Núñez et al. (2004) y Otteneder et al. (2004) encontraron perfiles antociánicos característicos en distintas variedades de uva, mientras que otros autores demostraron las diferencias existentes en el perfil de flavonoles entre cultivares (Mattivi et al., 2006; Castillo-Muñoz et al., 2007). Además de la variedad, la heterogeneidad intravarietal es un factor que induce un comportamiento muy diferente entre los distintos clones, por lo que, en el caso de ser posible, resulta esencial la elección del clon más adecuado de acuerdo al objetivo buscado.

Por otro lado, la disponibilidad nutricional de la planta influye notablemente en su crecimiento, afectando la composición fenólica en distintos tejidos de la misma. Existen varios estudios realizados acerca de la incidencia de distintos niveles de nitrógeno y potasio sobre estos compuestos, encontrándose que concentraciones excesivas de estos nutrientes tienden a disminuir la tasa de flavonoides en los hollejos de las bayas (Kliewer, 1977; Jackson y Lombard, 1993; Delgado et al., 2004). Según Downey et al. (2006), el mecanismo probable de esta disminución podría estar vinculado con el excesivo vigor. En relación a este factor, diversos autores han observado cambios cuantitativos en la composición fenólica de hollejos y semillas de bayas en vides manejadas con distintos niveles de vigor, encontrando en algunos casos una correspondencia entre bajo vigor y mayores contenidos de compuestos fenólicos (Peña-Neira et al., 2004; Cortell et al., 2005). En muchos casos, resulta incierto confirmar la incidencia directa del vigor o de un efecto indirecto



generado por cambios en la arquitectura del follaje, dando como resultado una modificación en la exposición solar de los frutos y afectando por ende el microclima del racimo (Coombe y McCarthy, 2000).

Las características físicas y químicas del suelo (composición nutricional, estructura, profundidad y textura) también pueden afectar la acumulación de flavonoides en las bayas, debido a su incidencia directa sobre el crecimiento de las plantas. Sin embargo, el mayor impacto del tipo de suelo está referido a la capacidad de retención de agua y al aporte de las condiciones de pH necesarias para la absorción de macro y micronutrientes (Matus Picero, 2008). El estado hídrico de las plantas ha sido expuesto por diversos autores como uno de los factores de mayor influencia sobre la calidad de la uva, observándose resultados variables. Algunos autores (Nadal y Arola, 1995; Ojeda et al., 2002; Roby y Matthews, 2004; Castellarin et al., 2007b) encontraron que en condiciones de restricción hídrica se observó un aumento del contenido de antocianinas y proantocianidinas en bayas, mientras que en otros estudios la restricción hídrica mostró un efecto bajo o nulo sobre la acumulación de estos compuestos (Kennedy et al., 2000b y 2002). Según Downey et al. (2006), el efecto del déficit hídrico estaría relacionado con la disminución del tamaño de la baya y la modificación de la relación peso de hollejo/peso de baya, lo cual afectaría la concentración de compuestos fenólicos. Adicionalmente, otros autores consideraron que los cambios en la estructura y desarrollo del hollejo serían los responsables de este efecto, más que la incidencia directa sobre la ruta biosintética (Roby et al., 2004; Roby y Matthews, 2004). Por lo tanto, la dificultad en la interpretación de este factor radica en el impacto que tiene la disponibilidad de agua sobre diversos procesos biológicos de la planta anexos a la ruta fenilpropanoide, tales como el cierre/apertura estomática, fotosíntesis, acumulación de fotoasimilados, crecimiento vegetativo y radicular, y en casos extremos modificación de la relación fuente/receptáculo y senescencia de algunos tejidos (Downey et al., 2006).

El impacto de las condiciones ambientales en la composición de las uvas ha sido ampliamente estudiado en diversas zonas vitivinícolas. La exposición a la luz solar y a la temperatura constituyen los factores más relevantes sobre la composición fenólica de las bayas (Spayd et al., 2002). Gran parte de los estudios sobre la incidencia de la radiación solar en la síntesis de flavonoides, no han podido diferenciar los efectos independientes de la luz fotosintéticamente activa (PAR), la radiación UV y la temperatura, generándose conclusiones contradictorias dependiendo del sitio de estudio (Haselgrove et al., 2000; Downey et al., 2004). La luz y todas aquellas prácticas culturales que promueven su incidencia en los racimos de uva, inducen significativamente la acumulación de flavonoides (Cortell y Kennedy, 2006) y la expresión de genes de esta ruta metabólica (Downey et al., 2004; Jeong et al., 2004). Por su parte, el efecto de la temperatura en la síntesis de flavonoides está también íntimamente relacionado a los manejos y conducción del follaje

de las plantas. En términos generales, temperaturas diurnas y nocturnas moderadas (15-25 °C) favorecen la biosíntesis y acumulación de antocianinas en hollejos (Buttrose et al., 1971; Mori et al., 2005), mientras que temperaturas elevadas (> 35 °C) podrían afectar la acumulación de estos compuestos a través de una inhibición de la ruta biosintética conjuntamente con un fenómeno de degradación (Mori et al., 2005 y 2007).

Otras características macroclimáticas como la topografía del terreno, la latitud y la altitud, también pueden modificar la composición química de las bayas. Algunos autores observaron un aumento en la concentración de antocianinas y flavanoles a mayor altitud del viñedo (Mateus et al., 2001a y 2002; Berli et al., 2008).

Las prácticas agronómicas realizadas en el viñedo tienen como función principal controlar el equilibrio entre el crecimiento vegetativo y productivo de la vid. Según el estado fenológico de la planta, los diferentes manejos vitícolas tendrán como objetivo controlar el vigor, mantener condiciones microclimáticas que mejoren la iluminación y ventilación de los racimos, facilitar los tratamientos fitosanitarios y la cosecha, modular la concentración de compuestos fenólicos y odorantes en las bayas, y en resumen, lograr la calidad de uva adecuada para el tipo de vino buscado. Entre los manejos culturales que pueden modificar la composición fenólica de las bayas se encuentran, el sistema de conducción (Haselgrove et al., 2000), el tipo de poda (González-Neves et al., 2002), el aclareo de racimos (Guidoni et al., 2008; Valdés et al., 2009), las labores en verde (desbrote, despunte, deshoje) (Poni et al., 2009), la fertilización (Delgado et al., 2004) y el manejo del agua (Esteban et al., 2001; Ojeda et al., 2002), entre otros. Adicionalmente, la aplicación de prácticas culturales bajo sistemas convencionales, orgánicos o biodinámicos han mostrado cierta incidencia sobre la composición fenólica de las bayas (Reeve et al., 2005; Vian et al., 2006).

Otros factores como la edad del viñedo (Reynolds et al., 2007) y la presencia de enfermedades criptogámicas (Amati et al., 1996) también pueden afectar la composición fenólica de las uvas. Si bien, se ha investigado ampliamente el aumento en la producción de fitoalexinas (resveratrol, viniferina) en presencia de heridas y hongos en bayas, no se ha extendido el estudio del efecto de estos parámetros sobre la biosíntesis de flavonoides (Romero-Pérez et al., 2001; Timperio et al., 2012)

Finalmente, resulta esencial el grado de madurez de las uvas (hollejo, semilla y pulpa), que permitirá definir el momento oportuno de cosecha, con el mejor potencial de calidad, para producir el vino con las características buscadas. La madurez fenólica considera la abundancia, diversidad y complejidad de los compuestos fenólicos, y la facilidad de extracción de los mismos, de las distintas partes de la baya, durante el proceso de vinificación.

## **6. Evolución de los compuestos fenólicos durante la vinificación y crianza del vino tinto**

Durante el proceso de vinificación en tinto se produce la extracción y difusión de los compuestos fenólicos localizados en las diferentes partes de la baya, generando un medio (mosto/vino) complejo y en constante evolución, donde participan una serie de fenómenos bioquímicos y químicos, que continúan durante la crianza y posterior almacenamiento del vino (Cheynier et al., 2000).

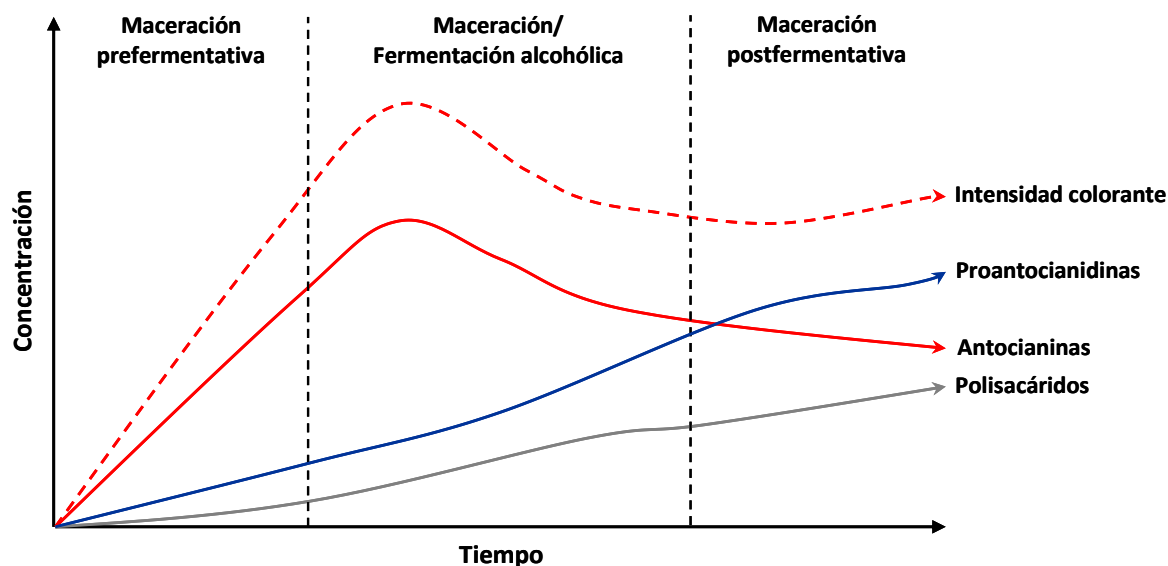
### **6.1. Extracción de antocianinas y flavanoles durante la vinificación**

La vinificación en tinto es un proceso complejo que involucra la ocurrencia de dos etapas en forma simultánea: la maceración y la fermentación alcohólica. Es precisamente la superposición de estas dos etapas la que condiciona la cinética de disolución de los principales compuestos responsables de las características organolépticas del vino tinto (Zamora, 2003).

La maceración es un proceso físico-químico que incluye la extracción fraccionada de compuestos químicos desde la fase sólida (principalmente, hollejos y semillas de las bayas), seguido de la disolución de los mismos en la matriz del mosto/vino (Peynaud, 1984). Durante la maceración, dos procesos físicos ocurren de manera secuencial. El primero de ellos corresponde a la disolución e implica la extracción de los compuestos hacia la fase líquida o mosto; y el segundo, implica la difusión de las sustancias extraídas. El proceso de maceración completo se puede dividir en tres etapas, en las cuales la composición y condiciones físico-químicas del medio de extracción son diferentes (**Figura 14**). La primera etapa, denominada maceración prefermentativa, corresponde al período inicial previo al comienzo de la fermentación alcohólica, ocurre en medio acuoso y generalmente a temperaturas moderadas (Zamora, 2003), y su duración depende fundamentalmente de la temperatura, de la concentración de  $\text{SO}_2$  y de la fase de latencia de las levaduras presentes. La segunda etapa o maceración propiamente dicha, ocurre en condiciones crecientes de temperatura y concentración de etanol conforme progresa la fermentación alcohólica, y su duración depende, entre otros factores, de la concentración inicial de azúcares, de la cepa de levadura, de la composición nutricional del mosto, de la concentración de  $\text{O}_2$  disuelto y de la temperatura. Finalmente, la tercera etapa o maceración postfermentativa, tiene lugar en un medio eminentemente hidroalcohólico, en condiciones de descenso de temperatura, y su duración depende generalmente de decisiones enológicas, de acuerdo al tipo de vino buscado.

Los compuestos fenólicos, principalmente antocianinas y proantocianidinas, presentan cinéticas de extracción diferentes durante la maceración/fermentación, que pueden apreciarse esquemáticamente en la **Figura 14**. En general, responden a una curva exponencial simple, mientras que las antocianinas difunden siguiendo un modelo exponencial en dos fases, con un incremento y un posterior descenso (Boulton, 1995). La velocidad de extracción es proporcional al gradiente de

concentración entre los sólidos y el mosto/vino, aunque el proceso total es más complejo. Es posible establecer que maceraciones prefermentativas a bajas temperaturas, previo a la fermentación alcohólica (FA), aumentan la concentración de antocianinas y proantocianidinas de hollejos, en tanto que postmaceraciones hacia el final de la FA resultan en vinos con mayores concentraciones de proantocianidinas de semilla y menos antocianinas (Cheynier et al., 2006).



**Figura 14.** Fases de la maceración/fermentación alcohólica. Cinética de extracción de compuestos fenólicos. Adaptada de Ribéreau-Gayon et al. (2006b).

Con respecto a la extracción de las antocianinas durante la maceración, la misma ocurre a una tasa generalmente muy rápida, alcanzándose la máxima concentración de las formas monoméricas durante los primeros 4-5 días de fermentación. Luego de alcanzado el máximo nivel, se registra un descenso (de hasta un 60 %), asociado con fenómenos de oxidación, precipitación, adsorción sobre las paredes celulares de las levaduras y sólidos presentes en la maceración, inclusión en cristales de bitartrato de potasio, y modificaciones estructurales (Zamora, 2003). Asimismo, las antocianinas pueden polimerizarse con los flavanoles y/o reaccionar con otros compuestos del vino como el ácido pirúvico, el acetaldehído, etc., disminuyendo su degradación y aumentando la estabilidad del color del vino (Monagas y Bartolomé, 2009). Por otro lado, el aumento de la concentración de etanol reduce los fenómenos de copigmentación y provoca una disminución de la solubilidad de ciertos copigmentos como la quercetina (Somers y Evans, 1979), conduciendo a una disminución del color. Patrones clásicos de extracción de antocianinas han sido informados por diversos autores (Somers y Evans, 1979; Gil-Muñoz et al., 1999; Gómez-Míguez y Heredia, 2004; Gómez-Plaza et al., 2005; Aron y Kennedy, 2007).

Por su parte, la extracción de las proantocianidinas de los hollejos se inicia conjuntamente con la extracción de las antocianinas, aunque se desarrolla más lentamente, con una cinética de solubilidad favorecida por el etanol y la temperatura (Canals et al., 2005; Sacchi et al., 2005). En el caso de las proantocianidinas de las semillas, es necesario un tiempo de maceración mayor para su extracción, debido a la necesidad de una eliminación previa de los lípidos presentes en éstas (Glories y Saucier, 2000). En general, la extracción de flavanoles comienza lentamente en la etapa prefermentativa y continúa progresivamente durante la fermentación y postfermentación, modificando su composición cualitativa en el vino (Cheynier et al., 2000; González-Manzano et al., 2004; Llaudy et al., 2008). Teniendo en cuenta esta variabilidad y dependiendo del estilo de vino, resulta necesario adaptar las condiciones de maceración para obtener las características deseadas (Sacchi et al., 2005). Por ejemplo, respecto al tiempo de contacto, puede ser conveniente emplear maceraciones cortas para la obtención de vinos jóvenes, con suficiente color y poco tánicos, y maceraciones largas en la elaboración de vinos de guarda, para obtener la estructura necesaria y poder garantizar la estabilidad del color (Zamora, 2003). También se pueden optimizar otras variables como la temperatura (Reynolds et al., 2001), la dosis de SO<sub>2</sub> (Bakker et al., 1998), el número, intensidad y automatización de los remontajes (Razungles, 2006), la aplicación de délestages (Zoecklein et al., 2003), la cantidad de semillas presentes, la relación sólido/líquido (Singleton, 1972), y la aplicación de tratamientos físicos (altas temperaturas, vacío, o temperaturas de congelamiento) sobre la uva previo a la maceración (termomaceración, Girard et al., 1997; flash-détente, Morel-Salmi et al., 2006; crio-maceración, Crespy et al., 2005).

## **6.2. Cambios en la composición fenólica durante la vinificación y crianza del vino**

La evolución de los compuestos fenólicos durante todo el proceso de vinificación involucra principalmente dos tipos de mecanismos. El primero, comprende diversas reacciones bioquímicas, catalizadas por diferentes enzimas, y sucede mayoritariamente en las primeras etapas de la elaboración; mientras que el segundo, lleva consigo fenómenos químicos que se desencadenan durante la vinificación y continúan durante la crianza del vino. Todas estas reacciones conducen a la generación de nuevos productos a través de la formación o ruptura de enlaces covalentes, como así también mediante interacciones moleculares establecidas por uniones energéticamente débiles (Cheynier et al., 2000).

### **6.2.1. Procesos enzimáticos**

Las reacciones enzimáticas que conducen a la oxidación y degradación de compuestos fenólicos en los vinos, pueden ser catalizadas por enzimas endógenas o exógenas de la uva. La principal enzima endógena corresponde a la polifenoloxidasas (PPO), mientras que entre las exógenas

se encuentran principalmente las cinamato esterasas, tanino acil-hidrolasas y  $\beta$ -glicosidasas (Cheynier et al., 2000).

En el caso particular de la oxidación enzimática catalizada por la PPO (pardeamiento enzimático), la misma comienza a producirse desde el momento de la molienda de la uva, en presencia de oxígeno molecular, siendo más importante durante la vinificación en blanco que en los vinos tintos. Los principales sustratos para la PPO son los ácidos caftárico y cutárico, a partir de los cuales se generan *o*-quinonas altamente reactivas capaces de oxidar otros constituyentes del mosto. Si bien, las antocianinas y flavanoles no pueden oxidarse directamente por la PPO, debido posiblemente a impedimentos estéricos (Cheynier et al., 2000), pueden reaccionar con las *o*-quinonas de los ácidos mencionados (oxidación acoplada y condensación nucleofílica) produciéndose su degradación (**Figura 16**) (Cheynier y Ricardo Da Silva, 1991; Sarni-Manchado et al., 1995 y 1997; Monagas et al., 2005a).

Con respecto a las  $\beta$ -glicosidasas, estas enzimas pueden ser liberadas por algunas cepas de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* durante la vinificación, pueden ser añadidas al proceso para liberar compuestos odorantes volátiles o estar presentes como actividades secundarias en preparados enzimáticos del tipo pectinasas o glucanasas (Cheynier et al., 2000). Su incidencia sobre los compuestos fenólicos se debe principalmente a la capacidad de escindir el enlace glicosídico de algunos flavonoles y antocianinas, liberando las correspondientes agliconas más inestables y fácilmente degradables (Somers y Ziemelis, 1985; Monagas y Bartolomé, 2009).

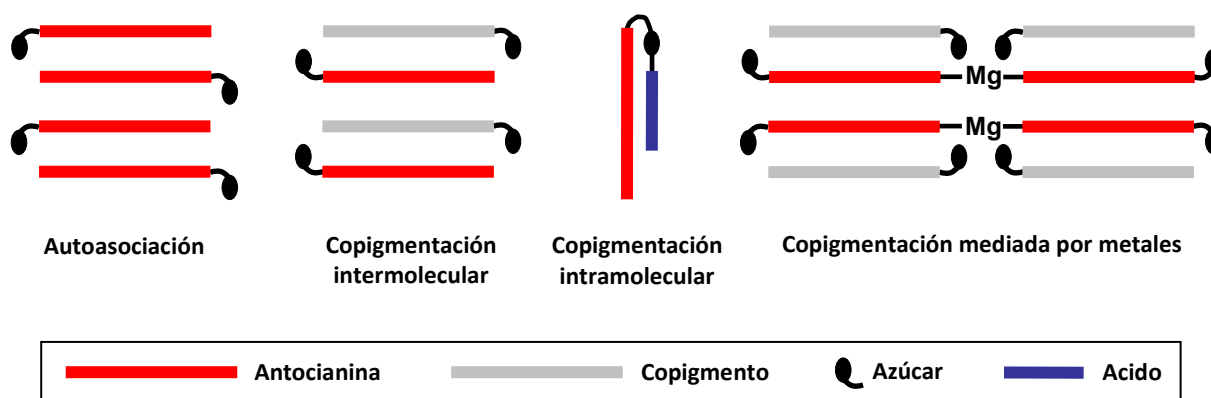
## **6.2.2. Reacciones químicas**

Tal como se mencionó anteriormente, durante la vinificación y crianza del vino se suceden una serie de reacciones químicas entre los flavonoides (antocianinas y proantocianidinas) y con otros componentes del vino, gobernadas principalmente por mecanismos de adición nucleofílica, acoplamiento de radicales e interacciones electrostáticas, que conducen a la modificación y estabilización del color, cuerpo y astringencia del producto. A continuación se describen brevemente las principales reacciones involucradas entre dichos compuestos.

### **6.2.2.1. Copigmentación**

La copigmentación es un fenómeno de solución que involucra la asociación entre formas monoméricas antociánicas coloreadas y espacialmente planares (forma flavilium y base quinoidal) y otros compuestos orgánicos no coloreados (copigmentos), determinando complejos  $\pi$ - $\pi$  de apilamiento vertical, mantenidos por enlaces lábiles y de baja energía (fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas) que se estabilizan por disposición de las moléculas de azúcar en la parte externa del complejo, entre las cuales se establecen uniones por puente de hidrógeno (Boulton,

2001). Se asume que este arreglo tipo “sándwich” es el más favorable para mantener las moléculas de agua alejadas del cromóforo del catión flavilium, evitando la hidratación nucleofílica y la formación de bases carbinol incoloras al hacer que el equilibrio se desplace hacia las formas coloreadas (Brouillard et al., 2003; Gómez-Míguez et al., 2006). Adicionalmente a esta interacción intermolecular (**Figura 15**), también se ha descrito el mecanismo de asociación covalente del cromóforo antociánico con los residuos aromáticos de su propia molécula (interacción intramolecular), la autoasociación de antocianinas y la copigmentación mediada por cationes metálicos (Asen et al., 1972; Dangles et al., 1993; Fernández et al., 2006). Como resultado de este fenómeno, las soluciones copigmentadas habitualmente muestran un desplazamiento de la longitud de onda máxima en el espectro visible hacia longitudes de onda mayores (efecto batocrómico) o menores (efecto hipsocrómico), acompañado de un incremento de absorbancia (efecto hiperocrómico). La amplitud de estos efectos depende de varios factores tales como el pH, la temperatura, el contenido de etanol, la naturaleza del cromóforo y del copigmento, y la relación molar pigmento/copigmento (Boulton, 2001).



**Figura 15.** Esquema de las distintas variantes del fenómeno de copigmentación que pueden ocurrir en los vinos tintos. Adaptado de Casassa (2007).

Entre los componentes del vino tinto, los flavonoides y los ácidos hidroxicinámicos constituyen los principales copigmentos. En ensayos realizados en soluciones símil-vino, los flavonoles mostraron un mayor potencial de copigmentación, seguido por los ácidos hidroxicinámicos y finalmente por los flavanoles (Brouillard et al., 1991; Gómez-Míguez et al., 2006). La capacidad limitada de estos últimos para interactuar con las antocianinas se atribuye a la ausencia de estructura planar, observándose una eficiencia diferencial de acuerdo al origen y conformación molecular del flavanol involucrado (Berké y De Freitas, 2005; González-Manzano et al., 2009).

La copigmentación es un proceso de gran interés enológico, ya que resulta vital para la comprensión de la relación entre la composición fenólica de la uva y el color de los vinos tintos

jóvenes (Boulton, 2001). Asimismo, diversos autores han señalado su posible participación en la evolución del color durante la maduración y crianza del vino, al constituir la primera etapa en la formación de pigmentos más estables (Brouillard y Dangles, 1994), habiéndose demostrado que vinos tintos jóvenes con altos porcentajes de color copigmentado dan lugar a vinos con altos porcentajes de color polimérico (Lorenzo et al., 2005; Cliff et al., 2007).

#### **6.2.2.2. Condensación directa antocianina-flavanol, flavanol-flavanol y antocianina-antocianina**

Los mecanismos de reacción propuestos para la formación de pigmentos por condensación directa entre antocianinas y flavanoles comprenden la unión antocianina-flavanol (A-F) y flavanol-antocianina (F-A) (**Figura 16**).

La condensación directa A-F comienza con el ataque nucleofílico de la posición C8 o C6 del flavanol a la posición electrofílica C4 de la antocianina en forma de catión flavilium, dando lugar a un flaveno, que puede oxidarse a su correspondiente catión flavilium y finalmente deshidratarse para formar pigmentos de color amarillo (forma xantilium) (Jurd y Somers, 1970; Somers, 1971; Santos-Buelga et al., 1999) o generar un producto incoloro de condensación bicíclica (Bishop y Nagel, 1984).

Con respecto a la condensación F-A, el mecanismo propuesto consiste en la reacción entre los carbocationes (generados a partir de las proantocianidinas, por la ruptura de los enlaces interflavánicos en medio ácido), como electrófilos, y la forma hemiacetal hidratada de la antocianina en la posición C6 o C8, como nucleófilo, dando lugar a pigmentos incoloros que podrían ser deshidratados a la forma flavilium de color roja (Haslam et al., 1980; Monagas et al., 2005a). Estos carbocationes también pueden reaccionar con otros flavanoles (condensación directa flavanol-flavanol) generando proantocianidinas, que pueden conducir a un aumento del *mDP*, si los flavanoles nucleófilos son polímeros, o a una disminución del mismo, en el caso de un exceso de flavanoles monoméricos (Haslam et al., 1980; Vidal et al., 2002).

Aunque inicialmente los productos resultantes de estos dos mecanismos sólo se detectaron en soluciones modelo, diversos autores han confirmado la existencia de ambos mecanismos en vinos tintos (Monagas y Bartolomé, 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que las reacciones de condensación descritas se encuentran altamente influenciadas por factores como el pH, la temperatura, y el *mDP* de los flavanoles involucrados (Malien-Aubert et al., 2002; Salas et al., 2003; Dueñas et al., 2006).

Por otro lado, también se han detectado algunos dímeros antocianina-antocianina en vinos tintos. Entre ellos se encuentran el flaveno (malvidina-3-glucósido[flaveno]-(C4-C8)-malvidina-3-glucósido[A<sup>+</sup>]), la estructura bicíclica (malvidina-3-glucósido[flavano]-(C2-O-C7, C4-C8)-malvidina-3-glucósido [A<sup>+</sup>]), otros dímeros de malvidina-3-glucósido con delfinidina, cianidina, peonidina o



petunidina-3-glucósidos, y oligómeros formados por (-)-epicatequina o (-)-epigallocatequina y un dímero de antocianina (Vidal et al., 2004c; Salas et al., 2005; Alcalde-Eon et al., 2007).

### **6.2.2.3. Condensación antocianina-flavanol, flavanol-flavanol y antocianina-antocianina mediada por aldehídos**

El mecanismo de condensación propuesto en este caso por Timberlake y Bridle (1976), consiste en la reacción del aldehído, en forma de carbocatión, con el flavanol en la posición C6 o C8 del anillo A. Este aducto flavanol-aldehído, después de la deshidratación, reacciona con las antocianinas o flavanoles, generando nuevas estructuras unidas por puente etilo (**Figura 16**).

El principal aldehído que participa de esta reacción es el acetaldehído, que se origina en el vino durante la fermentación alcohólica, por descarboxilación del ácido pirúvico (Romano et al., 1994), y en etapas posteriores del proceso, por oxidación del etanol (Widenradt y Singleton, 1974). Otros aldehídos presentes en menor cantidad en el vino y que pueden participar de este mecanismo son el formaldehído, propionaldehído, isovaleraldehído, isobutiraldehído y benzaldehído, furfural, 5-hidroximetilfurfural y vainillina (provenientes del envejecimiento en roble), y ácido glioxílico (resultante de la oxidación del ácido tartárico) (Monagas y Bartolomé, 2009).

Los pigmentos resultantes de la condensación antocianina-flavanol han sido ampliamente reportados en vinos (Monagas y Bartolomé, 2009). Poseen color violeta (base quinoidal), y son más estables a los cambios de pH y a la decoloración por anhídrido sulfuroso que las antocianinas. Sin embargo, estos pigmentos son más sensibles a la degradación en solución acuosa, y la ruptura de los puentes etilo puede generar nuevos precursores capaces de reaccionar con otros polifenoles (Escribano-Bailón et al., 2001).

También se ha demostrado en vinos la existencia de este mecanismo de condensación entre flavanoles, en ausencia de antocianinas, dando lugar a la formación de estructuras incoloras. En general, los oligómeros y polímeros que pueden formarse a partir de esta reacción son inestables e intervienen en otras reacciones (Fulcrand et al., 2006).

Finalmente, se ha reportado en vinos la formación de pigmentos mediante la condensación de antocianinas vía acetaldehído en ausencia de flavanoles (Atanasova et al., 2002b). Esta reacción puede inducir a la formación de dímeros, trímeros o tetrámeros compuestos por unidades antociánicas enlazadas por puente etilo en sus diversas formas estructurales (flavilium, hemiacetal y quinoidal).

Entre los principales factores que afectan este mecanismo de condensación se encuentran la concentración de los precursores involucrados, el contenido de O<sub>2</sub>, el pH y la temperatura. En general, la velocidad de reacción es mayor en presencia de O<sub>2</sub> y a pH ácido, debido a que se favorece la formación de acetaldehído y de su forma protonada (Rivas-Gonzalo et al., 1995; Atanasova et al.,

2002a). Por otro lado, la formación de puente etilo es más lenta a temperaturas bajas (15 °C) y los compuestos generados son más estables en relación a su degradación y precipitación (Rivas-Gonzalo et al., 1995).

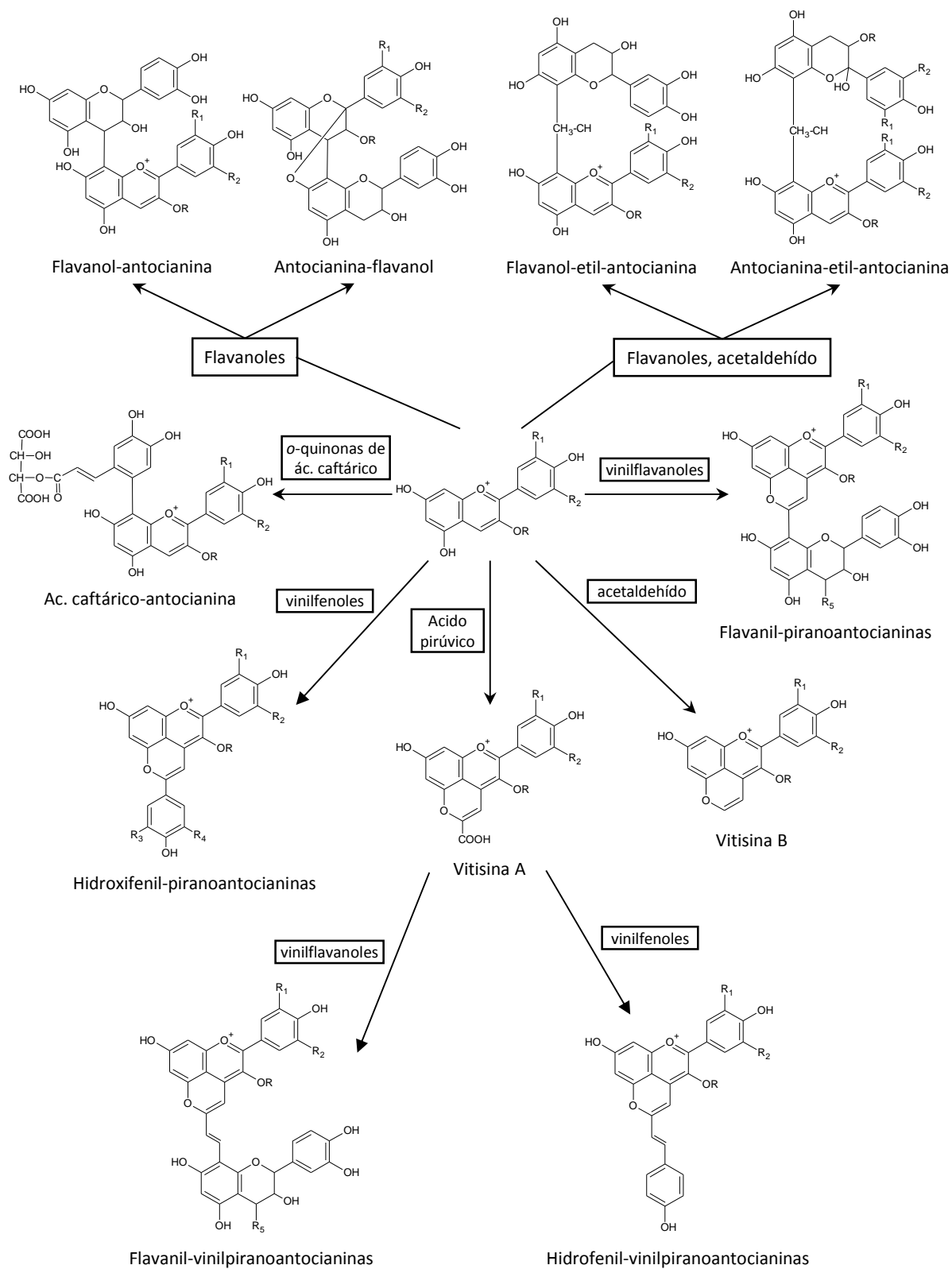
#### **6.2.2.4. Formación de piranoantocianinas**

Estos pigmentos se originan en los vinos tintos por reacciones de cicloadición entre las antocianinas y otros compuestos de bajo peso molecular, principalmente metabolitos producidos por las levaduras, como acetaldehído (vitisina B) (Bakker y Timberlake, 1997; Vivar-Quintana et al., 1999; Monagas et al., 2003a; Alcalde-Eon et al., 2006), ácido pirúvico (vitisina A) (Fulcrand et al., 1998; Mateus et al., 2001b), acetona (Alcalde-Eon et al., 2006), ácido acetoacético (He et al., 2006a), vinilfenol (Fulcrand et al., 1996; Schwarz et al., 2003b), vinilguayacol (Hayasaka y Asenstorfer, 2002), y vinilcatecol (pinotina A) (Schwarz et al., 2003a). Los pigmentos así formados presentan un color rojo-anaranjado y una mayor estabilidad a los cambios de pH y resistencia a la decoloración por SO<sub>2</sub>, en comparación con las antocianinas naturales presentes en la uva y el vino (Sarni-Manchado et al., 1996), sugiriendo su participación en los cambios graduales de color que ocurren durante la crianza del vino.

También se ha demostrado en vinos la presencia de flavanil-piranoantocianinas, formados por la reacción entre antocianinas y flavanoles o vinilflavanoles, a través de un mecanismo similar al descrito para las hidroxifenil-piranoantocianinas (cicloadición con vinilfenoles) (Atanasova et al., 2002a; Mateus et al., 2003a,b; Monagas et al., 2003a; Alcalde-Eon et al., 2006). Al igual que los derivados vinilfenólicos, estos pigmentos son de color rojo-anaranjado y presentan una mayor resistencia a los efectos del pH y el SO<sub>2</sub> que los pigmentos unidos a través de puente etilo (Vivar-Quintana et al., 2002).

Finalmente, se ha reportado en vinos Oporto una nueva serie de pigmentos, denominados “portisinas” o flavanil-vinilpiranoantocianinas, con características espectroscópicas asociadas al color azul en condiciones ácidas (Mateus et al., 2003b). El mecanismo de formación sugiere la unión entre una carboxi-piranoantocianina (aducto antocianina-ácido pirúvico) y un vinilflavanol a través de un puente vinilo (Mateus et al., 2004). Adicionalmente, este mecanismo podría ser extrapolado a la formación de fenil-vinilpiranoantocianinas (reacción entre una carboxi-piranoantocianina y un vinilfenol), detectados en vinos tintos (Mateus et al., 2006).

La **Figura 16** muestra la estructura de algunas piranoantocianinas descritas anteriormente.



**Figura 16.** Esquema de las principales reacciones químicas de las antocianinas durante la vinificación y crianza. Adaptado de Monagas y Bartolomé (2009).

#### **6.2.2.5. Reacciones de condensación con otros compuestos**

Algunos autores han reportado la existencia de otras reacciones de condensación durante la crianza del vino en presencia de roble. Quideau et al. (2003 y 2005) observaron la formación de estructuras tánicas complejas denominadas acutissimina y epicutissimina, como resultado de una reacción de sustitución nucleofílica entre (+)-catequina o (-)-epicatequina y la (-)-vescalagina (elagitanino proveniente de la crianza del vino en madera o de la adición de taninos enológicos). Por su parte, otros autores sugirieron la posibilidad de condensación entre antocianinas y elagitaninos, generando un efecto batocrómico en el color del vino (Chassaing et al., 2010). Sin embargo, resulta necesario ampliar el conocimiento sobre estas reacciones.

#### **6.2.2.6. Interacciones entre flavonoides y otras macromoléculas del vino**

En forma complementaria a las reacciones descritas anteriormente, los flavonoides tienen la capacidad de interactuar con otros componentes del vino tales como las proteínas y los polisacáridos.

Las interacciones entre proantocianidinas y proteínas han sido objeto de numerosas investigaciones resumidas en varias revisiones bibliográficas (Haslam y Lilley, 1988; Hagerman, 1989; Haslam et al., 1992), destacándose su incidencia en las características organolépticas del producto (percepción de astringencia), en la formación de turbidez y precipitados, en procesos tecnológicos como la clarificación y estabilización del vino (fenómenos coloidales), y en aspectos nutricionales y antinutricionales (inhibición de enzimas y reducción de proteína dietaria) (Terrier et al., 2009). En particular, las interacciones de las proantocianidinas del vino con las proteínas salivales (especialmente, proteínas ricas en prolina e histatinas) producen la sensación de sequedad y rugosidad en toda la cavidad bucal, conocida con el término de astringencia (Gawel, 1998). El mecanismo de asociación entre las proantocianidinas y las distintas proteínas (presentes en el vino, adicionadas como clarificantes, y proteínas salivales) involucra interacciones de Van der Waals-London y enlaces por puente de hidrógeno (Murray et al., 1994), dando lugar a la formación de complejos solubles o insolubles. La precipitación de los mismos depende principalmente de la estructura y configuración espacial del flavanol involucrado, en especial del número de funciones *o*-difenol, y aumenta con el grado de polimerización y el número de unidades galoiladas (Haslam y Lilley, 1988; Ricardo Da Silva et al., 1991). Otros factores que afectan esta interacción son la concentración de proteínas, las características del solvente, la presencia de polisacáridos, la temperatura, la fuerza iónica y el pH del medio (Terrier et al., 2009).

Por su parte, los polisacáridos presentes en el vino también pueden interactuar con los flavanoles y las asociaciones flavanoles-proteínas, previniendo posibles precipitaciones y afectando positivamente la calidad organoléptica del vino, al modificar el cuerpo, estructura y astringencia del

producto (Terrier et al., 2009; Fernández et al., 2011). Estos compuestos provienen de las paredes celulares que recubren y protegen la membrana plasmática, tanto de las células del hollejo de las bayas [arabinogalactanos-proteínas (AGPs), arabinanos y ramnogalacturonanos (RG-I y RG-II)], como de las levaduras, hongos y bacterias involucradas en el proceso de elaboración (manoproteínas) (Riou et al., 2002), y también pueden ser adicionadas durante la vinificación (goma arábiga, mezcla de arabinogalactanos-proteínas y arabinogalactanos) como coloides protectores para evitar la floculación y precipitación de proantocianidinas o de complejos flavanoles-proteínas (Pellerin y Cabanis, 2000). En general, se ha observado que las manoproteínas y algunos arabinogalactanos-proteínas actúan como moduladores de la astringencia al forman estructuras estables con los flavanoles, previniendo su precipitación y asociación con la proteínas (Fuster et al., 2002). Mientras que los dímeros de RG-II pueden aumentar la agregación y conducir a una precipitación de flavanoles (Riou et al., 2002). Entre los factores que afectan esta interacción se encuentran el tamaño y conformación estructural del polifenol y polisacárido involucrado, y la composición del medio (contenido de etanol y fuerza iónica) (Terrier et al., 2009).

## **7. El vino y la calidad**

El vino es un producto de características particulares debido a que el grado de diferenciación responde a un mercado imperfecto, donde los diferentes productos compiten por la misma demanda, pero cada uno con estilos únicos.

En vista de las necesidades y demandas del mercado vitivinícola actual, resulta cada vez más necesario producir vinos de la mayor calidad posible. La calidad del vino puede ser definida por diferentes criterios, estando sujeta a los parámetros de evaluación empleados y siempre destinados a satisfacer las necesidades de los consumidores. También hay que señalar que el concepto de calidad está estrechamente relacionado con el valor comercial del producto.

En muchos casos, la calidad se evalúa a través del análisis sensorial mediante panelistas entrenados que caracterizan los vinos de acuerdo a sus propiedades organolépticas. Luego, estos datos se correlacionan con el gusto de los consumidores o con la aceptación de grupos específicos de consumidores. En este contexto, las técnicas de análisis sensorial han sido ampliamente utilizadas como un complemento en el control de calidad y como herramienta de diagnóstico para caracterizar las diferencias entre productos (Goldner y Zamora, 2007; Ferreira et al., 2009).

Del mismo modo, la identificación y cuantificación de los componentes químicos minoritarios es un enfoque promisorio que sirve para explicar la descripción sensorial de un vino, y para evaluar su estabilidad, origen y autenticidad y, en consecuencia, su calidad comercial (Sáenz-Navajas et al., 2010a). La relación entre la evaluación sensorial y la composición química del vino es un punto crítico de investigación en enología. Algunos autores han evaluado la influencia de la composición volátil

sobre las características organolépticas de los vinos (Escudero et al., 2007; Sáenz-Navajas et al., 2010b), mientras que otros han examinado las relaciones entre los compuestos fenólicos y sus atributos sensoriales (Holt et al., 2008; Chira et al., 2011). Por otra parte, la composición química del vino relacionada con la variedad o zona agroecológica de procedencia es un parámetro de importancia no sólo en el campo de las investigaciones vitivinícolas sino también como herramienta necesaria en el marketing de los productos.

Estos enfoques mencionados han estimulado el desarrollo de investigaciones en el ámbito de la química analítica a fin de generar nuevas metodologías que sean capaces de verificar la autenticidad de los vinos (Siret et al., 2000; Hernández-Orte et al., 2002; Otteneder et al., 2004; Garde-Cerdán et al., 2009), como así también adecuadas para evaluar diferentes factores vitícolas (González-Neves et al., 2002; Ojeda et al., 2002; Guidoni et al., 2008) y enológicos (Peinado et al., 2004; Sacchi et al., 2005; Comuzzo et al., 2006) que inciden sobre la calidad de los productos.

### **7.1. Composición química del vino**

El vino es considerado un producto de lujo, del cual el consumidor espera obtener un placer intenso y sofisticado como para justificar su alto precio. Dicho placer está relacionado con las diferentes sensaciones gustativas, olfativas, táctiles y quemoestésicas (el picante, el “efecto frío” o la astringencia) producidas durante su consumo. Este conjunto de sensaciones debe estar equilibrado y no debe ser enturbiado por la presencia de ninguna sensación espuria. Adicionalmente, durante la degustación, las distintas sustancias químicas presentes en el vino generan diferentes sensaciones, que después de un complejo procesado cerebral, permiten al consumidor distinguir y reconocer aromas, sabores, texturas y sensaciones quemoestésicas. Por lo tanto, detrás de la calidad (o de la falta de ella) de un vino se encuentran un cierto número de compuestos odorantes y gustativos, siendo el mayor reto para la química determinar su naturaleza y estructura, y comprender el papel que juegan en la percepción final. En este sentido es importante realizar una clasificación general de los componentes químicos del vino en función de su contribución asociada a las características organolépticas. Así, en el vino pueden distinguirse los componentes odorantes, los componentes gustativos y los responsables de sensaciones táctiles (astringencia). Por otro lado, también existen otros componentes que, aunque no sean percibidos sensorialmente, inciden en las características organolépticas de los productos.

#### **7.1.1. Componentes odorantes**

La composición volátil y odorante de los vinos se caracteriza por su compleja constitución química formada por diferentes familias de compuestos generados a lo largo de una extensa secuencia biológica, bioquímica y tecnológica llevada a cabo en el proceso vitivinícola. En los vinos

jóvenes esta fracción está constituida por compuestos de origen varietal (terpenos, pirazinas, norisoprenoides y tioles volátiles, entre otros), por compuestos prefermentativos formados entre la vendimia y la molienda (alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos, saturados e insaturados de 6 a 9 átomos de carbono) y por compuestos generados por el metabolismo de los microorganismos fermentativos (alcoholes, ésteres, cetonas, ácidos orgánicos, aldehídos, terpenos, compuestos azufrados y fenoles volátiles, entre otros). Asimismo, en los vinos de crianza y/o después del almacenamiento en botella deben considerarse también los compuestos que se generan por transformaciones químicas de las sustancias presentes inicialmente en los vinos jóvenes, y los compuestos aportados por la madera de roble. Los diferentes componentes de esta fracción volátil y odorante se encuentran en concentraciones comprendidas entre los ng/L y los mg/L (dependiendo del compuesto químico y de su origen) (Bayonove et al., 2000).

### **7.1.2. Componentes gustativos**

El gusto dulce de los vinos es la expresión gustativa de azúcares residuales en el producto terminado y de algunos alcoholes formados durante la etapa fermentativa. Los azúcares residuales encontrados en los vinos son aquellos que provienen de las uvas. A este grupo pertenecen las hexosas (glucosa y fructosa) y las pentosas (arabinosa y xilosa) (Pellerin y Cabanis, 2000). Estos azúcares se encuentran en los vinos blancos y tintos secos en concentraciones inferiores a 3 g/L. Por otro lado, los alcoholes que generan gustos dulces se producen durante la fermentación alcohólica por oxidación de azúcares, y son principalmente el etanol (del 9 al 16% v/v), el glicerol (entre 5 y 10 g/L) y en menor proporción el butilenglicol. Otros alcoholes que participan en el gusto dulce (inositol, manitol, xilitol, arabitol, eritritol, sorbitol) también son formados durante la vinificación, pero sus concentraciones en el vino son dependientes del tipo de fermentación realizada (Cabanis et al., 2000; Pellerin y Cabanis, 2000).

La acidez del vino se atribuye a distintos ácidos orgánicos provenientes de la uva (ácidos tartárico, málico y cítrico) y otros originados durante la fermentación (ácidos succínico, pirúvico, láctico y acético). Su concentración total en los vinos varía generalmente entre 5 y 10 g/L (Boulton et al., 2002). Otros ácidos como el galacturónico y glucurónico, y algunos ácidos grasos saturados e insaturados también conforman la acidez del vino pero se encuentran en concentraciones inferiores a 100 mg/L (Cabanis et al., 2000). En el caso de uvas afectadas por *Botrytis cinerea* y/u otros hongos, la presencia de ácido glucónico puede ser muy significativa (más de 2 g/L) (Ribéreau-Gayon et al., 2006d). La mayor parte de los ácidos se encuentran en estado libre y constituyen la acidez total de los vinos; aunque, en menor proporción, también se presentan en sus formas iónicas, contribuyendo de esta manera al gusto salado. Paralelamente, la acidez del vino y en particular el pH desempeñan

un papel fundamental en muchos aspectos de la vinificación, estabilidad y crianza del producto (Boulton et al., 2002).

Por su parte, los componentes del gusto salado consisten en sales de los cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  de compuestos inorgánicos adicionados en diferentes etapas del proceso vitivinícola ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{SO}_3^{-2}$ ), y en sales de los cationes  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Cu}^+$  de ácidos orgánicos propios de las uvas o generados durante la fermentación (tartárico, málico y láctico). Estos componentes en general se encuentran en los vinos en concentraciones inferiores a 3 g/L, acompañados de oligoelementos como F, Si, I, Br, B, Zn, Pb, Co, Ni, etc. (Cabanis, 2000).

Finalmente, el gusto amargo y la sensación de astringencia de los vinos son producidos por los compuestos fenólicos, descritos anteriormente en el ítem 2. La concentración de estos compuestos químicos es variable y dependiente de múltiples factores vitícolas (variedad de uva, grado de madurez, condiciones agroecológicas y manejo del viñedo, entre otros) y de las condiciones de vinificación. El contenido de compuestos no-flavonoides en los vinos tintos se encuentra en el rango comprendido entre 1 y 200 mg/L, en tanto que los flavonoides varían entre 20 mg/L y 5 g/L. Asimismo, los compuestos fenólicos además de impartir a los vinos el gusto amargo y la sensación de astringencia, están asociados al color de los mismos (Cheynier et al., 2000).

### **7.1.3. Otros componentes**

Dentro de este grupo se encuentran principalmente los compuestos nitrogenados, los polisacáridos y las vitaminas. Respecto a las vitaminas, las mismas no poseen ninguna influencia directa sobre las propiedades organolépticas del vino, pero son factores de crecimiento indispensables para las levaduras y bacterias lácticas intervinientes en el proceso de vinificación. El contenido promedio de vitaminas (tiamina, riboflavina, nicotinamida, colina, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico) en un vino varía entre 0,1 y 5 mg/L (Cabanis et al., 2000).

Por su parte, las sustancias nitrogenadas (aminoácidos, péptidos y proteínas) se encuentran en el vino en concentraciones inferiores a 1 g/L (Feuillat et al., 2000). Con respecto a los aminoácidos, son muy importantes durante la vinificación, al ser utilizados como fuente de nitrógeno por levaduras y bacterias lácticas, y participan también en la generación de compuestos odorantes deseables (alcoholes superiores, aldehídos, ésteres y cetonas), aunque pueden producir otros compuestos indeseables (carbamato de etilo, aminas biógenas, ocratoxina A) (Moreno-Arribas y Polo, 2009). En cuanto a los péptidos, también actúan como nutrientes de levaduras y bacterias, y han sido vinculados con propiedades gustativas de dulzor y amargor (Moreno-Arribas et al., 2009). Mientras que las proteínas, intervienen principalmente en fenómenos de estabilización de los vinos al formar agregados entre ellas y con otros componentes del vino (polifenoles y polisacáridos), y poseen cierto impacto sensorial (dulzor) (Waters y Colby, 2009).



Finalmente, los polisacáridos constituyen uno de los principales grupos de macromoléculas del vino, con concentraciones generalmente inferiores a 2 g/L (Ribéreau-Gayon et al., 2006c). Como ya se mencionó anteriormente (ítem 6.2.2.6.), estos compuestos contribuyen a la estabilidad del vino respecto a la precipitación tartárica, quiebra proteica y agregación de proantocianidinas. Por otro lado, también inciden en las propiedades organolépticas y en la calidad sensorial del vino, al aumentar la viscosidad, volumen en boca y modular la astringencia (Vidal et al., 2003b; Fernández et al., 2011), e interactuar con algunas sustancias odorantes (ésteres y alcoholes) disminuyendo su volatilidad (Dofour y Bayonove, 1999; Chalier et al., 2007).

## **8. La vitivinicultura argentina**

### **8.1. Breve reseña histórica**

La historia de la vitivinicultura argentina se remonta a la época de la colonización, ya que el cultivo de la vid estaba estrechamente relacionado con las prácticas agrícolas de los colonos españoles. Los primeros ejemplares de la especie *Vitis vinifera* llegaron a mediados del siglo XVI a Perú, de allí pasaron a Chile y a partir del año 1551 fueron introducidos en Argentina, propagándose por el centro, oeste y noroeste del país. Favorecida por las óptimas condiciones edafoclimáticas, la vitivinicultura manifestó un amplio y acelerado desarrollo, principalmente en las regiones andinas. En las Provincias de Mendoza y San Juan se implantaron los primeros viñedos entre 1569 y 1589, lo que dio lugar, con el transcurso del tiempo, al desarrollo de un importante polo económico-industrial (Montaña, 2007).

A principios del siglo XVII, ya se contaba con una importante producción de vinos, lo que llevó a buscar nuevos mercados. Por esa época no existía una industria vitivinícola propiamente dicha sino sólo una producción casera y artesanal, que se fue incrementando y fue generando un intercambio progresivo con Buenos Aires, ya entonces el principal centro de consumo. A partir de la mitad de siglo XIX, en plena época filoxérica en Europa, comenzó una etapa de impulso debido a la introducción de variedades francesas, italianas y españolas, acompañada de un fuerte incremento en el consumo de vinos por la creciente inmigración y la llegada del ferrocarril. Simultáneamente se inició una transformación radical en el ámbito organizacional a través de la creación de la Quinta Normal de Agricultura en Mendoza, que fue la primera Escuela de Agricultura de la República Argentina, y el dictado de las leyes de aguas y tierras. Estos cambios constitucionales permitieron el crecimiento de la colonización, con el importante aporte de las técnicas de cultivo y elaboración proporcionadas por los inmigrantes europeos, dando lugar a innovaciones utilizadas en los viñedos y bodegas de ese entonces (Montaña, 2007).

## **8.2. Situación actual de contexto**

Durante la década de 1990 la vitivinicultura argentina sufrió una serie de cambios estructurales, que confluyeron en un nuevo modelo agroindustrial. En este período, la industria especializada en la producción de vinos de mesa y orientada hacia el mercado nacional fue convirtiéndose paulatinamente en otra con elevados niveles tecnológicos y dedicada a la producción de diferentes gamas de vinos para la exportación y el consumo interno.

Los motivos de estos drásticos cambios estuvieron relacionados por un lado con la contracción del mercado nacional de vinos de mesa, a partir de 1980, que condujo a una fuerte disminución de la superficie cultivada con vid, y a la desaparición de muchas bodegas. Por otro lado, la apertura y estabilidad de la economía que vivió la Argentina en esa etapa, incentivó las inversiones nacionales y extranjeras orientadas a captar mercados, con un consumo creciente de vinos varietales de alta calidad y precios convenientes (Vigil et al., 2003). Durante la década de 1990 se erradicaron alrededor de 35.000 hectáreas de uvas criollas, de baja calidad enológica, y se implantaron otras tantas con variedades de alto potencial cualitativo, por lo que la superficie total de viñedos se mantuvo prácticamente estable.

En general, los viñedos y bodegas se ubican en la zona oeste del país (**Figura 17**), al pie de la Cordillera de los Andes, en valles irrigados principalmente por ríos de montaña. El cultivo se extiende desde los 22º de latitud sur (Provincia de Salta) hasta los 42º de latitud sur (Provincia de Río Negro). Esta gran amplitud latitudinal, combinada con la topografía de sus valles andinos, condicionan grandes variaciones ecológicas que admiten el cultivo de una amplia gama de variedades, destinadas a la obtención de diversos tipos de vinos (Catania y Avagnina, 2010). En la actualidad, la República Argentina posee 228.575 hectáreas cultivadas con vid, lo cual representa aproximadamente el 3% de la superficie mundial de viñedos. La Provincia de Mendoza concentra más del 70% del total nacional con 160.704 ha, seguida por la Provincia de San Juan (49.492 ha). Es importante destacar el predominio de las variedades de uva para vinificar, las cuales representan más del 93% del total implantado (INV, 2009).

Con respecto a las inversiones extranjeras realizadas en el sector, el monto invertido durante la década de 1990, fue de aproximadamente 1500 millones de dólares. Dichas inversiones se destinaron tanto a la adquisición de empresas argentinas, como a la instalación de viñedos y bodegas nuevas. Este cambio de escenario trajo aparejado un aumento de las ventas en el mercado interno y de las exportaciones de vinos de alta calidad enológica. Así las exportaciones de estos productos pasaron de aproximadamente 492.000 hL (US\$ 96.800.000) en el año 2000 a 1.981.000 hL (US\$ 636.000.000) en el año 2010 (INV, 2010a,b).

### **8.3. Características de la cadena vitivinícola**

En un análisis simplificado puede afirmarse que en el ámbito de la vitivinicultura argentina coexisten dos actividades bien diferentes desde el punto de vista del producto: los vinos de mesa y los vinos de alta calidad enológica. Existen muchas empresas que se dedican a la producción de ambos tipos, pero es más frecuente que las bodegas y los productores de uva estén especializados o tiendan a especializarse en sólo uno de ellos.

En el sector de los vinos de alta calidad enológica se observa una mayor diversificación de los actores que participan en el negocio. Aparece en primer lugar un grupo reducido de grandes empresas especializado en la gama más baja de estos productos, que en conjunto con los vinos de mesa, conforman los vinos básicos y representan aproximadamente el 91% del total de los vinos producidos en la Argentina. Al igual que en los vinos de mesa, en este subsector existe una fuerte concentración empresaria y estrategia de liderazgo en costos. Este grupo de empresas generalmente cuenta con viñedos propios, que alcanzan a autoabastecer aproximadamente la mitad de lo que elaboran, y reciben el resto de las uvas de productores no integrados. Las mismas elaboran una amplia gama de productos pero trabajan mayoritariamente este segmento, el cual es comercializado principalmente en grandes cadenas nacionales de supermercados. El siguiente grupo es el conformado por las bodegas que producen vinos de alta gama (premium y superpremium). Son alrededor de 50 empresas o grupos empresarios que comercializan vinos embotellados en el mercado interno, y exportan vinos a granel y/o embotellados con marcas propias o pertenecientes al distribuidor. Las uvas que utilizan para su elaboración provienen de viñedos propios y de productores no integrados. Por otro lado, existe también un conjunto de bodegas trasladistas que en los últimos años han realizado un importante proceso de tecnificación, adquiriendo equipamiento de avanzada con el objetivo de mejorar la calidad de sus productos. Estas empresas no han logrado un desarrollo de marca, ni una distribución propia, debido a su objetivo tradicional de elaborar productos a granel. En general se dedican a la exportación de vinos a granel o embotellados con marcas del distribuidor. Finalmente, se encuentra un pequeño grupo de bodegas cooperativas orientadas a la elaboración de vinos de alta calidad enológica, que ha asumido también un proceso de tecnificación similar y en la actualidad realizan exportaciones bajo la misma modalidad (Vigil et al., 2003).

### **8.4. Consideraciones generales**

Argentina posee condiciones agroecológicas óptimas para el desarrollo vitivinícola debido a la diferenciación de altitud, suelo y clima asociados a las distintas zonas de cultivo, en las cuales se producen diversas variedades de uva adecuadas para la elaboración de vinos de elevada calidad. Esta situación permite la obtención de una gran diversidad de productos de distintas gamas y estilos comerciales, que han permitido posicionar a este país como el quinto productor mundial de vinos

después de Italia, Francia, España y Estados Unidos (OIV, 2010a). La existencia de un sistema cooperativo comercialmente exitoso y en expansión, favorece a que gran parte de los pequeños productores alcancen las ventajas de la integración y vayan transitando su proceso de reconversión, amortiguando los efectos de la crisis del vino de mesa.

Los cambios estructurales marcados por las fuertes inversiones han sido acompañados por reformas en el ámbito legal, como la sanción de la Ley de Denominación de Origen Controlada, Indicaciones Geográficas e Indicaciones de Procedencia (Ley 25.163, promulgada el 6 de octubre de 1999), y la constitución de la Corporación Vitivinícola Argentina (COVIAR) mediante la Ley 25.849 (promulgada el 26 de febrero de 2004) destinada a gestionar y coordinar la implementación del denominado Plan Estratégico Argentina Vitivinícola 2020 (PEVI). Estas acciones conjuntas han permitido la promoción del consumo del vino argentino, tanto en el mercado interno como externo, y el posicionamiento dentro de los países vitivinícolas más importantes del mundo (Jofré, 2011).

## **9. La variedad Malbec (*Vitis vinifera* L.)**

### **9.1. Origen**

La variedad Malbec (*Vitis vinifera* L.) es considerada la uva tinta emblemática de la Argentina y se caracteriza por ser un cultivar (cv.) exigente, respecto a las condiciones agroecológicas de las zonas de producción y al manejo del viñedo, al momento de expresar todo su potencial. Según diversos autores sería originaria de las zonas de Cahors, Quercy o la Touraine, en el sud-oeste de Francia. Allí se la conoce principalmente con el nombre de "Côt", aunque posee varios sinónimos tales como Auxerrois, Côt de Bordeaux, Pressac y Luckens, entre otros. La denominación "Malbec", por la cual se la conoce en Argentina, proviene de "Malbeck", el nombre del viticultor húngaro que habría introducido esta variedad en Burdeos (Rodríguez et al., 1999; Catania y Avagnina, 2010).

Su cultivo fue muy extendido en los viñedos franceses, representando gran parte del encepado del sud-oeste y centro-oeste de ese país. Fue una variedad importante hasta la época de la filoxera, donde resultó muy afectada, quedando relegada hasta su reimplantación a partir del año 1940. En la región de Cahors es la variedad tinta dominante, y según la Apelación de Origen Controlada (AOC) interviene al menos en una proporción del 70% en los vinos producidos, complementados con otras variedades como Tannat y Merlot. Forma parte asimismo del encepado tinto de la AOC "Bordeaux" junto a las variedades Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Carménère, Merlot y Petit Verdot (Rodríguez et al., 1999).

## 9.2. Antecedentes en Argentina

Desde sus orígenes la viticultura argentina se inclinó netamente a las variedades de uva para vinificar. En un comienzo se caracterizó por el cultivo de variedades “criollas” provenientes de semillas de variedades españolas. La introducción del Malbec en Argentina, tal como se mencionó anteriormente, coincidió con el ingreso de otros cultivares europeos a mediados del siglo XIX, atribuyéndose esta labor al agrónomo francés Michel Aimé Pouget. Esta variedad tuvo una rápida difusión en la Provincia de Mendoza, adaptándose notablemente a diferentes condiciones agroecológicas y alcanzando una superficie superior a 50.000 ha en el año 1966 (Pandolfi, 2000). En esa época era conocida como “uva francesa”, aunque esta denominación incluía otras variedades como Tannat y Petit Verdot, constituyendo la base de los vinos tintos de la región.

Lamentablemente, al amparo de beneficios impositivos, en la década de 1960 comenzaron a implantarse nuevamente variedades criollas de mucha productividad y baja calidad enológica, que dejaron en desventaja y desplazaron al Malbec debido a sus rendimientos limitados. La consecuencia fue un importante porcentaje de erradicación, disminuyendo su superficie cultivada a 10.000 ha hacia el año 1990. A partir de ese momento, la reestructuración de la vitivinicultura hacia vinos de alta calidad enológica permitió la revalorización del Malbec, volviendo a ocupar el primer lugar entre las uvas tintas. En la actualidad existen más de 28.000 ha de esta variedad en Argentina, de las cuales aproximadamente el 80% (24.000 ha) se encuentra en la Provincia de Mendoza (INV, 2009).

## 9.3. Regiones de cultivo

La variedad Malbec ha sido difundida en todas las regiones vitivinícolas argentinas desde la localidad de Cafayate en la Provincia de Salta (25º latitud sur) a 1600 metros de altura sobre el nivel del mar (msnm), hasta los valles de la Provincia de Río Negro (40º de latitud sur y 300 msnm) en la región patagónica (**Figura 17**).

Mendoza es la provincia por excelencia para el cultivo de esta variedad con 24.331 ha (85,3% del total nacional), seguida por las Provincias de San Juan (7,2%), Neuquén (2,0%), La Rioja (1,8%), Salta (1,7%) y Río Negro (1,2%), mientras que la superficie restante se encuentra distribuida en otras localidades menos significativas (INV,2010c). Dentro de Mendoza (**Figura 17**), es indudable que la Zona Alta del Río Mendoza es la más tradicional con aproximadamente el 40% de la totalidad del Malbec provincial. Esta región abarca gran parte de las áreas cultivadas de los departamentos de Luján de Cuyo, Maipú, Guaymallén y Las Heras. La segunda zona en importancia corresponde al Valle de Uco, constituido por los departamentos de San Carlos, Tunuyán y Tupungato, que en conjunto poseen 8.000 ha con esta variedad representando el 35% del total provincial. Finalmente, se destaca la zona del Este Mendocino (San Martín, Junín, Rivadavia) con el 16%, y el Sur Mendocino (San

Rafael) con el 6%. Actualmente, se está difundiendo a nuevas áreas, con resultados promisorios en las regiones de altura (Catania y Avagnina, 2010; INV,2010c).

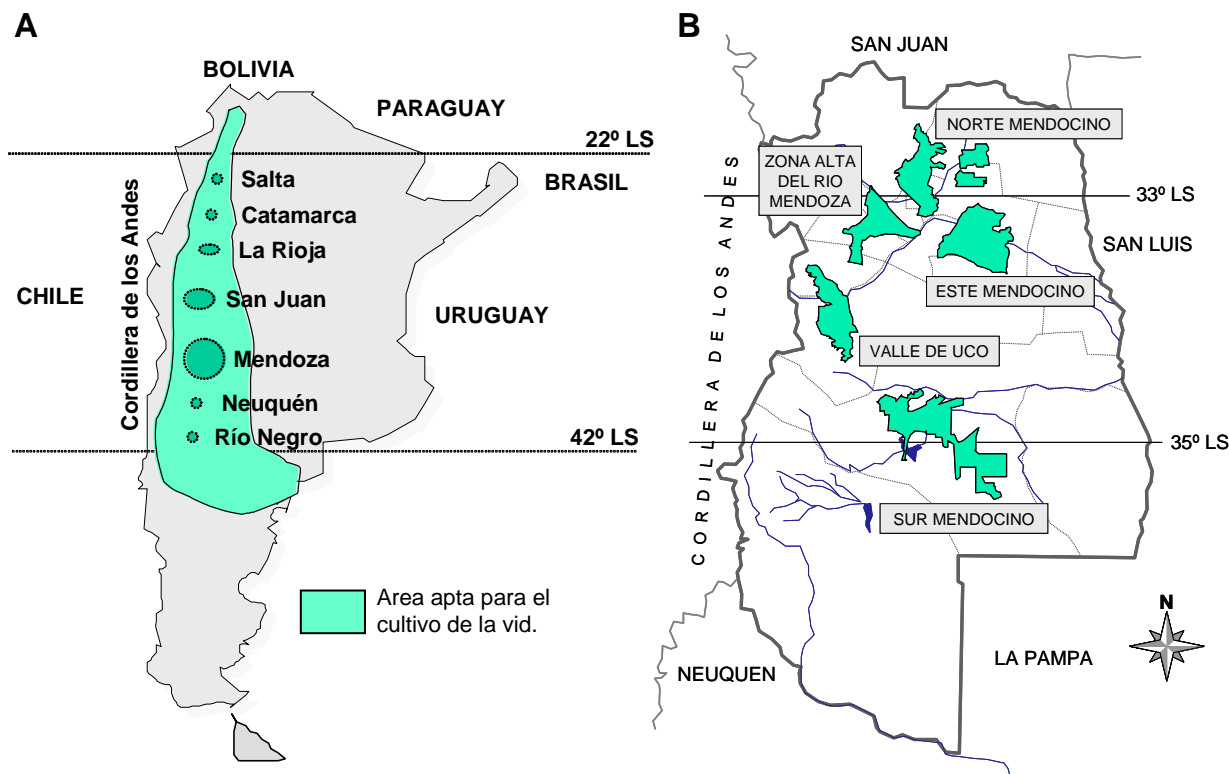


Figura 17. Regiones vitivinícolas de Argentina (A) y regiones vitivinícolas de la Provincia de Mendoza (B).

#### 9.4. Comportamiento agronómico y aptitud enológica

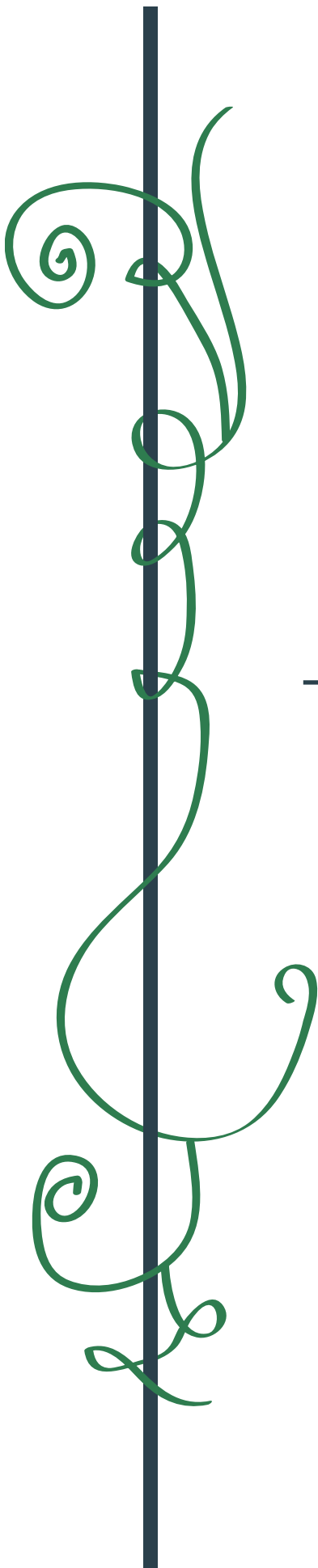
Desde el punto de vista agronómico, el Malbec es una variedad de maduración media (marzo-abril para las condiciones edafoclimáticas de Mendoza), manifiesta yemas basales fértiles, y una productividad baja a media, obteniéndose los mejores resultados con rendimientos cercanos a los 10.000 kg/ha. Se caracteriza por su alta sensibilidad a las heladas, mientras que por el contrario es menos susceptible a enfermedades tales como oidio, peronospora y podredumbre de los racimos (Rodríguez et al., 1999). Es de porte erecto, por lo que se adapta muy bien a la conducción vertical con posicionamiento ascendente de los brotes como los sistemas Guyot y Cordón Bilateral (VSP), no así a los de follaje descendente como el sistema Ginebra Cortina Doble (GDC). Es un cultivar vigoroso, poco plástico y sensible a las altas temperaturas nocturnas (Casassa, 2007).

Desde el punto de vista enológico, es una variedad apta para la elaboración de vinos tintos jóvenes y de guarda, como así también para la producción de vinos rosados y espumantes. Organolépticamente, los vinos Malbec se caracterizan por una alta intensidad colorante, con matices violetas y negros. Los descriptores aromáticos más citados son frutos rojos (ciruela, mora), tinta,

violetas y anís, con algún carácter herbáceo cuando las uvas provienen de viñedos desequilibrados. En boca, se caracteriza por presentar taninos suaves, maduros y redondos, y por un sabor ligeramente dulce. Envejece muy bien y es adecuado para la crianza en barricas (Vila, 2002; Casassa, 2007).

Es importante destacar, que la inserción y posicionamiento competitivo de Argentina en la escena vitivinícola mundial se debe en gran medida al desarrollo de esta variedad, utilizando como eje numerosos trabajos de investigación especialmente en el ámbito agronómico. Así, en los últimos 20 años el Malbec ha sido caracterizado a nivel vitícola respecto a sus clones y/o poblaciones (Scarsi, 2000), sistemas de conducción (Ojeda et al., 1994) y condiciones agroecológicas más favorables para su desarrollo (Rodríguez et al., 1999). La necesidad de preservar su patrimonio y el auge alcanzado con el tiempo llevaron a la creación de la Denominación de Origen Controlada “Luján de Cuyo” en el año 1986. Por su parte, en el ámbito enológico se han evaluado distintas alternativas de maceración y crianza en roble tendientes a optimizar la calidad del producto (Catania y Avagnina, 2010). Sin embargo, existe hasta el momento un gran desconocimiento sobre la composición química de las uvas y vinos de esta variedad.

Finalmente, si bien el Malbec se ha convertido en el vino emblemático argentino, resulta necesario consensuar criterios vitícolas y enológicos que permitan mejorar las cualidades del producto y contribuyan a definir estilos diferenciales.



## **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

---



El presente trabajo de investigación pretende ser una contribución al estudio y conocimiento de la composición química de uvas y vinos de la variedad Malbec (*Vitis vinifera* L.). De acuerdo a lo señalado en la introducción, el cultivo de esta variedad es de suma importancia para la vitivinicultura argentina, representada en su mayoría por la Provincia de Mendoza, ya que ha permitido la inserción y posicionamiento competitivo de este país en el mercado vitivinícola mundial.

El conocimiento de la composición química de la uva y el vino, y particularmente de la composición fenólica, es uno de los elementos clave a la hora de monitorear y mejorar la calidad de los productos. Actualmente, la tendencia del mercado del vino tinto se orienta hacia la elaboración de productos con un alto contenido polifenólico, coloraciones intensas, buena estructura en boca y equilibrados. Por lo cual, resulta fundamental la comprensión de estos parámetros de calidad y de los múltiples factores que inciden sobre los mismos.

Estudios previos vinculados a la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec sólo se han focalizado en evaluar la influencia de algunas variables vitícolas y enológicas sobre parámetros analíticos generales. Sin embargo, existe un gran desconocimiento sobre la distribución y concentración de compuestos fenólicos individuales (flavonoides y no-flavonoides) en dichos productos, en relación a otros cultivares, al origen geográfico, a ciertos manejos vitivinícolas y al valor comercial.

Por lo tanto, en respuesta a las necesidades planteadas, se han propuesto las siguientes Hipótesis y Objetivos Generales:

### **Hipótesis**

- ✓ La composición fenólica de uvas y vinos cv. Malbec es influenciada por la región geográfica de procedencia, y por los manejos vitícolas y enológicos realizados durante el proceso vitivinícola.
- ✓ La composición fenólica y polisacáridica de vinos cv. Malbec se encuentra relacionada con la calidad de los mismos, la cual se ve reflejada en el valor comercial.
- ✓ Los vinos cv. Malbec presentan una composición fenólica diferencial respecto a los vinos producidos con otras variedades tintas cultivadas en la Provincia de Mendoza (Argentina), lo que puede condicionar sus propiedades sensoriales.

**Objetivos Generales**

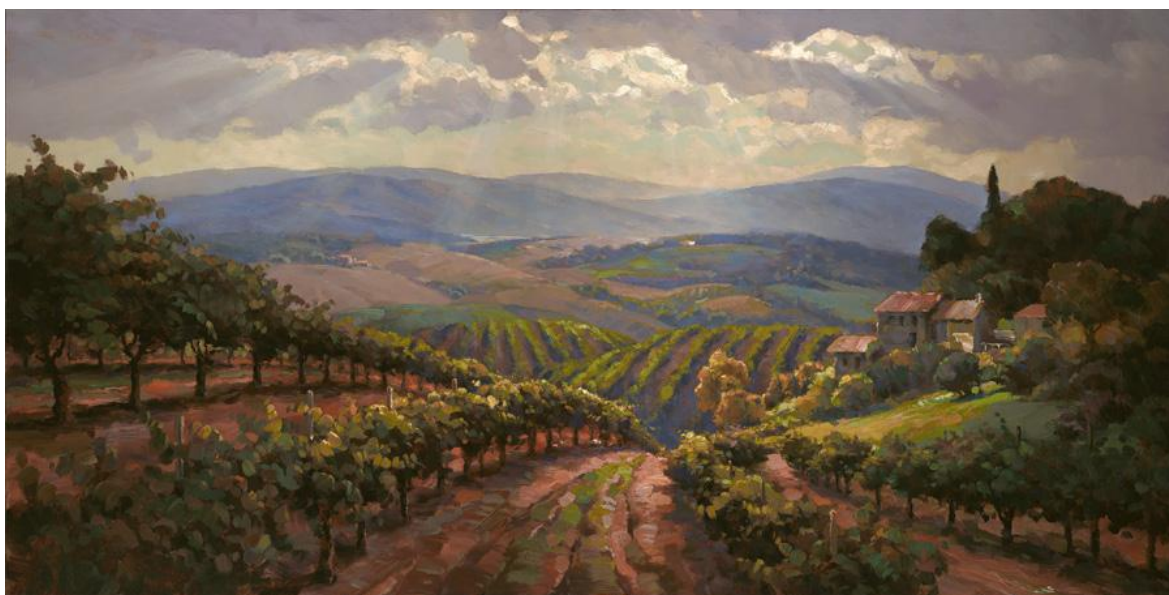
- ✓ Caracterizar la composición fenólica de uvas y vinos cv. Malbec provenientes de diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (Argentina).
- ✓ Evaluar el efecto de la práctica vitícola “aclareo de racimos” y del manejo enológico “sangrado parcial del mosto” sobre la composición fenólica de uvas y vinos cv. Malbec de la Provincia de Mendoza.
- ✓ Determinar la influencia de la composición fenólica y polisacáridica sobre las características cualitativas y el valor comercial de vinos cv. Malbec de la Provincia de Mendoza.
- ✓ Describir y comparar la composición fenólica de vinos provenientes de las seis variedades tintas más cultivadas en la Provincia de Mendoza (Malbec, Bonarda, Cabernet Sauvignon, Merlot, Shiraz y Tempranillo).



## **RESULTADOS Y DISCUSION**

---

## **Influencia del origen geográfico sobre la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (*Vitis vinifera* L.)**



**Leon Roulette, *Tuscany splendor*.**

- II.1. Caracterización de la composición fenólica de uvas Malbec cultivadas en diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (Argentina).
- I.2. Caracterización de la composición fenólica de bajo peso molecular y perfil antociánico de vinos Malbec provenientes de diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza.
- I.3. Caracterización de la fracción flavánica y otras fracciones fenólicas de vinos Malbec de diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza.

De acuerdo a lo descrito en la introducción general, los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de compuestos químicos de mayor relevancia en la uva destinada a vinificación, debido principalmente a su influencia directa sobre las características organolépticas del producto. Estos compuestos son biosintetizados en las plantas como resultado del metabolismo secundario, el cual se encuentra regulado por diversos factores. Entre los factores genéticos, la **variedad** determina en gran medida la composición cualitativa y cuantitativa de las diferentes partes de la baya (hollejo, semilla y pulpa) y, por consiguiente, del vino. Por otro lado, las condiciones edafoclimáticas que definen una determinada **zona geográfica** inciden notablemente sobre la misma. A pesar de la importancia de la variedad Malbec (*Vitis vinifera* L.) para la vitivinicultura argentina, existe un gran desconocimiento sobre su composición química. Con el propósito de ampliar el conocimiento sobre este cultivar, en este primer capítulo se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Caracterizar la composición fenólica de hollejos, semillas y pulpa de uvas Malbec provenientes de tres zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (Argentina), y realizar un estudio comparativo con uvas Cabernet Sauvignon.
- ✓ Caracterizar la composición fenólica de vinos Malbec provenientes de diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza.

Los resultados obtenidos, tendientes al cumplimiento de estos objetivos, se describen en los siguientes apartados:

- I.1. Caracterización de la composición fenólica de uvas Malbec cultivadas en diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (Argentina).
- I.2. Caracterización de la composición fenólica de bajo peso molecular y perfil antociánico de vinos Malbec provenientes de diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza.
- I.3. Caracterización de la fracción flavánica y otras fracciones fenólicas de vinos Malbec de diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza.

Este primer trabajo ha permitido la publicación científica de los resultados obtenidos en el Apartado I.2: "*Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina)*".

### **Caracterización de la composición fenólica de uvas Malbec cultivadas en diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (Argentina)**



## 1. Consideraciones generales

Los compuestos fenólicos son considerados uno de los parámetros de calidad más importantes de uvas y vinos. Según su estructura química pueden ser divididos en dos grandes grupos: no-flavonoides (ácidos fenólicos y estilbenos) y flavonoides (antocianinas, flavanoles y flavonoles). En las bayas, se distribuyen principalmente en hollejos y semillas (no-flavonoides y flavonoides) y en menor proporción en pulpa (no-flavonoides) (Monagas et al., 2005a). Las antocianinas constituyen la familia de compuestos directamente responsables del color de las uvas y vinos tintos jóvenes, los flavanoles (monómeros, oligómeros y polímeros) contribuyen a la astringencia, amargor y estructura de los vinos (Gawel, 1998), en tanto, los flavonoles se relacionan con el amargor (Sáenz-Navajas et al., 2010c) y junto con los flavanoles participan del color a través de reacciones de copigmentación y/o condensación (Monagas y Bartolomé, 2009). Adicionalmente, se los relaciona con efectos fisiológicos benéficos sobre la salud humana debido a sus propiedades antimicrobianas, anticarcinogénicas y antioxidantes (Renaud y de Lorgeril, 1992; Shrikhande, 2000). Las antocianinas y flavonoles son los polifenoles más abundantes en los hollejos, mientras que los flavanoles predominan en las semillas (Rodríguez Montealegre et al., 2006). La presencia y concentración de compuestos fenólicos en las bayas depende principalmente de factores genéticos, ambientales y culturales. Al analizar el efecto de la variedad de uva, diversos estudios han demostrado diferencias significativas en la composición de antocianinas, flavonoles y flavanoles entre cultivares (Núñez et al., 2004; Otteneder et al., 2004; Rodríguez Montealegre et al., 2006; Castillo-Muñoz et al., 2007; Obreque-Slier et al., 2010). Por su parte, factores ambientales como la luz y la temperatura, que caracterizan las diferentes zonas de cultivo, inciden directamente sobre la actividad fotosintética de la planta y sobre las enzimas de la ruta fenilpropanoide modificando la biosíntesis de estos compuestos (Boss et al., 1996a; Goldberg et al., 1998; Peña-Neira et al., 2000).

El cultivar Malbec (*Vitis vinifera* L.), de origen francés, es la variedad de uva tinta más producida en Argentina (> 28.000 ha), debido a su adaptación a los distintos ecosistemas, permitiendo la obtención de materia prima apta para la elaboración de diferentes estilos de vino. Mendoza es la principal provincia productora con más del 80% de la superficie implantada con esta variedad en Argentina, la cual se distribuye en diferentes zonas con características agroecológicas particulares (INV, 2009). Desde hace algunas décadas se están realizando algunos estudios de investigación a nivel agronómico (selección masal y clonal, evaluación de sistemas de conducción y riego, manejos del suelo, etc.) y enológico (sistemas de maceración y crianza) tendientes a su posicionamiento en el mercado internacional (Catania y Avagnina, 2010). Sin embargo, existe escasa información acerca de su composición química.

Por lo expuesto anteriormente, se propuso estudiar la composición fenólica de uvas Malbec provenientes de tres zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (Junín, Agrelo y Gualtallary), con el fin de determinar los parámetros que las caracterizan. Paralelamente, se decidió realizar un análisis comparativo con Cabernet Sauvignon por ser una variedad ampliamente estudiada y difundida en la mayoría de los países de importancia vitivinícola.

## 2. Condiciones experimentales

El estudio se realizó en bayas de la vendimia 2010. Se analizaron uvas de los cultivares (cvs.) Malbec (MB) y Cabernet Sauvignon (CS) provenientes de viñedos implantados sobre pie franco y representativos de cada variedad, ubicados en 3 zonas vitícolas de Mendoza: Junín, Agrelo y Gualtallary (**Tabla 1**).

<b>Tabla 1.</b> Características geográficas de las distintas zonas de Mendoza.			
<b>Zona</b>	<b>Altitud (msnm<sup>a</sup>)</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
Junín (Zona este)	650	33° 05' S	68° 28' O
Agrelo (Zona alta del río Mendoza)	940	33° 07' S	68° 52' O
Gualtallary (Valle de Uco)	1450	33° 24' S	69° 17' O
<sup>a</sup> msnm (metros sobre el nivel del mar)			

Estas zonas se diferencian principalmente por la altitud, incidiendo en las condiciones agroecológicas y generando distintos regímenes de temperatura y radiación solar sobre los viñedos en cuestión. Los viñedos pertenecían a la empresa Bodegas Esmeralda S.A. (Mendoza, Argentina) y fueron manejados siguiendo el criterio agronómico tradicional aplicado a cada zona estudiada. La **Tabla 2** muestra los datos más relevantes de los viñedos evaluados. Se emplearon 3 réplicas por variedad, correspondientes a 30 plantas homogéneas conducidas en espaldera, con orientación norte-sur, y sometidas a regímenes hídricos y prácticas culturales estándares. El manejo del follaje, realizado manualmente, incluyó desbrote de tronco, eliminación de brotes dobles, y posicionamiento de brotes sobre alambres móviles. Las plantas fueron mantenidas sin restricción hídrica y la cantidad media de agua recibida desde brotación hasta cosecha (septiembre-marzo) fue estimada en 400-450 mm. Se realizó el muestreo aleatorio de bayas en madurez tecnológica (24-25 °Brix), siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo I. Se separaron los hollejos, semillas y pulpa, y cada fracción fue sometida a la determinación de parámetros analíticos generales y al análisis de compuestos fenólicos, siguiendo la metodología detallada en el Anexo I.



Tabla 2. Datos de los viñedos Malbec y Cabernet Sauvignon de las distintas zonas evaluadas.								
Varietal	Zona <sup>a</sup>	Año de plantación	Marco de plantación	Sistema de conducción	Rendimiento (t/ha)	Poda	Sistema de riego	Fecha de floración
Malbec	J	2002	2,2 x 1,2 m	Espaldera (2 niveles)	14,0	Cordón de pitones	Superficial	01-11-2009
	A	1996	2 x 1,2 m	Espaldera simple	10,0	Guyot doble	Goteo	18-11-2009
	G	1998	2 x 1,2 m	Espaldera simple	8,0	Guyot doble	Goteo	23-11-2009
Cabernet Sauvignon	J	1999	2,2 x 1,2 m	Espaldera (2 niveles)	13,0	Cordón de pitones	Superficial	10-11-2009
	A	1997	2 x 1,2 m	Espaldera simple	10,0	Guyot doble	Goteo	22-11-2009
	G	1998	2 x 1,2 m	Espaldera simple	8,0	Guyot doble	Goteo	28-11-2009

<sup>a</sup> J (Junín), A (Agrelo), G (Gualtallary)

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Parámetros analíticos generales

Las bayas MB y CS de las distintas zonas evaluadas fueron caracterizadas inicialmente a través de los parámetros analíticos presentados en la **Tabla 3**. El análisis de 100 bayas mostró una tendencia creciente en el peso total a medida que aumenta la altitud del viñedo, con diferencias estadísticamente significativas sólo en MB ( $p < 0,05$ ) indicando un mayor tamaño promedio de bayas en las muestras de Gualtallary. Esto podría deberse posiblemente al menor rendimiento del MB en esta zona, relacionado en parte a temperaturas muy bajas durante la temporada anterior afectando probablemente la inducción floral y el desarrollo de las inflorescencias inmaduras en las yemas latentes, como así también a menores temperaturas ambientales al momento de la floración causadas por la mayor altitud. Esta situación probablemente condujo a un menor número de bayas por racimo, disminuyendo la competencia entre las bayas de cada racimo e incidiendo notablemente en su peso final, al generarse condiciones más propicias para los procesos de división y elongación celular característicos de las etapas de formación y maduración de las bayas, respectivamente (Coombe y McCarthy, 2000).

Parámetro	Malbec			Cabernet Sauvignon		
	Junín	Agrelo	Gualtallary	Junín	Agrelo	Gualtallary
Peso de 100 bayas (g)	176,0 ± 4,2* a	194,3 ± 1,5 b	210,4 ± 0,8 c	133,0 ± 3,3 a	137,9 ± 8,0 a	146,7 ± 1,7 a
Peso de hollejos (g)	13,5 ± 0,4 a	15,3 ± 1,6 a	17,2 ± 0,8 a	16,1 ± 1,5 a	14,8 ± 0,9 a	15,4 ± 0,5 a
Peso de semillas (g)	7,1 ± 0,4 a	6,3 ± 0,4 a	5,8 ± 0,1 a	7,1 ± 0,2 a	7,4 ± 0,6 a	6,5 ± 0,2 a
Sólidos solubles (°Brix)	24,7 ± 0,1 a	25,2 ± 0,5 a	24,3 ± 0,1 a	24,5 ± 0,2 a	25,6 ± 0,1 b	24,1 ± 0,1 a
Acidez titulable (g/L)	5,3 ± 0,1 a	5,2 ± 0,2 a	6,7 ± 0,1 b	4,6 ± 0,1 a	5,5 ± 0,2 b	7,9 ± 0,1 c
pH	3,62 ± 0,04 b	3,52 ± 0,02 b	3,31 ± 0,02 a	3,54 ± 0,01 b	3,54 ± 0,02 b	3,28 ± 0,01 a

\* Media ± error estándar ( $n = 3$ ). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre zonas para la misma variedad (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el peso de hollejos y semillas para ambas variedades en las tres zonas estudiadas. Los datos agrupados de las uvas se muestran en

la **Tabla 4**, donde se aplicó un ANOVA multifactorial empleando “zona” y “variedad” como factores. A partir de este análisis, se observó también un efecto significativo del factor “variedad” sobre el peso de bayas, indicando mayores valores para MB comparado con CS. Al utilizar las variables físicas medidas en las uvas para calcular la relación hollejo/pulpa, el cultivar CS mostró una proporción superior [Junín (0,13), Agrelo (0,15), y Gualtallary (0,12)] respecto de MB [(0,09), en las tres zonas]. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en uvas Cabernet Sauvignon de distintas zonas de Mendoza, revelando la posibilidad de obtener mejores relaciones sólido/líquido al momento de la molienda y beneficiando la extracción de los compuestos químicos presentes en el hollejo durante la vinificación (González et al., 2009).

Parámetro	Factor		
	zona	variedad	zona x variedad <sup>b</sup>
	$p_{value}$ <sup>a</sup>		
Peso de 100 bayas (g)	0,0003	< 0,0001	0,0678
Peso de hollejos (g)	0,3373	0,9399	0,1531
Peso de semillas (g)	0,0552	0,0521	0,2712
Sólidos solubles (°Brix)	0,0006	0,8605	0,4040
Acidez titulable (g/L)	< 0,0001	0,0290	0,0001
pH	< 0,0001	0,0841	0,1242

<sup>a</sup> Considerado significativo cuando  $p_{value} < 0,05$ .  
<sup>b</sup> Efecto de interacción entre “zona y variedad”.

Con respecto a la composición química general, el contenido de sólidos solubles de las uvas fue similar para ambas variedades en las distintas zonas (24-25,5 °Brix), con valores levemente superiores en Agrelo, especialmente para CS (**Tabla 3**). Paralelamente, se observaron diferencias significativas en los parámetros restantes determinados en la pulpa. En ambos cultivares, los niveles de acidez obtenidos en Gualtallary fueron mayores al resto de las zonas, coincidente con los bajos valores de pH (**Tabla 3**). Esto podría explicarse por las condiciones climáticas de esta zona, condicionada principalmente por su gran altitud. Según estudios previos (Catania y Avagnina, 1994; González et al., 2009), es considerada una zona más fría que las restantes y se caracteriza por presentar, durante el período de maduración de las bayas, una gran amplitud térmica (> 20 °C) y noches muy frías. Las bajas temperaturas durante el ciclo disminuyen la tasa de catabolismo respiratorio de los ácidos fijos (tartárico y málico), manteniendo este parámetro en niveles altos (Boulton et al., 2002). Por otro lado, al comparar las variedades se observaron niveles significativamente mayores de acidez en CS respecto de MB, indicando también la influencia de la variedad sobre la composición ácida de las bayas (**Tabla 4**).

### 3.2. Composición fenólica de hollejos

#### 3.2.1. Parámetros fenólicos generales

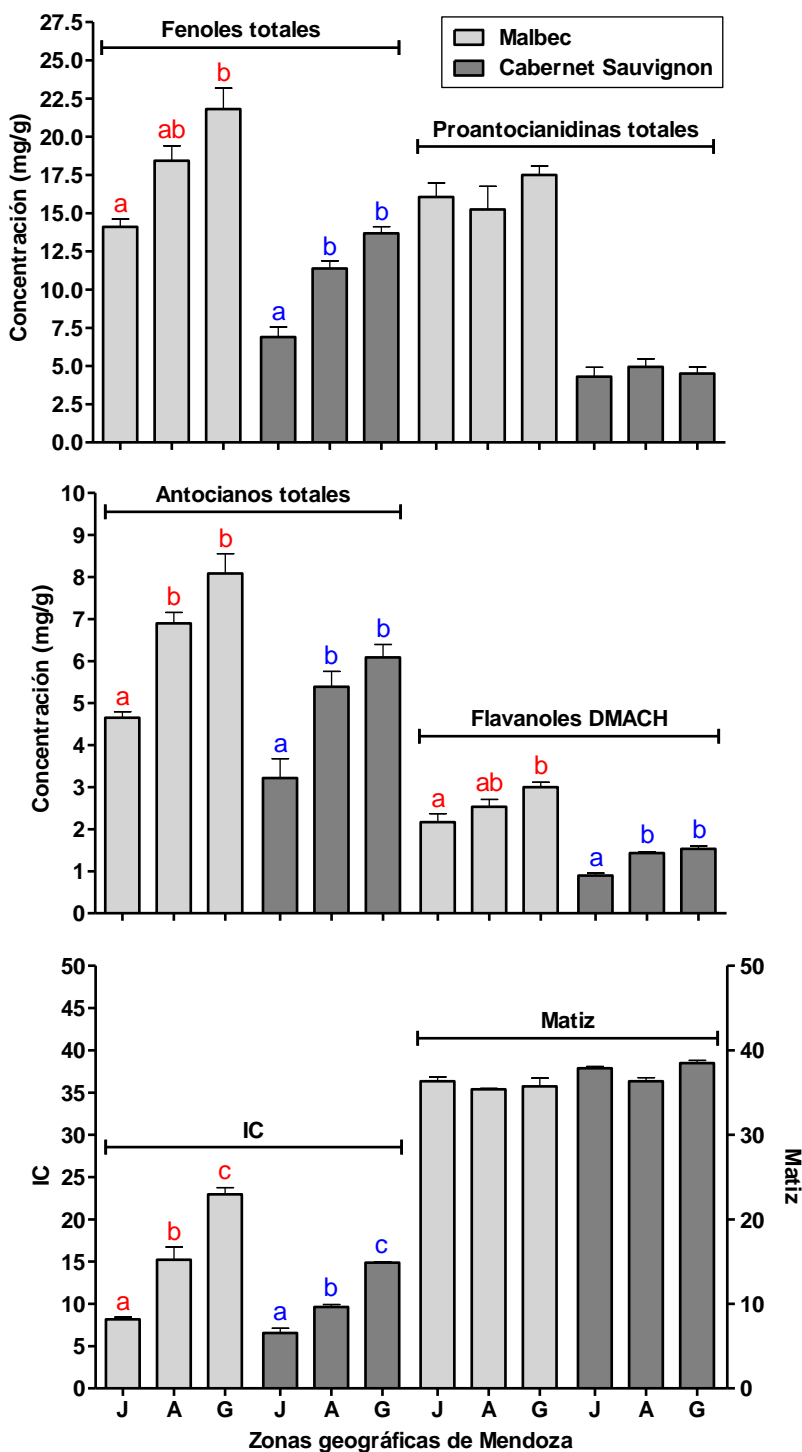
La composición fenólica global de los hollejos provenientes de las uvas MB y CS fue determinada empleando las técnicas espectrofotométricas descritas en el Anexo I. En ambas variedades, se observó una mayor concentración de fenoles totales, antocianos totales, flavanoles DMACH e intensidad colorante a medida que aumenta la altitud del viñedo, con diferencias estadísticamente significativas entre las zonas estudiadas (**Figura 1**). Estos resultados podrían deberse a las diferencias ambientales generadas por la altura (radiación UV-B, radiación PAR, regímenes de temperatura, textura del suelo, etc.), y coinciden con algunos datos publicados por otros autores (Berli et al., 2008) lo cuáles observaron una mayor riqueza fenólica en uvas Malbec cultivadas a 1500 msnm. Por su parte, los bajos niveles de antocianos determinados en las uvas de Junín, indicarían que las elevadas temperaturas de esta zona (> 33 °C, entre enero y marzo) podrían afectar la acumulación de estos compuestos a través de una inhibición de la ruta biosintética conjuntamente con un fenómeno de degradación (Mori et al., 2005 y 2007; Guidoni et al., 2008). Por el contrario, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proantocianidinas entre zonas (**Figura 1**), confirmando el menor impacto de las variaciones de temperatura (entre el día y la noche) sobre la biosíntesis de estos compuestos en hollejos después de envero (Cohen et al., 2008).

**Tabla 5.** Valores de probabilidad de los parámetros fenólicos generales para "zona y variedad de uva". Datos agrupados de Junín, Agrelo y Gualtallary.

Parámetro	Factor		
	zona	variedad	zona x variedad <sup>b</sup>
<i>p</i> <sub>value</sub> <sup>a</sup>			
<b>Hollejos</b>			
Fenoles totales	< 0,0001	< 0,0001	0,7755
Antocianos totales	< 0,0001	0,0001	0,7014
Proantocianidinas totales	0,5109	< 0,0001	0,3158
Flavanoles DMACH	0,0003	< 0,0001	0,3734
Intensidad colorante	< 0,0001	< 0,0001	0,0033
Matiz	0,0498	0,0013	0,2320
<b>Semillas</b>			
Fenoles totales	0,0004	0,0122	0,1960
Proantocianidinas totales	0,0040	0,1396	0,1569
Flavanoles DMACH	0,2713	0,2159	0,0262
<b>Pulpa</b>			
Fenoles totales	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Proantocianidinas totales	0,0006	0,1071	0,0542
Flavanoles DMACH	0,0006	0,4642	0,0002

<sup>a</sup> Considerado significativo cuando *p*<sub>value</sub> < 0,05.

<sup>b</sup> Efecto de interacción entre zona y variedad.



**Figura 1.** Parámetros fenólicos generales determinados en extractos de hollejos de bayas Malbec y Cabernet Sauvignon de distintas zonas de Mendoza (J, Junín; A, Agrelo; G, Gualtallary).

Los datos agrupados de hollejos, semillas y pulpa se muestran en la **Tabla 5**, donde se aplicó un ANOVA multifactorial empleando “zona” y “variedad” como factores. A partir de este análisis, se observó también un efecto significativo del factor “variedad”, indicando mayores niveles de todos los parámetros analizados en hollejos MB comparado con CS. La única excepción se presentó en el

matiz, donde CS mostró registros levemente superiores (**Figura 1**). En general, los resultados obtenidos en este estudio para hollejos MB fueron similares a los observados por Da Silva et al. (2008), en hollejos de esta misma variedad cultivada en Brasil; y superiores a los publicados en otro estudio (Matus et al., 2006), sobre hollejos Malbec de Mendoza. Por su parte, los niveles observados en CS fueron superiores a los reportados por otros autores (Matus et al., 2009; Obreque-Slier et al., 2010), en hollejos de esta variedad cultivada en Chile.

### 3.2.2. Perfil de antocianinas individuales

Los compuestos antociánicos presentes en los hollejos provenientes de las uvas MB y CS fueron identificados y cuantificados empleando la metodología descrita en el Anexo I. Los mismos fueron agrupados de acuerdo a la ausencia o presencia de acilación y compuesto acilante (glucósidos no acilados, acetil-glucósidos y cinamil-glucósidos), y considerando la antocianidina involucrada (delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina). Los glucósidos cinamílicos incluyeron las antocianinas cumarílicas y cafeílicas. Las **Figuras 2 y 3** muestran cromatogramas típicos correspondientes a hollejos MB y CS de las distintas zonas de Mendoza, y la **Tabla 6** resume los resultados cuantitativos obtenidos. Al analizar la composición del Malbec, todos los derivados antociánicos aumentaron con la altitud del viñedo, presentándose diferencias estadísticamente significativas entre las zonas estudiadas. Dado que la síntesis de antocianos ocurre en el retículo endoplasmático de las células como resultado de la actividad de diversas enzimas unidas a él, así como la acilación de estos compuestos ocurre en el citoplasma y vacuolas (Zhao et al., 2010), sería posible inferir una mayor actividad de dichos complejos enzimáticos a medida que aumenta la altitud del viñedo. Esta observación coincide con los niveles de antocianos totales cuantificados por espectrofotometría (**Figura 1**). Por su parte, en el caso del CS se observó la misma tendencia respecto a los compuestos no acilados, presentándose un patrón diferencial en los derivados acetílicos y cinamílicos, con concentraciones significativamente superiores en Agrelo. Las proporciones medias de los grupos antociánicos fueron diferentes entre ambas variedades, pero las relaciones entre los mismos indicaron un patrón característico para cada una de ellas. El grupo de los monoglucósidos representaron la proporción más alta de todas las antocianinas determinadas (69,2% para MB y 63,8% para CS). Por su parte, los derivados acilados mostraron las mayores diferencias entre las variedades. Teniendo en cuenta los derivados acetílicos, los hollejos CS tuvieron la mayor proporción (30,9%) comparado con MB (17,2%); mientras que al evaluar los derivados cinamílicos se observó un comportamiento opuesto (MB 13,6%; CS 5,2%). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el Apartado II.1 (Capítulo II) y en otros estudios realizados por diversos autores (García-Beneytez et al., 2003; Núñez et al., 2004; González-Neves et al., 2007).

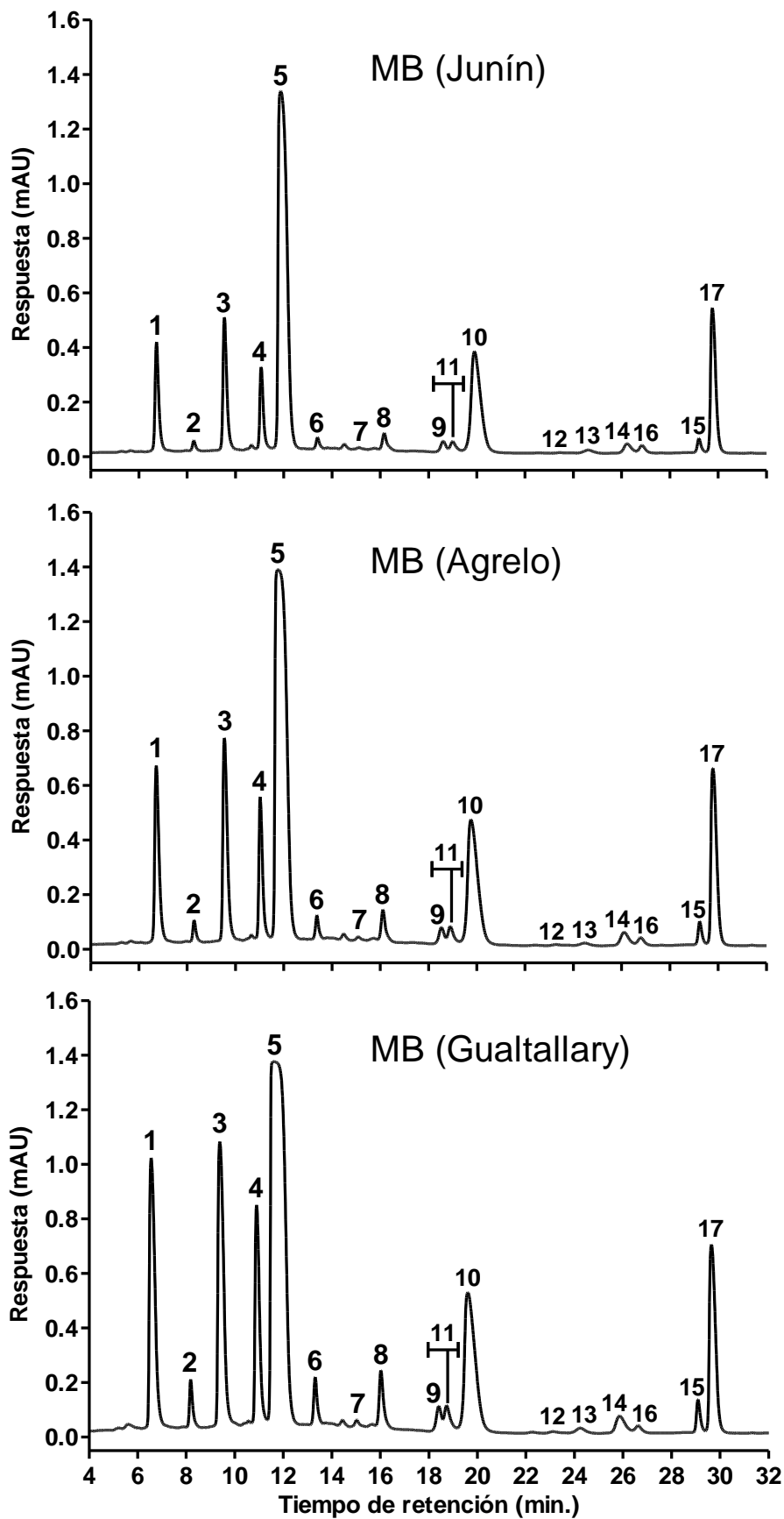
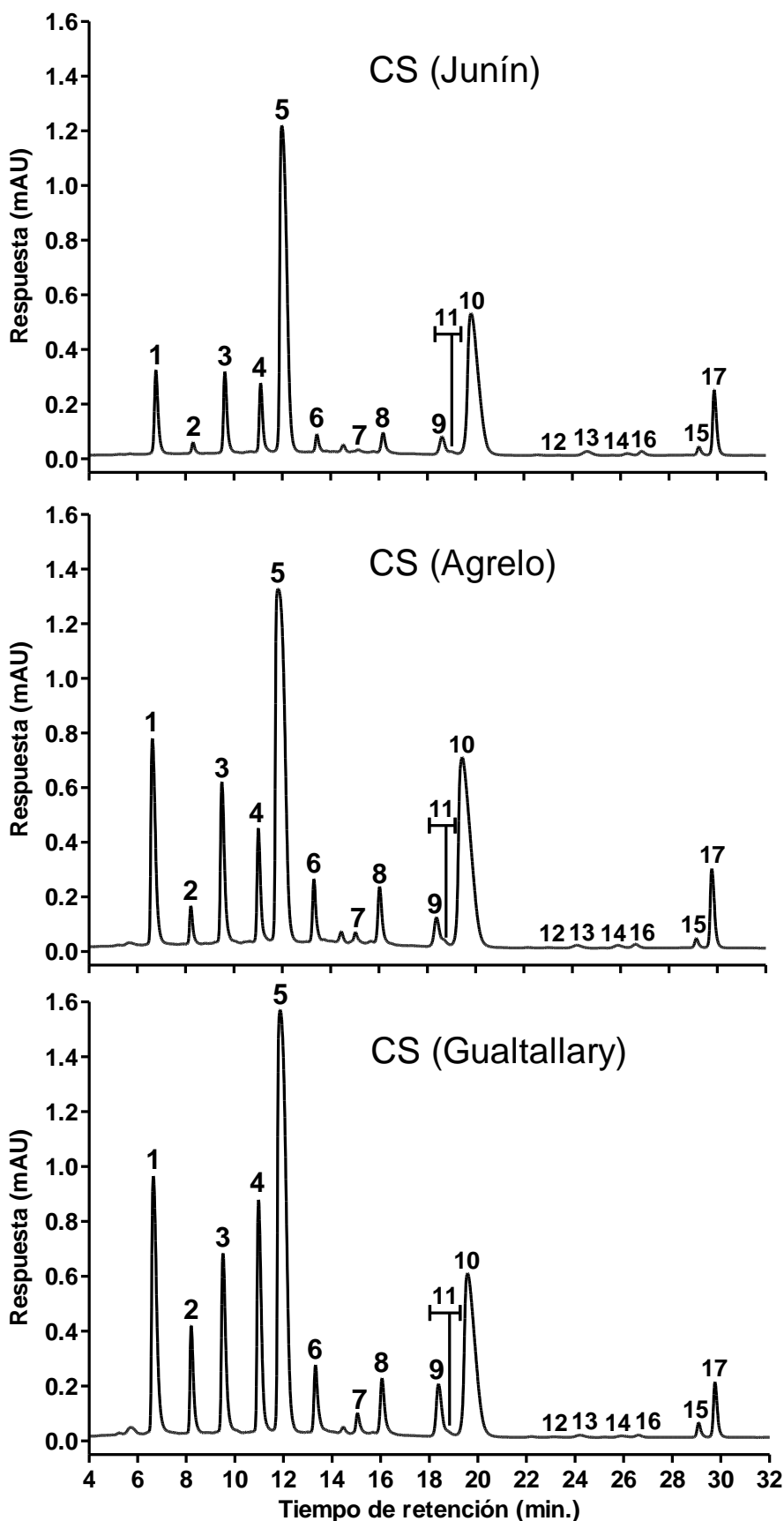


Figura 2. Perfil de antocianinas por HPLC-DAD (520 nm) de extractos de hollejos Malbec de distintas zonas de Mendoza. La identificación de los picos cromatográficos se encuentra en la **Tabla 6**.



**Figura 3.** Perfil de antocianinas por HPLC-DAD (520 nm) de extractos de hollejos Cabernet Sauvignon de distintas zonas de Mendoza. La identificación de los picos cromatográficos se encuentra en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Antocianinas individuales cuantificadas en hollejos de bayas Malbec y Cabernet Sauvignon de distintas zonas de Mendoza.

Pico	Compuesto	Malbec					Cabernet Sauvignon				
		Junín	Agrelo	Gualtallary	Junín	Agrelo	Junín	Agrelo	Gualtallary	Junín	Agrelo
1	Delfinidina-3-glucósido	24,5 ± 5,8 <sup>a</sup>	42,2 ± 6,3 <sup>b</sup>	65,6 ± 24,4 <sup>c</sup>	115,9 ± 13,1 <sup>a</sup>	477,7 ± 47,2 <sup>b</sup>	552,6 ± 18,3 <sup>b</sup>				
2	Cianidina-3-glucósido	26,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	45,8 ± 14 <sup>b</sup>	74,0 ± 10 <sup>c</sup>	18,9 ± 15 <sup>a</sup>	79,7 ± 9,6 <sup>b</sup>	158,9 ± 6,5 <sup>c</sup>				
3	Petunidina-3-glucósido	282,1 ± 6,8 <sup>a</sup>	499,3 ± 4,8 <sup>b</sup>	678,1 ± 24,2 <sup>c</sup>	12,3 ± 9,1 <sup>a</sup>	325,5 ± 18,4 <sup>b</sup>	352,8 ± 9,2 <sup>b</sup>				
4	Peonidina-3-glucósido	176,2 ± 4,7 <sup>a</sup>	272,9 ± 17,5 <sup>b</sup>	398,9 ± 5,5 <sup>c</sup>	104,9 ± 5,1 <sup>a</sup>	244,9 ± 28,8 <sup>b</sup>	419,0 ± 12,6 <sup>c</sup>				
5	Malvidina-3-glucósido	1713,8 ± 28,5 <sup>a</sup>	2165,1 ± 166,8 <sup>ab</sup>	2295,2 ± 70,2 <sup>b</sup>	896,1 ± 40,7 <sup>a</sup>	1499,0 ± 48,6 <sup>b</sup>	1517,1 ± 44,4 <sup>b</sup>				
	<b>Antocianinas glucosiladas</b>	2413,1 ± 44,0 <sup>a</sup> (67,3)	3395,3 ± 179,3 <sup>b</sup> (68,6)	40618 ± 125,4 <sup>c</sup> (718)	1248,1 ± 69,0 <sup>a</sup> (58,9)	2626,8 ± 147,1 <sup>b</sup> (63,3)	3000,4 ± 87,2 <sup>b</sup> (69,2)				
6	Delfinidina-3-(6"-acetil)glucósido	38,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	69,4 ± 1,7 <sup>b</sup>	96,7 ± 5,3 <sup>c</sup>	30,6 ± 3,3 <sup>a</sup>	129,1 ± 10,1 <sup>b</sup>	140,8 ± 6,8 <sup>b</sup>				
7	Cianidina-3-(6"-acetil)glucósido	22,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	35,1 ± 1,2 <sup>b</sup>	35,0 ± 1,6 <sup>b</sup>	15,8 ± 1,0 <sup>a</sup>	43,6 ± 4,2 <sup>b</sup>	51,1 ± 0,9 <sup>b</sup>				
8	Petunidina-3-(6"-acetil)glucósido	57,6 ± 1,4 <sup>a</sup>	98,7 ± 3,4 <sup>b</sup>	119,8 ± 4,6 <sup>c</sup>	44,8 ± 3,9 <sup>a</sup>	135,2 ± 5,5 <sup>b</sup>	128,1 ± 2,9 <sup>b</sup>				
9	Peonidina-3-(6"-acetil)glucósido	33,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	43,9 ± 3,9 <sup>b</sup>	47,7 ± 1,5 <sup>b</sup>	39,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	77,6 ± 8,1 <sup>b</sup>	109,5 ± 3,2 <sup>c</sup>				
10	Malvidina-3-(6"-acetil)glucósido	491,7 ± 12,9 <sup>a</sup>	619,3 ± 42,0 <sup>a</sup>	603,8 ± 31,7 <sup>a</sup>	588,4 ± 28,2 <sup>a</sup>	936,5 ± 24,6 <sup>c</sup>	745,0 ± 16,9 <sup>b</sup>				
	<b>Antocianinas acetiladas</b>	643,3 ± 14,8 <sup>a</sup> (18,0)	866,4 ± 42,2 <sup>b</sup> (17,5)	903,0 ± 44,7 <sup>b</sup> (16,0)	719,4 ± 36,7 <sup>a</sup> (34,0)	1322,0 ± 29,5 <sup>c</sup> (318)	1174,5 ± 26,2 <sup>b</sup> (27,1)				
11	Delfinidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	36,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	55,8 ± 3,4 <sup>b</sup>	66,5 ± 4,8 <sup>b</sup>	7,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	18,8 ± 1,0 <sup>b</sup>	18,6 ± 0,7 <sup>b</sup>				
12	Cianidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	2,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,5 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>b</sup>				
13	Malvidina-3-(6"-cafeil)glucósido	14,2 ± 0,9 <sup>a</sup>	15,1 ± 1,3 <sup>a</sup>	21,0 ± 1,6 <sup>b</sup>	14,1 ± 1,1 <sup>b</sup>	8,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	8,9 ± 0,1 <sup>a</sup>				
14	Petunidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	36,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	56,0 ± 4,0 <sup>b</sup>	65,9 ± 4,3 <sup>b</sup>	4,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	10,9 ± 0,7 <sup>b</sup>	6,9 ± 0,5 <sup>a</sup>				
15	Peonidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	31,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	42,9 ± 3,5 <sup>ab</sup>	50,8 ± 3,3 <sup>b</sup>	12,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	18,5 ± 1,8 <sup>ab</sup>	22,9 ± 1,0 <sup>b</sup>				
16	Malvidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido <i>cis</i>	25,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	25,9 ± 2,6 <sup>a</sup>	20,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	9,5 ± 0,5 <sup>b</sup>	10,3 ± 0,5 <sup>b</sup>	6,5 ± 0,3 <sup>a</sup>				
17	Malvidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido <i>trans</i>	382,1 ± 2,7 <sup>a</sup>	488,1 ± 36,0 <sup>a</sup>	456,8 ± 29,2 <sup>a</sup>	100,1 ± 8,8 <sup>a</sup>	133,5 ± 4,5 <sup>b</sup>	92,0 ± 3,3 <sup>a</sup>				
	<b>Antocianinas cumariladas</b>	512,6 ± 3,9 <sup>a</sup> (14,3)	672,5 ± 49,1 <sup>b</sup> (13,6)	667,8 ± 43,1 <sup>b</sup> (11,8)	135,4 ± 11,6 <sup>a</sup> (6,4)	194,9 ± 6,9 <sup>b</sup> (4,7)	149,7 ± 5,1 <sup>a</sup> (3,5)				
	<b>Antocianinas cinamiladas</b>	526,8 ± 3,2 <sup>a</sup> (14,7)	687,6 ± 48,5 <sup>b</sup> (13,9)	688,8 ± 44,7 <sup>b</sup> (12,2)	149,5 ± 10,8 <sup>a</sup> (7,1)	203,7 ± 6,5 <sup>b</sup> (4,9)	158,6 ± 5,1 <sup>a</sup> (3,7)				
	<b>Antocianinas totales</b>	3583,2 ± 43,3 <sup>a</sup>	4949,3 ± 266,7 <sup>b</sup>	5653,6 ± 214,8 <sup>b</sup>	2117,0 ± 110,6 <sup>a</sup>	4152,5 ± 173,5 <sup>b</sup>	4333,5 ± 116,1 <sup>b</sup>				
	$\Sigma$ glucosiladas / $\Sigma$ acetiladas	3,8	3,9	4,5	1,7	2,0	2,6				
	$\Sigma$ glucosiladas / $\Sigma$ cumariladas	4,7	5,1	6,1	9,2	13,5	20,0				
	$\Sigma$ cumariladas / $\Sigma$ acetiladas	0,8	0,8	0,7	0,2	0,1	0,1				
	$\Sigma$ acetiladas / $\Sigma$ cumariladas	1,3	1,3	1,4	5,3	6,8	7,8				

\* Media (mg/kg de hollejos) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre zonas para la misma variedad (Tukey HSD, p < 0,05). Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre derivados antocianínicos por acilación y antocianinas totales.



Paralelamente, se calcularon las relaciones entre los distintos derivados antociánicos. De particular interés resultó la relación  $\Sigma$ acetiladas /  $\Sigma$ cumariladas, propuesta por algunos autores para la verificación de autenticidad varietal en cepajes tintos (Otteneder et al., 2004), obteniéndose valores significativamente diferentes para MB (1,3) y CS (6,6). Adicionalmente, los valores medios obtenidos para las relaciones  $\Sigma$ glucosiladas /  $\Sigma$ acetiladas y  $\Sigma$ glucosiladas /  $\Sigma$ cumariladas en los hollejos MB fueron 4,1 y 5,3; y en CS, 2,1 y 14,2 (**Tabla 6**).

En términos del perfil basado en las diferentes antocianidinas, los derivados de la malvidina constituyeron los compuestos más abundantes en todas las muestras analizadas (MB 60,1-73,3%; CS 54,7-76%), mientras que los derivados de la cianidina mostraron la menor proporción (MB 1,4-2,1%; CS 1,7-4,9%). La distribución del resto de los compuestos en ambas variedades reveló un patrón similar al observado en el Apartado II.1 (Capítulo II) y en otros estudios previos (Núñez et al., 2004; Berli et al., 2011).

<b>Tabla 7.</b> Valores de probabilidad de compuestos fenólicos para "zona y variedad de uva". Datos agrupados de Junín, Agrelo y Gualtallary.			
Compuesto	Factor		
	zona	variedad	zona x variedad <sup>b</sup>
	<i>p</i> value <sup>a</sup>		
<b>Hollejos</b>			
Antocianinas glucosiladas	< 0,0001	< 0,0001	0,2594
Antocianinas acetiladas	< 0,0001	< 0,0001	0,0005
Antocianinas cinamiladas	0,0050	< 0,0001	0,0452
Delfinidinas	< 0,0001	0,1479	0,0085
Cianidinas	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Petunidinas	< 0,0001	< 0,0001	0,0005
Peonidinas	< 0,0001	0,3721	0,0208
Malvidinas	< 0,0001	< 0,0001	0,4035
<i>Antocianinas totales</i>	< 0,0001	< 0,0001	0,1624
Acidos hidroxibenzoicos/derivados	0,0806	< 0,0001	0,1036
Acidos hidroxicinámicos/derivados	0,0045	< 0,0001	0,1888
Estilbenos	0,0001	< 0,0001	0,0027
Flavanoles	0,0500	< 0,0001	0,7072
Flavonoles	0,4752	0,0951	0,0430
Dihidroflavonoles	0,7548	< 0,0001	0,8118
<i>Fenoles no-antociánicos totales</i>	0,4529	< 0,0001	0,5138
<b>Semillas</b>			
Fenoles no-antociánicos totales	< 0,0001	< 0,0001	0,0002
<b>Pulpa</b>			
Fenoles no-antociánicos totales	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<sup>a</sup> Considerado significativo cuando <i>p</i> value < 0,05.			
<sup>b</sup> Efecto de interacción entre zona y variedad.			

De acuerdo a estos resultados, y conjuntamente con los datos agrupados presentados en la **Tabla 7**, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en la composición antociánica de las variedades estudiadas, sugiriendo la influencia del cultivar sobre la actividad enzimática involucrada en su biosíntesis y en las reacciones que conducen a la acilación de estos compuestos (Castellarin y Di Gaspero, 2007a). Finalmente, se observó que la concentración total de antocianinas fue significativamente superior en la variedad Malbec indicando, junto al resto de los parámetros fenólicos evaluados (**Figura 1**), un gran potencial para la producción de vinos con coloraciones intensas y estables en el tiempo.

### 3.2.3. Perfil de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

Los compuestos fenólicos no-antociánicos presentes en los hollejos provenientes de las uvas MB y CS fueron identificados y cuantificados empleando la metodología descrita en el Anexo I. Los mismos fueron agrupados en no-flavonoides (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y estilbenos) y flavonoides (flavanoles, flavonoles y dihidroflavonoles). La **Figura 4** muestra los cromatogramas típicos correspondientes a hollejos MB y CS. La concentración de los distintos compuestos, individualmente y agrupados, y las proporciones relativas de cada grupo en las muestras analizadas se presentan en la **Tabla 8**. Los flavonoides constituyeron la fracción más abundante (media, 96,3% en MB y 96,5% en CS) comparada con los no-flavonoides (media, 3,7% en MB y 3,5% en CS), en concordancia con lo reportado en el Apartado II.1 (Capítulo II) y en otros estudios (Peña-Neira et al., 2004; Monagas et al., 2005a; Obreque-Slier et al., 2010). Coincidente con los resultados observados en los parámetros fenólicos descritos anteriormente (parámetros generales y antocianinas individuales), se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre variedades para la mayor parte de los compuestos determinados (**Tabla 7**). En general, los hollejos MB presentaron una mayor concentración de fenoles no-antociánicos (1784,7-2039,1 mg/kg), indicando su riqueza fenólica comparado con CS (879,8-1001,4 mg/kg).

Con respecto a los no-flavonoides cuantificados en ambas variedades, no se observó una influencia significativa de la zona geográfica sobre el contenido de ácidos fenólicos. Por el contrario, el nivel de glucósido de *trans*-resveratrol en las muestras analizadas mostró una tendencia creciente hacia las zonas de mayor altitud, con concentraciones significativamente superiores en MB (**Tablas 7 y 8**). Estas diferencias parecen indicar un posible efecto de la variedad de uva y de las condiciones medioambientales sobre estos compuestos (Vitrac et al., 2002; Bavaresco et al., 2007; Perrone et al., 2007; Moreno et al., 2008). Cabe destacar la elevada concentración observada en hollejos MB de Gualtallary ( $20,7 \pm 0,2$  mg/kg), lo cual podría deberse a la alta exposición de las bayas a la radiación UV en esta zona (Berli et al., 2008), y coincide con los niveles obtenidos en otro estudio conducido sobre uvas Malbec en la misma localidad durante la vendimia 2009 (Apartado II.2, Capítulo II).

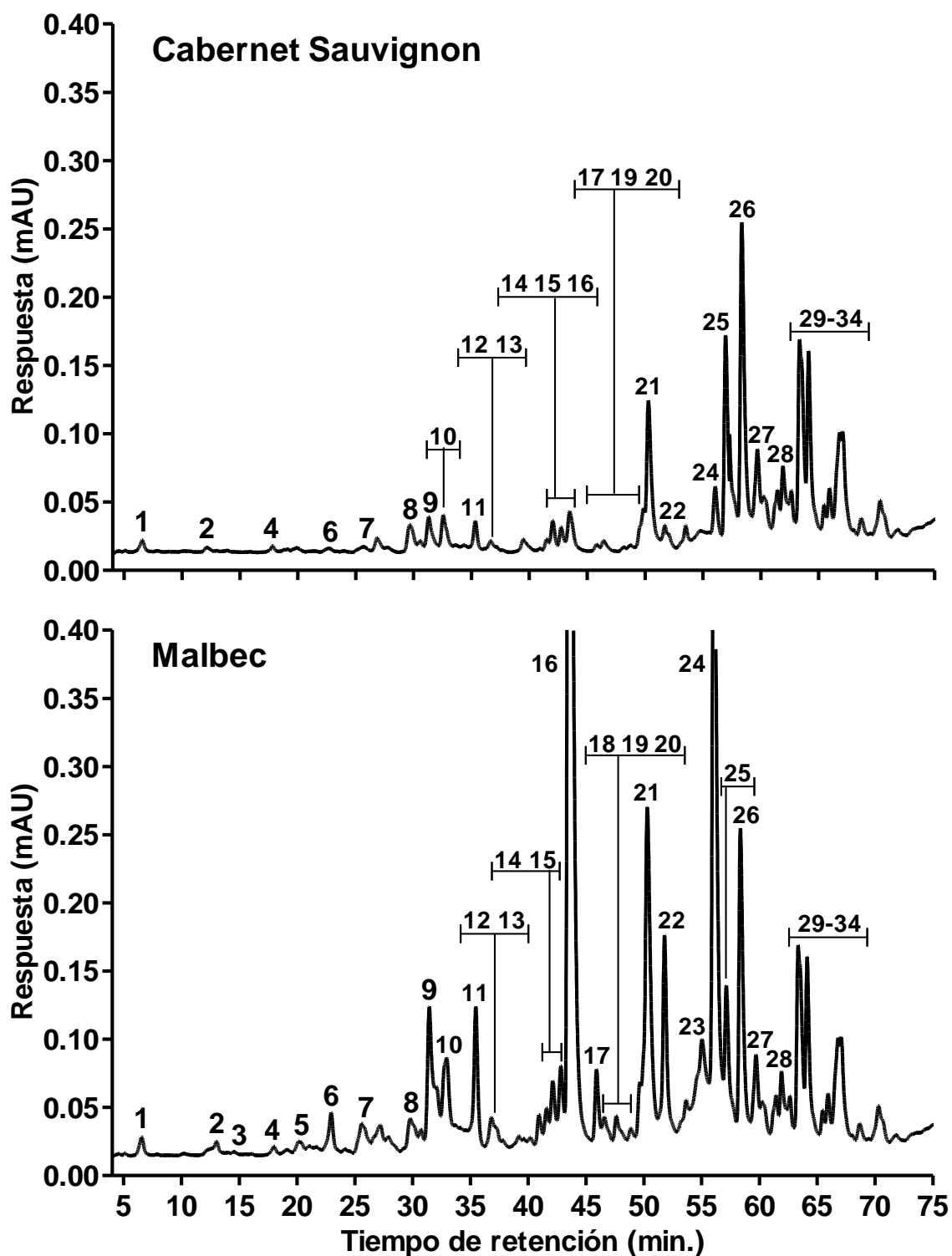


Figura 4. Perfil de fenoles de bajo peso molecular por HPLC-DAD (280 nm) de extractos de hollejos Malbec y Cabernet Sauvignon de Mendoza. La identificación de los picos cromatográficos se encuentra en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Compuestos fenólicos de bajo peso molecular cuantificados en hollejos de bayas Malbec y Cabernet Sauvignon de distintas zonas de Mendoza.

Pico	Compuesto	Malbec			Cabernet Sauvignon		
		Junín	Agrelo	Gualtallary	Junín	Agrelo	Gualtallary
<b>No-flavonoides</b>							
1	Acido gálico	0,83 ± 0,03* a	1,20 ± 0,06 ab	1,47 ± 0,18 b	0,77 ± 0,09 a	1,10 ± 0,06 b	1,10 ± 0,06 b
2	Acido protocatéuico	0,8 ± 0,1 a	1,0 ± 0,1 a	0,7 ± 0,1 a	0,5 ± 0,1 a	0,6 ± 0,1 ab	0,9 ± 0,1 b
11	Acido siríngico	9,2 ± 1,3 a	15,7 ± 1,6 b	14,7 ± 0,3 b	6,4 ± 0,5 b	4,6 ± 0,4 a	5,0 ± 0,1 ab
4	Galato de metilo	4,2 ± 0,2 a	4,1 ± 0,3 a	4,0 ± 0,4 a	3,6 ± 0,4 a	4,0 ± 0,3 a	3,9 ± 0,1 a
12	Galato de etilo	6,3 ± 0,4 a	6,9 ± 0,8 a	7,2 ± 0,8 a	4,0 ± 0,4 a	5,0 ± 0,4 a	5,0 ± 0,2 a
<b>Acidos hidroxibenzoicos/derivados</b>		21,3 ± 2,0 a (1,2)	28,9 ± 2,8 a (1,5)	28,1 ± 1,6 a (1,4)	15,3 ± 1,1 a (1,7)	15,3 ± 1,1 a (1,5)	15,9 ± 0,6 a (1,8)
3	Acido <i>trans</i> -caftárico	3,3 ± 0,1 a	3,4 ± 0,4 a	3,1 ± 0,2 a	nd	nd	nd
5	Acido <i>trans</i> -cutárico	3,3 ± 0,1 a	4,3 ± 0,3 b	4,1 ± 0,2 ab	nd	nd	nd
8	Acido <i>trans</i> -cafeico	6,0 ± 0,3 a	7,3 ± 0,2 a	7,4 ± 0,5 a	5,2 ± 0,4 a	6,4 ± 0,4 a	6,5 ± 0,2 a
14	Acido <i>trans</i> - <i>p</i> -cumárico	3,1 ± 0,5 a	3,6 ± 0,2 ab	4,7 ± 0,2 b	nd	2,2 ± 0,2 a	3,1 ± 0,4 a
9	Acido fenólico no identificado	9,5 ± 1,0 a	15,0 ± 1,9 b	13,9 ± 0,4 ab	7,6 ± 0,5 a	6,8 ± 0,6 a	6,8 ± 0,2 a
<b>Acidos hidroxicinnámicos/derivados</b>		25,2 ± 1,9 a (1,4)	33,6 ± 2,7 a (1,7)	33,2 ± 1,0 a (1,6)	12,8 ± 0,8 a (1,4)	15,4 ± 1,2 a (1,5)	16,4 ± 0,7 a (1,9)
22	Glucósido de <i>trans</i> -resveratrol	8,4 ± 1,0 a (0,5)	14,6 ± 1,8 b (0,7)	20,7 ± 0,2 c (1,0)	nd	3,0 ± 0,2 a (0,3)	4,5 ± 0,3 b (0,5)
<b>No-flavonoides totales</b>		54,9 ± 4,9 a (3,1)	77,1 ± 7,3 ab (3,9)	82,0 ± 2,4 b (4,0)	28,1 ± 2,0 a (3,1)	33,7 ± 2,4 ab (3,3)	36,8 ± 1,4 b (4,2)

\* Media (mg/kg de hollejos) ± error estándar ( $n = 3$ ). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre zonas para la misma variedad (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ). Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre los distintos grupos fenólicos y fenoles totales. nd, no detectado.

Pico	Compuesto	Malbec			Cabernet Sauvignon			
		Junín		Guatallary	Junín		Agrelo	Guatallary
		Agrelo	Junín	Agrelo	Agrelo	Junín	Agrelo	
<b>Flavonoides</b>								
7	(+)-Catequina	16,7 ± 1,9* a	25,7 ± 2,9 ab	32,5 ± 2,1 b	4,1 ± 0,4 a	8,4 ± 1,1 b	7,8 ± 0,6 b	
13	(-)-Epicatequina	11,2 ± 1,7 a	17,0 ± 2,0 a	17,4 ± 2,0 a	2,9 ± 0,3 a	3,8 ± 0,4 a	4,3 ± 0,3 a	
6	Dímero de procianidina 1	15,7 ± 2,2 a	24,5 ± 0,6 ab	30,5 ± 3,8 b	2,0 ± 0,2 a	5,4 ± 0,2 b	4,9 ± 0,4 b	
10	Dímero de procianidina 2	72,9 ± 6,6 a	83,4 ± 9,3 a	55,5 ± 4,5 a	23,4 ± 1,9 a	41,6 ± 4,5 b	28,2 ± 1,4 a	
15	Trímero de procianidina 1	25,8 ± 2,3 a	39,5 ± 2,6 b	43,4 ± 3,3 b	9,0 ± 1,2 a	12,1 ± 1,5 ab	14,3 ± 0,7 b	
17	Trímero de procianidina 2	32,3 ± 2,9 a	34,9 ± 3,6 a	43,5 ± 4,6 a	3,1 ± 0,5 a	7,2 ± 0,6 b	11,3 ± 0,8 c	
29	Trímero de procianidina 3	51,8 ± 4,4 a	48,7 ± 2,9 a	59,7 ± 5,8 a	25,2 ± 2,4 a	22,2 ± 1,8 a	27,0 ± 2,3 a	
<b>Flavonoles</b>		226,4 ± 20,7 a (12,7)	273,7 ± 23,4 a (13,9)	282,5 ± 24,4 a (13,8)	69,7 ± 6,7 a (7,7)	100,7 ± 8,9 b (10,0)	97,8 ± 3,6 ab (11,1)	
19	Miricetina-3-glucuronido	21,8 ± 2,1 a	22,5 ± 2,5 a	21,6 ± 2,0 a	14,7 ± 0,8 a	18,2 ± 1,5 a	16,5 ± 0,8 a	
20	Miricetina-3-galactósido	27,9 ± 3,0 a	29,4 ± 2,1 a	28,9 ± 2,2 a	21,9 ± 2,1 a	27,6 ± 2,1 ab	30,5 ± 1,3 b	
21	Miricetina-3-glucósido	135,5 ± 13,7 a	142,9 ± 15,7 a	148,2 ± 12,5 a	85,4 ± 9,2 a	116,9 ± 4,1 b	79,7 ± 3,7 a	
23	Kaempferol-3-galactósido	173,3 ± 11,7 a	209,8 ± 12,7 ab	256,1 ± 16,1 b	nd	nd	nd	
25	Quercetina-3-glucuronido	66,3 ± 8,5 a	52,4 ± 7,3 a	68,9 ± 5,0 a	109,7 ± 5,9 b	117,2 ± 7,9 b	80,6 ± 2,7 a	
26	Quercetina-3-galactósido	74,5 ± 9,7 a	70,0 ± 3,6 a	103,5 ± 11,5 a	218,5 ± 6,3 a	215,5 ± 15,8 a	172,4 ± 7,3 a	
27	Quercetina-3-glucósido	28,7 ± 3,2 a	32,2 ± 3,5 a	26,4 ± 1,7 a	33,4 ± 2,0 b	34,3 ± 1,1 b	24,6 ± 1,0 a	
32	Quercetina-3-ramnósido	29,7 ± 1,7 a	28,7 ± 1,9 a	26,7 ± 1,7 a	69,8 ± 5,0 a	60,7 ± 4,0 a	57,2 ± 3,9 a	
28	Isoramnetina-3-glucósido	10,8 ± 1,4 a	20,7 ± 1,3 a	33,0 ± 3,5 b	21,9 ± 2,1 a	23,8 ± 1,5 a	21,8 ± 1,6 a	
30	Laricitrina-3-galactósido	25,3 ± 2,7 a	43,8 ± 4,3 b	42,3 ± 1,1 b	11,7 ± 1,1 a	12,1 ± 1,1 a	15,0 ± 1,2 a	
31	Laricitrina-3-glucósido	34,2 ± 4,5 a	41,7 ± 3,5 ab	57,6 ± 6,1 b	85,5 ± 2,5 a	90,7 ± 6,0 a	85,4 ± 6,8 a	
34	Siringetina-3-glucósido	54,8 ± 4,8 a	59,8 ± 5,1 a	71,3 ± 6,3 a	28,8 ± 3,7 a	30,5 ± 2,3 a	35,5 ± 2,0 a	
33	Naringenina	39,8 ± 3,7 a	38,4 ± 3,2 a	27,9 ± 1,8 a	43,1 ± 3,8 a	40,9 ± 2,6 a	46,9 ± 2,7 a	
<b>Flavonoles</b>		722,6 ± 65,1 a (40,5)	792,3 ± 63,8 a (40,3)	912,4 ± 58,5 a (44,8)	744,4 ± 28,6 a (82,9)	788,4 ± 47,1 a (78,8)	666,1 ± 33,7 a (75,7)	
18	Dihidroquercetina-3-ramnósido	35,8 ± 3,0 a	36,3 ± 3,6 a	33,5 ± 2,9 a	nd	nd	nd	
24	Dihidrokaempferol-3-glucósido	243,4 ± 24,2 a	244,0 ± 21,9 a	263,5 ± 24,7 a	31,8 ± 3,4 a	47,1 ± 4,0 b	44,3 ± 2,2 ab	
16	Dihidroquercetina-3-glucósido	501,6 ± 44,7 a	547,0 ± 53,7 a	465,2 ± 36,9 a	24,3 ± 1,7 a	31,7 ± 1,6 b	35,1 ± 1,0 b	
<b>Diidroflavonoles</b>		780,8 ± 71,9 a (43,7)	827,3 ± 79,2 a (41,9)	762,2 ± 64,3 a (37,3)	56,1 ± 4,9 a (6,2)	78,8 ± 4,8 b (7,9)	79,4 ± 3,2 b (9,0)	
<b>Flavonoides totales</b>		1729,8 ± 157,5 a (96,9)	1893,3 ± 165,5 a (96,1)	1957,1 ± 140,2 a (96,0)	870,5 ± 39,5 a (96,9)	967,7 ± 59,7 a (96,7)	843,0 ± 39,5 a (95,8)	
<b>Fenoles no-antocianínicos totales</b>		1784,7 ± 162,3 a	1970,4 ± 172,7 a	2039,1 ± 142,5 a	898,6 ± 41,4 a	1001,4 ± 61,8 a	879,8 ± 40,9 a	

\* Media (mg/kg de hollejos) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre zonas para la misma variedad (Tukey HSD, p<0,05). Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre los distintos grupos fenólicos y fenoles totales. nd, no detectado.

Al analizar el grupo de los flavanoles, sólo los hollejos CS mostraron un contenido diferencial según la zona de procedencia con niveles superiores en Agrelo (**Tabla 8**), coincidiendo con los resultados obtenidos en otros parámetros evaluados (proantocianidinas totales y antocianinas aciladas). Comparando ambos cultivares, los hollejos MB presentaron concentraciones significativamente superiores de todos los compuestos identificados, independientemente de la zona de estudio (**Tablas 7 y 8**). El principal monómero cuantificado fue (+)-catequina (16,7-32,5 mg/kg en MB y 4,1-8,4 mg/kg en CS) seguido por (-)-epicatequina (11,2-17,4 mg/kg en MB y 2,9-4,3 mg/kg en CS). Considerando que la relación (+)-catequina/(-)-epicatequina fue variable entre las muestras de cada variedad para las distintas zonas estudiadas (1,5-1,9 en MB y 1,4-2,2 en CS) es posible sugerir la influencia de las condiciones ambientales sobre la biosíntesis de estos compuestos y una mayor actividad de la enzima leucoantocianidina reductasa en ambos cultivares, coincidiendo con lo reportado en el Apartado II.1 (Capítulo II) y en otros estudios (Rodríguez Montealegre et al., 2006). Por otro lado, los altos niveles de dímeros y trímeros de procianidina encontrados en hollejos MB, junto al elevado contenido de antocianinas observado en esta variedad, revelan su capacidad para producir vinos de alta calidad con potencial para un envejecimiento adecuado, debido a la posibilidad de estabilización del color a través de reacciones de copigmentación y condensación (Escribano-Bailón et al., 2001).

Los flavonoles representaron el grupo fenólico más abundante determinado en hollejos CS (75,7-82,9%), mientras que en MB compartieron una proporción similar con los dihidroflavonoles (40,3-44,8%). El contenido total en las muestras analizadas estuvo comprendido entre 722,6 y 912,4 mg/kg de hollejos para MB, y entre 666,1 y 788,4 mg/kg de hollejos para CS, sin encontrarse diferencias significativas entre zonas para cada variedad estudiada (**Tabla 8**). Estos valores elevados para ambas variedades podrían ser explicados por las condiciones ambientales de Mendoza, principalmente la alta intensidad de luz solar durante el período de maduración de las bayas, lo cual parece estar asociado a una mayor acumulación de flavonoles (Downey et al., 2004; Makris et al., 2006a). Al comparar las variedades, si bien no existieron diferencias significativas en el contenido total, se observaron, por el contrario, perfiles diferenciales entre las mismas (**Tablas 7 y 8**). En hollejos MB, el principal compuesto fue kaempferol (media 26,3%), seguido por quercetina (25,1%), miricetina (23,8%), laricitrina (10,0%), siringetina (7,7%), naringenina (4,5%) e isoramnetina (2,6%); mientras que en CS, no se detectó kaempferol y el flavonol predominante fue quercetina (54,2%), seguido por miricetina (18,7%), laricitrina (13,7%), naringenina (6,0%), siringetina (4,3%) e isoramnetina (3,1%). Esta variación observada en la proporción de cada compuesto indicaría la influencia del cultivar en la actividad enzimática (flavonol sintasa y/o metiltransferasa) involucrada en la biosíntesis de flavonoles (Mattivi et al., 2006). Por otro lado, la mayor parte de estos compuestos se encontraron bajo la forma glicosilada, apreciándose entre variedades una selectividad

diferencial por parte de las enzimas glicosil-tranferasas sobre el sustrato utilizado en el proceso biosintético. Los hollejos MB se caracterizaron por presentar mayor proporción de galactósidos (media 44,5%), mientras que en CS predominaron los derivados glucosilados (media 36,3%). Por último, con respecto a los flavonoles-3-glucurónidos ambos cultivares mostraron niveles similares.

Completando los flavonoides identificados, es importante destacar la presencia de dihidroflavonoles en las bayas analizadas. Estos compuestos desempeñan un rol funcional en las plantas, actuando como mecanismo de defensa ante el ataque de hongos como *Botritis* (astilbina o dihidroquercetina-3-ramnósido), y son considerados también compuestos bioactivos capaces de promover efectos fisiológicos benéficos (antioxidantes, antimicrobianos, antibacteriales, hepatoprotectivos, quimiopreventivos, entre otros) en humanos (Vitrac et al., 2001; Landrault et al., 2002). Según la literatura, son considerados compuestos minoritarios y han sido reportados principalmente en variedades de uva blanca (Masa et al., 2007; Masa y Vilanova, 2008; Vilanova et al., 2009), y en vinos blancos y tintos (Baderschneider y Winterhalter, 2001; Landrault et al., 2002; Vitrac et al., 2002; Pozo-Bayón et al., 2003; Jeffery et al., 2008). En el presente estudio, los dihidroflavonoles caracterizados por HPLC-DAD/ESI-MS e información espectral fueron dihidroquercetina-3-glucósido, dihidrokaempferol-3-glucósido y dihidroquercetina-3-ramnósido (**Tabla 9**). En hollejos MB se detectaron los tres compuestos, mientras que en CS sólo los dos primeros. El contenido total en las muestras analizadas estuvo comprendido entre 762,2 y 827,3 mg/kg de hollejos para MB, y entre 56,1 y 79,4 mg/kg de hollejos para CS, observándose diferencias significativas entre variedades (**Tablas 7 y 8**). Analizando la influencia de la zona de procedencia, sólo en el caso de CS se observó una tendencia significativa creciente hacia las zonas de mayor altitud (**Tabla 8**). En las muestras MB de las distintas zonas evaluadas, la dihidroquercetina-3-glucósido fue el compuesto mayoritario representando entre el 22,8 y 28,1% de la totalidad de fenoles de bajo peso molecular cuantificados, mientras que en CS sólo representó entre el 2,1 y el 4,0%. Los altos niveles de dihidroflavonoles encontrados en Malbec coinciden con otros estudios realizados en el marco del presente trabajo de Tesis Doctoral, sobre uvas y vinos del mismo cultivar, y podrían indicar un rasgo taxonómico distintivo de esta variedad.

**Tabla 9.** Dihidroflavonoles identificados por HPLC-DAD/ESI-MS en hollejos de bayas Malbec y Cabernet Sauvignon de distintas zonas de Mendoza.

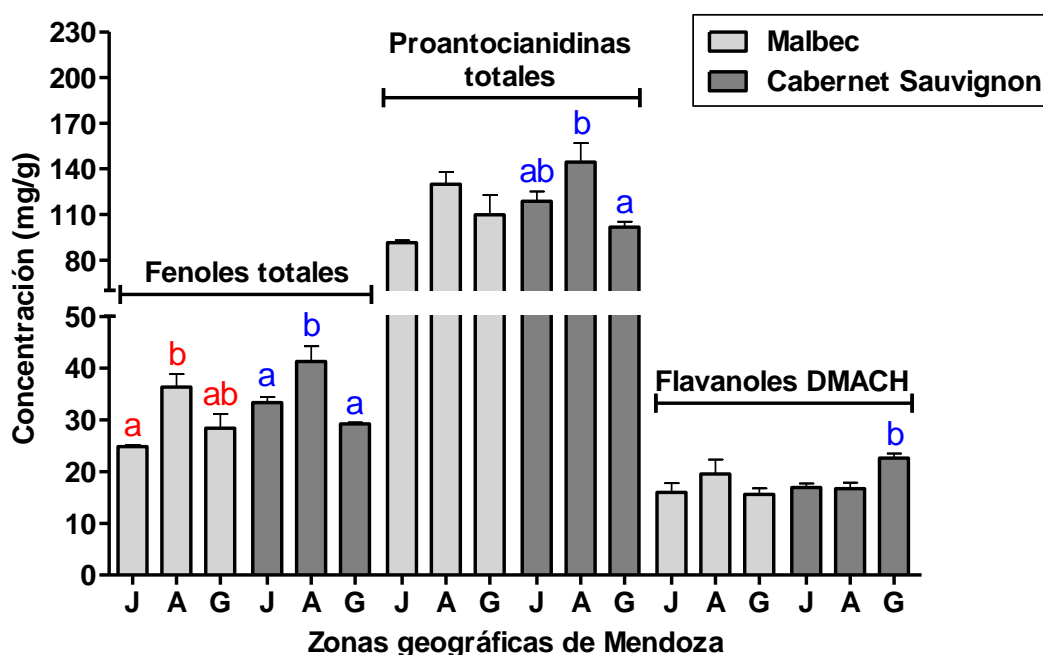
Compuesto	$\lambda_{\max}$ (nm)	Ion molecular [M-H] <sup>+</sup> (m/z)	Fragmentos (m/z)
Dihidroquercetina-3-glucósido	336 (h) <sup>a</sup> , 292	465	303
Dihidroquercetina-3-ramnósido	336 (h), 292	449	303
Dihidrokaempferol-3-glucósido	340 (h), 292	449	287

<sup>a</sup> h, hombro.

### 3.3. Composición fenólica de semillas

#### 3.3.1. Parámetros fenólicos generales

Las semillas cumplen un rol muy importante durante la vinificación, aportando al medio flavanoles de diversa estructura molecular, los cuales inciden directamente en las características sensoriales de los vinos tintos (astringencia y amargor) y participan en la estabilización de los pigmentos antociánicos (Monagas y Bartolomé, 2009). La **Figura 5** muestra los resultados de los parámetros fenólicos globales determinados en semillas MB y CS de las distintas zonas evaluadas.



**Figura 5.** Parámetros fenólicos generales determinados en extractos de semillas de bayas Malbec y Cabernet Sauvignon de distintas zonas de Mendoza (J, Junín; A, Agrelo; G, Gualtallary).

Al considerar conjuntamente ambas variedades, las semillas de Agrelo presentaron los mayores niveles de fenoles y proantocianidinas totales, con diferencias significativas respecto a las zonas restantes ( $p < 0,05$ ). Estas diferencias podrían deberse a factores climáticos y/o culturales que inciden sobre el desarrollo de las bayas, afectando sus características físicas (tamaño, peso, volumen). Particularmente en las muestras de este estudio, no existieron diferencias significativas entre zonas respecto al peso de semillas (**Tabla 3**), pero si se encontraron diferencias en el número de semillas por baya, observándose los mayores valores en Agrelo (MB 1,8 semillas/baya; CS 2,1 semillas/baya), lo cual podría suponer una mayor fuente de estos compuestos. Con respecto a los flavanoles DMACH, las semillas de bayas MB mostraron el mismo patrón observado para los otros parámetros; mientras que en el caso de CS, las semillas de Gualtallary presentaron los mayores



niveles de estos compuestos. Al comparar los cultivares (**Tabla 5**), no se evidenció un efecto varietal significativo sobre los parámetros evaluados, encontrándose sólo diferencias en el contenido de fenoles totales y, en general, una mayor concentración fenólica en CS. Finalmente, los niveles de compuestos fenólicos obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por otros autores (Mateus et al., 2001a; Bozan et al., 2008; Obreque-Slier et al., 2010).

### 3.3.2. Perfil de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

Los compuestos fenólicos no-antociánicos presentes en las semillas provenientes de las uvas MB y CS fueron identificados y cuantificados empleando la técnica cromatográfica descrita en el Anexo I. Entre ellos, se determinaron tres monómeros [(+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC) y (-)-epicatequina-3-galato (ECG)], cinco dímeros de procianidina [(+)-catequina-(4 $\alpha$ →8)-(+)-catequina (B3), (-)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-(+)-catequina (B1), (+)-catequina-(4 $\alpha$ →8)-(-)-epicatequina (B4), (-)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-(-)-epicatequina (B2) y (+)-catequina-(4 $\alpha$ →6)-(+)-catequina (B6)], un trímero de procianidina [(-)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-(-)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-(+)-catequina (C1)], seis procianidinas no identificadas [dos dímeros esterificados con ácido gálico, dos trímeros esterificados con ácido gálico, un trímero y un tetrámero], y sólo un compuesto no-flavonoide (ácido gálico). La **Figura 6** muestra los cromatogramas típicos correspondientes a semillas MB y CS, y la **Tabla 9** resume los resultados cuantitativos obtenidos en las muestras analizadas. Coincidente con la tendencia observada en los parámetros fenólicos generales (**Figura 5**), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre variedades para todos los compuestos determinados por HPLC (**Tablas 7 y 9**). En general, las semillas CS presentaron una mayor concentración de fenoles no-antociánicos (3792,7-7880,3 mg/kg), comparado con MB (3337,2-4388,2 mg/kg). Estos niveles totales determinados en semillas fueron mayores que los obtenidos en hollejos, lo cual concuerda con los resultados reportados en el Apartado II.1 (Capítulo II) y en otros estudios previos (Cheynier et al., 2000; Rodríguez Montealegre et al., 2006).

Con respecto a los monómeros cuantificados en ambos cultivares, y según observaciones realizadas en el Apartado II.1 (Capítulo II) y en otros estudios (Guendez et al., 2005; Iacopini et al., 2008; Obreque-Slier et al., 2010), el principal compuesto fue (+)-catequina, seguido por (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-galato. En general, las semillas CS presentaron mayores niveles de monómeros en todas las zonas evaluadas, comparado con MB (**Tabla 9**). Las proporciones relativas de estos compuestos (C:EC:ECG) fueron similares para las semillas MB de las distintas zonas (Junín 32,6:19,0:4,2; Agrelo 32,7:19,6:3,7; Gualtallary 32,5:20,0:3,9); mostrando algunos cambios en CS (Junín 26,8:16,3:4,5; Agrelo 35,2:21,4:1,9; Gualtallary 39,3:20,0:2,8).

Al analizar la distribución de las distintas procianidinas, se observó un comportamiento similar a los monómeros, con niveles superiores en CS y abundancias relativas distintas según la zona

(Tabla 9). En semillas CS, las proporciones de procianidinas y compuestos esterificados con ácido gálico estuvieron comprendidas entre 22,5-31,5% y 13,5-18,3%, respectivamente; mientras que en MB, fueron de 26,1-27,6% y 13,4-14,8%, indicando una menor dispersión para esta variedad.

Finalmente, al analizar la influencia de la zona geográfica sobre estos compuestos se observó una concentración creciente hacia las zonas de mayor altitud en las dos variedades estudiadas. Estos resultados difieren de los obtenidos en los parámetros fenólicos generales, y podrían deberse a la influencia específica de las condiciones climáticas y del *terroir* sobre la biosíntesis de compuestos flavánicos de bajo peso molecular (Mateus et al., 2001a; Lorrain et al., 2011).

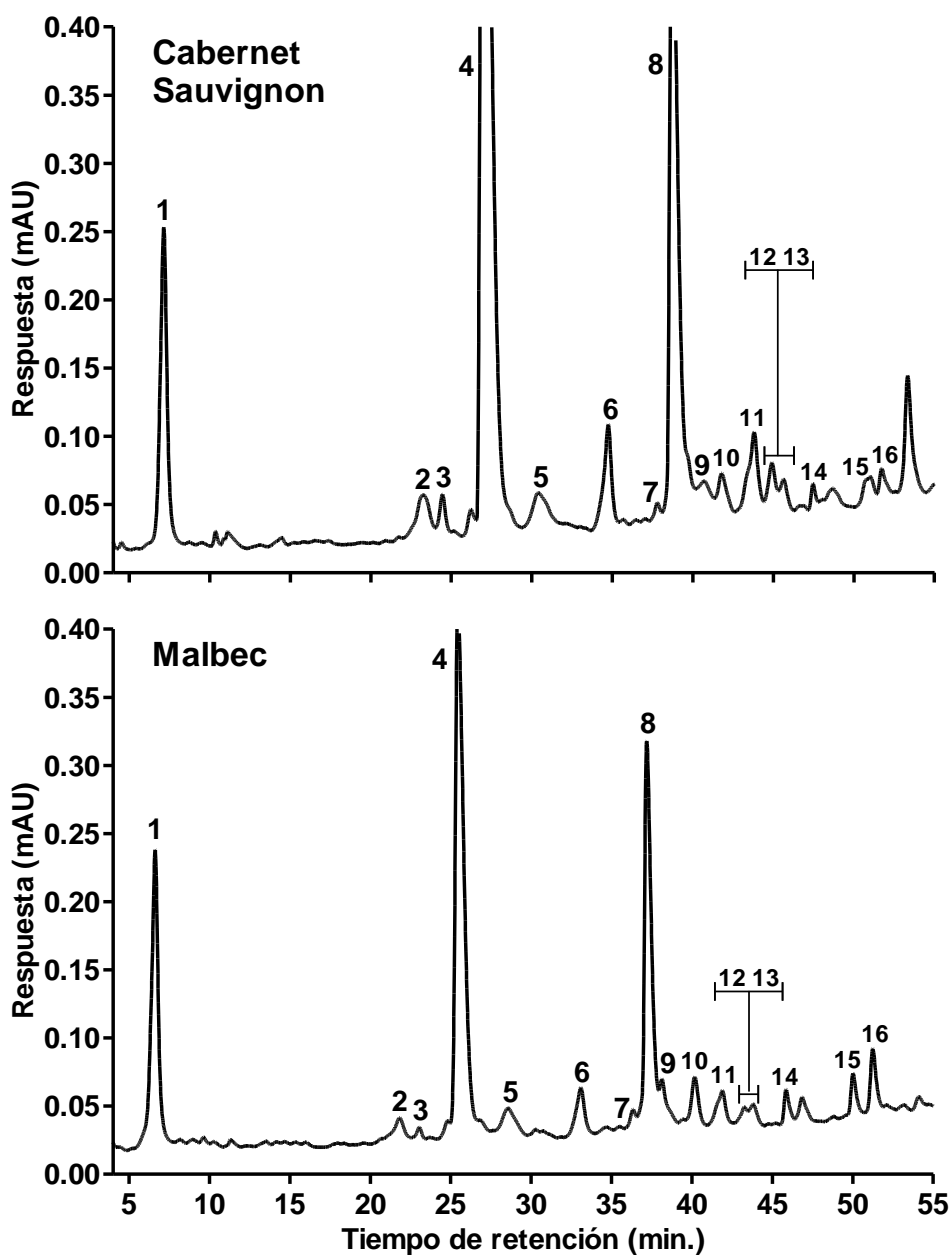


Figura 6. Perfil de fenoles de bajo peso molecular por HPLC-DAD (280 nm) de extractos de semillas Malbec y Cabernet Sauvignon de Mendoza. La identificación de los picos cromatográficos se encuentra en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Compuestos fenólicos de bajo peso molecular cuantificados en semillas de bayas Malbec y Cabernet Sauvignon de distintas zonas de Mendoza.

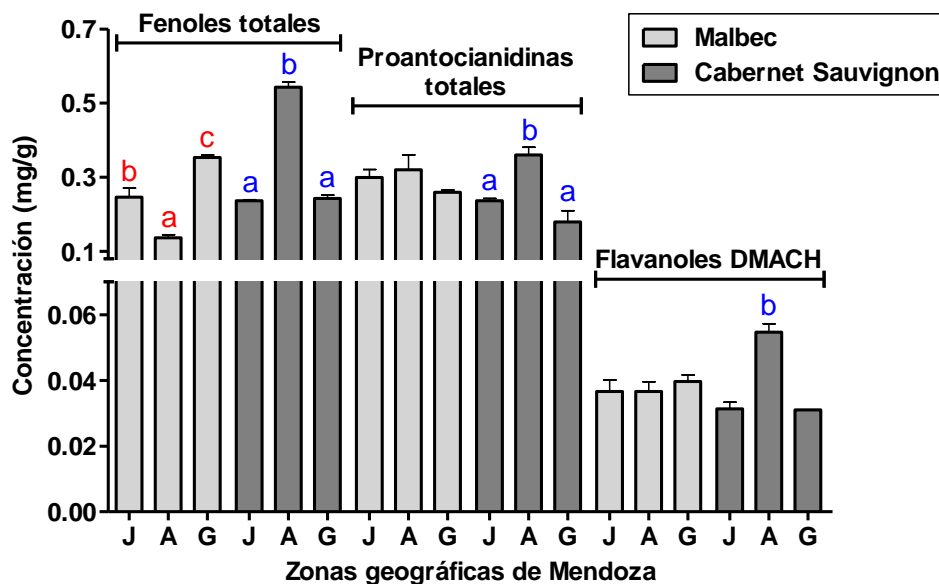
Pico	Compuesto	Malbec			Cabernet Sauvignon		
		Junín	Agrelo	Gualtallary	Junín	Agrelo	Gualtallary
1	Acido gálico	109,7 ± 7,1* a	125,9 ± 6,5 a	102,3 ± 0,1 a	100,6 ± 3,9 a	92,5 ± 5,0 a	103,5 ± 2,0 a
4	(+)-Catequina	1088,1 ± 65,1 a	1310,3 ± 22,2 ab	1427,4 ± 61,8 b	1016,2 ± 52,7 a	2309,9 ± 155,7 b	3099,9 ± 177,6 c
8	(-)-Epicatequina	634,8 ± 51,3 a	783,0 ± 34,6 ab	876,6 ± 27,0 b	620,3 ± 43,9 a	1405,4 ± 80,6 b	1578,0 ± 98,0 b
15	(-)-Epicatequina-3-galato	139,4 ± 11,4 a	146,0 ± 6,2 a	170,5 ± 3,3 a	168,9 ± 9,1 b	122,0 ± 3,5 a	217,1 ± 0,6 c
3	Procianidina B1	40,5 ± 2,3 a	40,0 ± 2,8 a	50,0 ± 3,6 a	53,5 ± 5,2 a	119,1 ± 9,7 b	100,7 ± 8,4 b
6	Procianidina B2	167,2 ± 10,2 a	187,5 ± 11,3 a	215,0 ± 14,3 a	239,8 ± 16,0 a	407,8 ± 25,2 b	307,6 ± 24,1 a
2	Procianidina B3	105,4 ± 7,3 a	104,7 ± 1,7 a	116,8 ± 6,7 a	108,3 ± 4,4 a	202,4 ± 18,2 b	207,3 ± 20,1 b
5	Procianidina B4	188,9 ± 7,3 a	197,5 ± 8,2 a	209,6 ± 16,3 a	187,0 ± 1,6 a	234,4 ± 12,1 a	300,2 ± 16,5 b
7	Procianidina B6	52,5 ± 2,8 a	61,3 ± 0,1 a	85,6 ± 4,6 b	76,2 ± 1,1 a	84,0 ± 2,6 a	101,1 ± 4,2 b
9	Procianidina C1	122,8 ± 6,8 a	178,9 ± 2,3 b	187,7 ± 2,0 b	173,4 ± 5,6 a	175,5 ± 12,5 a	243,5 ± 4,3 b
11	Trímero de procianidina	165,9 ± 12,5 a	182,8 ± 8,5 a	203,7 ± 1,9 a	262,4 ± 15,9 a	429,9 ± 30,1 b	401,8 ± 24,1 b
14	Tetrámero de procianidina	76,4 ± 5,1 a	91,8 ± 2,5 b	111,8 ± 1,6 c	93,8 ± 1,4 a	90,9 ± 1,8 a	110,0 ± 0,1 b
10	Galato de dímero de procianidina 1	129,7 ± 3,7 a	181,6 ± 7,2 b	185,6 ± 4,2 b	154,2 ± 2,7 a	171,8 ± 4,8 a	233,9 ± 10,3 b
12	Galato de dímero de procianidina 2	65,5 ± 5,0 a	88,6 ± 6,4 b	96,7 ± 2,4 b	119,9 ± 7,8 a	215,3 ± 15,5 b	191,3 ± 12,7 b
13	Galato de trímero de procianidina 1	76,5 ± 5,8 a	93,0 ± 1,7 ab	100,3 ± 6,4 b	127,1 ± 1,2 a	113,9 ± 4,2 a	161,5 ± 10,6 b
16	Galato de trímero de procianidina 2	173,9 ± 6,7 a	228,0 ± 0,1 b	248,6 ± 0,6 c	291,1 ± 10,7 a	383,1 ± 28,7 a	522,9 ± 33,5 b
<b>Compuestos fenólicos totales</b>		3337,2 ± 144,4 a	4000,9 ± 62,4 b	4388,2 ± 13,0 b	3792,7 ± 143,6 a	6557,9 ± 392,6 b	7880,3 ± 443,1 b

\* Media (mg/kg de semillas) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre zonas para la misma variedad (Tukey HSD, p < 0,05).

### 3.4. Composición fenólica de pulpa

#### 3.3.1. Parámetros fenólicos generales

El análisis global de la pulpa proveniente de uvas MB y CS mostró concentraciones 2-3 órdenes de magnitud inferiores al resto de la baya (**Figura 7**), coincidiendo con la literatura (Cheynier et al., 2000; Terrier et al., 2009). Es probable que gran parte de los flavanoles detectados en la pulpa provengan desde el hollejo a través de su transferencia durante el proceso de separación y procesamiento de las muestras (Sun et al., 2001a; Mané et al., 2007). Al analizar la variedad CS, se observó una tendencia similar a la detectada en semillas, con concentraciones significativamente superiores de fenoles en la pulpa proveniente de las bayas de Agrelo. Por el contrario, en el caso del MB no se observó el mismo patrón, presentándose niveles similares de proantocianidinas y flavanoles DMACH en las distintas zonas evaluadas, y un mayor contenido de fenoles totales en Gualtallary. Comparativamente, el cultivar CS mostró concentraciones significativamente superiores de fenoles totales respecto al MB (**Tabla 5, Figura 7**). Finalmente, la proporción relativa de proantocianidinas en la pulpa de bayas MB representó entre 0,20 y 0,30%, y en CS entre 0,18 y 0,24% del contenido cuantificado en toda la baya, coincidiendo con lo reportado por Sun et al. (2001a).

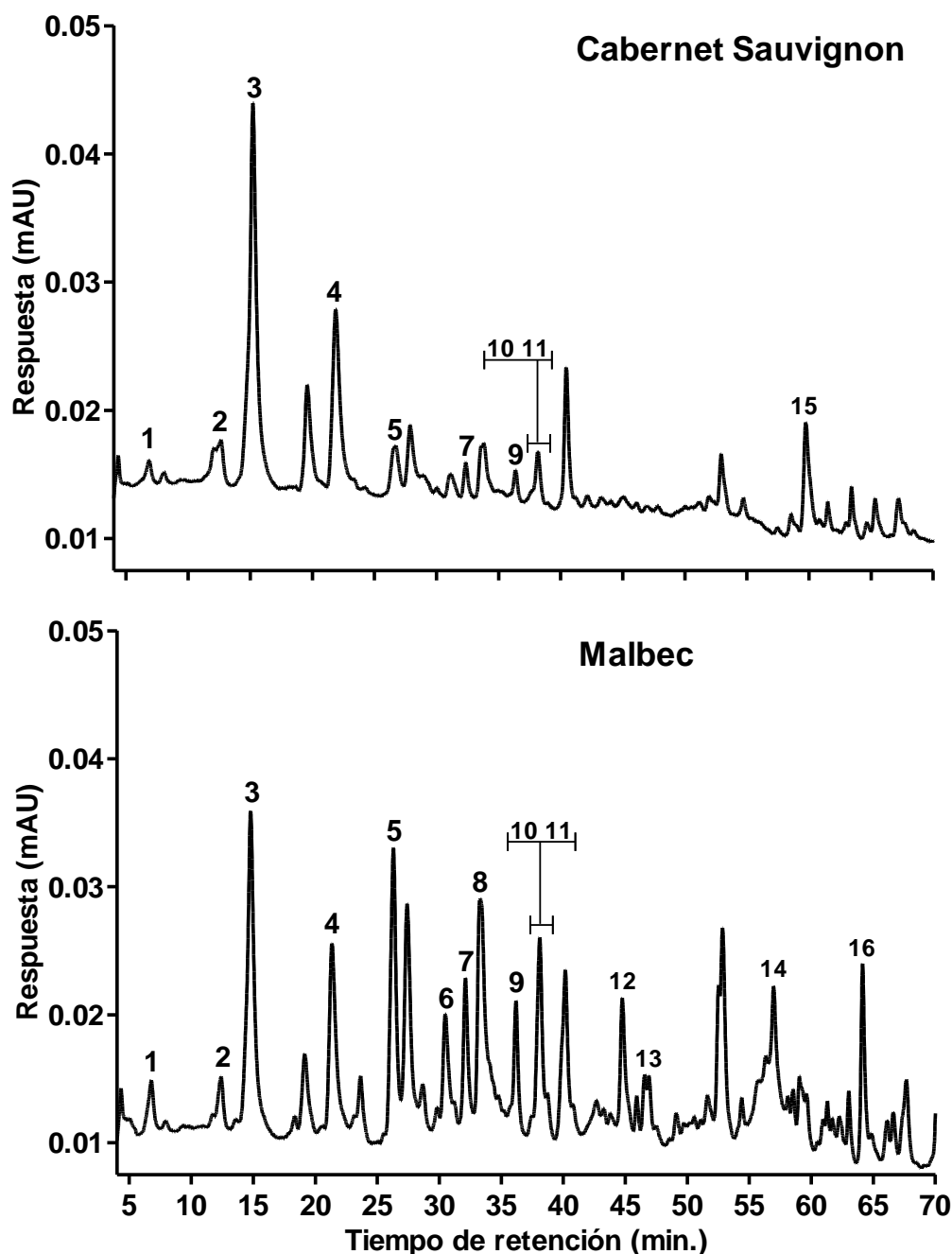


**Figura 7.** Parámetros fenólicos generales determinados en extractos de pulpa de bayas Malbec y Cabernet Sauvignon de distintas zonas de Mendoza (J, Junín; A, Agrelo; G, Gualtallary).

#### 3.3.2. Perfil de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

Los compuestos fenólicos no-antocianínicos presentes en la pulpa de las bayas estudiadas fueron identificados y cuantificados empleando la técnica cromatográfica descrita en el Anexo I.

Entre ellos, se determinaron ocho compuestos no-flavonoides (ácidos gálico, protocatéuico, siríngico, *trans*-caftárico, *trans*-cutárico, *trans*-cafeico, galato de etilo y un ácido fenólico no identificado), y ocho flavonoides [(+)-catequina, (-)-epicatequina, un dímero y dos trímeros de procianidina, quercetina-3-glucósido, dihidroquercetina-3-glucósido y dihidrokaempferol-3-glucósido]. La **Figura 8** muestra los cromatogramas típicos correspondientes a la pulpa de bayas MB y CS. La concentración de los distintos compuestos, individualmente y agrupados, y las proporciones relativas de cada grupo en las muestras analizadas se presentan en la **Tabla 10**.



**Figura 8.** Perfil de fenoles de bajo peso molecular por HPLC-DAD (280 nm) de extractos de pulpa Malbec y Cabernet Sauvignon de Mendoza. La identificación de los picos cromatográficos se encuentra en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Compuestos fenólicos de bajo peso molecular cuantificados en pulpa de bayas Malbec y Cabernet Sauvignon de distintas zonas de Mendoza.

Pico	Compuesto	Malbec			Cabernet Sauvignon		
		Junín	Agrelo	Gualtallary	Junín	Agrelo	Gualtallary
1	Acido gálico	73,2 ± 5,5* a	94,7 ± 13,0 a	104,5 ± 13,9 a	40,1 ± 4,5 a	52,0 ± 4,1 a	55,1 ± 4,1 a
2	Acido protocatéquico	182,5 ± 15,3 b	69,6 ± 10,0 a	177,0 ± 16,8 b	95,6 ± 6,9 a	168,0 ± 9,2 b	125,9 ± 7,1 a
9	Acido siríngico	451,7 ± 5,2 a	428,2 ± 5,2 a	709,3 ± 30,3 b	396,7 ± 3,1 a	424,2 ± 5,8 b	399,2 ± 0,1 a
10	Galato de etilo	633,0 ± 2,0 a	626,7 ± 1,4 a	805,4 ± 5,8 b	636,6 ± 3,6 a	665,7 ± 2,2 b	653,7 ± 6,1 ab
3	Acido <i>trans</i> -caféico	816,0 ± 9,2 b	634,6 ± 13,4 a	1425,8 ± 27,7 c	735,9 ± 43,6 a	1505,9 ± 26,3 c	978,3 ± 68,2 b
4	Acido <i>trans</i> -cutárico	814,4 ± 6,9 b	629,7 ± 7,5 a	996,7 ± 57,4 c	675,5 ± 18,2 a	1041,8 ± 35,9 b	727,9 ± 25,3 a
6	Acido <i>trans</i> -caféico	594,9 ± 3,6 a	589,5 ± 3,4 a	835,5 ± 34,8 b	nd	nd	nd
7	Acido fenólico no identificado	640,0 ± 4,1 a	613,7 ± 5,7 a	870,5 ± 50,9 b	578,6 ± 2,8 a	611,5 ± 6,5 b	583,4 ± 3,5 a
	<b>No-flavonoides totales</b>	4205,7 ± 27,1 b (27,9)	3686,7 ± 22,0 a (32,1)	5924,7 ± 83,7 c (26,2)	3159,0 ± 59,0 a (68,4)	4469,1 ± 20,6 c (67,2)	3523,5 ± 97,1 b (72,7)
5	(+)-Catequina	1360,9 ± 136,7 b	740,5 ± 55,8 a	4139,7 ± 157,9 c	354,4 ± 21,2 a	520,0 ± 5,6 b	483,0 ± 6,5 b
11	(-)-Epicatequina	883,0 ± 67,5 b	442,6 ± 47,6 a	1596,2 ± 84,2 c	250,1 ± 26,3 a	457,0 ± 27,6 b	471,7 ± 43,3 b
8	Dímero de procianidina 1	1858,8 ± 80,4 b	876,0 ± 154,3 a	1855,1 ± 109,6 b	nd	nd	nd
13	Trímero de procianidina 1	321,8 ± 22,1 b	112,4 ± 16,5 a	596,0 ± 52,7 c	nd	nd	nd
16	Trímero de procianidina 2	581,7 ± 78,2 a	271,1 ± 36,3 a	1557,1 ± 126,5 b	nd	nd	nd
15	Queretina-3-glucósido	nd	nd	nd	860,8 ± 46,4 b	1203,5 ± 99,9 c	371,3 ± 2,3 a
12	Dihidroqueretina-3-glucósido	3066,3 ± 16,4 ab	2714,8 ± 33,3 a	3272,8 ± 165,4 b	nd	nd	nd
14	Dihidrokaempferol-3-glucósido	2800,0 ± 12,9 a	2668,8 ± 37,5 a	3699,4 ± 174,5 b	nd	nd	nd
	<b>Flavonoides totales</b>	10872,5 ± 414,2 b (72,1)	7826,2 ± 290,4 a (67,9)	16716,3 ± 711,4 c (73,8)	1465,3 ± 88,4 a (31,6)	2180,5 ± 83,9 b (32,8)	1326,0 ± 44,2 a (27,3)
	<b>Fenoles no-antociánicos totales</b>	15078,2 ± 441,2 b	11512,9 ± 311,2 a	22641,0 ± 730,7 c	4624,3 ± 139,6 a	6649,6 ± 98,6 b	4849,5 ± 139,4 a

\* Media (µg/kg de pulpa) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre zonas para la misma variedad (Tukey HSD, p < 0,05). Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre los distintos grupos fenólicos y fenoles totales. nd, no detectado.

Según la literatura, la pulpa contiene principalmente ácidos fenólicos (Cheynier et al., 2000) y trazas de monómeros y dímeros de flavanoles (Bourzeix et al., 1986; Revilla y Ryan, 2000). En el presente estudio se detectaron diferencias significativas entre las variedades estudiadas (**Tablas 7 y 10**), coincidiendo con los resultados observados en hollejos. La pulpa de las bayas MB presentaron una mayor concentración de compuestos fenólicos (11,5-22,6 mg/kg de pulpa) comparado con CS (4,6-6,6 mg/kg de pulpa). Con respecto al contenido de no-flavonoides (ácidos fenólicos y derivados), se observó la misma tendencia mencionada anteriormente, con valores comprendidos entre 3,7 y 5,9 mg/kg de pulpa para MB y entre 3,2 y 4,5 mg/kg de pulpa para CS. La principal diferencia entre las variedades se encontró en la fracción flavonoide. En el caso de CS, sólo se detectaron (+)-catequina, (-)-epicatequina y quercetina-3-glucósido, representando en conjunto entre 27,3 y 32,8% del total de los fenoles cuantificados. Por el contrario, en la pulpa de la variedad MB se determinaron además otros flavanoles (un dímero y dos trímeros) y dos dihidroflavonoles, alcanzando una proporción superior al 65% en todas las muestras analizadas.

Finalmente, al analizar la influencia de la zona geográfica sobre estos compuestos se observó un comportamiento diferencial según la variedad (**Tablas 7 y 10**). En el caso de MB, las muestras provenientes de Agrelo mostraron una concentración significativamente inferior, seguidas por Junín, en tanto que la zona de Gualtallary presentó los mayores registros. Por su parte, las muestras de CS con los mayores niveles de compuestos fenólicos en la pulpa correspondieron a Agrelo. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos en la determinación global de fenoles por espectrofotometría (**Figura 7**).

Las observaciones descritas anteriormente muestran variaciones en algunos parámetros fenólicos globales y en la composición flavonoide y no-flavonoide de uvas Malbec y Cabernet Sauvignon cultivadas en distintas zonas geográficas de Mendoza. En los hollejos de ambas variedades, se observó mayor concentración de fenoles totales y derivados antociánicos a medida que aumenta la altitud del viñedo. Los compuestos no-flavonoides mostraron una tendencia similar, con diferencias significativas en el contenido de glucósido de trans-resveratrol. Con respecto a los flavonoides, no se observaron diferencias en MB; mientras que para CS, los hollejos de Agrelo presentaron contenidos superiores de estos compuestos. Al analizar las semillas de ambos cultivares, Agrelo generó los mayores niveles de fenoles y proantocianidinas totales; mientras que los monómeros y oligómeros de flavanoles siguieron el mismo patrón observado en hollejos, en general las zonas más altas presentaron los mayores niveles de flavanoles. Por su parte, las bayas MB presentaron una mayor riqueza fenólica en hollejo y pulpa, mientras que CS se caracterizó por un mayor contenido en semillas. Es importante destacar la presencia de dihidroflavonoles en el cultivar Malbec, representando entre 37,3 y 43,7% de los fenoles no-antociánicos, e indicando un rasgo distintivo desde el punto de vista taxonómico.

### **Caracterización de la composición fenólica de bajo peso molecular y perfil antociánico de vinos Malbec provenientes de diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza**



**“Phenolic Characterization of Malbec Wines from Mendoza Province (Argentina)”**

Artículo publicado en la revista  
*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58 (4), 2388-2397



## Phenolic Characterization of Malbec Wines from Mendoza Province (Argentina)

Martín Fanzone,<sup>†</sup> Álvaro Peña-Neira,<sup>‡</sup> Viviana Jofré,<sup>†</sup> Mariela Assof,<sup>†</sup> and Fernando Zamora<sup>§</sup>

<sup>†</sup>Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales, Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), San Martín 3853, 5507 Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina, <sup>‡</sup>Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile, <sup>§</sup>Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, Universidad Rovira i Virgili, C/ Marcel·li Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58 (4), 2388-2397

Received October 21, 2009. Accepted December 20, 2009.

### ABSTRACT

Malbec is a wine grape variety that is now mainly produced in Mendoza and considered to be the emblematic cultivar of Argentina. Forty-four phenolic compounds, including hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids and different flavonoids, were identified and quantified in 61 monovarietal Malbec wines from 11 geographical zones of Mendoza province, using a reversed high-performance liquid chromatography system coupled to a diode array detector (HPLC-DAD). Among non-flavonoids, gallic, *cis*-caftaric, *trans*-coutaric and caffeic acids presented the higher concentrations in all of the samples, whereas *trans*-resveratrol glucoside was present at concentrations from 0.6 to 1.3 mg/L. For the flavonoids, (+)-catechin and (-)-epicatechin presented the higher concentrations among flavan-3-ols with a ratio (+)-catechin / (-)-epicatechin from 1.3 to 2.1. An astilbin derivative and quercetin presented the higher concentrations for flavonols, whereas malvidin-3-glucoside and its derivatives were the major anthocyanins. For the first time the phenolic composition of Malbec wines from Mendoza province has been characterized.

**KEYWORDS:** Phenolic compound; Malbec; Mendoza; high-performance liquid chromatography; Argentina; wine.

## INTRODUCTION

Argentina is a New World wine producer and consumer country in the southern hemisphere, with 225846 ha of vineyards representing ~3% of the global winegrape cultivation area. Mendoza province has ~70% of all Argentinean vineyards, with 158833 ha. In Mendoza, there are around 22000 ha of Malbec (*Vitis vinifera* L.) vines, which account for 80% of the cultivated area for that variety in the country and ~28% of total red wine grape production in Mendoza (1, 2). This middle-maturing grape variety, of French origin, is well adapted to the soil and dry climate of Mendoza and produces wines with very deep color and high tannin concentration, with a fruity aroma and a particularly plum-like flavor. Today, Malbec is considered to be the emblematic cultivar of Argentina (3).

Phenolic compounds are one of the most important quality parameters of wines, and they contribute to organoleptic characteristics such as color, astringency, and bitterness. These compounds are also active in biochemical processes and have nutraceutical effects on human health, including antimicrobial, anticarcinogenic, and antioxidant properties (4-6). Additionally, phenolic compounds have been suggested as chemical markers to confirm cultivar authenticity and geographical origin in grapes and wines. In past years, the cultivar-characteristic profiles of monomeric anthocyanins have been widely used for the classification and differentiation of grape cultivars and monovarietal wines (7-9).

The phenolic profile of a wine depends on the grape variety, the geographical location of the vineyard, factors that affect the berry development (e.g., soil, weather, viticultural practices, etc.), grape maturity (10, 11), and the winemaking techniques (12-14). The variation in phenolic composition among cultivation areas can be explained by the fact that the phenylpropanoid pathway enzymes are highly influenced by temperature and light, factors that also affect the photosynthetic process, which provides the biosynthetic precursors (mainly sugars) necessary for synthesis of phenolic compounds (15-17).

To our knowledge, there is to date no published information on the phenolic composition of Argentinean Malbec wines. Considering this, the aim of this work was to study the non-flavonoid and flavonoid compositions of commercial wines of this cultivar from different zones of Mendoza province.

## MATERIALS AND METHODS

**Wine Samples.** Sixty-one Malbec wines produced at commercial scale were collected in bottles (750 mL), at the end of malolactic fermentation, directly from the 23 collaborating wineries to

ensure the varietal purity of the samples. The wine samples belonged to 11 different zones of Mendoza (**Table 1**): 5 samples of zone 1 (East (Santa Rosa, Rivadavia, SanMartín, and Junín)), 5 samples of zone 2 (East Maipú), 7 samples of zone 3 (Maipú-Luján), 5 samples of zone 4 (West Luján), 6 samples of zone 5 (Agreglo), 4 samples of zone 6 (Alto Agreglo), 5 samples of zone 7 (Perdriel), 6 samples of zone 8 (Ugarteche), 8 samples of zone 9 (West Valle deUco), 5 samples of zone 10 (Center Valle de Uco), and 5 samples of zone 11 (San Carlos). All wines were pure monovarietals from the 2007 vintage. They were stored in darkness at 12-15 °C, and each wine bottle was opened immediately before the analysis.

Table 1. Geographical Characteristics of Different Zones of Mendoza				
zone	description	altitude (m asl <sup>a</sup> )	latitude	longitude
1	East	650	33° 05' S	68° 28' W
2	East Maipú	750	32° 58' S	68° 45' W
3	Maipú-Luján	910	33° 00' S	68° 52' W
4	West Luján	1000	33° 01' S	68° 58' W
5	Agreglo	970	33° 07' S	68° 52' W
6	Alto Agreglo	1100	33° 06' S	68° 57' W
7	Perdriel	940	33° 04' S	68° 52' W
8	Ugarteche	900	33° 13' S	68° 52' W
9	West Valle de Uco	1450	33° 24' S	69° 17' W
10	Center Valle de Uco	1050	33° 22' S	69° 08' W
11	San Carlos	1100	33° 43' S	69° 07' W

<sup>a</sup> m asl, meters above sea level.

#### **Chemical Analyses.** *Total Phenols, Anthocyanins, Tannins, and Other Chemical Parameters.*

Absorbance measurements were made with a Perkin-Elmer UV-vis spectrophotometer model Lambda 25 (Perkin-Elmer Instruments, Hartford, CT).

Total phenols were determined by direct reading of the absorbance of the samples at 280 nm (18). Total phenols were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per liter of sample (GAE, mg/L).

Total anthocyanins were measured by diluting wine samples with ethanol and hydrochloric acid. Briefly, two aliquots of this dilution were treated either with NaHSO<sub>3</sub> or with the same amount of water. Each aliquot was then analyzed at 520 nm (18). Total anthocyanins were expressed as milligrams per liter of malvidin-3-glucoside.

For total tannins, the analytical method applied was the acid butanol assay (19). This method is based on the acid-catalyzed oxidative cleavage of the C-C interflavanic bond of proanthocyanidins in butanol-HCl. Total tannins were expressed as milligrams per liter of catechin.

Gelatin index (GI) was measured using the methodology described by Glories (20). To two tubes with 10 mL of wine was added 1 mL of distilled water (total tannin) or 1mL of 70 g/L gelatin

solution (tannin precipitated with gelatin). After 3 days, the samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 min (Rolco CM4080, Buenos Aires, Argentina). The supernatants were assayed to determine the tannin concentration (19). Gelatin index (%) was expressed as the relationship between tannin residual (difference among total wine tannin concentration and tannin after gelatin precipitation) and total tannin concentration.

Other chemical parameters measured in the samples were pH (by Altronix equipment TPX-1, Buenos Aires, Argentina), titratable acidity (g/L of tartaric acid) (21), degree of polymerization of condensed tannins (DMACH, *p*-dimethylaminocinnamaldehyde assay) (22), color intensity (CI), and hue values (23).

*HPLC-DAD Analysis of Anthocyanins.* The chromatographic system consisted of an HPLC equipped with a photodiode array detector model L-7455, intelligent pump model L-6200, and autosampler model L-7200 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany). Separation was performed on a reverse-phase Nova-Pak C<sub>18</sub> column (150 mm x 3.9 mm i.d., 4 μm) at room temperature (Waters Corp., Milford, MA). A gradient consisting of solvent A (water/formic acid, 90:10, v/v) and solvent B (acetonitrile) was applied as 0-23 min, 96-85% A and 4-15% B; 23-27 min, 85-80% A and 15-20% B; 27-43 min, 80-70% A and 20-30% B and followed by washing (methanol) and re-equilibration of the column. The flow rate was 1.1 mL/min from 0 to 23 min and 1.5 mL/min from 23 to 43 min. One hundred and fifty microliters of wine, previously filtered through a 0.45 μm pore size membrane, was injected onto the column. Photodiode array detection (DAD) was performed from 260 to 600 nm (24). Quantification was carried out by area measurements at 520 nm, and the anthocyanin content was expressed as malvidin-3-glucoside (Extrasynthese, Lyon, France), using a standard calibration curve.

*HPLC-DAD Analysis of Low Molecular Weight Phenolic Compounds.* An aliquot (50 mL) of wine from each bottle was extracted three times with 20 mL of ethyl ether and three times with 20 mL of ethyl acetate. The organic fractions were combined. The extracts were evaporated to dryness under vacuum at 30 °C. The residue was dissolved in 2 mL of methanol/water (1:1, v/v) and then filtered through a 0.45 μm pore size membrane, and 30 μL was injected into the HPLC-DAD system. The chromatographic system consisted of an HPLC equipped with a photodiode array detector model G1315B, quaternary pump model G1311A, and autosampler model G1329A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). A reverse phase Nova-Pack C<sub>18</sub> column (300 mm x 3.9 mm i.d., 4 μm) at 20 °C (Waters Corp.) was used for separation of the compounds. Two mobile phases were employed for elution: A (water/acetic acid, 98:2, v/v) and B (water/acetonitrile/acetic acid, 78:20:2, v/v/v). The gradient profile was 0-55 min, 100-20% A and 0-80% B; 55-57 min, 20-10% A and 80-90% B; 57-90 min, 10% A and 90% B isocratic, followed by washing (methanol) and re-equilibration of the column. The flow

rate was 1.0 mL/min from 0 to 55 min and 1.2 mL/min from 55 to 90 min. Detection was performed by scanning from 210 to 360 nm with an acquisition speed of 1 s (15).

**Qualitative and Quantitative Analysis.** The identification of specific compounds was carried out by comparison of their spectra and retention time with those of standards. The standards were purchased from Sigma (St. Louis, MO): gallic, protocatechuic, syringic, *p*-coumaric, and caffeic acids; tyrosol, (+)-catechin, (-)-epicatechin, *trans*-resveratrol, myricetin, and quercetin. The flavonol glycosides, myricetin glycosides, *trans*-resveratrol glucoside (piceid), hydroxycinnamic acid esters, and the procyanidins for which no standards were available were identified by their retention time and spectral parameters, as reported by Peña-Neira et al. (15, 24).

Quantitative determinations were made by using the external standard method with the commercial standards. The calibration curves were obtained by injection of standard solutions, under the same conditions as for the samples analyzed, over the range of concentrations observed. The compounds for which no standards were available were quantified with the curves of quercetin (flavonol glycosides, myricetin glycosides, and dihydroflavonols), *trans*-resveratrol (*trans*-resveratrol glucoside), caffeic acid (hydroxycinnamic acid esters and unknown compound), and (+)-catechin (procyanidins). All of the solvents were of HPLC grade and purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All of the analyses were performed in duplicate.

**Statistical Analysis.** Means comparisons were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple-range tests (TMRT). A  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant. Canonical discriminant analyses (CDA) were performed to examine geographical differences in Malbec wines from Mendoza, using the chemical determinations, in which new variables, called canonical discriminant functions, were created to separate the zones. Statistical analysis was evaluated with Statgraphics Plus version 4.0 software (Copyright 1994-1999, Statistical Graphics Corp., Warrenton, VA).

## RESULTS AND DISCUSSION

**General Chemical Parameters.** Table 2 presents the results of the general chemical parameters of the Malbec wines studied. Among all of the samples studied, titratable acidity varied from 5.1 to 6.1 g/L and pH from 3.5 to 3.8. These results show a low dispersion for these important parameters that influence not only the sensorial quality of wine but also the color intensity expression and the microbiology stability (21).

For all samples, total phenols ranged between 1932.0 and 3506.8 mg/L. These results are in agreement with those determined by Minussi et al. (25) for red wines from South America.

**Table 2. Chemical Parameters (Mean ± SD) of Commercial Malbec Wines<sup>a</sup>**

parameter	geographical zones of Mendoza (Argentina)										
	1 (n=5)	2 (n=5)	3 (n=7)	4 (n=5)	5 (n=6)	6 (n=4)	7 (n=5)	8 (n=6)	9 (n=8)	10 (n=5)	11 (n=5)
titratable acidity (tartaric acid, g/L)	5.8 ± 0.5 a	5.4 ± 1.2 a	5.6 ± 0.6 a	6.1 ± 0.3 a	5.3 ± 1.3 a	5.6 ± 0.5 a	6.1 ± 0.8 a	5.1 ± 1.1 a	6.1 ± 1.1 a	5.6 ± 1.7 a	5.7 ± 1.5 a
pH	3.7 ± 0.2 a	3.6 ± 0.1 a	3.6 ± 0.2 a	3.5 ± 0.1 a	3.7 ± 0.2 a	3.8 ± 0.1 a	3.5 ± 0.1 a	3.7 ± 0.1 a	3.6 ± 0.1 a	3.7 ± 0.2 a	3.5 ± 0.1 a
TA (malvidin-3-glucoside, mg/L)	261.1 ± 61.1 a	462.8 ± 94.2 ab	575.6 ± 130.1 bc	631.3 ± 96.1 bc	566.8 ± 123.6 bc	656.9 ± 201.3 bc	534.5 ± 165.2 abc	619.8 ± 99.4 bc	802.8 ± 213.6 c	608.8 ± 58.0 bc	614.1 ± 185.0 bc
Cl (A 420nm+520nm+620nm) x 10	8.7 ± 2.0 a	11.8 ± 2.5 a	14.9 ± 3.6 ab	19.5 ± 4.4 ab	14.4 ± 2.1 ab	19.5 ± 9.2 ab	17.6 ± 8.0 ab	16.2 ± 3.2 ab	25.1 ± 13.0 b	17.2 ± 5.7 ab	17.3 ± 7.8 ab
Hue values (A 420nm/520nm) x 100	65.4 ± 10.7 b	54.6 ± 4.9 ab	54.8 ± 6.2 ab	50.6 ± 4.2 a	54.1 ± 4.5 ab	56.5 ± 9.7 ab	48.4 ± 3.6 a	57.7 ± 4.3 ab	53.9 ± 4.5 ab	54.1 ± 6.6 ab	50.4 ± 8.3 a
TP (catechin, mg/L)	1932.0 ± 357.3 a	2170.8 ± 404.5 a	2801.2 ± 438.3 ab	2924.5 ± 232.1 ab	2430.0 ± 355.5 a	3175.3 ± 539.1 ab	2722.9 ± 744.6 ab	2797.8 ± 411.3 ab	3506.8 ± 1080.1 b	2947.9 ± 481.2 ab	2787.8 ± 528.4 ab
TT (catechin, mg/L)	3169.3 ± 780.3 ab	2782.9 ± 298.6 a	3821.1 ± 697.7 ab	3990.1 ± 1315.5 ab	3139.7 ± 581.6 ab	4431.4 ± 1339.2 ab	4067.7 ± 1145.7 ab	4162.6 ± 1036.6 ab	4943.3 ± 1525.1 b	4346.9 ± 982.8 ab	4291.4 ± 1046.9 ab
DMACH	10.6 ± 1.0 a	11.6 ± 1.3 a	11.4 ± 1.0 a	12.4 ± 6.7 a	11.9 ± 3.2 a	12.4 ± 2.2 a	10.7 ± 0.4 a	10.7 ± 2.0 a	10.4 ± 2.7 a	9.9 ± 2.4 a	11.3 ± 3.8 a
GI (%)	79.8 ± 6.4 ab	77.9 ± 5.6 ab	86.6 ± 4.4 b	72.9 ± 10.9 a	79.3 ± 3.4 ab	77.4 ± 8.4 ab	84.4 ± 3.7 b	84.3 ± 2.5 b	82.7 ± 3.8 ab	80.5 ± 3.9 ab	84.0 ± 2.4 ab

<sup>a</sup> Results of the analytical methods used to determine the phenolic characteristics of young red wines cv. Malbec from different zones of Mendoza. TA, total anthocyanins; Cl, color intensity; TP, total phenols; TT, total tannins; DMACH, degree of polymerization of condensed tannins; GI, gelatin index. SD, standard deviation. Different letters within the same row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) according to a Tukey HSD test.

The total anthocyanins, color intensity, and hue values of the samples ranged from 261.1 to 802.8 mg/L, from 8.7 to 25.1, and from 48.4 to 65.4, respectively. The high dispersion of these results might be due to the influence of different factors (e.g., origin of wine samples or effect of agronomical and enological practices) on the phenolic compounds, responsible for the color of the wines and related parameters.

Total tannin contents ranged between 2782.9 and 4943.3mg/L. These concentrations are similar to those observed by González-Neves et al. (26) for Cabernet Sauvignon, Merlot, and Tannat wines from Uruguay.

The degree of polymerization of condensed tannins is the ratio between catechin and proanthocyanidin contents and is mainly dependent upon the cultivar and the chemical age of the wine (22). For all samples, the values for this parameter ranged from 9.9 to 12.4, indicating high degrees of condensation for the proanthocyanidins contained in these wines.

The GI is an analytical parameter for estimating astringency in red wine. For Malbec samples, the values for this index ranged between 72.9 and 86.6%. These values are higher than those described by Llaudy et al. (27) for wines from different Spanish Origin Denominations and show high tannin reactivities for all of the wines studied. These results could be because the samples were of young wines, without any fining treatment.

**Anthocyanins and Pyranoanthocyanins.** Anthocyanins are water-soluble pigments present in red grape skins, which partition into the wine during vinification. The monomeric forms are responsible for most of the red color of young wines, and they contribute to the development of red polymeric pigments during wine aging (28).

Glycosylated and acylated (acetyl and *p*-coumaroyl derivatives) anthocyanins, as well as pyranoanthocyanins, were identified by HPLC-DAD. **Table 3** summarizes the individual anthocyanin and pyranoanthocyanin concentrations in Malbec wines. **Figure 1** shows a chromatographic profile of these compounds in the wines analyzed.

Concentrations of monoglucosylated anthocyanins in Malbec samples ranged from 12.0 to 67.8 mg/L for delphinidin-3-glucoside, from 1.6 to 15.5 mg/L for cyanidin-3-glucoside, from 17.7 to 83.5 mg/L for petunidin-3-glucoside, from 3.5 to 23.5 mg/L for peonidin-3-glucoside, and from 189.9 to 408.8 mg/L for malvidin-3-glucoside.

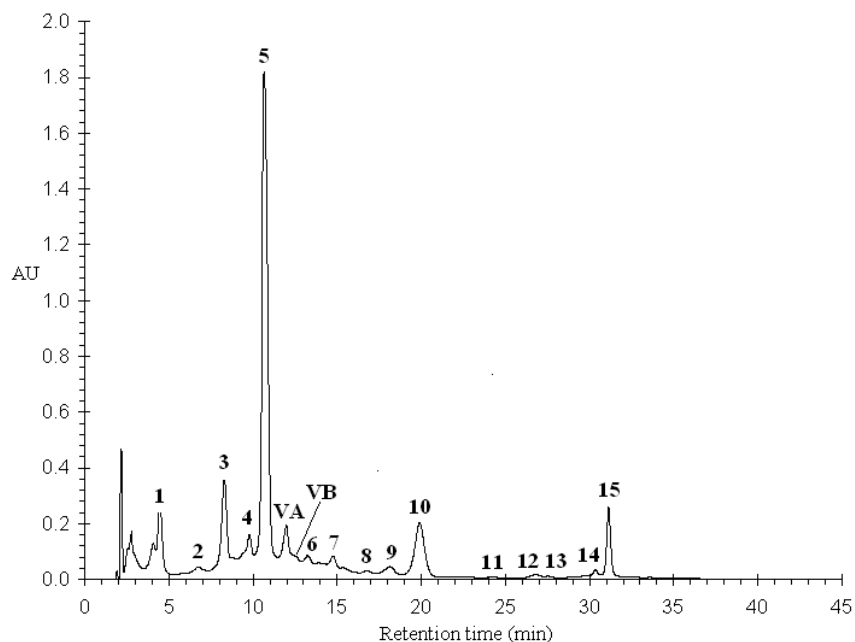
The concentrations for acetylated anthocyanins found in the wine samples ranged from 2.9 to 11.0 mg/L for delphinidin-3-(6-acetyl)glucoside, from 2.7 to 19.2 mg/L for cyanidin-3-(6-acetyl)glucoside, from 1.9 to 7.7 mg/L for petunidin-3-(6-acetyl)glucoside, from 6.4 to 10.8 mg/L for peonidin-3-(6-acetyl)glucoside, and from 32.9 to 68.7 mg/L for malvidin-3-(6-acetyl)glucoside.

**geographical zones of Mendoza**

peak	compound	1 (n=5)	2 (n=5)	3 (n=7)	4 (n=5)	5 (n=5)	6 (n=4)	7 (n=5)	8 (n=6)	9 (n=8)	10 (n=5)	11 (n=5)
1	delphinidin-3-glucoside	12.0 ± 7.0 a	17.3 ± 14.6 a	25.1 ± 6.8 a	61.5 ± 39.5 a	29.1 ± 14.8 a	46.6 ± 23.0 a	31.4 ± 25.0 a	27.2 ± 14.3 a	67.8 ± 62.3 a	52.9 ± 22.4 a	50.0 ± 32.9 a
2	cyanidin-3-glucoside	11.5 ± 9.9 a	6.8 ± 4.1 a	7.9 ± 7.4 a	4.2 ± 3.3 a	7.2 ± 6.3 a	14.1 ± 12.1 a	13.1 ± 8.5 a	7.8 ± 7.4 a	15.5 ± 20.9 a	10.1 ± 12.6 a	1.6 ± 1.7 a
3	petunidin-3-glucoside	17.7 ± 16.5 a	37.9 ± 12.5 a	50.4 ± 14.9 a	71.1 ± 26.9 a	50.9 ± 18.5 a	83.5 ± 45.4 a	53.0 ± 33.4 a	34.5 ± 26.9 a	82.1 ± 67.4 a	58.4 ± 17.2 a	61.7 ± 37.8 a
4	peonidin-3-glucoside	3.5 ± 2.7 a	8.0 ± 7.2 a	19.0 ± 10.2 a	16.5 ± 5.6 a	14.7 ± 5.3 a	22.7 ± 22.2 a	15.9 ± 11.6 a	7.9 ± 6.2 a	23.5 ± 23.7 a	10.8 ± 2.7 a	10.4 ± 8.2 a
5	malvidin-3-glucoside	189.9 ± 42.9 a	265.9 ± 74.7 a	320.5 ± 95.9 a	349.9 ± 131.2 a	369.4 ± 47.1 a	408.8 ± 149.5 a	308.9 ± 155.0 a	283.0 ± 148.0 a	340.8 ± 171.0 a	384.4 ± 42.2 a	315.6 ± 131.3 a
	<i>total glucosylated</i>	234.6 (73.3) <sup>b</sup>	335.9 (72.7)	422.9 (77.5)	503.2 (75.0)	471.3 (73.6)	575.7 (75.4)	422.3 (77.0)	360.4 (77.3)	529.7 (76.8)	516.6 (74.4)	439.3 (73.6)
VA	vitisin A	nd	nd	nd	13.5	9.8	16.1	nd	nd	nd	15.1	13.7
VB	vitisin B	6.9 ± 4.0 a	10.6 ± 5.3 a	14.1 ± 5.0 a	33.2 ± 22.6 a	24.6 ± 9.1 a	35.3 ± 3.9 a	18.3 ± 18.5 a	9.7 ± 7.6 a	27.7 ± 18.1 a	28.6 ± 23.9 a	37.1 ± 20.3 a
6	delphinidin-3-(6-acetyl)-glucoside	6.1 ± 4.1 a	2.9 ± 3.4 a	8.9 ± 6.2 a	10.6 ± 6.7 a	7.3 ± 7.6 a	4.3 ± 2.5 a	11.0 ± 9.4 a	6.9 ± 5.8 a	11.0 ± 10.2 a	7.6 ± 5.8 a	6.6 ± 4.6 a
7	cyanidin-3-(6-acetyl)-glucoside	2.9 ± 3.2 a	6.7 ± 7.3 a	7.3 ± 3.5 a	11.0 ± 9.5 a	6.5 ± 4.1 a	6.6 ± 2.8 a	6.2 ± 5.0 a	2.7 ± 1.8 a	19.2 ± 28.6 a	7.6 ± 8.8 a	4.8 ± 7.1 a
8	petunidin-3-(6-acetyl)-glucoside	4.5 ± 6.4 a	7.7 ± 13.6 a	1.9 ± 2.4 a	2.4 ± 1.7 a	7.7 ± 14.8 a	2.1 ± 1.2 a	2.5 ± 2.5 a	2.6 ± 2.6 a	5.0 ± 7.1 a	4.6 ± 5.6 a	4.0 ± 4.0 a
9	peonidin-3-(6-acetyl)-glucoside	6.5 ± 5.6 a	7.0 ± 3.9 a	7.9 ± 4.0 a	7.6 ± 3.7 a	8.8 ± 4.3 a	10.8 ± 6.3 a	10.3 ± 7.1 a	6.4 ± 4.2 a	9.2 ± 7.3 a	6.9 ± 1.5 a	7.3 ± 3.9 a
10	malvidin-3-(6-acetyl)-glucoside	32.9 ± 9.4 a	53.8 ± 24.8 a	52.3 ± 21.0 a	51.6 ± 21.1 a	64.8 ± 10.8 a	68.7 ± 23.4 a	46.2 ± 25.1 a	47.4 ± 27.5 a	53.6 ± 27.6 a	68.1 ± 12.7 a	50.5 ± 22.6 a
	<i>total acetylated</i>	52.9 (16.5)	78.1 (16.9)	78.3 (14.3)	83.2 (12.4)	95.1 (14.8)	92.5 (12.1)	76.2 (13.9)	66.0 (14.2)	98.0 (14.2)	94.8 (13.7)	73.2 (12.3)
11	delphinidin-3-(6-p-coumaroyl)-glucoside	2.9 ± 3.0 a	4.2 ± 4.4 a	0.7 ± 0.6 a	5.0 ± 4.2 a	2.0 ± 1.6 a	5.3 ± 8.4 a	0.7 ± 0.7 a	1.2 ± 1.7 a	2.7 ± 4.9 a	2.3 ± 0.1 a	1.1 ± 1.0 a
12	cyanidin-3-(6-p-coumaroyl)-glucoside	0.6 ± 0.8 a	2.0 ± 1.1 a	2.1 ± 2.0 a	5.0 ± 6.5 a	5.2 ± 6.1 a	1.0 ± 0.5 a	1.8 ± 2.8 a	3.0 ± 1.8 a	2.4 ± 2.4 a	1.9 ± 2.2 a	5.2 ± 3.6 a
13	petunidin-3-(6-p-coumaroyl)-glucoside	1.4 ± 1.0 a	1.2 ± 0.4 a	1.9 ± 1.6 a	1.0	0.6 ± 0.5 a	0.7 ± 0.7 a	2.0 ± 1.7 a	1.5 ± 2.4 a	0.9 ± 0.6 a	0.5 ± 0.2 a	0.4 ± 0.4 a
14	peonidin-3-(6-p-coumaroyl)-glucoside	1.3 ± 0.9 a	2.3 ± 1.7 a	3.0 ± 1.5 a	3.7 ± 1.8 a	4.8 ± 1.6 a	4.8 ± 1.6 a	3.5 ± 2.5 a	3.6 ± 1.6 a	4.2 ± 4.0 a	3.3 ± 0.7 a	2.7 ± 1.9 a
15	malvidin-3-(6-p-coumaroyl)-glucoside	19.3 ± 8.5 a	27.7 ± 12.6 a	22.7 ± 7.7 a	23.4 ± 7.9 a	28.4 ± 8.4 a	31.8 ± 14.6 a	23.9 ± 12.5 a	20.8 ± 10.9 a	23.8 ± 14.1 a	31.0 ± 2.3 a	24.5 ± 13.6 a
	<i>total coumaroylated</i>	25.5 (8.0)	37.4 (8.1)	30.4 (5.6)	38.1 (5.7)	39.9 (6.2)	43.6 (5.7)	31.9 (5.8)	30.1 (6.5)	34.0 (4.9)	39.0 (5.6)	33.9 (5.7)
	<i>total anthocyanins</i>	319.9	462.0	545.7	671.2	640.7	763.2	548.7	466.2	689.4	694.1	597.2
	$\Sigma$ glucosylated / $\Sigma$ acetylated	4.4	4.3	5.4	6.0	5.0	6.2	5.5	5.5	5.4	5.4	6.0
	$\Sigma$ glucosylated / $\Sigma$ coumaroylated	9.2	9.0	13.9	13.2	11.8	13.2	13.2	12.0	15.6	13.2	13.0
	$\Sigma$ coumaroylated / $\Sigma$ acetylated	0.5	0.5	0.4	0.5	0.4	0.5	0.4	0.5	0.3	0.4	0.5
	$\Sigma$ acetylated / $\Sigma$ coumaroylated	2.1	2.1	2.6	2.2	2.4	2.1	2.4	2.2	2.9	2.4	2.2

<sup>a</sup>Different letters within the same row means significant differences ( $p < 0.05$ ) according to a Tukey HSD test. SD: standard deviation. nd: not detected. <sup>b</sup>Relationship (%) between anthocyanin derivatives by acylation and total anthocyanins.





**Figure 1.** Chromatographic profile of anthocyanins in Malbec wine. For peak identification, see **Table 3**.

In the case of coumaroyl derivatives, the concentrations ranged from 0.7 to 5.3 mg/L for delphinidin-3-(6-p-coumaroyl)glucoside, from 0.6 to 5.2 mg/L for cyanidin-3-(6-p-coumaroyl)glucoside, from 0.4 and 2.0mg/L for petunidin-3-(6-p-coumaroyl)glucoside, from 1.3 to 4.8 mg/L for peonidin-3-(6-p-coumaroyl)glucoside, and from 19.3 to 31.8 mg/L for the malvidin-3-(6-p-coumaroyl)glucoside.

Anthocyanin-derived pigments, such as vitisins, are of interest for winemakers because they have high stability during the aging of red wines. These pyranoanthocyanins are more resistant to elevated pH values and bisulfite bleaching than anthocyanins, and they present an orange-red color; these compounds are responsible for deeper colors than other pigments at the typical pH of wine (29). **Table 3** shows that all wines contained vitisin B (6.9-37.1 mg/L), but only the wines from zones 4, 5, 6, 10, and 11 contained vitisin A (9.8-16.1 mg/L). The differences observed in the vitisin concentrations could be related with the winemaking conditions (9), which could influence mainly the formation of vitisin B and in some cases of vitisin A.

**Low Molecular Weight Phenolic Composition.** **Table 4** shows the individual concentrations of the different non-flavonoids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids, *trans*-resveratrol glucoside, and tyrosol) and flavonoids (flavanols, flavanonols, and flavonols). **Figure 2** shows a chromatographic profile of low molecular weight phenolic compounds in Malbec wine samples.

An unknown compound (peak 23) was found in all of the wines studied. The peak eluted at 46min and has a UV spectrum with an absorption maximum at 279 nm, shown in **Figure 3**.

The phenolic acids (gallic, protocatechuic, syringic, *cis*-caftaric, *trans*-caftaric, caffeic, *cis*-coutaric, *trans*-coutaric, *cis-p*-coumaric, and *trans-p*-coumaric) and tyrosol were identified and quantified in all of the wines analyzed. By comparison of the average concentrations for the hydroxybenzoic acids, it was observed that gallic acid was the most abundant, representing 72-77% of all benzoic acids in the wines studied. These values are in accordance with some young Spanish red wines (30); however, the values are higher than those found by Peña-Neira et al. (15) in Spanish red wines.

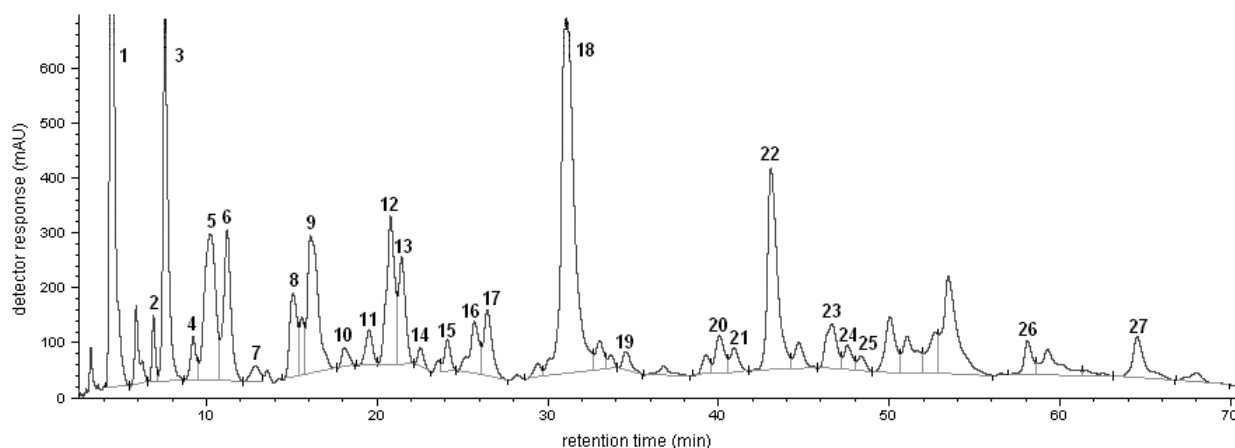
For the different hydroxycinnamic acids identified in the Malbec wines, their total contents were lower than those found by other authors in Spanish wines (31). Therein, different relationships were observed between the *trans* and *cis* isomers of caftaric, coutaric, and coumaric acids; on average, for all wines, the *trans/cis* ratios were 4.8, 2.2, and 0.2 for coumaric, coutaric, and caftaric acid, respectively.

Among non-flavonoids, stilbenes are the important compounds due to their putative protective effects against cardiovascular diseases (32). Some authors (33) have suggested that the concentrations of these compounds in wines vary from values of <1 to 30.0 mg/L, depending on multiple factors such as grape variety, fungal infections, winemaking procedures, and weather conditions. In this study, *trans*-resveratrol glucoside was the only stilbene identified, with concentrations ranging from 0.6 to 1.3 mg/L. These values are in agreement with those previously reported by other authors in Tempranillo, Cabernet Sauvignon, and Merlot wines (12). Finally, the levels of tyrosol, formed during yeast fermentation from tyrosine (15), were lower in the Malbec wines than those found in Tempranillo and Cabernet Sauvignon (34).

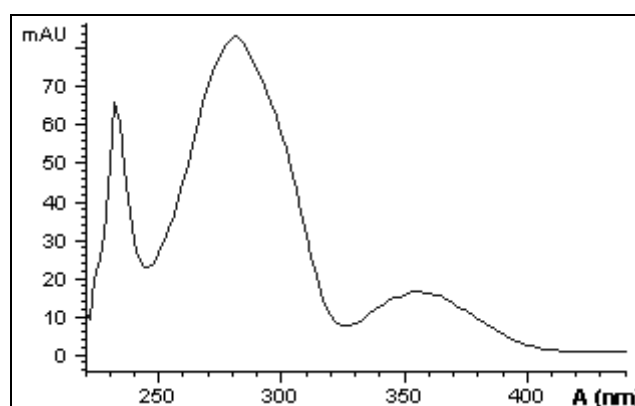
Flavonoids have been shown to inhibit low-density lipoprotein oxidation, both in vitro and in vivo, and reduce platelet aggregation (35). Flavan-3-ols (catechins) are some of the most widely occurring flavonoids, and the most important sources of these compounds in the diet are grapes and wines, at least in the Mediterranean region (36). Flavan-3-ols were the major class of phenolic compounds present in the samples studied. In all of the Malbec wines, the (b)-catechin contents were higher than those of (-)-epicatechin, with concentrations ranging from 24.4 to 47.0 mg/L and from 14.5 to 23.6 mg/L, respectively.

Flavonols accumulate in the skins of red grapes during ripening (37). The time of harvest and the vinification conditions have noticeable influences on flavonol content. The wines obtained from very ripe grapes with longer sun exposure contain higher concentrations of flavonols. In the Mendoza region, with a dry period during the harvest time and especially with high sunlight intensity, the grapes are allowed to ripen to a much greater extent than elsewhere, and this appears to be associated with an increased accumulation of flavonols (38, 39). In the Malbec wines studied, the

content of total flavonols was between 11.2 and 16.7 mg/L. These results are in agreement with those obtained by other authors in red wines of different geographical origins (30, 39).



**Figure 2.** Chromatographic profile of low-molecular weight phenolic compounds determined in Malbec wines. For peak identification, see **Table 4**.

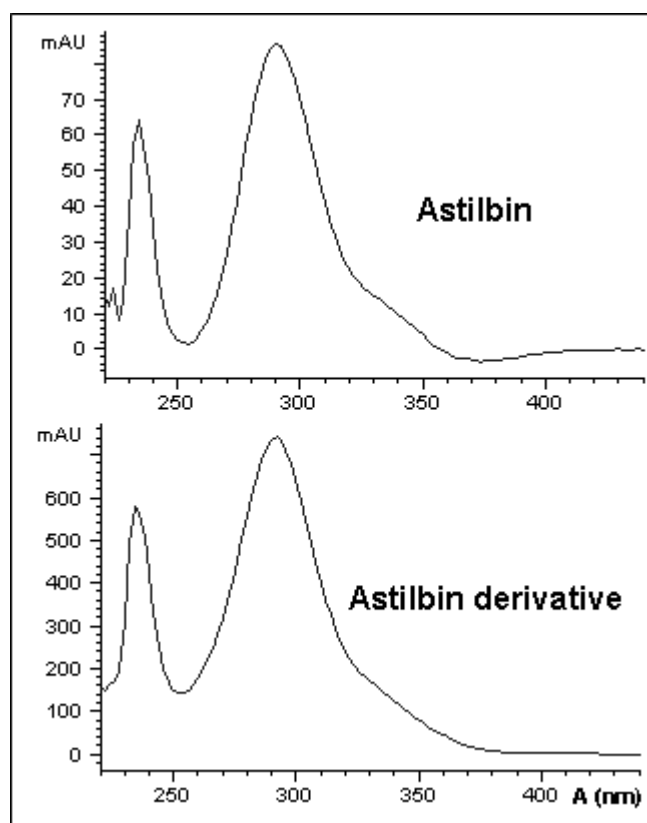


**Figure 3.** UV spectrum of non-identified phenolic compound in Malbec wines.

Another important 2-phenylbenzopyran subclass found commonly in fruit-based beverages is the dihydroflavonols (flavanonols). These compounds contribute to a smaller fraction of total wine flavonoids, and they play functional roles in grape berries. Flavanonols such as astilbin most likely function in plants to fight botrytis infection. Astilbin (dihydroquercetin-3-*O*-rhamnoside) is a bioactive flavanonol thought to provide antimicrobial, antibacterial, cardiopreventive, and possibly chemopreventive effects in humans (40). From the UV characteristics ( $\lambda_{\max}$  290 nm;  $\lambda_{\text{shoulder}}$  327 nm) (40), astilbin was tentatively identified in all of the Malbec wines, with concentrations ranging from 9.1 to 16.3 mg/L. These values are in agreement with those found by Vitrac et al. (33) in commercial red wines from southwestern France. Using the UV spectral information, it was possible to detect three astilbin derivatives (1, 2, and 3, **Table 4**) by comparison with the astilbin spectrum. The retention times of these compounds were 19, 31, and 33 min, respectively, and they presented a UV spectrum with an absorption maximum at 290 nm (**Figure 4**).

peak	compound	geographical zones of Mendoza <sup>a</sup>										
		1 (n=5)	2 (n=5)	3 (n=7)	4 (n=5)	5 (n=6)	6 (n=4)	7 (n=5)	8 (n=6)	9 (n=8)	10 (n=5)	11 (n=5)
<b>hydroxybenzoic acids</b>												
1	gallic	17.7 ± 6.6 a	13.8 ± 3.1 a	20.1 ± 5.1 a	18.5 ± 4.7 a	15.1 ± 3.8 a	21.7 ± 6.0 a	18.8 ± 5.2 a	17.5 ± 3.5 a	18.2 ± 4.2 a	18.6 ± 7.0 a	18.6 ± 6.7 a
2	protocatechuic	2.7 ± 0.8 a	2.3 ± 0.7 a	3.6 ± 0.7 a	2.3 ± 0.5 a	2.6 ± 0.8 a	4.1 ± 1.9 a	2.7 ± 0.7 a	2.4 ± 0.6 a	3.2 ± 0.9 a	2.5 ± 1.3 a	2.6 ± 0.9 a
13	syringic	3.3 ± 0.4 a	2.3 ± 1.0 a	4.1 ± 1.5 a	3.3 ± 1.1 a	3.0 ± 0.8 a	4.2 ± 1.1 a	3.5 ± 1.1 a	3.1 ± 0.6 a	2.9 ± 0.7 a	3.8 ± 2.2 a	2.9 ± 1.8 a
	<i>total</i>	23.7	18.4	27.8	24.1	20.7	30.0	25.0	23.0	24.3	24.9	24.1
<b>hydroxycinnamic acids</b>												
3	<i>cis</i> -cinnamic	2.8 ± 2.1 a	4.5 ± 2.3 a	2.4 ± 1.7 a	4.4 ± 2.4 a	3.5 ± 2.2 a	5.6 ± 6.5 a	5.0 ± 3.0 a	3.1 ± 1.3 a	3.0 ± 0.8 a	3.4 ± 1.4 a	5.1 ± 3.1 a
4	<i>trans</i> -cinnamic	0.9 ± 0.4 b	0.6 ± 0.2 ab	0.4 ± 0.1 ab	0.7 ± 0.2 ab	0.6 ± 0.3 ab	0.6 ± 0.3 ab	0.7 ± 0.2 ab	0.4 ± 0.1 a	0.4 ± 0.1 a	0.6 ± 0.1 ab	0.8 ± 0.4 ab
10	caffeic	2.4 ± 1.4 a	1.8 ± 2.0 a	2.0 ± 1.1 a	2.1 ± 1.1 a	1.7 ± 0.5 a	3.4 ± 2.9 a	1.9 ± 1.1 a	1.5 ± 0.7 a	1.8 ± 1.1 a	2.1 ± 2.5 a	1.3 ± 0.5 a
6	<i>cis</i> -coumaric	2.0 ± 1.5 a	2.2 ± 1.7 a	1.2 ± 1.1 a	3.1 ± 1.6 a	1.8 ± 1.0 a	2.4 ± 2.7 a	2.3 ± 1.9 a	2.1 ± 1.0 a	1.5 ± 0.7 a	2.0 ± 1.1 a	3.2 ± 1.7 a
12	<i>trans</i> -coumaric	3.0 ± 0.9 a	4.1 ± 1.9 a	5.1 ± 0.9 a	4.7 ± 1.7 a	4.1 ± 1.1 a	4.7 ± 1.2 a	6.0 ± 3.4 a	6.0 ± 3.4 a	5.4 ± 1.2 a	5.8 ± 3.3 a	3.6 ± 0.7 a
15	<i>cis-p</i> -coumaric	0.3 ± 0.1 a	0.4 ± 0.1 a	0.3 ± 0.2 a	0.4 ± 0.2 a	0.4 ± 0.1 a	0.6 ± 0.4 a	0.5 ± 0.2 a	0.5 ± 0.2 a	0.4 ± 0.2 a	0.4 ± 0.1 a	0.4 ± 0.2 a
16	<i>trans-p</i> -coumaric	2.7 ± 1.7 a	3.0 ± 2.1 a	2.2 ± 1.0 a	1.9 ± 0.8 a	1.9 ± 0.8 a	3.0 ± 2.0 a	1.4 ± 0.2 a	1.5 ± 1.2 a	1.6 ± 1.0 a	2.0 ± 2.3 a	2.0 ± 2.0 a
	<i>total</i>	14.1	16.6	13.6	17.3	14.0	20.3	17.8	15.1	14.1	16.3	16.4
<b>stilbene</b>												
20	<i>trans</i> -resveratrol glucoside	1.1 ± 0.6 a	0.9 ± 0.5 a	0.8 ± 0.4 a	1.2 ± 0.7 a	0.7 ± 0.4 a	1.3 ± 1.1 a	1.1 ± 0.5 a	0.6 ± 0.5 a	1.3 ± 0.5 a	1.0 ± 0.4 a	0.7 ± 0.4 a
<b>flavanols</b>												
7	procyanidin B3	3.6 ± 1.3 a	nd	2.1	3.4 ± 1.4 a	2.3 ± 0.4 a	2.6 ± 0.6 a	nd	5.9	3.1 ± 1.1 a	3.0 ± 1.8 a	2.7
8	procyanidin B1	7.3 ± 5.7 a	4.1 ± 3.8 a	7.5 ± 5.4 a	11.7 ± 3.5 a	5.6 ± 3.8 a	9.9 ± 7.0 a	2.5 ± 0.7 a	7.4 ± 6.8 a	10.0 ± 5.3 a	6.0 ± 4.2 a	5.2 ± 4.3 a
14	procyanidin dimer	5.4 ± 2.3 a	2.2	7.1 ± 5.9 a	3.7 ± 2.1 a	3.1 ± 1.5 a	2.3 ± 0.6 a	2.5 ± 0.4 a	3.1 ± 2.5 a	2.9 ± 1.4 a	3.5 ± 2.3 a	3.0 ± 0.5 a
9	(+)-catechin	26.0 ± 7.9 a	25.2 ± 5.9 a	33.6 ± 13.5 a	24.4 ± 8.9 a	28.1 ± 10.7 a	47.0 ± 9.9 a	39.3 ± 12.1 a	42.1 ± 25.1 a	33.6 ± 15.0 a	33.4 ± 22.2 a	29.3 ± 16.3 a
17	(-)-epicatechin	20.1 ± 6.8 a	14.5 ± 2.1 a	17.9 ± 5.6 a	14.6 ± 4.7 a	17.2 ± 5.3 a	23.6 ± 9.9 a	18.7 ± 5.2 a	20.2 ± 7.1 a	17.4 ± 5.5 a	18.4 ± 6.9 a	17.6 ± 9.3 a
	<i>total</i>	62.4	46.0	68.2	57.8	56.3	85.4	63.0	78.7	67.0	64.3	57.8
	(+)-catechin/(-)-epicatechin	1.3	1.7	1.9	1.7	1.6	2.0	2.1	2.1	1.9	1.8	1.7
<b>flavanonols</b>												
22	astilbin	9.1 ± 3.8 a	16.0 ± 3.5 ab	15.0 ± 3.4 ab	16.3 ± 1.7 b	12.2 ± 2.1 ab	14.8 ± 5.5 ab	14.7 ± 5.1 ab	16.0 ± 3.9 b	13.8 ± 2.3 ab	13.6 ± 1.8 ab	12.9 ± 2.9 ab
11	astilbin derivative 1	1.5 ± 0.4 a	1.9 ± 0.6 a	2.9 ± 1.4 a	2.8 ± 0.6 a	2.0 ± 0.7 a	2.7 ± 0.5 a	2.3 ± 0.7 a	2.2 ± 0.4 a	2.1 ± 0.5 a	2.6 ± 2.1 a	3.6 ± 1.2 a
18	astilbin derivative 2	28.3 ± 14.1 a	42.6 ± 2.5 ab	37.8 ± 5.4 ab	41.8 ± 5.9 ab	34.8 ± 3.6 ab	40.9 ± 12.6 ab	37.9 ± 7.9 ab	47.4 ± 14.2 b	39.9 ± 5.9 ab	47.9 ± 7.6 b	38.1 ± 6.5 ab
19	astilbin derivative 3	2.0 ± 1.1 a	2.0 ± 0.7 a	1.7 ± 0.5 a	1.6 ± 0.6 a	1.9 ± 0.9 a	1.6 ± 0.4 a	1.5 ± 0.2 a	2.4 ± 1.2 a	1.7 ± 0.7 a	2.5 ± 1.0 a	2.0 ± 1.5 a
	<i>total</i>	40.9	62.5	57.4	62.5	50.9	60.0	56.4	68.0	57.5	66.6	56.6
<b>flavonols</b>												
21	flavonol-glycoside 1	2.1	2.6 ± 1.7 a	3.8 ± 2.1 a	3.1 ± 2.2 a	3.1 ± 1.4 a	3.3 ± 4.2 a	3.3 ± 1.9 a	5.4 ± 3.3 a	3.8 ± 1.4 a	1.5 ± 0.6 a	0.8 ± 0.3 a
26	flavonol-glycoside 2	4.1 ± 1.3 a	2.7 ± 1.5 a	3.7 ± 1.0 a	4.3 ± 1.5 a	3.8 ± 2.0 a	3.0 ± 2.0 a	3.3 ± 2.3 a	2.8 ± 1.7 a	4.2 ± 1.8 a	2.9 ± 0.7 a	4.3 ± 1.9 a
24	myricetin-3-O-glucoside	1.6 ± 0.9 a	1.3 ± 0.1 a	1.3 ± 0.5 a	2.5 ± 0.6 a	1.7 ± 0.8 a	2.9 ± 1.7 a	1.9 ± 0.4 a	1.4 ± 0.9 a	1.7 ± 1.1 a	1.8 ± 0.9 a	1.8 ± 1.6 a
25	myricetin-3-O-galactoside	0.8 ± 0.3 a	1.0 ± 0.3 a	1.4 ± 1.0 a	0.9 ± 0.1 a	1.0 ± 0.1 a	0.9	0.9 ± 0.3 a	1.7 ± 1.1 a	0.9 ± 0.2 a	0.9 ± 0.2 a	0.7 ± 0.1 a
27	quercetin	4.3 ± 2.4 a	4.1 ± 1.9 a	3.2 ± 2.1 a	5.0 ± 1.5 a	4.4 ± 3.1 a	5.0 ± 2.0 a	4.9 ± 2.7 a	5.4 ± 2.5 a	4.7 ± 2.5 a	4.1 ± 1.7 a	4.5 ± 1.6 a
	<i>total</i>	12.9	11.7	13.4	15.8	14.0	15.1	14.3	16.7	15.3	11.2	12.1
<b>others compounds</b>												
5	tyrosol	5.0 ± 2.8 a	5.0 ± 1.4 a	5.8 ± 1.0 a	6.2 ± 1.3 a	5.7 ± 1.0 a	7.5 ± 0.9 a	5.7 ± 1.2 a	5.4 ± 1.1 a	6.7 ± 1.1 a	6.7 ± 1.8 a	5.5 ± 1.3 a
23	unknown compound	1.1 ± 0.4 a	2.1 ± 1.1 a	1.3 ± 0.3 a	1.9 ± 0.9 a	1.7 ± 0.7 a	2.2 ± 1.5 a	1.9 ± 1.8 a	2.6 ± 1.1 a	2.0 ± 0.5 a	1.8 ± 0.5 a	1.6 ± 0.7 a
	<i>total</i>	6.1	7.1	7.1	8.1	7.4	9.7	7.6	8.0	8.7	8.5	7.1
	<b>total phenolic compounds</b>	161.2	163.2	188.3	186.8	164.0	221.8	185.2	210.1	188.2	192.8	174.8

<sup>a</sup>Different letters within the same row means significant differences ( $p < 0.05$ ) according to a Tukey HSD test. SD, standard deviation; nd, not detected.



**Figure 4.** UV spectra of astilbin and one of the astilbin derivatives found in Malbec wines.

Considering that to our knowledge there is not any information in the literature about the chemical composition of Malbec wines, our discussion will consider a comparison of Malbec wines with those of other international red varieties.

It is irrefutable that the amounts as well as the several types of phenolic compounds that occur in wines depend on a wide range of factors, including cultural practices, local climate conditions, vinification techniques, storage, and aging (10-12, 14). These factors make it difficult to compare different wines. The examination of the polyphenolic composition has in some instances provided evidence of the potential of certain cultivars for polyphenol biosynthesis (41). The phenolic profile and the range of the data obtained in the Malbec samples analyzed in this work are in agreement with the available international literature for other red varieties. Their phenolic content was comparable to, and in some cases richer than, the content of the most well-known varieties used for producing quality wines (12, 15, 16, 25, 30, 31, 33, 36, 39, 41). The results obtained confirm a variation in phenolic content among wine samples tested and are indicative of the polyphenolic richness of the Malbec samples analyzed.

The critical assessment of the data from the wine samples analyzed clearly indicates some areas from Mendoza province to be distinctive for their exceptional polyphenolic potential. Considering total phenols, tannins, and anthocyanins, as well as the total anthocyanins determined

by HPLC-DAD, zones 9 and 6 were particularly rich in these phenolic groups. In addition, all Malbec wine samples were exceptionally high in total tannin content, which could be possibly used in mixtures with other varieties poor in tannins to produce balanced, in both mouth structure and body, wines.

The composition data that have been available to date do not permit the distinction of trends related to specific phenolic metabolites and, therefore, do not allow recognition of variety dependent patterns. With regard to other important international varieties (Syrah, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon), a similar but not identical phenolic profile was observed compared with previous works (9, 12, 15, 26, 41). The compound with an UV absorption spectra similar to that of the flavanonol astilbin, showing an absorption maximum at 290 nm but a different retention time, can correspond to an astilbin derivative (**Figure 4**). It was the major compound found among the low molecular weight phenolic compounds studied in all of the samples (astilbin derivative 2, **Table 4**). We have observed the same profile behavior in skin samples from Malbec grape berries compared with those from Cabernet Sauvignon, Carménère, and Syrah (data not published). These results and the low amount of flavonols (quercetin, myricetin, and kaempferol) and their glycosylated derivatives, compared with those described for Chilean Cabernet Sauvignon and Merlot wines (mean value of 29 mg/L for both varieties) (39), could be a distinctive phenolic profile of grapes and wines from the Malbec variety. Considering that dihydroflavonols (flavanonols) are precursors of flavonols (42), the high concentration of dihydroflavonols could be related with a lower activity for flavonol synthase (FLS) in Malbec grapes.

Flavan-3-ols were the major class of phenolic compounds present in the samples studied. In all of the Malbec wines, the (+)-catechin contents were higher than those of (-)-epicatechin. These results are in agreement with those presented by other authors for other varieties (16, 25, 36). In grapes, the biosynthesis of flavanol monomers involves two enzymes: leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR), responsible for the synthesis of (+)-catechin and (-)-epicatechin, respectively. The expression of these enzymes is mainly related to environmental conditions in the vineyard (42). Considering that the ratio (+)-catechin/(-)-epicatechin varies from 1.3 to 2.1 among the samples from the different zones studied, it could be possible to confirm the variation in the LAR and ANR activity due to the effect of environmental conditions. In addition, and independent from the zone, it is possible to suppose that the LAR enzyme is more active than the ANR in the Malbec variety.

**Figure 5** shows that the non-acylated glucosides were the most abundant group of pigments in Malbec wines studied (mean value=75.1%) compared with the acylated forms. These results are in agreement with those described by Núñez et al. (8) for other *Vitis vinifera* L. grape varieties such as Cabernet Sauvignon, Tempranillo, and Graciano. Considering the acylated derivatives, Malbec wines

presented a pattern, similar to that of Cabernet Sauvignon, that usually has a higher proportion of acetylglucosides than of coumaroylglucosides (mean values = 14.1 and 6.2%, respectively), whereas other varieties such as Tempranillo are characteristic for presenting the opposite values (9). With regard to the monomeric anthocyanins determined by HPLCAD, the total concentration of these compounds was higher than that described by Pérez-Lamela et al. (43) for wines from Sousón, Mencía, and Brancellao, three different *V. vinifera* red grape varieties grown in northwestern Spain.

For the verification of varietal authenticity in red wines, the use of the ratio of acetylated and coumaroylated anthocyanins ( $\Sigma$ acetylated/ $\Sigma$ coumaroylated) has been proposed (44). The values of this ratio obtained in this study ranged between 2.1 and 2.9 and are in the same range as those described for Carménère and Merlot wines (45). This implies that only with this parameter it is not possible to differentiate between wines of these three varieties. Additionally, the mean values obtained for the ratios  $\Sigma$ glucosylated/ $\Sigma$ acetylated and  $\Sigma$ glucosylated/ $\Sigma$ coumaroylated in the different Malbec wines were 4.3-6.2 and 9.0-15.6, respectively (Table 3).

As shown in Figure 6, the amounts of malvidin-3-glucoside were highest among all of the anthocyanins. This result could indicate that the methyltransferase enzyme involved in the biosynthesis of this anthocyanin is as active as it is in other *V. vinifera* varieties such as Syrah, Cabernet Sauvignon, and Pinot noir (46). The second most abundant anthocyanidin was petunidin, followed by delphinidin. This profile is different from those of other wine varieties such as Cabernet Sauvignon, Tempranillo, and Graciano (8). The low concentrations found for cyanidin derivatives could be explained by the fact that this anthocyanin is the biosynthetic precursor of all the others (47) and the synthetic pathway could be more active in this variety.

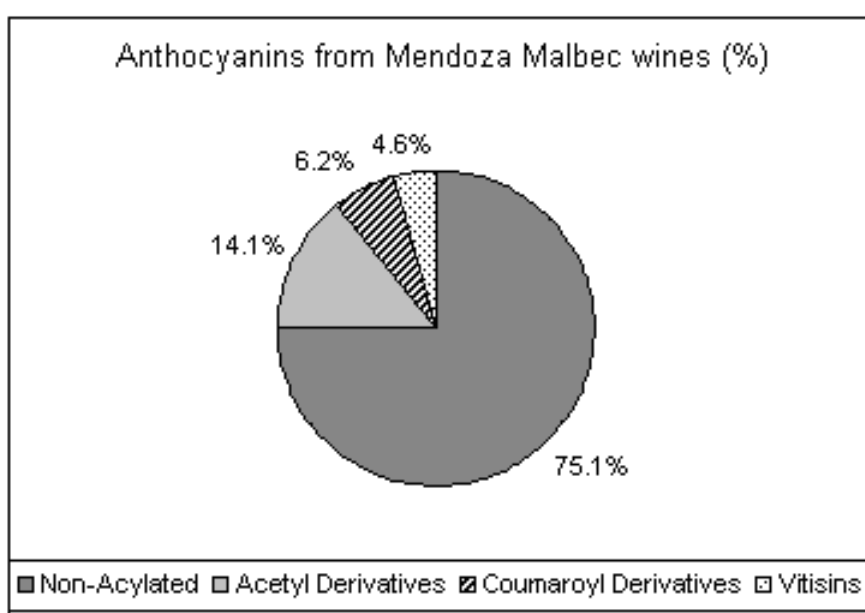


Figure 5. Anthocyanin distribution by acylation in Mendoza Malbec wines.

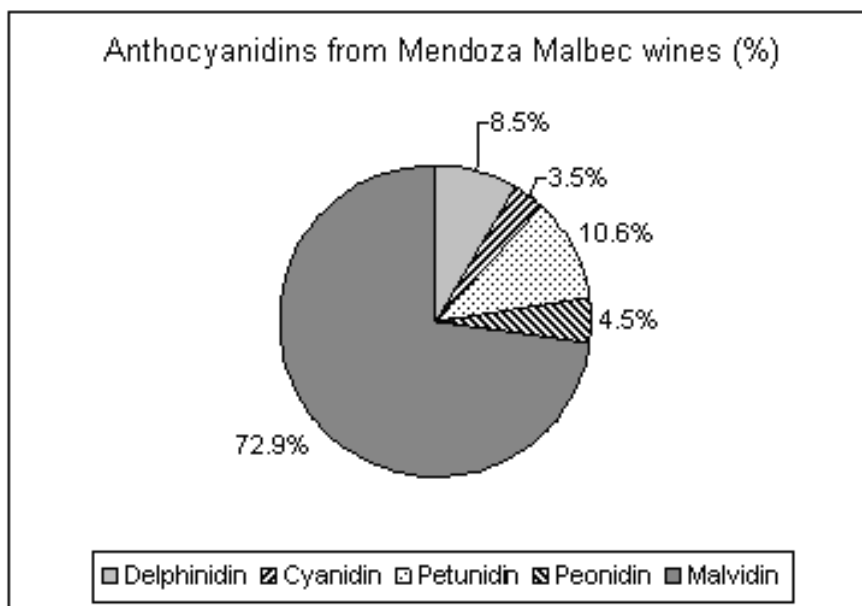


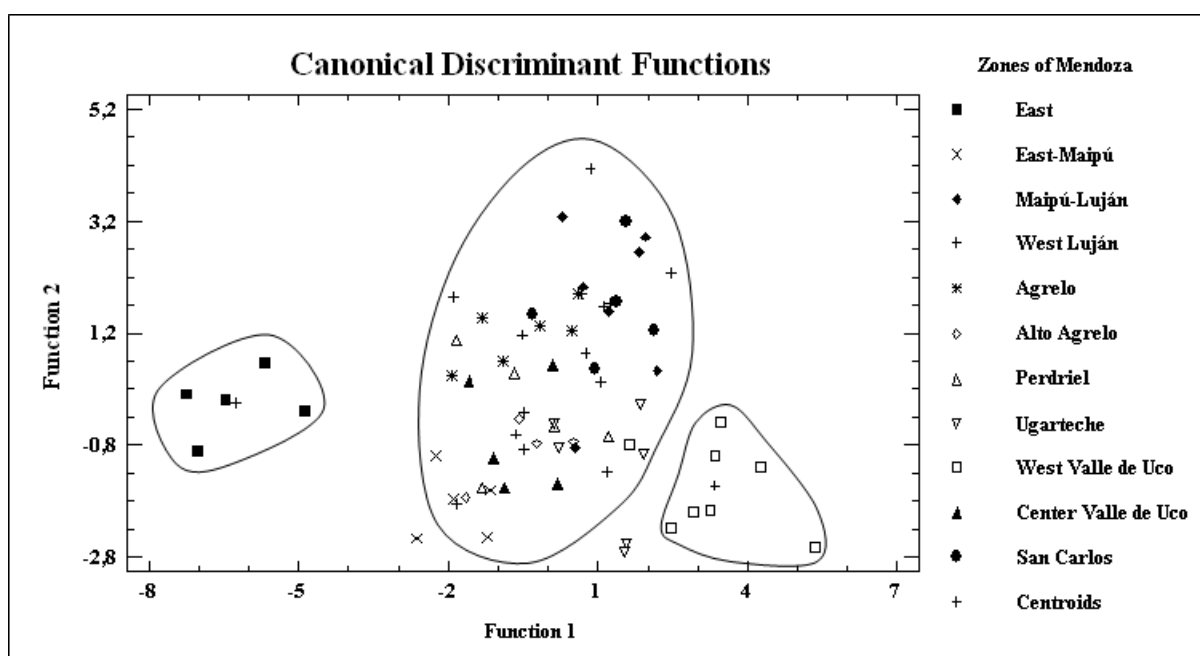
Figure 6. Anthocyanin distribution by anthocyanidin in Mendoza Malbec wines.

**Discriminant Analysis.** A canonical discriminant analysis (CDA) was applied to the data of the wines to obtain any differentiation based on their phenolic composition. This analysis was carried out by comparing the wines from the different geographical zones studied. This analysis included only the variables that presented normal distributions with a 90% or higher confidence level (gallic, protocatechuic, syringic, *cis*-caftaric, and *trans*-caftaric acids, tyrosol, (+)-catechin, (-)-epicatechin, astilbin derivatives 1 and 2, unknown compound (peak 23), malvidin-3-glucoside, malvidin-3-(6-acetyl)glucoside, peonidin-3-(6-p-coumaroyl)glucoside, malvidin-3-(6-p-coumaroyl)glucoside, total anthocyanins, color intensity, and hue values). Using a stepwise forward selection algorithm, two discriminating functions were determined ( $p < 0.05$ , 95%), which allowed the correct prediction of origin for 84% of the 61 wine samples studied. The variables gallic and protocatechuic acids, total anthocyanins, malvidin-3-glucoside, peonidin-3-(6-p-coumaroyl)glucoside, and astilbin derivatives were the most important variables for the classification of the samples analyzed.

Figure 7 depicts the distribution of Malbec samples in the plane defined by the two discriminating functions. A good discrimination was observed between wines from two extremely different zones: 1 (eastern Mendoza) and 9 (West Valle de Uco). They are principally differentiated by their altitudes above sea level (asl); zone 1 varies from 600 to 700 m asl, and zone 9 presented the highest altitudes in the whole region, between 1200 and 1500 m asl. For that reason, zone 9 is colder than zone 1 and the average day/night temperature during the ripening period reaches 20 °C (49). Samples from zone 9 presented a higher concentration of total phenols, tannins, and anthocyanins, which could indicate high tannin reactivity, as well as a greater potential for the formation of polymeric pigments and for color stability. These results are in agreement with those presented by



Miguel-Tabares et al. (48), who found that the cultivation altitude had a favorable effect on anthocyanin biosynthesis in red grapes, because higher concentrations of these compounds were reported at higher altitude. Conversely, Mateus et al. (50) demonstrated that low altitude (higher temperature and humidity), especially at the end of maturity, appears to be advantageous for producing higher concentrations of total flavanols and tannins. In the Malbec wines from eastern Mendoza (the low-altitude zone) similar results were not obtained, perhaps explained by the dry climate of the region. In addition, the high temperatures of this zone, above 32-35 °C during the ripening, strongly decrease the anthocyanin accumulation in grapes and are accompanied by poorer wine color, according to other authors (51). On the other hand, the close proximity of the wines from the remaining zones reflects the similar behavior among samples, in relation with the variables used for this discriminant analysis.



**Figure 7.** Canonical discriminant analysis of Malbec commercial wines from Mendoza, according to geographical zone ( $n = 61$ ).

The results presented in this paper show variations in some total phenolic variables analyzed and in the individual non-flavonoid and flavonoid contents of the Malbec wines from different geographical zones of Mendoza province. As a conclusion and considering the results presented above, the phenolic composition of Malbec wines from Mendoza is reported for the first time. Considering the individual phenolic composition analyzed by HPLC-DAD, the compound described as an astilbin derivative seems to be characteristic of Malbec wines, which differ from the phenolic profile of other wines from red varieties (e.g., Cabernet Sauvignon, Carménère, and Syrah). With regard to individual anthocyanins, wines of this cultivar are characterized by having a high

concentration of simple glucosides, principally the malvidin derivatives, as is observed in other red varieties.

The discriminant analysis applied allowed the differentiation of wines from three origins: eastern Mendoza, West Valle de Uco, and the remaining zones. The wines of West Valle de Uco presented higher concentrations of phenolic compounds that were reputed to possess greater potential to develop polymeric pigments and color stability, suitable for long aging.

The results are indicative of the polyphenolic richness of the Malbec variety from different origins of Mendoza and their potential to produce quality wines. More studies in grapes from specific zones with controlled viticultural conditions and in wines obtained by applying different winemaking practices should be carried out to confirm these observations and to improve the polyphenolic quality of the products.

#### ACKNOWLEDGMENT

Special thanks are due to all 23 wineries for supplying the samples used in the study and to Héctor Morales of the GIE for his collaboration in the HPLC analysis. David L. and Sharon C. (American Journal Experts) are thanked for correcting the English. This research was supported by INTA (Projects PNFRU3191-3194) and GIE (Grupo de Investigación Enológica, Universidad de Chile) International Collaboration Project.

#### LITERATURE CITED

- (1) Instituto Nacional de Vitivinicultura, Argentina. [www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/registrovinedossuperficie2007total%20pais.pdf](http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/registrovinedossuperficie2007total%20pais.pdf). **2008**.
- (2) Instituto Nacional de Vitivinicultura, Argentina. [www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/registrovnedos2007-mendoza.pdf](http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/registrovnedos2007-mendoza.pdf). **2008**.
- (3) Rodríguez, J.; Matus, S.; Catania, C.; Avagnina de Del Monte, S. El Malbec, cepaje emblemático de los vinos tintos argentinos. *Vinífera Año IV N<sup>o</sup>Extraordinario* **1999**, 61-64.
- (4) Landrault, N.; Poucheret, P.; Ravel, P.; Gasc, F.; Cros, G.; Teissedre, P. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3341-3348.
- (5) Frankel, E. N.; Waterhouse, A. L.; Teissedre, P. L. Principal phenolics phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 890-894.
- (6) Renaud, S. C.; de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **1992**, *339*, 1523-1526.

- (7) de Villiers, A.; Vanhoenacker, G.; Majek, P.; Sandra, P. Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 195-204.
- (8) Núñez, V.; Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biol. Technol.* **2004**, *31*, 69–79.
- (9) Monagas, M.; Núñez, V.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. Anthocyanin-derived pigments in Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon wines produced in Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* **2003**, *54*, 163-169.
- (10) Canals, R.; Llaudy, M. C.; Valls, J.; Canals, J. M.; Zamora, F. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4019-4025.
- (11) Berli, F.; D'Angelo, J.; Cavagnaro, B.; Bottini, R.; Wuilloud, R.; Silva, M. F. Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levels by capillary zone electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2892–2898.
- (12) Monagas, M.; Suarez, R.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 139-147.
- (13) Spayd, S. E.; Tarara, J. M.; Mee, D. L.; Ferguson, J. C. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 171-182.
- (14) Cheynier, V.; Moutounet, M.; Sarni-Manchado, P. Los compuestos fenólicos. In *Enología. Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, 1st ed.; Flanzy, C., Ed.; AMV Ediciones and Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, Spain, 2000; pp 114-136.
- (15) Peña-Neira, A.; Hernández, T.; García-Vallejo, C.; Estrella, I.; Suarez, J. A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origins. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *210*, 445-448.
- (16) Goldberg, D.; Karumanchiri, A.; Tsang, E.; Soleas, G. Catechin and epicatechin concentrations of red wine: regional and cultivar-related differences. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 23-34.
- (17) Boss, P. K.; Davies, C.; Robinson, S. P. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* **1996a**, *111*, 1059-1066.
- (18) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. Phenolic compounds. In *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*; Wiley and Sons Ltd., Eds.: Chichester, UK, 2000; Vol. 2, pp 129-186.

- (19) Porter, L. J.; Hritsch, L. N.; Chan, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 223-230.
- (20) Glories, Y. La couleur des vins rouges. 2ème partie. Mesure, origine et interpretation. *Conn. Vigne. Vin.* **1984b**, *18*, 253-271.
- (21) Zoecklein, B.; Fugelsang, K.; Gump, B.; Nury, F. In *Análisis y Producción de Vino*; Acibia, Ed.: Zaragoza, España, 2001; 634 p.
- (22) Vivas, N.; Glories, Y.; Lagune, L.; Saucier, C.; Augustin, M. Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au *p*-dimethylaminocinnamaldéhyde. *J. Int. Sci. Vigne. Vin.* **1994**, *28*, 319-336.
- (23) Glories, Y. La couleur des vins rouges. 1ère partie. Les equilibres des anthocyanes et des tanins. *Conn. Vigne. Vin.* **1984a**, *18*, 195-217.
- (24) Peña-Neira, A.; Cáceres, A.; Pastenes, C. Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of clusters thinning and vineyard yield. *Food Sci. Tech. Int.* **2007**, *13*, 153-158.
- (25) Minussi, R.; Rossi, M.; Bologna, L.; Cordi, L.; Rotilio, D.; Pastore, G.; Durán, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem.* **2003**, *82*, 409-416.
- (26) González-Neves, G.; Charamelo, D.; Balado, J.; Barreiro, L.; Bochicchio, R.; Gatto, G.; Gil, G.; Tessore, A.; Carbonneau, A.; Moutounet, M. Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 191-196.
- (27) Llaudy, M. C.; Canals, R.; Canals, J. M.; Rozés, N.; Arola, L.; Zamora, F. New method for evaluating astringency in red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 742-746.
- (28) Ribéreau-Gayon, P. The chemistry of red wine color. In *The Chemistry of Winemaking*; Webb, A. D., Ed.; American Chemical Society: Washington DC, 1985; Vol. 137, pp 50-87.
- (29) Bakker, J.; Timberlake, C. Isolation, identification and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 35-43.
- (30) García-Falcón, M. S.; Pérez-Lamela, C.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J. Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chem.* **2007**, *105*, 248-259.
- (31) Pérez-Magariño, S.; González-San José, M. L. Differentiation parameters of Ribera del Duero wines from other Spanish denominations of origin. *Food Sci. Tech. Int.* **2001**, *7*, 237-244.
- (32) Saiko, P.; Szakmary, A.; Jaeger, W.; Szekeres, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat. Res.* **2008**, *658*, 68-94.

- (33) Vitrac, X.; Monti, J. P.; Vercauteren, J.; Deffieux, G.; Mérillon, J. M. Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 103–110.
- (34) Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and colour characteristics of wines. *Food Chem.* **2007**, *104*, 814-823.
- (35) Fuhrman, B.; Lavy, A.; Aviram, M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid lipoperoxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *61*, 549-554.
- (36) Carando, S.; Teissedre, P. L.; Pascual-Martinez, L.; Cabanis, J. C. Levels of flavan-3-ols in French wines. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4161-4166.
- (37) Peña-Neira, A.; Duarte, A.; Hernández, T.; Estrella, I.; Dueñas, M.; Loyola, E. Effects of ripening stages and of plant vegetative vigor on the phenolic composition of grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon in the Maipo Valley (Chile). *Vitis* **2004**, *43*, 51-57.
- (38) Lenk, S.; Buschmann, C.; Pfündel, E. *In vivo* assessing flavonols in white grape berries (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot Blanc) of different degrees of ripeness using chlorophyll fluorescence imaging. *Funct. Plant Biol.* **2007**, *34*, 1092–1104.
- (39) McDonald, M. S.; Hughes, M.; Burns, J.; Lean, M. E. J.; Matthews, D.; Crozier, A. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 368-375.
- (40) Landrault, N.; Larronde, F.; Delaunay, J. C.; Castagnino, C.; Vercauteren, J.; Merillon, J. M.; Gasc, F.; Cros, G.; Teissedre, P. L. Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2046-2052.
- (41) Kallithraka, S.; Tsoutsouras, E.; Tzourou, E.; Lanaridis, P. Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chem.* **2006**, *99*, 784-793.
- (42) Bogs, J.; Downey, M.; Harvey, J.; Ashton, A.; Tanner, G.; Robinson, S. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 652-663.
- (43) Pérez-Lamela, C.; García-Falcón, M. S.; Simal-Gándara, J.; Orriols-Fernández, I. Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chem.* **2007**, *101*, 601–606.

- (44) Otteneder, H.; Marx, R.; Zimmer, M. Analysis of anthocyanin composition of Cabernet sauvignon and Portuguese wines provides an objective assessment of the grape varieties. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2004**, *10*, 3-7.
- (45) Von Baer, D.; Mardones, C.; Gutierrez, L.; Hofmann, G.; Becerra, J.; Hirschfeld, A.; Vergara, C. Varietal authenticity verification of Cabernet Sauvignon, Merlot and Carménère wines produced in Chile by their anthocyanin, flavonol and shikimic acid profiles. *Bull. O.I.V.* **2005**, *78*, 45-57.
- (46) Boss, P.; Davies, C.; Robinson, S. Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **1996b**, *2*, 163-170.
- (47) Roggero, J.; Coen, S.; Ragonnet, B. High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. *Am. J. Enol. Vitic.* **1986**, *37*, 77-83.
- (48) Miguel-Tabares, J. A.; Martín-Luis, B.; Carrillo-López, M.; Díaz-Díaz, E.; Darias-Martín, J. Effect of altitude on the wine-making potential of Listan negro and Ruby Cabernet cultivars in the south of Tenerife Island. *J. Int. Sci. Vigne. Vin.* **2002**, *36*, 185-194.
- (49) Catania, C.; Avagnina de del Monte, S. Las Regiones Vitícolas Argentinas. *Rev. Agro de Cuyo INTA* **1994**, *4*, 78-84.
- (50) Mateus, N.; Marques, S.; Gonçalves, A.; Machado, J.; De Freitas, V. Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro Valley during ripening: influence of cultivation altitude. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 115-121.
- (51) Mori, K.; Sugaya, S.; Gemma, H. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci. Hortic.* **2005**, *105*, 319-330.

### **Caracterización de la fracción flavánica y otras fracciones fenólicas de vinos Malbec de diferentes zonas geográficas de la Provincia de Mendoza**



## 1. Consideraciones generales

La composición fenólica del vino comprende un grupo heterogéneo de sustancias químicas de estructuras moleculares diversas, provenientes principalmente de las partes sólidas de la baya (hollejos y semillas), las cuáles son transferidas al mismo durante el proceso de vinificación. Entre ellas, la fracción más abundante corresponde a las proantocianidinas o taninos condensados (Kennedy et al., 2006b). Las mismas están constituidas por subunidades de flavanoles [(+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina-3-galato (ECG) y (-)-epigallocatequina (EGC)] generando una amplia gama de compuestos de distinto tamaño molecular, incluyendo desde dímeros hasta polímeros de más de 30 subunidades. Las proantocianidinas de hollejos difieren de las encontradas en semillas, ya que las primeras contienen (-)-epigallocatequina, y poseen un mayor grado de polimerización y una menor proporción de subunidades galoiladas. Por el contrario, los taninos de semillas poseen subunidades de (-)-epicatequina-3-galato, el cual se encuentra prácticamente ausente en hollejos (Prieur et al., 1994; Souquet et al., 1996; Cheynier, 2005).

Los flavanoles constituyen uno de los parámetros de calidad más importantes en vinos tintos, ya que contribuyen en gran medida a propiedades sensoriales tales como astringencia, amargor y cuerpo (Gawel, 1998; Peleg et al., 1999), interactúan con proteínas y polisacáridos, y participan activamente en la estabilización del color durante la vinificación y crianza (Terrier et al., 2009). Según diversos estudios, la astringencia y el amargor dependen de las características estructurales de las proantocianidinas, como el tamaño molecular, la composición monomérica y el grado de galoilación. Así, a medida que aumenta el grado de polimerización y el porcentaje de galoilación, aumenta la sensación de astringencia (Peleg et al., 1999; Vidal et al., 2003a). Mientras que con respecto al amargor, esta sensación gustativa es causada principalmente por monómeros y oligómeros de flavanoles, y su intensidad también aumenta con el grado de galoilación (Santos-Buelga y De Freitas, 2009). Por lo tanto, el conocimiento de la composición estructural de las proantocianidinas del vino resulta esencial para la definición de sus características sensoriales.

Es bien conocido que la composición flavánica del vino depende de la variedad de uva, y está influenciada por la ubicación geográfica del viñedo, por factores que afectan su desarrollo y por su estado de madurez (Cheynier et al., 2000). El Malbec (*Vitis vinifera* L.) es una variedad ampliamente cultivada en todas las zonas vitícolas de la Provincia de Mendoza, y de acuerdo a los resultados obtenidos en los Apartados I.1 y I.2 (Capítulo I) sus bayas y vinos poseen niveles elevados de flavanoles. Sin embargo, no existe información pormenorizada sobre la distribución de las diferentes fracciones flavánicas, grado medio de polimerización y galoilación de dichos compuestos en los vinos de esta variedad. Por lo tanto, para complementar la información descrita hasta el momento, se propuso caracterizar la composición flavánica de vinos Malbec de diferentes zonas vitícolas de



Mendoza. Paralelamente, se estudiaron los parámetros fenólicos restantes con el propósito de confirmar las observaciones presentadas en el Apartado I.2 (Capítulo I).

## 2. Condiciones experimentales

El estudio se realizó en la vendimia 2009. Se analizaron 27 vinos monovarietales cv. Malbec cosecha 2009, provenientes de 9 zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (**Tabla 1**). Se emplearon 3 réplicas por zona correspondientes a vinos terminados con fermentación maloláctica, estabilizados, sin crianza en madera y envasados en botellas de vidrio de 750 mL en condiciones controladas. Cabe destacar que a diferencia del estudio descrito en el Apartado I.2 (Capítulo I), donde se estudiaron vinos de 11 zonas geográficas, en este ensayo se excluyeron los vinos provenientes de Alto Agrelo y de Ugarteche. Esta decisión se debió a la proximidad y similitud agroecológica existentes entre Alto Agrelo y Agrelo, y entre Ugarteche y Perdriel, descartándolas del ensayo.

Con el objetivo de asegurar la pureza de las muestras, las mismas fueron obtenidas directamente de 12 bodegas comerciales, representativas de la Provincia de Mendoza, dedicadas principalmente a la producción de vinos monovarietales. Las botellas de 750 mL con los vinos estudiados fueron conservados en posición horizontal (13-15 °C, 40-50% de humedad relativa, oscuridad) hasta el momento de análisis. Cada botella se abrió inmediatamente antes de los análisis. Debido al tiempo requerido para completar todas las determinaciones (aproximadamente 1 mes), las muestras fueron transferidas, bajo corriente de gas nitrógeno, a botellas plásticas color ámbar completamente llenas para asegurar su preservación. Los vinos fueron sometidos a la determinación de los diferentes parámetros fenólicos, siguiendo la metodología detallada en el Anexo I.

<b>Tabla 1. Características geográficas de las distintas zonas de Mendoza.</b>				
<b>Zona</b>	<b>Descripción</b>	<b>Altitud (msnm<sup>a</sup>)</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
1	Este (San Martín, Junín, Rivadavia)	650	33° 05' S	68° 28' O
2	Maipú este (Russell, Cruz de Piedra, Medrano)	750	32° 58' S	68° 45' O
3	Maipú-Luján (Mayor Drummond, Lunlunta)	910	33° 00' S	68° 52' O
4	Luján oeste (Vistalba)	1000	33° 01' S	68° 58' O
5	Agrelo	970	33° 07' S	68° 52' O
6	Perdriel	940	33° 04' S	68° 52' O
7	Valle de Uco oeste (Gualtallary, Alto Valle)	1450	33° 24' S	69° 17' O
8	Valle de Uco centro (Agua Amarga, La Arboleda)	1050	33° 22' S	69° 08' O
9	San Carlos (La Consulta, Altamira, El Cepillo)	1100	33° 43' S	69° 07' O

<sup>a</sup> msnm (metros sobre el nivel del mar)

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Parámetros analíticos generales

Los vinos Malbec de las distintas zonas evaluadas fueron caracterizados inicialmente a través de los parámetros analíticos presentados en la **Tabla 2**. Los valores de acidez titulable y pH para todos los vinos analizados estuvieron comprendidos entre 5,0-6,5 g/L y 3,49-3,77, respectivamente, indicando una baja dispersión de los mismos y ausencia de diferencias significativas entre las zonas consideradas.

Al analizar los parámetros fenólicos generales, se observaron diferencias significativas entre las muestras evaluadas, presentándose en general un mayor potencial fenólico en vinos provenientes de las regiones de mayor altitud (zonas 7, 8 y 9), coincidiendo con el estudio realizado previamente (Apartado I.2, Capítulo I). Esta tendencia se confirmó en los niveles determinados de fenoles totales, proantocianidinas totales y antocianos libres y totales (**Tabla 2**). Sin embargo, la concentración molar de flavanoles (flavanoles DMACH) y el índice de gelatina (IG) fueron similares entre los vinos de las diferentes zonas, sin encontrarse diferencias significativas entre los mismos.

En cuanto a los parámetros de color, en el presente estudio se efectuó un análisis más profundo complementando las determinaciones realizadas en el Apartado I.2 (Capítulo I). Paralelamente a lo observado con respecto a los antocianos totales, los vinos de la zona 7 presentaron valores significativamente superiores de IC e inferiores de  $L^*$  en comparación al resto, indicando un color más profundo e intenso debido principalmente a la componente roja (% de color rojo). Por el contrario, los vinos de las zonas 1 y 2 mostraron un comportamiento opuesto, presentando menores valores de IC y  $C^*$  y mayores niveles de  $L^*$ , indicando menor color y una mayor proporción de la componente amarilla (% de color amarillo).

**Tabla 3.** Diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) entre vinos Malbec de distintas zonas de Mendoza.

	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Zona 5	Zona 6	Zona 7	Zona 8	Zona 9
Zona 1		13,2 ± 5,8	15,0 ± 5,9	18,5 ± 4,4	25,7 ± 2,9	13,2 ± 5,7	30,6 ± 0,5	22,5 ± 5,8	28,5 ± 2,5
Zona 2	13,2 ± 5,8		11,6 ± 3,7	16,6 ± 3,0	13,7 ± 2,6	16,1 ± 4,7	18,4 ± 5,8	18,4 ± 2,6	16,4 ± 2,9
Zona 3	15,0 ± 5,9	11,6 ± 3,7		8,5 ± 4,7	13,9 ± 5,1	13,5 ± 2,8	17,2 ± 6,6	10,2 ± 3,9	16,2 ± 4,1
Zona 4	18,5 ± 4,4	16,6 ± 3,0	8,5 ± 4,7		12,2 ± 5,9	8,2 ± 1,6	15,8 ± 4,2	8,8 ± 1,2	16,1 ± 4,1
Zona 5	25,7 ± 2,9	13,7 ± 2,6	13,9 ± 5,1	12,2 ± 5,9		15,5 ± 7,4	7,8 ± 2,8	10,5 ± 4,7	6,0 ± 0,6
Zona 6	13,2 ± 5,7	16,1 ± 4,7	13,5 ± 2,8	8,2 ± 1,6	15,5 ± 7,4		19,8 ± 4,9	10,5 ± 5,6	18,9 ± 6,4
Zona 7	30,6 ± 0,5	18,4 ± 5,8	17,2 ± 6,6	15,8 ± 4,2	7,8 ± 2,8	19,8 ± 4,9		10,9 ± 5,2	8,4 ± 3,3
Zona 8	22,5 ± 5,8	18,4 ± 2,6	10,2 ± 3,9	8,8 ± 1,2	10,5 ± 4,7	10,5 ± 5,6	10,9 ± 5,2		11,3 ± 4,8
Zona 9	28,5 ± 2,5	16,4 ± 2,9	16,2 ± 4,1	16,1 ± 4,1	6,0 ± 0,6	18,9 ± 6,4	8,4 ± 3,3	11,3 ± 4,8	

Todos los datos están expresados como la media ± error estándar ( $n = 3$ ).

**Zona geográfica de Mendoza**

Parámetro	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acidez titulable (ácido tartárico, g/L)	5,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,5 a	5,4 ± 0,3 a	5,3 ± 0,3 a	6,3 ± 0,3 a	5,2 ± 0,4 a	6,5 ± 0,2 a	5,0 ± 0,6 a	6,0 ± 0,9 a
pH	3,77 ± 0,06 a	3,69 ± 0,16 a	3,69 ± 0,03 a	3,70 ± 0,18 a	3,49 ± 0,07 a	3,63 ± 0,04 a	3,60 ± 0,02 a	3,71 ± 0,06 a	3,55 ± 0,09 a
AT (Mv3gl, mg/L)	352,2 ± 8,8 a	533,5 ± 49,8 ab	480,5 ± 36,2 ab	648,6 ± 66,5 ab	595,5 ± 70,3 ab	588,9 ± 92,9 ab	829,7 ± 109,6 b	668,9 ± 81,9 ab	608,0 ± 63,9 ab
AL (Mv3gl, mg/L)	197,4 ± 6,9 a	339,0 ± 25,9 ab	284,8 ± 18,4 ab	406,4 ± 33,7 abc	372,1 ± 52,9 abc	390,9 ± 45,2 abc	557,6 ± 67,5 c	431,1 ± 52,8 bc	379,1 ± 42,9 abc
AC (Mv3gl, mg/L)	154,8 ± 14,6 a	194,6 ± 24,1 a	195,7 ± 18,3 a	242,2 ± 33,2 a	223,4 ± 17,7 a	197,9 ± 50,0 a	272,0 ± 45,1 a	227,8 ± 29,9 a	228,9 ± 22,1 a
IC ( $A_{420nm} + A_{520nm} + A_{620nm}$ ) <sup>10</sup>	9,3 ± 0,7 a	10,3 ± 1,3 a	12,8 ± 1,1 ab	12,5 ± 1,2 ab	19,2 ± 2,6 ab	14,0 ± 2,0 ab	21,6 ± 3,4 b	17,6 ± 1,6 ab	20,4 ± 2,5 b
% de color amarillo	35,1 ± 0,9 b	31,3 ± 0,4 ab	31,4 ± 0,5 ab	31,9 ± 0,3 ab	30,5 ± 1,0 ab	26,9 ± 1,7 a	27,4 ± 1,9 a	32,5 ± 1,1 ab	30,7 ± 1,5 ab
% de color rojo	52,1 ± 1,6 a	57,9 ± 0,6 a	56,4 ± 1,1 a	54,4 ± 0,8 a	56,6 ± 1,2 a	57,4 ± 3,6 a	61,7 ± 2,8 a	53,7 ± 1,9 a	58,0 ± 2,0 a
% de color azul	12,8 ± 0,7 a	10,8 ± 0,2 a	12,2 ± 0,7 a	13,8 ± 1,1 a	13,0 ± 0,3 a	12,3 ± 1,3 a	10,9 ± 0,9 a	13,8 ± 0,9 a	11,4 ± 0,5 a
L*	54,8 ± 2,7 b	44,9 ± 5,5 ab	44,7 ± 2,3 ab	41,1 ± 6,0 ab	33,1 ± 3,4 ab	45,6 ± 7,5 ab	29,3 ± 4,0 a	36,3 ± 3,9 ab	32,7 ± 1,8 ab
C*	43,6 ± 3,2 a	49,4 ± 2,3 a	54,0 ± 2,2 a	55,6 ± 4,0 a	56,3 ± 1,9 a	50,3 ± 4,2 a	56,5 ± 2,5 a	53,9 ± 4,1 a	58,7 ± 3,3 a
h	7,0 ± 1,5 a	12,2 ± 2,6 ab	7,2 ± 1,0 a	15,5 ± 1,9 b	12,3 ± 2,2 ab	12,8 ± 1,2 ab	10,3 ± 0,9 ab	12,3 ± 0,9 ab	17,3 ± 1,6 b
a*	43,3 ± 3,3 a	50,8 ± 3,0 a	53,7 ± 2,0 a	54,5 ± 2,9 a	55,0 ± 1,5 a	49,9 ± 4,0 a	55,1 ± 3,3 a	53,1 ± 3,7 a	56,3 ± 2,3 a
b*	3,1 ± 0,5 a	6,2 ± 0,9 ab	5,8 ± 0,6 ab	5,6 ± 0,4 ab	9,8 ± 1,4 bc	8,0 ± 1,5 ab	10,0 ± 0,9 bc	10,3 ± 1,2 bc	14,4 ± 1,4 c
CC (%)	21,5 ± 1,7 ab	24,3 ± 1,5 ab	20,2 ± 1,1 ab	21,8 ± 0,6 ab	15,9 ± 3,1 a	23,3 ± 1,2 ab	25,6 ± 1,4 b	24,5 ± 1,2 ab	16,5 ± 3,4 ab
CP (%)	29,0 ± 1,2 b	25,2 ± 0,6 ab	28,4 ± 0,2 ab	24,8 ± 0,9 ab	29,9 ± 1,9 b	25,1 ± 0,8 ab	23,0 ± 1,2 a	25,4 ± 1,1 ab	28,5 ± 1,6 ab
FT (EAG, mg/L)	2370,2 ± 176,6 ab	2563,4 ± 283,8 ab	2306,7 ± 78,0 a	2690,3 ± 260,5 ab	3136,0 ± 267,9 ab	2540,3 ± 396,6 ab	3433,7 ± 351,0 ab	3755,4 ± 452,5 b	3205,2 ± 147,4 ab
PA (Cat, mg/L)	2628,2 ± 307,0 a	2899,3 ± 181,2 a	2827,6 ± 327,1 a	2441,3 ± 349,7 a	3885,3 ± 262,1 ab	2896,3 ± 368,1 a	3657,4 ± 234,1 ab	4533,5 ± 250,6 b	4466,3 ± 305,9 b
FL (Cat, mol/L)	$1,4 \times 10^{-3} \pm 8,8 \times 10^{-5}$ a	$1,4 \times 10^{-3} \pm 1,5 \times 10^{-4}$ a	$1,2 \times 10^{-3} \pm 5,8 \times 10^{-5}$ a	$1,3 \times 10^{-3} \pm 1,0 \times 10^{-4}$ a	$1,7 \times 10^{-3} \pm 1,5 \times 10^{-4}$ a	$1,5 \times 10^{-3} \pm 1,8 \times 10^{-4}$ a	$1,7 \times 10^{-3} \pm 1,7 \times 10^{-4}$ a	$1,7 \times 10^{-3} \pm 3,2 \times 10^{-4}$ a	$1,9 \times 10^{-3} \pm 8,8 \times 10^{-5}$ a
IG (%)	68,4 ± 1,0 a	74,9 ± 2,8 a	72,1 ± 6,6 a	72,7 ± 2,4 a	76,4 ± 2,1 a	76,2 ± 5,5 a	74,3 ± 7,8 a	70,6 ± 4,2 a	73,6 ± 6,6 a

\* Media ± error estándar (n = 3). AT, antocianos totales; AL, antocianos libres; AC, antocianos combinados; IC, intensidad colorante; L\*, claridad; C\*, saturación; h, tonalidad; a\*, rojo-verde; b\*, amarillo-azul; CC, color copigmentado; CP, color debido a pigmentos poliméricos; FT, fenoles totales; PA, proantocianidinas totales; FL, flavanoles DMACH; IG, índice de gelatina. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre zonas (Tukey HSD, p<0,05).

La **Tabla 3** muestra la diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) entre los vinos de las diferentes zonas evaluadas. Este parámetro resulta de gran interés para la industria vitivinícola ya que expresa la capacidad del ojo humano para discriminar dos vinos a través del color. Pérez-Magariño y González-Sanjosé (2003) establecieron que los catadores serían capaces de distinguir el color de dos vinos a través de una copa sólo si  $\Delta E^* \geq 5$  unidades. En el presente estudio los valores de  $\Delta E^*$  obtenidos entre los vinos de las distintas zonas fueron superiores al valor mencionado.

Finalmente, analizando la contribución del CC (%) al color total del vino se observó una mayor proporción en vinos de la zona 7 (25,6%), debido probablemente a un mayor contenido de antocianos y de otros compuestos responsables del color. Adicionalmente, todos los vinos del ensayo manifestaron una importante fracción de copigmentación, lo cual podría explicarse por el corto tiempo de envejecimiento de los mismos previo al análisis (vinos del año). Estas observaciones concuerdan con Boulton (2001), quién sugirió que aproximadamente el 30-50% del color rojo de los vinos tintos jóvenes depende del desarrollo y de la concentración de antocianinas copigmentadas. Por el contrario, el grado de polimerización observado (CP) coincidió con los niveles de antocianos combinados (CA). Los vinos de la zona 7, cuya proporción de CA fue del 32,7% presentaron el menor grado de polimerización (23,0%), mientras que los vinos de la zona 1 con 43,9% de CA mostraron un grado de polimerización mayor (29,0%).

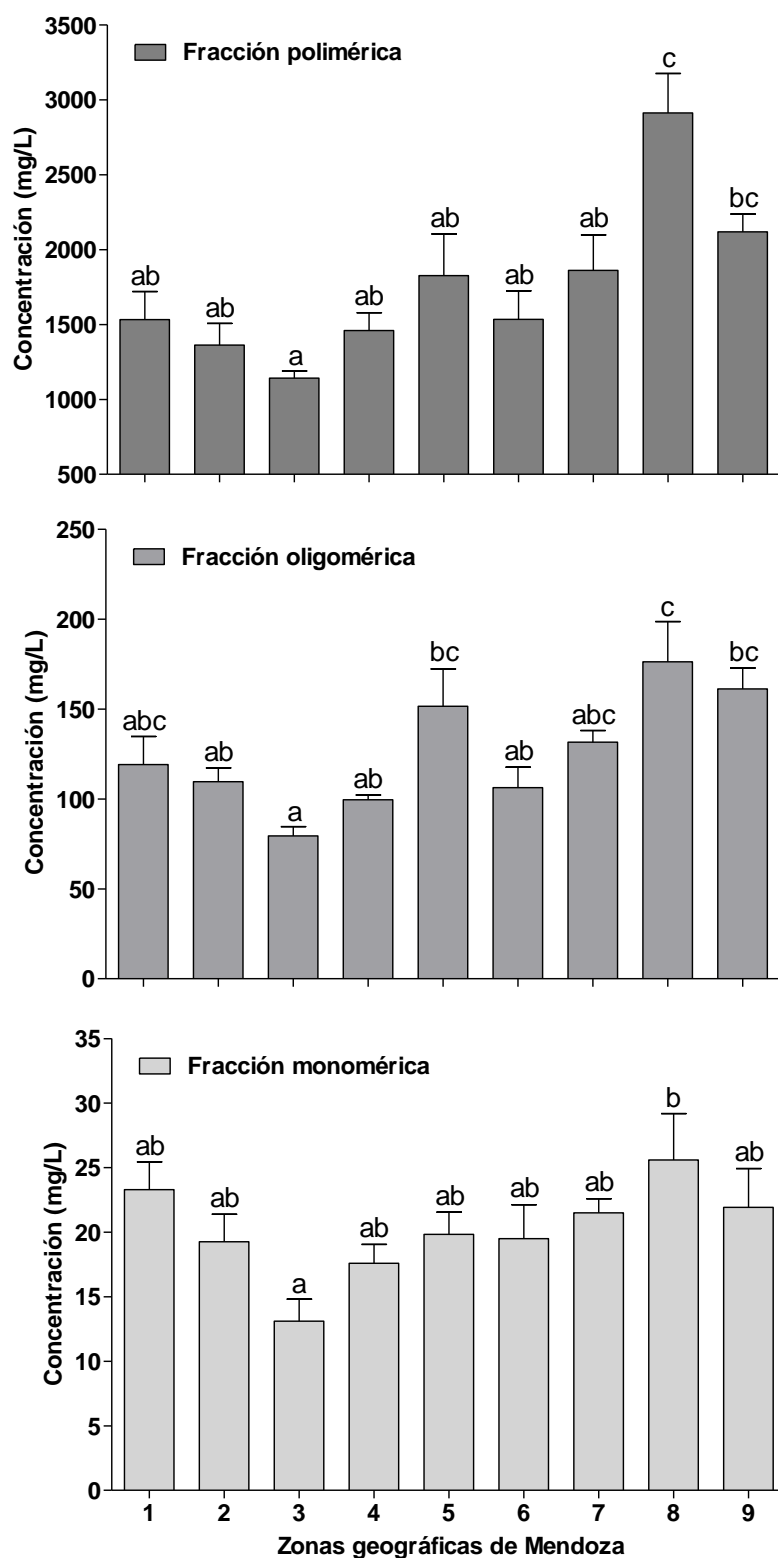
### 3.2. Análisis de flavanoles

#### 3.2.1. Fraccionamiento de flavanoles en monómeros, oligómeros y polímeros

Los flavanoles presentes en las muestras de vino fueron separados de acuerdo a su grado de polimerización en tres fracciones (monómeros, oligómeros y polímeros) mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE) y su contenido total en cada fracción fue determinado mediante el ensayo con vainillina, siguiendo la metodología detallada en el Anexo I.

La **Figura 1** muestra la distribución de las fracciones flavánicas en los vinos Malbec de las distintas zonas evaluadas. Según diversos autores (Sun et al., 1998a) la fracción monomérica consiste sólo de (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-galato, mientras que la fracción oligomérica está formada por dímeros, trímeros y tetrámeros de procianidinas, y la fracción polimérica la componen las proantocianidinas (> 4 unidades). En todos los vinos analizados, las proantocianidinas poliméricas constituyeron la fracción predominante (91,4-93,5%), seguida por la fracción oligomérica (5,7-7,6%), en tanto los monómeros de flavanoles presentaron los niveles más bajos (0,8-1,4%). Estos resultados coinciden con los datos reportados en otros estudios (Sun et al., 2001b; Monagas et al., 2003b; Cosme et al., 2009). Sin embargo, los niveles observados en el

presente trabajo fueron mayores a los encontrados por estos autores en vinos españoles y portugueses de otras variedades tintas.



**Figura 1.** Fracciones monomérica, oligomérica y polimérica de flavanoles en vinos Malbec de diferentes zonas de Mendoza. Letras distintas dentro de cada fracción indican diferencias significativas entre zonas geográficas (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Al analizar la influencia de la zona geográfica sobre estos compuestos, se observaron diferencias significativas entre las mismas para cada fracción considerada ( $p < 0,05$ ). Con respecto a la fracción polimérica, los resultados mostraron una tendencia similar a la obtenida en la determinación espectrofotométrica global de proantocianidinas (**Tabla 2**). Los vinos de las zonas 7, 8 y 9 presentaron la mayor concentración de polímeros, sugiriendo posiblemente una mayor sensación de astringencia, volumen y estructura en boca, comparados con el resto. Por su parte, las fracciones oligomérica y monomérica revelaron también un comportamiento concordante con los niveles de flavanoles determinados por HPLC (**Tabla 5**). Nuevamente, los vinos de las zonas 7, 8 y 9 junto con los provenientes de la zona 5 presentaron los registros más elevados de estas fracciones, lo cual podría traducirse en un aporte adicional de amargor (Santos-Buelga y De Freitas, 2009).

En general, se observó un contenido elevado de flavanoles en las zonas de mayor altitud. Esta tendencia, conjuntamente con los parámetros presentados en la **Tabla 2**, indicaría un gran potencial de las mismas para la producción de vinos estructurados y complejos destinados a crianzas prolongadas (vinos de guarda).

### 3.2.2. Análisis de proantocianidinas mediante floroglucinólisis

La **Figura 2** muestra los resultados del análisis de proantocianidinas en vinos Malbec de distintas zonas de Mendoza, empleando el método de catálisis ácida en presencia del nucleófilo floroglucinol (Anexo I). Como se puede observar, los parámetros determinados fueron el grado medio de polimerización ( $mDP$ ), el porcentaje de galoilación ( $\%G$ ) y el peso molecular promedio ( $\alpha MW$ ). En oposición a los resultados obtenidos en la evaluación de flavanoles por la metodología presentada hasta el momento (**Tabla 2**, **Figura 1**), no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los vinos estudiados para ninguno de los parámetros mencionados.

Con respecto al  $mDP$ , se observó un patrón irregular entre las muestras evaluadas, con valores similares a los observados en la literatura para vinos de diferentes variedades tintas producidos en otras partes del mundo (Cosme et al., 2009; Busse-Valverde et al., 2010; Chira et al., 2011; Kontoudakis et al., 2011b,c). Como era de esperar, el  $\alpha MW$  siguió una tendencia similar al  $mDP$ . Por otra parte, el  $\%G$  en todas las muestras analizadas mostró niveles elevados en relación a los obtenidos por diversos autores en los trabajos mencionados anteriormente, indicando posiblemente un aporte superior de proantocianidinas de semillas al contenido total de los vinos Malbec estudiados. Si bien no existieron diferencias entre las zonas, se observó una tendencia hacia mayores  $\%G$  en zonas de mayor altura, en tanto los menores registros se obtuvieron en las zonas más bajas (Este y Maipú).

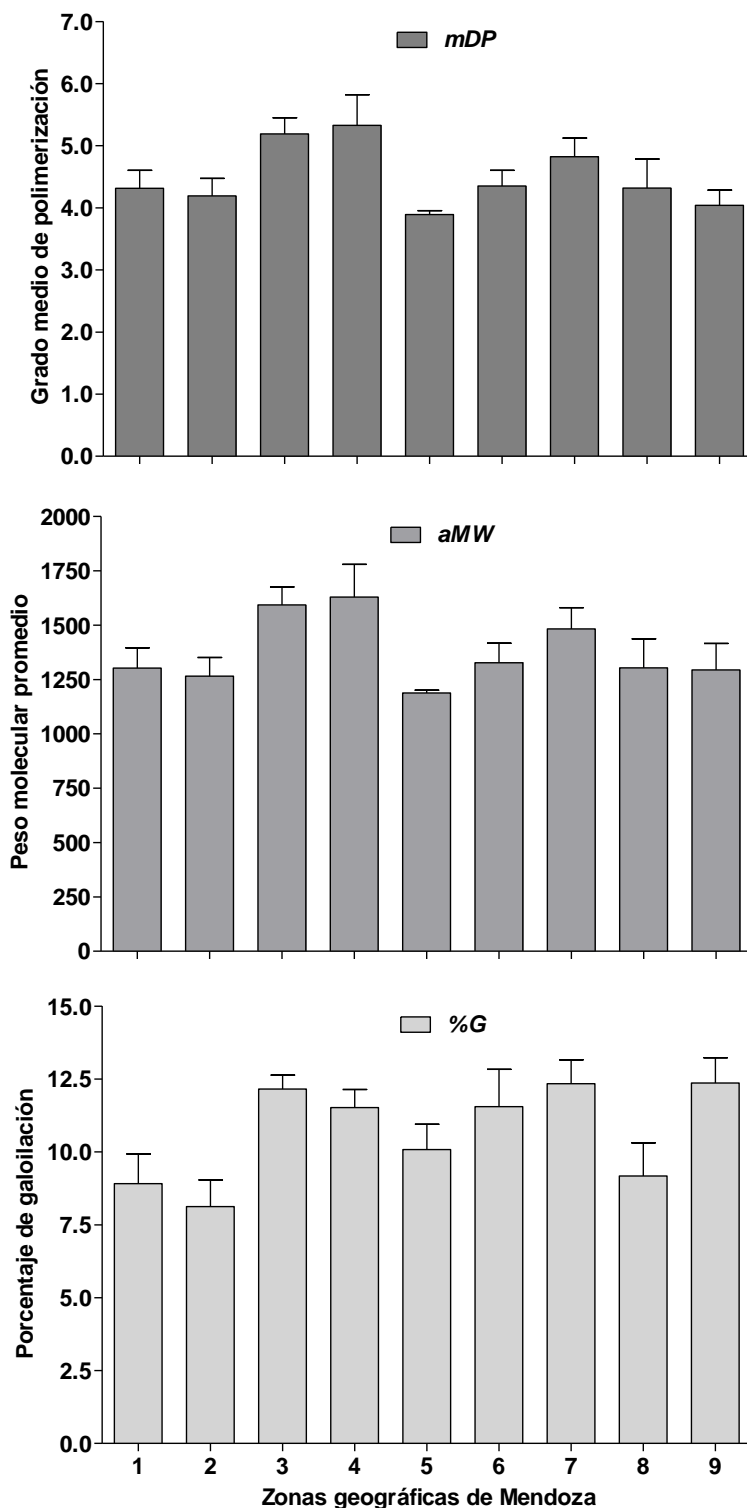


Figura 2. Valores de *mDP*, *aMW* y %G en vinos Malbec de diferentes zonas de Mendoza.

### 3.3. Perfil de antocianinas individuales

Con el propósito de complementar la información obtenida en el Apartado I.2 (Capítulo I), se realizó la identificación y confirmación de los pigmentos antocíánicos por HPLC-DAD/ESI-MS y la posterior cuantificación de los mismos empleando la metodología descrita en el Anexo I. Los mismos

fueron agrupados de acuerdo a la ausencia o presencia de acilación y compuesto acilante (glucósidos no acilados, acetil-glucósidos y cinamil-glucósidos), y considerando la antocianidina involucrada (delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina). Los glucósidos cinamílicos incluyeron las antocianinas cumarílicas y cafeílicas. También se determinaron algunos derivados antociánicos más complejos pertenecientes al grupo de las piranoantocianinas. La **Figura 3** muestra el perfil cromatográfico típico de un vino Malbec, y la **Tabla 4** resume los resultados cuantitativos obtenidos.

Coincidente con la medición global de antocianos (**Tabla 2**), se observaron diferencias cuantitativas significativas ( $p < 0,05$ ) en el perfil antociánico de los vinos según la zona de estudio. Los vinos provenientes de la zona 7, presentaron los mayores contenidos de antocianinas glucosiladas (241,5 mg/L), acetiladas (65,0 mg/L) y cinamiladas (28,5 mg/L), piranoantocianinas (26,4 mg/L) y pigmentos monoméricos totales (361,4 mg/L); mientras que los vinos de la zona 1 mostraron los menores registros de estos compuestos. En todas las muestras analizadas, los niveles de concentración determinados fueron menores a los obtenidos por espectrofotometría, debido a la capacidad de la técnica cromatográfica empleada de detectar sólo antocianos libres sin considerar la contribución de otros pigmentos (Canals et al., 2008).

El grupo de los monoglucósidos representaron la fracción más abundante de todas las antocianinas determinadas, con proporciones medias comprendidas entre 64,8% (zona 8) y 69,9% (zona 6). Estos resultados confirman las observaciones presentadas en el Apartado I.2 (Capítulo I) y coinciden con los datos publicados sobre vinos de otras variedades tintas (Monagas et al., 2003a; Hermosín Gutiérrez et al., 2005; González Neves et al., 2007). Al analizar los derivados acilados, se observó el mismo patrón obtenido en el estudio previo (Apartado I.2, Capítulo I), caracterizado por una mayor proporción de acetil-glucósidos (media 17,5%) y un menor contenido de pigmentos cumarilados (media 7,6%). Adicionalmente, al comparar los resultados de ambos estudios se encontraron algunas diferencias en las proporciones medias de los distintos grupos antociánicos entre los vinos cosecha 2007 (Apartado I.2, Capítulo I) y los evaluados en el presente trabajo (cosecha 2009). Esta variabilidad podría atribuirse a la influencia de las condiciones climáticas de cada temporada sobre la biosíntesis de estos compuestos (González Neves et al., 2007; Lorrain et al., 2011).

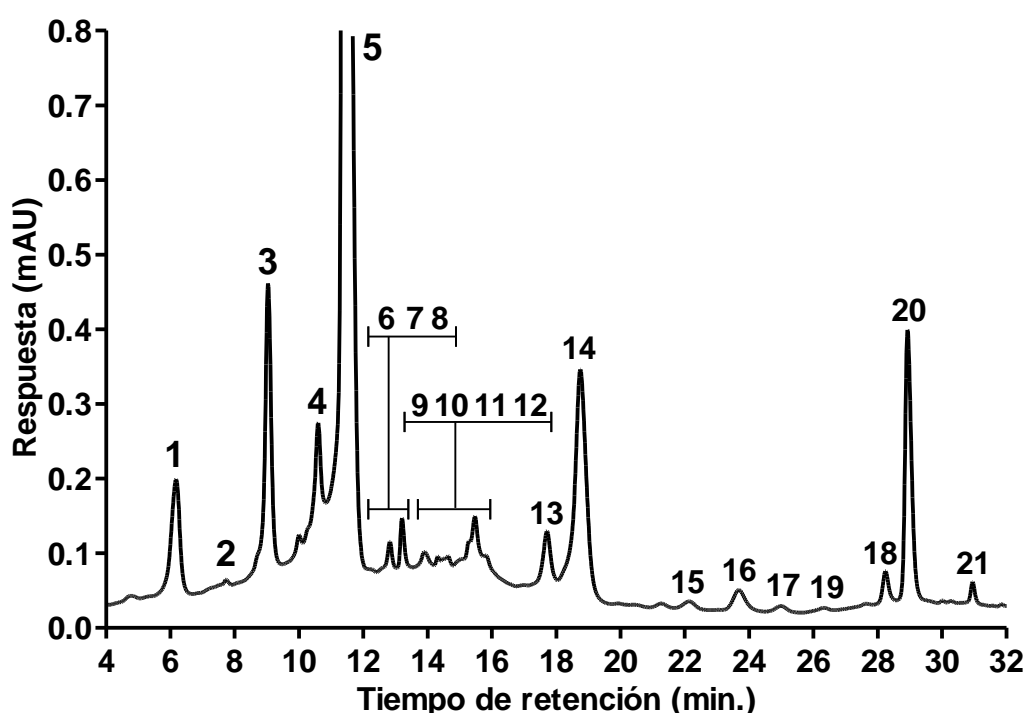
Paralelamente, se calcularon las relaciones entre los distintos derivados antociánicos, obteniéndose resultados concordantes con los presentados anteriormente (Apartado I.2, Capítulo I). La relación  $\Sigma$ acetiladas /  $\Sigma$ cumariladas, propuesta por algunos autores para la verificación de autenticidad varietal en cepajes tintos (Otteneder et al., 2004), mostró valores comprendidos entre 1,9 y 2,9. Complementariamente, los valores medios obtenidos para las relaciones  $\Sigma$ glucosiladas /  $\Sigma$ acetiladas y  $\Sigma$ glucosiladas /  $\Sigma$ cumariladas variaron entre 3,4-4,5 y 7,5-10,9, respectivamente (**Tabla 4**).



En términos del perfil basado en las diferentes antocianidinas, los derivados de la malvidina constituyeron los compuestos más abundantes en todas las muestras analizadas (media 70,4%), mientras que los derivados de la cianidina mostraron la menor proporción (media 1,9%). En general, la distribución de todas las antocianidinas reveló un patrón similar al observado previamente (Apartado I.2, Capítulo I).

Con respecto al grupo de las piranoantocianinas, se identificaron cinco compuestos. Los derivados piruvílicos (vitisina A y peonidina-3-glucósido piruvato) representaron alrededor del 50% de la totalidad de los pigmentos detectados, seguido por la vitisina B (media 30%), y en menor proporción por los aductos malvidina-3-glucósido-etil-epicatequina (media 13,9%) y malvidina-3-glucósido-4-vinilfenol (media 7,1%). En concordancia con lo reportado por otros autores (Monagas et al., 2003a), se encontró que los vinos con elevados contenidos de estos compuestos presentaban mayores niveles de sus correspondientes precursores antociánicos (malvidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido).

En conclusión, se observó una mayor concentración de antocianinas en vinos provenientes de zonas de mayor altitud, coincidiendo con los resultados presentados en los Apartados I.1 y I.2 (Capítulo I). Conjuntamente, los niveles de antocianinas y el resto de los parámetros fenólicos evaluados (**Tabla 2**) revelan el gran potencial de algunas zonas de Mendoza para la producción de vinos Malbec con coloraciones intensas y estables en el tiempo, destinados a una crianza prolongada (vinos de guarda).



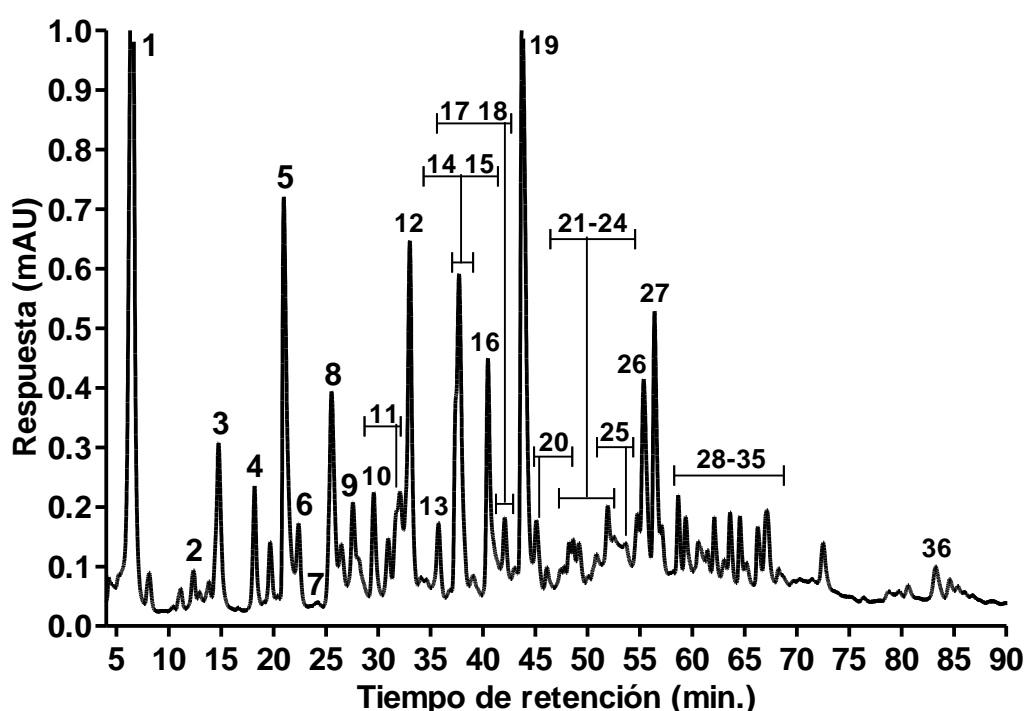
**Figura 3.** Perfil de antocianinas por HPLC-DAD (520 nm) de un vino Malbec de la Provincia de Mendoza. La identificación de los picos cromatográficos se encuentra en la **Tabla 4**.

Pico	Zona geográfica de Mendoza								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Definidina-3-glucósido	6,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	7,3 ± 0,6 a	8,4 ± 0,6 ab	10,1 ± 0,9 ab	14,5 ± 1,5 bc	17,6 ± 2,2 c	14,5 ± 1,3 bc	13,5 ± 0,9 bc
2	Cianidina-3-glucósido	1,1 ± 0,2 a	1,5 ± 0,2 ab	1,8 ± 0,2 ab	1,9 ± 0,3 ab	2,1 ± 0,1 b	2,5 ± 0,3 b	1,9 ± 0,2 ab	1,9 ± 0,1 ab
3	Petunidina-3-glucósido	14,3 ± 1,6 a	22,6 ± 2,7 ab	19,6 ± 1,1 ab	27,0 ± 2,0 ab	27,7 ± 2,7 b	29,2 ± 3,9 b	26,2 ± 2,3 ab	28,2 ± 2,7 b
4	Peonidina-3-glucósido	11,5 ± 1,8 a	20,1 ± 1,5 a	15,6 ± 0,6 a	20,0 ± 1,3 a	19,9 ± 2,0 a	20,7 ± 2,6 a	18,3 ± 2,7 a	14,9 ± 2,3 a
5	Malvidina-3-glucósido	86,9 ± 2,4 a	130,2 ± 6,9 abc	118,3 ± 5,7 ab	151,1 ± 6,2 bc	139,2 ± 14,0 bc	171,5 ± 15,2 c	146,8 ± 11,8 bc	144,2 ± 6,1 bc
	<b>Antocianinas glucosiladas</b>	120,1 ± 2,2 a (67,3)	181,7 ± 10,2 abc (66,8)	163,7 ± 7,6 ab (67,3)	210,1 ± 10,5 bc (68,7)	203,3 ± 19,3 bc (65,6)	241,5 ± 21,9 c (66,8)	209,9 ± 14,1 bc (64,8)	202,7 ± 7,1 bc (65,0)
7	Definidina-3-(6"-acetil)glucósido	3,1 ± 0,1 a	4,4 ± 0,5 ab	4,7 ± 0,4 ab	5,8 ± 0,5 abc	7,7 ± 0,5 c	8,1 ± 1,0 c	6,9 ± 0,6 bc	6,0 ± 0,6 bc
10	Cianidina-3-(6"-acetil)glucósido	1,7 ± 0,2 a	2,1 ± 0,3 abc	2,6 ± 0,1 abcd	2,5 ± 0,4 abcd	3,9 ± 0,5 d	3,1 ± 0,5 abcd	3,4 ± 0,3 bcd	3,7 ± 0,3 cd
12	Petunidina-3-(6"-acetil)glucósido	3,0 ± 0,3 a	4,5 ± 0,5 ab	4,5 ± 0,6 ab	6,0 ± 0,6 abc	7,5 ± 0,3 bc	8,3 ± 0,9 c	8,2 ± 0,8 c	7,5 ± 0,6 bc
13	Peonidina-3-(6"-acetil)glucósido	4,7 ± 0,3 a	8,3 ± 0,5 ab	7,2 ± 0,5 ab	9,4 ± 0,6 b	9,0 ± 0,4 b	9,7 ± 1,4 b	8,7 ± 1,0 b	9,1 ± 0,7 b
14	Malvidina-3-(6"-acetil)glucósido	17,7 ± 0,8 a	27,7 ± 3,5 ab	21,6 ± 2,0 ab	30,6 ± 3,5 ab	31,1 ± 4,3 ab	35,8 ± 3,3 b	33,0 ± 2,9 b	29,5 ± 0,8 ab
	<b>Antocianinas acetiladas</b>	30,2 ± 0,7 a (16,9)	47,0 ± 5,1 abc (17,3)	40,6 ± 3,1 ab (16,7)	54,3 ± 5,4 bc (17,8)	59,2 ± 4,6 bc (19,1)	65,0 ± 6,5 c (18,0)	60,2 ± 4,0 bc (18,6)	55,8 ± 1,6 bc (17,9)
15	Cianidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	0,40 ± 0,06 a	1,07 ± 0,13 b	0,87 ± 0,13 ab	2,00 ± 0,15 c	0,83 ± 0,03 ab	0,87 ± 0,07 ab	0,90 ± 0,12 b	0,63 ± 0,03 ab
16	Malvidina-3-(6"-cafeil)glucósido	1,3 ± 0,1 a	2,0 ± 0,2 abcd	1,5 ± 0,1 a	1,8 ± 0,1 abc	2,0 ± 0,1 abcd	1,6 ± 0,1 ab	2,7 ± 0,2 d	2,5 ± 0,3 bcd
17	Petunidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	0,6 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	0,6 ± 0,1 a	0,7 ± 0,1 a	0,6 ± 0,1 a	0,7 ± 0,1 a	0,8 ± 0,1 a	0,8 ± 0,1 a
18	Peonidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	2,3 ± 0,1 a	3,2 ± 0,2 bcd	2,5 ± 0,1 ab	2,7 ± 0,1 ab	3,1 ± 0,2 abc	2,5 ± 0,3 ab	4,1 ± 0,2 d	3,9 ± 0,2 cd
19	Malvidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido cis	0,23 ± 0,03 a	0,43 ± 0,03 abc	0,37 ± 0,07 ab	0,37 ± 0,03 ab	0,53 ± 0,03 bc	0,63 ± 0,09 bcd	0,50 ± 0,06 abc	0,90 ± 0,06 d
20	Malvidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido trans	12,4 ± 0,3 a	16,8 ± 1,2 b	14,3 ± 1,1 ab	14,5 ± 0,9 ab	15,2 ± 1,0 ab	14,2 ± 0,7 ab	19,9 ± 1,5 b	19,0 ± 1,5 b
	<b>Antocianinas cumariladas</b>	15,9 ± 0,4 a (8,9)	24,4 ± 1,4 bc (9,0)	18,6 ± 1,1 ab (7,7)	20,3 ± 1,1 abc (6,6)	20,3 ± 1,0 abc (6,5)	18,7 ± 0,6 ab (6,4)	25,9 ± 1,7 c (7,2)	25,2 ± 1,3 c (8,1)
	<b>Antocianinas cinamiladas</b>	17,2 ± 0,4 a (9,6)	26,4 ± 1,6 bc (9,7)	20,1 ± 1,1 ab (8,3)	22,1 ± 1,3 abc (7,2)	22,3 ± 1,0 abc (7,2)	20,3 ± 0,7 ab (7,0)	28,5 ± 1,9 c (7,9)	27,7 ± 1,4 c (8,9)
8	Vitisina A	3,5 ± 0,4 a	5,6 ± 0,8 ab	7,3 ± 0,5 ab	6,4 ± 0,6 ab	9,7 ± 1,4 b	8,0 ± 1,2 ab	8,9 ± 1,2 b	8,7 ± 1,0 b
9	Vitisina B	2,5 ± 0,1 a	4,9 ± 0,6 ab	5,0 ± 0,4 ab	6,7 ± 0,7 b	8,3 ± 1,0 b	8,6 ± 1,4 b	7,7 ± 1,1 b	7,8 ± 0,3 b
6	Peonidina-3-glucósido piruvato	1,9 ± 0,2 a	2,4 ± 0,2 ab	2,6 ± 0,3 ab	2,7 ± 0,4 ab	2,9 ± 0,1 ab	4,2 ± 0,4 b	3,5 ± 0,5 ab	4,1 ± 0,5 ab
11	Malvidina-3-glucósido-etil-epicatequina	1,8 ± 0,3 a	2,6 ± 0,3 a	2,4 ± 0,2 a	2,3 ± 0,2 a	3,2 ± 0,3 abc	2,9 ± 0,3 ab	4,5 ± 0,4 c	4,1 ± 0,2 bc
21	Malvidina-3-glucósido-4-vinilfenol	1,3 ± 0,1 a	1,4 ± 0,1 a	1,7 ± 0,1 a	1,2 ± 0,2 a	1,1 ± 0,1 a	1,7 ± 0,1 a	1,1 ± 0,2 a	1,3 ± 0,1 a
	<b>Piranoantocianinas</b>	11,0 ± 0,9 a (6,2)	16,8 ± 1,8 ab (6,2)	19,0 ± 0,5 ab (7,8)	19,3 ± 2,0 ab (6,3)	25,2 ± 2,4 b (8,1)	22,3 ± 2,6 b (7,7)	26,4 ± 3,4 b (7,3)	26,0 ± 1,6 b (8,3)
	<b>Antocianinas totales</b>	178,5 ± 2,5 a	271,9 ± 16,8 abc	243,4 ± 11,7 ab	305,8 ± 18,8 ab	310,0 ± 21,7 ab	361,4 ± 32,6 b	323,8 ± 22,8 ab	312,2 ± 8,6 ab
	$\Sigma$ glucosiladas / $\Sigma$ acetiladas	4,0	3,9	4,0	3,9	3,4	3,7	3,5	3,6
	$\Sigma$ glucosiladas / $\Sigma$ cumariladas	7,5	7,4	8,8	10,3	10,0	9,3	8,3	8,1
	$\Sigma$ cumariladas / $\Sigma$ acetiladas	0,5	0,5	0,5	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5
	$\Sigma$ acetiladas / $\Sigma$ cumariladas	1,9	1,9	2,2	2,7	2,9	2,5	2,4	2,2

\* Media (mg/L) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre zonas (Tukey HSD, p < 0,05). Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre derivados antocianicos por acilación y antocianinas totales.

### 3.4. Perfil de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

Adicionalmente, con la finalidad de complementar la información obtenida en el Apartado I.2 (Capítulo I), se realizó la identificación y confirmación de los compuestos fenólicos no-antociánicos por HPLC-DAD/ESI-MS y la posterior cuantificación de los mismos empleando la metodología descrita en el Anexo I. Los mismos fueron agrupados en no-flavonoides (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, estilbenos y alcoholes fenólicos/compuestos relacionados) y flavonoides (flavanoles, flavonoles y dihidroflavonoles). La **Figura 4** muestra el perfil cromatográfico típico de un vino Malbec. La concentración de los distintos compuestos, individualmente y agrupados, y las proporciones relativas de cada grupo en las muestras analizadas se presentan en la **Tabla 5**.



**Figura 4.** Perfil de compuestos fenólicos de bajo peso molecular por HPLC-DAD (280 nm) de un vino Malbec de la Provincia de Mendoza. La identificación de los picos cromatográficos se encuentra en la **Tabla 5**.

En todas las muestras analizadas, los flavonoides constituyeron la fracción más abundante (75,0-82,8%) comparada con los no-flavonoides (17,2-25,0%). Estos resultados confirman las observaciones presentadas en el Apartado I.2 (Capítulo I) y coinciden con los datos publicados sobre vinos de otras variedades tintas (Monagas et al., 2005d; Hermosín Gutiérrez et al., 2005; Hernández et al., 2006). En concordancia con los parámetros fenólicos descritos anteriormente (**Tablas 2 y 4**), se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre zonas para la mayor parte de los compuestos determinados (**Tabla 5**). En general, los vinos provenientes de las zonas de mayor altitud presentaron una mayor concentración de fenoles no-antociánicos, indicando su riqueza fenólica comparados con el resto.

**Tabla 5.** Compuestos fenólicos de bajo peso molecular cuantificados en vinos Malbec de distintas zonas de Mendoza.

Pico	Zona geográfica de Mendoza								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>No-flavonoides</b>									
1	14,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	12,5 ± 1,0 a	12,5 ± 1,7 a	9,9 ± 1,0 a	14,4 ± 1,4 a	11,3 ± 1,0 a	14,2 ± 1,6 a	15,5 ± 2,1 a	15,6 ± 1,4 a
2	1,6 ± 0,2 c	1,3 ± 0,1 bc	1,0 ± 0,1 abc	0,7 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 ab	0,8 ± 0,1 ab	1,0 ± 0,1 ab	0,9 ± 0,2 ab	1,1 ± 0,1 abc
13	2,2 ± 0,2 a	2,8 ± 0,3 a	2,5 ± 0,2 a	2,6 ± 0,3 a	2,8 ± 0,3 a	2,5 ± 0,3 a	2,5 ± 0,3 a	3,0 ± 0,3 a	2,7 ± 0,1 a
11	1,0 ± 0,1 a	0,6 ± 0,1 a	2,7 ± 0,2 b	2,3 ± 0,3 b	2,9 ± 0,3 b	2,8 ± 0,3 b	3,1 ± 0,2 b	2,7 ± 0,4 b	3,0 ± 0,1 b
4	1,9 ± 0,3 a	2,3 ± 0,4 a	2,6 ± 0,2 a	2,2 ± 0,2 a	2,3 ± 0,2 a	2,4 ± 0,4 a	2,8 ± 0,2 a	2,3 ± 0,2 a	2,6 ± 0,2 a
14	6,6 ± 0,8 a	6,0 ± 0,6 a	4,8 ± 0,8 a	4,7 ± 0,6 a	6,6 ± 0,4 a	5,2 ± 0,6 a	5,9 ± 0,7 a	5,9 ± 1,0 a	6,8 ± 0,6 a
<b>Ácidos hidroxibenzoicos/derivados</b>									
	27,8 ± 2,5 a (8,0)	25,5 ± 2,2 a (7,0)	26,1 ± 2,4 a (6,6)	22,4 ± 1,3 a (5,8)	29,9 ± 2,0 a (6,7)	25,0 ± 2,2 a (6,3)	29,5 ± 1,9 a (7,2)	30,3 ± 3,9 a (6,8)	31,8 ± 2,2 a (7,0)
3	0,37 ± 0,03 a	0,90 ± 0,06 a	1,00 ± 0,06 a	0,70 ± 0,06 a	0,99 ± 0,09 a	0,60 ± 0,12 a	3,83 ± 0,38 b	3,47 ± 0,32 b	5,93 ± 0,09 c
6	1,0 ± 0,2 a	1,4 ± 0,2 a	1,6 ± 0,2 a	1,2 ± 0,2 a	1,3 ± 0,2 a	1,5 ± 0,3 a	2,7 ± 0,2 b	1,4 ± 0,2 a	2,8 ± 0,2 b
9	1,7 ± 0,3 a	1,9 ± 0,3 a	2,4 ± 0,2 ab	1,9 ± 0,2 a	3,0 ± 0,1 b	2,8 ± 0,1 ab	2,8 ± 0,2 ab	2,5 ± 0,2 ab	2,1 ± 0,1 ab
10	4,7 ± 0,7 ab	3,1 ± 0,4 ab	2,4 ± 0,3 a	2,3 ± 0,2 a	5,1 ± 0,7 b	4,8 ± 0,4 b	3,2 ± 0,4 ab	2,3 ± 0,3 a	3,9 ± 0,6 ab
16	5,6 ± 0,8 a	4,2 ± 0,5 a	3,6 ± 0,3 a	4,0 ± 0,3 a	4,6 ± 0,5 a	5,4 ± 0,1 a	4,1 ± 0,4 a	3,6 ± 0,4 a	4,4 ± 0,6 a
<b>Ácidos hidroxihámicos/derivados</b>									
	13,4 ± 1,2 abc (3,9)	11,5 ± 0,8 ab (3,2)	11,0 ± 0,8 a (2,8)	10,1 ± 0,4 a (2,6)	14,9 ± 1,0 bc (3,4)	14,9 ± 0,1 bc (3,8)	16,4 ± 0,8 cd (4,0)	13,3 ± 0,1 abc (3,0)	19,1 ± 1,0 d (4,2)
25	1,9 ± 0,1 ab	1,4 ± 0,2 a	2,0 ± 0,2 ab	2,5 ± 0,2 bc	3,0 ± 0,2 c	2,6 ± 0,3 bc	3,0 ± 0,3 c	2,6 ± 0,1 bc	3,4 ± 0,1 c
32	1,0 ± 0,1 a	1,1 ± 0,2 ab	1,3 ± 0,1 ab	1,7 ± 0,1 b	1,6 ± 0,1 ab	1,4 ± 0,1 ab	1,5 ± 0,2 ab	1,6 ± 0,2 ab	1,4 ± 0,1 ab
<b>Estilbenos</b>									
5	2,9 ± 0,2 a (0,8)	2,5 ± 0,4 a (0,7)	3,3 ± 0,2 ab (0,8)	4,2 ± 0,2 bc (1,1)	4,6 ± 0,2 c (1,0)	4,0 ± 0,3 bc (1,0)	4,5 ± 0,1 c (1,1)	4,2 ± 0,2 bc (1,0)	4,7 ± 0,1 c (1,1)
26	30,4 ± 2,7 ab	17,5 ± 2,4 a	29,7 ± 3,4 ab	24,4 ± 3,5 ab	34,5 ± 1,5 bc	21,2 ± 2,9 ab	26,0 ± 4,0 ab	34,1 ± 4,3 bc	45,8 ± 1,0 c
<b>Alcoholes fenólicos/compuestos relacionados</b>									
	6,7 ± 0,5 a	5,9 ± 0,6 a	7,7 ± 0,4 a	6,8 ± 0,3 a	8,6 ± 1,1 ab	8,8 ± 0,5 ab	8,4 ± 0,7 ab	8,9 ± 0,4 ab	11,3 ± 1,0 b
	37,1 ± 2,3 ab (10,7)	23,4 ± 3,0 a (6,4)	37,4 ± 3,6 ab (9,5)	31,2 ± 3,4 ab (8,0)	43,1 ± 2,7 bc (9,7)	30,0 ± 3,3 ab (7,6)	34,4 ± 4,3 ab (8,5)	43,0 ± 4,6 bc (9,7)	57,1 ± 2,0 c (12,7)
<b>No-flavonoides totales</b>									
	81,2 ± 2,2 ab (23,4)	62,9 ± 3,9 a (17,2)	77,8 ± 6,6 ab (19,7)	67,9 ± 2,4 ab (17,5)	92,5 ± 3,2 bc (20,8)	73,9 ± 5,1 ab (20,9)	84,8 ± 5,4 ab (20,9)	90,8 ± 8,4 bc (20,5)	112,7 ± 5,1 c (25,0)

\* Media (mg/L) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre zonas (Tukey HSD, p < 0,05). Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre los distintos grupos fenólicos y fenoles totales.

**Tabla 5. (Continuación)**

Pico	Zona geográfica de Mendoza									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<b>Flavonoides</b>										
8	38,5 ± 3,6 <sup>a</sup>	34,9 ± 3,5 a	32,0 ± 3,7 a	26,1 ± 1,4 a	39,4 ± 2,3 a	29,0 ± 3,4 a	32,2 ± 2,2 a	33,2 ± 2,7 a	35,1 ± 1,2 a	
15	20,8 ± 1,9 a	19,0 ± 1,4 a	16,4 ± 1,4 a	14,0 ± 1,8 a	21,4 ± 2,0 a	18,0 ± 2,4 a	17,8 ± 2,3 a	19,0 ± 2,8 a	20,6 ± 2,0 a	
7	13,0 ± 1,6 a	12,6 ± 0,9 a	10,1 ± 0,8 a	10,9 ± 0,1 a	13,1 ± 1,5 a	9,8 ± 1,2 a	10,6 ± 0,6 a	11,0 ± 1,5 a	10,7 ± 0,5 a	
12	44,3 ± 5,3 a	44,4 ± 5,1 a	49,9 ± 5,0 a	51,2 ± 4,2 a	53,7 ± 7,0 a	51,2 ± 5,5 a	43,4 ± 4,5 a	49,6 ± 4,4 a	48,9 ± 2,4 a	
17	7,4 ± 0,8 abc	6,2 ± 0,8 abc	5,8 ± 0,5 ab	6,6 ± 0,6 abc	8,9 ± 0,7 c	8,5 ± 0,2 abc	5,4 ± 0,2 a	6,7 ± 0,8 abc	8,6 ± 0,7 bc	
18	6,3 ± 0,1 a	5,5 ± 0,8 a	5,5 ± 0,6 a	6,8 ± 0,6 a	8,5 ± 0,4 a	6,4 ± 0,5 a	6,7 ± 0,3 a	8,0 ± 1,0 a	7,1 ± 0,5 a	
20	5,3 ± 0,3 a	7,2 ± 1,1 ab	14,7 ± 0,8 cd	14,5 ± 0,4 cd	17,6 ± 1,5 d	17,3 ± 0,5 d	16,5 ± 2,2 cd	14,1 ± 1,6 cd	11,4 ± 0,4 bc	
31	9,3 ± 0,7 a	10,5 ± 1,0 ab	14,6 ± 1,1 b	14,7 ± 0,7 b	13,7 ± 1,1 ab	11,8 ± 1,3 ab	12,4 ± 0,8 ab	15,2 ± 1,8 b	12,4 ± 0,3 ab	
	144,9 ± 10,6 a (41,7)	140,3 ± 12,2 a (38,3)	149,0 ± 10,3 a (37,8)	144,9 ± 2,7 a (37,3)	176,3 ± 14,5 a (39,4)	152,0 ± 7,5 a (38,5)	145,0 ± 7,9 a (35,7)	156,8 ± 11,4 a (35,5)	154,8 ± 5,3 a (34,3)	
22	7,5 ± 0,3 a	10,5 ± 1,2 a	8,9 ± 1,1 a	7,3 ± 0,9 a	9,7 ± 1,5 a	7,4 ± 0,2 a	7,3 ± 0,2 a	8,7 ± 1,2 a	10,9 ± 0,6 a	
23	6,7 ± 0,6 a	5,6 ± 0,8 a	5,0 ± 0,7 a	6,4 ± 0,8 a	7,7 ± 0,8 a	6,5 ± 1,0 a	8,5 ± 0,9 a	8,0 ± 1,0 a	6,5 ± 0,2 a	
24	4,6 ± 0,2 a	6,5 ± 1,0 ab	7,6 ± 0,8 ab	9,6 ± 0,7 b	8,1 ± 1,0 ab	6,9 ± 0,8 ab	10,5 ± 1,3 b	8,1 ± 1,2 ab	6,3 ± 0,1 ab	
28	7,5 ± 0,6 ab	6,4 ± 0,8 a	6,0 ± 0,5 a	10,1 ± 1,6 ab	10,1 ± 0,3 ab	8,8 ± 1,0 ab	8,9 ± 0,8 ab	12,2 ± 1,5 b	8,6 ± 1,2 ab	
29	3,1 ± 0,2 a	5,4 ± 0,3 abc	7,0 ± 0,8 bc	4,7 ± 0,4 ab	6,6 ± 0,6 bc	6,7 ± 0,6 bc	7,5 ± 0,6 c	5,7 ± 0,6 bc	6,6 ± 0,2 bc	
33	3,3 ± 0,2 abc	2,5 ± 0,3 a	2,8 ± 0,3 a	3,5 ± 0,3 abc	3,1 ± 0,1 abc	2,9 ± 0,4 ab	4,7 ± 0,5 d	4,5 ± 0,3 cd	4,3 ± 0,1 bcd	
30	5,6 ± 0,5 a	5,3 ± 0,2 a	4,9 ± 0,2 a	7,0 ± 0,6 ab	5,0 ± 0,6 a	4,7 ± 0,2 a	6,3 ± 0,7 ab	9,0 ± 1,0 b	5,8 ± 0,5 a	
35	1,7 ± 0,1 a	2,7 ± 0,3 a	2,4 ± 0,1 a	3,3 ± 0,3 ab	3,2 ± 0,4 ab	2,1 ± 0,2 a	4,8 ± 0,6 b	4,9 ± 0,5 b	4,4 ± 0,2 b	
34	6,7 ± 0,3 a	8,7 ± 1,2 ab	9,5 ± 0,3 ab	11,1 ± 1,3 b	9,8 ± 0,8 ab	9,9 ± 1,1 ab	8,8 ± 0,6 ab	10,4 ± 1,2 ab	9,8 ± 0,2 ab	
36	12,4 ± 1,0 a	21,1 ± 2,0 bc	20,0 ± 1,0 bc	21,4 ± 1,8 bc	20,0 ± 2,1 bc	18,5 ± 1,1 abc	16,8 ± 1,2 ab	18,0 ± 1,4 abc	24,8 ± 0,5 c	
	59,1 ± 2,1 a (17,1)	74,7 ± 3,5 ab (20,4)	74,1 ± 2,2 ab (18,9)	84,4 ± 4,3 b (21,6)	83,3 ± 5,1 b (18,7)	74,4 ± 5,9 ab (18,7)	84,4 ± 3,2 b (20,7)	89,5 ± 5,9 b (20,2)	88,0 ± 0,1 b (19,5)	
21	8,1 ± 0,7 a	8,5 ± 0,5 a	8,2 ± 0,6 a	8,0 ± 1,2 a	9,5 ± 0,5 a	9,1 ± 1,0 a	9,3 ± 0,6 a	11,6 ± 1,3 a	8,3 ± 0,3 a	
27	15,7 ± 1,3 a	22,3 ± 2,3 ab	29,3 ± 1,8 b	25,3 ± 1,4 ab	26,4 ± 1,6 ab	25,3 ± 2,6 ab	26,3 ± 2,8 ab	29,3 ± 3,7 b	24,4 ± 0,3 ab	
19	37,7 ± 3,6 a	57,2 ± 6,2 ab	55,1 ± 3,4 ab	58,8 ± 5,4 ab	58,1 ± 0,5 ab	60,5 ± 7,7 ab	56,4 ± 4,6 ab	64,9 ± 6,8 b	62,7 ± 2,2 b	
	61,5 ± 4,6 a (17,8)	88,0 ± 9,0 ab (24,1)	92,6 ± 4,0 ab (23,6)	92,1 ± 7,9 ab (23,6)	94,0 ± 1,2 ab (21,2)	94,9 ± 10,7 ab (24,0)	92,0 ± 7,4 ab (22,7)	105,8 ± 11,6 b (23,8)	95,4 ± 2,2 ab (21,2)	
	265,5 ± 7,9 a (76,6)	303,0 ± 14,6 ab (82,8)	315,7 ± 9,5 ab (80,3)	321,3 ± 10,3 ab (82,5)	353,6 ± 20,6 b (79,2)	321,3 ± 16,3 ab (81,2)	321,4 ± 2,2 ab (79,1)	352,1 ± 25,5 b (79,5)	338,2 ± 3,3 b (75,0)	
<b>Flavonoides totales</b>										
	346,7 ± 9,5 a	365,9 ± 18,3 ab	393,5 ± 13,9 ab	389,2 ± 11,3 ab	446,1 ± 22,3 b	395,2 ± 17,3 ab	406,2 ± 4,0 ab	442,9 ± 33,5 b	450,9 ± 8,4 b	
<b>Fenoles no-antibióticos totales</b>										

\* Media (mg/L) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre zonas (Tukey HSD, p < 0,05). Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre los distintos grupos fenólicos y fenoles totales.

Con respecto a los no-flavonoides, el contenido de ácidos hidroxibenzoicos fue similar en todas las muestras estudiadas, corroborando las observaciones presentadas en el Apartado I.2 (Capítulo I). Por el contrario, el nivel de ácidos hidroxicinámicos y estilbenos mostró una tendencia creciente hacia las zonas de mayor altitud, con concentraciones significativamente superiores (**Tabla 5**). Estas diferencias parecen indicar un posible efecto de las condiciones medioambientales sobre estos compuestos. A diferencia del estudio precedente, en este caso sólo se identificaron y cuantificaron los isómeros *trans* de los ácidos caftárico, cutárico, fertárico, cafeico y cumárico en proporciones similares, mientras que se detectaron los isómeros *cis* y *trans* del glucósido de resveratrol mostrando concentraciones superiores. Por su parte, los alcoholes fenólicos constituyeron el grupo mayoritario representando entre 37 y 51% de los compuestos no-flavonoides, sin observarse una clara dependencia respecto a la zona de origen de los vinos.

Los flavanoles representaron la fracción más abundante de los fenoles no-antociánicos determinados, con concentraciones comprendidas entre 140,3 y 176,3 mg/L. Si bien no existieron diferencias significativas entre las zonas evaluadas, el contenido de estos compuestos reveló una tendencia creciente hacia zonas de mayor altitud, coincidiendo con los resultados obtenidos anteriormente (**Tabla 2, Figura 1**). En todos los vinos analizados, el contenido de (+)-catequina fue superior al de (-)-epicatequina mostrando una relación comprendida entre 1,6 y 2,0, lo cual coincide con los datos reportados en el Apartado I.2 (Capítulo I). Este comportamiento observado en los vinos cv. Malbec confirma una mayor actividad de la enzima leucoantocianidina reductasa involucrada en la biosíntesis de (+)-catequina. Por otro lado, el contenido individual de oligómeros (dímeros y trímeros) fue menor que la concentración de monómeros en todas las muestras, con la excepción del "dímero de procianidina 2" que mostró valores elevados. En general, los resultados presentados concuerdan con los reportados por diversos autores en otras variedades tintas (de Villiers et al., 2005; Monagas et al., 2005d; Makris et al., 2006b).

Al analizar el grupo de los flavonoles, se observó un patrón diferencial al obtenido en el Apartado I.2 (Capítulo I), con niveles significativamente superiores, alcanzado una proporción comprendida entre 17,1 y 21,6% de la totalidad de los fenoles no-antociánicos determinados (**Tabla 5**). El contenido total en las muestras analizadas varió entre 59,1 y 89,5 mg/L. Estos valores elevados podrían deberse a las condiciones ambientales de la región de Mendoza, principalmente la alta intensidad de luz solar durante el período de maduración de las bayas, lo cual parece estar asociado a una mayor acumulación de flavonoles (Downey et al., 2004; Makris et al., 2006a). Al evaluar la influencia del origen geográfico, nuevamente se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas zonas, coincidiendo con la tendencia mostrada hasta el momento. Los niveles elevados encontrados en los vinos provenientes de zonas de mayor altura podrían estar relacionados a un mayor potencial de las uvas. En el estudio descrito en el Apartado I.1 (Capítulo I),

las uvas provenientes del Valle de Uco mostraron mayor concentración de flavonoles, confirmando el efecto significativo de la radiación solar UV-B sobre la biosíntesis de estos compuestos en la zona mencionada (Berli et al., 2011). Con respecto a la distribución de los distintos compuestos, la estructura mayoritaria en los vinos analizados correspondió a la miricetina (media 29,3%), seguido por kaempferol (24,3%), quercetina (22,9%), naringenina (11,9%), isoramnetina (7,5%) y siringetina (4,0%). Por otro lado, la mayor parte de estos compuestos se encontraron bajo la forma glicosilada, principalmente como glucósidos (45,1%), glucurónidos (34,6%), galactósidos (13,4%) y ramnósidos (7,0%), apreciándose una selectividad diferencial de las enzimas glicosil-transferasas sobre el sustrato utilizado en el proceso biosintético. En general, los niveles de flavonoles observados en los vinos Malbec coinciden con los reportados por diversos autores en otras variedades tintas (Makris et al., 2006b; Castillo-Muñoz et al., 2007).

Por último, es importante destacar la presencia de dihidroflavonoles en los vinos analizados. Según la literatura, son considerados compuestos minoritarios y han sido reportados principalmente en variedades de uva blanca (Masa et al., 2007; Masa y Vilanova, 2008; Vilanova et al., 2009), y en vinos blancos y tintos (Baderschneider y Winterhalter, 2001; Landrault et al., 2002; Vitrac et al., 2002; Pozo-Bayón et al., 2003; Jeffery et al., 2008). Sin embargo, de acuerdo a los resultados presentados en los Apartados I.1 y I.2 (Capítulo I) constituye un grupo fenólico importante para la variedad Malbec. En el presente estudio, los dihidroflavonoles fueron caracterizados por HPLC-DAD/ESI-MS, confirmando las estructuras químicas identificadas tentativamente en el Apartado I.2. Los compuestos identificados fueron dihidroquercetina-3-glucósido, dihidrokaempferol-3-glucósido y dihidroquercetina-3-ramnósido. El contenido total en las muestras estuvo comprendido entre 61,5 y 105,8 mg/L, representando entre el 17,8 y 24,1% de la totalidad de los fenoles no-antocianínicos determinados (**Tabla 5**). Analizando la influencia de la zona de procedencia, se observó una tendencia similar a la encontrada en los parámetros fenólicos descritos anteriormente. En los vinos de todas las zonas evaluadas, la dihidroquercetina-3-glucósido fue el compuesto mayoritario representando entre el 10,9 y 15,6% de la totalidad de fenoles de bajo peso molecular cuantificados.

### 3.5. Clasificación de los vinos de acuerdo al origen geográfico

La variabilidad observada en la composición fenólica individual entre los vinos analizados, independientemente de las prácticas vitícolas y enológicas involucradas en su producción, revela la influencia del origen geográfico (características edafoclimáticas) sobre la biosíntesis de estos metabolitos secundarios. Por lo tanto, con el objetivo de clasificar las muestras de acuerdo a su procedencia, se aplicó la herramienta quimiométrica de análisis multivariado.

En el análisis multivariado se deben seleccionar, en función del criterio considerado (variedad, zona agroecológica, tiempo de crianza, etc.), las variables que se emplearán para clasificar

las muestras bajo estudio. Con el objetivo de asegurar el éxito de los análisis multivariados, es necesario determinar las variables de clasificación que brinden la información necesaria para alcanzar el fin propuesto. Para llevar a cabo los análisis multivariados de manera exitosa es necesario eliminar las variables redundantes o las variables que no aporten información sustantiva. El procedimiento para cumplir este objetivo se denomina selección característica o *feature selection*. Este procedimiento se puede realizar empleando diferentes metodologías: “selección hacia delante”, “selección hacia atrás”, “análisis de componentes principales” o “algoritmos genéticos” (Kruzlicova et al., 2009).

En el presente estudio se aplicó el método de “selección hacia delante” para elegir las variables independientes y no correlacionadas, empleando la información analítica presentada en las **Tablas 4 y 5**. A partir de estas variables fenólicas individuales se realizó un análisis canónico discriminante (CDA) para clasificar los vinos Malbec de las distintas regiones evaluadas. Se obtuvieron 8 variables predictoras significativas que generaron 5 funciones discriminantes (DF), representando en conjunto el 99,6% de la varianza total, con  $p < 0,05$  y un nivel de significancia estadística del 95% (**Tabla 6**). Las funciones discriminantes 1 y 2 expresaron el 55,4% y 34,7% de la varianza total, respectivamente, y mostraron valores de Wilks'λ inferiores a 0,05 indicando una discriminación satisfactoria. La **Tabla 6** muestra los coeficientes estandarizados para las variables predictoras en las 2 funciones discriminantes.

**Tabla 6.** Resultados del CDA para vinos Malbec, empleando "zona" como factor de discriminación. Coeficientes estandarizados para las variables predictoras en las funciones discriminantes significativas.

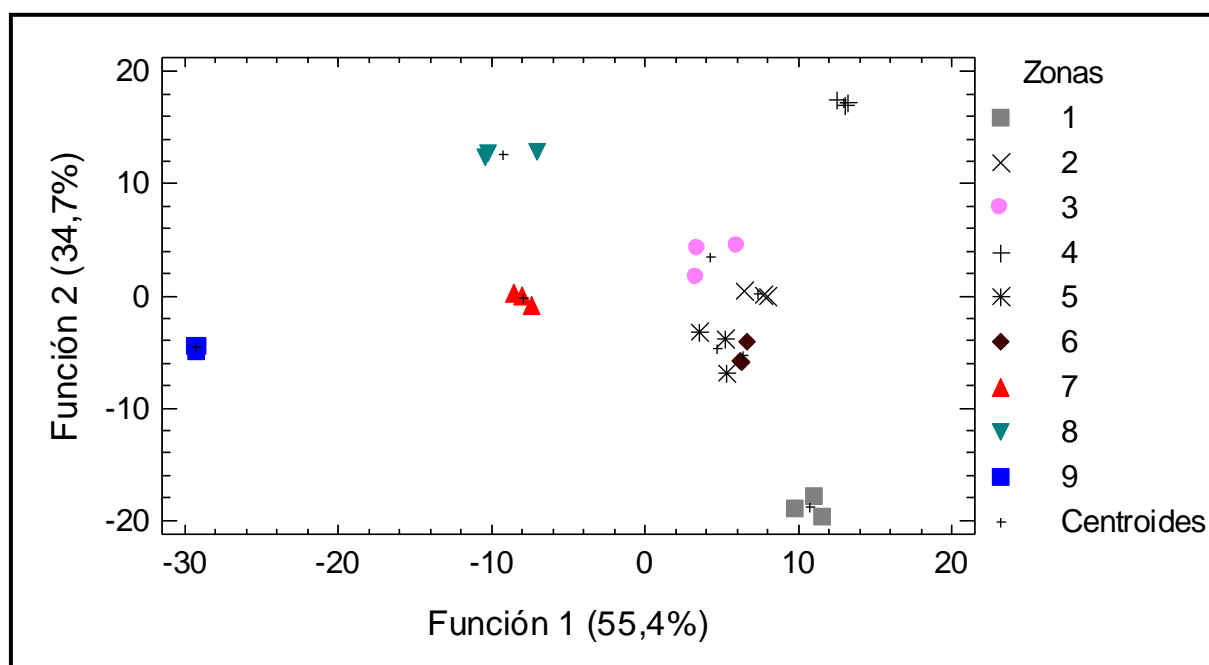
	Función Discriminante (DF)				
	1	2	3	4	5
Valor propio	237,7*	148,9*	18,1	16,0	6,9
Varianza (%)	55,4	34,7	4,2	3,7	1,6
Correlación canónica	0,9979	0,9967	0,9735	0,9701	0,9347
Wilks'λ	$3,6 \times 10^{-9}$	$8,6 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-2}$
p value	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
Acido <i>trans</i> -caftárico	-2,2	0,6	-0,2	0,2	-0,2
Acido <i>trans</i> -cutárico	1,4	-1,7	1,4	0,0	2,1
Acido <i>trans</i> -cafeico	0,0	-2,6	0,9	-1,2	0,3
Dihidroquercetina-3-glucósido	-0,5	1,8	-0,9	-2,1	-1,7
Trímero de procianidina 3	-0,5	1,1	1,0	0,1	-0,6
Dihidroquercetina-3-ramnósido	1,1	2,6	-0,1	2,4	1,4
Miricetina-3-galactósido	0,6	-2,6	1,6	0,0	-0,8
Kaempferol	-1,2	-0,6	-0,6	-1,3	-0,2
Cianidina-3-(6"- <i>p</i> -cumaril)glucósido	1,2	2,2	0,6	0,0	0,9

\* Funciones discriminantes empleadas en el análisis.



La **Figura 5** muestra la distribución de las muestras analizadas en el plano bidimensional definido por DF1 y DF2. Ambas funciones permitieron la correcta clasificación del 100% de los vinos estudiados de acuerdo con el origen geográfico. Los vinos de las zonas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 presentaron valores positivos de DF1, mientras que los vinos de las zonas restantes mostraron valores negativos. En relación a DF2, los vinos de las zonas 1, 5, 6 y 9 mostraron valores negativos, en tanto los restantes tuvieron un comportamiento opuesto.

A diferencia de la clasificación de los vinos observada en el Apartado I.2 (Capítulo I), el CDA aplicado en este estudio permitió la separación de vinos provenientes de localidades geográficas muy próximas, tales como las zonas 1 y 2 (Este y Maipú este), y las zonas 3 y 4 (Maipú-Luján y Luján oeste), logrando asimismo la discriminación de las zonas restantes.

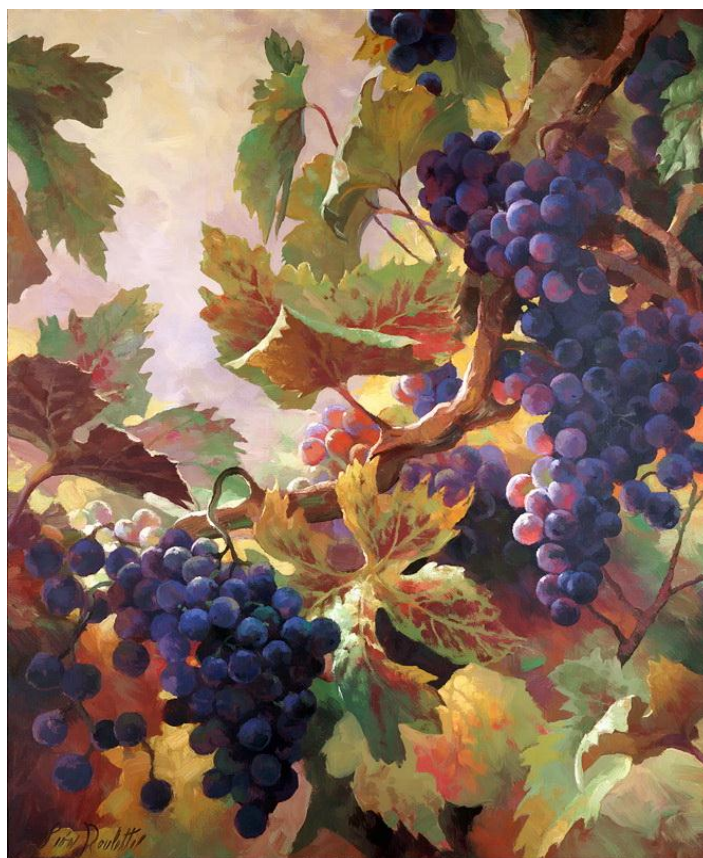


**Figura 5.** Representación gráfica del análisis discriminante bidimensional de vinos Malbec de distintas zonas de Mendoza, empleando compuestos fenólicos individuales como variables predictoras. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de la varianza explicada por cada función discriminante.

En conclusión, las observaciones descritas anteriormente muestran variaciones en algunos parámetros fenólicos globales y en la composición flavonoide y no-flavonoide individual de vinos Malbec provenientes de distintas zonas geográficas de Mendoza. Se observó mayor concentración de fenoles totales, proantocianidinas totales, fracciones flavánicas y derivados antociánicos a medida que aumenta la altitud del viñedo. Los no-flavonoides mostraron una tendencia similar, con diferencias significativas en el contenido de ácidos hidroxicinámicos y estilbenos. Con respecto a los flavonoides, los flavonoles y dihidroflavonoles siguieron el mismo patrón. Por lo tanto, las variaciones de temperatura y radiación UV, relacionadas con características agroclimáticas zonales, afectarían los

procesos enzimáticos y la biosíntesis de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos. Estas observaciones revelan la riqueza fenólica de uvas Malbec de algunas zonas de Mendoza y su potencialidad para la producción de vinos de alta gama, estructurados y complejos, adecuados para una crianza prolongada. Finalmente, los altos niveles de dihidroflavonoles encontrados coinciden con otros estudios realizados en el marco del presente trabajo de Tesis Doctoral, sobre uvas y vinos del mismo cultivar, y podrían indicar un rasgo taxonómico distintivo del Malbec.

## Efecto del control de carga (aclareo o raleo de racimos), año de cosecha y ubicación geográfica del viñedo sobre la composición fenólica de uvas y vinos Malbec



Leon Roulette, *Prime harvest*.

- II.1. Incidencia del raleo de racimos sobre la composición fenólica de uvas Malbec provenientes de un viñedo de Altamira (Valle de Uco, Mendoza). Evolución de estos compuestos durante el período de maduración de las bayas en dos vendimias consecutivas (2008-2009).
- II.2. Estudio comparativo del efecto del raleo de racimos sobre la composición fenólica de uvas y vinos Malbec de dos zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (Altamira y Gualtallary), durante la vendimia 2009.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, los compuestos fenólicos constituyen uno de los parámetros de calidad más importantes de uvas y vinos, debido a su influencia directa sobre las características organolépticas del producto y a sus propiedades funcionales. Estos compuestos son biosintetizados en las plantas como resultado del metabolismo secundario, y se acumulan principalmente en las partes sólidas de las bayas (hollejos y semillas). Su distribución y concentración depende fundamentalmente de factores genéticos, edafoclimáticos y culturales. Entre las prácticas agronómicas realizadas en viñedos, el **aclareo o raleo de racimos** (remoción de fruta) se aplica usualmente para modificar la relación fuente (hoja)/receptáculo (puntos de activo crecimiento como las bayas), favoreciendo el transporte de fotoasimilados a este último y, por lo tanto, procesos fisiológicos tales como el llenado y la maduración de las bayas. Esta práctica vitícola ha sido propuesta por diversos autores para mejorar la calidad de las uvas, a través de la modificación de ciertos atributos como el contenido de azúcar, pH, acidez, aromas y color, durante la maduración.

En los viñedos Malbec de la Provincia de Mendoza, el raleo de racimos se aplica comúnmente con el objetivo de mejorar la calidad de la uva destinada a vinificación. Sin embargo, no existe información sobre su influencia en la composición fenólica pormenorizada de las bayas de este cultivar, y sobre la evolución de estos compuestos durante la fase de maduración. Con el propósito de satisfacer esta necesidad, en este segundo capítulo se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Estudiar la evolución de la composición fenólica de hollejos y semillas de uvas Malbec durante el período de maduración, y determinar la incidencia del raleo de racimos sobre estos compuestos en dos temporadas consecutivas.
- ✓ Evaluar el efecto del raleo de racimos sobre la composición fenólica de uvas y vinos Malbec provenientes de dos zonas geográficas de la Provincia de Mendoza.

Los resultados obtenidos, tendientes al cumplimiento de estos objetivos, se describen en los siguientes apartados:

- II.1. Incidencia del raleo de racimos sobre la composición fenólica de uvas Malbec provenientes de un viñedo de Altamira (Valle de Uco, Mendoza). Evolución de estos compuestos durante el período de maduración de las bayas en dos vendimias consecutivas (2008-2009).
- II.2. Estudio comparativo del efecto del raleo de racimos sobre la composición fenólica de uvas y vinos Malbec de dos zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (Altamira y Gualtallary), durante la vendimia 2009.

Este segundo trabajo ha permitido la publicación científica de los resultados obtenidos en el Apartado II.1: *“Phenolic composition of Malbec grape skins and seeds from Valle de Uco (Mendoza, Argentina) during ripening. Effect of cluster thinning”*.

### **Incidencia del raleo de racimos sobre la composición fenólica de uvas Malbec provenientes de un viñedo de Altamira (Valle de Uco, Mendoza). Evolución de estos compuestos durante el período de maduración de las bayas en dos vendimias consecutivas (2008-2009)**



**“Phenolic Composition of Malbec Grape Skins and Seeds from Valle de Uco (Mendoza, Argentina) During Ripening. Effect of Cluster Thinning”**

Artículo publicado en la revista  
*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59 (11), 6120-6136

# Phenolic Composition of Malbec Grape Skins and Seeds from Valle de Uco (Mendoza, Argentina) During Ripening. Effect of Cluster Thinning

Martín Fanzone,<sup>†</sup> Fernando Zamora,<sup>§</sup> Viviana Jofré,<sup>†</sup> Mariela Assof,<sup>†</sup> and  
Álvaro Peña-Neira<sup>‡</sup>

<sup>†</sup>Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales, Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), San Martín 3853, 5507 Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina, <sup>§</sup>Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, Universidad Rovira i Virgili, C/ Marcel·li Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain, <sup>‡</sup>Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile,

**Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59 (11), 6120-6136**

Received January 06, 2011. Accepted April 26, 2011.

## ABSTRACT

The phenolic composition of Malbec (*Vitis vinifera* L.) grape skins and seeds during ripening and the effect of cluster thinning (CT) in two consecutive seasons (2008-2009) were evaluated by high-performance liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-DAD/ESI-MS). Removal of 50% of clusters was performed at 40 days (T1), 80 days (T2), and 100 days after flowering (T3) in a vineyard located in southern Mendoza (Argentina). Yield components, with the exception of cluster weight, were significantly affected by CT in both seasons, but no statistically significant differences were found among treatments. Cluster thinning and its timing had little or no influence on physical parameters and fruit chemical composition, and the differences with respect to the control were mainly due to the season. At harvest in 2008, T1 encouraged the biosynthesis of individual anthocyanins in skins, generating 44.0, 39.6, and 41.2% more glucosylated, acetylated, and total anthocyanins, respectively, as compared to the control, whereas in seeds, T1 and T2 mainly changed the concentrations of (+)-catechin, epicatechin-3-gallate, procyanidin B4, dimer gallate 1, trimer gallate 2, and tetramer. Conversely in 2009, T1 significantly affected the content of flavanols and flavonols in skins, whereas in seeds, T1 and T2

modified the level of (+)-catechin, procyanidins B4 and B6, and trimer gallate 2. Moreover, in 2008 the grapes had a higher concentration of most phenolic compounds, indicating a greater potential for more complex wines. Finally, dihydroquercetin-3-glucoside was the major compound among all nonanthocyanin phenolics detected in Malbec skins and represented 25.7%(2008) and 39.9% (2009) of the total content of those compounds at harvest. This finding could represent a distinctive feature of this grape variety.

**KEYWORDS:** phenolic compound, Malbec, skin, seed, ripening, anthocyanins, flavanols, flavonols, dihydroflavonols.

## INTRODUCTION

Phenolic compounds constitute one of the most important quality parameters of grapes and wines, because they contribute to organoleptic characteristics such as color, astringency, and bitterness. These compounds are also active in biochemical processes and have nutraceutical effects on human health, including antimicrobial, anticarcinogenic, and antioxidant properties.<sup>1,2</sup> In grape berries, phenolic compounds are present mainly in skins and seeds. The concentration and presence of these compounds in grapes depend mainly on genetic, soil, climate, and viticulture factors, among others.<sup>3,4</sup> Several authors have suggested that the concentration of some secondary metabolites, such as anthocyanins, flavanols, and flavonols, is dependent, to some extent, on the plant yield and the leaf area/berry ratio.<sup>4,5</sup>

Some agronomical practices such as summer pruning and cluster thinning (fruit removal) have been proposed to improve berry grape quality, by means of modifying some attributes of the berries such as sugar content, pH, total acidity, flavors, and color during ripening.<sup>6</sup> Cluster thinning is a practice applied to regulate the yield levels and to help ripen the crop under poor climatic conditions or excessive crop demand.<sup>7</sup> Nevertheless, the literature reports contrasting results with cluster thinning leading to better fruit quality in some cases,<sup>7,8</sup> but with no clear effect in others.<sup>6,9,10</sup> Moreover, it is potentially an expensive process in terms of labor and lost yield. In addition, the amount of fruit removed and the timing of the operation may be important. Removing crop early in the season (at bloom or soon thereafter) may not lead to the desired result because the reduced sink size might in turn lead to lower leaf photosynthesis rates, so that the remaining berries may not have extra sugar available for import. If, however, photosynthesis remains unchanged, surplus photoassimilates could also be used to fuel more shoot (and root) growth. This growth would counteract the benefits of lower crop load because of its negative effect on vigor and canopy

microclimate. Therefore, it might be beneficial to delay thinning until shoot growth has slowed and assimilates may be diverted to the fruit.<sup>10</sup>

Malbec (*Vitis vinifera* L.) is a middle-maturing grape variety of French origin that is now mainly produced in Mendoza. This cultivar is well adapted to the different local ecosystems and nowadays is considered to be the emblematic cultivar for wine production in Argentina.<sup>11</sup> In Mendoza's Malbec vineyards, cluster thinning is commonly applied to modify fruit growth and composition. However, to our knowledge, to date there is no published information about the influence of this viticultural practice on the individualized phenolic composition of Malbec grapes and the evolution of these compounds during ripening. Considering this, the aim of the present work was to study the phenolic composition of Malbec grape skins and seeds and to evaluate the effect of cluster thinning timing in two consecutive seasons.

## MATERIALS AND METHODS

**Standards and Reagents.** Standards of gallic acid [149-91-7], syringic acid [530-57-4], caffeic acid [331-39-5], ethyl gallate [831-61-8], (b)-catechin [7295-85-4], (-)-epicatechin [490-46-0], resveratrol [501-36-0], myricetin [529-44-2], quercetin-3-glucoside [21637-25-2], and *p*-dimethylaminocinnamaldehyde [6203-18-5] were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), whereas protocatechuic acid [99-50-3], quercetin [117-39-5], kaempferol-3-glucoside [480-10-4], and malvidin-3-glucoside chloride [7228-78-6] were supplied by Extrasynthese (Lyon, France). Sodium chloride, sodium metabisulfite, sodium hydroxide, and tartaric acid were purchased from Anedra (Buenos Aires, Argentina). Ammonium iron(II) sulfate and butanol were obtained from Dalton (Mendoza, Argentina). Ethyl ether and ethyl acetate were acquired from Sintorgan (Buenos Aires, Argentina). Sodium sulfate anhydrous, hydrochloric acid, acetic acid, formic acid, ethanol, chromatography grade methanol, and acetonitrile were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All reagents were of analytical grade or superior. Ultrapure water was obtained from an RiO/Elix3-Sinergy185 purification system (Millipore, Sao Pablo, Brazil). Cellulose filter (3 µm pore size) and 0.45 µm pore size nylon membrane were supplied by Microclar (Buenos Aires, Argentina).

**Instrumentation.** The pH was measured in a TPX-1 equipment (Altronix, Buenos Aires, Argentina), and soluble solids (°Brix) were measured with a refractometer, model ATC-1 (Atago, Tokyo, Japan). Skin grinding was performed using a mixer homogenizer (Omni International, Germany). Seeds milling was carried out through an ultracentrifugal mill model ZM200 (Retsch, Newtown, PA). The extract maceration was made in an orbital shaker (Decalab, Buenos Aires, Argentina) and the centrifugation with CM4080 equipment (Rolco, Buenos Aires, Argentina).



Absorbance measurements were made with a Perkin-Elmer UV-vis spectrophotometer model Lambda 25 (PerkinElmer, Hartford, CT). The chromatographic system consisted of a Perkin-Elmer series 200 high-performance liquid chromatograph equipped with a photodiode array detector, a quaternary pump, and an autosampler (HPLC-DAD; PerkinElmer, Shelton, CT). A reversed phase Chromolith Performance C<sub>18</sub> column (100 mm x 4.6 mm i.d., 2 µm; Merck) was used for individual anthocyanin analysis. A reversed phase Nova-Pak C<sub>18</sub> column (300 mm x 3.9 mm i.d., 4 µm; Waters Corp., Milford, MA) was applied in low molecular weight phenolic compound analysis.

**Plant Material and Experimental Conditions.** The experiments were performed in 2008 and 2009 seasons, in a commercial vineyard located at an altitude of 1100m at Altamira (69° 07' W and 33° 43' S), San Carlos, Mendoza, Argentina. The grapevines of *V. vinifera* L. cv. Malbec were planted in 2000, own-rooted, trained on a vertical trellis system, pruned as Guyot, and arranged in north-south oriented rows spaced 2 m apart, with 1.2 m between plants on the row. The vineyard was managed according to standard viticultural practices for the cultivar and region. Winter pruning was carried out leaving 12 buds per vine. Canopy management practices, all manually performed, included trunk deshooting and removal of double shoots. Shoots were not trimmed, but positioned twice between the wires, and no leaf removal was conducted. The plants were maintained with no soil-water restriction during the whole experiment by a drip irrigation system. Average seasonal (September-March) water received per vine has been estimated at about 400 mm. Drip irrigation was applied with pressure-compensated emitters (2 L/h) located in a single row 0.75 m apart. Irrigation started before budbreak and finished about a week before harvest. Four cluster thinning (CT) treatments were imposed as a completely randomized design with three replicates. The experimental unit consisted of 30 plants, which were selected on the basis of their homogeneity in the row. Treatments were early thinning [T1, at pea size, approximately 40 days after flowering (DAF)], veraison thinning (T2, at veraison, 80 DAF), late thinning (T3, 100 DAF), and no thinned control (C). For CT treatments, 50% of the clusters of each plant were removed at 40 (T1), 82 (T2), and 103 (T3) DAF in 2008 and at 39 (T1), 78 (T2), and 101 (T3) DAF in 2009. Flowering was on November 13, 2008, and November 17, 2009, according to the stage 23 described by Coombe.<sup>12</sup> The distal cluster was removed, leaving only one bunch per shoot at most, as were clusters of weak shoots. Yield components were assessed at harvest. The number of clusters, total vine yield per vine, and canopy surface area/yield ratio were determined in 10 vines per treatment. Cluster weight was calculated in 10 clusters per treatment. Crop yield prediction per hectare was based on past weight of clusters recorded by the vineyard and confirmed at harvest. Climatic conditions of the two seasons 2008 and 2009 were very different, particularly in the rainfall amounts and temperatures (**Table 1**). These meteorological conditions significantly affected the grape ripening period. The 2008 season

had higher rainfall records and lower temperatures than the 2009 season, so the ripening was slower and the time of harvest about 30 days later. Due to the foregoing, the berry sampling dates in both seasons were different.

**Table 1.** Monthly Rainfall, Growing Degree Days, and Maximum and Minimum Air Temperature at Altamira, in 2008 and 2009 Seasons<sup>a</sup>

month	2008				2009			
	rain (mm)	GDD (°C)	$T_{max}$ (°C)	$T_{min}$ (°C)	rain (mm)	GDD (°C)	$T_{max}$ (°C)	$T_{min}$ (°C)
July	6	0	23,0	-14,5	0	0	22,5	-4,0
Aug	24	0	20,0	-7,5	41	0	29,0	-4,5
Sep	31	45	28,0	-1,5	17	60	27,0	-5,0
Oct	65	171	32,5	3,0	4	155	30,0	1,5
Nov	6	225	33,5	0,0	7	360	39,0	8,5
Dec	54	341	34,5	6,5	53	372	37,5	8,5
Jan	46	356,5	35,0	6,5	24	341	37,0	8,0
Feb	59	290	35,0	8,0	0	336	35,5	9,0
March	47	248	30,5	9,0	0	341	35,0	7,0
April	51	105	29,5	-3,0	0	210	30,0	2,0
May	0	nd	nd	nd	0	nd	nd	nd
June	0	nd	nd	nd	0	nd	nd	nd
total	389	1781,5			146	2175		

<sup>a</sup>Season 2008 understand includes July 2007-June 2008. Season 2009 includes July 2008 to June 2009. GDD, growing degree days;  $T_{max}$  maximum air temperature;  $T_{min}$ , minimum air temperature; nd, data not available.

**Berry Sampling and General Analytical Parameters.** Three hundred berries per experimental unit were randomly collected, from different positions within clusters and plants, in nylon bags. Sampling corresponded to 85, 113, and 154 DAF in 2008 and to 67, 98, and 121 DAF in 2009. The last sampling in both seasons is considered as the harvest time (about 25 °Brix). The samples were kept in dry ice to prevent dehydration and transported to the laboratory, where they were weighed, frozen, and conserved at -80 °C. One hundred berries per experimental unit were defrosted at room temperature, and skins were separated from pulp and seeds by hand. The pulps were collected in nylon bags and crushed by finger pressing to obtain the juice, and later this juice was used to determine soluble solids (°Brix), pH, and titratable acidity (g/L of tartaric acid) as described by Zoecklein et al.<sup>13</sup>

**Extract Preparation of Skins and Seeds.** Berry phenolics were extracted as described in previous papers.<sup>14-16</sup> Briefly, skins and seeds were separated by hand from 100 berries, weighed, and ground with 30 mL of ultrapure water. Forty milliliters of hydroalcoholic solution (ethanol/water, 12:88, v/v) containing 5 g/L of tartaric acid was added to the ground material (skins or seeds), and the weight of the resulting suspension was adjusted to 200 g with ultrapure water. The pH of extracts was adjusted to 3.6 with NaOH or HCl. Extracts were macerated for 2 h at 25 °C using an orbital shaker at 200 rpm and then centrifuged for 15 min at 2038g.

**Spectrophotometric Characterization.** Total phenols were determined by direct reading of the absorbance of the samples at 280 nm.<sup>17</sup> Total phenols were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of sample (GAE, mg/g). Total anthocyanins were measured by diluting the extract with 2% hydrochloric acid in ethanol and by comparing spectrophotometric readings at 520 nm of single aliquots treated with either sodium metabisulfite or water.<sup>17</sup> Total anthocyanins were expressed as milligrams of malvidin-3-glucoside per gram of sample. For total proanthocyanidins, the analytical method applied was the acid butanol assay.<sup>18</sup> This method is based on the acid-catalyzed oxidative cleavage of the C-C interflavanic bond of proanthocyanidins in butanol-HCl. Total proanthocyanidins were expressed as milligrams of (+)-catechin per gram of sample. Other chemical parameters measured in the samples were flavanol reagents with *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (flavanols DMACH), expressed as milligrams of (+)-catechin per gram of sample,<sup>19</sup> and color intensity.<sup>20</sup>

**HPLC Analysis of Anthocyanins.** Two milliliters of skin extracts per experimental unit was filtered through a 0.45 µm pore size nylon membrane, and then 100 µL was injected in the HPLC-DAD system. Separation was performed at 25 °C. A gradient consisting of solvent A (water/formic acid, 90:10, v/v) and solvent B (acetonitrile) was applied at a flow rate of 1.1mL/min from 0 to 22 min and at flow rate of 1.5mL/min from 22 to 35 min as follows: 96-85% A and 4-15% B from 0 to 12 min, 85-85% A and 15-15% B from 12 to 22 min, 85-70% A and 15-30% B from 22 to 35 min. This was followed by a final wash with 100% methanol and re-equilibration of the column. Photodiode array detection was performed from 210 to 600 nm, and the quantification was carried out by peak area measurements at 520 nm, according to the method of Fanzone et al.<sup>11</sup> Anthocyanin amount was expressed by using malvidin-3-glucoside chloride as standard for a calibration curve ( $R^2 = 0.98$ ). Identification and confirmation of anthocyanic pigments was performed by HPLC-DAD/ESI-MS as described by Monagas et al.<sup>21</sup>

**HPLC Analysis of Low Molecular Weight Phenolic Compounds.** Sodium chloride (1 g) was added to 50 mL of skin and seed extract and extracted three times with 20 mL of ethyl ether and three times with 20 mL of ethyl acetate. The organic fractions were combined, dehydrated with 2.5 g of sodium sulfate anhydrous, filtered through a 3 µm pore size cellulose filter, and evaporated to dryness under a gentle nitrogen gas stream at 35 °C. The solid residue was dissolved in 2 mL of methanol/water (1:1, v/v) and filtered through a 0.45 µm pore size nylon membrane, and then 30 µL was injected in the HPLC-DAD system according to the conditions described previously.<sup>11,22</sup> Separation was performed at 25 °C. Two mobile phases were employed for elution: A (water/acetic acid, 98:2, v/v) and B (water/acetonitrile/acetic acid, 78:20:2, v/v/v). The gradient profile was 0-55

min, 100-20% A and 0-80% B; 55-57 min, 20-10% A and 80-90% B; 57-70 min, 10% A and 90% B isocratic; 70-80 min, 10-0% A and 90-100% B; 80-125 min, 100% B isocratic; followed by a 100% methanol washing and re-equilibration of the column. The flow rate was 0.9 mL/min from 0 to 55 min and 1.0 mL/min from 55 to 125 min. Detection was performed by scanning from 210 to 360 nm with an acquisition speed of 1 s. The identification of specific compounds was carried out by comparison of their spectra and retention times with those of standards. All of the individual phenolic compounds were confirmed by HPLC-DAD/ESI-MS as described by Monagas et al.<sup>22</sup> Quantitative determinations were made by using the external standard method with the commercial standards. The calibration curves were obtained by injection of standard solutions, under the same conditions as for the samples analyzed, over the range of concentrations observed ( $R^2 \geq 0.94$ ). The compounds for which no standards were available were quantified with the curves of quercetin (dihydroflavonols), quercetin-3-glucoside (quercetin and flavonol glycosides), myricetin (myricetin glycosides), kaempferol-3-glucoside (kaempferol-3-galactoside), resveratrol (*trans*- and *cis*-resveratrol glucoside), caffeic acid (*trans*-ferulic acid), ethyl gallate (methyl gallate), and (+)-catechin (procyanidins). All of the analyses (including extraction) were performed in triplicate.

**Statistical Analysis.** Statistical analysis was carried out with Statgraphics Plus version 4.0 software (copyright 1994-1999, Statistical Graphics Corp., Warranton, VA). All of the results were tested for homogeneity of variance using Cochran's test and analyzed by one-way or multifactorial analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple range tests (TMRT). A  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

To our best knowledge, there is very scarce information in the literature about the phenolic composition of Malbec grapes. Therefore, our discussion will be mainly focused on a comparison between Malbec and other international red varieties.

**Vine Vegetative Parameters.** The effectiveness in yield reduction by thinning treatments in 2008 and 2009 is shown in **Table 2**. Yield components of Malbec vines, with the exception of cluster weight, were significantly affected by CT in both seasons, but we found no statistically significant differences among treatments T1, T2, and T3. In 2008, thinned vines averaged 38% less yield, with 44.2% fewer clusters per vine as compared to the control plants. Similar results were observed in 2009, with a 41.7 and 45.6% reductions of yield and number of clusters, respectively, in thinned plants. With respect to canopy surface area/yield ratio, CT caused increases of 80.0 and 56.7% in 2008 and 2009, respectively, as compared to the control. However, in 2009 the annual yield was

significantly lower and the canopy surface area/yield ratio was significantly higher than in 2008, possibly due to climatic differences between seasons, especially higher temperatures at flowering in November 2009 (Table 1).

Table 2. Yield Components of Malbec Vines from Altamira (2008-2009) <sup>a</sup>						
year	treatment	parameter, mean ± SE (n = 3)				
		cluster number/vine	cluster weight (g)	yield/vine (kg/vine)	crop yield (t/ha)	canopy surface area/yield (m <sup>2</sup> /kg)
2008	C	24.2 ± 0.4 b	151.3 ± 11.0 a	3.6 ± 0.1 b	14.7 ± 0.3 b	0.5 ± 0.1 a
	T1	13.5 ± 0.1 a	161.9 ± 8.4 a	2.2 ± 0.1 a	9.4 ± 0.1 a	0.9 ± 0.1 b
	T2	13.7 ± 0.1 a	162.0 ± 6.7 a	2.3 ± 0.1 a	9.6 ± 0.1 a	0.9 ± 0.1 b
	T3	13.3 ± 0.1 a	164.4 ± 8.3 a	2.2 ± 0.1 a	9.6 ± 0.1 a	0.9 ± 0.1 b
2009	C	20.9 ± 0.5 b	80.2 ± 4.0 a	1.6 ± 0.1 b	6.8 ± 0.1 b	1.0 ± 0.1 a
	T1	10.8 ± 0.4 a	91.4 ± 12.2 a	0.9 ± 0.1 a	4.1 ± 0.1 a	1.6 ± 0.1 b
	T2	12.1 ± 0.4 a	76.1 ± 10.3 a	0.9 ± 0.1 a	3.9 ± 0.1 a	1.6 ± 0.1 b
	T3	11.2 ± 0.5 a	93.9 ± 11.5 a	1.0 ± 0.1 a	4.3 ± 0.2 a	1.5 ± 0.1 b

<sup>a</sup>In each column, within the same year, mean values followed by different letters indicate significant differences (Tukey, *p* < 0,05). SE, standard error. Cluster thinning treatments: C, control; T1, early thinning; T2, veraison thinning; T3, late thinning.

**General Analytical Parameters.** The analysis of 100 berries of Malbec grapes during ripening showed no significant differences among treatments, with respect to the total weight, skin weight, and seed weight (Table 3). These results, with the absence of differences in the cluster weight (Table 2), indicate that no yield compensation occurred.<sup>10,15</sup> In general, for both seasons, the weight of the berries as well as that of the skins increased from veraison to harvest, whereas seeds showed a slight decrease in weight at the second sampling without continuing the trend toward harvesting. The pooled data of the grapes for the two years of study are shown in Table 4, which represents a two-way ANOVA using CT treatments and year as factors. When the factors “CT and year” were jointly analyzed, there was a significant effect of “year” for these evaluated general physical parameters.

In terms of berry composition, CT treatments led to significantly higher soluble solids concentration (°Brix) in both seasons, with a similar evolution among all treatments until harvest (Table 3). The enhancement of sugar accumulation could be linked to the increase of canopy surface area/yield ratio. Similar results are described for other grape varieties in other studies.<sup>7,23</sup> According to Petrie and Clingeleffer,<sup>23</sup> the observed increase in soluble solids caused by thinning treatments would be mostly due to the advancement of berry maturity rather than to the variation of the sugar accumulation rate. Other must parameters (pH, titratable acidity) were unaffected by CT in both seasons (Table 3), but there was a significant effect of factor “year” for pH (Table 4), with values slightly higher in 2009.

<b>Table 3. General Physical and Chemical Analyses of Malbec Grapes from Altamira During Ripening (2008-2009)<sup>a</sup></b>							
parameter	year	DAF	mean ± SE (n = 3) for treatment				
			C	T1	T2	T3	
average weight per 100 berries (g)	2008	85 <sup>b</sup>	139.6 ± 0.7 a	139.8 ± 2.6 a	148.4 ± 7.5 a	143.1 ± 1.1 a	
		113	184.3 ± 6.5 a	182.1 ± 2.6 a	189.5 ± 3.6 a	188.2 ± 2.5 a	
		154 <sup>c</sup>	191.7 ± 3.0 a	189.4 ± 4.6 a	188.4 ± 5.6 a	191.6 ± 3.5 a	
	2009	67 <sup>b</sup>	133.3 ± 0.8 a	141.1 ± 2.7 a	129.5 ± 5.2 a	139.4 ± 2.3 a	
		98	172.3 ± 3.0 a	173.1 ± 3.7 a	163.2 ± 3.9 a	170.0 ± 2.0 a	
		121 <sup>c</sup>	180.4 ± 6.7 a	182.9 ± 7.0 a	175.3 ± 3.2 a	187.3 ± 5.0 a	
	average weight per 100 skins (g)	2008	85 <sup>b</sup>	19.7 ± 1.7 a	15.5 ± 0.8 a	19.8 ± 0.7 a	17.3 ± 0.6 a
			113	22.6 ± 1.6 a	21.6 ± 2.2 a	20.0 ± 1.1 a	17.6 ± 1.1 a
			154 <sup>c</sup>	22.4 ± 2.1 a	20.6 ± 0.7 a	22.2 ± 1.2 a	24.0 ± 0.5 a
2009		67 <sup>b</sup>	16.5 ± 1.0 a	17.1 ± 0.6 a	15.9 ± 0.6 a	17.0 ± 0.5 a	
		98	17.1 ± 1.7 a	15.9 ± 0.3 a	14.6 ± 0.1 a	15.7 ± 0.7 a	
		121 <sup>c</sup>	16.2 ± 0.3 a	17.5 ± 0.7 a	16.4 ± 0.6 a	17.7 ± 0.8 a	
average weight per 100 seeds (g)		2008	85 <sup>b</sup>	6.6 ± 0.2 ab	5.9 ± 0.3 a	6.9 ± 0.2 b	6.3 ± 0.1 ab
			113	5.3 ± 0.3 a	5.2 ± 0.1 a	5.4 ± 0.1 a	5.4 ± 0.2 a
			154 <sup>c</sup>	5.7 ± 0.2 a	5.5 ± 0.1 a	5.3 ± 0.3 a	5.9 ± 0.2 a
	2009	67 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.1 a	5.8 ± 0.3 a	5.3 ± 0.2 a	5.6 ± 0.2 a	
		98	5.4 ± 0.1 a	5.5 ± 0.2 a	5.0 ± 0.1 a	5.1 ± 0.1 a	
		121 <sup>c</sup>	5.4 ± 0.2 a	5.5 ± 0.6 a	5.2 ± 0.3 a	6.0 ± 0.3 a	
	soluble solids (°Brix)	2008	85 <sup>b</sup>	13.6 ± 0.1 a	15.5 ± 0.2 b	13.8 ± 0.3 a	14.1 ± 0.2 a
			113	21.3 ± 0.7 a	23.1 ± 0.3 a	22.9 ± 0.7 a	22.0 ± 0.4 a
			154 <sup>c</sup>	25.0 ± 0.4 a	26.7 ± 0.1 b	26.5 ± 0.3 b	26.3 ± 0.3 ab
2009		67 <sup>b</sup>	14.5 ± 0.3 ab	15.1 ± 0.1 b	15.0 ± 0.2 ab	13.8 ± 0.4 a	
		98	23.1 ± 0.4 ab	24.6 ± 0.3 b	23.9 ± 0.1 ab	22.8 ± 0.1 a	
		121 <sup>c</sup>	24.5 ± 0.1 a	25.5 ± 0.1 c	25.0 ± 0.1 ab	24.9 ± 0.2 ab	
titratable acidity (tartaric acid, g/L)		2008	85 <sup>b</sup>	19.3 ± 0.4 b	18.0 ± 0.6 a	19.6 ± 0.1 b	19.1 ± 0.5 ab
			113	6.5 ± 0.1 c	5.2 ± 0.1 a	5.7 ± 0.1 ab	5.8 ± 0.3 b
			154 <sup>c</sup>	4.1 ± 0.1 a	3.9 ± 0.3 a	4.0 ± 0.2 a	3.9 ± 0.1 a
	2009	67 <sup>b</sup>	17.3 ± 0.3 a	17.9 ± 0.5 a	17.5 ± 0.4 a	17.9 ± 0.1 a	
		98	5.0 ± 0.1 a	4.9 ± 0.1 a	4.8 ± 0.3 a	5.2 ± 0.2 a	
		121 <sup>c</sup>	3.3 ± 0.1 a	3.6 ± 0.1 a	3.4 ± 0.2 a	3.8 ± 0.2 a	
	pH	2008	85 <sup>b</sup>	2.86 ± 0.03 a	2.86 ± 0.02 a	2.86 ± 0.02 a	2.80 ± 0.01 a
			113	3.24 ± 0.04 a	3.39 ± 0.02 b	3.30 ± 0.04 ab	3.22 ± 0.03 a
			154 <sup>c</sup>	3.60 ± 0.05 a	3.71 ± 0.06 a	3.61 ± 0.01 a	3.63 ± 0.03 a
2009		67 <sup>b</sup>	2.89 ± 0.02 a	2.90 ± 0.01 a	2.90 ± 0.01 a	2.86 ± 0.01 a	
		98	3.52 ± 0.03 a	3.59 ± 0.01 a	3.58 ± 0.03 a	3.53 ± 0.01 a	
		121 <sup>c</sup>	3.86 ± 0.04 a	3.92 ± 0.01 a	3.93 ± 0.01 a	3.89 ± 0.01 a	

<sup>a</sup>Mean values followed by different letters indicate significant differences between yield treatments for the same sampling date (Tukey,  $p < 0,05$ ). SE, standard error. DAF, days after flowering. Cluster thinning treatments: C, control; T1, early thinning; T2, veraison thinning; T3, late thinning. <sup>b</sup>Veraison. <sup>c</sup>Harvest time.

<b>Table 4.</b> Probability Values for Year and Cluster Thinning Treatments to the General Analytical Parameters and Total Phenolic Compounds in Malbec Grapes from Altamira (Pooled Data for 2008 and 2009 Seasons).			
parameter	<i>p</i> value <sup>a</sup> for factor		
	year	CT treatment	year x CT <sup>b</sup>
<b>berries</b>			
weight per 100 berries	0.0486	0.9523	0.7971
soluble solids	0.8919	0.8495	0.9920
titratable acidity	0.5874	0.9985	0.9940
pH	0.0449	0.9412	0.9932
<b>skins</b>			
weight per 100 skins	< 0.0001	0.5774	0.1803
total anthocyanins	0.0172	0.4832	0.9491
proanthocyanidins	0.7582	0.9175	0.9813
flavanols DMACH	0.0116	0.3053	0.8547
total phenols	0.0913	0.2661	0.6852
color intensity	0.3782	0.3782	0.9994
<b>seeds</b>			
weight per 100 seeds	0.0055	0.6800	0.1928
proanthocyanidins	0.0892	0.0055	0.2093
flavanols DMACH	0.4386	0.7481	0.8024
total phenols	0.8317	0.9945	0.9578
<sup>a</sup> Considered to be significant when $p < 0.05$ .			
<sup>b</sup> Interaction effect between year and cluster thinning treatments.			

**Phenolic Composition of Skins during Ripening. Total Phenolic Composition.** Table 5 shows the results of total phenolic parameters for Malbec grape skins and seeds during ripening. At harvest time, there were no significant differences among treatments relating to total anthocyanins, proanthocyanidins, flavanols DMACH, total phenols, and color intensity. These results are in agreement with Da Silva et al.,<sup>24</sup> when yield of Malbec grapes from Brazil was reduced by 45%. However, in both seasons T1 resulted in a higher total anthocyanin concentration at veraison, as compared to the other treatments. This could possibly be the result of an increased availability of sugars (Table 3), which can promote enzyme activity.<sup>25,26</sup> Total anthocyanin content showed biosynthesis, for both growing seasons evaluated, from the first sampling date until reaching a maximum value at the second sampling, and then diminished toward harvest. A similar decline has been reported by different authors.<sup>4,14,24,25</sup> Fournand et al.<sup>27</sup> suggested that this decrease could be caused by the conversion of free anthocyanins into polymeric pigments. At harvest, the values for this parameter ranged from 3.9 to 4.6 mg/g of skins and from 3.2 to 4.5 mg/g of skins in 2008 and 2009, respectively, indicating a significant effect of the factor “year” on the anthocyanin content (Tables 4 and 5). The lower contents detected in 2009, particularly in control vines, could indicate that climatic conditions with high temperatures (>33 °C) between January and March might affect

anthocyanin accumulation, through biosynthetic inhibition and degradation phenomena.<sup>8,28</sup> These concentrations are similar to those observed by Da Silva et al.<sup>24</sup> in Malbec berry skins from Brazil and higher than those reported by other authors in Cabernet Sauvignon and Carménère berry skins from Chile.<sup>14,29</sup>

Skin proanthocyanidins have been reported to increase in size during the later stages of ripening and react with pectins and anthocyanins, which can affect the mouthfeel and texture of red wines as well as color stability.<sup>30</sup> Due to the analytical method used, the results of this study reflect only quantitative changes without power assessed for the qualitative changes. In 2008, the results showed a decrease during ripening, whereas in 2009 there was a slight increase toward the second sampling and then a decrease until harvest. Some authors have suggested that this decrease is caused by reduced extractability as a result of tannin being bound to other cellular components.<sup>30</sup> At harvest, total proanthocyanidin content ranged between 7.7 and 10.7 mg/g in 2008 and between 10.4 and 12.6 mg/g in 2009 (**Table 5**). These results are in agreement with those determined by others authors<sup>14</sup> in Cabernet Sauvignon and Carménère berry skins.

The remaining parameters (total phenols, flavanols DMACH, and color intensity) followed the same trend observed for anthocyanins in both seasons. In the particular case of flavanols DMACH, there was a significant effect of the factor “year” (**Table 4**), with values slightly higher in 2009.

*HPLC Anthocyanin Profile of Grape Skins.* The identified and quantified compounds in Malbec skins were grouped according to acylation (nonacylated glucosides, acetyl-glucosides, and cinnamoylglucosides) and anthocyanidin (delphinidins, cyanidins, petunidins, peonidins, and malvidins) characteristics. Cinnamoyl-glucosides included both *p*-coumaroyl and caffeoyl anthocyanins. The results for these compounds in both seasons are presented in **Tables 6 and 7**. During the ripening period, independent of treatment, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-(6''-acetyl)glucoside, and peonidin-3-(6''-*p*-coumaroyl)glucoside in 2008 and only cyanidin-3-(6''-acetyl)glucoside in 2009 increased from veraison to harvest, whereas the remaining anthocyanins showed the same pattern of evolution observed for total anthocyanins. Nonacylated glucosides were the most abundant group as compared with the acylated forms, and malvidin was the main anthocyanidin, in accordance with many other cultivars that had prevalence of 3',5'-substituted anthocyanins,<sup>31</sup> including Malbec wines.<sup>11</sup> Predominance of 3',5'-substituted anthocyanins was associated with higher ratios of flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) to flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) transcription activity, and higher levels of *O*-methyltransferase (OMT) transcripts were observed in berries that accumulated methoxylated forms of anthocyanins more abundantly.<sup>31,32</sup> Considering the acylated derivatives, Malbec skins presented a higher proportion of acetyl-glucosides than of coumaroyl-glucosides (**Tables 6 and 7**), a pattern similar to that observed in Malbec and



Cabernet Sauvignon wines.<sup>11,21</sup> When analyzing the distribution of anthocyanidins, we observed the same profile previously found in Malbec wines.<sup>11</sup>

At harvest, the berry skins from CT treatments had higher contents of nonacylated glucosides and acetylated and cinnamoylated derivatives in 2008 compared with 2009. In 2008, there was a significant effect of CT on the anthocyanin composition. Early thinning (T1) was the most significant, generating 44.0, 39.6, and 41.2% more glucosylated, acetylated, and total anthocyanins, respectively, as compared with the control (C). In the treatments at the most advanced stages of the ripening period (T2 and T3) the effect on the anthocyanin composition was lower. It has to be emphasized that this might be of importance because acetylated anthocyanins confer high stability to color intensity and threshold for visual detection in red wines and, therefore, better color quality.<sup>15</sup> Also of importance for color is the proportion of coumaroylated derivatives, but data from **Tables 6 and 7** suggest that these compounds are not affected by yield. With respect to individual compounds, we observed a significant effect of CT for 2008 on monoglucosides, acetylglucosides of delphinidin, cyanidin, and petunidin, and cyanidin-3-(6''-p-coumaroyl)glucoside, whereas in 2009 CT produced a significant effect only on the cyanidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, and cyanidin-3-(6''-acetyl)glucoside contents (**Tables 6 and 7**). Increases in individual anthocyanin contents of berries following cluster removal have also been reported in other grape varieties by several authors.<sup>8,15</sup>

The pooled data of individual phenolic compounds of skins and seeds for the two years of study are shown in **Table 8**, which represents a two-way ANOVA using "CT treatments and year" as factors. The differences observed in the composition of anthocyanins for both seasons could be explained by a differential content of primary metabolites (mainly sugars) required for anthocyanin biosynthesis. In 2008, with a lower canopy surface area/yield ratio in control vines, there may be some sugar limitation, and therefore the CT would alter the sink-source relationship affecting the anthocyanin-related gene expression,<sup>25,26,29</sup> whereas in 2009 with an increased canopy surface area/yield ratio, and thus no apparent sugar limitation, thinning did not affect the biosynthesis of anthocyanins. There was even a decline of its content, possibly due to a decrease in the expression of dihydroflavonol reductase gene.<sup>33</sup> Moreover, regardless of the thinning treatments, sun exposure may differentially affect the biosynthesis of anthocyanins in berries. The light significantly increases their accumulation and expression of biosynthetic genes.<sup>29</sup> Conversely, the temperature has a negative influence. Mori et al.<sup>28</sup> demonstrated that high temperature increases anthocyanin degradation in grape skin, together with a decrease in expression of flavonoid biosynthetic and *MYBA* genes.

**Table 5.** Total Phenolic Analyses of Malbec Berry Skins and Seeds from Altamira During Ripening (2008-2009)<sup>a</sup>

parameter	year	DAF	mean ± SE (n = 3) for treatment				
			C	T1	T2	T3	
<b>Skins</b>							
total anthocyanins (M3G), mg/g)	2008	85 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.1 ab	1.5 ± 0.1 b	1.1 ± 0.1 ab	0.9 ± 0.1 a	
		113	4.6 ± 0.4 a	5.7 ± 0.2 ab	6.0 ± 0.2 b	4.9 ± 0.4 ab	
		154 <sup>c</sup>	4.3 ± 0.6 a	4.6 ± 0.2 a	4.6 ± 0.1 a	3.9 ± 0.2 a	
	2009	67 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.1 a	1.6 ± 0.1 b	0.9 ± 0.1 a	1.0 ± 0.1 a	
		98	2.5 ± 0.1 a	3.3 ± 0.5 a	3.8 ± 0.4 a	3.4 ± 0.1 a	
		121 <sup>c</sup>	3.3 ± 0.4 a	4.5 ± 0.5 a	3.5 ± 0.4 a	3.2 ± 0.2 a	
	proanthocyanidins (catechin, mg/g)	2008	85 <sup>b</sup>	20.9 ± 2.7 a	18.4 ± 0.2 a	20.0 ± 2.6 a	15.6 ± 0.6 a
			113	9.5 ± 0.8 a	11.7 ± 2.3 a	11.8 ± 0.1 a	13.5 ± 0.5 a
			154 <sup>c</sup>	7.7 ± 0.7 a	10.7 ± 0.9 a	8.5 ± 0.8 a	8.1 ± 0.6 a
2009		67 <sup>b</sup>	13.9 ± 1.3 a	10.3 ± 2.4 a	12.8 ± 2.9 a	12.5 ± 2.6 a	
		98	13.0 ± 1.2 a	14.8 ± 0.7 a	16.7 ± 0.7 a	14.2 ± 1.4 a	
		121 <sup>c</sup>	10.8 ± 1.1 a	12.6 ± 0.5 a	10.4 ± 0.2 a	10.8 ± 1.4 a	
flavanols DMACH (catechin, mg/g)		2008	85 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.1 a	1.4 ± 0.1 b	1.1 ± 0.1 a	1.2 ± 0.1 a
			113	1.2 ± 0.1 a	1.3 ± 0.3 a	1.3 ± 0.1 a	1.5 ± 0.3 a
			154 <sup>c</sup>	1.0 ± 0.1 a	1.4 ± 0.1 a	0.9 ± 0.2 a	0.9 ± 0.1 a
	2009	67 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.1 a	1.2 ± 0.1 a	1.0 ± 0.1 a	1.0 ± 0.1 a	
		98	1.6 ± 0.1 a	1.9 ± 0.1 a	2.0 ± 0.1 a	1.7 ± 0.2 a	
		121 <sup>c</sup>	1.2 ± 0.1 a	1.4 ± 0.2 a	1.2 ± 0.1 a	1.2 ± 0.1 a	
	total phenols (GAE, mg/g)	2008	85 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.1 a	8.3 ± 0.1 b	6.0 ± 0.3 a	6.8 ± 0.4 a
			113	9.1 ± 0.5 a	11.4 ± 2.2 a	11.6 ± 1.3 a	12.0 ± 1.2 a
			154 <sup>c</sup>	10.5 ± 1.5 a	14.3 ± 0.8 a	11.2 ± 1.2 a	10.6 ± 0.4 a
2009		67 <sup>b</sup>	5.7 ± 0.3 a	5.7 ± 0.3 a	5.4 ± 0.2 a	5.2 ± 0.1 a	
		98	9.8 ± 0.7 a	12.0 ± 0.5 a	12.4 ± 0.6 a	11.0 ± 0.9 a	
		121 <sup>c</sup>	9.3 ± 0.8 a	9.5 ± 0.6 a	9.6 ± 0.2 a	8.6 ± 0.6 a	
Color intensity (A <sub>420</sub> +A <sub>520</sub> +A <sub>620</sub> ) x 10		2008	85 <sup>b</sup>	3.0 ± 0.1 a	3.2 ± 0.3 a	2.8 ± 0.1 a	2.7 ± 0.1 a
			113	6.2 ± 0.4 a	8.0 ± 0.4 a	8.0 ± 0.8 a	6.8 ± 0.7 a
			154 <sup>c</sup>	6.8 ± 0.4 a	8.7 ± 1.0 a	8.1 ± 0.7 a	7.9 ± 0.1 a
	2009	67 <sup>b</sup>	2.4 ± 0.2 ab	2.8 ± 0.2 b	2.2 ± 0.1 ab	2.4 ± 0.1 a	
		98	6.4 ± 0.4 a	8.7 ± 0.7 b	8.0 ± 0.2 ab	7.1 ± 0.4 ab	
		121 <sup>c</sup>	5.5 ± 0.5 a	7.2 ± 0.1 a	7.1 ± 0.4 a	6.4 ± 0.6 a	
	<b>Seeds</b>						
	proanthocyanidins (catechin, mg/g)	2008	85 <sup>b</sup>	123.0 ± 14.2 a	106.4 ± 9.0 a	134.7 ± 9.0 a	95.2 ± 2.2 a
			113	109.5 ± 2.0 a	113.2 ± 3.7 a	96.9 ± 9.0 a	101.3 ± 4.7 a
154 <sup>c</sup>			125.2 ± 3.6 a	120.2 ± 16.8 a	125.1 ± 7.5 a	96.8 ± 6.1 a	
2009		67 <sup>b</sup>	116.9 ± 1.8 a	116.1 ± 4.9 a	116.1 ± 9.9 a	108.8 ± 3.6 a	
		98	102.3 ± 3.4 a	105.3 ± 1.9 a	105.7 ± 2.4 a	98.7 ± 1.7 a	
		121 <sup>c</sup>	99.2 ± 3.0 a	102.3 ± 0.4 ab	112.5 ± 2.4 b	100.8 ± 3.5 ab	
flavanols DMACH (catechin, mg/g)		2008	85 <sup>b</sup>	17.1 ± 0.9 ab	17.5 ± 0.4 ab	19.8 ± 0.9 b	15.2 ± 0.6 a
			113	13.0 ± 1.5 a	13.9 ± 0.3 a	12.2 ± 0.3 a	12.3 ± 0.3 a
			154 <sup>c</sup>	10.8 ± 0.6 ab	12.4 ± 0.5 b	10.9 ± 0.2 ab	10.1 ± 0.2 a
	2009	67 <sup>b</sup>	17.5 ± 1.5 a	20.4 ± 0.2 a	20.1 ± 0.3 a	20.3 ± 1.1 a	
		98	11.7 ± 0.2 a	12.7 ± 0.2 a	12.4 ± 0.2 a	12.5 ± 0.8 a	
		121 <sup>c</sup>	11.9 ± 0.2 a	11.3 ± 0.5 a	11.2 ± 0.6 a	11.1 ± 1.5 a	
	total phenols (GAE, mg/g)	2008	85 <sup>b</sup>	38.3 ± 0.7 a	40.0 ± 3.1 a	37.9 ± 2.5 a	43.2 ± 6.0 a
			113	34.4 ± 1.9 a	31.1 ± 1.7 a	30.0 ± 2.6 a	30.8 ± 0.8 a
			154 <sup>c</sup>	26.7 ± 2.5 a	26.9 ± 1.7 a	29.9 ± 0.7 a	25.7 ± 2.3 a
2009		67 <sup>b</sup>	36.4 ± 0.5 a	35.6 ± 0.3 a	35.7 ± 1.6 a	35.4 ± 1.5 a	
		98	31.2 ± 1.1 a	32.2 ± 0.4 a	32.0 ± 0.4 a	32.3 ± 0.4 a	
		121 <sup>c</sup>	28.6 ± 1.2 a	29.6 ± 0.5 ab	32.5 ± 1.0 b	29.8 ± 0.3 ab	

<sup>a</sup>Mean values followed by different letters indicate significant differences between yield treatments for the same sampling date (Tukey,  $p < 0,05$ ). SE, standard error. DAF, days after flowering. Cluster thinning treatments: C, control; T1, early thinning; T2, veraison thinning; T3, late thinning. <sup>b</sup>Veraison. <sup>c</sup>Harvest time.

Table 6. Individual Anthocyanins Quantified in 2008 Malbec Berry Skins from Altamira During Ripening <sup>a</sup>					
compound	DAF	concentration (mg/kg of skins, mean ± SE) for treatment			
		C	T1	T2	T3
delphinidin-3-glucoside	85 <sup>b</sup>	175.5 ± 8.9 a	244.2 ± 16.3 b	172.0 ± 4.3 a	180.6 ± 8.8 a
	113	282.3 ± 6.9 a	455.0 ± 44.1 b	379.7 ± 17.2 ab	300.3 ± 32.2 a
	154 <sup>c</sup>	197.4 ± 29.9 a	351.4 ± 46.0 b	309.6 ± 7.6 ab	257.5 ± 6.6 ab
cyanidin-3-glucoside	85 <sup>b</sup>	22.9 ± 3.1 a	52.6 ± 4.1 b	22.3 ± 2.4 a	27.7 ± 1.7 a
	113	24.1 ± 0.9 a	43.4 ± 6.6 a	37.3 ± 0.9 a	28.3 ± 6.0 a
	154 <sup>c</sup>	25.9 ± 2.9 a	47.7 ± 4.2 c	39.2 ± 1.8 bc	33.8 ± 0.8 ab
petunidin-3-glucoside	85 <sup>b</sup>	159.6 ± 7.8 a	207.6 ± 12.2 b	156.9 ± 4.1 a	161.7 ± 5.9 a
	113	316.0 ± 5.0 a	483.0 ± 41.7 b	412.5 ± 16.1 ab	335.4 ± 32.4 a
	154 <sup>c</sup>	230.9 ± 32.2 a	393.5 ± 45.5 b	348.2 ± 5.4 ab	290.6 ± 5.6 ab
peonidin-3-glucoside	85 <sup>b</sup>	67.3 ± 7.1 a	125.0 ± 7.4 b	65.1 ± 5.9 a	75.4 ± 1.6 a
	113	119.1 ± 3.8 a	208.7 ± 26.7 b	175.0 ± 11.1 ab	134.7 ± 20.3 ab
	154 <sup>c</sup>	163.5 ± 14.0 a	246.1 ± 17.8 b	218.1 ± 6.1 ab	194.5 ± 12.5 ab
malvidin-3-glucoside	85 <sup>b</sup>	592.2 ± 31.5 a	663.9 ± 32.4 a	587.5 ± 12.0 a	561.2 ± 15.7 a
	113	1668.8 ± 46.8 a	2054.0 ± 70.4 b	1695.9 ± 60.1 a	1617.5 ± 68.7 a
	154 <sup>c</sup>	1276.7 ± 103.0 a	1688.3 ± 126.1 b	1569.2 ± 41.3 ab	1419.2 ± 29.5 ab
<i>total glucosylated</i>	85 <sup>b</sup>	1017.5 ± 54.4 a (79.8 <sup>d</sup> )	1293.4 ± 70.9 b (80.4)	1003.7 ± 25.5 a (79.3)	1006.6 ± 27.0 a (80.4)
	113	2410.3 ± 33.4 a (76.4)	3244.2 ± 184.2 b (75.3)	2700.3 ± 104.4 ab (74.8)	2416.2 ± 158.1 a (75.0)
	154 <sup>c</sup>	1894.4 ± 181.4 a (75.3)	2727.0 ± 239.0 b (76.8)	2484.4 ± 56.3 ab (76.0)	2195.6 ± 30.9 ab (75.4)
delphinidin-3-(6''-acetyl)glucoside	85 <sup>b</sup>	25.3 ± 2.9 a	40.0 ± 2.5 b	26.2 ± 1.0 a	27.0 ± 1.2 a
	113	37.2 ± 0.4 a	65.8 ± 7.7 b	59.2 ± 2.4 ab	44.8 ± 7.4 ab
	154 <sup>c</sup>	30.3 ± 4.9 a	55.2 ± 6.5 b	48.1 ± 1.0 ab	39.2 ± 1.3 ab
cyanidin-3-(6''-acetyl)glucoside	85 <sup>b</sup>	3.7 ± 0.6 a	7.8 ± 0.4 b	3.8 ± 0.2 a	3.9 ± 0.2 a
	113	8.5 ± 1.4 a	13.5 ± 2.9 a	14.1 ± 0.4 a	12.7 ± 3.1 a
	154 <sup>c</sup>	9.5 ± 3.0 a	17.8 ± 1.4 b	15.7 ± 0.9 ab	13.9 ± 0.5 ab
petunidin-3-(6''-acetyl)glucoside	85 <sup>b</sup>	27.7 ± 2.6 a	41.3 ± 2.0 b	29.0 ± 0.7 a	29.0 ± 0.7 a
	113	49.7 ± 0.4 a	81.5 ± 7.4 b	73.4 ± 3.3 ab	58.0 ± 8.7 ab
	154 <sup>c</sup>	35.4 ± 5.7 a	61.9 ± 7.5 b	55.7 ± 1.2 ab	47.1 ± 2.1 ab
peonidin-3-(6''-acetyl)glucoside	85 <sup>b</sup>	23.0 ± 1.5 a	33.4 ± 2.3 b	23.3 ± 0.4 a	23.3 ± 0.9 a
	113	40.3 ± 1.5 a	68.1 ± 5.3 b	59.5 ± 4.9 ab	47.5 ± 6.4 ab
	154 <sup>c</sup>	38.1 ± 6.1 a	53.7 ± 4.8 a	48.5 ± 1.4 a	44.3 ± 1.2 a
malvidin-3-(6''-acetyl)glucoside	85 <sup>b</sup>	93.8 ± 6.8 ab	111.8 ± 4.4 b	98.3 ± 2.0 ab	89.5 ± 2.9 a
	113	331.4 ± 14.4 a	450.7 ± 7.4 b	378.2 ± 21.6 ab	340.6 ± 18.1 a
	154 <sup>c</sup>	264.7 ± 27.5 a	339.2 ± 27.6 a	320.8 ± 1.8 a	300.4 ± 5.5 a
<i>total acetylated</i>	85 <sup>b</sup>	173.4 ± 14.2 a (13.6)	234.3 ± 11.1 b (14.6)	180.7 ± 3.5 a (14.3)	172.8 ± 3.3 a (13.8)
	113	467.1 ± 17.0 a (14.8)	679.6 ± 30.1 b (15.8)	584.5 ± 32.1 ab (16.2)	503.8 ± 43.2 a (15.6)
	154 <sup>c</sup>	378.0 ± 45.3 a (15.0)	527.7 ± 47.7 b (14.9)	488.8 ± 3.8 ab (15.0)	444.8 ± 4.1 ab (15.3)
cyanidin-3-(6''-p-coumaroyl)glucoside	85 <sup>b</sup>	2.2 ± 0.2 a	4.0 ± 0.4 b	2.1 ± 0.2 a	2.5 ± 0.2 a
	113	2.0 ± 0.1 a	4.0 ± 0.6 b	3.6 ± 0.3 ab	2.5 ± 0.4 ab
	154 <sup>c</sup>	1.7 ± 0.3 a	3.1 ± 0.4 b	2.8 ± 0.2 ab	2.26 ± 0.02 ab
malvidin-3-(6''-caffeoyl)glucoside	85 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.1 a	0.8 ± 0.1 a	0.47 ± 0.02 a	0.6 ± 0.1 a
	113	4.3 ± 0.3 a	5.8 ± 0.3 b	5.0 ± 0.4 ab	4.7 ± 0.2 ab
	154 <sup>c</sup>	5.8 ± 1.1 a	6.4 ± 0.3 a	7.1 ± 0.6 a	5.8 ± 0.6 a
petunidin-3-(6''-p-coumaroyl)glucoside	85 <sup>b</sup>	13.9 ± 0.3 a	15.2 ± 1.2 a	13.6 ± 0.2 a	13.0 ± 0.5 a
	113	27.6 ± 1.9 a	42.8 ± 1.9 b	38.2 ± 3.7 ab	31.1 ± 2.7 ab
	154 <sup>c</sup>	19.5 ± 3.1 a	28.4 ± 4.1 a	27.2 ± 0.9 a	23.6 ± 0.4 a
malvidin-3-(6''-p-coumaroyl)glucoside <i>cis</i>	85 <sup>b</sup>	4.6 ± 0.2 a	3.4 ± 0.3 a	4.3 ± 0.4 a	3.6 ± 0.1 a
	113	10.4 ± 1.1 a	10.3 ± 1.2 a	8.3 ± 0.6 a	10.3 ± 0.4 a
	154 <sup>c</sup>	5.4 ± 0.4 a	5.4 ± 0.5 a	5.2 ± 0.1 a	5.6 ± 0.1 a
peonidin-3-(6''-p-coumaroyl)glucoside	85 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.3 a	8.4 ± 0.6 b	5.9 ± 0.3 a	6.0 ± 0.1 a
	113	14.9 ± 0.9 a	25.3 ± 2.0 b	22.1 ± 2.1 ab	17.8 ± 2.0 ab
	154 <sup>c</sup>	23.2 ± 2.5 a	29.4 ± 2.6 a	28.3 ± 0.9 a	25.7 ± 2.0 a
malvidin-3-(6''-p-coumaroyl)glucoside <i>trans</i>	85 <sup>b</sup>	56.1 ± 2.2 a	48.8 ± 4.1 a	55.5 ± 2.1 a	47.1 ± 1.1 a
	113	219.8 ± 18.9 a	295.6 ± 4.3 b	249.5 ± 20.0 ab	236.6 ± 12.9 ab
	154 <sup>c</sup>	187.9 ± 23.2 a	225.4 ± 24.4 a	224.2 ± 4.1 a	209.3 ± 5.4 a
<i>total coumaroylated</i>	85 <sup>b</sup>	82.8 ± 2.8 a (6.5)	79.7 ± 6.3 a (5.0)	81.4 ± 2.7 a (6.4)	72.2 ± 1.5 a (5.8)
	113	274.7 ± 22.7 a (8.7)	378.1 ± 4.3 b (8.8)	321.7 ± 26.6 ab (8.9)	298.4 ± 18.1 ab (9.3)
	154 <sup>c</sup>	237.7 ± 29.4 a (9.4)	291.7 ± 31.9 a (8.2)	287.7 ± 6.0 a (8.8)	266.4 ± 7.1 a (9.1)
<i>total cinnamoylated</i>	85 <sup>b</sup>	83.5 ± 2.8 a (6.6)	80.5 ± 6.4 a (5.0)	81.9 ± 2.7 a (6.5)	72.8 ± 1.5 a (5.8)
	113	279.0 ± 23.1 a (8.8)	383.9 ± 4.4 b (8.9)	326.7 ± 26.7 ab (9.0)	303.1 ± 18.2 ab (9.4)
	154 <sup>c</sup>	243.5 ± 30.5 a (9.7)	298.1 ± 32.1 a (8.4)	294.8 ± 6.4 a (9.0)	272.2 ± 7.2 a (9.3)
<i>total anthocyanins</i>	85 <sup>a</sup>	1274.4 ± 69.8 a	1608.2 ± 88.2 b	1266.3 ± 29.7 a	1252.3 ± 31.5 a
	113	3156.4 ± 70.1 a	4307.7 ± 216.7 b	3611.5 ± 162.8 ab	3223.1 ± 218.0 a
	154 <sup>b</sup>	2516.0 ± 254.6 a	3552.8 ± 318.6 b	3268.0 ± 53.6 ab	2912.6 ± 41.9 ab

<sup>a</sup>Average of three replicates followed by different letters in the same row indicate significant differences between treatments for each compound and date (Tukey,  $p < 0,05$ ). SE, standard error. DAF, days after flowering. Cluster thinning treatments: C, control; T1, early thinning; T2, veraison thinning; T3, late thinning. <sup>b</sup>Veraison. <sup>c</sup>Harvest time. <sup>d</sup>Relationship (%) between anthocyanin derivatives by acylation and total anthocyanins.

Table 7. Individual Anthocyanins Quantified in 2009 Malbec Berry Skins from Altamira During Ripening <sup>a</sup>					
compound	DAF	concentration (mg/kg of skins, mean ± SE) for treatment			
		C	T1	T2	T3
delphinidin-3-glucoside	67 <sup>b</sup>	109.2 ± 13.6 a	116.5 ± 10.9 a	88.2 ± 7.2 a	87.2 ± 4.2 a
	98	192.9 ± 13.9 ab	278.1 ± 26.4 ab	280.7 ± 25.1 b	174.0 ± 25.4 a
	121 <sup>c</sup>	147.0 ± 22.7 a	176.9 ± 7.2 a	156.4 ± 13.6 a	124.1 ± 13.9 a
cyanidin-3-glucoside	67 <sup>b</sup>	14.5 ± 3.3 a	19.5 ± 2.9 a	10.5 ± 1.7 a	10.5 ± 1.0 a
	98	15.5 ± 2.2 a	30.6 ± 3.4 b	28.9 ± 3.4 ab	16.9 ± 2.9 ab
	121 <sup>c</sup>	12.4 ± 2.7 a	20.0 ± 0.5 b	17.4 ± 1.2 ab	12.4 ± 1.3 a
petunidin-3-glucoside	67 <sup>b</sup>	119.4 ± 13.4 a	123.5 ± 10.1 a	100.6 ± 6.8 a	100.1 ± 2.3 a
	98	236.4 ± 17.9 ab	333.0 ± 28.0 ab	334.9 ± 25.7 b	221.1 ± 27.1 a
	121 <sup>c</sup>	196.0 ± 27.4 a	230.3 ± 7.6 a	211.9 ± 13.6 a	169.2 ± 15.9 a
peonidin-3-glucoside	67 <sup>b</sup>	58.6 ± 7.7 a	67.1 ± 6.5 a	45.0 ± 5.5 a	45.4 ± 0.9 a
	98	102.1 ± 11.9 ab	167.9 ± 14.5 c	163.1 ± 12.4 bc	95.1 ± 15.0 a
	121 <sup>c</sup>	81.6 ± 16.7 ab	120.0 ± 1.9 b	107.6 ± 5.1 ab	75.1 ± 6.7 a
malvidin-3-glucoside	67 <sup>b</sup>	567.6 ± 40.4 a	525.9 ± 30.3 a	470.3 ± 22.9 a	483.1 ± 12.6 a
	98	1465.8 ± 137.1 a	1764.4 ± 77.5 a	1842.9 ± 58.0 a	1405.3 ± 119.3 a
	121 <sup>c</sup>	1457.0 ± 115.5 a	1363.1 ± 38.6 a	1417.9 ± 42.8 a	1233.0 ± 49.8 a
<i>total glucosylated</i>	67 <sup>b</sup>	869.3 ± 78.3 a (79.6 <sup>d</sup> )	852.5 ± 57.7 a (79.9)	714.5 ± 43.8 a (78.9)	726.4 ± 4.8 a (79.4)
	98	2012.7 ± 174.3 ab (76.4)	2574.0 ± 148.5 ab (76.1)	2650.6 ± 121.7 b (76.8)	1912.4 ± 185.1 a (78.6)
	121 <sup>c</sup>	1894.0 ± 184.1 a (73.9)	1910.2 ± 45.2 a (75.3)	1911.2 ± 69.7 a (75.1)	1613.8 ± 82.8 a (74.2)
delphinidin-3-(6''-acetyl)glucoside	67 <sup>b</sup>	17.4 ± 2.6 a	19.6 ± 1.8 a	14.7 ± 1.5 a	12.1 ± 1.8 a
	98	24.6 ± 4.4 a	43.1 ± 4.0 b	40.3 ± 4.5 ab	24.7 ± 3.2 ab
	121 <sup>c</sup>	22.7 ± 4.0 a	30.8 ± 2.1 a	26.6 ± 1.9 a	21.7 ± 2.3 a
cyanidin-3-(6''-acetyl)glucoside	67 <sup>b</sup>	5.1 ± 0.9 a	5.9 ± 0.6 a	4.5 ± 0.6 a	3.3 ± 0.7 a
	98	8.3 ± 2.5 a	15.2 ± 0.4 a	12.9 ± 0.8 a	10.0 ± 1.4 a
	121 <sup>c</sup>	14.1 ± 1.5 a	15.7 ± 1.7 a	15.6 ± 0.4 a	14.0 ± 1.1 a
petunidin-3-(6''-acetyl)glucoside	67 <sup>b</sup>	22.0 ± 2.6 a	23.8 ± 1.9 a	19.4 ± 1.6 a	17.6 ± 0.9 a
	98	37.3 ± 3.8 a	59.7 ± 3.3 b	53.1 ± 5.5 ab	34.3 ± 4.2 a
	121 <sup>c</sup>	33.4 ± 5.4 a	42.8 ± 3.6 a	38.6 ± 3.0 a	32.9 ± 3.3 a
peonidin-3-(6''-acetyl)glucoside	67 <sup>b</sup>	16.1 ± 1.4 a	17.0 ± 1.2 a	13.4 ± 0.6 a	13.5 ± 0.8 a
	98	31.9 ± 2.8 ab	48.2 ± 2.9 c	45.0 ± 3.0 bc	25.6 ± 3.6 a
	121 <sup>c</sup>	28.5 ± 3.4 a	35.0 ± 2.9 a	31.2 ± 2.9 a	26.5 ± 1.9 a
malvidin-3-(6''-acetyl)glucoside	67 <sup>b</sup>	98.3 ± 5.7 a	90.5 ± 5.3 a	83.4 ± 3.2 a	83.6 ± 2.2 a
	98	293.5 ± 27.8 ab	363.1 ± 8.7 b	369.5 ± 8.4 b	260.4 ± 19.0 a
	121 <sup>c</sup>	310.4 ± 24.1 a	281.5 ± 19.0 a	287.8 ± 10.5 a	254.2 ± 9.0 a
<i>total acetylated</i>	67 <sup>b</sup>	159.0 ± 13.0 a (14.5)	156.7 ± 10.0 a (14.7)	135.3 ± 7.4 a (15.0)	130.2 ± 3.2 a (14.2)
	98	395.6 ± 36.1 a (15.0)	529.3 ± 18.7 b (15.7)	520.7 ± 22.1 b (15.1)	354.9 ± 30.3 a (14.6)
	121 <sup>c</sup>	409.2 ± 37.9 a (16.0)	405.8 ± 28.0 a (16.0)	399.9 ± 14.3 a (15.7)	349.3 ± 17.1 a (16.1)
cyanidin-3-(6''-p-coumaroyl)glucoside	67 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.2 a	1.5 ± 0.2 a	1.1 ± 0.1 a	1.2 ± 0.2 a
	98	1.2 ± 0.1 ab	2.3 ± 0.3 c	2.1 ± 0.2 bc	0.8 ± 0.1 a
	121 <sup>c</sup>	1.0 ± 0.2 ab	1.6 ± 0.1 b	1.1 ± 0.1 ab	0.8 ± 0.1 a
malvidin-3-(6''-caffeoyl)glucoside	67 <sup>b</sup>	1.30 ± 0.03 a	1.12 ± 0.03 a	1.2 ± 0.1 a	1.2 ± 0.2 a
	98	9.2 ± 2.7 a	8.4 ± 1.4 a	7.8 ± 1.0 a	5.3 ± 0.3 a
	121 <sup>c</sup>	9.3 ± 0.6 a	7.2 ± 0.5 a	11.1 ± 1.6 a	7.8 ± 0.4 a
petunidin-3-(6''-p-coumaroyl)glucoside	67 <sup>b</sup>	9.3 ± 0.4 a	9.0 ± 0.6 a	8.1 ± 0.4 a	8.5 ± 0.6 a
	98	20.1 ± 1.8 ab	26.8 ± 2.1 b	26.8 ± 1.4 b	14.6 ± 1.6 a
	121 <sup>c</sup>	19.5 ± 1.9 a	18.6 ± 1.0 a	17.8 ± 1.3 a	15.5 ± 1.2 a
malvidin-3-(6''-p-coumaroyl)glucoside <i>cis</i>	67 <sup>b</sup>	4.2 ± 0.1 a	3.2 ± 0.2 a	3.6 ± 0.5 a	3.7 ± 0.1 a
	98	8.5 ± 1.2 a	8.0 ± 0.6 a	8.8 ± 0.5 a	6.3 ± 0.7 a
	121 <sup>c</sup>	8.3 ± 0.8 b	5.0 ± 0.6 a	6.1 ± 0.6 ab	6.3 ± 0.2 ab
peonidin-3-(6''-p-coumaroyl)glucoside	67 <sup>b</sup>	4.6 ± 0.4 a	4.7 ± 0.3 a	3.6 ± 0.2 a	3.9 ± 0.2 a
	98	11.1 ± 1.2 a	18.3 ± 0.6 b	17.5 ± 1.2 b	8.0 ± 1.3 a
	121 <sup>c</sup>	12.9 ± 2.3 a	16.2 ± 1.4 a	15.5 ± 0.7 a	11.2 ± 0.5 a
malvidin-3-(6''-p-coumaroyl)glucoside <i>trans</i>	67 <sup>b</sup>	44.0 ± 1.7 a	37.7 ± 1.8 a	37.7 ± 3.1 a	39.3 ± 0.5 a
	98	175.4 ± 15.8 ab	213.8 ± 8.2 b	219.1 ± 4.3 b	129.8 ± 14.4 a
	121 <sup>c</sup>	209.1 ± 13.9 a	172.8 ± 9.6 a	183.9 ± 5.7 a	169.2 ± 5.1 a
<i>total coumaroylated</i>	67 <sup>b</sup>	63.2 ± 2.5 a (5.8)	56.2 ± 2.8 a (5.3)	54.1 ± 4.0 a (6.0)	56.6 ± 1.0 a (6.2)
	98	216.4 ± 19.2 ab (8.2)	269.3 ± 11.7 b (8.0)	274.3 ± 6.1 b (7.9)	159.6 ± 17.7 a (6.6)
	121 <sup>c</sup>	250.8 ± 17.4 a (9.8)	214.2 ± 12.3 a (8.4)	224.4 ± 7.4 a (8.8)	203.0 ± 6.9 a (9.3)
<i>total cinnamoylated</i>	67 <sup>b</sup>	64.5 ± 2.5 a (5.9)	57.3 ± 2.8 a (5.4)	55.3 ± 4.0 a (6.1)	57.8 ± 0.9 a (6.3)
	98	225.6 ± 21.7 ab (8.6)	277.7 ± 12.6 b (8.2)	282.1 ± 6.4 b (8.2)	164.9 ± 17.5 a (6.8)
	121 <sup>c</sup>	260.1 ± 17.9 a (10.1)	221.4 ± 12.8 a (8.7)	235.5 ± 7.0 a (9.2)	210.8 ± 7.3 a (9.7)
<i>total anthocyanins</i>	67 <sup>b</sup>	1092.7 ± 93.4 a	1066.6 ± 69.5 a	905.2 ± 48.1 a	914.3 ± 6.2 a
	98	2633.9 ± 231.1 ab	3381.0 ± 179.0 b	3453.4 ± 149.2 b	2432.3 ± 226.5 a
	121 <sup>c</sup>	2563.2 ± 238.2 a	2537.4 ± 79.0 a	2546.6 ± 90.5 a	2173.9 ± 107.1 a

<sup>a</sup>Average of three replicates followed by different letters in the same row indicate significant differences between treatments for each compound and date (Tukey,  $p < 0,05$ ). SE, standard error. DAF, days after flowering. Cluster thinning treatments: C, control; T1, early thinning; T2, veraison thinning; T3, late thinning.  
<sup>b</sup>Veraison. <sup>c</sup>Harvest time. <sup>d</sup>Relationship (%) between anthocyanin derivatives by acylation and total anthocyanins.

**Table 8.** Probability Values for Year and Cluster Thinning Treatments to the Phenolic Compounds in Malbec Berry Skins and Seeds from Altamira (Pooled Data for 2008 and 2009 Seasons).

compound	$p_{\text{value}}^{\text{a}}$ for factor		
	year	CT treatment	year x CT <sup>b</sup>
<b>skins</b>			
anthocyanins glucosylated	0.0256	0.2227	0.8043
anthocyanins acetylated	0.0548	0.2269	0.8135
anthocyanins cinnamoylated	0.0457	0.6603	0.8622
delphinidins	< 0.0001	0.0014	0.3443
cyanidins	< 0.0001	< 0.0001	0.0844
petunidins	0.0001	0.0196	0.6402
peonidins	< 0.0001	0.0050	0.6839
malvidins	0.3091	0.6211	0.9009
<i>total anthocyanins</i>	0.0303	0.2577	0.8162
hydroxybenzoic acids/derivatives	0.1914	0.7050	0.9457
hydroxycinnamic acids/derivatives	< 0.0001	0.0208	0.0215
stilbenes	0.0002	0.8856	0.9441
flavanols	0.0323	0.5862	0.9883
flavonols	0.0673	0.4590	0.9257
dihydroflavonols	< 0.0001	0.9032	0.9592
<i>total phenolic compounds</i>	0.0023	0.7441	0.9625
<b>seeds</b>			
<i>total phenolic compounds</i>	0.3947	0.7972	0.7787

<sup>a</sup> Considered significant when  $p < 0.05$ .  
<sup>b</sup> Interaction effect between year and cluster thinning treatments.

*HPLC Nonanthocyanin Profile of Grape Skins.* The identified and quantified low molecular weight phenolic compounds in Malbec skins during ripening (2008-2009) were grouped in nonflavonoids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids/derivatives, stilbenes) and flavonoids (flavanols, flavonols, and dihydroflavonols). Among nonflavonoids, we identified gallic, protocatechuic, syringic, *trans*-ferric, and *trans*-caffeic acids, methyl and ethyl gallates, and *trans* and *cis*-resveratrol-3-glucosides. Among nonanthocyanin flavonoids, we found 7 flavanols [(+)-catechin, (-)-epicatechin, 3 procyanidin dimers, and 2 procyanidin trimers], 10 flavonols (myricetin-3-galactoside, myricetin-3-glucoside, kaempferol-3-galactoside, quercetin-3-glucuronide, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside, quercetin-3-rhamnoside, isorhamnetin-3-glucoside, laricitrin-3-glucoside, and naringenin), and 4 dihydroflavonols (dihydroquercetin-3-rhamnoside, dihydroquercetin-3-glucoside, dihydrokaempferol-3-glucoside, and an unknown dihydroflavonol).

During the 2008 ripening period, independent of the treatment, the phenolic profile changed remarkably from 85 to 154 DAF (**Table 9**). There was a decrease in the relative abundance (percent) of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids/derivatives and flavonols with respect to the total, representing 3.9, 2.1, and 42.7% at 85 DAF and 2.4, 0.8, and 28.7% at 154 DAF, respectively, whereas stilbenes, flavanols, and dihydroflavonols increased from 0.3, 19.8, and 31.1% to 0.8, 22.3, and

45.0%, respectively. In 2009, these compounds showed the same pattern of evolution as observed in 2008, except for flavanols, the relative abundance of which decreased until harvest. At this moment their general distribution was 1.6% of hydroxybenzoic acids, 0.3% of hydroxycinnamic acids, 0.9% of stilbenes, 11.0% of flavanols, 24.2% of flavonols, and 62.0% of dihydroflavonols. All of the phenolic groups (nonflavonoids and flavonoids) increased progressively from veraison to harvest in 2008, whereas 2009 showed a considerable increase toward the second sampling and then a decrease until harvest (Table 9).

At harvest, the nonanthocyanin phenolic composition of skins was differentially affected by CT treatments. With regard to the nonflavonoids, the yield treatments did not modify their content, with significant higher values for phenolic acids in 2008 than 2009 and similar contents of stilbenes in both seasons (**Tables 8 and 9**). These results are in agreement with those obtained by other authors in different grape varieties.<sup>14,34</sup> Stilbenes are important compounds of interest in human health due to their putative protective effects against cardiovascular diseases. In grape cluster, stilbenes are considered to be located essentially in skins and mainly in glucosylated form. The levels determined in this study, ranging from 7.2 to 10.2 mg/kg of skins, are coincident with previous results.<sup>35</sup>

Considering the flavanols, we observed a significant effect of T1 only in 2009 berry skins with respect to the rest of the treatments, and the total content was lower compared to 2008 (**Tables 8 and 9**). The main monomer quantified in the skins was (+)-catechin (6.4-8.1 mg/kg of skins), followed by (-)-epicatechin (5.2-6.9 mg/kg of skins). Considering the ratio (+)-catechin/(-)-epicatechin (average of 1.2 among samples), it would be possible to suggest that in Malbec grapes, the leucoanthocyanidin reductase enzyme is more active than the anthocyanidin reductase, as shown in Fanzone et al.<sup>11</sup> The highest levels of procyanidin dimers and trimers found in the skins of 2008, together with the higher anthocyanins content, represent their ability to obtain quality wines with potential for aging, because these compounds are related to color stability and body through reactions of copigmentation and polymerization.<sup>36</sup>

Flavonols were the second most abundant group found in Malbec berry skins at harvest. The total contents ranged from 288.6 mg/kg of skins to 318.0 and from 208.3 to 291.9 mg/kg of skins in 2008 and 2009, respectively (**Table 9**). These concentrations are lower than those found in Syrah grapes with thinning management,<sup>15</sup> higher with respect to Carménère,<sup>14</sup> and similar to those determined by other authors.<sup>34</sup> In the pattern of 2008, the main flavonol was myricetin (mean = 29.4%), followed by isorhamnetin (22.1%), quercetin (18.9%), kaempferol (13.4%), laricitrin (8.3%), and naringenin (8%), whereas in 2009, a different profile was observed, with flavonol myricetin (33.1%) being the main flavonol, followed by kaempferol (28.0%), quercetin (13.9%), naringenin (11.0%), laricitrin (7.4%), and isorhamnetin (6.7%). These results differ from those presented by Mattivi et al.<sup>37</sup> for other red grape varieties, indicating a distinctive flavonol profile of Malbec grapes.

To analyze the effect of CT on these compounds, in 2008 there were no differences between them with respect to the control, whereas in 2009, T1 and T2 positively affected the contents of myricetin-3-glucoside, kaempferol-3-galactoside, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside, laricitrin-3-glucoside, and naringenin, increasing the level of total flavonols by 21.2 and 6.8%, respectively. This could be mainly explained by climatic differences between seasons. First, regardless of thinning treatments, higher temperatures and radiation existing in 2009 induced a higher expression and regulation of flavonol synthesis in berries<sup>29</sup> between the first and second samplings. Then toward the harvest, there was a decrease in the rate of these compounds, probably due to degradation and inhibition by high temperatures, as has been described for other flavonoids such as anthocyanins.<sup>28</sup> However, the thinning treatments applied to pea size (T1) and veraison (T2) would allow greater availability of photoassimilates (sugars) in leaves at early stages before berry filling. Thus, the higher rate of flavonols might be explained by an inductive effect of sugars on the expression of genes involved in biosynthesis, as in the case of anthocyanins.<sup>25,26</sup>

Another important 2-phenylbenzopyran subclass found in some fruits is the dihydroflavonols. These compounds contribute to a smaller fraction of total wine flavonoids, and they play functional roles in grape berries. Data on dihydroflavonols in grapes are rather scarce and, as far as we know, have been reported especially in white varieties.<sup>38,39</sup> Dihydroflavonols such as astilbin (dihydroquercetin-3-rhamnoside) most likely function in plants to fight Botrytis infection. It is also considered as a bioactive compound that would provide antimicrobial, antibacterial, cardiopreventive, and possibly chemopreventive effects in humans. In our experiment, these compounds were characterized by HPLC-DAD/ESI-MS and using the UV spectral information (**Table 10**). The total content, independent of treatment, ranged from 461.9 to 490.3 mg/kg of skins and from 574.6 to 695.6 mg/kg of skins in 2008 and 2009, respectively (**Table 9**). Analyzing the effect of CT on these compounds, in 2008 we found no differences between the treatments with respect to the control, whereas in 2009, T1 positively affected the contents of dihydrokaempferol-3-glucoside and the unknown dihydroflavonol without changing the total content. Dihydroflavonols are direct precursors of flavonols; therefore, the significant differences observed in both seasons (**Table 8**) could be explained by the differences in flavonol content, suggesting a possibly lower activity of flavonol synthase (FLS) in 2009 samples compared to 2008. Dihydroquercetin-3-glucoside was the major compound among all nonanthocyanin phenolics detected and represented 25.7% (2008) and 39.9% (2009) of the total content at harvest. To our knowledge, this finding is reported for the first time in Malbec grapes, and it was also obtained in another experiment with Malbec wines,<sup>11</sup> which could represent a distinctive feature of this variety.

**Table 9.** Low Molecular Weight Phenolic Compounds Quantified in Malbec Berry Skins, from Altamira, During Ripening (2008-2009)<sup>a</sup>

compound	year	DAF	concentration (mg/kg of skins, mean $\pm$ SE) for treatment				
			C	T1	T2	T3	
total hydroxybenzoic acids/derivatives	2008	85 <sup>b</sup>	13.8 $\pm$ 1.1 ab (4.0 <sup>d</sup> )	17.3 $\pm$ 0.9 b (3.3)	11.9 $\pm$ 0.3 a (4.4)	14.0 $\pm$ 1.0 ab (3.9)	
		113	21.4 $\pm$ 1.8 a (2.8)	25.1 $\pm$ 4.5 a (2.9)	27.5 $\pm$ 3.2 a (2.9)	28.0 $\pm$ 3.4 a (3.0)	
		154 <sup>c</sup>	25.4 $\pm$ 2.1 a (2.5)	26.8 $\pm$ 1.7 a (2.4)	25.8 $\pm$ 2.1 a (2.4)	23.2 $\pm$ 1.6 a (2.3)	
	2009	67 <sup>b</sup>	17.7 $\pm$ 0.9 a (2.8)	17.0 $\pm$ 1.0 a (2.6)	17.1 $\pm$ 0.6 a (3.0)	16.2 $\pm$ 0.6 a (2.8)	
		98	21.7 $\pm$ 1.0 a (1.7)	26.8 $\pm$ 1.8 ab (1.7)	28.8 $\pm$ 1.1 b (1.8)	25.7 $\pm$ 2.0 ab (1.9)	
		121 <sup>c</sup>	16.8 $\pm$ 0.6 a (1.6)	16.5 $\pm$ 0.7 a (1.4)	17.2 $\pm$ 0.2 a (1.7)	16.5 $\pm$ 0.6 a (1.8)	
	total hydroxycinnamic acids/derivatives	2008	85 <sup>b</sup>	7.1 $\pm$ 0.7 a (2.1)	10.1 $\pm$ 0.7 b (1.9)	6.6 $\pm$ 0.4 a (2.4)	7.8 $\pm$ 0.2 ab (2.2)
			113	5.8 $\pm$ 0.1 a (0.8)	7.6 $\pm$ 1.1 a (0.9)	7.5 $\pm$ 0.7 a (0.8)	7.8 $\pm$ 0.9 a (0.8)
			154 <sup>c</sup>	8.1 $\pm$ 0.8 a (0.8)	9.5 $\pm$ 0.6 a (0.9)	9.0 $\pm$ 0.6 a (0.9)	8.2 $\pm$ 0.5 a (0.8)
2009		67 <sup>b</sup>	2.9 $\pm$ 0.1 a (0.5)	2.9 $\pm$ 0.2 a (0.4)	3.2 $\pm$ 0.1 a (0.6)	3.0 $\pm$ 0.1 a (0.5)	
		98	3.1 $\pm$ 0.2 a (0.2)	3.5 $\pm$ 0.1 ab (0.2)	3.8 $\pm$ 0.1 b (0.2)	3.5 $\pm$ 0.2 ab (0.3)	
		121 <sup>c</sup>	3.3 $\pm$ 0.1 a (0.3)	3.0 $\pm$ 0.1 a (0.3)	3.2 $\pm$ 0.1 a (0.3)	2.9 $\pm$ 0.1 a (0.3)	
total stilbenes		2008	85 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 0.1 a (0.3)	1.7 $\pm$ 0.1 b (0.3)	1.0 $\pm$ 0.1 a (0.4)	1.4 $\pm$ 0.1 ab (0.4)
			113	4.1 $\pm$ 0.3 a (0.5)	4.8 $\pm$ 0.5 a (0.6)	4.6 $\pm$ 0.6 a (0.5)	5.0 $\pm$ 0.4 a (0.5)
			154 <sup>c</sup>	7.2 $\pm$ 0.7 a (0.7)	9.4 $\pm$ 1.5 a (0.9)	9.3 $\pm$ 1.2 a (0.9)	9.0 $\pm$ 0.7 a (0.9)
	2009	67 <sup>b</sup>	3.5 $\pm$ 0.1 a (0.6)	3.6 $\pm$ 0.3 a (0.5)	3.3 $\pm$ 0.2 a (0.6)	3.2 $\pm$ 0.2 a (0.6)	
		98	12.2 $\pm$ 1.2 a (0.9)	13.1 $\pm$ 0.5 a (0.8)	13.7 $\pm$ 0.7 a (0.9)	11.5 $\pm$ 1.1 a (0.8)	
		121 <sup>c</sup>	9.1 $\pm$ 0.6 a (0.8)	10.2 $\pm$ 1.0 a (0.9)	9.1 $\pm$ 0.4 a (0.9)	8.6 $\pm$ 0.1 a (0.9)	
	total flavanols	2008	85 <sup>b</sup>	71.2 $\pm$ 5.7 ab (20.8)	95.9 $\pm$ 3.3 b (18.2)	54.4 $\pm$ 2.3 a (19.9)	72.5 $\pm$ 0.8 ab (20.2)
			113	154.6 $\pm$ 4.7 a (20.2)	194.7 $\pm$ 26.5 a (22.9)	191.5 $\pm$ 16.2 a (20.3)	202.5 $\pm$ 22.1 a (21.6)
			154 <sup>c</sup>	228.8 $\pm$ 16.2 a (22.4)	246.7 $\pm$ 7.8 a (22.4)	248.0 $\pm$ 25.4 a (23.3)	211.8 $\pm$ 20.3 a (21.0)
2009		67 <sup>b</sup>	114.0 $\pm$ 6.8 a (18.2)	123.6 $\pm$ 12.3 a (18.6)	104.1 $\pm$ 6.0 a (18.4)	103.2 $\pm$ 6.9 a (18.0)	
		98	152.3 $\pm$ 4.9 a (11.7)	189.5 $\pm$ 4.3 bc (12.2)	198.8 $\pm$ 4.8 c (12.4)	166.1 $\pm$ 10.1 ab (12.0)	
		121 <sup>c</sup>	112.1 $\pm$ 5.1 a (10.4)	136.6 $\pm$ 6.6 b (11.9)	103.5 $\pm$ 5.3 a (10.5)	100.8 $\pm$ 2.4 a (11.1)	
total flavonols		2008	85 <sup>b</sup>	148.0 $\pm$ 16.3 ab (43.3)	218.2 $\pm$ 18.6 b (41.4)	116.3 $\pm$ 2.6 a (42.4)	156.6 $\pm$ 19.4 ab (43.7)
			113	215.7 $\pm$ 21.0 a (28.2)	245.9 $\pm$ 34.5 a (28.9)	276.2 $\pm$ 37.3 a (29.2)	251.2 $\pm$ 37.5 a (26.8)
			154 <sup>c</sup>	288.6 $\pm$ 22.3 a (28.3)	318.0 $\pm$ 10.9 a (28.9)	302.4 $\pm$ 24.3 a (28.5)	292.6 $\pm$ 15.2 a (29.0)
	2009	67 <sup>b</sup>	180.7 $\pm$ 9.1 ab (28.8)	200.5 $\pm$ 10.0 b (30.2)	165.2 $\pm$ 4.1 a (29.2)	171.3 $\pm$ 2.2 ab (29.9)	
		98	355.8 $\pm$ 30.7 a (27.2)	410.0 $\pm$ 25.7 a (26.4)	442.5 $\pm$ 33.0 a (27.6)	371.2 $\pm$ 24.2 a (26.8)	
		121 <sup>c</sup>	240.8 $\pm$ 6.7 ab (22.3)	291.9 $\pm$ 10.5 c (25.5)	257.2 $\pm$ 12.4 bc (26.0)	208.3 $\pm$ 4.7 a (22.8)	
	total dihydroflavonols	2008	85 <sup>b</sup>	100.7 $\pm$ 7.6 a (29.4)	184.3 $\pm$ 23.3 b (34.9)	83.7 $\pm$ 9.8 a (30.5)	106.0 $\pm$ 13.8 a (29.6)
			113	363.1 $\pm$ 45.4 a (47.5)	373.9 $\pm$ 59.8 a (43.9)	438.1 $\pm$ 62.4 a (46.3)	442.5 $\pm$ 62.8 a (47.2)
			154 <sup>c</sup>	461.9 $\pm$ 30.0 a (45.3)	490.3 $\pm$ 6.0 a (44.5)	468.1 $\pm$ 29.5 a (44.0)	463.2 $\pm$ 16.5 a (46.0)
2009		67 <sup>b</sup>	308.9 $\pm$ 20.6 a (49.2)	316.5 $\pm$ 20.8 a (47.7)	272.0 $\pm$ 4.4 a (48.2)	276.0 $\pm$ 13.5 a (48.2)	
		98	760.7 $\pm$ 37.1 a (58.3)	910.6 $\pm$ 38.3 a (58.6)	916.8 $\pm$ 44.4 a (57.1)	809.7 $\pm$ 50.7 a (58.3)	
		121 <sup>c</sup>	695.6 $\pm$ 21.6 b (64.5)	687.3 $\pm$ 39.3 ab (60.0)	597.5 $\pm$ 13.3 ab (60.5)	574.6 $\pm$ 23.0 a (63.0)	
total nonanthocyanin phenolic compounds		2008	85 <sup>b</sup>	341.9 $\pm$ 28.4 a	527.7 $\pm$ 38.9 b	274.0 $\pm$ 5.1 a	358.3 $\pm$ 46.1 a
			113	764.7 $\pm$ 71.0 a	852.0 $\pm$ 126.8 a	945.3 $\pm$ 112.9 a	937.0 $\pm$ 125.6 a
			154 <sup>c</sup>	1020.0 $\pm$ 67.5 a	1100.8 $\pm$ 18.8 a	1062.6 $\pm$ 28.3 a	1008.1 $\pm$ 40.3 a
	2009	67 <sup>b</sup>	627.6 $\pm$ 36.0 a	664.1 $\pm$ 43.8 a	564.8 $\pm$ 5.2 a	572.9 $\pm$ 22.4 a	
		98	1305.8 $\pm$ 69.6 a	1553.5 $\pm$ 67.5 a	1604.4 $\pm$ 82.2 a	1387.7 $\pm$ 86.9 a	
		121 <sup>c</sup>	1077.7 $\pm$ 28.9 b	1145.6 $\pm$ 55.9 b	987.6 $\pm$ 28.4 ab	911.8 $\pm$ 20.3 a	

<sup>a</sup>Average of three replicates followed by different letters in the same row indicate significant differences between treatments for each compounds group and date (Tukey,  $p < 0.05$ ). SE, standard error. DAF, days after flowering. Cluster thinning treatments: C, control; T1, early thinning; T2, veraison thinning; T3, late thinning. <sup>b</sup>Veraison. <sup>c</sup>Harvest time. <sup>d</sup>Relative abundance (%) between phenolic groups and total phenolics.



Table 10. Dihydroflavonols Identified by HPLC-DAD/ESI-MS in Malbec Berry Skins			
compound	$\lambda_{\max}$ (nm)	molecular ion [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragments ions (m/z)
dihydroquercetin-3-glucoside	336 (sh) <sup>a</sup> , 292	465	303
dihydroquercetin-3-rhamnoside	336 (sh), 292	449	303
dihydrokaempferol-3-glucoside	340 (sh), 292	449	287
<sup>a</sup> sh, shoulder.			

**Phenolic Composition of Seeds during Ripening.** *Total Phenolic Composition.* The seeds play a very important role during red winemaking, the flavanols being the major sensory components responsible for the bitterness and astringency of red wine, as well as also facilitate the stabilization of the anthocyanins. **Table 5** shows the results of total phenolic parameters for Malbec grape seeds during ripening. During the periods evaluated, independent of treatments, total phenols and flavanols DMACH decreased 31.5 and 36.5% in 2008 and 41.9 and 15.8% in 2009, respectively, between the first and last samplings. With regard to proanthocyanidins, in 2009 the same trend was observed as in the above parameters, whereas in 2008 these compounds showed an irregular pattern of evolution. At harvest time in 2008 season, there was a significant effect of T1 on flavanols DMACH content, whereas in 2009 the T2 treatment increased the proanthocyanidin and total phenol concentrations. The findings obtained in this research were concordant with those presented in previous studies with other varieties.<sup>14,40</sup>

*HPLC Nonanthocyanin Profile of Grape Seeds.* **Table 11** shows the identified and quantified low molecular weight phenolic compounds in Malbec seeds during ripening (2008-2009). Among them, three flavanol monomers were found [catechin-(4 $\alpha$ →8)-catechin (B3), epicatechin-(4 $\beta$ →8)-catechin (B1), catechin-(4 $\alpha$ →8)-epicatechin (B4), epicatechin-(4 $\beta$ →8)-epicatechin (B2), and catechin-(4 $\alpha$ →6)-catechin (B6)], one procyanidin trimer [epicatechin-(4 $\beta$ →8)-epicatechin-(4 $\beta$ →8)-catechin (C1)], five undetermined procyanidins [two dimers esterified with gallic acid (DG1, DG2), two trimers esterified with gallic acid (TG1, TG2), and one tetramer], and only one nonflavonoid compound (gallic acid).

Both flavanol monomers and seed procyanidin contents experienced a continuous fall until harvest, indicating that the extraction of these compounds declines with maturity. Kennedy et al.<sup>41</sup> suggest that this decline is consistent with an oxidative process. As expected, the seeds had a high concentration of flavanols in comparison with the skins. At harvest, the total flavanol contents in seeds were 4- and 9-fold higher than that of the skins in 2008 and 2009, respectively. These results coincide with the findings described previously by other authors in other varieties.<sup>16</sup> Also according to these studies, we observed that in Malbec seeds the major compound was (+)-catechin, followed by (-)-epicatechin. We found no significant differences of these monomers in both seasons; however, the remaining monomer (epicatequina-3-gallate) had a greater amount in 2009 compared with 2008.

**Table 11.** Low Molecular Weight Phenolic Compounds Quantified in Malbec Berry Seeds, from Altamira, During Ripening (2008-2009)<sup>a</sup>

compound	year	DAF	concentration (mg/kg of seeds, mean ± SE) for treatment			
			C	T1	T2	T3
gallic acid	2008	85 <sup>b</sup>	140.4 ± 12.1 a	143.5 ± 0.2 a	139.3 ± 3.7 a	136.1 ± 11.1 a
		113	30.3 ± 0.9 a	35.0 ± 1.1 a	26.0 ± 3.0 a	29.7 ± 5.3 a
		154 <sup>c</sup>	151.6 ± 9.6 a	144.3 ± 12.3 a	102.4 ± 12.2 a	101.9 ± 9.0 a
	2009	67 <sup>b</sup>	108.2 ± 4.8 a	120.7 ± 0.4 a	103.1 ± 1.6 a	108.4 ± 5.8 a
		98	64.8 ± 2.0 a	70.4 ± 3.4 a	74.4 ± 4.3 a	74.9 ± 8.6 a
		121 <sup>c</sup>	80.7 ± 3.8 a	83.6 ± 4.2 a	73.5 ± 2.2 a	77.1 ± 3.2 a
(+) -catechin	2008	85 <sup>b</sup>	2649.7 ± 103.4 a	3095.1 ± 199.8 a	2860.5 ± 214.7 a	3144.7 ± 401.5 a
		113	2565.0 ± 280.6 a	2411.6 ± 220.8 a	2413.5 ± 168.2 a	2863.2 ± 227.3 a
		154 <sup>c</sup>	2061.0 ± 145.5 a	2002.8 ± 14.3 a	2754.5 ± 251.5 b	2046.6 ± 99.1 a
	2009	67 <sup>b</sup>	2717.0 ± 162.7 a	5345.2 ± 226.7 b	4226.4 ± 633.3 ab	3257.6 ± 261.7 ab
		98	2099.8 ± 116.7 a	2659.1 ± 307.8 a	2888.7 ± 280.7 a	1874.4 ± 106.6 a
		121 <sup>c</sup>	1806.4 ± 56.2 ab	2025.3 ± 2.6 b	1662.9 ± 16.9 a	1682.0 ± 88.2 a
(-) -epicatechin	2008	85 <sup>b</sup>	1532.3 ± 246.2 a	1824.3 ± 101.0 a	1750.8 ± 94.8 a	1650.7 ± 128.4 a
		113	1324.8 ± 50.5 a	1118.9 ± 72.6 a	1725.7 ± 35.9 b	1239.2 ± 17.7 a
		154 <sup>c</sup>	1221.3 ± 97.6 a	835.9 ± 154.8 a	1061.9 ± 140.6 a	1183.6 ± 188.5 a
	2009	67 <sup>b</sup>	1548.2 ± 61.6 a	3187.4 ± 135.5 b	2372.0 ± 228.1 ab	1932.7 ± 137.8 a
		98	1322.5 ± 141.7 a	1332.7 ± 131.3 a	1433.5 ± 139.3 a	975.1 ± 81.7 a
		121 <sup>c</sup>	1090.7 ± 53.6 a	1219.6 ± 118.0 a	1048.8 ± 39.9 a	941.6 ± 66.5 a
epicatechin-3-gallate	2008	85 <sup>b</sup>	115.9 ± 18.4 a	92.6 ± 5.2 a	142.5 ± 16.2 a	163.0 ± 0.4 a
		113	61.4 ± 2.3 a	83.7 ± 4.0 b	57.3 ± 2.7 a	62.1 ± 2.0 a
		154 <sup>c</sup>	27.8 ± 2.7 a	54.4 ± 1.0 c	44.3 ± 3.8 ab	36.8 ± 2.1 ab
	2009	67 <sup>b</sup>	145.9 ± 12.9 a	202.1 ± 26.4 a	185.2 ± 16.3 a	173.5 ± 5.3 a
		98	77.8 ± 4.1 a	123.0 ± 15.1 a	97.8 ± 3.1 a	88.4 ± 8.9 a
		121 <sup>c</sup>	74.7 ± 9.9 a	86.8 ± 5.0 a	86.7 ± 2.5 a	83.9 ± 2.9 a
procyanidin B1	2008	85 <sup>b</sup>	86.7 ± 6.4 a	80.8 ± 4.8 a	105.3 ± 15.3 a	86.2 ± 3.7 a
		113	30.4 ± 7.4 a	60.1 ± 9.9 a	39.5 ± 2.4 a	46.7 ± 4.6 a
		154 <sup>c</sup>	14.3 ± 1.8 a	14.1 ± 1.0 a	14.4 ± 1.6 a	19.3 ± 2.5 a
	2009	67 <sup>b</sup>	102.4 ± 4.4 a	207.0 ± 21.2 b	165.3 ± 14.7 ab	137.7 ± 13.2 ab
		98	34.4 ± 2.7 a	36.4 ± 2.0 a	46.0 ± 5.7 a	27.5 ± 1.9 a
		121 <sup>c</sup>	27.9 ± 4.3 a	27.0 ± 3.2 a	24.5 ± 0.1 a	27.3 ± 1.5 a
procyanidin B2	2008	85 <sup>b</sup>	298.9 ± 18.1 a	223.8 ± 18.8 a	272.7 ± 18.1 a	286.7 ± 11.9 a
		113	155.3 ± 25.2 a	216.8 ± 36.1 a	144.3 ± 10.9 a	169.0 ± 21.9 a
		154 <sup>c</sup>	70.9 ± 8.4 a	44.0 ± 7.8 a	40.9 ± 0.9 a	126.0 ± 9.9 b
	2009	67 <sup>b</sup>	222.7 ± 5.4 a	454.1 ± 2.2 b	350.3 ± 48.4 ab	304.7 ± 49.7 ab
		98	120.8 ± 15.4 a	129.0 ± 19.1 a	152.4 ± 23.5 a	85.0 ± 11.3 a
		121 <sup>c</sup>	108.6 ± 13.6 a	105.5 ± 3.0 a	113.2 ± 1.1 a	106.9 ± 10.9 a
procyanidin B3	2008	85 <sup>b</sup>	141.7 ± 23.3 a	133.9 ± 5.1 a	191.4 ± 0.5 a	153.6 ± 17.3 a
		113	138.2 ± 8.4 a	107.5 ± 16.7 a	195.7 ± 2.5 b	126.1 ± 9.5 a
		154 <sup>c</sup>	93.7 ± 9.8 a	63.9 ± 4.0 a	68.7 ± 11.1 a	114.7 ± 19.1 a
	2009	67 <sup>b</sup>	187.3 ± 23.1 a	366.9 ± 10.9 b	301.5 ± 33.0 ab	228.6 ± 11.6 a
		98	84.6 ± 3.1 a	95.0 ± 3.8 a	105.2 ± 13.0 a	76.9 ± 3.9 a
		121 <sup>c</sup>	58.2 ± 6.9 a	61.5 ± 4.7 a	58.6 ± 0.1 a	53.3 ± 6.8 a
procyanidin B4	2008	85 <sup>b</sup>	250.7 ± 14.5 a	294.1 ± 19.5 a	308.0 ± 22.3 a	308.6 ± 16.4 a
		113	235.7 ± 18.7 a	170.1 ± 1.8 a	265.6 ± 2.2 a	260.3 ± 35.8 a
		154 <sup>c</sup>	205.9 ± 23.2 ab	115.8 ± 13.8 a	251.3 ± 11.0 b	199.6 ± 19.0 ab
	2009	67 <sup>b</sup>	295.1 ± 27.0 a	496.7 ± 30.5 a	444.6 ± 34.0 a	386.6 ± 45.9 a
		98	185.5 ± 5.0 ab	215.6 ± 3.0 b	158.9 ± 5.6 a	175.3 ± 6.1 a
		121 <sup>c</sup>	86.5 ± 2.8 a	176.5 ± 2.8 b	126.3 ± 22.9 ab	109.9 ± 12.0 ab
procyanidin B6	2008	85 <sup>b</sup>	30.1 ± 2.7 a	38.6 ± 2.2 a	30.5 ± 4.0 a	57.7 ± 0.1 b
		113	36.3 ± 0.5 a	43.0 ± 4.1 a	33.5 ± 0.3 a	46.3 ± 4.2 a
		154 <sup>c</sup>	29.5 ± 0.1 a	27.9 ± 0.2 a	28.4 ± 0.4 a	28.1 ± 0.5 a
	2009	67 <sup>b</sup>	49.9 ± 1.4 a	75.9 ± 2.2 b	59.6 ± 5.9 ab	55.3 ± 4.5 ab
		98	54.0 ± 1.8 a	44.6 ± 1.8 a	49.3 ± 6.1 a	51.3 ± 1.1 a
		121 <sup>c</sup>	28.3 ± 2.7 a	43.8 ± 4.5 ab	51.0 ± 6.2 b	31.7 ± 3.5 ab

<sup>a</sup>Average of three replicates followed by different letters in the same row indicate significant differences between treatments for each compound and date (Tukey,  $p < 0,05$ ). SE, standard error. DAF, days after flowering. Cluster thinning treatments: C, control; T1, early thinning; T2, veraison thinning; T3, late thinning. <sup>b</sup>Veraison. <sup>c</sup>Harvest time.

Table 11. Continued							
compound	year	DAF	concentration (mg/kg of seeds, mean ± SE) for treatment				
			C	T1	T2	T3	
procyanidin C1	2008	85 <sup>b</sup>	162.7 ± 1.2 a	190.3 ± 19.0 a	126.2 ± 6.0 a	135.9 ± 18.8 a	
		113	100.4 ± 13.8 a	82.3 ± 2.2 a	75.2 ± 5.2 a	138.1 ± 16.7 a	
		154 <sup>c</sup>	67.7 ± 6.9 a	56.5 ± 8.9 a	58.5 ± 3.5 a	58.6 ± 3.7 a	
	2009	67 <sup>b</sup>	219.8 ± 13.2 a	410.7 ± 54.1 a	371.2 ± 38.7 a	282.7 ± 43.0 a	
		98	80.2 ± 4.6 ab	99.3 ± 9.6 b	112.4 ± 1.0 b	63.9 ± 5.3 a	
		121 <sup>c</sup>	75.0 ± 9.1 a	113.8 ± 5.1 a	100.1 ± 10.1 a	87.3 ± 3.0 a	
tetramer	2008	85 <sup>b</sup>	64.9 ± 3.6 b	29.4 ± 1.8 a	71.1 ± 2.6 b	79.9 ± 10.7 b	
		113	25.1 ± 0.2 a	27.1 ± 0.5 a	69.0 ± 6.6 b	34.2 ± 2.1 a	
		154 <sup>c</sup>	27.2 ± 1.8 a	24.0 ± 0.8 a	45.2 ± 1.2 b	31.7 ± 3.1 a	
	2009	67 <sup>b</sup>	48.1 ± 2.6 a	85.7 ± 3.1 b	76.5 ± 7.9 ab	62.4 ± 5.4 ab	
		98	41.2 ± 5.4 a	57.8 ± 3.2 a	41.3 ± 1.1 a	44.2 ± 7.9 a	
		121 <sup>c</sup>	28.0 ± 1.7 a	32.1 ± 0.2 a	40.4 ± 5.1 a	23.1 ± 3.5 a	
procyanidin dimer gallate 1	2008	85 <sup>b</sup>	35.5 ± 3.5 a	60.1 ± 6.5 ab	35.7 ± 3.5 a	84.9 ± 5.7 b	
		113	59.4 ± 8.0 ab	80.6 ± 12.6 b	33.0 ± 1.0 a	32.0 ± 5.1 a	
		154 <sup>c</sup>	33.4 ± 0.5 a	50.6 ± 3.6 b	32.2 ± 3.7 a	31.9 ± 2.3 a	
	2009	67 <sup>b</sup>	87.5 ± 2.5 a	122.4 ± 13.3 a	115.3 ± 17.3 a	91.6 ± 8.6 a	
		98	68.9 ± 6.4 a	67.0 ± 3.7 a	68.5 ± 4.0 a	69.7 ± 3.8 a	
		121 <sup>c</sup>	55.7 ± 8.0 a	53.8 ± 7.6 a	62.8 ± 3.3 a	36.2 ± 3.7 a	
procyanidin dimer gallate 2	2008	85 <sup>b</sup>	200.6 ± 10.1 ab	181.7 ± 7.1 a	248.5 ± 9.4 b	196.6 ± 6.3 a	
		113	154.9 ± 19.4 ab	100.3 ± 6.1 a	128.3 ± 7.5 ab	164.6 ± 15.6 b	
		154 <sup>c</sup>	105.0 ± 13.2 a	107.1 ± 15.9 a	121.9 ± 9.5 a	92.5 ± 4.5 a	
	2009	67 <sup>b</sup>	407.5 ± 42.5 a	737.2 ± 27.0 b	620.0 ± 61.4 ab	493.5 ± 30.0 ab	
		98	106.6 ± 13.8 a	133.7 ± 20.1 a	131.8 ± 3.6 a	76.4 ± 9.9 a	
		121 <sup>c</sup>	70.3 ± 3.0 a	78.6 ± 4.7 a	83.4 ± 5.2 a	77.0 ± 5.2 a	
procyanidin trimer gallate 1	2008	85 <sup>b</sup>	47.0 ± 3.8 a	104.6 ± 5.7 b	120.0 ± 11.6 b	224.0 ± 9.3 c	
		113	93.2 ± 14.9 ab	127.0 ± 8.8 b	69.6 ± 3.1 a	74.1 ± 15.0 ab	
		154 <sup>c</sup>	111.9 ± 16.9 a	102.0 ± 9.2 a	125.5 ± 10.4 a	103.8 ± 6.7 a	
	2009	67 <sup>b</sup>	140.7 ± 13.8 a	267.2 ± 1.5 b	224.4 ± 24.1 b	127.0 ± 4.7 a	
		98	74.7 ± 4.6 a	71.2 ± 6.0 a	84.6 ± 2.6 a	59.6 ± 6.9 a	
		121 <sup>c</sup>	61.9 ± 4.1 a	67.3 ± 4.3 a	68.4 ± 3.7 a	63.7 ± 5.4 a	
procyanidin trimer gallate 2	2008	85 <sup>b</sup>	290.6 ± 54.7 a	275.4 ± 4.4 a	361.0 ± 53.5 a	308.0 ± 53.3 a	
		113	229.8 ± 7.6 ab	294.5 ± 24.7 b	214.1 ± 14.0 a	206.9 ± 3.1 a	
		154 <sup>c</sup>	35.1 ± 4.9 a	130.3 ± 1.7 c	134.2 ± 9.0 c	86.8 ± 6.3 b	
	2009	67 <sup>b</sup>	1009.6 ± 46.0 a	2070.1 ± 114.1 b	1930.6 ± 76.0 b	976.9 ± 131.3 a	
		98	244.5 ± 34.2 a	201.0 ± 4.1 a	401.0 ± 21.8 b	156.4 ± 7.7 a	
		121 <sup>c</sup>	161.1 ± 2.0 a	167.2 ± 4.5 a	200.9 ± 10.3 b	162.2 ± 2.3 a	
total phenolic compounds	2008	85 <sup>b</sup>	6047.5 ± 168.4 a	6768.3 ± 302.8 a	6763.5 ± 181.9 a	7016.6 ± 489.7 a	
		113	5240.1 ± 299.6 a	4958.4 ± 175.9 a	5490.4 ± 135.0 a	5491.3 ± 246.1 a	
		154 <sup>c</sup>	4256.4 ± 306.4 a	3773.5 ± 130.5 a	4884.3 ± 345.1 a	4260.9 ± 320.6 a	
	2009	67 <sup>b</sup>	7289.8 ± 415.8 a	14149.2 ± 536.0 b	11546.2 ± 1240.7 ab	8619.1 ± 437.9 a	
		98	4660.4 ± 314.2 a	5341.1 ± 408.6 a	5838.2 ± 482.0 a	3903.9 ± 237.5 a	
		121 <sup>c</sup>	3814.0 ± 154.5 a	4342.4 ± 167.1 a	3801.5 ± 9.2 a	3563.1 ± 202.6 a	

<sup>a</sup>Average of three replicates followed by different letters in the same row indicate significant differences between treatments for each compound and date (Tukey,  $p < 0,05$ ). SE, standard error. DAF, days after flowering. Cluster thinning treatments: C, control; T1, early thinning; T2, veraison thinning; T3, late thinning. <sup>b</sup>Veraison. <sup>c</sup>Harvest time.

The relative abundance of these flavanol monomers changed during both periods evaluated. In 2008, independent of treatment, the C:EC:ECG ratio changed from 44:25:2 on first sampling to 52:25:1 on last sampling, whereas in 2009 we observed a 37:22:2 ratio at veraison and a 46:28:2 ratio at harvest. According to Kennedy et al.<sup>41</sup> these rate differences are consistent with expected differences when C, EC, and ECG are exposed to radical-induced oxidation under aqueous conditions.

With regard to procyanidins, there were some differences in their contents at harvest. In 2008, the relative abundances of procyanidins and compounds esterified with gallic acid were 11.3 and 8.2%, and those in 2009 were 12.6 and 9.5%, respectively. Finally, the flavanol composition of seeds was differentially affected by CT treatments. At the last sampling date in 2008, the thinning treatments increased the contents of C, ECG, B4, tetramer, DG1, and TG2, whereas in 2009, the only compounds affected by CT were C, B4, B6, and TG2. The analysis of pooled data for the total content of phenolic compounds revealed no significant differences between seasons (**Table 8**).

The results presented in this paper show variations in some total phenolic variables analyzed and in the individual nonflavonoid and flavonoid contents of Malbec grapes from different thinning treatments, during the ripening period. In summary, during 2008, with more restrictive conditions for grapevines mainly due to climatic conditions, the early thinning had a differential effect on the various parameters evaluated on berry skins and seeds. This practice encouraged the biosynthesis of some global parameters of the grapes (soluble solids) and seeds (flavanols DMACH) and some individual compounds in grape skins (anthocyanins) and seeds (flavanols). Conversely, in 2009 the thinning treatments produced a different effect compared to 2008; there was greater biosynthesis of nonanthocyanin flavonoids (flavanols and flavonols) in skins and some global parameters and individual flavanols in seeds. On the other hand, in 2008 there was a higher concentration of most phenolic compounds, indicating greater potential to obtain high-quality wines, with polymeric pigments and color stability suitable for long aging. Finally, it is important to note that benefits from thinning should be carefully weighed with the cost involved in this viticultural practice (about \$250 U.S. per hectare) and the losses of fruit, particularly if gain in grape and wine quality is not evident.

As a conclusion, our work presents for the first time the phenolic profile of Malbec berry skins and seeds from Mendoza. The phenolic composition and the range of the data obtained in the analyzed Malbec samples are in good agreement with the available international literature for other red varieties. Furthermore, our analysis of the individual phenolic composition by HPLC-DAD/ESI-MS shows that the compound family corresponding to dihydroflavonols seems to be a distinctive feature of Malbec, differing from the phenolic profile reported for other red varieties (e.g., Cabernet Sauvignon, Merlot, Carménère, and Syrah).

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Bodegas Esmeralda S.A. for providing the vines of this assay. Special thanks are due to Federico Rodríguez of the Research and Development Department (Catena Zapata Winery) for their support in field trials, to Dr. Carmen Gómez-Cordovés of the IFI-CSIC (Madrid, Spain) for her cooperation in the identification of phenolic compounds by HPLC-DAD/ESI-MS, and to Mariana de la Cruz and Eugenia Turaglio for their technical assistance. This research was

supported by Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Projects AETA282831 and PTRMZASJ-510071.

## REFERENCES

- (1) Landrault, N.; Poucheret, P.; Ravel, P.; Gasc, F.; Cros, G.; Teissedre, P. L. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3341-3348.
- (2) Renaud, S. C.; de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **1992**, *339*, 1523-1526.
- (3) Düring, H.; Davtyan, A. Development changes of primary processes of photosynthesis in sun-and shade adapted berries of two grapevine cultivars. *Vitis* **2002**, *41*, 63-67.
- (4) Haselgrove, L.; Botting, D.; van Heeswijck, R.; Hoj, P. B.; Dry, P. R.; Ford, C.; Iland, P. G. Canopy microclimate and berry composition: The effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 141-149.
- (5) Petrie, P. R.; Trought, M. C. T.; Stanley Howell, G. Growth and dry matter partitioning of Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) in relation to leaf area and crop load. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 40-45.
- (6) Ough, C.S.; Nagaoka, R. Effect of cluster thinning and vineyard yields on grape and wine composition and wine quality of Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* **1984**, *35*, 30-34.
- (7) Valdés, M. E.; Moreno, D.; Gamero, E.; Uriarte, D.; Prieto, M. H.; Manzano, R.; Picon, J.; Intrigliolo, D. S. Effects of cluster thinning and irrigation amount on water relations, growth, yield and fruit and wine composition of Tempranillo grapes in Extremadura (Spain). *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2009**, *43*, 67-76.
- (8) Guidoni, S.; Ferrandino, A.; Novello, V. Effects of seasonal and agronomical practices on skin anthocyanin profile of Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **2008**, *59*, 22-29.
- (9) Keller, M.; Smithyman, R. P.; Mills, L. J. Interactive effects of deficit irrigation and crop load on Cabernet Sauvignon in an arid climate. *Am. J. Enol. Vitic.* **2008**, *59*, 221-234.
- (10) Keller, M.; Mills, L. J.; Wample, R. L.; Spayd, S. E. Cluster thinning effects on three deficit-irrigated *Vitis vinifera* Cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 91-103.
- (11) Fanzone, M.; Peña-Neira, A.; Jofré, V.; Assof, M.; Zamora, F. Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 2388-2397.
- (12) Coombe, B. J. Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Aust. J. Grape Wine Res.* **1995**, *1*, 104-110.

- (13) Zoecklein, B.; Fugelsang, K.; Gump, B.; Nury, F. In *Análisis y Producción de Vino*; Acribia: Zaragoza, Spain, 2001; 634 pp.
- (14) Obreque-Slier, E.; Peña-Neira, A.; López-Solís, R.; Zamora-Marín, F.; Ricardo-Da Silva, J. M.; Laureano, O. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3591-3599.
- (15) Peña-Neira, A.; Cáceres, A.; Pastenes, C. Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of clusters thinning and vineyard yield. *Food Sci. Technol. Int.* **2007**, *13*, 153-158.
- (16) Venencie, C.; Uveira, M.; Guet, S. Maturité polyphénolique du raisin. Mise en place d'une méthode d'analyse de routine. *Rev. Franc. Oenol.* **1997**, *167*, 36-41.
- (17) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. Phenolic compounds. In *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*; Wiley: Chichester, U.K., 2000; Vol. 2, pp 129-186.
- (18) Porter, L. J.; Hritsch, L. N.; Chan, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 223-230.
- (19) Vivas, N.; Glories, Y.; Lagune, L.; Saucier, C.; Augustin, M. Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au p-diméthylaminocinnamaldéhyde. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1994**, *28*, 319-336.
- (20) Glories, Y. La couleur des vins rouges. 1ère partie. Les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaiss. Vigne Vin* **1984**, *18*, 195-217.
- (21) Monagas, M.; Núñez, V.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. Anthocyanin-derived pigments in Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon wines produced in Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* **2003**, *54*, 163-169.
- (22) Monagas, M.; Suárez, R.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 139-147.
- (23) Petrie, P. R.; Clingeleffer, P. R. Crop thinning (hand versus mechanical), grape maturity and anthocyanin concentration: outcomes from irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) in a warm climate. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**, *12*, 21-29.
- (24) Da Silva, L.; Kretschmar, A.; Rufato, L.; Brighenti, A.; Schlemper, C. Load levels in vineyards of Malbec cv. and their effects on evolution and phenolic maturation. *Rev. Bras. Frutic.* **2008**, *30*, 675-680.
- (25) Coombe, B. G.; McCarthy, M. G. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 131-135.

- (26) Boss, P. K.; Davies, C.; Robinson, S. P. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* **1996**, *111*, 1059-1066.
- (27) Fournand, D.; Vicens, A.; Sidhoum, L.; Souquet, J. M.; Moutounet, M.; Cheynier, V. Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7331-7338.
- (28) Mori, K.; Goto-Yamamoto, N.; Kitayama, M.; Hashizume, K. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 1935-1945.
- (29) Matus, J.; Loyola, R.; Vega, A.; Peña-Neira, A.; Bordeu, E.; Arce-Johnson, P.; Alcalde, J. Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 853-867.
- (30) Kennedy, J. A.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E. J.; Jones, G. P. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5348-5355.
- (31) Castellarin, S.; Di Gaspero, G. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biol.* **2007**, *7* (46), 1-10.
- (32) Bogs, J.; Ebadi, A.; McDavid, D.; Robinson, S. P. Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiol.* **2006**, *140*, 279-291.
- (33) Gollop, R.; Even, S.; Colova-Tsolova, V.; Perl, A. Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 1397-1409.
- (34) Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *J. Food Compos. Anal.* **2007**, *20*, 618-626.
- (35) Sun, B.; Ribes, A. M.; Conceição, M.; Belchior, A. P.; Spranger, M. I. Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 382-390.
- (36) Escribano-Bailón, T.; Alvarez-García, M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Heredia, F. J.; Santos-Buelga, C. Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin 3-O-glucoside and (+)-catechin. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1213-1217.
- (37) Mattivi, F.; Guzzon, R.; Vrhovsek, U.; Stefanini, M.; Velasco, R. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7692-7702.
- (38) Vilanova, M.; Santalla, M.; Masa, A. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in grapes (*Vitis vinifera*) from northwest Spain. *J. Agric. Sci.* **2009**, *147*, 683-697.

- (39) Masa, A.; Vilanova, M.; Pomar, F. Varietal differences among the flavonoid profiles of white grape cultivars studied by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1164*, 291-297.
- (40) Guendez, R.; Kallithraka, S.; Makris, D. P.; Kefalas, P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chem.* **2005**, *89*, 1-9.
- (41) Kennedy, J. A.; Troup, G. J.; Pilbrow, J. R.; Hutton, D. R.; Hewitt, D.; Hunter, C. R.; Ristic, R.; Iland, P. G.; Jones, G. P. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 244-254.



### **Estudio comparativo del efecto del raleo de racimos sobre la composición fenólica de uvas y vinos Malbec de dos zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (Altamira y Gualtallary), durante la vendimia 2009**



## 1. Consideraciones generales

En vista de las necesidades y demandas del mercado actual, resulta cada vez más necesaria la producción de vinos de la mayor calidad posible. La calidad del vino puede ser definida por criterios diferentes, estando sujeta a los parámetros de evaluación empleados, y siempre diseñados para cumplir con los requisitos de los consumidores. Entre los parámetros objetivos, se encuentran los compuestos químicos provenientes de las uvas que inciden en las características sensoriales y en el valor nutricional de los vinos correspondientes. Estos compuestos son biosintetizados en la planta de vid a través del metabolismo primario (azúcares, proteínas, lípidos) y secundario (compuestos fenólicos y sustancias odorantes), y su concentración en las uvas está condicionada por factores genéticos relacionados a la variedad, factores edafoclimáticos y manejos culturales aplicados sobre el viñedo (Jackson y Lombard, 1993; Haselgrove et al., 2000; Düring y Davtyan, 2002; Downey et al., 2006).

En las últimas décadas, el reconocimiento del importante papel de la viticultura en la producción de vinos de alta calidad ha conducido a un interés considerable en las prácticas culturales tendientes a optimizar la calidad de la materia prima. Gran parte de estos manejos vitícolas tienen como función controlar el equilibrio entre el crecimiento vegetativo y productivo de la vid. El aclareo o raleo de racimos (remoción de fruta) se aplica usualmente para modificar la relación fuente (hoja)/receptáculo (bayas), pues limita parte de la cosecha sin disminuir el área foliar. Al eliminar órganos vivos, la planta concentra su actividad en las partes que se dejan, favoreciéndose el transporte de fotoasimilados a las bayas y los procesos fisiológicos como el llenado y la maduración de las mismas. Esta práctica puede emplearse como medida correctiva cuando las condiciones medioambientales determinan rendimientos excesivos dificultando la maduración de las uvas (Valdés et al., 2009). El raleo de racimos, independientemente de su intensidad y época de realización, afecta la producción. Al tener menos uvas, las plantas raleadas tienden a compensar su producción aumentando el tamaño de las bayas. Cuando el raleo se realiza en enero, no incide considerablemente sobre el tamaño de las bayas ni sobre el peso de los racimos, ya que la planta no dispone de las mismas posibilidades de recuperación que cuando dicha operación se realiza inmediatamente después del cuajado (Matus et al., 2006). Con respecto a la composición química de la uva y el vino, los resultados reportados en la literatura muestran efectos contrastantes y respuestas diversas según el momento de realización del raleo, las variedades utilizadas, la zona de cultivo y las condiciones de las vendimias involucradas (Ough y Nagaoka, 1984; González-Neves et al., 2002; Keller et al., 2005 y 2008; Peña-Neira et al., 2007; Prajitna et al., 2007; Guidoni et al., 2008; Intrigliolo y Castel, 2011).

En los viñedos Malbec de la Provincia de Mendoza, el raleo de racimos se aplica comúnmente con el objetivo de mejorar la calidad de la uva destinada a vinificación; sin embargo existe poca información sobre su influencia en la composición fenólica pormenorizada de uvas y vinos de esta variedad en distintas zonas de cultivo. A partir de los resultados obtenidos en el Apartado II.1 del presente capítulo, se comprobó la notable incidencia del factor “temporada o vendimia” sobre el efecto de esta práctica vitícola realizada en un viñedo ubicado en la localidad de Altamira (Valle de Uco, Mendoza). Teniendo en cuenta esta información, se planteó el estudio comparativo de este manejo en viñedos cv. Malbec ubicados en dos zonas geográficas de la Provincia de Mendoza (Altamira y Gualtallary) consideradas, según viticultores y enólogos locales, con un gran potencial para la producción de uvas tintas de alta calidad. El trabajo consistió en evaluar, como respuesta, la composición fenólica de las uvas y sus respectivos vinos durante la vendimia 2009.

## **2. Condiciones experimentales**

El experimento se realizó durante la vendimia 2009 en dos viñedos comerciales ubicados en las localidades de Altamira (69° 07' longitud oeste y 33° 43' latitud sur) y Gualtallary (69° 17' longitud oeste y 33° 24' latitud sur), pertenecientes al Valle de Uco, Provincia de Mendoza. Estas zonas se diferencian principalmente por la altitud (Altamira 1100 msnm y Gualtallary 1450 msnm), incidiendo en las condiciones agroecológicas y generando distintos regímenes de temperatura y radiación solar sobre las plantas en cuestión. Con respecto a la composición de los suelos, en ambas zonas son de origen aluvional formados por descomposición y desintegración de rocas y minerales de la Cordillera de los Andes, que debido a su juventud (origen cuaternario) no poseen una diferenciación química relevante. Sin embargo existen algunas diferencias respecto a su textura. El perfil de los suelos se caracterizó mediante la realización de calicatas hasta una profundidad de 1 m. En Altamira predominan los suelos de textura suelta donde se observaron 3 capas diferenciadas, una primer capa desde 0 a 0,1 m constituido por piedras en una matriz de arena, una segunda capa desde 0,1 a 0,9 m de textura franco-arenosa, y desde esa profundidad hasta 1 m una tercera capa de textura limo-arcillosa. Mientras que en Gualtallary, predominan los suelos de textura gruesa con piedras localizadas a diferentes profundidades, lo que favorece el drenaje del agua y reduce la capacidad de retención de la misma. Adicionalmente, se observó la presencia de carbonato de calcio en algunos sectores, produciendo una cementación de las partículas de arena y grava, formando agregados difíciles de romper que limitan la profundidad efectiva de los enraizamientos y en determinadas circunstancias disminuyen la infiltración del agua de riego. En esta zona, la primera capa de piedras fue de mayor espesor hasta 0,3 m de profundidad, seguido por una capa de textura arenosa o areno-

franca hasta 0,9 m y limo hasta 1 m. En ambas zonas, el suelo presentó una textura pedregosa hacia los estratos inferiores.

Los viñedos de *Vitis vinifera* L. cv. Malbec pertenecían a la empresa Bodegas Esmeralda S.A. (Mendoza, Argentina), y fueron implantados en el año 2000 (Altamira) y en el año 1998 (Gualtallary), sobre pie franco, empleando un sistema de conducción en espaldera alta, con orientación norte-sur, un marco de plantación de 2 m entre hileras y 1,2 m entre plantas de la misma hilera, poda Guyot doble y sistema de riego por goteo. Los mismos fueron manejados siguiendo el criterio agronómico tradicional aplicado para este cultivar en cada zona estudiada. Se realizó una poda invernal dejando 12 yemas por planta. El manejo del follaje, realizado manualmente, incluyó desbrote de tronco, eliminación de brotes dobles, y posicionamiento de brotes sobre alambres móviles. Las plantas fueron mantenidas sin restricción hídrica y la cantidad media de agua recibida desde brotación hasta cosecha (septiembre-marzo) fue estimada en 400-450 mm. El riego comenzó a aplicarse antes de la brotación y finalizó alrededor de una semana antes de la cosecha.

Los ensayos de aclareo o raleo de racimos (CT) fueron aplicados en los viñedos de ambas zonas empleando un diseño experimental completamente aleatorizado constituido por 4 tratamientos con 3 réplicas cada uno. La unidad experimental consistió de 30 plantas homogéneas, seleccionadas en función de un vigor homogéneo, teniendo en cuenta el desarrollo vegetativo y procurando uniformidad en el diámetro de tronco. Los tratamientos evaluados fueron: raleo temprano [T1, realizado en bayas con tamaño de *grano de arveja*, 40 días después de floración (DAF) en Altamira y 33 DAF en Gualtallary], raleo en enero [T2, 80 DAF en Altamira y 78 DAF en Gualtallary], raleo tardío [T3, 100 DAF en Altamira y 106 DAF en Gualtallary], y control sin raleo (C). Las fechas de floración fueron el 17 de noviembre de 2008 (Altamira) y el 20 de noviembre de 2008 (Gualtallary), coincidiendo con la etapa 23 del crecimiento de la vid descrita por Coombe (1995). Para todos los tratamientos de CT se realizó la remoción del 50% de los racimos de cada planta, eliminando siempre el racimo distal (es decir, el más cercano al ápice vegetativo) y los racimos de los brotes débiles, dejando solo un racimo por brote.

En ambos ensayos, los componentes del rendimiento fueron determinados al momento de la cosecha. El número de racimos por planta, el rendimiento (kg de uva/planta) y la relación superficie foliar expuesta (SFE)/rendimiento ( $m^2/kg$ ; Carbonneau, 1995) fueron determinados empleando 10 plantas por tratamiento. El peso de racimo y el número de bayas por racimo fue calculado empleando 10 racimos por tratamiento. La predicción del rendimiento (t/ha) se realizó considerando la densidad del viñedo (número de plantas/ha) y el rendimiento expresado por planta.

Las condiciones climáticas de las dos zonas evaluadas fueron diferentes, particularmente en la tasa de lluvias recibidas y en las temperaturas durante el ciclo de crecimiento de las plantas (**Tabla 1**). Estas condiciones meteorológicas, determinadas en parte por la altitud, modificaron

considerablemente el período de maduración de las bayas. La zona de Gualtallary presentó mayor incidencia de lluvias y temperaturas inferiores respecto a Altamira, lo que condujo a una maduración más lenta de las bayas. Debido a lo mencionado, la fecha de cosecha en ambos casos fue distinta: 18 de marzo de 2009 (121 DAF) en Altamira y 31 de marzo de 2009 (131 DAF) en Gualtallary.

Se realizó el muestreo aleatorio de bayas, de cada unidad experimental correspondiente a los distintos tratamientos evaluados para cada zona de estudio, en madurez tecnológica (aproximadamente 25 °Brix), siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo I. Se separaron los hollejos, semillas y pulpa, y cada fracción fue sometida a la determinación de parámetros analíticos generales y al análisis de compuestos fenólicos, siguiendo la metodología detallada en el Anexo I.

Las uvas correspondientes a cada ensayo (2 zonas x 4 tratamientos x 3 réplicas) fueron vinificadas por separado en recipientes plásticos de 30 L, siguiendo el protocolo de elaboración detallado en el Anexo I. Los vinos terminados se embotellaron y después de 3 meses de almacenamiento en botella fueron sometidos a la determinación de parámetros analíticos generales y compuestos fenólicos, siguiendo la metodología detallada en el Anexo I. Paralelamente, se realizó una evaluación sensorial de los mismos (test triangular) para examinar diferencias entre los tratamientos y complementar la información obtenida mediante las determinaciones químicas (Anexo I).

**Tabla 1.** Lluvias mensuales, grados día de crecimiento acumulados, y temperaturas máximas y mínimas en Altamira y Gualtallary (2009).

Mes	Altamira				Gualtallary			
	Lluvias (mm)	GDC (°C)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	Lluvias (mm)	GDC (°C)	Tmax (°C)	Tmin (°C)
Julio	0	0	22,5	-4,0	0	0	25,0	-5,0
Agosto	41	0	29,0	-4,5	37	0	31,0	-5,0
Septiembre	17	60	27,0	-5,0	35	nd	nd	nd
Octubre	4	155	30,0	1,5	30	310	34,0	0,0
Noviembre	7	360	39,0	8,5	14	330	32,0	3,0
Diciembre	53	372	37,5	8,5	47	279	32,0	8,0
Enero	24	341	37,0	8,0	63	310	34,0	10,0
Febrero	0	336	35,5	9,0	22	280	32,0	7,0
Marzo	0	341	35,0	7,0	43	279	30,0	6,0
Abril	0	210	30,0	2,0	0	150	28,0	2,0
Mayo	0	nd	nd	nd	0	nd	nd	nd
Junio	0	nd	nd	nd	0	nd	nd	nd
Total	146	2175			291	1938		

La vendimia 2009, en estas zonas de Mendoza (Argentina), comprende desde julio de 2008 a junio de 2009. GDC, grados día de crecimiento acumulados para una temperatura base de 10°C (Oliveira, 1998); Tmax, temperatura máxima; Tmin, temperatura mínima. nd, datos no disponibles.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Parámetros generales de los viñedos estudiados

Los tratamientos de raleo aplicados en ambas zonas, independientemente del momento de realización, lograron una reducción significativa en el rendimiento del viñedo expresado por planta y por hectárea comparados con las plantas control (**Tabla 2**). Todos los componentes del rendimiento, a excepción del peso de racimo y del número de bayas/racimo, fueron significativamente afectados por CT en las dos zonas evaluadas ( $p < 0,05$ ), sin observarse diferencias entre los tratamientos T1, T2 y T3. En Altamira, tal como se describió en el Apartado II.1 (Capítulo II), las plantas raleadas presentaron en promedio una reducción del 41,7% en el rendimiento, con un 45,6% menos de racimos/planta comparado con el tratamiento control. Mientras que en Gualtallary, se observó una reducción del 42,2% y 36,6% en el rendimiento y en el número de racimos/planta, respectivamente, en las plantas con CT (**Tabla 2**). Con respecto a la relación SFE/rendimiento, los tratamientos de CT generaron un aumento de este parámetro en las dos zonas evaluadas (56,7% en Altamira y 83,3% en Gualtallary). Finalmente, al comparar ambas zonas (**Tabla 3**), las plantas de Gualtallary presentaron menor número de bayas/racimo y menor rendimiento (t/ha) en relación a Altamira ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2.** Componentes de rendimiento de viñedos cv. Malbec de Altamira y Gualtallary (2009).

Zona	Tratamiento	Número de racimos/planta	Peso de racimo (g)	Número de bayas/racimo	Rendimiento (kg/planta)	Rendimiento (t/ha)	SFE/rendimiento (m <sup>2</sup> /kg)
Altamira	C	20,9 ± 0,5* b	80,2 ± 4,0 a	101,3 ± 2,6 a	1,6 ± 0,1 b	6,8 ± 0,1 b	1,0 ± 0,1 a
	T1	10,8 ± 0,4 a	91,4 ± 12,2 a	103,2 ± 4,5 a	0,9 ± 0,1 a	4,1 ± 0,1 a	1,6 ± 0,1 b
	T2	12,1 ± 0,4 a	76,1 ± 10,3 a	103,2 ± 4,2 a	0,9 ± 0,1 a	3,9 ± 0,1 a	1,6 ± 0,1 b
	T3	11,2 ± 0,5 a	93,9 ± 11,5 a	102,5 ± 2,8 a	1,0 ± 0,1 a	4,3 ± 0,2 a	1,5 ± 0,1 b
Gualtallary	C	18,5 ± 0,5 b	85,3 ± 2,8 a	92,0 ± 4,1 a	1,5 ± 0,1 b	6,3 ± 0,1 b	1,0 ± 0,1 a
	T1	10,9 ± 1,0 a	74,8 ± 4,1 a	86,0 ± 6,5 a	0,8 ± 0,1 a	3,2 ± 0,2 a	1,8 ± 0,1 b
	T2	11,7 ± 0,7 a	80,9 ± 5,4 a	91,2 ± 8,0 a	0,9 ± 0,1 a	3,8 ± 0,3 a	1,9 ± 0,1 b
	T3	12,6 ± 0,6 a	80,6 ± 5,8 a	94,8 ± 7,0 a	0,9 ± 0,1 a	3,9 ± 0,1 a	1,8 ± 0,1 b

\* Media ± error estándar ( $n = 3$ ). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ). Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en enero; T3, raleo tardío.

**Tabla 3.** Valores de probabilidad de los componentes del rendimiento para "zona y tratamiento" en viñedos Malbec. Datos agrupados de Altamira y Gualtallary.

Parámetro	Factor		
	zona	tratamiento	zona x tratamiento <sup>b</sup>
$p_{\text{value}}^a$			
Nº racimos/planta	0,4381	< 0,0001	0,0374
Peso de racimo	0,3789	0,7451	0,3838
Nº bayas/racimo	0,0004	0,7502	0,6043
Rendimiento (kg/planta)	0,2699	< 0,0001	0,6590
Rendimiento (t/ha)	0,0003	< 0,0001	0,1307
SFE/rendimiento	0,0050	< 0,0001	0,5017

<sup>a</sup> Considerado significativo cuando  $p_{\text{value}} < 0,05$ .  
<sup>b</sup> Efecto de interacción entre "zona y tratamiento".

### 3.2. Composición de las uvas al momento de cosecha

En primer lugar se realizó la evaluación y comparación de la incidencia de los tratamientos de raleo de racimos sobre los parámetros químicos globales y la composición fenólica de bayas cv. Malbec provenientes de viñedos ubicados en las dos zonas estudiadas (Altamira y Gualtallary), durante la vendimia 2009.

#### 3.2.1. Parámetros analíticos generales

Las bayas Malbec de las dos zonas evaluadas fueron caracterizadas inicialmente a través de los parámetros analíticos presentados en la **Tabla 4**. Al examinar las muestras de Gualtallary, el análisis de 100 bayas reveló la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos, con respecto al peso total y al peso de hollejos y semillas ( $p > 0,05$ ). Estos resultados, conjuntamente con la similitud existente en el peso de racimos (**Tabla 2**), indican que las plantas con CT no compensaron la disminución de rendimiento generada por el tratamiento, coincidiendo con las observaciones realizadas en uvas Malbec de Altamira (descriptas previamente en el Apartado II.1 del Capítulo II) y con los datos reportados por diversos autores en otras variedades tintas (Keller et al., 2005; Peña-Neira et al., 2007).

**Tabla 4.** Parámetros analíticos generales de uvas Malbec, de Altamira y Gualtallary, al momento de cosecha (2009).

Zona	Tratamiento	Peso de 100 bayas (g)	Peso de hollejos (g)	Peso de semillas (g)	Sólidos solubles (°Brix)	Acidez titulable (g/L)	pH
Altamira	C	180,4 ± 6,7* a	16,2 ± 0,3 a	5,4 ± 0,2 a	24,5 ± 0,1 a	3,3 ± 0,1 a	3,86 ± 0,04 a
	T1	182,9 ± 7,0 a	17,5 ± 0,7 a	5,5 ± 0,6 a	25,5 ± 0,1 c	3,6 ± 0,1 a	3,92 ± 0,01 a
	T2	175,3 ± 3,2 a	16,4 ± 0,6 a	5,2 ± 0,3 a	25,0 ± 0,1 ab	3,4 ± 0,2 a	3,93 ± 0,01 a
	T3	187,3 ± 5,0 a	17,7 ± 0,8 a	6,0 ± 0,3 a	24,9 ± 0,2 ab	3,8 ± 0,2 a	3,89 ± 0,01 a
Gualtallary	C	210,7 ± 4,0 a	19,2 ± 1,1 a	5,5 ± 0,2 a	25,3 ± 0,3 a	4,4 ± 0,2 a	3,77 ± 0,02 a
	T1	204,0 ± 9,8 a	20,4 ± 2,1 a	5,4 ± 0,3 a	25,5 ± 0,3 a	3,8 ± 0,2 a	3,84 ± 0,05 a
	T2	197,3 ± 4,9 a	20,0 ± 0,8 a	5,2 ± 0,1 a	25,4 ± 0,3 a	4,0 ± 0,1 a	3,84 ± 0,04 a
	T3	203,2 ± 3,6 a	19,4 ± 2,9 a	5,4 ± 0,3 a	25,1 ± 0,4 a	4,2 ± 0,1 a	3,83 ± 0,06 a

\* Media ± error estándar ( $n = 3$ ). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ). Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en invierno; T3, raleo tardío.

Los datos agrupados de las uvas se muestran en la **Tabla 5**, donde se aplicó un ANOVA multifactorial empleando “zona y tratamiento” como factores. A partir de este análisis se observó un efecto significativo del factor “zona”, presentándose un mayor peso de bayas y hollejos a mayor altitud del viñedo ( $p < 0,05$ ) e indicando un mayor tamaño promedio de bayas en las muestras de Gualtallary. Esto podría deberse al menor rendimiento del Malbec en esta zona, relacionado en parte a temperaturas muy bajas durante la temporada anterior afectando probablemente la inducción floral y el desarrollo de las inflorescencias inmaduras en las yemas latentes, como así también a menores temperaturas ambientales al momento de la floración y el cuajado de las uvas, causadas

por la mayor altitud (noviembre-diciembre, **Tabla 1**), conduciendo posiblemente al menor número de bayas por racimo observado en comparación con Altamira (**Tabla 2**) (Carmona et al., 2008). Esta situación generaría una disminución de la competencia entre las bayas de cada racimo incidiendo notablemente en su peso final, al generarse condiciones más propicias para los procesos de división y elongación celular característicos de las etapas de formación y maduración de las bayas, respectivamente (Coombe y McCarthy, 2000).

Parámetro	Factor		
	zona	tratamiento	zona x tratamiento <sup>b</sup>
	$p_{value}^a$		
Peso de bayas	< 0,0001	0,3908	0,6776
Peso de hollejos	0,0015	0,5282	0,9922
Peso de semillas	0,4928	0,4912	0,7335
Sólidos solubles	0,0540	0,0822	0,4280
Acidez titulable	< 0,0001	0,2329	0,0682
pH	0,0094	0,2445	0,9659

<sup>a</sup> Considerado significativo cuando  $p_{value} < 0,05$ .  
<sup>b</sup> Efecto de interacción entre "zona y tratamiento".

Con respecto a la composición química general, al igual que lo observado en el Apartado II.1 (Capítulo II), los tratamientos T1 y T2 aplicados en Gualtallary condujeron a un mayor contenido de sólidos solubles en las muestras analizadas comparadas con las uvas control, sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Mientras que en Altamira, por el contrario, el raleo modificó significativamente este parámetro. Tal como se mencionó oportunamente, la mayor acumulación de sólidos solubles en las bayas podría estar vinculada al incremento de la relación SFE/rendimiento en las plantas raleadas, y deberse principalmente a una adelanto de la maduración más que a una modificación en la tasa de acumulación de azúcares (Petrie y Clingeleffer, 2006). Por el contrario, al analizar los resultados de acidez y pH no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en las dos zonas estudiadas.

Finalmente, al realizar un análisis comparativo entre ambas zonas (**Tabla 5**) los niveles de acidez en las muestras de Gualtallary fueron significativamente superiores a los encontrados en Altamira, coincidiendo con los bajos valores de pH (**Tabla 4**). Esto podría explicarse por las condiciones climáticas de esta zona, condicionada principalmente por su gran altitud. Las menores temperaturas observadas durante el período de maduración de las bayas comparadas con Altamira (febrero-abril, **Tabla 1**), podrían disminuir la tasa de catabolismo respiratorio de los ácidos fijes (tartárico y málico), manteniendo este parámetro en niveles altos (Boulton et al., 2002).



### 3.2.2. Composición fenólica de hollejos

#### 3.2.2.1. Parámetros fenólicos generales

La **Tabla 6** muestra los resultados de los parámetros fenólicos globales determinados en hollejos de bayas Malbec provenientes de los ensayos de raleo de racimos realizados en Altamira y Gualtallary. En concordancia con los datos obtenidos en el Apartado II.1 (Capítulo II), los tratamientos de CT realizados en Gualtallary no afectaron significativamente ninguno de los parámetros evaluados. Sin embargo, en las dos zonas estudiadas, las bayas provenientes del tratamiento T1 mostraron valores ligeramente superiores de antocianos totales e intensidad colorante comparados con el resto de los tratamientos ( $p > 0,05$ ). De acuerdo a las observaciones realizadas en el Apartado II.1 (Capítulo II), el raleo temprano efectuado en Altamira aumentó considerablemente la disponibilidad de azúcares en las bayas al envero, promoviendo posiblemente la actividad enzimática involucrada en la biosíntesis de antocianos. Si bien en el presente estudio sólo se evaluaron las bayas al momento de cosecha, se podría suponer un efecto similar de T1 en el ensayo de Gualtallary.

Tabla 6. Parámetros fenólicos generales de extractos de hollejos Malbec, de Altamira y Gualtallary, al momento de cosecha (2009).						
Zona	Tratamiento	Fenoles totales (mg/g)	Antocianos totales (mg/g)	Proantocianidinas totales (mg/g)	Flavonoles DMACH (mg/g)	Intensidad colorante
Altamira	C	9,3 ± 0,8* a	3,3 ± 0,4 a	10,8 ± 1,1 a	1,2 ± 0,1 a	5,5 ± 0,5 a
	T1	9,5 ± 0,6 a	4,5 ± 0,5 a	12,6 ± 0,5 a	1,4 ± 0,2 a	7,2 ± 0,1 a
	T2	9,6 ± 0,2 a	3,5 ± 0,4 a	10,4 ± 0,2 a	1,2 ± 0,1 a	7,1 ± 0,4 a
	T3	8,6 ± 0,6 a	3,2 ± 0,2 a	10,8 ± 1,4 a	1,2 ± 0,1 a	6,4 ± 0,6 a
Gualtallary	C	10,8 ± 0,5 a	5,8 ± 0,2 a	10,7 ± 1,1 a	1,3 ± 0,1 a	11,8 ± 0,5 a
	T1	11,3 ± 0,5 a	6,3 ± 0,3 a	10,0 ± 0,2 a	1,2 ± 0,02 a	14,1 ± 1,6 a
	T2	11,0 ± 0,5 a	5,9 ± 0,3 a	10,0 ± 0,6 a	1,2 ± 0,02 a	12,7 ± 1,0 a
	T3	11,8 ± 1,2 a	5,7 ± 0,5 a	9,5 ± 1,2 a	1,2 ± 0,2 a	11,0 ± 1,1 a

\* Media ± error estándar ( $n = 3$ ). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ). Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en envero; T3, raleo tardío.

La **Tabla 7** muestra los datos agrupados de las uvas de ambas zonas, donde se aplicó un ANOVA multifactorial empleando “zona y tratamiento” como factores. A partir de este análisis se observó un efecto significativo del factor “zona” sobre el contenido de fenoles totales, antocianos totales e intensidad colorante. Las muestras de Gualtallary mostraron niveles superiores de los parámetros mencionados respecto a Altamira, debido posiblemente a las diferencias ambientales existentes entre las mismas. Entre los factores más importantes, se encuentran la luz y la temperatura provenientes de la exposición solar. Según estudios previos (Berli et al., 2008), la zona de Gualtallary posee una gran incidencia de luz solar generada por su elevada altitud, lo cual favorece la expresión de los genes relacionados a la biosíntesis de estos compuestos (Matus et al.,

2009). Este comportamiento también fue observado en el estudio presentado en el Apartado I.1 (Capítulo I) y podría explicar en parte los resultados obtenidos en el presente trabajo. Por otro lado, las diferencias de temperatura observadas entre Altamira y Gualtallary durante la fase de maduración de las bayas complementarían esta hipótesis. Según el reporte climático (**Tabla 1**), Altamira presentó temperaturas más elevadas (> 33 °C, entre enero y marzo) en comparación con Gualtallary, lo cual podría afectar la acumulación de antocianos a través de una inhibición de la ruta biosintética conjuntamente con un fenómeno de degradación (Mori et al., 2005 y 2007; Guidoni et al., 2008). Por su parte, las zonas estudiadas mostraron concentraciones similares de proantocianidinas en los hollejos de las bayas analizadas (**Tabla 6**), confirmando el menor impacto de las variaciones de temperatura sobre la biosíntesis de estos compuestos (Cohen et al., 2008).

<b>Tabla 7.</b> Valores de probabilidad de los parámetros fenólicos generales para "zona y tratamiento" en hollejos y semillas Malbec. Datos agrupados de Altamira y Gualtallary.			
Parámetro	Factor		
	zona	tratamiento	zona x tratamiento <sup>b</sup>
<i>p</i> <sub>value</sub> <sup>a</sup>			
<i>Hollejos</i>			
Fenoles totales	0,0021	0,7121	0,9327
Antocianos totales	< 0,0001	0,0792	0,6665
Proantocianidinas totales	0,1110	0,5978	0,4995
Flavanoles DMACH	0,8657	0,8373	0,6143
Intensidad colorante	< 0,0001	0,0699	0,5877
<i>Semillas</i>			
Fenoles totales	0,0003	0,2255	0,8762
Proantocianidinas totales	0,0050	0,0782	0,9092
Flavanoles DMACH	0,0002	0,9781	0,7140
<sup>a</sup> Considerado significativo cuando <i>p</i> <sub>value</sub> < 0,05.			
<sup>b</sup> Efecto de interacción entre "zona y tratamiento".			

### 3.2.2.2. Perfil de antocianinas individuales

Los compuestos antocianínicos presentes en los hollejos fueron identificados y cuantificados empleando la técnica cromatográfica descrita en el Anexo I. Los mismos fueron agrupados de acuerdo a la ausencia o presencia de acilación y compuesto acilante (glucósidos no acilados, acetil-glucósidos y cinamil-glucósidos), y considerando la antocianidina involucrada (delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina). Los glucósidos cinamílicos incluyeron las antocianinas cumarílicas y cafeílicas. La **Tabla 8** muestra los resultados cuantitativos correspondientes a los hollejos de las bayas Malbec provenientes de los ensayos de raleo de racimos aplicados en las dos zonas de estudio. El grupo de los monoglucósidos representaron en promedio la fracción más abundante (74,6% en Altamira y 75,3% en Gualtallary), seguido por los derivados acetílicos (16,0% en ambas zonas) y cinamílicos (9,4% en Altamira y 8,7% en Gualtallary). Estos resultados coinciden con los obtenidos en

el Capítulo I, en el Capítulo II (Apartado II.1) y en distintos estudios realizados por diversos autores en otras variedades tintas (García-Beneytez et al., 2003; Núñez et al., 2004; González-Neves et al., 2007).

**Tabla 8.** Antocianinas individuales cuantificadas en hollejos de bayas Malbec, de Altamira y Gualtallay, al momento de cosecha (2009).

Compuesto	Tratamiento				Factor		
	C				zona	tratamiento	
	T1	T2	T3	T3	zona x tratamiento <sup>b</sup>	p <sub>value</sub> <sup>a</sup>	
Delfindina-3-glucósido	Altamira	147,0 ± 22,7 a	176,9 ± 7,2 a	156,4 ± 13,6 a	124,1 ± 13,9 a	0,0044	0,0106
	Gualtallay	156,2 ± 16,4 a	244,8 ± 20,2 a	225,2 ± 32,4 a	163,7 ± 21,2 a		
Cianidina-3-glucósido	Altamira	12,4 ± 2,7 a	20,0 ± 0,5 b	17,4 ± 1,2 ab	12,4 ± 1,3 a	< 0,0001	0,0063
	Gualtallay	20,0 ± 2,6 a	33,6 ± 4,3 a	31,3 ± 5,4 a	23,5 ± 2,2 a		
Petunidina-3-glucósido	Altamira	196,0 ± 27,4 a	230,3 ± 7,6 a	211,9 ± 13,6 a	169,2 ± 15,9 a	0,0137	0,0091
	Gualtallay	198,3 ± 22,9 a	293,8 ± 14,8 a	274,6 ± 30,4 a	208,9 ± 27,9 a		
Peonidina-3-glucósido	Altamira	81,6 ± 16,7 ab	120,0 ± 1,9 b	107,6 ± 5,1 ab	75,1 ± 6,7 a	< 0,0001	0,0093
	Gualtallay	126,1 ± 17,4 a	183,6 ± 16,0 a	183,5 ± 22,6 a	152,6 ± 14,6 a		
Malvídina-3-glucósido	Altamira	1457,0 ± 115,5 a	1363,1 ± 38,6 a	1417,9 ± 42,7 a	1233,0 ± 49,8 a	0,7329	0,2962
	Gualtallay	1248,1 ± 163,3 a	1429,6 ± 75,7 a	1429,4 ± 24,4 a	1274,5 ± 119,1 a		
<b>Antocianinas glucosiladas</b>	Altamira	1894,0 ± 184,1 a (73,9)	1910,3 ± 45,2 a (75,3)	1911,2 ± 69,7 a (75,1)	1613,8 ± 82,8 a (74,2)	0,1494	0,0677
	Gualtallay	1748,7 ± 219,7 a (75,0)	2185,4 ± 53,9 a (75,6)	2144,0 ± 112,3 a (75,6)	1823,2 ± 176,1 a (74,9)		
Delfindina-3-(6"-acetil)glucósido	Altamira	22,7 ± 4,0 a	30,8 ± 2,1 a	26,6 ± 1,9 a	21,7 ± 2,3 a	0,0083	0,0060
	Gualtallay	25,9 ± 3,2 a	39,1 ± 2,5 a	35,3 ± 4,0 a	27,2 ± 3,3 a		
Cianidina-3-(6"-acetil)glucósido	Altamira	14,1 ± 1,5 a	15,7 ± 1,7 a	15,6 ± 0,4 a	14,0 ± 1,1 a	0,6696	0,6648
	Gualtallay	14,2 ± 3,0 a	16,3 ± 2,5 a	16,3 ± 1,5 a	15,0 ± 2,0 a		
Petunidina-3-(6"-acetil)glucósido	Altamira	33,4 ± 5,4 a	42,8 ± 3,6 a	38,6 ± 3,0 a	32,9 ± 3,3 a	0,0092	0,0205
	Gualtallay	38,7 ± 5,7 a	53,9 ± 1,2 a	49,4 ± 3,5 a	40,0 ± 5,1 a		
Peonidina-3-(6"-acetil)glucósido	Altamira	28,5 ± 3,4 a	35,0 ± 2,9 a	31,2 ± 2,9 a	26,5 ± 1,9 a	0,0012	0,0402
	Gualtallay	33,5 ± 5,5 a	45,0 ± 2,0 a	42,9 ± 2,4 a	36,6 ± 3,8 a		
Malvídina-3-(6"-acetil)glucósido	Altamira	310,4 ± 24,1 a	281,5 ± 19,0 a	287,9 ± 10,5 a	254,2 ± 9,0 a	0,9213	0,4144
	Gualtallay	259,9 ± 44,8 a	307,7 ± 21,5 a	305,3 ± 4,4 a	267,6 ± 25,0 a		
<b>Antocianinas acetiladas</b>	Altamira	409,1 ± 37,9 a (16,0)	405,8 ± 28,0 a (16,0)	399,9 ± 14,3 a (15,7)	349,3 ± 17,1 a (16,1)	0,2732	0,2012
	Gualtallay	372,2 ± 62,1 a (16,0)	462,0 ± 23,4 a (16,0)	449,2 ± 4,9 a (15,9)	386,4 ± 38,8 a (15,9)		

\* Media (mg/kg de hollejos) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD, p < 0,05). <sup>a</sup> Considerado significativo cuando p<sub>value</sub> < 0,05. <sup>b</sup> Efecto de interacción entre "zona y tratamiento". Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre derivados antocianínicos por acilación y antocianinas totales. nd, no detectado. Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en invierno; T3, raleo tardío.

**Tabla 8.** (Continuación).

Compuesto	Tratamiento				Factor	
	C	T1	T2	T3	zona	zona x tratamiento <sup>b</sup>
					tratamiento	<i>p</i> value <sup>a</sup>
Delfinidina-3-(6"- <i>p</i> -cumaril)glucósido	Altamira	nd	nd	nd		
	Guatlallary	nd	nd	nd		
Cianidina-3-(6"- <i>p</i> -cumaril)glucósido	Altamira	1,6 ± 0,1 b	1,1 ± 0,1 ab	0,8 ± 0,1 a	0,0001	0,0034
	Guatlallary	1,4 ± 0,1 a	2,2 ± 0,4 a	1,6 ± 0,2 a		0,4517
Malvidina-3-(6"-cafeil)glucósido	Altamira	9,3 ± 0,6 a	11,1 ± 1,6 a	7,8 ± 0,4 a	0,0003	0,3592
	Guatlallary	5,1 ± 1,4 a	5,4 ± 0,5 a	6,5 ± 0,9 a		0,1292
Petunidina-3-(6"- <i>p</i> -cumaril)glucósido	Altamira	19,5 ± 1,9 a	17,8 ± 1,3 a	15,5 ± 1,2 a	0,3352	0,0907
	Guatlallary	16,2 ± 2,3 a	20,5 ± 0,8 a	17,0 ± 2,1 a		0,1619
Peonidina-3-(6"- <i>p</i> -cumaril)glucósido	Altamira	12,9 ± 2,3 a	15,5 ± 0,7 a	11,2 ± 0,5 a	< 0,0001	0,0206
	Guatlallary	17,8 ± 2,8 a	24,1 ± 0,8 a	21,4 ± 1,4 a		0,4208
Malvidina-3-(6"- <i>p</i> -cumaril)glucósido <i>cis</i>	Altamira	8,3 ± 0,8 a	5,0 ± 0,6 a	6,3 ± 0,2 a	0,0006	0,2709
	Guatlallary	4,0 ± 1,1 a	4,5 ± 0,9 a	4,6 ± 0,5 a		0,0920
Malvidina-3-(6"- <i>p</i> -cumaril)glucósido <i>trans</i>	Altamira	209,1 ± 13,8 a	183,8 ± 5,7 a	169,2 ± 5,1 a	0,5424	0,7477
	Guatlallary	165,1 ± 28,3 a	184,1 ± 7,8 a	172,4 ± 17,8 a		0,3087
<b>Antocianinas cumariladas</b>	Altamira	250,8 ± 17,4 a	224,3 ± 7,4 a	203,0 ± 6,9 a	0,9594	0,7092
	Guatlallary	204,5 ± 34,4 a	238,5 ± 23,7 a	217,0 ± 21,2 a		0,2666
<b>Antocianinas cinamiladas</b>	Altamira	260,1 ± 17,9 a (10,1)	235,4 ± 7,0 a (9,2)	210,8 ± 7,3 a (9,7)	0,8552	0,7201
	Guatlallary	209,6 ± 35,8 a (9,0)	244,0 ± 25,1 a (8,4)	223,5 ± 21,9 a (9,2)		0,2737
<b>Antocianinas totales</b>	Altamira	2563,2 ± 238,2 a	2546,5 ± 90,5 a	2173,9 ± 107,1 a	0,2086	0,1039
	Guatlallary	2330,5 ± 317,2 a	2833,6 ± 110,5 a	2433,1 ± 233,8 a		0,3702

\* Media (mg/kg de hollejos) ± error estándar (*n* = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD, *p* < 0,05). <sup>a</sup> Considerado significativo cuando *p* value < 0,05. <sup>b</sup> Efecto de interacción entre "zona y tratamiento". Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre derivados antocianícos por aclación y antocianinas totales. nd, no detectado. Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en verano; T3, raleo tardío.

Coincidiendo con las observaciones realizadas en el Apartado II.1 (Capítulo II), los tratamientos de CT realizados en Gualtallary no afectaron significativamente ninguno de los compuestos identificados. Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido en Altamira, los hollejos de las bayas provenientes del tratamiento T1 mostraron valores ligeramente superiores de monoglucósidos no acilados, derivados acetílicos y cinamílicos comparados con el resto de los tratamientos, en especial con el control ( $p > 0,05$ ). Estos resultados concuerdan con los niveles de antocianos totales cuantificados por espectrofotometría (Tabla 6).

Al comparar las dos zonas de estudio (Tabla 8), se observaron diferencias significativas entre las mismas para gran parte de los compuestos identificados. Los hollejos de Gualtallary mostraron concentraciones significativamente superiores de los monoglucósidos de delfinidina, cianidina, petunidina y peonidina; de los derivados acetilados de delfinidina, petunidina y peonidina; de cianidina-3-(6"-*p*-cumaril)glucósido, peonidina-3-(6"-*p*-cumaril)glucósido, malvidina-3-(6"-*p*-cumaril)glucósido *cis* y malvidina-3-(6"-cafeil)glucósido. Por el contrario, los niveles de malvidina-3-glucósido y malvidina-3-(6"-acetil)glucósido fueron similares en ambas zonas. Dado que la síntesis de antocianos ocurre en el retículo endoplasmático de las células como resultado de la actividad de diversas enzimas unidas a él, así como la acilación de estos compuestos ocurre en el citoplasma y vacuolas (Zhao et al., 2010), sería posible inferir una mayor actividad de dichos complejos enzimáticos a medida que aumenta la altitud del viñedo, influenciada por las condiciones ambientales mencionadas anteriormente (luz y temperatura). Estos resultados, conjuntamente con los obtenidos mediante la evaluación espectrofotométrica de los parámetros fenólicos generales, revelan el gran potencial de Gualtallary para la producción de vinos con coloraciones intensas y estables en el tiempo, destinados a una crianza prolongada.

### 3.2.2.3. Perfil de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

Los compuestos fenólicos no-antociánicos presentes en los hollejos fueron identificados y cuantificados empleando la técnica cromatográfica descrita en el Anexo I. Los mismos fueron agrupados en no-flavonoides (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y estilbenos) y flavonoides (flavanoles, flavonoles y dihidroflavonoles). La concentración de los distintos compuestos, individualmente y agrupados, y las proporciones relativas de cada grupo en las muestras analizadas se presentan en la Tabla 9. Los flavonoides constituyeron en promedio la fracción más abundante (97,1% en Altamira y 94,7% en Gualtallary) comparada con los no-flavonoides (2,9% en Altamira y 5,3% en Gualtallary), en concordancia con lo reportado en el Capítulo I, en el Capítulo II (Apartado II.1) y en diversos estudios realizados por distintos autores en otras variedades tintas (Peña-Neira et al., 2004; Monagas et al., 2005a; Obreque-Slier et al., 2010).

**Tabla 9.** Compuestos fenólicos de bajo peso molecular cuantificados en hollejos de bayas Malbec, de Altamira y Guatallary, al momento de cosecha (2009).

Compuesto	C			T1			T2			T3			Factor				
	C			T1			T2			T3			zona	tratamiento	zona x tratamiento <sup>b</sup>		
	C			T1			T2			T3			zona	tratamiento	zona x tratamiento <sup>b</sup>		
																<i>p</i> value <sup>a</sup>	
Acido gálico	Altamira	0,67 ± 0,3* a	0,60 ± 0,06 a	0,60 ± 0,06 a	0,60 ± 0,06 a	0,60 ± 0,06 a	0,50 ± 0,06 a										0,5070
	Guatallary	0,97 ± 0,03 a	1,00 ± 0,06 a	1,00 ± 0,06 a	1,00 ± 0,06 a	1,00 ± 0,06 a	0,97 ± 0,09 a										
Acido protocatequico	Altamira	0,37 ± 0,03 a	0,37 ± 0,03 a	0,37 ± 0,03 a	0,37 ± 0,03 a	0,37 ± 0,03 a	0,33 ± 0,03 a										0,9966
	Guatallary	1,30 ± 0,06 a	1,37 ± 0,24 a	1,37 ± 0,24 a	1,33 ± 0,18 a	1,33 ± 0,18 a	1,30 ± 0,26 a										
Acido siríngico	Altamira	8,2 ± 0,3 a	8,1 ± 0,4 a	8,1 ± 0,4 a	8,9 ± 0,2 a	8,9 ± 0,2 a	8,9 ± 0,5 a										0,9441
	Guatallary	13,3 ± 2,2 a	13,8 ± 2,8 a	13,8 ± 2,8 a	16,5 ± 3,0 a	16,5 ± 3,0 a	15,3 ± 3,6 a										
Galato de metilo	Altamira	3,4 ± 0,1 a	3,2 ± 0,1 a	3,2 ± 0,1 a	3,4 ± 0,1 a	3,4 ± 0,1 a	3,1 ± 0,1 a										0,8532
	Guatallary	3,4 ± 0,1 a	3,3 ± 0,1 a	3,3 ± 0,1 a	3,6 ± 0,2 a	3,6 ± 0,2 a	3,2 ± 0,2 a										
Galato de etilo	Altamira	4,2 ± 0,2 a	4,3 ± 0,2 a	4,3 ± 0,2 a	3,9 ± 0,1 a	3,9 ± 0,1 a	3,7 ± 0,1 a										0,4679
	Guatallary	6,8 ± 0,4 a	6,8 ± 0,5 a	6,8 ± 0,5 a	7,3 ± 0,4 a	7,3 ± 0,4 a	6,3 ± 0,3 a										
<b>Acidos hidroxibenzoicos/derivados</b>																	
Acido <i>trans</i> -cattárico	Altamira	nd	nd	nd	nd	nd	nd										
	Guatallary	3,2 ± 0,1 a	2,9 ± 0,2 a	2,9 ± 0,2 a	3,0 ± 0,1 a	3,0 ± 0,1 a	2,8 ± 0,2 a										
Acido <i>trans</i> -cutárico	Altamira	nd	nd	nd	nd	nd	nd										
	Guatallary	5,9 ± 0,4 a	5,2 ± 0,9 a	5,2 ± 0,9 a	4,9 ± 0,3 a	4,9 ± 0,3 a	4,2 ± 0,3 a										
Acido <i>trans</i> -cafeico	Altamira	3,3 ± 0,1 a	3,0 ± 0,1 a	3,0 ± 0,1 a	3,2 ± 0,1 a	3,2 ± 0,1 a	2,9 ± 0,1 a										0,7015
	Guatallary	3,3 ± 0,1 a	3,2 ± 0,2 a	3,2 ± 0,2 a	3,4 ± 0,2 a	3,4 ± 0,2 a	3,1 ± 0,2 a										
<b>Acidos hidroxicinnámicos/derivados</b>																	
Glucósido de <i>trans</i> -resveratrol	Altamira	3,3 ± 0,1 a (0,3)	3,0 ± 0,1 a (0,3)	3,0 ± 0,1 a (0,3)	3,2 ± 0,1 a (0,3)	3,2 ± 0,1 a (0,3)	2,9 ± 0,1 a (0,3)										0,4763
	Guatallary	12,4 ± 0,4 a (0,9)	11,3 ± 1,3 a (0,8)	11,3 ± 1,3 a (0,8)	11,3 ± 0,6 a (0,8)	11,3 ± 0,6 a (0,8)	10,1 ± 0,7 a (0,8)										
Glucósido de <i>cis</i> -resveratrol	Altamira	6,2 ± 0,6 a	7,4 ± 0,8 a	7,4 ± 0,8 a	6,4 ± 0,5 a	6,4 ± 0,5 a	5,8 ± 0,2 a										0,3492
	Guatallary	18,4 ± 0,5 a	18,4 ± 2,5 a	18,4 ± 2,5 a	22,6 ± 2,8 a	22,6 ± 2,8 a	20,0 ± 1,4 a										
<b>Estilbenos</b>	Altamira	3,0 ± 0,1 a	2,8 ± 0,3 a	2,8 ± 0,3 a	2,7 ± 0,1 a	2,7 ± 0,1 a	2,8 ± 0,3 a										0,1101
	Guatallary	15,5 ± 0,3 a	10,9 ± 0,3 a	10,9 ± 0,3 a	14,2 ± 1,9 a	14,2 ± 1,9 a	13,4 ± 1,5 a										
<b>No-flavonoides totales</b>	Altamira	9,2 ± 0,6 a (0,9)	10,2 ± 1,0 a (0,9)	10,2 ± 1,0 a (0,9)	9,1 ± 0,4 a (0,9)	9,1 ± 0,4 a (0,9)	8,6 ± 0,1 a (1,0)										0,2562
	Guatallary	33,9 ± 0,5 a (2,5)	29,3 ± 2,8 a (2,0)	29,3 ± 2,8 a (2,0)	36,8 ± 4,7 a (2,6)	36,8 ± 4,7 a (2,6)	33,4 ± 1,9 a (2,7)										
<b>No-flavonoides totales</b>	Altamira	29,3 ± 1,2 a (2,7)	29,8 ± 1,8 a (2,6)	29,8 ± 1,8 a (2,6)	29,5 ± 0,6 a (3,0)	29,5 ± 0,6 a (3,0)	28,0 ± 0,8 a (3,1)										0,3739
	Guatallary	72,1 ± 3,0 a (5,4)	66,9 ± 4,1 a (4,7)	66,9 ± 4,1 a (4,7)	77,8 ± 2,7 a (5,5)	77,8 ± 2,7 a (5,5)	70,6 ± 6,1 a (5,7)										

\* Media (mg/kg de hollejos) ± error estándar (*n* = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD, *p* < 0,05). <sup>a</sup> Considerado significativo cuando *p* value < 0,05. <sup>b</sup> Efecto de interacción entre "zona y tratamiento". Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre grupos fenólicos y fenoles totales. nd, no detectado. Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en verano; T3, raleo tardío.

Compuesto	Tratamiento			Factor		
	C	T1	T2	T3	zona x tratamiento <sup>b</sup>	
					P value <sup>a</sup>	
(+)-Catequina	7,7 ± 0,8 <sup>a</sup> 17,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,4 <sup>a</sup> 9,4 ± 4,5 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,3 <sup>a</sup> 9,0 ± 2,4 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,5 <sup>a</sup> 14,9 ± 2,7 <sup>a</sup>	< 0,0001 0,5416	0,7991
(-)-Epicatequina	6,2 ± 0,4 <sup>a</sup> 7,7 ± 1,3 <sup>a</sup>	6,9 ± 0,5 <sup>a</sup> 9,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,5 <sup>a</sup> 9,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,2 <sup>a</sup> 9,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	< 0,0001 0,4590	0,3091
Dímero de procianidina 1	14,7 ± 0,7 <sup>a</sup> 26,3 ± 1,4 <sup>a</sup>	20,0 ± 1,7 <sup>b</sup> 24,2 ± 2,9 <sup>a</sup>	11,2 ± 0,7 <sup>a</sup> 24,3 ± 1,9 <sup>a</sup>	12,9 ± 0,7 <sup>a</sup> 21,2 ± 2,9 <sup>a</sup>	< 0,0001 0,0496	0,1134
Dímero de procianidina 2	32,6 ± 1,7 <sup>a</sup> 43,1 ± 5,9 <sup>a</sup>	32,6 ± 0,5 <sup>a</sup> 44,8 ± 4,8 <sup>a</sup>	34,3 ± 1,0 <sup>a</sup> 52,5 ± 3,6 <sup>a</sup>	32,8 ± 0,9 <sup>a</sup> 50,0 ± 7,1 <sup>a</sup>	0,0001 0,4983	0,7209
Trímero de procianidina 1	20,3 ± 2,1 <sup>a</sup> 31,7 ± 2,9 <sup>a</sup>	26,0 ± 1,0 <sup>a</sup> 36,2 ± 4,6 <sup>a</sup>	21,0 ± 2,1 <sup>a</sup> 36,7 ± 3,3 <sup>a</sup>	19,2 ± 1,4 <sup>a</sup> 31,6 ± 2,5 <sup>a</sup>	< 0,0001 0,1672	0,7671
Trímero de procianidina 2	30,6 ± 1,1 <sup>ab</sup> 50,1 ± 6,4 <sup>a</sup>	43,0 ± 3,0 <sup>b</sup> 52,9 ± 9,6 <sup>a</sup>	25,4 ± 4,1 <sup>a</sup> 47,0 ± 3,8 <sup>a</sup>	24,1 ± 2,7 <sup>a</sup> 41,5 ± 2,6 <sup>a</sup>	0,0001 0,0372	0,6529
<b>Flavonoles</b>	112,1 ± 5,1 <sup>a</sup> (10,4) 176,6 ± 5,0 <sup>a</sup> (3,1)	136,6 ± 6,6 <sup>b</sup> (11,9) 196,6 ± 26,7 <sup>a</sup> (3,3)	103,5 ± 5,3 <sup>a</sup> (10,5) 188,5 ± 2,8 <sup>a</sup> (3,4)	100,9 ± 2,4 <sup>a</sup> (11,1) 168,2 ± 6,6 <sup>a</sup> (3,4)	< 0,0001 0,2923	0,6495
Miricetina-3-galactósido	17,1 ± 0,4 <sup>b</sup> 35,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	18,4 ± 0,3 <sup>b</sup> 20,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	17,8 ± 0,8 <sup>b</sup> 21,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	14,6 ± 0,4 <sup>a</sup> 18,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	0,0001 0,0062	0,3071
Miricetina-3-glucósido	60,0 ± 3,6 <sup>ab</sup> 79,7 ± 1,8 <sup>a</sup>	79,8 ± 2,6 <sup>c</sup> 93,2 ± 8,3 <sup>a</sup>	67,7 ± 2,8 <sup>bc</sup> 94,5 ± 4,3 <sup>a</sup>	55,0 ± 1,8 <sup>a</sup> 78,9 ± 6,0 <sup>a</sup>	< 0,0001 0,0012	0,4803
Kaempferol-3-galactósido	68,3 ± 2,0 <sup>ab</sup> 76,5 ± 9,6 <sup>a</sup>	82,6 ± 5,5 <sup>b</sup> 91,3 ± 9,9 <sup>a</sup>	70,0 ± 6,0 <sup>ab</sup> 91,6 ± 5,0 <sup>a</sup>	58,6 ± 1,9 <sup>a</sup> 77,2 ± 4,0 <sup>a</sup>	0,0047 0,0308	0,6559
Quercetina-3-galactósido	15,1 ± 1,1 <sup>ab</sup> 13,9 ± 1,5 <sup>a</sup>	22,5 ± 1,5 <sup>c</sup> 23,3 ± 2,1 <sup>b</sup>	16,5 ± 0,3 <sup>b</sup> 23,0 ± 1,7 <sup>b</sup>	10,7 ± 1,5 <sup>a</sup> 18,5 ± 1,7 <sup>ab</sup>	0,0051 0,0001	0,0253
Quercetina-3-glucósido	14,4 ± 0,7 <sup>ab</sup> 16,1 ± 1,0 <sup>a</sup>	16,7 ± 0,4 <sup>b</sup> 20,8 ± 0,6 <sup>b</sup>	16,4 ± 1,3 <sup>b</sup> 21,9 ± 0,8 <sup>b</sup>	12,3 ± 0,7 <sup>a</sup> 19,5 ± 1,0 <sup>ab</sup>	< 0,0001 0,0004	0,0358
Quercetina-3-ramnósido	3,8 ± 0,3 <sup>a</sup> 4,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,1 <sup>a</sup> 3,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,1 <sup>a</sup> 7,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,1 <sup>a</sup> 7,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	< 0,0001 0,0002	< 0,0001
Iso ramnetina-3-glucósido	17,1 ± 1,1 <sup>a</sup> 24,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	17,0 ± 0,6 <sup>a</sup> 26,1 ± 0,6 <sup>ab</sup>	16,9 ± 0,8 <sup>a</sup> 30,7 ± 1,0 <sup>b</sup>	14,9 ± 0,5 <sup>a</sup> 27,6 ± 1,6 <sup>ab</sup>	< 0,0001 0,0231	0,0112
Laricetrina-3-glucósido	18,7 ± 0,9 <sup>ab</sup> 18,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	20,5 ± 1,2 <sup>b</sup> 21,6 ± 2,5 <sup>a</sup>	19,0 ± 0,4 <sup>ab</sup> 22,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	15,3 ± 0,8 <sup>a</sup> 19,7 ± 1,6 <sup>a</sup>	0,0312 0,0395	0,3033
Naringenina	26,5 ± 0,5 <sup>ab</sup> 29,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	30,5 ± 1,2 <sup>b</sup> 29,8 ± 1,8 <sup>a</sup>	29,2 ± 0,8 <sup>b</sup> 32,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	23,6 ± 1,0 <sup>a</sup> 27,3 ± 2,2 <sup>a</sup>	0,0348 0,0048	0,3762
<b>Flavonoles</b>	241,0 ± 6,7 <sup>ab</sup> (22,3) 28,17 ± 3,7 <sup>a</sup> (21,0)	291,9 ± 10,5 <sup>c</sup> (25,5) 330,5 ± 25,3 <sup>a</sup> (23,6)	257,2 ± 12,4 <sup>bc</sup> (26,0) 346,0 ± 9,0 <sup>a</sup> (24,6)	208,4 ± 4,7 <sup>a</sup> (22,8) 294,5 ± 17,0 <sup>a</sup> (23,5)	< 0,0001 0,0009	0,1548
Dihidro quercetina-3-ramnósido	21,9 ± 1,3 <sup>a</sup> 25,6 ± 1,4 <sup>a</sup>	24,0 ± 0,6 <sup>a</sup> 28,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	20,5 ± 1,4 <sup>a</sup> 28,3 ± 2,5 <sup>a</sup>	19,4 ± 0,4 <sup>a</sup> 25,8 ± 2,3 <sup>a</sup>	0,0002 0,2375	0,5217
Dihidro kaempferol-3-glucósido	16,7 ± 4,4 <sup>b</sup> 19,7,6 ± 2,6 <sup>a</sup>	20,7,5 ± 4,6 <sup>c</sup> 22,9,2 ± 19,8 <sup>a</sup>	16,1,4 ± 3,6 <sup>ab</sup> 22,0,4 ± 9,8 <sup>a</sup>	14,2,1 ± 7,0 <sup>a</sup> 19,0,0 ± 11,1 <sup>a</sup>	< 0,0001 0,0004	0,2304
Dihidro quercetina-3-glucósido	505,9 ± 16,8 <sup>a</sup> 589,8 ± 215 <sup>a</sup>	455,8 ± 35,0 <sup>a</sup> 562,3 ± 50,6 <sup>a</sup>	415,5 ± 9,0 <sup>a</sup> 545,5 ± 38,9 <sup>a</sup>	413,0 ± 11,1 <sup>a</sup> 502,0 ± 40,2 <sup>a</sup>	0,0003 0,0612	0,9845
<b>Dihidroflavonoles</b>	695,5 ± 216 <sup>b</sup> (64,5) 813,0 ± 21,4 <sup>a</sup> (60,5)	687,3 ± 39,3 <sup>ab</sup> (60,0) 819,5 ± 70,9 <sup>a</sup> (58,4)	597,4 ± 13,3 <sup>ab</sup> (60,5) 794,2 ± 51,1 <sup>a</sup> (56,5)	574,5 ± 23,0 <sup>a</sup> (63,0) 717,8 ± 52,5 <sup>a</sup> (67,4)	0,0001 0,0527	0,7868
<b>Flavonoides totales</b>	1048,6 ± 27,6 <sup>b</sup> (97,2) 127,13 ± 17,8 <sup>a</sup> (94,6)	115,8 ± 54,3 <sup>b</sup> (97,4) 1336,6 ± 122,8 <sup>a</sup> (95,3)	958,1 ± 27,9 <sup>ab</sup> (97,0) 1328,7 ± 71,6 <sup>a</sup> (94,5)	883,8 ± 19,7 <sup>a</sup> (96,9) 180,5 ± 80,5 <sup>a</sup> (94,3)	< 0,0001 0,0491	0,6004
<b>Fenoles no-antocianínicos totales</b>	1077,9 ± 28,9 <sup>b</sup> 1343,4 ± 18,7 <sup>a</sup>	145,6 ± 55,9 <sup>b</sup> 1403,5 ± 126,6 <sup>a</sup>	987,6 ± 28,4 <sup>ab</sup> 1406,5 ± 69,1 <sup>a</sup>	911,8 ± 20,3 <sup>a</sup> 1251,1 ± 83,7 <sup>a</sup>	< 0,0001 0,0563	0,5766

\* Media (mg/kg de hollejos) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD, p < 0,05). \* Considerado significativo cuando p value < 0,05. b Efecto de interacción entre "zona y tratamiento". Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre grupos fenólicos y fenoles totales. nd, no detectado. Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en envase; T3, raleo tardío.

Coincidente con los resultados presentados en el Apartado II.1 (Capítulo II), los tratamientos de CT realizados en Gualtallary no afectaron significativamente el contenido de los compuestos no-flavonoides determinados en hollejos ( $p > 0,05$ ). Por el contrario, al analizar el grupo de los flavonoides, los tratamientos aplicados generaron un efecto diferencial según la zona estudiada. Mientras que en Altamira, el T1 aumentó significativamente los niveles de flavanoles y flavonoles en hollejos; en el caso de Gualtallary, se observó una tendencia semejante pero no significativa (**Tabla 9**). La notable incidencia del tratamiento de raleo temprano (T1) sobre la biosíntesis de estos compuestos, principalmente flavonoles, podría estar vinculada a una mayor acumulación de fotoasimilados (azúcares) en las hojas, generada por este tratamiento, en estadios previos a la maduración de las bayas. Como consecuencia, esta situación podría promover la acumulación de dichos compuestos debido un efecto inductivo de los azúcares sobre la expresión de los genes involucrados en su biosíntesis, como ocurre en el caso de los antocianos (Coombe y McCarthy, 2000; Boss et al., 1996a).

Al realizar un análisis comparativo entre las zonas evaluadas (**Tabla 9**), se encontraron diferencias significativas en el contenido de todos los compuestos identificados, con excepción del galato de metilo y el ácido *trans*-cafeico. En todos los casos, las muestras de Gualtallary mostraron concentraciones superiores respecto de Altamira ( $p < 0,05$ ), revelando nuevamente la posible incidencia de los factores medioambientales (luz, temperatura) en la biosíntesis y acumulación de estos compuestos (Downey et al., 2006). Las diferencias observadas fueron mayores en la tasa de los compuestos no-flavonoides. Independientemente del tratamiento, las muestras de Gualtallary presentaron en promedio 1,6 veces mayor contenido de ácidos hidroxibenzoicos, 3,6 veces más ácidos hidroxicinámicos y 3,6 veces más estilbenos, en comparación con Altamira.

Con respecto al grupo de los flavanoles, el principal monómero cuantificado fue (+)-catequina, seguido por (-)-epicatequina (**Tabla 9**). Considerando que la relación (+)-catequina/(-)-epicatequina fue variable entre las muestras de cada zona (1,2 en Altamira y 2,1 en Gualtallary) es posible sugerir la influencia de las condiciones ambientales sobre la biosíntesis de estos compuestos y una mayor actividad de la enzima leucoantocianidina reductasa en hollejos de Gualtallary. Por otro lado, los altos niveles de dímeros y trímeros de procianidina encontrados en los hollejos de esta zona, junto al elevado contenido de antocianinas observado anteriormente, permiten suponer un gran potencial para producir vinos aptos para la crianza, debido a la posibilidad de estabilización del color a través de reacciones de copigmentación y/o condensación (Escribano-Bailón et al., 2001).

Los flavonoles representaron el segundo grupo fenólico más abundante después de los dihidroflavonoles (24,2% en Altamira y 23,2% en Gualtallary). El contenido total promedio en las muestras analizadas estuvo comprendido entre 208,4 y 291,9 mg/kg de hollejos y entre 281,7 y 346,0 mg/kg de hollejos en Altamira y Gualtallary, respectivamente. Estos valores elevados para ambas



zonas podrían ser explicados por las condiciones ambientales de Mendoza, principalmente la alta intensidad de luz solar durante el período de maduración de las bayas, lo cual parece estar asociado a una mayor acumulación de flavonoles (Downey et al., 2004; Makris et al., 2006a). Paralelamente, se observaron proporciones diferenciales de los distintos compuestos entre las zonas evaluadas. En Altamira, el perfil de flavonoles estuvo compuesto por miricetina (media 33,1%), seguido por kaempferol (28,0%), quercetina (13,8%), naringenina (11,0%), laricitrina (7,4%) e isoramnetina (6,7%); mientras que en Gualtallary, también predominó la miricetina (34,0%), seguido por kaempferol (26,8%), quercetina (14,4%), naringenina (9,5%), isoramnetina (8,7%) y laricitrina (6,6%). Esta variación observada en la proporción de cada compuesto indicaría la influencia de la zona de cultivo en la actividad enzimática (flavonol sintasa y/o metiltransferasa) involucrada en la biosíntesis de flavonoles (Mattivi et al., 2006). Por otro lado, la mayor parte de estos compuestos se encontraron bajo la forma glicosilada, apreciándose una mayor proporción de glucósidos (46,3% en Altamira y 49,2% en Gualtallary), seguido por los derivados galactosilados (41,2% en Altamira y 39,4% en Gualtallary).

Finalmente, es importante destacar la presencia de dihidroflavonoles en las uvas estudiadas. En concordancia con los resultados reportados en el Capítulo I y en el Apartado II.1 (Capítulo II), estos compuestos constituyeron el grupo fenólico más abundante (62,0% en Altamira y 58,2% en Gualtallary). El contenido total promedio en las muestras analizadas estuvo comprendido entre 574,5 y 695,5 mg/kg de hollejos y entre 717,8 y 819,5 mg/kg de hollejos en Altamira y Gualtallary, respectivamente. Independientemente del tratamiento aplicado, la dihidroquercetina-3-glucósido fue el compuesto mayoritario representando el 43,5% (Altamira) y el 40,7% (Gualtallary) de la totalidad de fenoles de bajo peso molecular cuantificados. Los altos niveles de dihidroflavonoles encontrados en los hollejos Malbec coinciden con otros estudios realizados en el marco del presente trabajo de Tesis Doctoral, sobre uvas y vinos del mismo cultivar, y podrían indicar un rasgo taxonómico distintivo de esta variedad.

### 3.2.3. Composición fenólica de semillas

#### 3.2.3.1. Parámetros fenólicos generales

Las semillas cumplen un rol muy importante durante la vinificación, aportando al medio flavanoles de diversa estructura molecular, los cuales inciden directamente en las características sensoriales de los vinos tintos (astringencia y amargor) y participan en la estabilización de los pigmentos antociánicos (Monagas y Bartolomé, 2009). La **Tabla 10** muestra los resultados de los parámetros fenólicos globales determinados en semillas de bayas Malbec provenientes de los ensayos de raleo de racimos realizados en Altamira y Gualtallary. En concordancia con los datos

obtenidos en el Apartado II.1 (Capítulo II), el tratamiento T2 aplicado en Gualtallary condujo a un mayor contenido de fenoles y proantocianidinas totales en las muestras analizadas comparadas con las uvas control, sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Mientras que en Altamira, por el contrario, el tratamiento T2 modificó significativamente ambos parámetros ( $p < 0,05$ ).

<b>Tabla 10.</b> Parámetros fenólicos generales de extractos de semillas Malbec, de Altamira y Gualtallary, al momento de cosecha (2009).				
Zona	Tratamiento	Fenoles totales (mg/g)	Proantocianidinas totales (mg/g)	Flavanoles DMACH (mg/g)
Altamira	C	28,6 ± 1,2* a	99,2 ± 3,0 a	11,9 ± 0,2 a
	T1	29,6 ± 0,5 ab	102,3 ± 0,4 ab	11,3 ± 0,5 a
	T2	32,5 ± 1,0 b	112,5 ± 2,4 b	11,2 ± 0,6 a
	T3	29,8 ± 0,3 ab	100,8 ± 3,5 ab	11,1 ± 1,5 a
Gualtallary	C	34,1 ± 0,4 a	111,2 ± 2,3 a	13,6 ± 0,5 a
	T1	33,6 ± 2,9 a	110,1 ± 9,5 a	14,6 ± 0,7 a
	T2	35,9 ± 0,8 a	121,0 ± 3,4 a	14,7 ± 0,9 a
	T3	34,9 ± 1,9 a	114,2 ± 5,6 a	14,1 ± 1,1 a

\* Media ± error estándar ( $n = 3$ ). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ). Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en enero; T3, raleo tardío.

Al considerar conjuntamente todos los tratamientos (**Tabla 7**), las semillas de Gualtallary presentaron mayores niveles de fenoles totales, proantocianidinas totales y flavanoles DMACH, con diferencias significativas respecto a Altamira ( $p < 0,05$ ). Estas diferencias podrían deberse nuevamente a factores edafoclimáticos que inciden sobre el desarrollo de las bayas, afectando su composición química. Si bien las muestras de ambas zonas presentaron el mismo contenido de sólidos solubles (25 °Brix), las bayas de Gualtallary mostraron niveles superiores de acidez indicando posiblemente una madurez diferencial en comparación con Altamira (**Tabla 4**). Por lo tanto, si las condiciones ambientales de Gualtallary (temperaturas bajas durante la maduración) retardaran esta fase, el fenómeno de oxidación de las proantocianidinas de semillas mencionado por Kennedy et al. (2000a,b) también se vería disminuido, explicando el mayor contenido de estos compuestos en las muestras de esta localidad.

### 3.2.3.2. Perfil de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

Los compuestos fenólicos individuales presentes en las semillas fueron identificados y cuantificados empleando la técnica cromatográfica descrita en el Anexo I. Entre ellos, se determinaron tres monómeros [(+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC) y (-)-epicatequina-3-galato (ECG)], cinco dímeros de procianidina [(+)-catequina-(4 $\alpha$ - $\rightarrow$ 8)-(-)-catequina (B3), (-)-epicatequina-

(4 $\beta$ →8)-(+)-catequina (B1), (+)-catequina-(4 $\alpha$ →8)-(-)-epicatequina (B4), (-)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-(-)-epicatequina (B2) y (+)-catequina-(4 $\alpha$ →6)-(+)-catequina (B6)], un trímero de procianidina [(-)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-(-)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-(+)-catequina (C1)], seis procianidinas no identificadas [dos dímeros esterificados con ácido gálico, dos trímeros esterificados con ácido gálico, un trímero y un tetrámero], y sólo un compuesto no-flavonoide (ácido gálico). La **Tabla 11** resume los resultados cuantitativos obtenidos en las muestras analizadas.

Coincidente con la tendencia observada en Altamira (Apartado II.1, Capítulo II), los tratamientos T1 y T2 realizados en Gualtallary modificaron significativamente el contenido de algunos compuestos determinados por HPLC [(+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina B4, tetrámero y galato de dímero de procianidina 1], aumentando por consiguiente la concentración total de fenoles en comparación con el tratamiento control (**Tabla 11**).

Al analizar la influencia de la zona geográfica sobre estos compuestos, no se encontró un comportamiento comparable con el observado en los parámetros fenólicos globales (**Tabla 10**). Las semillas de Gualtallary mostraron sólo niveles superiores de procianidina B4, tetrámero y galato de dímero de procianidina 1, respecto a las muestras de Altamira; sin apreciarse diferencias significativas en relación al resto de los fenoles identificados (**Tabla 11**). En general, las semillas de ambas zonas presentaron concentraciones similares de fenoles de bajo peso molecular (3801,5-4342,4 mg/kg de semillas en Altamira y 3164,5-4247,1 mg/kg de semillas en Gualtallary). Estos niveles totales determinados en semillas fueron mayores que los obtenidos en hollejos, lo cual concuerda con los resultados reportados en el Apartado II.1 (Capítulo II) y en otros estudios previos (Cheynier et al., 2000; Rodríguez Montealegre et al., 2006).

Con respecto a los monómeros de flavanoles cuantificados en este estudio, y según observaciones realizadas en el Apartado II.1 (Capítulo II) y en estudios publicados por diversos autores (Guendez et al., 2005; Iacopini et al., 2008; Obreque-Slier et al., 2010), el principal compuesto fue (+)-catequina, seguido por (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-galato. Independientemente del tratamiento aplicado, las proporciones relativas de estos compuestos (C:EC:ECG) fueron similares para las semillas Malbec de las dos zonas evaluadas (Altamira 46,6:27,8:2,2 y Gualtallary 45,7:26,0:2,4).

Al analizar la distribución de las distintas procianidinas, se observó un comportamiento similar a los monómeros, con niveles similares entre zonas para gran parte de los compuestos determinados. Agrupando las mismas como procianidinas esterificadas o no con ácido gálico, se encontraron algunas diferencias según la zona evaluada. Independientemente del tratamiento aplicado, las proporciones de procianidinas y compuestos esterificados con ácido gálico fueron del 12,7% y 9,6% en Altamira (Apartado II.1, Capítulo II), y del 14,5% y 9,2% en Gualtallary, respectivamente.

**Tabla 11. Compuestos fenólicos de bajo peso molecular cuantificados en semillas de bayas Malbec, de Altamira y Gualtallary, al momento de cosecha (2009).**

Compuesto	Tratamiento			Factor			
	C	T1	T2	T3	zona	tratamiento	
					zona	zona x tratamiento <sup>b</sup>	
						<i>p</i> value <sup>a</sup>	
Acido gálico	Altamira Gualtallary	83,6 ± 4,2 a 88,9 ± 8,1 a	73,5 ± 2,2 a 85,6 ± 8,5 a	77,1 ± 3,2 a 82,5 ± 10,1 a	0,3466	0,8111	0,8837
(+)-Catequina	Altamira Gualtallary	1806,4 ± 56,2 ab 1840,8 ± 1819 ab	1662,9 ± 16,9 a 1922,1 ± 168,5 ab	1682,0 ± 88,2 a 1369,1 ± 134,7 a	0,9397	0,0207	0,2428
(-)-Epicatequina	Altamira Gualtallary	1090,7 ± 53,6 a 1033,6 ± 60,3 b	1219,6 ± 118,0 a 1045,5 ± 20,7 b	941,6 ± 66,5 a 822,7 ± 23,8 a	0,1155	0,0032	0,1527
(-)-Epicatequina-3-galato	Altamira Gualtallary	74,7 ± 9,9 a 80,8 ± 4,3 a	86,8 ± 5,0 a 103,2 ± 13,7 a	83,9 ± 2,9 a 85,4 ± 9,1 a	0,2268	0,3501	0,8837
Procianidina B1	Altamira Gualtallary	27,9 ± 4,3 a 23,5 ± 2,7 a	27,0 ± 3,2 a 21,6 ± 2,2 a	27,3 ± 1,5 a 16,0 ± 1,2 a	0,0069	0,4702	0,5752
Procianidina B2	Altamira Gualtallary	108,6 ± 13,6 a 122,5 ± 12,6 a	105,5 ± 3,0 a 97,4 ± 5,4 a	106,9 ± 10,9 a 85,2 ± 3,5 a	0,6685	0,1670	0,3429
Procianidina B3	Altamira Gualtallary	58,2 ± 6,9 a 59,3 ± 4,8 a	61,5 ± 4,7 a 57,3 ± 7,3 a	53,3 ± 6,8 a 38,4 ± 3,1 a	0,1438	0,1583	0,6137
Procianidina B4	Altamira Gualtallary	86,5 ± 2,8 a 179,3 ± 7,3 ab	176,5 ± 2,8 b 203,3 ± 10,1 b	109,9 ± 12,0 a 147,0 ± 16,8 a	0,0071	0,0879	0,5954
Procianidina B6	Altamira Gualtallary	28,3 ± 2,7 a 35,2 ± 4,8 a	43,8 ± 4,5 ab 42,8 ± 2,5 a	31,7 ± 3,5 ab 32,7 ± 3,4 a	0,4959	0,0175	0,1379
Procianidina C1	Altamira Gualtallary	75,0 ± 9,1 a 94,8 ± 10,7 a	100,1 ± 10,1 a 79,9 ± 4,1 a	87,3 ± 3,0 a 82,7 ± 5,3 a	0,2749	0,2896	0,0419
Trímero de procianidina	Altamira Gualtallary	nd 46,5 ± 4,8 a	nd 49,9 ± 4,9 a	nd 37,4 ± 4,8 a			
Tetrámero de procianidina	Altamira Gualtallary	28,0 ± 1,7 a 36,1 ± 3,7 a	32,1 ± 0,2 a 35,7 ± 2,2 a	23,1 ± 3,5 a 40,1 ± 2,6 ab	0,0009	0,0029	0,1993
Galato de dímero de procianidina 1	Altamira Gualtallary	55,7 ± 6,0 a 58,7 ± 4,0 a	53,8 ± 7,6 a 60,2 ± 4,3 a	36,2 ± 3,7 a 66,3 ± 4,8 ab	0,0010	0,0050	0,0585
Galato de dímero de procianidina 2	Altamira Gualtallary	70,3 ± 3,0 a 67,5 ± 6,7 a	78,6 ± 4,7 a 63,4 ± 4,5 a	77,0 ± 5,2 a 57,9 ± 2,8 a	0,0042	0,1213	0,3605
Galato de trímero de procianidina 1	Altamira Gualtallary	61,9 ± 4,1 a 70,9 ± 5,1 a	68,4 ± 3,7 a 67,0 ± 4,2 a	63,7 ± 5,4 a 62,7 ± 5,2 a	0,8387	0,6711	0,3418
Galato de trímero de procianidina 2	Altamira Gualtallary	161,1 ± 2,0 a 143,0 ± 13,9 a	167,2 ± 4,5 a 168,1 ± 18,7 a	162,2 ± 2,3 a 138,4 ± 9,0 a	0,1482	0,0048	0,8082
<b>Compuestos fenólicos totales</b>	Altamira Gualtallary	3814,0 ± 154,5 a 3972,5 ± 309,7 ab	4342,4 ± 167,1 a 4179,8 ± 397,7 b	3563,1 ± 202,6 a 3164,5 ± 146,6 a	0,8271	0,0124	0,3049

<sup>a</sup> Media (mg/kg de semillas) ± error estándar (*n* = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey/HSD, *p* < 0,05). <sup>b</sup> Considerado significativo cuando *p* value < 0,05. <sup>c</sup> Efecto de interacción entre "zona y tratamiento". nd, no detectado. Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en verano; T3, raleo tardío.

### 3.3. Composición fenólica de los vinos

En el siguiente apartado se procedió a analizar la influencia del raleo de racimos sobre los parámetros químicos globales y la composición fenólica de vinos Malbec elaborados con uvas provenientes de las dos zonas de estudio (Altamira y Gualtallary), durante la vendimia 2009. Se realizó la evaluación y comparación de los tratamientos C, T1, T2 y T3 en vinos terminados, después de 3 meses de almacenamiento en botella, y se determinó la incidencia del factor “zona” sobre la composición fenólica de los mismos.

#### 3.3.1. Parámetros analíticos generales

Los resultados correspondientes a los parámetros químicos globales determinados en las muestras analizadas se presentan en la **Tabla 12**. Para cada zona evaluada, los niveles de alcohol obtenidos en los vinos provenientes de los diferentes tratamientos no presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), sin embargo mostraron un leve aumento con la aplicación de T1 y T2. Esta uniformidad observada facilita la comparación de los resultados entre los vinos, ya que la concentración de alcohol (principalmente etanol) influye notablemente sobre la extracción de los compuestos fenólicos. Con respecto a la acidez titulable y al pH, sólo en Altamira los vinos provenientes de T1 mostraron valores significativamente superiores de pH ( $p < 0,05$ ) e inferiores de acidez ( $p > 0,05$ ) en comparación con los vinos control. Por su parte, los vinos de Gualtallary revelaron una tendencia similar pero sin significancia estadística. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas en uvas, y podrían ser explicados por el contenido superior de sólidos solubles y los mayores valores de pH obtenidos en las muestras con CT (**Tabla 4**). Al realizar un análisis comparativo entre los vinos de ambas zonas (**Tabla 12**), no se encontraron diferencias significativas entre los mismos para ninguno de los parámetros descriptos ( $p > 0,05$ ).

Con respecto a los parámetros fenólicos generales, los tratamientos de CT realizados en ambas zonas no incidieron significativamente en ninguno de los grupos cuantificados. Sin embargo, los vinos provenientes de los tratamientos T1 y T2 mostraron valores ligeramente superiores de antocianos totales, libres y combinados, proantocianidinas totales, flavanoles DMACH y fenoles totales en comparación con el resto de los tratamientos ( $p > 0,05$ ; **Tabla 12**). Esta tendencia observada con la aplicación de raleos tempranos, concuerda con los datos obtenidos en hollejos y semillas (**Tabla 6**) y revela la efectividad conseguida en la extracción de estos compuestos durante la vinificación. Resultados similares fueron obtenidos por diversos autores en vinos españoles de otras variedades tintas (Valdés et al., 2009; Diago et al., 2010; Intrigliolo y Castel, 2011).

**Tabla 12.** Parámetros analíticos generales de vinos Malbec de Altamira y Guatallary (2009).

Parámetro	Tratamiento			Factor			
	C	T1	T2	T3	zona	tratamiento	zona x tratamiento <sup>b</sup>
					<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Acidez titulable (ácido tartárico, g/L)	6,4 ± 0,2 <sup>a</sup> 6,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,1 <sup>a</sup> 6,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,2 <sup>a</sup> 6,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,1 <sup>a</sup> 6,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,0644	0,4609	0,886
pH	3,55 ± 0,01 <sup>a</sup> 3,51 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,66 ± 0,02 <sup>b</sup> 3,62 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,59 ± 0,01 <sup>ab</sup> 3,61 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,58 ± 0,03 <sup>ab</sup> 3,53 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,0637	0,0007	0,3359
Alcohol (% v/v)	15,7 ± 0,4 <sup>a</sup> 15,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	16,6 ± 0,1 <sup>a</sup> 15,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	16,1 ± 0,2 <sup>a</sup> 15,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	15,8 ± 0,1 <sup>a</sup> 15,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,1089	0,2007	0,4458
AT (Mv3gl, mg/L)	900,7 ± 65,5 <sup>a</sup> 998,0 ± 105,1 <sup>a</sup>	975,9 ± 26,1 <sup>a</sup> 1093,1 ± 100,4 <sup>a</sup>	969,2 ± 25,5 <sup>a</sup> 159,5 ± 42,1 <sup>a</sup>	887,4 ± 19,1 <sup>a</sup> 927,2 ± 103,4 <sup>a</sup>	0,0401	0,1333	0,7620
AL (Mv3gl, mg/L)	505,1 ± 49,6 <sup>a</sup> 575,4 ± 52,3 <sup>a</sup>	473,8 ± 35,0 <sup>a</sup> 608,4 ± 60,7 <sup>a</sup>	516,3 ± 15,9 <sup>a</sup> 636,2 ± 53,5 <sup>a</sup>	485,1 ± 17,1 <sup>a</sup> 540,7 ± 51,9 <sup>a</sup>	0,0087	0,5850	0,7844
AC (Mv3gl, mg/L)	395,6 ± 16,3 <sup>a</sup> 422,6 ± 52,9 <sup>a</sup>	502,1 ± 33,8 <sup>b</sup> 484,7 ± 39,7 <sup>a</sup>	452,9 ± 9,9 <sup>ab</sup> 523,3 ± 51,7 <sup>a</sup>	402,3 ± 11,8 <sup>a</sup> 386,6 ± 51,5 <sup>a</sup>	0,5557	0,0320	0,6180
IC (A420nm+A520nm-A620nm)*10	26,8 ± 3,9 <sup>a</sup> 28,4 ± 3,6 <sup>a</sup>	30,7 ± 1,3 <sup>a</sup> 32,5 ± 4,3 <sup>a</sup>	29,1 ± 2,1 <sup>a</sup> 36,0 ± 1,5 <sup>a</sup>	24,5 ± 0,3 <sup>a</sup> 26,3 ± 3,7 <sup>a</sup>	0,1657	0,0880	0,7673
% de color amarillo	27,8 ± 0,3 <sup>a</sup> 27,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	28,3 ± 0,3 <sup>a</sup> 27,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	28,1 ± 0,1 <sup>a</sup> 26,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	28,3 ± 0,4 <sup>a</sup> 28,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,0024	0,0501	0,3730
% de color rojo	61,1 ± 0,2 <sup>a</sup> 62,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	59,4 ± 0,5 <sup>a</sup> 61,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	60,3 ± 0,2 <sup>a</sup> 62,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	60,2 ± 0,7 <sup>a</sup> 60,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,0005	0,0130	0,6076
% de color azul	11,1 ± 0,1 <sup>a</sup> 10,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	12,3 ± 0,2 <sup>b</sup> 11,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	11,6 ± 0,1 <sup>ab</sup> 11,1 ± 0,3 <sup>ab</sup>	11,5 ± 0,3 <sup>ab</sup> 11,1 ± 0,1 <sup>ab</sup>	0,0005	0,0006	0,7529
<i>L</i> *	27,1 ± 3,6 <sup>a</sup> 26,6 ± 2,6 <sup>a</sup>	21,5 ± 0,4 <sup>a</sup> 21,8 ± 3,4 <sup>a</sup>	23,9 ± 2,0 <sup>a</sup> 19,7 ± 1,5 <sup>a</sup>	27,9 ± 0,7 <sup>a</sup> 27,5 ± 3,6 <sup>a</sup>	0,5271	0,0489	0,8033
<i>C</i> *	59,6 ± 12 <sup>a</sup> 61,0 ± 11 <sup>a</sup>	55,7 ± 0,4 <sup>a</sup> 56,2 ± 2,1 <sup>a</sup>	57,9 ± 12 <sup>a</sup> 55,8 ± 2,0 <sup>a</sup>	59,8 ± 0,8 <sup>a</sup> 59,8 ± 12 <sup>a</sup>	0,9593	0,0125	0,6255
<i>h</i>	18,3 ± 3,3 <sup>a</sup> 21,4 ± 2,1 <sup>a</sup>	19,6 ± 1,2 <sup>a</sup> 20,3 ± 1,7 <sup>a</sup>	19,8 ± 1,2 <sup>a</sup> 22,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	16,8 ± 0,1 <sup>a</sup> 19,2 ± 2,9 <sup>a</sup>	0,1132	0,4392	0,9173
<i>a</i> *	56,5 ± 2,1 <sup>a</sup> 56,8 ± 1,8 <sup>a</sup>	52,4 ± 0,1 <sup>a</sup> 52,7 ± 2,5 <sup>a</sup>	54,5 ± 1,6 <sup>a</sup> 51,3 ± 1,4 <sup>a</sup>	57,2 ± 0,8 <sup>a</sup> 56,4 ± 1,9 <sup>a</sup>	0,4835	0,0350	0,7128
<i>b</i> *	22,1 ± 1,6 <sup>a</sup> 26,1 ± 1,8 <sup>a</sup>	18,7 ± 1,2 <sup>a</sup> 19,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	19,6 ± 0,8 <sup>a</sup> 21,8 ± 1,9 <sup>a</sup>	17,3 ± 0,2 <sup>a</sup> 19,6 ± 2,6 <sup>a</sup>	0,1023	0,5588	0,8720
CC (%)	22,7 ± 1,0 <sup>a</sup> 30,3 ± 3,5 <sup>a</sup>	25,0 ± 1,0 <sup>a</sup> 35,1 ± 2,6 <sup>a</sup>	27,7 ± 0,9 <sup>a</sup> 23,2 ± 3,0 <sup>a</sup>	25,9 ± 0,9 <sup>a</sup> 27,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,0607	0,1841	0,0214
CP (%)	20,1 ± 0,5 <sup>a</sup> 3541,2 ± 297,1 <sup>a</sup>	20,0 ± 0,5 <sup>a</sup> 3698,4 ± 282,3 <sup>a</sup>	20,7 ± 0,5 <sup>a</sup> 3911,9 ± 171,6 <sup>a</sup>	20,3 ± 0,3 <sup>a</sup> 3424,4 ± 316 <sup>a</sup>	<0,0001	0,4994	0,3664
FT (EAG, mg/L)	309,1 ± 250,3 <sup>a</sup> 4285,9 ± 398,3 <sup>a</sup>	3989,8 ± 615 <sup>a</sup> 4902,1 ± 711 <sup>a</sup>	3774,9 ± 463 <sup>a</sup> 4335,2 ± 58,8 <sup>a</sup>	3092,7 ± 392,7 <sup>a</sup> 4168,8 ± 203,7 <sup>a</sup>	0,1483	0,0266	0,5641
PA (Cat, mg/L)	3983,9 ± 450,4 <sup>a</sup> 1,5 × 10 <sup>-2</sup> ± 1,3 × 10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	4538,5 ± 178,8 <sup>a</sup> 1,7 × 10 <sup>-2</sup> ± 8,5 × 10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	4396,8 ± 208,3 <sup>a</sup> 1,7 × 10 <sup>-2</sup> ± 7,3 × 10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	3201,3 ± 446,8 <sup>a</sup> 1,3 × 10 <sup>-2</sup> ± 3,4 × 10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup>	0,2880	0,2593	0,7854
FL (Cat, mol/L)	1,5 × 10 <sup>-2</sup> ± 1,7 × 10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup> 85,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	1,7 × 10 <sup>-2</sup> ± 2,5 × 10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup> 85,3 ± 1,4 <sup>a</sup>	1,7 × 10 <sup>-2</sup> ± 7,4 × 10 <sup>-4</sup> <sup>a</sup> 87,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	1,3 × 10 <sup>-2</sup> ± 1,3 × 10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup> 89,2 ± 3,7 <sup>a</sup>	0,1033	0,1426	0,8750
IG (%)	87,3 ± 2,2 <sup>a</sup> 88,0 ± 1,8 <sup>a</sup>	88,0 ± 1,8 <sup>a</sup> 88,0 ± 1,8 <sup>a</sup>	87,4 ± 0,9 <sup>a</sup> 87,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	84,5 ± 3,2 <sup>a</sup> 84,5 ± 3,2 <sup>a</sup>	0,6120	0,9296	0,2328

\* Media ± error estándar (n = 3). AT, antocianos totales; AL, antocianos libres; AC, antocianos combinados; IC, intensidad colorante; *L*\*, claridad; *C*\*, saturación; *h*\*, tonalidad; *a*\*, rojo-verde; *b*\*, amarillo-azul; CC, color copigmentado; CP, color debido a pigmentos poliméricos; FT, fenoles totales; PA, proantocianidinas totales; FL, flavanoles DMACH; IG, índice de gelatina. Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD, *p* < 0,05). <sup>a</sup> Considerado significativo cuando *p* <sub>valor</sub> < 0,05. <sup>b</sup> Efecto de interacción entre "zona x tratamiento". Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en verano; T3, raleo tardío.

Al analizar los parámetros de color en los vinos de las dos zonas estudiadas, si bien no existieron diferencias significativas en la IC, se observaron niveles levemente superiores con la aplicación de T1 y T2, acompañados por un menor valor de  $L^*$ ,  $a^*$  y % de color rojo, y un mayor % de color azul, indicando un color más intenso, debido principalmente a la componente azul, en comparación con los vinos control ( $p > 0,05$ ). Paralelamente, se calculó la diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) entre los vinos provenientes de los distintos tratamientos (**Tabla 13**). Este parámetro resulta de gran interés para la industria vitivinícola ya que expresa la capacidad del ojo humano para discriminar dos vinos a través del color. Pérez-Magariño y González-Sanjósé (2003) establecieron que los catadores serían capaces de distinguir el color de dos vinos a través de una copa sólo si  $\Delta E^* \geq 5$  unidades. En el presente estudio, los valores de  $\Delta E^*$  fueron similares entre todos los tratamientos ( $p > 0,05$ ) y superiores a 5 unidades, a excepción de la diferencia entre T1 y T2 para los vinos de ambas zonas y entre C y T3 para los vinos de Gualtallary, indicando la posibilidad de distinción de los mismos a pesar de su similitud analítica en la intensidad colorante.

**Tabla 13.** Diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) entre vinos Malbec de Altamira y Gualtallary (2009).

Zona	Tratamiento	C	T1	T2	T3
Altamira	C		7,8 ± 4,1	6,0 ± 1,8	7,7 ± 2,1
	T1	7,8 ± 4,1		4,6 ± 1,7	8,2 ± 1,5
	T2	6,0 ± 1,8	4,6 ± 1,7		5,9 ± 2,3
	T3	7,7 ± 2,1	8,2 ± 1,5	5,9 ± 2,3	
Gualtallary	C		7,5 ± 3,2	10,2 ± 1,2	4,0 ± 1,6
	T1	7,5 ± 3,2		4,8 ± 3,0	7,4 ± 2,1
	T2	10,2 ± 1,2	4,8 ± 3,0		11,1 ± 3,0
	T3	4,0 ± 1,6	7,4 ± 2,1	11,1 ± 3,0	

Todos los datos están expresados como la media ± error estándar ( $n = 3$ ).

Finalmente, considerando la contribución del color copigmentado (CC) y del color polimérico (CP) al color total del vino, los tratamientos de CT no modificaron estos parámetros, indicando hasta el momento (vinos con 3 meses de estiba en botella) una estabilidad de color similar en comparación con los vinos control. La situación descrita podría cambiar durante el almacenamiento en botella, si el contenido levemente superior de compuestos fenólicos de los vinos provenientes del raleo favoreciera con el tiempo las reacciones de condensación y/o polimerización de los pigmentos antocianícos descritos por Monagas y Bartolomé (2009).

La **Tabla 12** muestra paralelamente los datos agrupados de los vinos de ambas zonas, donde se aplicó un ANOVA multifactorial empleando “zona y tratamiento” como factores. A partir de este análisis se observó un efecto significativo del factor “zona” sólo sobre el contenido de antocianos

libres y totales, y sobre las proporciones de las componentes amarilla, roja y azul del color. Las muestras de Gualtallary mostraron concentraciones superiores de antocianos respecto a Altamira, coincidiendo con las observaciones realizadas en hollejos (**Tablas 6 y 7**). Al comparar las componentes del color, los vinos de Gualtallary presentaron una proporción significativamente superior de color rojo, mientras que los vinos de Altamira se caracterizaron por un mayor porcentaje de las componentes amarilla y azul ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.2. Perfil de antocianinas individuales

Al analizar el perfil antociánico de los vinos después de 3 meses de estiba en botella (**Tabla 14**), se observó un patrón similar al obtenido en los vinos Malbec estudiados en los Capítulos I-V, representado por una mayor proporción de derivados glucosilados (67,9% en Altamira y 68,9% en Gualtallary) seguido por los acetil-glucósidos (18,6% en Altamira y 18,5% en Gualtallary), cinamil-glucósidos (7,1% en Altamira y 6,3% en Gualtallary) y piranoantocianinas (6,4% en Altamira y 6,3% en Gualtallary).

Coincidente con la tendencia observada en hollejos (**Tablas 6 y 8**), y en la determinación espectrofotométrica de antocianos realizada en vinos (**Tabla 12**), se observaron diferencias cuantitativas significativas entre los tratamientos evaluados ( $p < 0,05$ ) para gran parte de las antocianinas identificadas. Con respecto a los derivados glucosilados, los vinos de Gualtallary provenientes de T1 y T2 mostraron un aumento significativo del 24,0% y 21,7% respectivamente, comparados con C. Este efecto fue observado principalmente en el contenido de malvidina-3-glucósido, sin apreciarse diferencias significativas en el resto de los compuestos. En el caso de Altamira, los vinos con CT presentaron una tendencia similar pero no significativa en comparación con el control.

Al analizar los derivados acetilados en los vinos de Gualtallary, T1 y T2 mostraron un efecto significativo semejante respecto de C con un incremento del 28,2% y 25,8% respectivamente, debido principalmente a la modificación en la concentración de cianidina-3-(6"-acetil)glucósido, peonidina-3-(6"-acetil)glucósido y malvidina-3-(6"-acetil)glucósido. Por su parte, los vinos de Altamira revelaron un comportamiento similar con la aplicación de los raleos tempranos, sin apreciarse diferencias significativas en el contenido total.

En cuanto a las antocianinas cinamiladas, los tratamientos de CT modificaron significativamente esta fracción en las dos zonas estudiadas. En Gualtallary, los vinos obtenidos a partir de T1 y T2 presentaron un aumento del 26,4% y 29,5% respectivamente, en comparación con los vinos control; mientras que en Altamira, dicho incremento fue del 25,4% (T1) y 17,4% (T2).



Compuesto	Tratamiento			Factor		
	C			zona	tratamiento	
	T1	T2	T3	zona	tratamiento	
					p <sub>value</sub> <sup>a</sup>	
Delfinidina-3-glucósido	Altamira	35,4 ± 5,2 <sup>a</sup>	41,2 ± 2,7 a	38,3 ± 3,0 a	30,8 ± 1,1 a	0,4564
	Guaitallary	41,8 ± 6,0 a	60,2 ± 8,0 a	58,8 ± 4,2 a	40,5 ± 7,1 a	
Cianidina-3-glucósido	Altamira	5,0 ± 0,6 a	5,8 ± 0,1 a	5,5 ± 0,4 a	4,5 ± 0,1 a	0,4040
	Guaitallary	5,1 ± 0,5 a	7,7 ± 0,7 a	7,2 ± 0,5 a	5,9 ± 1,0 a	
Petunidina-3-glucósido	Altamira	58,3 ± 6,6 a	65,6 ± 2,7 a	62,3 ± 3,6 a	52,3 ± 1,7 a	0,3833
	Guaitallary	62,6 ± 5,9 a	85,2 ± 7,6 a	84,5 ± 4,1 a	63,7 ± 8,2 a	
Peonidina-3-glucósido	Altamira	31,9 ± 2,2 a	32,1 ± 1,0 a	31,5 ± 1,1 a	27,4 ± 0,6 a	0,0613
	Guaitallary	34,3 ± 1,6 a	46,5 ± 2,4 a	44,2 ± 3,3 a	40,5 ± 3,8 a	
Malvidina-3-glucósido	Altamira	254,4 ± 4,1 b	244,3 ± 3,1 b	243,1 ± 1,5 b	229,2 ± 1,9 a	0,0005
	Guaitallary	236,7 ± 4,4 a	272,3 ± 9,6 b	268,2 ± 3,0 b	253,2 ± 5,6 ab	
<b>Antocianinas glucosiladas</b>	Altamira	385,0 ± 18,0 a (69,7)	389,0 ± 8,3 a (66,5)	380,7 ± 9,3 a (67,3)	344,2 ± 5,3 a (68,1)	0,0011
	Guaitallary	380,5 ± 10,5 a (69,7)	471,9 ± 15,0 b (68,9)	462,9 ± 13,5 b (68,5)	403,8 ± 20,4 ab (68,7)	
Delfinidina-3-(6"-acetil)glucósido	Altamira	8,4 ± 1,1 a	14,3 ± 0,3 b	13,3 ± 0,9 b	9,0 ± 1,0 a	0,9838
	Guaitallary	12,1 ± 1,1 a	17,8 ± 1,6 a	17,1 ± 1,1 a	11,9 ± 2,2 a	
Cianidina-3-(6"-acetil)glucósido	Altamira	4,7 ± 0,6 a	6,1 ± 0,1 a	5,3 ± 0,5 a	4,4 ± 0,2 a	0,3834
	Guaitallary	4,7 ± 0,1 a	6,2 ± 0,4 ab	6,6 ± 0,4 b	5,2 ± 0,5 ab	
Petunidina-3-(6"-acetil)glucósido	Altamira	21,1 ± 3,5 a	21,6 ± 0,5 a	20,0 ± 1,4 a	19,5 ± 3,0 a	0,2357
	Guaitallary	18,1 ± 1,2 a	25,2 ± 1,8 a	25,1 ± 1,1 a	19,6 ± 2,0 a	
Peonidina-3-(6"-acetil)glucósido	Altamira	13,8 ± 1,1 ab	15,3 ± 0,4 b	14,4 ± 0,7 ab	12,1 ± 0,4 a	0,1350
	Guaitallary	13,5 ± 0,6 a	18,6 ± 1,3 b	18,3 ± 1,0 b	15,1 ± 1,2 ab	
Malvidina-3-(6"-acetil)glucósido	Altamira	52,0 ± 1,6 ab	53,6 ± 0,7 b	53,1 ± 0,3 ab	49,1 ± 0,1 a	0,0416
	Guaitallary	51,5 ± 1,1 a	60,3 ± 2,6 b	58,6 ± 1,3 ab	56,1 ± 1,1 ab	
<b>Antocianinas acetiladas</b>	Altamira	100,0 ± 6,7 a (18,1)	110,9 ± 1,4 a (19,0)	106,1 ± 3,6 a (18,8)	94,1 ± 3,9 a (18,6)	0,1230
	Guaitallary	99,9 ± 2,2 a (18,3)	128,1 ± 4,2 b (18,7)	125,7 ± 3,8 b (18,6)	107,9 ± 4,9 a (18,4)	

\* Media (mg/L) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD, p < 0,05).<sup>a</sup> Considerado significativo cuando p<sub>value</sub> < 0,05. <sup>b</sup> Efecto de interacción entre "zona y tratamiento". Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre derivados antocianínicos por acilación y antocianinas totales. Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en verano; T3, raleo tardío.

Compuesto		Tratamiento						Factor			
		C		T1		T2		T3		zona x tratamiento <sup>b</sup>	
		P <sub>value</sub> <sup>a</sup>		P <sub>value</sub> <sup>a</sup>		P <sub>value</sub> <sup>a</sup>		P <sub>value</sub> <sup>a</sup>		P <sub>value</sub> <sup>a</sup>	
Alamira	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Guatallary	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Delfindina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	0,6 ± 0,1 a	0,8 ± 0,1 a	0,7 ± 0,1 a	0,7 ± 0,1 a	0,7 ± 0,1 a	0,7 ± 0,1 a	0,6 ± 0,1 a	0,6 ± 0,1 a	0,0248	0,5273	0,5273
Alamira	0,7 ± 0,1 a	1,0 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a			
Guatallary	0,7 ± 0,1 a	1,0 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a	0,9 ± 0,1 a			
Cianidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	1,4 ± 0,1 a	1,6 ± 0,1 a	1,6 ± 0,1 a	1,6 ± 0,1 a	1,6 ± 0,1 a	1,6 ± 0,1 a	1,5 ± 0,1 a	1,5 ± 0,1 a	0,0003	0,1929	0,1929
Alamira	1,6 ± 0,1 a	2,0 ± 0,2 a	1,7 ± 0,1 a	1,7 ± 0,1 a	1,7 ± 0,1 a	1,7 ± 0,1 a	2,1 ± 0,1 a	2,1 ± 0,1 a			
Guatallary	1,6 ± 0,1 a	2,0 ± 0,2 a	1,7 ± 0,1 a	1,7 ± 0,1 a	1,7 ± 0,1 a	1,7 ± 0,1 a	2,1 ± 0,1 a	2,1 ± 0,1 a			
Malvidina-3-(6"-cafeil)glucósido	4,7 ± 0,5 a	5,1 ± 0,3 a	5,0 ± 0,2 a	5,0 ± 0,2 a	5,0 ± 0,2 a	5,0 ± 0,2 a	4,3 ± 0,3 a	4,3 ± 0,3 a	0,2053	0,2214	0,2214
Alamira	4,3 ± 0,3 ab	5,8 ± 0,5 ab	6,0 ± 0,2 b	6,0 ± 0,2 b	6,0 ± 0,2 b	6,0 ± 0,2 b	4,2 ± 0,4 a	4,2 ± 0,4 a			
Guatallary	4,3 ± 0,3 ab	5,8 ± 0,5 ab	6,0 ± 0,2 b	6,0 ± 0,2 b	6,0 ± 0,2 b	6,0 ± 0,2 b	4,2 ± 0,4 a	4,2 ± 0,4 a			
Petunidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	4,4 ± 0,4 a	6,7 ± 0,1 b	5,9 ± 0,5 ab	5,9 ± 0,5 ab	5,9 ± 0,5 ab	5,9 ± 0,5 ab	5,2 ± 0,2 ab	5,2 ± 0,2 ab	0,0168	0,39	0,39
Alamira	4,4 ± 0,4 a	6,8 ± 0,3 a	6,8 ± 0,6 a	6,8 ± 0,6 a	6,8 ± 0,6 a	6,8 ± 0,6 a	7,1 ± 0,6 a	7,1 ± 0,6 a			
Guatallary	5,3 ± 0,7 a	6,8 ± 0,3 a	6,8 ± 0,6 a	6,8 ± 0,6 a	6,8 ± 0,6 a	6,8 ± 0,6 a	7,1 ± 0,6 a	7,1 ± 0,6 a			
Peonidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	1,9 ± 0,1 a	1,6 ± 0,1 a	1,8 ± 0,1 a	1,8 ± 0,1 a	1,8 ± 0,1 a	1,8 ± 0,1 a	1,8 ± 0,1 a	1,8 ± 0,1 a	0,2537	0,0589	0,0589
Alamira	1,1 ± 0,1 a	1,3 ± 0,2 a	1,1 ± 0,1 a	1,1 ± 0,1 a	1,1 ± 0,1 a	1,1 ± 0,1 a	1,5 ± 0,1 a	1,5 ± 0,1 a			
Guatallary	1,1 ± 0,1 a	1,3 ± 0,2 a	1,1 ± 0,1 a	1,1 ± 0,1 a	1,1 ± 0,1 a	1,1 ± 0,1 a	1,5 ± 0,1 a	1,5 ± 0,1 a			
Malvidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido <i>cis</i>	22,0 ± 1,6 a	28,2 ± 0,6 b	26,1 ± 1,2 ab	26,1 ± 1,2 ab	26,1 ± 1,2 ab	26,1 ± 1,2 ab	22,6 ± 0,2 a	22,6 ± 0,2 a	0,1312	0,2427	0,2427
Alamira	19,9 ± 1,0 a	24,7 ± 0,9 ab	26,1 ± 1,2 ab	26,1 ± 1,2 ab	26,1 ± 1,2 ab	26,1 ± 1,2 ab	23,2 ± 1,2 ab	23,2 ± 1,2 ab			
Guatallary	19,9 ± 1,0 a	24,7 ± 0,9 ab	26,1 ± 1,2 ab	26,1 ± 1,2 ab	26,1 ± 1,2 ab	26,1 ± 1,2 ab	23,2 ± 1,2 ab	23,2 ± 1,2 ab			
Malvidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido <i>trans</i>	33,6 ± 2,5 a (6,1)	42,3 ± 1,1 b (7,2)	39,5 ± 1,9 ab (7,0)	39,5 ± 1,9 ab (7,0)	39,5 ± 1,9 ab (7,0)	39,5 ± 1,9 ab (7,0)	34,5 ± 0,3 a (6,8)	34,5 ± 0,3 a (6,8)	0,8087	0,3965	0,3965
Alamira	31,3 ± 2,0 a (5,7)	39,6 ± 1,3 ab (5,8)	40,9 ± 2,1 b (6,1)	40,9 ± 2,1 b (6,1)	40,9 ± 2,1 b (6,1)	40,9 ± 2,1 b (6,1)	36,9 ± 2,0 ab (6,3)	36,9 ± 2,0 ab (6,3)			
Guatallary	31,3 ± 2,0 a (5,7)	39,6 ± 1,3 ab (5,8)	40,9 ± 2,1 b (6,1)	40,9 ± 2,1 b (6,1)	40,9 ± 2,1 b (6,1)	40,9 ± 2,1 b (6,1)	36,9 ± 2,0 ab (6,3)	36,9 ± 2,0 ab (6,3)			
<b>Antocianinas cumariladas</b>	35,0 ± 2,5 a (6,3)	43,9 ± 1,3 b (7,5)	41,1 ± 2,0 ab (7,3)	41,1 ± 2,0 ab (7,3)	41,1 ± 2,0 ab (7,3)	41,1 ± 2,0 ab (7,3)	36,0 ± 0,2 a (7,1)	36,0 ± 0,2 a (7,1)	0,9689	0,3812	0,3812
Alamira	32,9 ± 1,9 a (6,0)	41,6 ± 1,3 b (6,1)	42,6 ± 2,1 b (6,3)	42,6 ± 2,1 b (6,3)	42,6 ± 2,1 b (6,3)	42,6 ± 2,1 b (6,3)	39,0 ± 2,0 ab (6,6)	39,0 ± 2,0 ab (6,6)			
Guatallary	32,9 ± 1,9 a (6,0)	41,6 ± 1,3 b (6,1)	42,6 ± 2,1 b (6,3)	42,6 ± 2,1 b (6,3)	42,6 ± 2,1 b (6,3)	42,6 ± 2,1 b (6,3)	39,0 ± 2,0 ab (6,6)	39,0 ± 2,0 ab (6,6)			
<b>Antocianinas cinamiladas</b>	11,2 ± 1,3 a	13,8 ± 0,6 a	12,5 ± 0,9 a	12,5 ± 0,9 a	12,5 ± 0,9 a	12,5 ± 0,9 a	10,5 ± 0,4 a	10,5 ± 0,4 a	0,0177	0,3443	0,3443
Alamira	11,7 ± 0,3 a	14,5 ± 0,9 ab	15,9 ± 1,0 b	15,9 ± 1,0 b	15,9 ± 1,0 b	15,9 ± 1,0 b	12,4 ± 1,2 ab	12,4 ± 1,2 ab			
Guatallary	11,7 ± 0,3 a	14,5 ± 0,9 ab	15,9 ± 1,0 b	15,9 ± 1,0 b	15,9 ± 1,0 b	15,9 ± 1,0 b	12,4 ± 1,2 ab	12,4 ± 1,2 ab			
Vitisina B	9,4 ± 0,8 a	13,7 ± 0,2 b	12,9 ± 1,1 b	12,9 ± 1,1 b	12,9 ± 1,1 b	12,9 ± 1,1 b	10,7 ± 0,2 a	10,7 ± 0,2 a	0,0231	0,7849	0,7849
Alamira	10,5 ± 0,3 a	14,1 ± 0,4 b	14,3 ± 0,5 b	14,3 ± 0,5 b	14,3 ± 0,5 b	14,3 ± 0,5 b	12,3 ± 0,9 ab	12,3 ± 0,9 ab			
Guatallary	10,5 ± 0,3 a	14,1 ± 0,4 b	14,3 ± 0,5 b	14,3 ± 0,5 b	14,3 ± 0,5 b	14,3 ± 0,5 b	12,3 ± 0,9 ab	12,3 ± 0,9 ab			
Peonidina-3-glucósido piruvato	4,1 ± 0,5 a	4,5 ± 0,1 a	4,2 ± 0,4 a	4,2 ± 0,4 a	4,2 ± 0,4 a	4,2 ± 0,4 a	3,4 ± 0,1 a	3,4 ± 0,1 a	0,0923	0,194	0,194
Alamira	3,6 ± 0,1 a	5,0 ± 0,3 b	4,9 ± 0,3 ab	4,9 ± 0,3 ab	4,9 ± 0,3 ab	4,9 ± 0,3 ab	4,1 ± 0,4 ab	4,1 ± 0,4 ab			
Guatallary	3,6 ± 0,1 a	5,0 ± 0,3 b	4,9 ± 0,3 ab	4,9 ± 0,3 ab	4,9 ± 0,3 ab	4,9 ± 0,3 ab	4,1 ± 0,4 ab	4,1 ± 0,4 ab			
Malvidina-3-glucósido-etil-epicatequina	7,6 ± 0,9 a	8,9 ± 0,2 a	8,3 ± 0,7 a	8,3 ± 0,7 a	8,3 ± 0,7 a	8,3 ± 0,7 a	6,9 ± 0,1 a	6,9 ± 0,1 a	0,1714	0,2812	0,2812
Alamira	6,8 ± 0,3 a	9,7 ± 0,5 b	9,5 ± 0,5 b	9,5 ± 0,5 b	9,5 ± 0,5 b	9,5 ± 0,5 b	7,9 ± 0,7 ab	7,9 ± 0,7 ab			
Guatallary	6,8 ± 0,3 a	9,7 ± 0,5 b	9,5 ± 0,5 b	9,5 ± 0,5 b	9,5 ± 0,5 b	9,5 ± 0,5 b	7,9 ± 0,7 ab	7,9 ± 0,7 ab			
<b>Piranoantocianinas</b>	32,3 ± 3,0 a (5,8)	40,9 ± 0,8 a (7,0)	37,9 ± 3,0 a (6,7)	37,9 ± 3,0 a (6,7)	37,9 ± 3,0 a (6,7)	37,9 ± 3,0 a (6,7)	31,5 ± 0,8 a (6,2)	31,5 ± 0,8 a (6,2)	0,0310	0,4834	0,4834
Alamira	32,6 ± 1,1 a (6,0)	43,3 ± 2,0 b (6,3)	44,6 ± 2,0 b (6,6)	44,6 ± 2,0 b (6,6)	44,6 ± 2,0 b (6,6)	44,6 ± 2,0 b (6,6)	36,7 ± 3,2 ab (6,3)	36,7 ± 3,2 ab (6,3)			
Guatallary	32,6 ± 1,1 a (6,0)	43,3 ± 2,0 b (6,3)	44,6 ± 2,0 b (6,6)	44,6 ± 2,0 b (6,6)	44,6 ± 2,0 b (6,6)	44,6 ± 2,0 b (6,6)	36,7 ± 3,2 ab (6,3)	36,7 ± 3,2 ab (6,3)			
<b>Antocianinas totales</b>	552,3 ± 30,2 a	584,7 ± 11,6 a	565,8 ± 16,7 a	565,8 ± 16,7 a	565,8 ± 16,7 a	565,8 ± 16,7 a	505,8 ± 8,5 a	505,8 ± 8,5 a	0,0002	0,0005	0,0005
Alamira	545,9 ± 14,2 a	684,9 ± 21,0 b	675,8 ± 20,9 b	675,8 ± 20,9 b	675,8 ± 20,9 b	675,8 ± 20,9 b	587,4 ± 30,2 ab	587,4 ± 30,2 ab			
Guatallary	545,9 ± 14,2 a	684,9 ± 21,0 b	675,8 ± 20,9 b	675,8 ± 20,9 b	675,8 ± 20,9 b	675,8 ± 20,9 b	587,4 ± 30,2 ab	587,4 ± 30,2 ab			

\* Media (mg/L) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD, p < 0,05). <sup>a</sup> Considerado significativo cuando P<sub>value</sub> < 0,05. <sup>b</sup> Efecto de interacción entre "zona y tratamiento". Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre derivados antocianínicos por aclación y antocianinas totales. Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en invierno; T3, raleo tardío.

Con respecto al grupo de las piranoantocianinas, se identificaron cuatro compuestos. Los derivados piruvílicos (vitisina A y peonidina-3-glucósido piruvato) representaron alrededor del 45% de la totalidad de los pigmentos detectados, seguido por la vitisina B (media 33%), y en menor proporción por el aducto malvidina-3-glucósido-etil-epicatequina (media 22%). En concordancia con lo reportado por otros autores (Monagas et al., 2003a), se encontró que los vinos con elevados contenidos de estos compuestos presentaban mayores niveles de sus correspondientes precursores antociánicos (malvidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido). Nuevamente en Gualtallary, los tratamientos de CT modificaron positivamente (32,8% con T1 y 36,8% con T2) el nivel de los compuestos mencionados, en comparación con el tratamiento C ( $p < 0,05$ ); mientras que en Altamira, el incremento observado careció de significancia estadística ( $p > 0,05$ ).

Finalmente, al realizar un análisis comparativo entre los vinos de ambas zonas, se observaron diferencias cuantitativas significativas para gran parte de los compuestos evaluados (**Tabla 14**). Coincidiendo con los resultados obtenidos en hollejos (**Tabla 8**), los vinos de Gualtallary presentaron concentraciones superiores de todos los compuestos determinados, a excepción de los isómeros *cis* y *trans* de malvidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido cuyos niveles fueron mayores en los vinos de Altamira. En general, los niveles de concentración alcanzados en ambas zonas fueron menores a los cuantificados por espectrofotometría, debido a la capacidad de la técnica cromatográfica empleada de detectar sólo antocianos libres sin considerar la contribución de otros pigmentos (Canals et al., 2008).

En conclusión, se observó una mayor concentración de antocianinas en vinos provenientes de la zona de mayor altitud, coincidiendo con los resultados presentados en el Capítulo I. Conjuntamente, los niveles de antocianinas y el resto de los parámetros fenólicos evaluados revelan el gran potencial de Gualtallary para la producción de vinos Malbec con coloraciones intensas y estables en el tiempo, destinados a una crianza prolongada (vinos de guarda).

### 3.3.3. Perfil de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

La **Tabla 15** resume los resultados cuantitativos correspondientes a los compuestos fenólicos no-antociánicos determinados en vinos Malbec de Altamira y Gualtallary provenientes de los ensayos de raleo de racimos. En concordancia con las observaciones realizadas en los Capítulos I-V y con datos reportados por diversos autores en otras variedades tintas (Monagas et al., 2005d; Herмосín Gutiérrez et al., 2005; Hernández et al., 2006), el grupo de los flavonoides constituyó la fracción más abundante en las muestras analizadas (85,1% en Altamira y 82,5% en Gualtallary) comparada con los no-flavonoides (14,9% en Altamira y 17,5% en Gualtallary).

Tabla 15. Compuestos fenólicos de bajo peso molecular cuantificados en vinos Malbec de Altamira y Guaitallary (2009).

Compuesto	Tratamiento			T3	zona	tratamiento	zona x tratamiento <sup>b</sup>	P <sub>value</sub> <sup>a</sup>
	C	T1	T2					
Acido gálico	Altamira	8,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,9 ± 0,2 a	8,0 ± 0,5 a	0,7199	0,3412	0,0723	
	Guaitallary	9,2 ± 0,3 a	8,1 ± 0,6 a	7,5 ± 0,3 a				
Acido protocatequico	Altamira	0,83 ± 0,03 a	0,87 ± 0,03 a	0,87 ± 0,03 a	0,1334	0,9388	0,7780	
	Guaitallary	0,83 ± 0,12 a	0,80 ± 0,10 a	0,79 ± 0,09 a				
Acido siríngico	Altamira	4,3 ± 0,3 a	4,3 ± 0,1 a	4,1 ± 0,1 a	<0,0001	0,3296	0,4450	
	Guaitallary	3,2 ± 0,2 a	3,4 ± 0,1 a	3,0 ± 0,1 a				
Galato de melilo	Altamira	3,0 ± 0,3 a	3,0 ± 0,1 a	2,9 ± 0,1 a	<0,0001	0,5440	0,2439	
	Guaitallary	2,6 ± 0,2 a	2,2 ± 0,1 a	2,4 ± 0,1 a				
Galato de etilo	Altamira	7,8 ± 0,3 a	7,3 ± 0,9 a	8,0 ± 0,5 a	0,3437	0,7890	0,6208	
	Guaitallary	7,7 ± 0,4 a	7,4 ± 0,5 a	6,5 ± 0,5 a				
<b>Ácidos hidroxibenzoicos/derivados</b>								
Acido trans-caftárico	Altamira	23,9 ± 1,0 a (5,1)	23,4 ± 1,1 a (5,0)	23,9 ± 1,2 a (5,2)	0,0185	0,6250	0,3872	
	Guaitallary	23,5 ± 1,0 a (5,9)	21,1 ± 2,1 a (5,6)	22,1 ± 1,3 a (5,4)				
Acido trans-cutárico	Altamira	3,0 ± 0,4 a	2,5 ± 0,2 a	2,9 ± 0,3 a	0,0004	0,4277	0,0871	
	Guaitallary	1,5 ± 0,2 a	2,5 ± 0,3 a	2,0 ± 0,3 a				
Acido trans-fertárico	Altamira	2,4 ± 0,2 a	2,0 ± 0,1 a	2,4 ± 0,1 a	0,0209	0,7597	0,0827	
	Guaitallary	1,6 ± 0,2 a	2,2 ± 0,3 a	2,1 ± 0,4 a				
Acido trans-p-cumárico	Altamira	3,5 ± 0,4 a	3,7 ± 0,2 a	3,5 ± 0,2 a	<0,0001	0,9651	0,5060	
	Guaitallary	1,9 ± 0,1 a	1,7 ± 0,1 a	1,9 ± 0,1 a				
Acido trans- <i>p</i> -cumárico	Altamira	1,70 ± 0,06 a	1,93 ± 0,03 a	1,77 ± 0,03 a	<0,0001	0,2584	0,6439	
	Guaitallary	1,40 ± 0,10 a	1,43 ± 0,15 a	1,40 ± 0,06 a				
Acidos hidroxicinámicos/derivados	Altamira	1,23 ± 0,07 a	1,77 ± 0,09 b	1,43 ± 0,03 ab	0,4946	0,4065	0,1077	
	Guaitallary	1,50 ± 0,10 a	1,40 ± 0,10 a	1,67 ± 0,26 a				
Glucósido de trans-resveratrol	Altamira	11,8 ± 1,0 a (2,6)	11,9 ± 0,3 a (2,4)	11,8 ± 0,8 a (2,5)	<0,0001	0,5077	0,6701	
	Guaitallary	7,9 ± 0,4 a (2,0)	9,2 ± 0,9 a (2,4)	9,1 ± 0,8 a (2,2)				
Glucósido de cis-resveratrol	Altamira	4,4 ± 0,5 a	4,8 ± 0,3 a	4,3 ± 0,2 a	nd	0,2026	0,1052	
	Guaitallary	1,57 ± 0,09 a	1,50 ± 0,06 a	1,40 ± 0,06 a				
Estilbenos	Altamira	2,37 ± 0,09 a	3,17 ± 0,41 a	2,87 ± 0,20 a	<0,0001	0,0792	0,0970	
	Guaitallary	1,57 ± 0,09 a (0,3)	1,50 ± 0,06 a (0,3)	1,40 ± 0,06 a (0,3)				
Tirosol	Altamira	6,79 ± 0,52 a (1,7)	7,95 ± 0,16 a (2,1)	7,14 ± 0,38 a (1,8)	<0,0001	0,9040	0,0291	
	Guaitallary	20,3 ± 2,0 a	19,1 ± 1,1 a	19,8 ± 0,7 a				
Triptofol	Altamira	22,4 ± 1,7 a	23,1 ± 0,5 a	23,3 ± 2,4 a	0,9711	0,0251	0,2209	
	Guaitallary	12,7 ± 1,1 a	10,7 ± 0,3 a	12,3 ± 0,8 a				
Alcoholes fenólicos y no-fenólicos	Altamira	8,7 ± 0,5 ab	8,3 ± 0,1 a	8,9 ± 0,7 ab	<0,0001	0,7858	0,0971	
	Guaitallary	35,0 ± 3,0 a (7,5)	29,8 ± 1,2 a (6,0)	32,1 ± 1,1 a (6,9)				
No-flavonoides totales	Altamira	29,1 ± 1,7 a (7,3)	31,4 ± 0,4 a (8,3)	32,1 ± 2,7 a (7,9)	0,0532	0,8014	0,0798	
	Guaitallary	72,3 ± 2,1 a (15,5)	68,6 ± 0,8 a (13,9)	68,7 ± 1,0 a (14,6)				
* Media (mg/L) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD, p < 0,05). <sup>a</sup> Considerado significativo cuando p <sub>value</sub> < 0,05. <sup>b</sup> Efecto de interacción entre "zona y tratamiento". Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre grupos fenólicos y fenoles totales. nd, no detectado.								
Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en invierno; T3, raleo tardío.								

Compuesto	Tratamiento			Factor	
	C	T1	T2	zona	tratamiento
				zona	tratamiento
					$P_{value}^a$
(+)-Catequina	268 ± 2,7 a 319 ± 2,2 a	314 ± 17 a 304 ± 2,1 a	272 ± 14 a 291 ± 19 a	0,4246	0,1697
(-)-Epicatequina	4,7 ± 0,4 a 3,9 ± 0,5 a	4,7 ± 0,2 a 3,7 ± 0,6 a	4,4 ± 0,1 a 3,7 ± 0,1 a	0,0008	0,4355
Dímero de procianidina 1	17,4 ± 10 a 14,9 ± 14 a	18,4 ± 0,5 a 14,2 ± 2,0 a	16,4 ± 0,5 a 14,5 ± 0,6 a	0,0009	0,3137
Dímero de procianidina 2	44,2 ± 2,5 a 37,9 ± 18 a	47,8 ± 0,3 a 33,3 ± 11 a	45,7 ± 2,1 a 36,3 ± 0,8 a	<0,0001	0,9499
Trímero de procianidina 1	12,2 ± 0,4 a 14,8 ± 0,6 a	13,2 ± 0,5 a 14,1 ± 1,5 a	14,2 ± 1,0 a 14,1 ± 0,8 a	0,4543	0,9288
Trímero de procianidina 2	7,4 ± 0,4 a 6,2 ± 0,8 a	8,6 ± 0,5 a 7,0 ± 0,8 a	8,3 ± 0,4 a 8,5 ± 0,4 a	0,0355	0,0608
Trímero de procianidina 3	11,9 ± 0,3 a 9,9 ± 0,3 a	11,8 ± 0,3 a 9,9 ± 0,4 a	11,4 ± 0,2 a 9,9 ± 0,5 a	<0,0001	0,9019
<b>Flavonoles</b>	124,6 ± 6,6 a (26,8) 119,5 ± 4,0 a (30,0)	135,9 ± 2,7 a (27,5) 112,6 ± 6,4 a (29,8)	127,6 ± 1,9 a (27,2) 116,1 ± 3,6 a (28,6)	0,0004	0,5046
Miricetina-3-galactósido	9,0 ± 0,4 a 7,4 ± 0,7 a	9,8 ± 0,3 a 7,0 ± 0,8 a	9,0 ± 0,2 a 7,4 ± 0,6 a	<0,0001	0,6210
Miricetina-3-glucósido	11,3 ± 0,9 a 8,1 ± 0,7 a	14,0 ± 0,7 b 8,2 ± 0,4 a	12,1 ± 0,2 ab 12,1 ± 1,0 a	0,0061	0,0902
Kaempferol-3-galactósido	28,9 ± 3,2 a 25,4 ± 2,2 a	33,3 ± 1,9 a 22,8 ± 3,0 a	28,0 ± 1,4 a 27,1 ± 1,0 a	0,0009	0,2724
Quercetina-3-galactósido	8,8 ± 0,4 a 7,6 ± 0,5 a	9,8 ± 0,5 a 7,4 ± 0,8 a	9,5 ± 0,7 a 8,4 ± 0,4 a	0,0004	0,1811
Quercetina-3-glucósido	17,3 ± 1,1 a 15,3 ± 0,5 a	19,5 ± 0,9 a 13,8 ± 1,0 a	18,4 ± 0,3 a 15,0 ± 0,7 a	<0,0001	0,3248
Quercetina-3-ramnósido	5,3 ± 0,3 a 4,2 ± 0,1 b	6,4 ± 0,2 a 3,2 ± 0,1 a	5,7 ± 0,1 a 4,7 ± 0,4 b	<0,0001	0,1190
Isoqramnetina-3-glucósido	12,2 ± 1,4 a 9,5 ± 0,1 a	14,8 ± 1,4 a 8,4 ± 0,6 a	13,2 ± 1,1 a 10,0 ± 0,3 a	<0,0001	0,3909
Naringenina	13,3 ± 0,9 a 12,3 ± 0,1 b	15,3 ± 0,8 a 9,1 ± 0,7 a	14,2 ± 0,2 a 12,5 ± 0,5 b	<0,0001	0,2424
Kaempferol	13,2 ± 0,6 a 13,0 ± 0,3 a	15,7 ± 1,6 a 11,8 ± 0,8 a	17,2 ± 1,4 a 13,9 ± 0,7 a	0,0006	0,1185
<b>Flavonoles</b>	119,3 ± 9,1 a (25,6) 102,8 ± 4,9 a (25,9)	138,6 ± 7,6 a (28,0) 91,7 ± 6,9 a (24,2)	129,1 ± 3,8 a (27,5) 111,1 ± 3,0 a (27,3)	<0,0001	0,2519
Dihidro quercetina-3-ramnósido	6,5 ± 0,2 ab 4,8 ± 0,3 a	6,9 ± 0,2 b 4,6 ± 0,3 a	6,2 ± 0,1 a 4,4 ± 0,2 a	<0,0001	0,1357
Dihidro kaempferol-3-glucósido	35,1 ± 2,8 a 29,7 ± 1,4 a	37,7 ± 2,1 a 26,8 ± 2,5 a	35,3 ± 0,8 a 29,0 ± 0,7 a	<0,0001	0,3997
Dihidro quercetina-3-glucósido	107,6 ± 2,5 a 73,6 ± 2,0 a	106,9 ± 2,4 a 73,3 ± 3,7 a	102,8 ± 1,7 a 75,4 ± 1,2 a	<0,0001	0,0928
<b>Dihidroflavonoles</b>	149,2 ± 5,5 a (32,1) 108,1 ± 3,5 a (27,2)	151,5 ± 4,6 a (30,6) 104,7 ± 6,3 a (27,6)	144,3 ± 2,2 a (30,7) 109,4 ± 2,0 a (26,9)	<0,0001	0,1609
<b>Flavonoides totales</b>	383,1 ± 20,9 a (84,5) 330,4 ± 2,2 a (83,1)	426,0 ± 14,9 a (86,1) 309,0 ± 19,6 a (81,6)	401,0 ± 6,5 a (85,4) 336,6 ± 7,9 a (82,7)	<0,0001	0,3401
<b>Fenoles no-antocianínicos totales</b>	465,4 ± 20,5 a 397,7 ± 14,9 a	494,6 ± 15,7 a 378,7 ± 22,6 a	469,7 ± 6,9 a 407,0 ± 10,7 a	<0,0001	0,3644

<sup>a</sup> Media (mg/L) ± error estándar (n = 3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos para cada zona (Tukey HSD, p < 0,05). <sup>b</sup> Considerado significativo cuando p < 0,05. <sup>c</sup> Efecto de interacción entre "zona y tratamiento". Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre grupos fenólicos y fenoles totales. nd, no detectado. Tratamientos: C, control; T1, raleo temprano; T2, raleo en verano; T3, raleo tardío.

Al evaluar el efecto del raleo de racimos sobre la composición de los vinos, los tratamientos aplicados en ambas zonas no modificaron significativamente el contenido de ninguno de los grupos químicos identificados. Estos resultados responden a lo observado en los parámetros fenólicos generales determinados en los mismos (**Tabla 12**) y en los compuestos no-antociánicos cuantificados en hollejos (**Tabla 9**). Sin embargo, las diferencias generadas por T1 en los niveles de flavanoles y flavonoles en los hollejos de Altamira, y en la concentración de flavanoles en las semillas de Gualtallary (**Tabla 11**), fueron inapreciables en los vinos correspondientes.

El análisis comparativo entre los vinos de las dos zonas evaluadas (**Tabla 15**) reveló la existencia de diferencias significativas en el contenido de todos los compuestos identificados ( $p < 0,05$ ), con excepción de los ácidos gálico, protocatéquico y *trans-p*-cumárico, galato de etilo, tirosol, (+)-catequina y trímero de procianidina 1. Sólo en el caso de los estilbenos, las muestras de Gualtallary mostraron concentraciones superiores respecto de Altamira (4,7 veces más); mientras para el resto de los no-flavonoides y flavonoides se observó un patrón opuesto y diferente al obtenido en el análisis de los hollejos (**Tabla 9**).

Independientemente del tratamiento aplicado, los vinos de Altamira presentaron en promedio 11,2% más ácidos hidroxibenzoicos, 38,5% más ácidos hidroxicinámicos y 9,2% más alcoholes fenólicos y no-fenólicos, en relación a los vinos de Gualtallary.

Con respecto al grupo de los flavanoles, el principal monómero cuantificado fue (+)-catequina, seguido por (-)-epicatequina. En este estudio en particular, la relación (+)-catequina/(-)-epicatequina fue mayor a la observada en los vinos Malbec analizados en los Capítulos I, III, IV y V, y variable entre las muestras de cada zona (6,2 en Altamira y 7,9 en Gualtallary). Estos datos sugieren, por un lado, la posible influencia de las condiciones ambientales de cada zona sobre la biosíntesis de estos compuestos, además de una extracción diferencial de los mismos durante la vinificación. Independientemente del tratamiento aplicado, los vinos de Altamira mostraron en promedio una concentración 12,7% mayor en comparación con los vinos de Gualtallary.

Al analizar el grupo de los flavonoles, nuevamente los vinos de Altamira exhibieron niveles superiores comparados con Gualtallary. El contenido total promedio en las muestras analizadas estuvo comprendido entre 119,3 y 138,6 mg/L (Altamira) y entre 91,7 y 111,1 mg/L (Gualtallary). Estos valores elevados para ambas zonas podrían ser explicados por las condiciones ambientales de Mendoza, principalmente la alta intensidad de luz solar durante el período de maduración de las bayas, lo cual parece estar asociado a una mayor acumulación de flavonoles (Downey et al., 2004; Makris et al., 2006a). Con respecto a la distribución de los distintos compuestos, ambas zonas mostraron un perfil comparable caracterizado por una mayor proporción de kaempferol (35,8% en Altamira y 36,6% en Gualtallary), seguido por quercetina (26,1% en Altamira y 25,8% en Gualtallary), miricetina (16,8% en Altamira y 17,2% en Gualtallary), naringenina (11,1% en Altamira y 11,2% en

Gualtallary) e isoramnetina (10,2% en Altamira y 9,2% en Gualtallary). Por otro lado, la mayor parte de estos compuestos se encontraron bajo la forma glicosilada, apreciándose una mayor proporción de galactósidos (48,4% en Altamira y 38,8% en Gualtallary), seguido por los derivados glucosilados (34,0% en Altamira y 33,7% en Gualtallary).

Por último, es importante destacar la presencia de dihidroflavonoles en los vinos analizados. Al igual que en los vinos Malbec evaluados en los Capítulos I-V, este grupo mostró nuevamente niveles elevados y característicos de la variedad. El contenido total en las muestras estuvo comprendido entre 141,1 y 151,5 mg/L (Altamira) y entre 99,3 y 109,4 mg/L (Gualtallary), representando el 31,0% (Altamira) y el 27,2% (Gualtallary) de la totalidad de los fenoles no-antocianicos determinados (**Tabla 15**).

### 3.3.4. Evaluación sensorial de los vinos mediante la aplicación del test triangular

Con el fin de determinar diferencias entre los vinos Malbec obtenidos a partir de los ensayos de raleo de racimos aplicados en las dos zonas estudiadas, los mismos fueron sometidos a un test sensorial discriminativo (test triangular), después de 3 meses de almacenamiento en botella, siguiendo la metodología detallada en el Anexo I. Inicialmente, se evaluó por separado la homogeneidad entre las réplicas de cada tratamiento para cada zona en cuestión. Para ello, durante una primera sesión de degustación se analizaron 3 series consecutivas correspondientes a cada tratamiento (C, T1, T2 y T3) de Altamira, que permitieron examinar las 3 réplicas de cada uno. Posteriormente, en otra sesión se repitió el procedimiento para los tratamientos de Gualtallary. El número total de series evaluadas en cada sesión fue de 12. Teniendo en cuenta la cantidad de jueces empleados para el análisis sensorial (10 degustadores entrenados), el número de respuestas correctas requeridas para un nivel de significancia del 5% es de 7 (Roessler et al., 1948). En todas las series evaluadas, en número de jueces que encontraron diferencias fue menor a 4, indicando homogeneidad entre las réplicas de cada tratamiento estudiado.

A continuación, se realizaron 2 sesiones separadas donde se procedió a la comparación entre tratamientos por zona. Para llevar a cabo cada sesión, se seleccionó aleatoriamente una réplica de cada tratamiento. Los vinos seleccionados se sirvieron en grupos de tres copas distribuidas aleatoriamente entre los 10 panelistas. El número total de series evaluadas en cada sesión fue de 6. Con respecto a los vinos de Altamira, los jueces fueron incapaces de diferenciar entre los vinos de los distintos tratamientos evaluados; mientras que en el caso de Gualtallary, los jueces lograron diferenciar solamente los vinos control de los obtenidos a partir de la aplicación de T1 y T2 (**Tabla 16**). Adicionalmente, los panelistas que respondieron correctamente coincidieron en atribuir las diferencias percibidas principalmente a los parámetros cualitativos “color” y “sabor”.

<b>Tabla 16.</b> Test Triangular de elección forzada en vinos Malbec de Altamira y Gualtallary (2009). Número total de respuestas = 10.							
Zona	Respuestas	Comparación entre tratamientos					
		C y T1	C y T2	C y T3	T1 y T2	T1 y T3	T2 y T3
Altamira	Número de respuestas correctas	6	4	3	3	4	4
	Significancia	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Gualtallary	Número de respuestas correctas	8	7	4	3	5	4
	Significancia	+	+	ns	ns	ns	ns

ns, vinos sin diferencia significativa.  
+, vinos estadísticamente diferentes para un nivel de significancia del 5% (Roessler et al., 1948).

Las observaciones descritas anteriormente muestran variaciones en algunos parámetros fenólicos globales y en la composición flavonoide y no-flavonoide de uvas y vinos Malbec provenientes de diferentes tratamientos de raleo de racimos aplicados en dos zonas geográficas de la Provincia de Mendoza. En resumen, los tratamientos de raleo aplicados en ambas zonas, independientemente del momento de realización, modificaron significativamente los componentes del rendimiento de las plantas con excepción del peso de racimo y del número de bayas/racimo. Por otro lado, su incidencia sobre los parámetros físicos y la composición fenólica de las uvas y de los vinos fue muy baja, observándose mayores diferencias debido al factor “zona”. En general, los raleos tempranos (T1 y T2) tendieron a aumentar la biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos en hollejos y semillas, trasladándose este efecto a la composición de los vinos. Sin embargo, en la mayoría de los casos esta tendencia careció de significancia estadística. Por su parte, las condiciones edafoclimáticas de las zonas estudiadas incidieron notablemente en la composición de las muestras analizadas. Con respecto a las uvas, los hollejos y semillas de Gualtallary revelaron un mayor contenido de compuestos fenólicos en comparación con Altamira. En cuanto a los vinos elaborados, el patrón observado en las bayas de Gualtallary sólo se mantuvo en relación a los pigmentos antociánicos y parámetros relacionados al color; en tanto, las muestras de Altamira mostraron contenidos superiores de fenoles no-antociánicos. En conclusión, a partir de estos resultados se puede evidenciar el potencial de Altamira y Gualtallary para la producción de uvas con una gran riqueza fenólica adecuada para la obtención de vinos estructurados, complejos y con coloraciones intensas, destinados a una crianza prolongada.



# Efecto de la técnica de sangrado sobre la composición fenólica de vinos Malbec



Joan Miró, *La botella de vino* (1924).

## 1. Consideraciones generales

Es ampliamente conocido y ha sido mencionado en repetidas oportunidades el importante rol que cumplen los compuestos fenólicos como parámetros de calidad de los vinos tintos, debido a su impacto en las características organolépticas y a sus propiedades funcionales (Renaud y de Lorget, 1992; Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Estos compuestos se distribuyen principalmente en las partes sólidas de la uva, y su transferencia al vino depende de las condiciones de contacto con el líquido (maceración). La maceración es un proceso físico-químico que incluye la extracción fraccionada de compuestos químicos desde la fase sólida (hollejos, semillas y eventualmente escobajos), seguido de la disolución de los mismos en la matriz del mosto/vino (Peynaud, 1984). Durante la maceración, dos procesos físicos ocurren de manera secuencial. El primero de ellos es la disolución e implica la extracción de los componentes vacuolares hacia la fase líquida o mosto, primeramente los almacenados en forma libre dentro de las vacuolas y después los combinados con otras estructuras celulares y presentes en el tonoplasto o en la pared celular. Depende de la variedad de uva y del estado de madurez, y se ve facilitada por la destrucción de paredes celulares y tonoplastos vacuolares, ya sea por vía enzimática o física (Ribéreau-Gayon, 2006a). El segundo proceso ocurre a continuación del primero e implica la difusión de las sustancias extraídas. La ley de Fick rige los fenómenos de transferencia que ocurren en la maceración y establece que la continuidad de la disolución es completamente dependiente de la difusión, la que ocurre esencialmente a partir de la renovación del mosto saturado que impregna las partes sólidas de la uva, por ejemplo por medio de remontajes (Ribéreau-Gayon, 2006a). El grado de extracción logrado en la maceración incide en la cantidad y estabilidad del color, en la estructura de los taninos y en el potencial de envejecimiento. La magnitud de extracción y la tasa de difusión de estos compuestos dependen a su vez de la concentración, localización celular e interacción de los fenoles con otros metabolitos de la uva (Romero-Cascales et al., 2005; González-Manzano et al., 2006; Pinelo-Jiménez et al., 2006; Aron y Kennedy, 2007), de la composición química propia de la pared celular del hollejo (Doco et al., 2003; Pinelo-Jiménez et al., 2006), del método de procesamiento empleado (Ortega-Regules et al., 2006; Morel-Salmi et al., 2006; Pinelo-Jiménez et al., 2006) y del gradiente de concentración entre los hollejos macerados y el vino (Romero-Cascales et al., 2005). Por su parte, el tiempo óptimo de maceración necesario para lograr los niveles adecuados de fenoles varía, entre otros factores, con el estilo de vino buscado y con la variedad de uva utilizada (Baustista-Ortín et al., 2004). Complementariamente, esta matriz fenólica proveniente de las uvas sufre modificaciones sustanciales durante la vinificación y el envejecimiento, producto de diversas reacciones químicas desencadenadas durante todo el proceso (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

A través de los años, los productores de vino han desarrollado y evaluado numerosas técnicas enológicas tendientes a aumentar la extracción de compuestos fenólicos en el vino, sin embargo no todas han logrado resultados satisfactorios. Una revisión bibliográfica bastante reciente (Sacchi et al., 2005) concluyó que algunas técnicas efectivas para aumentar la extracción de compuestos fenólicos en el vino fueron la manipulación de la temperatura de fermentación, el congelamiento de la uva previo a la fermentación, el sangrado o *saignée*, la aplicación de enzimas pectolíticas y la maceración prolongada. Otras prácticas, como la utilización de anhídrido sulfuroso y la maceración prefermentativa en frío han mostrado tener poco o ningún efecto perdurable, y en algunos casos han conducido a una disminución en los niveles de compuestos fenólicos. Esta última técnica ha sido evaluada por Casassa (2007) durante la elaboración de vinos cv. Malbec de la Provincia de Mendoza, empleando como alternativas a la maceración tradicional el enfriamiento previo del mosto en cámara frigorífica y el empleo de CO<sub>2</sub> sólido como agente refrigerante e inertizante. Sólo el empleo de CO<sub>2</sub> resultó efectivo sobre la concentración fenólica del producto terminado, debido a su acción protectora; mientras la alternativa restante produjo efectos negativos sobre estos compuestos.

El mercado actual exige, en gran parte, la disponibilidad de vinos estructurados con coloraciones intensas, razón por la cual los enólogos evalúan constantemente diversas variantes tecnológicas tendientes a satisfacer las exigencias de los consumidores. En numerosas oportunidades la intención es mantener una alta relación sólido/líquido durante la vinificación. Una alternativa interesante sobre este punto es la técnica de sangrado, que consiste en extraer una fracción de jugo durante el encubado de la uva, antes de iniciarse la fermentación alcohólica, con el objetivo de aumentar la relación sólido/líquido y modificar la composición química del vino para lograr un mayor color y aroma en el producto terminado (Singleton, 1972; Gawel et al., 2001; Bautista-Ortín et al., 2004 y 2007). Esta técnica ha sido evaluada por diversos autores en diferentes cultivares y regiones del mundo (Bautista-Ortín et al., 2004 y 2007; Sacchi et al., 2005; Puertas et al., 2008; Baiano et al., 2009; Harbertson et al., 2009), sin embargo, no existe información sobre su impacto y comportamiento específico en vinos cv. Malbec argentinos.

En base a todo lo mencionado y teniendo en cuenta el estudio propuesto en el Capítulo II de la presente Tesis Doctoral, donde se evaluó la influencia de la práctica vitícola de aclareo de racimos sobre la composición fenólica de uvas y vinos Malbec, se planteó el interés de investigar un tratamiento enológico capaz de simular el efecto generado por dicho manejo en el viñedo. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron estudiar la incidencia del sangrado sobre la composición fenólica de vinos Malbec y analizar la extracción de estos compuestos durante el proceso de vinificación.

## 2. Condiciones experimentales

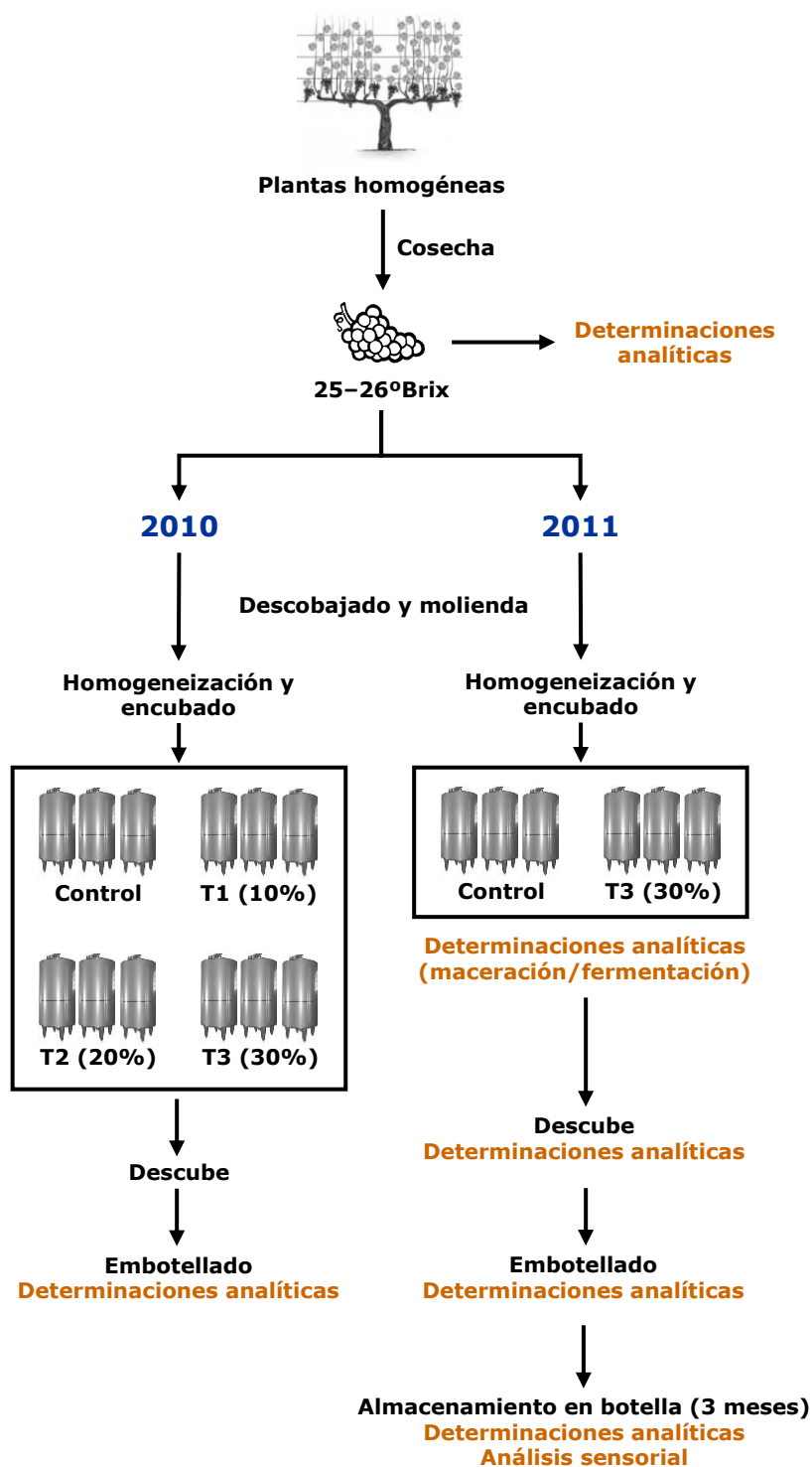
El ensayo fue realizado durante las vendimias 2010-2011 con uvas cv. Malbec provenientes de un viñedo ubicado en la localidad de Altamira (69° 07' O y 33° 43' S), San Carlos, Provincia de Mendoza, Argentina. El viñedo fue implantado en el año 2000 sobre pie franco, utilizando un sistema de conducción en espaldera con orientación norte-sur, poda Guyot y riego por goteo. El marco de plantación fue de 2 m entre hileras y 1,2 m entre plantas dentro de la hilera, y la producción estimada fue de 10 t/ha. Las uvas empleadas en este estudio correspondieron a las plantas resultantes del tratamiento control del ensayo de aclareo de racimos descrito en el Apartado II.1 (Capítulo II). Debido a la cantidad de uva necesaria para este ensayo, se seleccionaron nuevas plantas dentro del mismo viñedo, siguiendo el criterio utilizado en el Apartado II.1 (Capítulo II).

Las bayas fueron cosechadas manualmente con 25-26°Brix, colocadas en cajas plásticas de 20 kg de capacidad y transportadas inmediatamente a la bodega en condiciones controladas. El primer año (2010), se aplicaron 3 tratamientos enológicos consistentes en distintos niveles de sangrado: T1 (10%), T2 (20%) y T3 (30%), frente a un tratamiento control (C) sin sangrado. A partir de los resultados preliminares, el segundo año (2011) sólo se evaluó el T3 junto con el C y se estudió la cinética de extracción de compuestos fenólicos durante la etapa de maceración/fermentación alcohólica. En ambas temporadas se emplearon 3 réplicas de cada tratamiento.

La metodología utilizada para la aplicación de los tratamientos de sangrado fue la siguiente. En primer lugar, se determinó la relación volumen de jugo (mL)/peso de bayas (g) en 5 muestras de 100 bayas tomadas aleatoriamente a partir de la uva cosechada. Cada muestra fue pesada, colocada en una bolsa plástica y presionada manualmente hasta obtener un mosto, cuyo volumen fue medido en una probeta, previamente al filtrado del mismo a través una malla plástica de 0,5 mm de tamaño de poro para eliminar los restos sólidos. A partir de estos datos se calculó el volumen de jugo correspondiente a 100 kg de uva, que constituye la cantidad empleada en cada vinificación del ensayo. Finalmente, se procedió a determinar el volumen de jugo a retirar para alcanzar el porcentaje de sangrado deseado (10, 20 o 30%). En todos los casos, el sangrado se realizó inmediatamente después del encubado antes de iniciarse la fermentación alcohólica.

Las vinificaciones se realizaron en tanques de acero inoxidable de 100 L, siguiendo el protocolo de elaboración detallado en el Anexo I. En la vendimia 2010, sólo se evaluaron los vinos terminados al momento de embotellado (45 días después del descube). Mientras que en la vendimia 2011, se analizaron diariamente muestras de mosto/vino, durante 15 días hasta el descube, además de los vinos al momento de embotellado y después de 3 meses de almacenamiento en botella. Paralelamente, se estudió la composición fenólica de la uva al momento de cosecha a partir de un muestreo aleatorio de bayas por triplicado sobre el viñedo en cuestión (Anexo I). En todos los casos

se procedió a la determinación de parámetros analíticos generales y compuestos fenólicos, siguiendo la metodología detallada en el Anexo I. Sólo en la vendimia 2011, después de 3 meses de almacenamiento en botella, los vinos fueron sometidos a una evaluación sensorial (test triangular) para examinar diferencias entre los tratamientos y complementar la información obtenida mediante las determinaciones químicas (Anexo I). La **Figura 1** muestra un esquema detallado de los ensayos realizados en ambos años.



**Figura 1.** Esquema de los ensayos de sangrado realizados en las vendimias 2010 y 2011.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Composición fenólica de la uva al momento de cosecha

Las bayas Malbec de las dos vendimias evaluadas (2010-2011) fueron caracterizadas inicialmente a través de los parámetros analíticos presentados en la **Tabla 1**. Las mismas fueron cosechadas con similares contenidos de sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix) y acidez, sin observarse diferencias significativas entre ambos años ( $p > 0,05$ ). Con respecto a los parámetros físicos, las bayas muestreadas presentaron valores semejantes en el peso de bayas y hollejos, en tanto el peso de semillas fue significativamente superior en 2011.

Parámetro	Uvas	
	2010	2011
Peso de 100 bayas (g)	205,7 ± 7,4* a	185,2 ± 3,6 a
Peso de hollejos (g)	20,7 ± 1,1 a	21,6 ± 1,0 a
Peso de semillas (g)	5,2 ± 0,1 a	5,8 ± 0,2 b
Sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix)	25,7 ± 0,2 a	25,4 ± 0,2 a
Acidez titulable (g/L)	3,2 ± 0,1 a	3,4 ± 0,2 a
pH	3,99 ± 0,02 a	3,84 ± 0,07 a

\* Media ± error estándar ( $n = 3$ ). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre vendimias (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

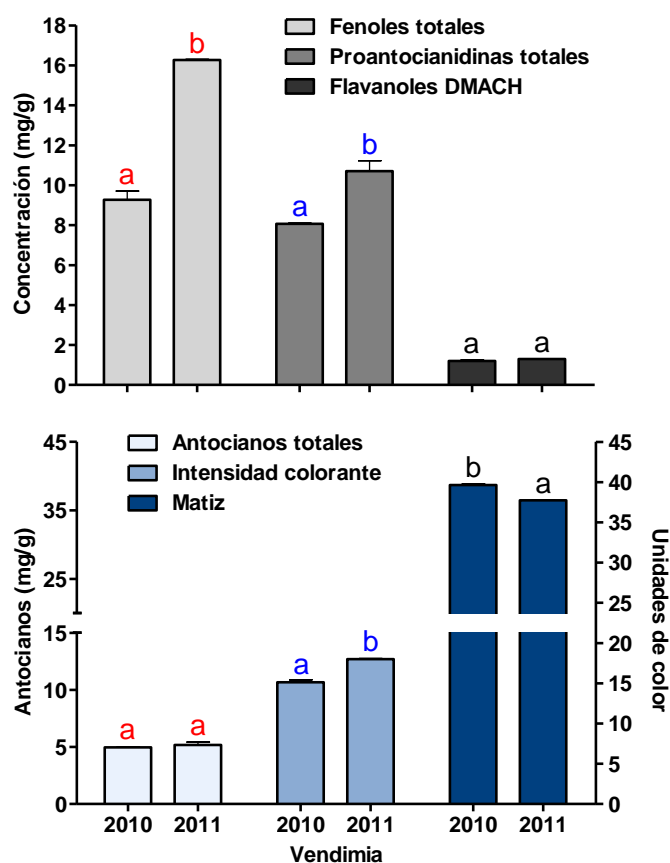
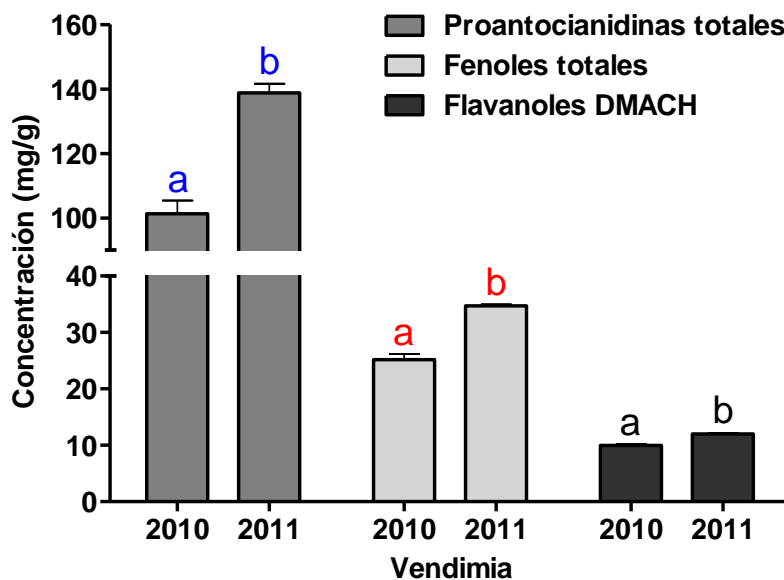


Figura 2. Parámetros fenólicos generales determinados en extractos de hollejos de bayas Malbec (2010-2011).



**Figura 3.** Parámetros fenólicos generales determinados en extractos de semillas de bayas Malbec (2010-2011).

La composición fenólica global de los hollejos y semillas provenientes de las uvas evaluadas se muestra en las **Figuras 2 y 3**. En la vendimia 2011, ambas partes de la baya presentaron niveles significativamente superiores de proantocianidinas y fenoles totales comparados con la vendimia 2010, indicando un potencial superior para la producción de vinos con mayor estructura. Por el contrario, el contenido total de antocianos mostró valores comparables y la intensidad colorante una tendencia similar, debido probablemente a un mayor contenido de antocianinas individuales en los hollejos de la vendimia 2011. La concentración elevada de compuestos fenólicos en las semillas de las uvas de la vendimia 2011 podría deberse en parte a la mayor proporción de materia disponible (**Tabla 1**). En general, los resultados obtenidos coinciden con los observados en el Apartado II.1 (Capítulo II) sobre uvas del mismo viñedo en dos vendimias previas (2008-2009).

Al analizar la distribución de antocianinas (**Figura 4**), se observó el mismo patrón obtenido en los hollejos de bayas Malbec estudiados en los Capítulos I y II, representado por una mayor proporción de monoglucósidos (media, 75,2% en 2010 y 77,6% en 2011) seguido por los acetylglucósidos (media, 15,8% en 2010 y 13,7% en 2011) y cinamil-glucósidos (media, 9,0% en 2010 y 8,7% en 2011). Al comparar las dos vendimias, sólo los derivados glucosilados mostraron diferencias significativas, con concentraciones superiores en 2011. Por su parte, considerando el perfil basado en las diferentes antocianidinas, se observó la incidencia del factor “año” sobre todos los compuestos, encontrándose niveles mayores en la vendimia 2011. Estos resultados concuerdan con el contenido de antocianos totales cuantificado por espectrofotometría y podrían explicar su relación con la intensidad colorante (**Figura 2**).

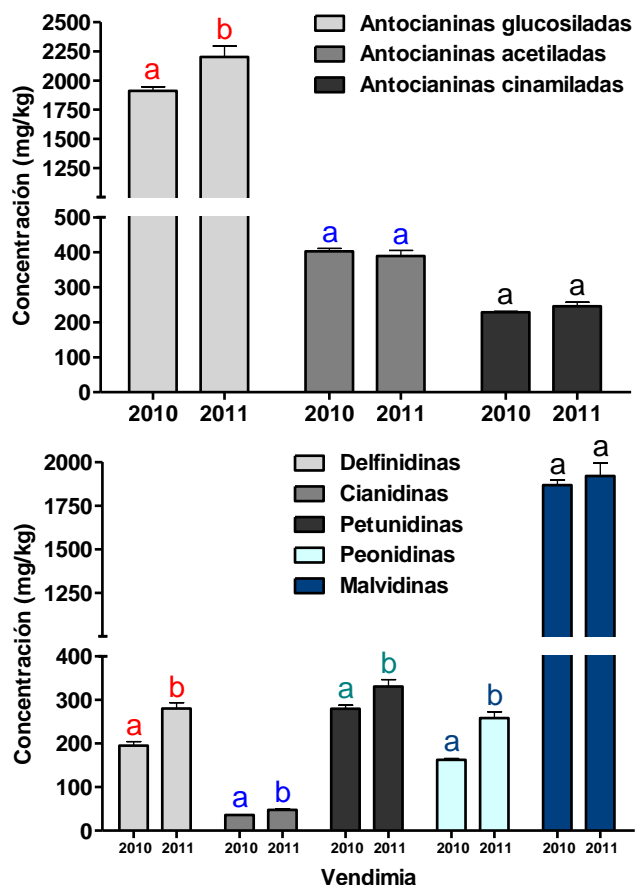


Figura 4. Antocianinas determinados en hollejos de bayas Malbec (2010-2011).

Adicionalmente, se determinaron los compuestos fenólicos de bajo peso molecular no-antocianínicos, cuyos resultados generales en hollejos y semillas se muestran en las Figuras 5 y 6. Analizando la composición de hollejos (Figura 5), los flavonoides constituyeron la fracción más abundante (media, 96,6% en 2010 y 96,5% en 2011) comparada con los no-flavonoides (media, 3,4% en 2010 y 3,5% en 2011), en concordancia con lo reportado en los Capítulos I y II. Al evaluar las dos vendimias, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la tasa de los distintos compuestos, especialmente flavonoides, presentándose concentraciones superiores en 2011 y coincidiendo con el contenido de fenoles totales determinado por espectrofotometría (Figura 2). Con respecto a los no-flavonoides, si bien no se observó una influencia significativa del factor “año” sobre el contenido de ácidos fenólicos, los hollejos mostraron niveles levemente superiores en 2011. Por su parte, el análisis de las semillas (Figura 6) reveló un patrón coincidente al observado en los parámetros generales descritos anteriormente (Figura 3). Tanto los monómeros como las procianidinas cuantificadas presentaron concentraciones significativamente superiores en la vendimia 2011.

A partir de las observaciones realizadas, se observa claramente la influencia del factor “año” sobre la biosíntesis de compuestos fenólicos en hollejos y semillas de uvas provenientes del mismo



viñedo. Esta composición diferencial de las bayas, determinada en parte por las condiciones climáticas de cada año (luz, temperatura, régimen hídrico, etc.), posiblemente incida en el perfil fenólico del mosto/vino durante la vinificación y en la composición final del producto.

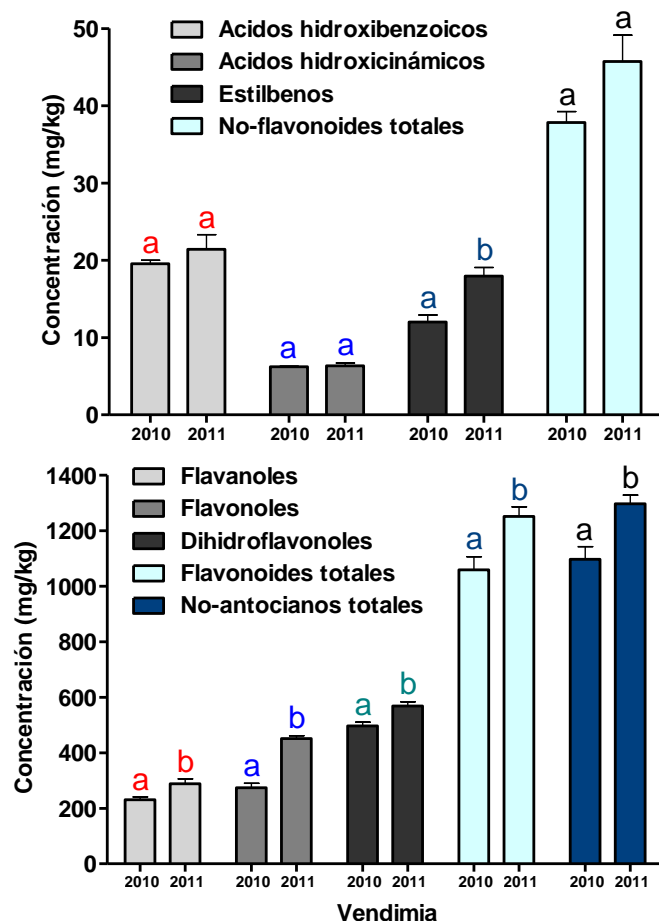


Figura 5. Fenoles no-antocianicos determinados en extractos de hollejos de bayas Malbec (2010-2011).

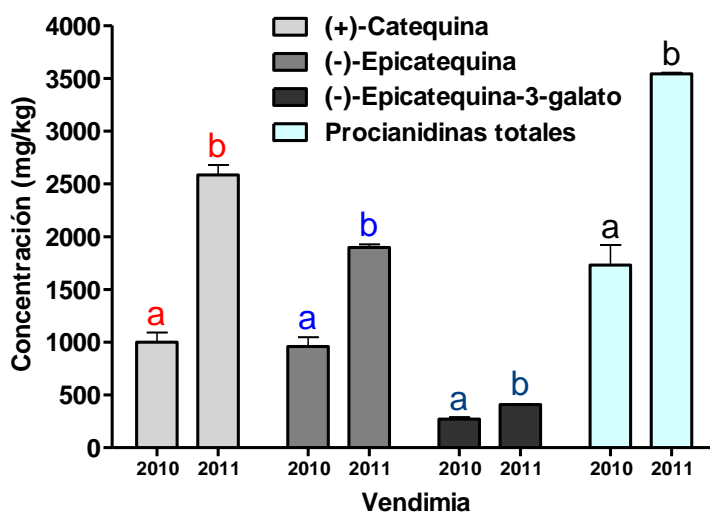


Figura 6. Fenoles no-antocianicos determinados en extractos de semillas de bayas Malbec (2010-2011).

### 3.2. Composición fenólica de los vinos provenientes del tratamiento control

En primer lugar se realizó la caracterización y comparación de los vinos Malbec obtenidos, empleando el protocolo de vinificación descrito en el Anexo I, sin aplicación de la técnica de sangrado (tratamiento C) en las dos vendimias evaluadas (2010-2011).

#### 3.2.1. Parámetros analíticos generales

La **Tabla 2** muestra los resultados correspondientes a los parámetros determinados al momento de embotellado (45 días después del descube). Los valores de pH presentaron una baja dispersión entre los vinos analizados, observándose por el contrario un nivel superior de acidez titulable en los vinos de la vendimia 2011, acompañado de un menor contenido de alcohol. Si bien no existieron diferencias significativas en estos parámetros determinados en las uvas al momento de cosecha (**Tabla 1**), el contenido levemente inferior de sólidos solubles observado en el año 2011 podría explicar estos resultados en los vinos.

Al analizar los parámetros fenólicos generales, se observaron diferencias significativas entre vendimias, presentándose en general una mayor riqueza fenólica en vinos de la vendimia 2011, coincidiendo con los resultados obtenidos en las uvas (**Figuras 2 y 3**). Esta tendencia se confirmó principalmente en los niveles de fenoles totales, proantocianidinas totales y antocianos combinados. Sin embargo, el contenido de antocianos libres y totales fue levemente superior en la vendimia 2010, y la concentración molar de flavanoles (flavanoles DMACH) y el índice de gelatina (IG) similares entre los vinos evaluados.

Con respecto a los parámetros de color, si bien no existieron diferencias significativas en la IC, se observó un nivel levemente superior en la vendimia 2011, acompañado por un menor valor de  $L^*$  y mayor  $h$  y  $b^*$ , indicando un color más intenso debido principalmente a la componente azul (% de color azul). En cuanto a los vinos de la vendimia 2010, a pesar del contenido superior de antocianos totales, los mismos mostraron una IC levemente inferior al 2011, caracterizada principalmente por la componente roja (% de color rojo y  $a^*$ ).

Finalmente, analizando la contribución del CC (%) al color total del vino se observó una mayor proporción en vinos de la vendimia 2010 (30,6%), debido probablemente a un mayor contenido de antocianos libres y de otros compuestos (copigmentos). Es importante destacar que los vinos de ambos años presentaron una importante fracción de copigmentación por tratarse de vinos recién terminados y embotellados (45 días después del descube), coincidiendo con las observaciones reportadas por Boulton (2001). Por el contrario, el grado de polimerización observado (CP) coincidió con los niveles de antocianos combinados (AC), los vinos de la vendimia 2010 cuya proporción de AC fue del 33,0% presentaron menor grado de polimerización (16,4%); mientras que los vinos de la vendimia 2011, con 43,3% de AC mostraron un grado de polimerización mayor (18,3%).

**Tabla 2.** Parámetros analíticos generales de vinos Malbec determinados al momento de embotellado (2010-2011). Influencia de distintos niveles de sangrado.

Parámetro	2010			2011		
	C	T1	T2	T3	C	T3
Acidez titulable (ácido tartárico, g/L)	4,93 ± 0,12* aA	4,63 ± 0,09 a	4,83 ± 0,09 a	4,53 ± 0,20 aA	5,30 ± 0,02 aB	5,40 ± 0,04 aB
pH	3,73 ± 0,03 aA	3,90 ± 0,01 a	3,83 ± 0,03 a	3,87 ± 0,09 aA	3,79 ± 0,01 aA	3,83 ± 0,03 aA
Alcohol (% v/v)	15,53 ± 0,03 aB	15,50 ± 0,01 a	15,40 ± 0,06 a	15,47 ± 0,12 aB	14,87 ± 0,17 aA	14,80 ± 0,15 aA
AT (Mv3gl, mg/L)	1015,7 ± 24,3 aB	1057,7 ± 40,6 ab	1077,6 ± 24,3 ab	1177,1 ± 15,5 bB	916,2 ± 15,5 aA	1073,2 ± 19,2 bA
AL (Mv3gl, mg/L)	680,7 ± 17,8 aB	716,0 ± 36,8 a	727,1 ± 28,8 a	796,8 ± 29,2 aB	519,2 ± 17,6 aA	620,4 ± 6,7 bA
AC (Mv3gl, mg/L)	335,1 ± 6,9 aA	341,7 ± 3,8 a	350,5 ± 13,5 a	380,4 ± 15,5 aA	397,0 ± 15,9 aB	452,8 ± 12,4 aB
IC ( $A_{420nm} + A_{520nm} + A_{620nm}$ )*10	17,3 ± 0,8 aA	17,2 ± 0,3 a	18,2 ± 0,5 a	18,4 ± 0,1 aA	19,7 ± 0,6 aA	23,5 ± 0,4 bB
Matiz ( $A_{420nm}/A_{520nm}$ )*100	50,1 ± 0,8 aA	55,6 ± 0,1 b	52,8 ± 0,9 ab	54,4 ± 1,4 abA	52,5 ± 0,4 aA	52,5 ± 0,1 aA
% de color amarillo	29,4 ± 0,3 aA	30,9 ± 0,1 a	30,4 ± 0,4 a	31,2 ± 0,7 aA	29,9 ± 0,2 aA	29,7 ± 0,1 aA
% de color rojo	58,7 ± 0,5 aB	55,5 ± 0,1 a	56,9 ± 0,7 a	55,6 ± 1,2 aA	56,9 ± 0,2 aA	56,6 ± 0,1 aA
% de color azul	11,8 ± 0,1 aA	13,7 ± 0,1 b	12,7 ± 0,3 ab	13,2 ± 0,1 abA	13,2 ± 0,1 aB	13,6 ± 0,1 aA
L*	36,0 ± 1,0 aB	34,4 ± 0,5 a	33,4 ± 0,3 a	33,2 ± 0,4 aB	31,4 ± 0,8 bA	26,2 ± 0,6 aA
C*	59,7 ± 0,6 bB	56,1 ± 0,1 a	58,4 ± 0,4 ab	57,4 ± 1,2 abA	57,5 ± 0,2 bA	55,8 ± 0,4 aA
h*	6,3 ± 0,7 aA	5,5 ± 0,4 a	8,0 ± 0,8 a	7,4 ± 1,0 aA	9,1 ± 0,6 aB	12,1 ± 0,1 bB
a*	59,2 ± 0,4 bB	55,9 ± 0,1 a	57,8 ± 0,3 ab	56,9 ± 1,0 abA	56,8 ± 0,2 bA	54,5 ± 0,4 aA
b*	6,6 ± 0,8 aA	5,4 ± 0,4 a	7,6 ± 0,5 a	7,9 ± 0,7 aA	9,1 ± 0,6 aA	11,7 ± 0,1 bB
CC (%)	30,6 ± 0,7 aB	31,2 ± 2,6 a	31,7 ± 1,7 a	30,0 ± 1,1 aA	25,8 ± 0,9 aA	28,2 ± 0,6 aA
CP (%)	16,4 ± 0,2 aA	15,9 ± 0,1 a	16,5 ± 0,7 a	16,2 ± 0,6 aA	18,3 ± 0,1 aB	18,1 ± 0,1 aB
FT (EAG, mg/L)	2988,9 ± 54,5 aA	3177,8 ± 80,8 a	3156,2 ± 161,8 a	3391,2 ± 15,0 aA	3169,2 ± 46,4 aA	3624,2 ± 11,2 bB
PA (Cat, mg/L)	2905,5 ± 141,7 aA	2985,6 ± 204,3 a	3102,7 ± 121,2 a	3256,8 ± 80,8 aA	3380,0 ± 48,9 aB	3990,1 ± 21,3 bB
FL (Cat, mol/L)	$1,6 \times 10^{-2} \pm 1,2 \times 10^{-3}$ aA	$1,5 \times 10^{-2} \pm 8,8 \times 10^{-4}$ a	$1,6 \times 10^{-2} \pm 8,8 \times 10^{-4}$ a	$1,6 \times 10^{-2} \pm 5,8 \times 10^{-4}$ aA	$1,5 \times 10^{-2} \pm 4,1 \times 10^{-4}$ aA	$1,7 \times 10^{-2} \pm 3,8 \times 10^{-4}$ bA
IG (%)	74,4 ± 2,8 aA	71,6 ± 1,2 a	73,7 ± 2,0 a	76,1 ± 2,1 aA	75,7 ± 5,6 aA	75,1 ± 1,4 aA

\* Media ± error estándar (n=3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey HSD, p<0,05). Letras minúsculas (a, b) son utilizadas para comparar los tratamientos en la misma vendimia. Letras mayúsculas (A, B) son utilizadas para comparar vinos del mismo tratamiento en diferentes vendimias. AT, antocianos totales; AL, antocianos libres; AC, antocianos combinados; IC, intensidad colorante; L\*, claridad; C\*, saturación; h\*, tonalidad; a\*, rojo-verde; b\*, amarillo-azul; CC, color copigmentado; CP, color debido a pigmentos poliméricos; FT, fenoles totales; PA, proantocianidinas totales; FL, flavanoles DMACH. Tratamientos: C, Control; T1, sangrado 10%, T2, sangrado 20%, T3, sangrado 30%.

### 3.2.2. Perfil de antocianinas individuales

Al analizar el perfil antociánico de los vinos al momento de embotellado (**Tabla 3**), se observó un patrón similar al obtenido en los vinos Malbec estudiados en los Capítulos I-V, representado por una mayor proporción de derivados glucosilados (69,5% en 2010 y 69,8% en 2011) seguido por los acetil-glucósidos (16,9% en 2010 y 16,3% en 2011), cinamil-glucósidos (6,6% en 2010 y 7,7% en 2011) y piranoantocianinas (7,0% en 2010 y 6,3% en 2011).

Al comparar las dos vendimias, se observaron diferencias cuantitativas significativas entre las muestras evaluadas. Los vinos de la vendimia 2011 presentaron mayores contenidos de todos los compuestos determinados, a excepción de delfinidina-3-(6"-acetil)glucósido, malvidina-3-(6"-acetil)glucósido, vitisina A y malvidina-3-(6"-acetil)glucósido piruvato cuyos niveles fueron comparables en ambos años. En general, los niveles de concentración determinados fueron menores a los obtenidos por espectrofotometría, debido a la capacidad de la técnica cromatográfica empleada de detectar sólo antocianos libres sin considerar la contribución de otros pigmentos (Canals et al., 2008).

Paralelamente, se calcularon las relaciones entre los distintos derivados antociánicos, obteniéndose resultados concordantes con los presentados en los Capítulos I-V. La relación  $\Sigma$ acetiladas /  $\Sigma$ cumariladas, propuesta por algunos autores para la verificación de autenticidad varietal en cepajes tintos (Otteneder et al., 2004), mostró valores similares en ambos años (2,6 en 2010 y 2,4 en 2011). Complementariamente, los valores medios obtenidos para las relaciones  $\Sigma$ glucosiladas /  $\Sigma$ acetiladas y  $\Sigma$ glucosiladas /  $\Sigma$ cumariladas variaron entre 4,1-4,3 y 10,2-10,9, respectivamente (**Tabla 3**).

Por su parte, considerando el perfil basado en las diferentes antocianidinas, los derivados de la malvidina constituyeron los compuestos más abundantes en todas las muestras analizadas (67,8% en 2010 y 61,0% en 2011), mientras que los derivados de la cianidina mostraron la menor proporción (1,7% en 2010 y 3,0% en 2011). En general, la distribución de todas las antocianidinas reveló un patrón similar al observado en los Capítulos I-V.

Con respecto al grupo de las piranoantocianinas, en la vendimia 2010 se identificaron seis compuestos (vitisina A y B, peonidina-3-glucósido piruvato, malvidina-3-(6"-acetil)glucósido piruvato, malvidina-3-glucósido-etil-epicatequina y malvidina-3-glucósido-4-vinilfenol); mientras que en la vendimia 2011, no se detectó malvidina-3-glucósido-4-vinilfenol. Los derivados piruvílicos (vitisina A, peonidina-3-glucósido piruvato y malvidina-3-(6"-acetil)glucósido piruvato) representaron entre 72,7% (2010) y 64,3% (2011) de la totalidad de los pigmentos detectados, seguido por el aducto malvidina-3-glucósido-etil-epicatequina (13,6% en 2010 y 19,7% en 2011), la vitisina B (12,5% en 2010 y 16,0% en 2011), y en menor proporción la malvidina-3-glucósido-4-vinilfenol (1,2% en 2010). En concordancia con lo reportado por otros autores (Monagas et al., 2003a), se encontró que los

vinos con elevados contenidos de estos compuestos presentaban mayores niveles de sus correspondientes precursores antociánicos (malvidina y peonidina).

**Tabla 3.** Antocianinas individuales cuantificadas en vinos Malbec al momento de embotellado (2010-2011). Influencia de distintos niveles de sangrado.

Compuesto	2010			2011		
	C	T1	T2	T3	C	T3
Delifidina-3-glucósido	21,1 ± 0,7 aA	22,9 ± 1,0 a	22,1 ± 1,0 a	23,9 ± 0,3 aA	29,4 ± 0,5 aB	34,3 ± 0,8 bB
Cianidina-3-glucósido	1,6 ± 0,2 aA	1,8 ± 0,1 a	2,8 ± 0,1 b	3,4 ± 0,1 cA	3,4 ± 0,1 aB	4,1 ± 0,1 bB
Petunidina-3-glucósido	37,7 ± 0,8 aA	44,6 ± 0,8 b	40,8 ± 2,0 ab	42,7 ± 0,1 abA	45,1 ± 0,7 aB	51,4 ± 1,2 bB
Peonidina-3-glucósido	18,8 ± 0,8 aA	21,0 ± 0,3 a	20,7 ± 2,5 a	43,1 ± 3,7 bA	48,6 ± 0,8 aB	53,9 ± 0,1 bB
Malvidina-3-glucósido	173,7 ± 4,1 aA	187,6 ± 2,9 a	188,5 ± 4,2 a	210,1 ± 5,0 bA	202,6 ± 5,1 aB	209,6 ± 3,0 aA
<b>Antocianinas glucosiladas</b>	252,9 ± 4,2 aA (69,5)	277,9 ± 2,7 a (68,6)	274,9 ± 6,1 a (68,1)	323,2 ± 8,6 bA (68,0)	329,1 ± 6,6 aB (69,8)	353,2 ± 4,9 bB (68,0)
Delifidina-3-(6"-acetil)glucósido	7,0 ± 0,6 aA	7,8 ± 0,2 a	7,7 ± 0,2 a	8,1 ± 0,2 aA	7,4 ± 0,1 aA	9,1 ± 0,1 bB
Cianidina-3-(6"-acetil)glucósido	4,2 ± 0,6 aA	4,8 ± 0,1 a	4,2 ± 0,2 a	4,6 ± 0,1 aA	9,4 ± 0,2 aB	11,1 ± 0,1 bB
Petunidina-3-(6"-acetil)glucósido	8,9 ± 0,3 aA	10,5 ± 0,2 b	10,3 ± 0,2 b	11,7 ± 0,1 cA	15,6 ± 0,2 aB	18,8 ± 0,4 bB
Peonidina-3-(6"-acetil)glucósido	4,8 ± 0,6 aA	6,0 ± 0,1 ab	6,4 ± 0,9 ab	7,8 ± 0,8 bA	6,7 ± 0,1 aB	7,5 ± 0,1 bA
Malvidina-3-(6"-acetil)glucósido	36,8 ± 1,3 aA	41,8 ± 1,4 ab	43,7 ± 1,8 b	53,6 ± 1,5 cB	37,6 ± 0,6 aA	42,3 ± 0,3 bA
<b>Antocianinas acetiladas</b>	61,7 ± 0,8 aA (16,9)	70,9 ± 1,7 b (17,6)	72,3 ± 2,7 b (17,9)	85,8 ± 1,8 cA (18,1)	76,7 ± 1,1 aB (16,3)	88,8 ± 1,0 bA (17,1)
Delifidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	4,0 ± 0,2 aA	4,9 ± 0,1 a	4,9 ± 0,3 a	6,7 ± 0,3 bA	6,5 ± 0,1 aB	7,1 ± 0,1 bA
Cianidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	0,37 ± 0,03 aA	0,43 ± 0,03 a	0,47 ± 0,07 a	0,50 ± 0,01 aA	1,20 ± 0,06 aB	1,40 ± 0,12 aB
Malvidina-3-(6"-cateil)glucósido	0,87 ± 0,03 aA	1,03 ± 0,03 a	1,10 ± 0,10 a	1,10 ± 0,06 aA	3,93 ± 0,09 aB	4,60 ± 0,01 bB
Petunidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	2,57 ± 0,22 aA	2,73 ± 0,12 a	2,67 ± 0,15 a	3,17 ± 0,03 aB	1,43 ± 0,12 aB	1,73 ± 0,09 aA
Peonidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido	3,4 ± 0,4 aA	3,7 ± 0,4 a	4,2 ± 0,2 a	4,5 ± 0,2 aA	4,8 ± 0,4 aB	6,0 ± 0,1 bB
Malvidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido cis	1,1 ± 0,2 a	1,1 ± 0,1 a	1,2 ± 0,1 a	1,3 ± 0,1 a	nd	nd
Malvidina-3-(6"-p-cumaril)glucósido trans	11,8 ± 1,0 aA	13,0 ± 0,4 a	14,3 ± 0,5 a	17,2 ± 0,1 bA	18,3 ± 0,5 aB	21,6 ± 0,6 bB
<b>Antocianinas cumariladas</b>	23,2 ± 1,6 aA (6,4)	25,9 ± 0,9 a (6,4)	27,7 ± 0,7 a (6,9)	33,4 ± 0,2 bA (7,0)	32,3 ± 0,8 aB (6,8)	37,8 ± 0,5 bB (7,3)
<b>Antocianinas cinamiladas</b>	24,1 ± 1,6 aA (6,6)	26,9 ± 0,9 ab (6,7)	28,8 ± 0,6 b (7,2)	34,5 ± 0,2 cA (7,3)	36,2 ± 0,9 aB (7,7)	42,4 ± 0,5 bB (8,2)
Vitisina A	12,2 ± 1,4 aA	12,6 ± 0,9 a	10,2 ± 0,9 a	10,2 ± 0,6 aA	10,5 ± 0,2 aA	12,6 ± 0,3 bB
Vitisina B	3,2 ± 0,4 aA	4,2 ± 0,3 ab	4,9 ± 0,3 bc	6,0 ± 0,1 cA	4,7 ± 0,1 aB	5,8 ± 0,1 bA
Peonidina-3-glucósido piruvato	2,9 ± 0,3 aA	3,5 ± 0,2 a	3,3 ± 0,2 a	3,4 ± 0,1 aA	4,2 ± 0,1 aB	4,9 ± 0,1 bB
Malvidina-3-(6"-acetil)glucósido piruvato	3,4 ± 0,4 aA	4,0 ± 0,1 a	3,3 ± 0,1 a	3,9 ± 0,1 aA	4,3 ± 0,1 aA	5,3 ± 0,1 bB
Malvidina-3-glucósido-etil-epicatequina	3,5 ± 0,5 aA	4,0 ± 0,1 a	4,7 ± 0,6 a	6,9 ± 0,1 bA	5,8 ± 0,1 aB	6,4 ± 0,2 aA
Malvidina-3-glucósido-4-vinilfenol	0,33 ± 0,03 a	0,37 ± 0,03 a	1,00 ± 0,06 b	1,03 ± 0,09 b	nd	nd
<b>Piranoantocianinas</b>	25,5 ± 2,9 aA (7,0)	28,7 ± 0,5 a (7,1)	27,4 ± 0,6 a (6,8)	31,4 ± 0,5 aA (6,6)	29,5 ± 0,5 aA (6,3)	35,0 ± 0,3 bB (6,7)
<b>Antocianinas totales</b>	364,2 ± 3,2 aA	404,4 ± 4,7 b	403,4 ± 9,0 b	474,9 ± 10,2 cA	471,5 ± 7,7 aB	519,4 ± 6,7 bB
Σ glucosiladas / Σ acetiladas	4,1	3,9	3,8	3,8	4,3	4,0
Σ glucosiladas / Σ cumariladas	10,9	10,7	9,9	9,7	10,2	9,3
Σ cumariladas / Σ acetiladas	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Σ acetiladas / Σ cumariladas	2,6	2,7	2,6	2,6	2,4	2,3

\* Media (mg/L) ± error estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey HSD, p < 0,05). Letras minúsculas (a, b, c) son utilizadas para comparar los tratamientos en la misma vendimia. Letras mayúsculas (A, B) son utilizadas para comparar vinos del mismo tratamiento en diferentes vendimias. Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre derivados antociánicos por acilación y antocianinas totales. nd, no detectado. Tratamientos: C, Control; T1, sangrado 10%; T2, sangrado 20%; T3, sangrado 30%.

### 3.2.3. Perfil de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

Adicionalmente, se determinaron los compuestos fenólicos no-antociánicos, cuyos resultados al momento de embotellado se presentan en la **Tabla 4**. Coincidiendo con las observaciones realizadas en los Capítulos I-V y con datos reportados por diversos autores en otras variedades tintas (Monagas et al., 2005d; Hermosín Gutiérrez et al., 2005; Hernández et al., 2006), el grupo de los flavonoides constituyó la fracción más abundante en las muestras analizadas (81,0% en 2010 y 82,4% en 2011) comparada con los no-flavonoides (19,0% en 2010 y 17,6% en 2011).

Al comparar las dos vendimias, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la tasa de algunos compuestos, en concordancia con los resultados obtenidos en uvas (**Figuras 5 y 6**). Con respecto a los no-flavonoides, los vinos de la vendimia 2011 presentaron niveles significativamente superiores de ácidos hidroxibenzoicos (principalmente gálico y protocatéquico) y triptofol; mientras que en el año 2010, se observó una mayor concentración de estilbenos.

Analizando el grupo de los flavonoides, sólo se observó la influencia de la vendimia en el contenido de flavanoles, encontrándose niveles significativamente superiores en 2011. Estos compuestos representaron la fracción más abundante de los fenoles no-antociánicos, con concentraciones comprendidas entre 107,1 mg/L (2010) y 166,0 mg/L (2011). En los vinos de ambos años, el contenido de (+)-catequina fue superior al de (-)-epicatequina mostrando una relación de 1,5 (2011) y 1,8 (2010), lo cual coincide con los datos reportados en el Capítulo I. En general, los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por diversos autores en otras variedades tintas (de Villiers et al., 2005; Monagas et al., 2005d; Makris et al., 2006b).

Con respecto a los flavonoles y dihidroflavonoles, si bien no existieron diferencias significativas entre vendimias, se observaron valores levemente superiores en 2011 en concordancia con los resultados obtenidos en uvas. El contenido total de flavonoles en las muestras analizadas varió entre 87,1 mg/L (2010) y 90,1 mg/L (2011), representando alrededor del 20% de los fenoles no-antociánicos determinados. Con respecto a la distribución de los distintos compuestos, se observaron perfiles diferentes en ambos años. En la vendimia 2010, la estructura mayoritaria correspondió a la miricetina con sus respectivos derivados (32,4%), seguida por kaempferol (25,8%), quercetina y sus derivados (23,2%), siringetina (7,9%), isoramnetina (5,9%) y naringenina (4,7%); mientras que en la vendimia 2011, predominó el kaempferol (33,3%), seguido por quercetina (20,6%), miricetina (19,7%), isoramnetina (14,2%), siringetina (6,3%) y naringenina (5,9%). Por otro lado, la mayor parte de estos compuestos se encontraron bajo la forma glicosilada, principalmente como glucósidos (62,6% en 2010 y 50,0% en 2011), glucurónidos (26,0% en 2010 y 26,8% en 2011), galactósidos (7,3% en 2010 y 16,0% en 2011) y ramnósidos (4,0% en 2010 y 7,2% en 2011), apreciándose una selectividad diferencial de las enzimas glicosil-transferasas sobre el sustrato utilizado en el proceso biosintético. En general, los niveles de flavonoles observados en los vinos

Malbec coinciden con los reportados por diversos autores en otras variedades tintas (Makris et al., 2006b; Castillo-Muñoz et al., 2007).

**Tabla 4.** Compuestos fenólicos de bajo peso molecular cuantificados en vinos Malbec al momento de embotellado (2010-2011). Influencia de distintos niveles de sangrado.

Compuesto	2010			2011		
	C	T1	T2	T3	C	T3
<b>No-flavonoides</b>						
Acido gálico	6,5 ± 0,3* aA	6,5 ± 0,5 a	7,1 ± 0,5 a	7,2 ± 0,4 aA	10,0 ± 0,2 aB	11,7 ± 0,3 bB
Acido protocatéquico	0,63 ± 0,03 aA	0,63 ± 0,03 a	0,63 ± 0,03 a	0,63 ± 0,03 aA	0,77 ± 0,03 aB	0,80 ± 0,01 aB
Acido siríngico	2,6 ± 0,3 aA	3,3 ± 0,1 b	3,4 ± 0,1 b	3,6 ± 0,1 bB	2,4 ± 0,3 aA	2,7 ± 0,2 aA
Acido gentísico	1,7 ± 0,1 aA	1,7 ± 0,2 a	2,0 ± 0,1 a	2,0 ± 0,1 aA	1,8 ± 0,1 aA	1,9 ± 0,1 aA
Galato de metilo	2,47 ± 0,03 aA	2,57 ± 0,03 ab	2,77 ± 0,09 b	2,80 ± 0,06 bA	2,43 ± 0,03 aA	2,80 ± 0,12 bA
Galato de etilo	2,7 ± 0,2 aA	3,0 ± 0,3 a	3,4 ± 0,2 a	3,6 ± 0,2 aA	4,9 ± 0,1 aB	6,2 ± 0,1 bB
<b>Acidos hidroxibenzoicos/derivados</b>	16,6 ± 0,3 aA (4,5)	17,7 ± 1,1 a (4,6)	19,3 ± 0,7 a (4,8)	19,8 ± 0,6 aA (5,0)	22,3 ± 0,6 aB (5,0)	26,1 ± 0,9 bB (5,2)
Acido trans-caftarico	5,7 ± 0,6 aA	4,0 ± 0,6 a	4,1 ± 0,5 a	4,8 ± 0,3 aA	4,8 ± 0,3 aA	3,9 ± 0,2 aA
Acido cis-cutárico	0,93 ± 0,03 aA	0,77 ± 0,07 a	0,83 ± 0,03 a	0,80 ± 0,12 aA	1,23 ± 0,03 aB	1,13 ± 0,03 aA
Acido trans-cutárico	4,4 ± 0,2 aA	4,1 ± 0,5 a	4,1 ± 0,5 a	3,9 ± 0,6 aA	4,0 ± 0,1 aA	4,1 ± 0,1 aA
Acido trans-fertárico	3,10 ± 0,21 aA	3,97 ± 0,03 b	4,13 ± 0,09 b	3,87 ± 0,07 bB	3,03 ± 0,03 aA	3,30 ± 0,06 bA
Acido trans-caféico	1,8 ± 0,1 aA	1,8 ± 0,1 a	1,9 ± 0,2 a	1,9 ± 0,1 aA	2,5 ± 0,1 aB	2,9 ± 0,1 bB
Acido trans-p-cumárico	2,4 ± 0,1 aA	2,3 ± 0,2 a	2,5 ± 0,3 a	2,9 ± 0,2 aA	3,6 ± 0,2 aB	4,1 ± 0,1 aB
<b>Acidos hidroxinámicos/derivados</b>	18,3 ± 0,8 aA (5,0)	16,9 ± 1,5 a (4,4)	17,6 ± 1,3 a (4,4)	18,3 ± 1,2 aA (4,6)	19,2 ± 0,4 aA (4,3)	19,4 ± 0,1 aA (3,9)
Glucósido de trans-resveratrol	2,1 ± 0,1 aB	2,6 ± 0,1 b	2,8 ± 0,2 b	2,4 ± 0,1 abA	1,6 ± 0,1 aA	2,0 ± 0,2 aA
Glucósido de cis-resveratrol	2,7 ± 0,2 aB	3,1 ± 0,1 a	3,1 ± 0,2 a	2,9 ± 0,2 aB	1,0 ± 0,1 aA	1,0 ± 0,1 aA
<b>Estilbenos</b>	4,8 ± 0,2 aB (1,3)	5,7 ± 0,1 ab (1,5)	5,9 ± 0,3 b (1,5)	5,3 ± 0,3 abB (1,3)	2,6 ± 0,1 aA (0,6)	3,0 ± 0,2 aA (0,6)
Tirosol	22,2 ± 0,7 aA	21,6 ± 1,3 a	21,3 ± 0,6 a	20,8 ± 0,3 aA	23,2 ± 0,4 aA	21,8 ± 0,6 aA
Triptofol	7,8 ± 0,2 aA	8,3 ± 0,6 a	8,5 ± 0,5 a	7,8 ± 0,4 aA	10,8 ± 0,8 aB	11,1 ± 0,5 aB
<b>Alcoholes fenólicos/compuestos relacionados</b>	30,0 ± 0,8 aA (8,2)	29,9 ± 1,9 a (7,7)	29,8 ± 1,2 a (7,4)	28,6 ± 0,6 aA (7,2)	34,0 ± 1,1 aB (7,7)	32,9 ± 1,0 aB (6,5)
<b>No-flavonoides totales</b>	69,7 ± 1,0 aA (19,0)	70,2 ± 4,5 a (18,2)	72,6 ± 3,1 a (18,1)	72,0 ± 2,2 aA (18,1)	78,1 ± 1,2 aB (17,6)	81,4 ± 0,2 aB (16,1)

\* Media (mg/L) ± error estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey HSD, p < 0,05). Letras minúsculas (a, b, c) son utilizadas para comparar los tratamientos en la misma vendimia. Letras mayúsculas (A, B) son utilizadas para comparar vinos del mismo tratamiento en diferentes vendimias. Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre los distintos grupos fenólicos y fenoles totales. nd, no detectado. Tratamientos: C, Control; T1, sangrado 10%, T2, sangrado 20%, T3, sangrado 30%.

Compuesto	2010			2011		
	C	T1	T2	T3	C	T3
<b>Flavonoides</b>						
(+)-Catequina	21,3 ± 0,3 aA	21,3 ± 1,7 a	22,2 ± 1,5 a	22,5 ± 1,1 aA	29,8 ± 0,4 aB	35,5 ± 1,0 bB
(-)-Epicatequina	11,8 ± 0,4 aA	11,2 ± 1,1 a	11,1 ± 0,6 a	10,7 ± 0,7 aA	20,4 ± 0,5 aB	25,6 ± 0,1 bB
Dímero de procianidina 1	6,2 ± 0,2 aA	6,0 ± 0,8 a	5,0 ± 0,4 a	5,6 ± 0,3 aA	11,9 ± 0,4 aB	16,1 ± 0,3 bB
Dímero de procianidina 2	39,0 ± 1,2 aA	39,8 ± 0,7 a	41,5 ± 1,7 a	40,2 ± 0,4 aA	48,2 ± 1,8 aB	55,3 ± 2,8 aB
Trímero de procianidina 1	5,5 ± 0,1 aA	5,9 ± 0,3 a	7,5 ± 0,4 b	7,7 ± 0,2 bA	5,7 ± 0,3 aA	6,6 ± 0,6 aA
Trímero de procianidina 2	5,0 ± 0,2 aA	5,3 ± 0,2 a	5,3 ± 0,3 a	5,5 ± 0,1 aA	5,9 ± 0,2 aB	7,1 ± 0,5 aB
Trímero de procianidina 3	7,9 ± 0,2 aA	8,4 ± 0,1 ab	8,7 ± 0,1 b	8,4 ± 0,1 abA	13,0 ± 0,6 aB	15,1 ± 0,5 bB
Trímero de procianidina 4	10,4 ± 0,4 aA	11,3 ± 0,3 ab	12,0 ± 0,3 bc	12,8 ± 0,3 cA	31,1 ± 2,1 aB	31,3 ± 0,4 aB
<b>Flavonoles</b>	107,1 ± 0,9 aA (29,2)	109,2 ± 2,6 a (28,2)	113,3 ± 0,7 a (28,3)	113,4 ± 2,0 aA (28,4)	166,0 ± 3,8 aB (37,5)	192,6 ± 5,2 bB (38,2)
Miricetina-3-glucurónido	7,4 ± 0,3 aB	7,0 ± 0,3 a	7,3 ± 0,1 a	7,2 ± 0,2 aB	4,2 ± 0,1 aA	4,4 ± 0,1 aA
Miricetina-3-galactósido	4,4 ± 0,1 aA	5,8 ± 0,1 b	5,8 ± 0,1 b	5,5 ± 0,1 bA	8,8 ± 0,3 aB	10,6 ± 0,4 bB
Miricetina-3-glucósido	16,4 ± 1,2 aB	18,3 ± 0,1 a	18,1 ± 0,5 a	18,5 ± 0,9 aB	4,9 ± 0,1 aA	7,2 ± 0,3 bA
Quercetina-3-glucurónido	8,4 ± 0,3 aA	9,4 ± 0,2 a	9,2 ± 0,3 a	9,3 ± 0,1 aA	10,5 ± 0,5 aB	12,9 ± 0,1 bB
Quercetina-3-glucósido	9,4 ± 0,2 aB	11,0 ± 0,3 b	11,6 ± 0,2 b	11,6 ± 0,3 bB	4,1 ± 0,4 aA	5,5 ± 0,2 aA
Quercetina-3-rannósido	2,43 ± 0,18 aA	3,23 ± 0,03 b	3,53 ± 0,03 b	3,40 ± 0,12 bA	3,93 ± 0,09 aB	4,57 ± 0,20 bB
Isoramnetina-3-glucósido	5,2 ± 0,1 aA	6,7 ± 0,2 b	7,5 ± 0,4 b	8,0 ± 0,3 bA	12,9 ± 1,5 aB	14,7 ± 0,1 aB
Siringetina-3-glucósido	6,9 ± 0,2 aB	7,2 ± 0,2 a	7,4 ± 0,1 a	7,2 ± 0,2 aA	5,6 ± 0,2 aA	6,7 ± 0,2 bA
Naringenina	4,1 ± 0,1 aA	4,6 ± 0,1 b	4,7 ± 0,1 b	4,7 ± 0,1 bA	5,3 ± 0,5 aA	6,3 ± 0,3 aB
Kaempferol	22,5 ± 0,2 aA	25,6 ± 1,2 a	30,1 ± 0,5 b	29,3 ± 0,7 bA	29,9 ± 0,4 aB	33,3 ± 0,5 bB
<b>Flavonoles</b>	87,1 ± 1,8 aA (23,6)	98,8 ± 2,0 b (25,5)	105,2 ± 1,5 b (26,4)	104,7 ± 1,3 bA (26,4)	90,1 ± 3,0 aA (20,4)	106,2 ± 1,0 bA (21,1)
Dihidroquercetina-3-rannósido	7,0 ± 0,2 aB	7,5 ± 0,2 a	7,7 ± 0,1 a	7,6 ± 0,1 aA	6,2 ± 0,2 aA	7,3 ± 0,6 aA
Dihidrokaempferol-3-glucósido	29,8 ± 0,4 aA	31,8 ± 0,6 ab	32,5 ± 0,4 b	32,4 ± 0,2 bA	35,8 ± 1,9 aB	43,3 ± 0,2 bB
Dihidroquercetina-3-glucósido	66,2 ± 1,5 aA	69,0 ± 2,2 a	69,4 ± 1,0 a	68,4 ± 0,5 aA	66,3 ± 1,1 aA	73,6 ± 1,3 bB
<b>Dihidroflavonoles</b>	103,0 ± 2,1 aA (28,1)	108,3 ± 3,0 a (28,0)	109,6 ± 1,4 a (27,3)	108,4 ± 0,6 aA (27,2)	108,3 ± 2,0 aA (24,5)	124,2 ± 1,7 bB (24,6)
<b>Flavonoides totales</b>	297,2 ± 4,1 aA (81,0)	316,3 ± 7,6 ab (81,8)	328,1 ± 1,7 b (81,9)	326,5 ± 1,4 bA (81,9)	364,4 ± 5,5 aB (82,4)	423,0 ± 7,9 bB (83,9)
<b>Fenoles no-antocianínicos totales</b>	366,9 ± 5,1 aA	386,5 ± 11,8 ab	400,7 ± 4,4 b	398,5 ± 3,4 abA	442,5 ± 6,7 aB	504,4 ± 7,6 bB

\* Media (mg/L) ± error estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey HSD, p<0,05). Letras minúsculas (a, b, c) son utilizadas para comparar los tratamientos en la misma vendimia. Letras mayúsculas (A, B) son utilizadas para comparar vinos del mismo tratamiento en diferentes vendimias. Valores entre paréntesis indican la relación (%) entre los distintos grupos fenólicos y fenoles totales. nd, no detectado. Tratamientos: C, Control; T1, sangrado 10%, T2, sangrado 20%, T3, sangrado 30%.



Por último, es importante destacar la presencia de dihidroflavonoles en los vinos analizados. Al igual que en los vinos Malbec evaluados en los Capítulos I-V, este grupo mostró nuevamente niveles elevados y característicos de la variedad. El contenido total en las muestras estuvo comprendido entre 103,0 mg/L (2010) y 108,3 mg/L (2011), representando entre el 24,5% (2010) y el 28,1% (2011) de la totalidad de los fenoles no-antociánicos determinados (**Tabla 4**).

A partir de las observaciones realizadas y considerando conjuntamente los niveles de los distintos parámetros fenólicos determinados, se pueden evidenciar las diferencias existentes entre los vinos Malbec provenientes del tratamiento control en las dos vendimias evaluadas. Los resultados indican un mayor potencial en el año 2011 para la producción de vinos de mayor estructura, con coloraciones intensas y estables en el tiempo.

### **3.3. Efecto del sangrado sobre la composición fenólica del vino**

En el siguiente apartado se procedió a analizar la influencia del tratamiento de sangrado sobre la composición fenólica de vinos Malbec en las dos vendimias consecutivas (2010-2011). Inicialmente, se evaluaron los tratamientos T1 (10%), T2 (20%) y T3 (30%), frente al tratamiento control (C) sin sangrado, en vinos elaborados durante el año 2010. Posteriormente, se realizó la comparación de la aplicación de T3 en las dos vendimias y se evaluó la incidencia del factor “año”. Por último, se estudió la evolución de la composición fenólica de los vinos obtenidos mediante C y T3 durante todo el proceso de elaboración (encubado, maceración/fermentación, descube y embotellado) y almacenamiento en botella (3 meses), en la vendimia 2011.

#### **3.3.1. Influencia de distintos niveles de sangrado sobre la composición fenólica de los vinos elaborados en la vendimia 2010**

##### **3.3.1.1. Parámetros analíticos generales**

La **Tabla 2** muestra los resultados correspondientes a los parámetros determinados al momento de embotellado. Al observar los porcentajes de alcohol en todos los vinos analizados, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ( $p > 0,05$ ). La uniformidad obtenida respecto a este parámetro facilita la comparación de los resultados entre los diferentes vinos, ya que la concentración de etanol (principalmente etanol) influye notablemente sobre la extracción de los compuestos fenólicos. En lo que respecta a la acidez titulable y al pH, si bien tampoco existieron diferencias significativas, los vinos obtenidos mediante el sangrado presentaron valores ligeramente inferiores de acidez y superiores de pH comparados con el control, lo cual podría atribuirse a una mayor solubilización de sales de potasio y de calcio provocada por el incremento de la proporción de hollejos y semillas (Zamora et al., 1994).

Con respecto a los parámetros fenólicos generales, se observó que sólo el contenido de antocianos totales fue modificado significativamente por los tratamientos de sangrado, generando un aumento del 4% (T1), 6% (T2) y 16% (T3) respecto al control. Una tendencia similar se obtuvo en los niveles de antocianos libres y combinados, fenoles totales y proantocianidinas totales, pero sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas entre los vinos analizados ( $p > 0,05$ ). En cuanto a la concentración molar de flavanoles y el índice de gelatina, las muestras evaluadas mostraron valores comparables. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Zamora et al. (1994) empleando uvas Malbec de Cahors durante tres temporadas consecutivas, y con los observados por Baustista-Ortín et al. (2004 y 2007), Puertas et al. (2008) y Harbertson et al. (2009) en otras variedades tintas.

Al analizar los parámetros de color, si bien no existieron diferencias significativas en la IC, se observaron niveles levemente superiores con la aplicación de las distintas proporciones de sangrado, acompañados por un menor valor de  $L^*$  y mayor  $h$  y  $b^*$ , indicando un color más intenso debido principalmente a la componente azul (% de color azul). Por otro lado, a diferencia de lo observado por otros autores (Zamora et al., 1994; Puertas et al., 2008), los vinos obtenidos con el sangrado mostraron un matiz levemente superior y valores de  $a^*$  y % de color rojo inferiores respecto al control. Paralelamente, se calculó la diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) entre los vinos provenientes de los distintos tratamientos (**Figura 7**). Este parámetro resulta de gran interés para la industria vitivinícola ya que expresa la capacidad del ojo humano para discriminar dos vinos a través del color. Pérez-Magariño y González-Sanjosé (2003) establecieron que los catadores serían capaces de distinguir el color de dos vinos a través de una copa sólo si  $\Delta E^* \geq 5$  unidades. En el presente estudio los valores de  $\Delta E^*$  fueron similares entre todos los tratamientos ( $p > 0,05$ ) e inferiores a 5 unidades, corroborando la similitud analítica obtenida en la intensidad colorante (IC).

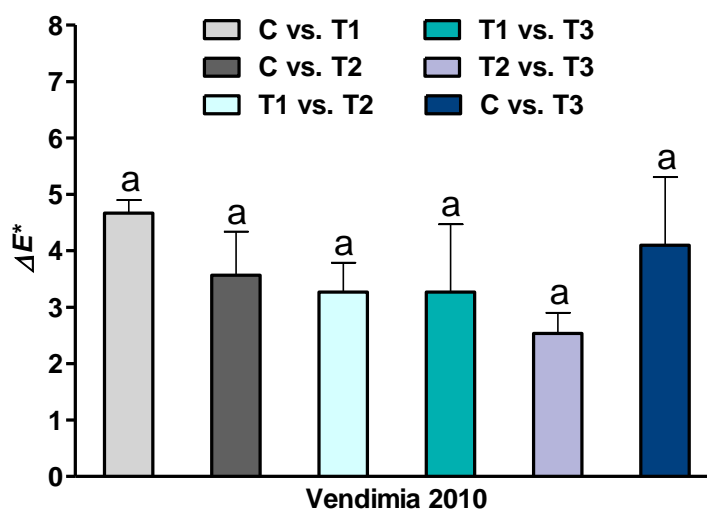


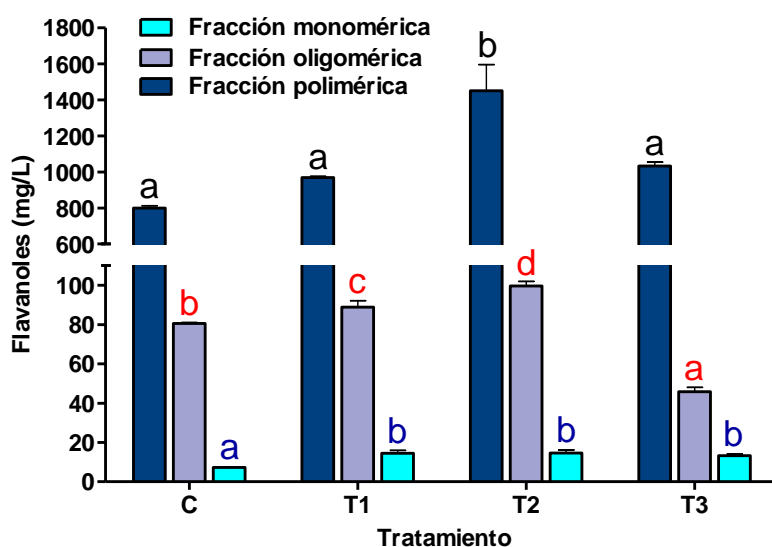
Figura 7. Diferencia de color total  $\Delta E^*$  entre vinos Malbec obtenidos con distintos niveles de sangrado (vendimia 2010).

Finalmente, considerando la contribución del color copigmentado (CC) y del color polimérico (CP) al color total del vino, la técnica de sangrado no modificó estos parámetros, indicando hasta el momento (vino embotellado, 45 días después del descube) una estabilidad de color similar en comparación con los vinos control. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por Bautista-Ortín et al. (2007). La situación descrita podría cambiar durante el almacenamiento en botella, si el contenido levemente superior de compuestos fenólicos de los vinos obtenidos con sangrado favoreciera con el tiempo las reacciones de condensación y/o polimerización de los pigmentos antocianicos detalladas por Monagas y Bartolomé (2009).

### 3.3.1.2. Análisis de flavanoles

#### 3.3.1.2.1. Fraccionamiento de flavanoles en monómeros, oligómeros y polímeros

La **Figura 8** muestra la distribución de las fracciones flavánicas en los vinos Malbec provenientes de los tratamientos evaluados. Según diversos autores (Sun et al., 1998a) la fracción monomérica consiste sólo de (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-galato, la fracción oligomérica está formada por dímeros, trímeros y tetrámeros de procianidinas, y la fracción polimérica la componen las proantocianidinas (> 4 unidades). En todos los vinos analizados, las proantocianidinas poliméricas constituyeron la fracción predominante, seguido por la fracción oligomérica y monomérica (**Tabla 5**). Estos resultados coinciden con las proporciones observadas en el Apartado I.3 (Capítulo I) y en las reportados por diversos autores (Sun et al., 2001b; Monagas et al., 2003b; Cosme et al., 2009) en vinos españoles y portugueses de otras variedades tintas.



**Figura 8.** Fracciones monomérica, oligomérica y polimérica de flavanoles en vinos Malbec obtenidos con distintos tratamientos de sangrado (vendimia 2010). Letras distintas en cada fracción indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

<b>Tabla 5.</b> Proporción relativa porcentual de las distintas fracciones flavánicas en vinos Malbec (vendimia 2010).				
<b>Flavanoles</b>	<b>Tratamientos</b>			
	<b>C</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
Fracción monomérica	0,8	1,3	0,9	1,2
Fracción oligomérica	9,1	8,3	6,4	4,2
Fracción polimérica	90,1	90,4	92,7	94,6
Tratamientos: C, Control; T1, sangrado 10%, T2, sangrado 20%, T3, sangrado 30%.				

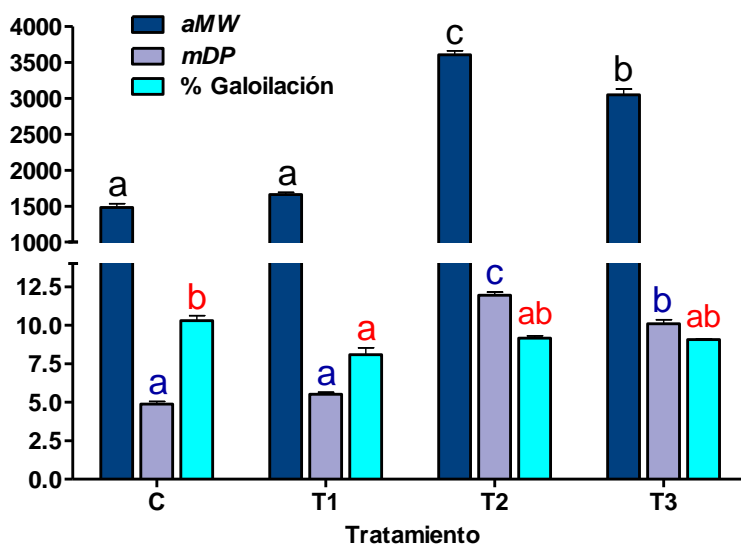
Al analizar la influencia de los distintos tratamientos sobre estos compuestos, se observaron diferencias significativas entre los mismos para cada fracción considerada ( $p < 0,05$ ). Con respecto a la fracción polimérica, los resultados mostraron una tendencia diferente a la obtenida en la determinación espectrofotométrica global de proantocianidinas (**Tabla 2**). Los vinos T2 presentaron la mayor concentración de polímeros, sugiriendo posiblemente una mayor sensación de astringencia y estructura en boca comparados con el resto. Por su parte, la fracción oligomérica reveló un comportamiento similar, con diferencias significativas entre todos los tratamientos; mientras que la fracción monomérica fue mayor en los 3 tratamientos de sangrado respecto de C, sin observarse diferencias entre los mismos. Esto podría traducirse en un aporte adicional de amargor por parte del sangrado sobre los vinos (Santos-Buelga y De Freitas, 2009).

En general, se observó un aumento en el contenido de flavanoles de cada fracción (mg/L) al aumentar el porcentaje de sangrado hasta un 20% (T2), seguido de una disminución notoria en T3 (30%). La razón del aumento de flavanoles en el vino al incrementarse el nivel de sangrado podría deberse a la disminución de líquido y a un aumento de la proporción de hollejos y semillas, mejorando hasta cierto punto la extracción de compuestos fenólicos (Sacchi et al., 2005). La extracción máxima en una vinificación tradicional en tinto se consigue cuando se igualan las concentraciones de los compuestos en ambas fases (líquida y sólida), obteniéndose menos del 50% de los compuestos fenólicos totales presentes inicialmente en la uva y quedando en los orujos el resto de los mismos sin aprovechar (Boulton et al., 2002). Por ende, posiblemente la menor proporción de líquido en T3 permita que la igualdad de concentraciones entre las dos fases se alcance más rápidamente, quedando gran parte del contenido flavánico en los hollejos y semillas, hecho que demuestra las deficientes condiciones de este tratamiento para una mejor extracción. En otras palabras, la extracción y solubilidad de compuestos probablemente esté limitada al no existir la cantidad de líquido suficiente para disolverlos.

### 3.3.1.2.2. Análisis de proantocianidinas mediante floroglucinólisis

La **Figura 9** muestra los resultados del análisis de proantocianidinas en los vinos Malbec provenientes de los tratamientos evaluados, empleando el método de catálisis ácida en presencia del

nucleófilo floroglucinol (Anexo I). Como se puede observar, los parámetros determinados fueron el grado medio de polimerización (*mDP*), el porcentaje de galoilación (%*G*) y el peso molecular promedio (*aMW*).



**Figura 9.** Valores de *mDP*, *aMW* y %*G* en vinos Malbec obtenidos con distintos tratamientos de sangrado (vendimia 2010). Letras distintas en cada parámetro indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Con respecto al *mDP* y al *aMW*, se observó un patrón semejante al observado en las distintas fracciones de flavanoles (**Figura 8**), con valores significativamente superiores en T2 comparados con el resto. Los resultados obtenidos en todas las muestras son concordantes a los reportados en la literatura para vinos de diferentes variedades tintas producidos en otras partes del mundo (Cosme et al., 2009; Busse-Valverde et al., 2010; Chira et al., 2011; Kontoudakis et al., 2011b,c). Por su parte, el %*G* mostró un patrón irregular entre tratamientos, siendo los vinos control los que presentaron el mayor contenido de unidades galoiladas. En general, los niveles observados en todas las muestras fueron algo elevados en relación a los obtenidos por diversos autores en los trabajos mencionados anteriormente, indicando posiblemente un aporte superior de proantocianidinas de semillas al contenido total de los vinos Malbec estudiados.

Los resultados obtenidos confirman que aún realizando un sangrado mínimo se logran diferencias significativas en la concentración y estructura de flavanoles, generando posiblemente una mejora cualitativa de los vinos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el contenido de polímeros junto al *mDP* dependerá de la técnica de fraccionamiento empleada y de las condiciones generales que afectan anualmente a la uva, además del aporte exclusivo de la variedad.

### 3.3.1.3. Perfil de antocianinas individuales

La **Tabla 3** muestra los resultados correspondientes a las antocianinas individuales determinadas al momento de embotellado. Coincidente con los resultados obtenidos en la determinación de antocianos por espectrofotometría (**Tabla 2**), se observaron diferencias cuantitativas significativas entre los tratamientos evaluados ( $p < 0,05$ ). Con respecto a los derivados glucosilados, los tratamientos de sangrado generaron un aumento de concentración de 9,9% (T1), 8,7% (T2) y 27,8% (T3) comparados con C, presentándose sólo diferencias significativas en T3. Al analizar los derivados acetilados, T1 y T2 mostraron un efecto significativo semejante respecto de C con un incremento de 15,1% y 17,1% respectivamente, en tanto T3 se diferenció del resto produciendo un 39,2% más que el control. Por su parte, las antocianinas cumariladas constituyeron la fracción de compuestos más influenciada por el sangrado observándose variaciones de 11,3% (T1), 19,0% (T2) y 43,3% (T3) comparado con los vinos control. Estos resultados difieren de los obtenidos por Bautista-Ortín et al. (2007) y Puertas et al. (2008), aplicando una proporción de sangrado del 15% y 20%, respectivamente.

Finalmente, considerando el grupo de las piranoantocianinas, sólo la vitisina B mostró una tendencia de concentración creciente con el nivel de sangrado, mientras que la malvidina-3-glucósido-etil-epicatequina y la malvidina-3-glucósido-4-vinilfenol fueron solamente afectadas en forma significativa por T3.

### 3.3.1.4. Perfil de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

La **Tabla 4** muestra los resultados correspondientes a los compuestos fenólicos no-antociánicos determinados al momento de embotellado (45 días post-descube). Al evaluar la influencia de los tratamientos de sangrado, se observaron diferencias significativas en la tasa de algunos compuestos ( $p < 0,05$ ). Con respecto a los no-flavonoides, sólo el contenido de ácido siríngico, galato de metilo, ácido *trans*-ferráico y glucósido de *trans*-resveratrol fue afectado positivamente por el sangrado ( $p < 0,05$ ), sin apreciarse diferencias entre los tratamientos T1, T2 y T3. Analizando el grupo de los flavonoides, sólo se observó la influencia del sangrado en el contenido de diversos flavonoles, encontrándose niveles significativamente superiores en T2 y T3. Por su parte, considerando por separado la sumatoria de flavanoles y dihidroflavonoles, si bien no existieron diferencias significativas entre tratamientos, se observaron valores levemente superiores con el sangrado, en concordancia con los resultados generales presentados en la **Tabla 2**.

Considerando conjuntamente todos los parámetros fenólicos determinados, los resultados obtenidos permiten confirmar que las diferencias producidas en la proporción sólido/líquido del mosto durante la vinificación, a través de los distintos niveles de sangrado, no se traducen en modificaciones composicionales proporcionales al tratamiento efectuado. En general, los

tratamientos T1 y T2 mostraron un comportamiento semejante, y en muchos casos no significativo, sobre los compuestos fenólicos, comparados con el control; mientras que el tratamiento más drástico (T3) generó modificaciones sustanciales especialmente en el contenido de antocianinas.

### 3.3.2. Estudio comparativo del efecto del sangrado (T3) en las vendimias 2010 y 2011

#### 3.3.2.1. Parámetros analíticos generales

Los valores de grado alcohólico, acidez titulable y pH, en los vinos obtenidos con T3 en la vendimia 2011, mostraron una tendencia similar a la observada en el año 2010, sin diferencias significativas respecto al control (**Tabla 2**). En las dos vendimias, el T3 generó un leve aumento en el pH de los vinos, acompañado de una disminución no significativa del grado alcohólico.

Al analizar los parámetros fenólicos generales, la aplicación de T3 en la vendimia 2011 generó una modificación diferencial de la composición del vino, comparado con el año 2010 (**Tabla 2**). Este comportamiento se confirmó principalmente en los niveles de antocianos (libres y totales), fenoles totales, proantocianidinas totales y flavanoles DMACH, presentándose diferencias significativas entre C y T3 en 2011, con incrementos superiores a los observados en 2010 (**Tabla 6**).

Parámetro	Incremento respecto al control (%)	
	2010	2011
Antocianos totales	15,9	17,1
Antocianos libres	17,1	19,5
Antocianos combinados	13,5	14,1
Intensidad colorante	6,4	19,3
Fenoles totales	13,5	14,4
Proantocianidinas totales	12,1	18,1
Flavanoles DMACH	3,1	16,2

Con respecto a los parámetros de color, en la vendimia 2011 la IC de los vinos obtenidos con T3 fue significativamente superior comparado con C, coincidiendo con los niveles de antocianos (**Tablas 2 y 6**). Paralelamente, a diferencia de lo observado en 2010, los vinos 2011 obtenidos con T3 presentaron valores significativamente inferiores de  $L^*$  y mayores de  $h$  y  $b^*$  respecto del control, indicando un color más intenso debido principalmente a la componente azul (% de color azul). Por su parte, las proporciones de las componentes amarilla y roja del color fueron semejantes entre ambos tratamientos.

Finalmente, analizando la contribución del CC (%) al color total del vino, si bien no existieron diferencias significativas, en los vinos de la vendimia 2011 el T3 generó un aumento del 9,3%

comparado con el control, debido probablemente al incremento producido en el contenido de antocianos libres y de otros compuestos (copigmentos); mientras que en la vendimia 2010, no se observó dicha variación. Por su parte, el grado de polimerización (CP) fue inalterado por el tratamiento de sangrado, coincidiendo en ambos años con los niveles de antocianos combinados (**Tabla 2**).

### 3.3.2.2. Perfil de antocianinas individuales

La **Tabla 3** muestra los resultados correspondientes a las antocianinas individuales determinadas al momento de embotellado. En la vendimia 2011, coincidente con los resultados obtenidos en 2010, se observaron diferencias cuantitativas significativas entre los tratamientos evaluados ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, la incidencia del sangrado (T3) en 2011 fue menor al efecto producido por este mismo tratamiento en la temporada anterior. La aplicación de este tratamiento en 2011 generó un aumento de 7,3% sobre los derivados glucosilados, 15,8% sobre los derivados acetilados y 17,4% sobre las antocianinas cumariladas, comparado con el tratamiento control.

Al comparar las dos vendimias, el T3 modificó diferencialmente la concentración individual de compuestos. En 2011, los vinos obtenidos alcanzaron mayores niveles de todas las antocianinas determinadas, a excepción de malvidina-3-(6"-acetil)glucósido y petunidina-3-(6"-*p*-cumaril)glucósido cuyos contenidos fueron superiores en la vendimia 2010.

Finalmente, considerando el grupo de las piranoantocianinas, se observó un efecto diferencial de T3 en las dos vendimias. En 2011, el sangrado aumentó significativamente el contenido de vitisina A, vitisina B, peonidina-3-glucósido piruvato y malvidina-3-(6"-acetil)glucósido piruvato, comparado con C; mientras que en 2010, el T3 sólo modificó el nivel de malvidina-3-glucósido-etil-epicatequina y la malvidina-3-glucósido-4-vinilfenol.

### 3.3.2.3. Perfil de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

Finalmente, se evaluaron los compuestos fenólicos no-antociánicos, cuyos resultados al momento de embotellado se presentan en la **Tabla 4**. En la vendimia 2011, coincidente con los resultados obtenidos en 2010, se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la tasa de algunos compuestos ( $p < 0,05$ ). En este 2º año, la incidencia del sangrado (T3) fue mayor respecto a la temporada anterior (**Tabla 7**).

Al comparar las dos vendimias, el T3 generó modificaciones en la concentración individual de distintos compuestos. Con respecto a los no-flavonoides, su aplicación en 2011 aumentó significativamente el contenido de ácido gálico, galatos de metilo y etilo, ácido *trans*-fertárico y ácido *trans*-cafeico; mientras que en 2010, el sangrado (T3) sólo afectó positivamente los niveles de ácido sirínico, galato de metilo, ácido *trans*-fertárico y glucósido de *trans*-resveratrol.



Analizando el grupo de los flavonoides, sólo se observó la influencia del factor “año” en el contenido de flavanoles, encontrándose niveles significativamente superiores en la vendimia 2011. En este año, el sangrado T3 aumentó significativamente el contenido de (+)-catequina, (-)-epicatequina, dímero de procianidina 1 y trímero de procianidina 3; mientras que en la vendimia 2010, el T3 sólo afectó los niveles de los trímeros de procianidina 1 y 4.

Con respecto a los flavonoles y dihidroflavonoles, si bien no existieron diferencias significativas entre vendimias respecto a los vinos control, el sangrado modificó de manera distinta su composición. En 2011, el T3 incidió positivamente sobre un mayor número de compuestos, comparado con el 2010 (Tabla 4).

Parámetro	Incremento respecto al control (%)	
	2010	2011
Acidos hidroxibenzoicos/derivados	19,4	17,2
Acidos hidroxicinámicos/derivados	0,0	2,1
Estilbenos	10,3	13,9
Alcoholes fenólicos	0,0	0,0
<i>No-flavonoides totales</i>	3,3	4,3
Flavonoles	6,0	16,0
Flavonoles	20,2	17,8
Dihidroflavonoles	5,1	14,6
<i>Flavonoides totales</i>	9,9	16,1
<b><i>Fenoles no-antociánicos totales</i></b>	<b>8,6</b>	<b>14,0</b>

A partir de las observaciones realizadas sobre los distintos parámetros fenólicos determinados, se puede evidenciar la influencia del factor “año” sobre la composición de los vinos elaborados con y sin la aplicación de la técnica de sangrado. Los resultados revelan la necesidad de evaluar exhaustivamente esta práctica enológica de acuerdo al objetivo buscado, ya que su influencia sobre la calidad del vino dependerá, entre otros factores, de la variedad de uva, de las características físicas y químicas de las bayas al momento de cosecha y de sus cambios producidos año a año.

### 3.3.3. Evolución de la composición fenólica de los vinos durante la vinificación y el almacenamiento en botella (vendimia 2011)

#### 3.3.3.1. Evolución de la temperatura y densidad en los mostos durante la vinificación

La Figura 10 muestra los perfiles comparables de temperatura y densidad durante la maceración/fermentación alcohólica de los mostos/vinos obtenidos con el tratamiento control y el sangrado T3 (30%). Los mostos/vinos de ambos tratamientos alcanzaron el nivel de rastros de azúcar

(< 1,8 g/L) luego de 11 días de fermentación, sin observarse diferencias significativas entre los mismos ( $p > 0,05$ ). Por su parte la temperatura de fermentación alcanzó un máximo de 28 °C entre los días 5 y 6, sin apreciarse diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ).

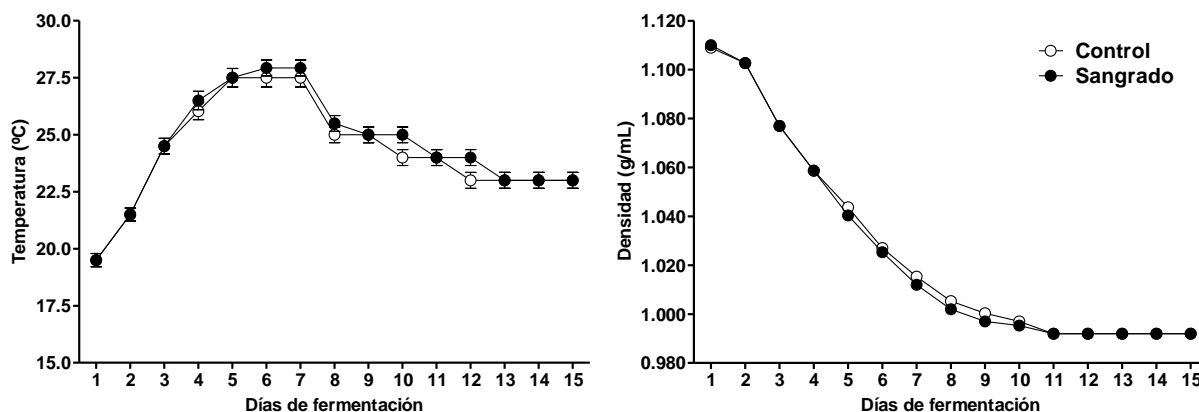


Figura 10. Evolución de densidad y temperatura en mostos/vinos Malbec durante la vinificación (2011).

### 3.3.3.2. Evolución de los parámetros fenólicos generales en los mostos/vinos durante la vinificación y el almacenamiento en botella

La Figura 11 muestra la evolución de los parámetros fenólicos globales determinados durante la maceración/fermentación en los mostos/vinos estudiados. Los antocianos fueron extraídos de los hollejos durante los primeros días de fermentación, alcanzando su máxima concentración al día 7 (coincidente con el consumo de >90% de los azúcares del mosto), seguido por una disminución sostenida hasta el descube (día 15 del proceso). Este descenso en el contenido de antocianos podría deberse a su fijación sobre levaduras o partículas sólidas en suspensión (Gil-Muñoz et al., 1999; Medina et al., 2005), reacciones de degradación y/o cambios estructurales como la formación de pigmentos poliméricos (Zimman y Waterhouse, 2004; Monagas y Bartolomé, 2009). Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Casassa (2007) en vinos Malbec y por diversos autores en otras variedades tintas (Gil-Muñoz et al., 1997 y 1999; Boulton et al., 2002; Bautista-Ortín et al., 2004 y 2007; Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Al analizar la evolución de la intensidad colorante, como era de esperar, se observó un comportamiento concordante con los niveles de antocianos. Sin embargo, la disminución de este parámetro fue menos pronunciada que la observada en el contenido de antocianos, debido probablemente a la formación de nuevos compuestos, principalmente a través de reacciones de condensación entre antocianinas y taninos, responsables de una cierta estabilidad de la intensidad colorante (Bautista-Ortín et al., 2007; Monagas y Bartolomé, 2009). Una tendencia similar presentó la componente roja del color, mientras que las componentes restantes (amarilla y azul) y el matiz mostraron un leve aumento hacia finales del

proceso, relacionado tentativamente a reacciones de condensación y polimerización entre antocianinas y otros polifenoles.

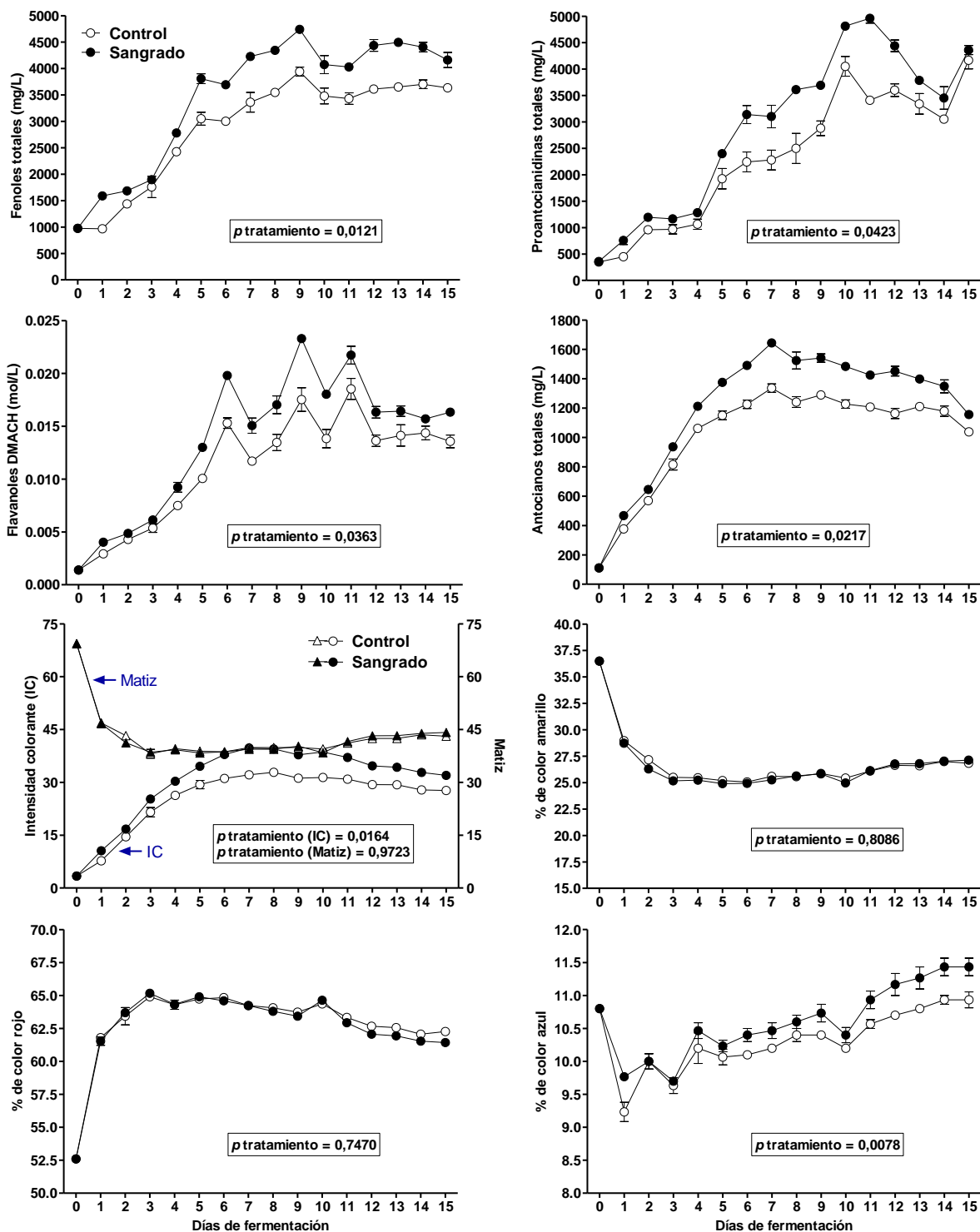


Figura 11. Evolución de parámetros fenólicos generales en mostos/vinos Malbec durante la vinificación (vendimia 2011). Comparación entre vinos control (C) y con sangrado (T3).

**Tabla 8.** Parámetros analíticos generales de vinos Malbec determinados en diferentes momentos del proceso de elaboración (2011). Comparación entre vinos control y con sangrado (T3).

Parámetro	Embotellado						Almacenamiento en botella (3 meses)	
	Descube			Sangrado			Control	Sangrado
	Control	Sangrado	Control	Sangrado	Control	Sangrado	Control	Sangrado
AT (Mv3gl, mg/L)	1037,8 ± 21,8 aB	1156,1 ± 21,1 bC	916,2 ± 15,5 aA	1073,2 ± 19,2 bB	876,4 ± 5,8 aA	958,4 ± 2,0 bA		
AL (Mv3gl, mg/L)	602,1 ± 13,4 aC	728,2 ± 15,3 bC	519,2 ± 17,6 aB	620,4 ± 6,7 bB	352,2 ± 3,5 aA	387,0 ± 5,6 bA		
AC (Mv3gl, mg/L)	435,7 ± 9,5 aA	427,9 ± 5,7 aA	397,0 ± 15,9 aA	452,8 ± 12,4 aA	524,2 ± 4,0 aB	571,4 ± 5,3 bB		
IC ( $A_{420nm} + A_{520nm} + A_{620nm}$ ) * 10	27,7 ± 0,5 aB	32,0 ± 0,1 bB	19,7 ± 0,6 aA	23,5 ± 0,4 bA	20,0 ± 0,4 aA	23,5 ± 0,2 bA		
Matiz ( $A_{420nm}/A_{520nm}$ ) * 100	43,1 ± 0,2 aA	44,2 ± 0,3 bA	52,5 ± 0,4 aB	52,5 ± 0,1 aB	53,6 ± 0,2 aB	53,7 ± 0,3 aB		
% de color amarillo	26,8 ± 0,1 aA	27,1 ± 0,1 aA	29,9 ± 0,2 aB	29,7 ± 0,1 aB	30,1 ± 0,1 aB	30,0 ± 0,1 aB		
% de color rojo	62,3 ± 0,1 bB	61,4 ± 0,2 aB	56,9 ± 0,2 aA	56,6 ± 0,1 aA	56,5 ± 0,2 aA	55,9 ± 0,1 aA		
% de color azul	10,9 ± 0,1 aA	11,4 ± 0,1 bA	13,2 ± 0,1 aB	13,6 ± 0,1 aB	13,4 ± 0,1 aB	14,0 ± 0,1 bB		
L*	26,1 ± 0,6 bA	21,7 ± 0,3 aA	31,4 ± 0,8 bB	26,2 ± 0,6 aB	30,3 ± 0,8 bB	26,0 ± 0,6 aB		
C*	59,7 ± 0,4 bB	56,2 ± 0,5 aA	57,5 ± 0,2 bA	55,8 ± 0,4 aA	57,2 ± 0,2 bA	55,4 ± 0,5 aA		
h*	18,2 ± 0,3 aB	19,4 ± 0,3 aB	9,1 ± 0,6 aA	12,1 ± 0,1 bA	9,2 ± 0,4 aA	11,5 ± 0,4 bA		
a*	56,7 ± 0,5 bA	52,9 ± 0,3 aA	56,8 ± 0,2 bA	54,5 ± 0,4 aA	56,4 ± 0,3 bA	54,3 ± 0,5 aA		
b*	18,6 ± 0,3 aB	18,6 ± 0,5 aB	9,1 ± 0,6 aA	11,7 ± 0,1 bA	9,5 ± 0,7 aA	11,1 ± 0,4 aA		
CC (%)	41,3 ± 2,4 aC	49,7 ± 1,0 bC	25,8 ± 0,9 aB	28,2 ± 0,6 aB	18,7 ± 0,8 aA	18,2 ± 0,1 aA		
CP (%)	13,7 ± 0,1 bA	11,7 ± 0,4 aA	18,3 ± 0,1 aB	18,1 ± 0,1 aB	22,0 ± 0,2 aC	22,9 ± 0,1 bC		
FT (EAG, mg/L)	3635,0 ± 42,0 aB	4162,8 ± 142,4 bB	3169,2 ± 46,4 aA	3624,2 ± 11,2 bA	3076,8 ± 121,1 aA	4171,5 ± 32,5 bB		
PA (Cat, mg/L)	4168,8 ± 166,2 aB	4359,8 ± 85,4 aA	3380,0 ± 48,9 aA	3990,1 ± 21,3 bA	3948,5 ± 88,0 aB	4050,1 ± 136,1 aA		
FL (Cat, mol/L)	$1,4 \times 10^{-2} \pm 6,0 \times 10^{-4}$ aA	$1,6 \times 10^{-2} \pm 2,6 \times 10^{-4}$ bA	$1,5 \times 10^{-2} \pm 4,1 \times 10^{-4}$ aA	$1,7 \times 10^{-2} \pm 3,8 \times 10^{-4}$ bA	$2,4 \times 10^{-2} \pm 8,7 \times 10^{-4}$ aB	$2,3 \times 10^{-2} \pm 2,7 \times 10^{-4}$ aB		
IG (%)	79,5 ± 5,8 aA	78,8 ± 1,5 aB	75,7 ± 5,6 aA	75,1 ± 1,4 aB	75,6 ± 3,4 aA	70,4 ± 2,6 aA		

\* Media ± error estándar (n=3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey HSD, p<0,05). Letras minúsculas (a, b) son utilizadas para comparar los dos tratamientos en el mismo momento de muestreo. Letras mayúsculas (A, B, C) son utilizadas para comparar vinos del mismo tratamiento en diferentes momentos. AT, antocianos totales; AL, antocianos libres; AC, antocianos combinados; IC, intensidad colorante; L\*, claridad; C\*, saturación; h\*, tonalidad; a\*, rojo-verde; b\*, amarillo-azul; CC, color copigmentado; CP, color debido a pigmentos poliméricos; FT, fenoles totales; PA, proantocianidinas totales; FL, flavanoles DMACH.

Al analizar el patrón de evolución de las proantocianidinas totales, flavanoles DMACH y fenoles totales, se observó un aumento continuo de estos parámetros durante toda la vinificación, indicando una mayor extracción de los compuestos flavánicos conforme aumenta el contenido de alcohol en el medio. Nuevamente estas observaciones coinciden con los resultados publicados por otros autores (Ribéreau-Gayon et al., 2006a,b; Aron y Kennedy, 2007; Bautista-Ortín et al., 2007; Casassa, 2007; Busse-Valverde et al., 2011).

Al comparar ambos tratamientos, el sangrado (T3) modificó significativamente los niveles de todas las variables evaluadas durante los 15 días de maceración/fermentación, a excepción de algunos parámetros relacionados al color de los vinos tales como el matiz y el porcentaje de las componentes amarilla y roja (**Figura 11**). Al momento del descube (**Tabla 8**), el T3 generó un incremento significativo del contenido de antocianos libres (20,9%) y totales (11,4%), flavanoles DMACH (20,4%) y fenoles totales (14,5%) respecto al control. La concentración de proantocianidinas totales mostró una tendencia similar, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre los vinos analizados ( $p > 0,05$ ). Con respecto a los parámetros de color, se observaron niveles levemente superiores de IC y matiz con la aplicación de T3, acompañados por un menor valor de  $L^*$ ,  $C^*$  y  $a^*$ , y una mayor proporción de la componente azul del color. Finalmente, los vinos obtenidos con el sangrado presentaron una mayor proporción de color copigmentado (20,3%) y menor color polimérico, comparados con el tratamiento control.

Continuando con las etapas del proceso de elaboración evaluadas en este estudio, se observaron modificaciones sustanciales en la composición fenólica global (**Tabla 8**). Al momento de embotellado (45 días post-descube), los niveles de antocianos y proantocianidinas mostraron un descenso significativo, debido a la precipitación de los mismos y/o adsorción sobre las levaduras, proteínas y tartratos durante la estabilización del vino (Ribéreau-Gayon et al., 2006b; Bautista-Ortín et al., 2007). Independientemente del tratamiento aplicado, el contenido de antocianos libres y totales continuó disminuyendo hasta el final del estudio (3 meses de almacenamiento en botella); mientras que, por el contrario, los antocianos combinados evolucionaron positivamente. Estos resultados confirman la presencia de reacciones de cicloadición, condensación y/o polimerización con otros compuestos (Monagas y Bartolomé, 2009).

Al analizar los parámetros de color, la intensidad colorante siguió una tendencia semejante a la observada para los antocianos, disminuyendo hacia el embotellado para luego permanecer estable durante los 3 meses de almacenamiento. Esto podría explicarse, tal como se indicó anteriormente, por la formación de nuevos compuestos que mantienen el color medido a través de este índice. En cuanto al matiz y la componente amarilla del color, se observó un aumento significativo durante las etapas evaluadas, indicando posibles reacciones de oxidación de los pigmentos antociánicos (Pérez-Magariño y González-Sanjosé, 2004). Adicionalmente, los vinos de ambos tratamientos mostraron

con el tiempo una caída en la componente roja del color, un aumento de  $L^*$  y un matiz azulado, proporcionado por mayores % de color azul y menores valores de  $b^*$ . Finalmente, la proporción de color copigmentado disminuyó significativamente durante el proceso, acompañado de un incremento notable de color polimerizado, confirmando las apreciaciones mencionadas anteriormente.

Con respecto a los compuestos flavánicos, la caída de proantocianidinas observada al momento de embotellado podría explicarse por la precipitación de coloides inestables tanino-tanino, tanino-polisacáridos y tanino-proteínas, y la posible combinación de estos compuestos con los antocianos (Revilla y González-Sanjosé, 2003; Guadalupe et al., 2008). En tanto, su aumento posterior durante el almacenamiento en botella, al igual que para los flavanoles DMACH, probablemente esté relacionado con procesos complejos de polimerización desencadenados por las condiciones del medio (Ginjom et al., 2011).

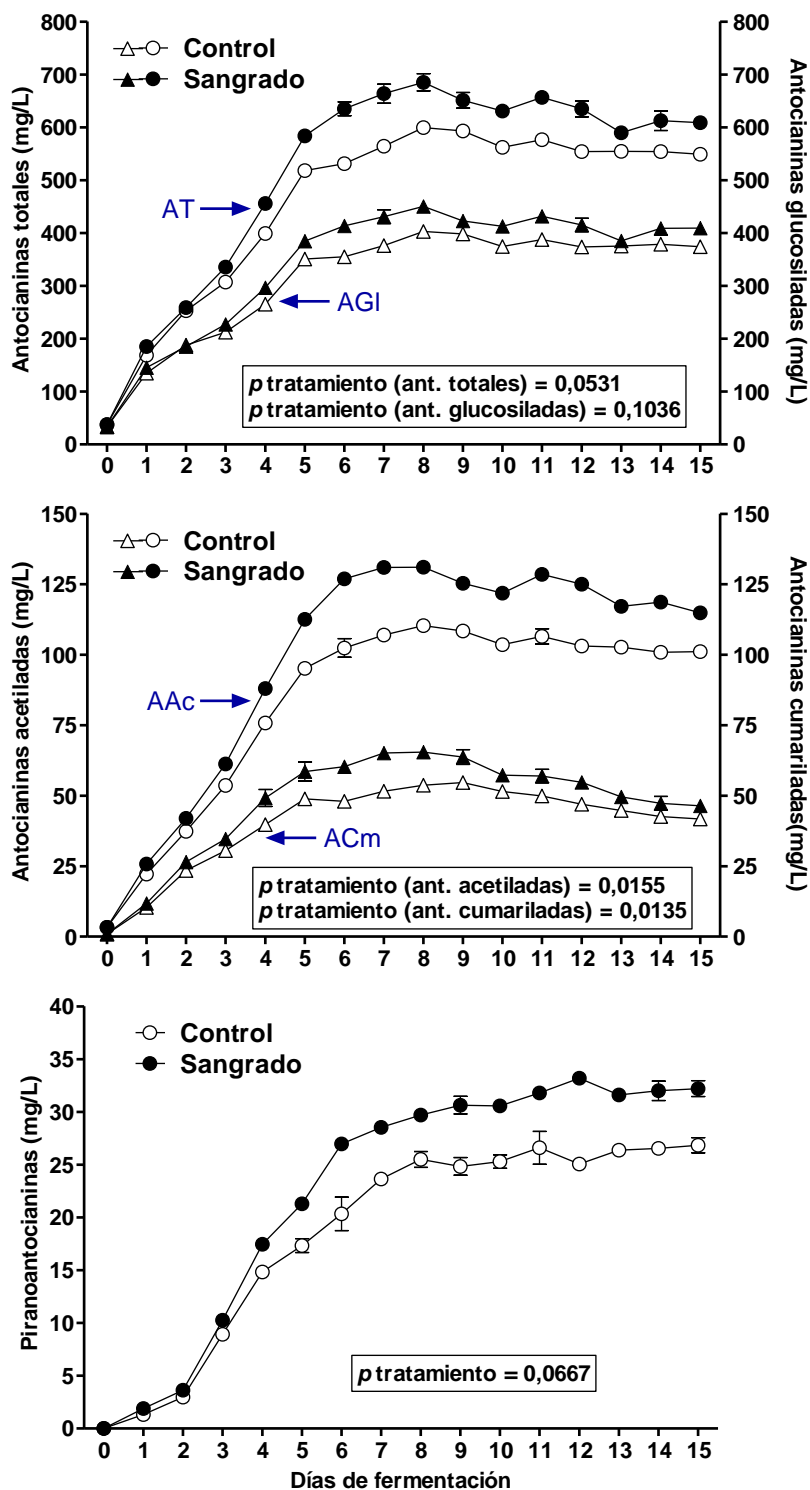
En general, las diferencias observadas en los parámetros fenólicos determinados al momento del descube, entre los vinos obtenidos con ambos tratamientos (C y T3), se mantuvieron hacia el final del estudio para la mayoría de las variables analizadas, especialmente la intensidad colorante y el contenido de fenoles totales (**Tabla 8**). Estos resultados indican la potencialidad del sangrado como una herramienta útil para aumentar la calidad polifenólica del cv. Malbec y mejorar la capacidad de envejecimiento en la producción de vinos de guarda.

### **3.3.3.3. Evolución de los diferentes grupos antociánicos en los mostos/vinos durante la vinificación y el almacenamiento en botella**

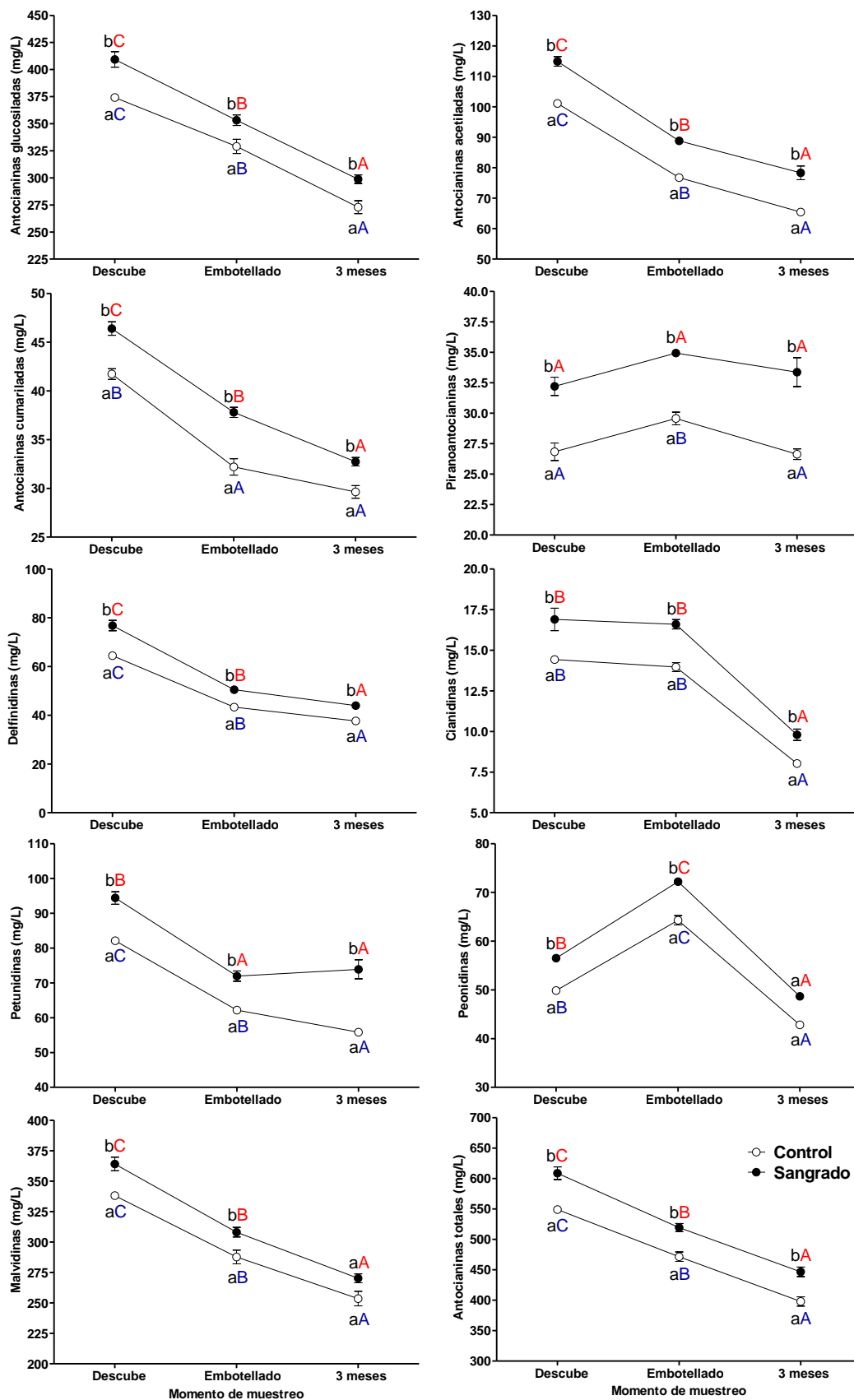
La **Figura 12** muestra la evolución de los diferentes grupos antociánicos, determinados por HPLC-DAD, durante la maceración/fermentación en los mostos/vinos estudiados. Al igual que los resultados obtenidos para los antocianos totales cuantificados por espectrofotometría (**Figura 11**), las antocianinas individuales mostraron el mismo patrón de evolución, caracterizado por un aumento continuo de concentración hasta el séptimo/octavo día de fermentación seguido por una disminución sostenida hasta el descube. En cuanto al grupo de las piranoantocianinas, se observó una tendencia creciente de formación de estos compuestos durante todo el proceso, coincidiendo con las observaciones realizadas por Morata et al. (2006) en vinos cv. Tempranillo.

Independientemente del tratamiento aplicado, las proporciones relativas de los diferentes grupos antociánicos cambiaron notablemente con el progreso de la fermentación. Así, se observó una disminución de monoglucósidos y un aumento de la proporción de antocianinas acetiladas durante la vinificación, en tanto los derivados cumarilados mostraron una evolución irregular. Al analizar las proporciones relativas de las diferentes antocianidinas, se encontró que los derivados de peonidina, cianidina y malvidina disminuyeron, mientras que las proporciones de delfinidina y

petunidina aumentaron durante el proceso fermentativo. Estos resultados coinciden con los observados por Guadalupe et al. (2008) en vinos cv. Tempranillo.



**Figura 12.** Evolución de los diferentes grupos antociánicos en mostos/vinos Malbec durante la vinificación (vendimia 2011). Comparación entre vinos control (C) y con sangrado (T3). AT, antocianinas totales; AGI, antocianinas glucosiladas; AAc, antocianinas acetiladas; ACm, antocianinas cumariladas.



**Figura 13.** Compuestos antocianicos de vinos Malbec, agrupados de acuerdo a la ausencia o presencia de acilación y a la antocianidina involucrada, en diferentes momentos del proceso de elaboración (vendimia 2011). Comparación entre vino control (C) y con sangrado (T3). Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ). Letras minúsculas (a, b) son utilizadas para comparar los dos tratamientos en el mismo momento de muestreo. Letras mayúsculas (A, B, C) en azul son utilizadas para comparar vinos del tratamiento C y en rojo vinos del tratamiento T3, en diferentes momentos del proceso.



Al momento del descube, los vinos obtenidos mediante el empleo del sangrado (T3) presentaron niveles significativamente superiores de todos los grupos antociánicos, comparados con los vinos control (**Figura 13**). Estas diferencias se mantuvieron inalteradas en el embotellado y después de 3 meses de almacenamiento en botella. En general, y coincidiendo con la evolución de antocianos totales, todos los compuestos evaluados mostraron un descenso comparable de concentración, independiente de la estabilidad asociada con su estructura química. La única excepción correspondió a las piranoantocianinas, cuyos niveles fueron similares hasta el final del estudio. Si bien el tiempo de estiba en botella fue bastante acotado para interpretar las diferentes reacciones que participan en la modificación de estos compuestos, los resultados obtenidos concuerdan con la tendencia observada por diversos autores en vinos cvs. Tempranillo, Graciano y Cabernet Sauvignon durante períodos de almacenamiento prolongados (Monagas et al., 2005b; Guadalupe et al., 2008; García-Marino et al., 2010).

#### **3.3.3.4. Compuestos fenólicos de bajo peso molecular de los vinos en diferentes momentos del proceso de elaboración**

La **Figura 14** muestra la evolución de los diferentes grupos de compuestos fenólicos no-antociánicos, determinados por HPLC-DAD, en los vinos estudiados desde el descube hasta los 3 meses de almacenamiento en botella.

Independientemente del tratamiento aplicado, las proporciones relativas de los diferentes grupos fenólicos cambiaron levemente durante el proceso evaluado. Así, se observó una disminución de la proporción de flavonoides (principalmente flavonoles y dihidroflavonoles) y un aumento de la proporción de no-flavonoides (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos). El perfil de los vinos al momento del descube estuvo representado por el 82,4% para C y 83,8% para T3 (flavonoides), y 17,6% para C y 16,2% para T3 (no-flavonoides). Mientras que después de 3 meses de almacenamiento en botella se modificó a 80,9% (C) y 82,7% (T3) para los flavonoides, y 19,1% (C) y 17,3%(T3) para los no-flavonoides.

Al momento del descube, los vinos obtenidos mediante la aplicación del sangrado (T3) presentaron niveles significativamente superiores de todos los flavonoides agrupados por estructura química, comparados con los vinos control; mientras que con respecto a los compuestos no-flavonoides, el T3 sólo afectó positivamente el contenido de ácidos hidroxibenzoicos ( $p < 0,05$ ). Estas diferencias se mantuvieron inalteradas en el embotellado y después de 3 meses de almacenamiento en botella.

Al analizar los vinos en las etapas posteriores del estudio, se observaron algunas modificaciones sustanciales en la composición fenólica de bajo peso molecular (**Figura 14**). Considerando el grupo de los compuestos no-flavonoides, los ácidos hidroxibenzoicos (representados

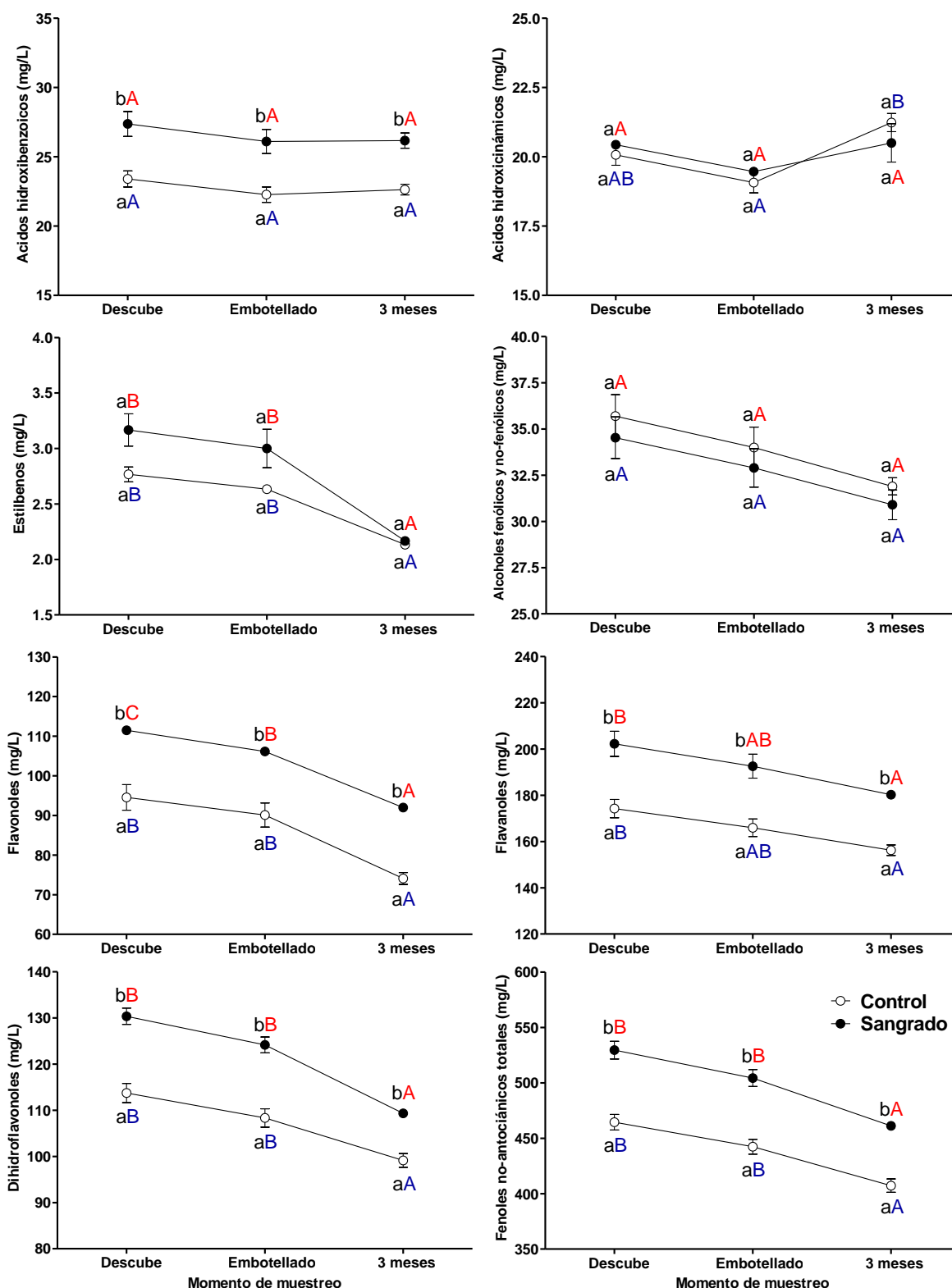
en más del 45% por el ácido gálico) permanecieron estables durante todo el proceso, coincidiendo con las observaciones realizadas por diversos autores en vinos españoles (Revilla y González-Sanjosé, 2003; Monagas et al., 2005c) y australianos (Ginjom et al., 2011) de otras variedades tintas.

Con respecto a los ácidos hidroxicínámicos, se observó una disminución no significativa al momento de embotellado, seguido por un leve aumento hacia el final del estudio ( $p > 0,05$ ). Dicho aumento se produjo en el contenido de ácido *trans p*-cumárico, 40,5% en C y 38,2% en T3, después de 3 meses de almacenamiento en botella, acompañado por una disminución del 9,0% (C) y 12,2% (T3) para el ácido *cis*-cutárico; mientras que los niveles de los demás compuestos identificados se mantuvieron estables. Según diversos autores (Somers et al., 1987; Monagas et al., 2005c), el incremento de las formas libres de estos ácidos durante la vinificación y el envejecimiento estaría vinculado con reacciones de hidrólisis de sus formas esterificadas, y en el caso particular del ácido *p*-cumárico podría deberse también a la hidrólisis de antocianinas cumariladas. Los resultados observados en la **Figura 13** revelan la posibilidad de ocurrencia de este fenómeno en los vinos estudiados.

Por su parte, la evolución de los estilbenos mostró un descenso significativo hacia el último muestreo ( $p < 0,05$ ). El glucósido de *trans*-resveratrol disminuyó el 18,4% (C) y el 32,6% (T3), mientras que el glucósido del isómero *cis* cayó el 33,4% (C) y el 35,2% (T3). Según Mattivi et al. (1995), las formas glucosiladas de resveratrol podrían ser hidrolizadas durante la vinificación y la crianza en botella liberando sus respectivas agliconas. Sin embargo, en el presente estudio no se identificaron las formas libres de este compuesto impidiendo verificar este comportamiento.

La concentración del alcohol fenólico tirosol y del alcohol no-fenólico triptofol, formados durante la fermentación alcohólica por el metabolismo de las levaduras a partir de la tirosina y del triptófano, respectivamente (Gil y Gómez-Cordovés, 1986; Barcenilla et al., 1989), presentaron un ligero descenso no significativo durante el proceso evaluado ( $p > 0,05$ ). Estos resultados fueron similares a los observados por Monagas et al. (2005c) en vinos cvs. Tempranillo, Graciano y Cabernet Sauvignon durante los primeros meses de almacenamiento en botella.

Analizando el grupo de los flavonoides, se observó una evolución similar en los distintos compuestos agrupados según su naturaleza química. Los flavanoles, representados en más del 30% por los monómeros (+)-catequina y (-)-epicatequina, mostraron una disminución significativa de concentración (10,4% para C y 10,9% para T3) desde el descube hasta los 3 meses de almacenamiento en botella ( $p < 0,05$ ), coincidiendo con los datos reportados por diversos autores en otras variedades tintas (Hermosín Gutiérrez et al., 2005; Monagas et al., 2005c; Sun y Spranger, 2005). Este comportamiento podría explicarse por la conversión de monómeros y oligómeros de flavanoles en polímeros más estables, a través de su reacción con otros flavanoles, antocianinas, y moléculas más pequeñas como ácido pirúvico y vinilfenol, entre otras (Monagas et al., 2005a).



**Figura 14.** Compuestos fenólicos no-antocianicos de vinos Malbec, agrupados por estructura química, en diferentes momentos del proceso de elaboración (vendimia 2011). Comparación entre vinos control (C) y con sangrado (T3). Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ). Letras minúsculas (a, b) son utilizadas para comparar los dos tratamientos en el mismo momento de muestreo. Letras mayúsculas (A, B, C) en azul son utilizadas para comparar vinos del tratamiento C y en rojo vinos del tratamiento T3, en diferentes momentos del proceso.

Con respecto a los flavonoles y dihidroflavonoles, ambos grupos también revelaron una tendencia decreciente de concentración hacia finales del estudio ( $p < 0,05$ ). Los flavonoles disminuyeron 21,7% (C) y 17,5% (T3) entre el descube y los 3 meses de almacenamiento en botella. Según algunos estudios (Zafrilla et al., 2003; Monagas et al., 2005c; Ginjom et al., 2011), durante la crianza del vino en barricas de roble y el envejecimiento en botella pueden producirse reacciones de hidrólisis de las formas conjugadas de los diferentes flavonoles, liberando sus correspondientes agliconas (formas libres). En el presente estudio, a diferencia de lo indicado por estos autores, todos los flavonoles (formas libres y conjugadas) experimentaron una disminución de concentración. Finalmente, los dihidroflavonoles mostraron el mismo comportamiento observado para los flavonoles, con una disminución del 12,8% (C) y 16,1% (T3) después del almacenamiento en botella.

De acuerdo a las observaciones realizadas, el proceso de vinificación generó cambios sistemáticos en el perfil fenólico de los vinos. Gran parte de los compuestos determinados presentaron niveles muy bajos al momento de la molienda, alcanzaron su máxima concentración durante la maceración/fermentación alcohólica, y finalmente se estabilizaron o disminuyeron lentamente durante el almacenamiento en botella.

### 3.3.3.5. Evaluación sensorial de los vinos mediante la aplicación del test triangular

Con el fin de determinar diferencias entre los vinos cv. Malbec obtenidos con el tratamiento control y mediante la aplicación del sangrado T3 (30%), los mismos fueron sometidos a un test sensorial discriminativo (test triangular), después de 3 meses de almacenamiento en botella, siguiendo la metodología detallada en el Anexo I. Inicialmente, se evaluó la homogeneidad entre las réplicas de cada tratamiento, para lo cual se analizaron 3 series consecutivas correspondientes al tratamiento C y 3 series correspondientes al tratamientos T3 que permitieron examinar las 3 réplicas de cada uno. Teniendo en cuenta la cantidad de jueces empleados para el análisis sensorial (10 degustadores entrenados), el número de respuestas correctas requeridas para un nivel de significancia del 5% es de 7 (Roessler et al., 1948). En todas las series evaluadas, en número de jueces que encontraron diferencias fue menor a 3, indicando homogeneidad entre las réplicas de cada tratamiento estudiado.

Posteriormente, se procedió a la comparación de ambos tratamientos seleccionando al azar una réplica de cada uno. Los vinos seleccionados se sirvieron en grupos de tres copas distribuidas aleatoriamente entre los 10 panelistas. Nuevamente en esta oportunidad, sólo 5 jueces fueron capaces de diferenciar los vinos control de los obtenidos mediante la aplicación del sangrado (T3), indicando ausencia de significancia estadística. Adicionalmente, los panelistas que respondieron correctamente coincidieron en atribuir la diferencia percibida principalmente a los parámetros cualitativos "aroma" y "sabor".

A partir de los resultados obtenidos, se puede evidenciar la imposibilidad de diferenciar los vinos estudiados a través de un panel entrenado de jueces. Esto podría explicarse por el gran potencial fenólico observado en las uvas y los niveles elevados de estos compuestos en los vinos elaborados, minimizando las sutiles diferencias observadas analíticamente.

## Impacto de la composición fenólica y polisacarídica en el valor comercial de vinos Malbec de la Provincia de Mendoza



Joan Miró, *Montroig, viñedos y olivares* (1919).

**“Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines”**

Artículo publicado en la revista  
*Food Research International*, 2012, 45 (1), 402-414

## Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines

Martín Fanzone<sup>a</sup>, Alvaro Peña-Neira<sup>b</sup>, Mariona Gil<sup>c</sup>, Viviana Jofré<sup>a</sup>, Mariela Assof<sup>a</sup>,  
Fernando Zamora<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales, Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), San Martín 3853, 5507 Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.

<sup>b</sup> Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Casilla 1004, 8820808 Santiago, Chile.

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, Universidad Rovira i Virgili, C/ Marcel·li Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain.

**Food Research International, 2012, 45 (1), 402-414**  
Received 15 July 2011. Accepted 9 November 2011.

### Abstract

Knowledge of the chemical composition of wine and its association with the commercial value constitutes an objective tool to assess quality and can be used as a marketing strategy. Phenolic compounds are very important quality parameters of wines because of their impact on color, taste and health properties, and together with polysaccharides contribute to the chemical stability and sensory perception of the products. In this context, the major aims of the present study were to describe the phenolic and polysaccharidic composition of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines of different price segments, and assessing their impact on the commercial value. Thirty wines representative of three retail price segments (US\$ 5-7, 18-20, and >40) were evaluated. In general, there was a trend towards greater concentration of these compounds with increasing the commercial value of wines. Particularly, it was found that general phenolic composition, color-related compounds, main flavonoid groups and polysaccharides appear as relevant variables differing among segments and showing some differences between varieties. Additionally, the sensory wine description was in good agreement with the analytical results. The wines of greater commercial value, with the best visual and gustatory scores, coincided with higher levels of the phenolic parameters determined. This study provide an interesting insight, no reported so far, on the impact

of phenolic and polysaccharidic composition in the final quality of the products and therefore in its market value.

**Keywords:** phenols; polysaccharides; red wine; Malbec; Cabernet Sauvignon; commercial value.

## 1. Introduction

Wine is a product of particular characteristics, since the degree of differentiation that can reach responds to an imperfectly competitive market, where different products compete for the same demand but each with unique styles. Argentina ranks fifth in world wine production, with about 13 million hectoliters in 2009, representing ~5% of the global amount (OIV, 2010). Over 70% of Argentinean wine is produced in Mendoza province. Malbec (*Vitis vinifera* L.) is the main red grape variety (29%) and is considered the emblematic cultivar of Argentina. This variety, of French origin, has well adapted to the soil and climate of Mendoza, finding the optimal ecological conditions for their development, and allowing obtaining wines with a distinctive style (Fanzone, Peña-Neira, Jofré, Assof, & Zamora, 2010; INV, 2009). For that reason, Malbec has a leading place in the Argentinean wine market by offering a wide range of products resulting from the influence of various factors (geographical location of the vineyard, grape maturity, viticultural practices, winemaking techniques, etc.).

In view of the needs and demands of the current wine market, it becomes increasingly necessary producing wines of the highest quality possible. The wine quality can be defined by different criteria, being subject to the evaluation parameters employed, and always designed to fulfill requirements of consumers. It should also be noted that the concept of quality is closely related to commercial value. In many cases, the quality is evaluated through sensory analysis by trained panelists that characterize the products according to their organoleptic attributes. Then, these data are correlated to consumer liking or acceptance judgments from typical and targeted groups of consumers. Furthermore, sensory analysis techniques have been widely used as an adjunct to quality control and as a diagnostic tool to characterize product differences (Ferreira et al., 2009; Goldner and Zamora, 2007).

Additionally, the identification and quantification of the minor chemical components is a promising approach to explain the sensory description of a wine, and to assess their stability, origin and authenticity, and thus its commercial quality (Sáenz-Navajas, Tao, Dizy, Ferreira, & Fernández-Zurbano, 2010b). The relationship between sensory evaluation and chemical composition of wine is a critical topic of research in oenology. Some authors have investigated the influence of volatile composition on the organoleptic characteristics of wines (Escudero, Campo, Farina, Cacho, &



Ferreira, 2007; Sáenz-Navajas, Campo, Fernández-Zurbano, Valentin, & Ferreira, 2010a), while others have examined relationships between phenolic compounds and their sensory attributes (Chira, Pacella, Jourdes, & Teissedre, 2011; Granato, Katayama, & de Castro, 2011; Holt, Francis, Field, Herderich, & Iland, 2008).

Phenolic compounds are one of the most important quality parameters in red wines, and involve two main groups of compounds, non-flavonoids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids and their derivatives, stilbenes, and phenolic alcohols) and flavonoids (anthocyanins, flavanols, flavonols, and dihydroflavonols). These compounds contribute to organoleptic characteristics of wines such as color, astringency, and bitterness, are also active in biochemical processes, and have nutraceutical effects on human health, including antimicrobial, anticarcinogenic, and antioxidant properties (Renaud & de Lorgeril, 1992). According to some studies, there is close link between high quality wines and high phenolic composition (Langlois, Ballester, Campo, Dacremont, & Dominique, 2010; Sáenz-Navajas, Tao, Dizy, Ferreira, & Fernández-Zurbano, 2010b).

During winemaking and aging, the flavonoids are able to interact between them and with other wine constituents, such as proteins or polysaccharides, contributing to the chemical stability and modifying the sensory perception of wines. Major wine polysaccharides include mannoproteins (MPs) originating from yeasts, and arabinogalactan-proteins (AGPs), arabinans and rhamnogalacturonans (RG-I and RG-II) coming from cell walls of grape berries. They play an important role in the colloidal stability of wines through their ability to interact and aggregate with tannins, and have a positive effect on the organoleptic quality modifying gustatory structure, fullness and body, and softening tannin astringency of wines (Fernández, Martínez, Hernández, Guadalupe, & Ayestarán, 2011; Terrier, Poncet-Legrand, & Cheynier, 2009).

Based on these considerations, it can establish that phenolic compounds and polysaccharides are of great importance for the organoleptic quality of red wines. Moreover, its biosynthesis in plants, their concentration in grapes at harvest and subsequent extraction into wine, give rise to obtain products of different qualities, which are reflected in the final market value. To best of our knowledge, there is to date no report on the individualized chemical composition of Argentinean red wines of different commercial value. In this context, the aims of our study were to describe the chemical composition (in particular, phenolic and polysaccharidic) of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines of different price segments, and assessing their impact on the commercial value. Together with Malbec, we decided to work with Cabernet Sauvignon since it is also a red variety very produced in this country and widely spread in the world.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Wine Samples

Thirty red wines produced at commercial scale were collected in bottles (750 mL) directly from the 9 collaborating wineries of Mendoza (Argentina), which produce monovarietal wines and, therefore, guarantee the 100% purity. The samples corresponded to five different monovarietal Malbec (MB) and Cabernet Sauvignon (CS) wines for each of the price segments assessed. The three segments evaluated were: retail values between US\$ 5-7 per bottle (low segment), US\$ 18-20 per bottle (medium segment), and > US\$ 40 per bottle (high segment). All wines were selected attending to sales criteria to obtain representative samples of Argentinean red wine market. Particularly, the vintage of these wines range from 2007 (3 samples for each variety) to 2008 (2 samples for each variety) for high segment, from 2008 (4 samples for each variety) to 2009 (1 sample for each variety) for medium segment, while only from 2009 for the low segment. They were stored in darkness at 12-15 °C, and each wine bottle was opened immediately before the analyses. Due to the time required for completing all analyses (about 2 month), the wine samples were transferred under nitrogen gas stream to completely filled amber bottles for ensuring their preservation.

### 2.2. Standards and reagents

Standards of gallic acid [149-91-7], syringic acid [530-57-4], caffeic acid [331-39-5], *p*-coumaric acid [501-98-4], ethyl gallate [831-61-8], tryptophol [526-55-6], (+)-catechin [7295-85-4], (-)-epicatechin [490-46-0], resveratrol [501-36-0], myricetin [529-44-2], kaempferol [520-18-3], and quercetin-3-glucoside [21637-25-2], *p*-dimethylaminocinnamaldehyde [6203-18-5], ammonium formate [540-69-2], L-ascorbic acid [50-81-7], phloroglucinol [108-73-6], and polyvinylpyrrolidone [25249-54-1] were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); tyrosol [501-94-0] was purchased from Fluka (St. Louis, MO); while protocatechuic acid [99-50-3], quercetin [117-39-5], (-)-epigallocatechin [970-74-1], (-)-epicatechin-3-gallate [1257-08-5], and malvidin-3-glucoside chloride [7228-78-6] were supplied by Extrasynthese (Lyon, France). A pullulan calibration kit Shodex P-82 (P-5, Mw = 5.9 kDa; P-10, Mw = 11.8 kDa; P-20, Mw = 22.8 kDa; P-50, Mw = 47.5 kDa; P-100, Mw = 112 kDa; P-200, Mw = 212 kDa; P-400, Mw = 404 kDa; P-800, Mw = 788 kDa) was obtained from Waters (Barcelona, Spain), while a pullulan 1.3 kDa and the four dextrans BioChemika (12, 25, 50 and 80 kDa) from Fluka (St. Louis, MO). The polysaccharides used as external standards were pectins from citrus and dextrans synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Sodium chloride and sodium metabisulphite were purchased from Anedra (Buenos Aires, Argentina). Ammonium iron (II) sulfate and butanol were obtained from Dalton (Mendoza, Argentina). Ethyl ether and ethyl acetate were acquired from Sintorgan (Buenos

Aires, Argentina). Sodium sulfate anhydrous, potassium dihydrogen phosphate, sodium acetate, vanillin, gelatin, acetaldehyde, hydrochloric acid, acetic acid, formic acid, ethanol, chromatography grade methanol and acetonitrile were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All reactive were analytical grade or superior. Ultra pure water was obtained from a RiO/Elix3-Sinergy185 purification system (Millipore, Sao Pablo, Brazil). Cellulose filter (3  $\mu\text{m}$  pore size) and 0.45  $\mu\text{m}$  pore size nylon membrane were supplied by Microclar (Buenos Aires, Argentina). Sep-Pak Plus (400 mg) and Environmental (900 mg)  $\text{tC}_{18}$  cartridges were obtained from Waters (Milford, MA). Nitrogen gas was supplied by Linde S.A. (Mendoza, Argentina).

### 2.3. Spectrophotometric analyses

Absorbance measurements were made with a Perkin-Elmer UV-vis spectrophotometer model Lambda 25 (PerkinElmer, Hartford, CT).

Total phenols were determined by direct reading of the absorbance of the samples (1:100 dilution) at 280 nm (Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean, & Dubourdieu, 2000). Total phenols were calculated from a calibration curve made with standard solutions of gallic acid (five replicates) in the range between 0 and 50 mg/L ( $R^2=0.99$ ), and expressed as milligrams of gallic acid equivalents per liter of sample (GAE, mg/L).

Total anthocyanins were measured by diluting the extract with 2% hydrochloric acid in ethanol and by comparing spectrophotometric readings at 520 nm of single aliquots treated with either sodium metabisulphite or water (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Total anthocyanins were expressed as milligrams per liter of malvidin-3-glucoside. Free and combined anthocyanins were calculated using the PVPP index (Glories, 1984a).

For total proanthocyanidins, the analytical method applied was the acid butanol assay (Porter, Hritsch, & Chan, 1986). This method is based on the acid-catalyzed oxidative cleavage of the C-C interflavanic bond of proanthocyanidins in butanol-HCl. Total proanthocyanidins were expressed as milligrams per liter of (+)-catechin.

Color intensity (CI), percentage of yellow (%yellow), percentage of red (%red) and percentage of blue (%blue) was estimated using the method described by Glories (1984a,b). The CIELAB coordinates, lightness ( $L^*$ ), chroma or saturation ( $C^*$ ), hue angle ( $h$ ), red-greenness ( $a^*$ ) and yellow-blueness ( $b^*$ ) were determined according to Ayala, Echávarri and Negueruela (1997) and the data were processed with the MSCV<sup>®</sup> software (Ayala, Echávarri, & Negueruela, 2001). The total color difference ( $\Delta E^*$ ) between two samples was obtained following the method proposed by Pérez-Magariño and González-Sanjósé (2003).

The contribution of copigmented anthocyanins to the total wine color at pH 3.6 (color due to copigmentation, %CC), and the degree of anthocyanins polymerization (color due to polymeric pigments, %CP), were determined following the method described by Hermosín Gutiérrez (2003).

Other chemical parameters measured in the samples were gelatin index (Glories, 1984b) and molar concentration of flavanols by *p*-dimethylaminocinnamaldehyde assay (Vivas, Glories, Lagune, Saucier, & Augustin, 1994). Titratable acidity, pH, and ethanol content were determined as described by Zoecklein, Fugelsang, Gump and Nury (2001).

#### 2.4. HPLC analysis of anthocyanins

The chromatographic system employed was a Perkin-Elmer Series 200 high-performance liquid chromatograph equipped with a diode array detector, a quaternary pump, and an autosampler (HPLC-DAD; PerkinElmer, Shelton, CT). Separation was performed on a reversed phase Chromolith Performance C<sub>18</sub> column (100 mm x 4.6 mm I.D., 2 μm; Merck, Darmstadt, Germany) with a Chromolith guard cartridge (10 mm x 4.6 mm) at 25 °C. A gradient consisting of solvent A (water/formic acid, 90:10, v/v) and solvent B (acetonitrile) was applied at a flow rate of 1.1 mL/min from 0 to 22 min and 1.5 mL/min from 22 to 35 min as follows: 96-85% A and 4-15% B from 0 to 12 min, 85-85% A and 15-15% B from 12 to 22 min, 85-70% A and 15-30% B from 22 to 35 min; followed by a final wash with 100% methanol and re-equilibration of the column. Two milliliters of wine was filtered through a 0.45 μm pore size nylon membrane, and then 100 μL was injected onto the column. Diode array detection was performed from 210 to 600 nm, and the quantification was carried out by peak area measurements at 520 nm. Anthocyanin amount was expressed by using malvidin-3-glucoside chloride as standard for a calibration curve ( $R^2=0.99$ ). Identification and confirmation of anthocyanic pigments were performed by HPLC-DAD/ESI-MS as described by Monagas, Núñez, Bartolomé and Gómez-Cordovés (2003a).

#### 2.5. HPLC analysis of low molecular weight phenolic compounds

Sodium chloride (1 g) was added to 50 mL of wine and extracted three times with 20 mL of ethyl ether and three times with 20 mL of ethyl acetate. The organic fractions were combined, dehydrated with 2.5 g sodium sulfate anhydrous, filtered throughout a 3 μm pore size cellulose filter, and evaporated to dryness under a gentle nitrogen gas stream at 35 °C. The solid residue was dissolved in 2 mL of methanol/water (1:1, v/v) and filtered through a 0.45 μm pore size nylon membrane, and then 30 μL was injected in the same HPLC system employed for anthocyanins. Separation was performed on a reversed phase Nova-Pak C<sub>18</sub> column (300 mm x 3.9 mm I.D., 4 μm; Waters Corp., Milford, MA) at 25 °C. Two mobile phases were employed for elution: A (water/acetic acid, 98:2, v/v) and B (water/acetonitrile/acetic acid, 78:20:2, v/v/v). The gradient profile was 0-55

min, 100-20% A and 0-80% B; 55-57 min, 20-10% A and 80-90% B; 57-70 min, 10% A and 90% B isocratic; 70-80 min, 10-0% A and 90-100% B; 80-125 min, 100% B isocratic; followed by a 100% methanol washing and re-equilibration of the column. The flow rate was 0.9 mL/min from 0 to 55 min and 1.0 mL/min from 55 to 125 min. Diode array detection was performed by scanning from 210 to 360 nm with an acquisition speed of 1 s. The identification of specific compounds was carried out by comparison of their spectra and retention time with those of standards. All the individual phenolic compounds were confirmed by HPLC-DAD/ESI-MS as described by Monagas, Suarez, Gómez-Cordovés and Bartolomé (2005). Quantitative determinations were made by using the external standard method with commercial standards. The calibration curves were obtained by injection of standard solutions, under the same conditions as for the samples analyzed, over the range of concentrations observed ( $R^2 \geq 0.94$ ). The compounds for which no standards were available were quantified with the curves of quercetin (dihydroflavonols), quercetin-3-glucoside (quercetin and flavonol glycosides), myricetin (myricetin glycosides), resveratrol (*trans* and *cis*-resveratrol glucoside), caffeic acid (ferric, caffeic and coumaric acids), gallic acid (gallic acid), ethyl gallate (methyl gallate), and (+)-catechin (proanthocyanidins).

## 2.6. Analysis of flavanols

### 2.6.1. Fractionation of flavanols into monomers, proanthocyanidins oligomers and polymers

Wine samples were fractionated using the solid phase extraction method described by Sun, Leandro, Ricardo da Silva and Spranger (1998a). Briefly, 5 mL of wine was concentrated to dryness in a vacuum evaporator (Univapo 100ECH, Uniequip, Martinsried, Germany) at  $<30$  °C. The residue was dissolved in 20 mL of 67 mM phosphate buffer (pH 7.0). Two  $C_{18}$  Sep-Pak cartridges were assembled (900 mg and 400 mg of sorbent weight on top and at the bottom, respectively) and conditioned sequentially with methanol (10 mL), pure water (2 x 10 mL), and phosphate buffer (10 mL). Samples were passed through the cartridges at a flow rate of 2 mL/min, and phenolic acids were then eliminated by elution with 10 mL of phosphate buffer. The cartridges were dried with nitrogen gas and eluted sequentially with 25 mL of ethyl acetate (fraction FI + FII containing monomeric and oligomeric flavanols) and with 15 mL of methanol (fraction FIII containing polymeric proanthocyanidins). The ethyl acetate eluate was taken to dryness under vacuum, redissolved in 20 mL of phosphate buffer, and reloaded onto the same series of cartridges that had been conditioned again as described above. The cartridges were dried with nitrogen and eluted sequentially with 25 mL of ethyl ether (fraction FI) and 15 mL of methanol (fraction FII). Fractions FI, FII, and FIII were evaporated to dryness under vacuum and redissolved in 5 mL of methanol. The total content of

flavanols in each fraction was determined by the vanillin assay described by Sun, Ricardo da Silva and Spranger (1998b).

### **2.6.2. Analysis of polymeric proanthocyanidins following acid-catalysis with phloroglucinol**

Acid-catalysis cleavage in the presence of excess phloroglucinol (Kennedy & Jones, 2001) was used to analyze monomeric proanthocyanidins composition and its mean degree of polymerization (mDP). Reversed-phase HPLC analysis was carried out for the determination of the structural composition of proanthocyanidins, which are characterized by the nature of their constitutive extension units (released as flavanols phloroglucinol adducts) and terminal units (released as flavanols). To calculate the apparent mDP, the sum of all subunits (flavanol monomers and phloroglucinol adducts, in moles) was divided by the sum of all flavanol monomers (in moles). The total proanthocyanidin concentration was considered as the addition of all terminal and extension subunits. In our study it was applied the procedure described by Kontoudakis et al. (2011b).

## **2.7. Analysis of polysaccharides**

### **2.7.1. Extraction of polysaccharides from the wine samples**

Wine samples were processed using the methodology described by Ayestarán, Guadalupe and León (2004). Briefly, 10 mL of wine was centrifuged (9500 xg, 20 min, 4 °C) by 5810R equipment (Eppendorf, Hamburg, Germany), and the supernatant concentrated to a final volume of 2 mL employing a vacuum evaporator (Univapo 100ECH, Uniequip, Martinsried, Germany). Total soluble polysaccharides were precipitated by addition of 10 mL cold acidified ethanol (ethanol 99%, 0.3M HCl) and kept for 24 h at 4 °C. Then, the samples were centrifuged (9000 xg, 10 min, 4 °C), the supernatants were discarded, and the pellets washed four times with cold ethanol to remove the interference materials. Finally, the precipitates were dissolved in 1 mL of ultra pure water, frozen to -80 °C and freeze-dried using an equipment model L-I-E300-CRT (Rificor, Buenos Aires, Argentina).

### **2.7.2. Determination of polysaccharides by HRSEC-RID**

In order to determine the molecular distribution and quantifying the polysaccharides obtained from wines, the soluble fractions were analyzed by high-resolution size-exclusion chromatography (HRSEC). The lyophilized samples were resuspended in 1 mL of 30 mM ammonium formate, filtered through a 0.45 µm pore size nylon membrane, and then 100 µL was injected onto the column. HRSEC was performed using an Agilent 1200 Series liquid chromatograph equipped with a G1362A refractive index detector (RID), a G1311A quaternary pump, a G1316A column oven, and G1329A autosampler (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Separation was carried out at 20 °C using

two Shodex OHPak SB-803 HQ and SB-804 HQ columns connected in series (300 mm x 8 mm I.D.; Showa Denko, Japan). The mobile phase consists of an aqueous solution of 30 mM ammonium formate applied with a constant flow of 0.6 mL/min for 60 min, and the temperature of cell RID was 35 °C. The molecular weight distribution of the wine fractions was followed by calibration with pullulans and dextrans standards of different molecular weight, described above. The apparent molecular weights were deduced from the calibration equation:

$$\log M_n \text{ (kDa)} = [(t_R - 43.67) / -4.45] / 1000 \quad (1)$$

where  $t_R$  = column retention time at peak maximum, and  $R^2=0.99$ .

The quantification of polysaccharides was performed according to the peak area for each fraction, using the external standard method with pectins and dextrans commercial standards. The calibration curve was obtained by injection of standard solutions, under the same conditions as for the samples analyzed, in the range between 0 and 2 g/L ( $R^2=0.99$ ).

## 2.8. Descriptive sensory analysis

All the wines were tasted by a group of 10 trained panelists (4 females and 6 males) from the National Institute of Agricultural Technology (INTA, Mendoza), all of them part of a sensory group with a long experience in tasting of Malbec and Cabernet Sauvignon wines from different features. A previous training session was carried out to standardize criteria among the panelists. In this first evaluation we elected, by consensus, the most suitable and uniform attributes among the panelists to describe the wines. Subsequently, it was performed five sessions of 60 min (2 per week) during three weeks. Through a session, each panelist had to assess two flights consisting of three wines of different commercial value for each variety (6 wines per session). Approximately 30-40 mL of wine was served in a completely randomized order, at 18-20 °C, in clear wine tasting glasses (ISO 3591, 1977) labeled with three-digit code. In order to ascertain judges' consistency one sample was replicated in each session. For each wine, it was evaluated six sensorial attributes: visual (color intensity), gustatory (fullness, bitterness, astringency, and persistency) and global quality, on a 10-point scale. Panelists were only informed about the grape variety of the wine samples.

## 2.9. Statistical analysis

All analyses (including extractions) were carried out in triplicate. Statistical analysis was assessed with Statgraphics Plus version 4.0 software (Copyright 1994-1999, Statistical Graphics Corp., Warrenton, VA). All of the results were tested for homogeneity of variance using Cochran's test, and analyzed by one-way or multifactor analysis of variance (ANOVA) and Tukey's honestly significant difference (HSD) test. A  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant. Discriminant analyses

were performed for examining price segment differences in Malbec and Cabernet Sauvignon wines, using the individual phenolic parameters.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. General chemical composition

**Table 1** presents a summary of the general analytical parameters evaluated in the red wines studied. The chemical data of MB and CS wines have been submitted to the ANOVA test in order to explore the “commercial value” effect ( $p < 0.05$ ). Among all of the samples analyzed, both for MB and CS, it was observed a low dispersion in titratable acidity, pH and ethanol content without significant differences for the price segments assessed.

For all samples, total phenols ranged from 2667.5 to 3905.0 and from 2765.3 to 3944.3 mg/L in MB and CS, respectively. Significant differences were observed among wines of different commercial value. On average, the wines of high segment showed the highest level of this parameter, while the lowest content was observed in the low segment. These results are comparable to those reported for other authors in wines from the same cultivars (Fanzone et al., 2010; Ginjom, D’Arcy, Caffin, & Gidley, 2010).

Proanthocyanidins were the major phenolics quantified in the samples, with concentrations similar to those published in previous works (Fanzone et al., 2010; González-Neves et al., 2004). Only for MB wines, there was a positive influence of these compounds on the commercial value, showing a significantly greater content in the high and medium segments with regard to the low segment. This could be due to several factors that favored their accumulation in grapes, as well as to winemaking practices made to achieve a greater extraction from the berries. The molar concentration of flavanols and the gelatin index showed a parallel behavior of proanthocyanidins, with values from  $1.7 \times 10^{-3}$  to  $2.2 \times 10^{-3}$  mol/L and from 72.9 to 74.2%, respectively. With regard to CS, the same trend was not observed as in MB, with levels of proanthocyanidins and GI comparable without significant differences among wines of different price segments.

An overall view of color composition indicates their significant incidence on the commercial value of wines. Specifically, MB and CS wines of high segment showed higher values of CI,  $C^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ . By contrast,  $L^*$  had the opposite tendency indicating that the wines of lower commercial value (low segment) had less color compared to the rest. The higher CI in MB was principally related to the blue component of the color (%blue), while in CS was due to the red component (%red). Analyzing the global effect of the variety (**Table 1**), we can see that MB wines showed a significantly higher %blue and a smaller %yellow and values of the CIELAB coordinates  $h$  and  $b^*$ , compared with CS.



**Table 1**  
General analytical parameters of Malbec and Cabernet Sauvignon wines of different commercial value. Probability values for variety and price segment.

Parameter	Malbec					Cabernet Sauvignon					Factor	
	Price segment					Variety					Segment	Variety x Segment <sup>d</sup>
	High	Medium	Low	High	Medium	Low	High	Medium	Low	p <sub>value</sub> <sup>e</sup>		
Titratable acidity (tartaric acid, g/L)	6.0 <sup>b</sup> ± 0.2	5.6 <sup>a</sup> ± 0.3	5.5 <sup>a</sup> ± 0.1	6.4 <sup>b</sup> ± 0.1	5.9 <sup>a</sup> ± 0.2	5.3 <sup>a</sup> ± 0.4	0.4640	0.0405	0.4671	0.0405	0.4671	
pH	3.66 <sup>b</sup> ± 0.03	3.65 <sup>b</sup> ± 0.02	3.62 <sup>b</sup> ± 0.04	3.57 <sup>b</sup> ± 0.01	3.62 <sup>b</sup> ± 0.05	3.71 <sup>b</sup> ± 0.04	0.8096	0.7872	0.4414	0.7872	0.4414	
Ethanol (% v/v)	15.1 <sup>a</sup> ± 0.2	14.7 <sup>a</sup> ± 0.1	14.2 <sup>a</sup> ± 0.2	14.4 <sup>a</sup> ± 0.1	14.5 <sup>a</sup> ± 0.2	14.3 <sup>a</sup> ± 0.2	0.1275	0.0497	0.2576	0.0497	0.2576	
TA (malvidin-3-glucoside, mg/L)	411.0 <sup>a</sup> ± 37.4	369.9 <sup>a</sup> ± 24.4	324.8 <sup>a</sup> ± 26.9	320.7 <sup>b</sup> ± 18.9	307.3 <sup>b</sup> ± 18.7	216.4 <sup>a</sup> ± 13.8	0.0006	0.0050	0.6879	0.0050	0.6879	
FA (malvidin-3-glucoside, mg/L)	170.2 <sup>a</sup> ± 25.3	185.2 <sup>b</sup> ± 13.8	164.0 <sup>a</sup> ± 15.7	141.8 <sup>a</sup> ± 11.1	143.9 <sup>a</sup> ± 15.1	101.4 <sup>a</sup> ± 13.5	0.0052	0.1870	0.6140	0.1870	0.6140	
CA (malvidin-3-glucoside, mg/L)	240.9 <sup>b</sup> ± 24.1	184.7 <sup>ab</sup> ± 16.0	160.8 <sup>a</sup> ± 13.3	178.9 <sup>b</sup> ± 10.7	163.4 <sup>b</sup> ± 5.5	115.0 <sup>a</sup> ± 9.5	0.0030	0.0007	0.4419	0.0007	0.4419	
CI (A 420nm+520nm+620nm)*10	21.5 <sup>b</sup> ± 1.9	16.1 <sup>ab</sup> ± 1.4	11.9 <sup>a</sup> ± 0.8	21.8 <sup>c</sup> ± 0.7	16.1 <sup>b</sup> ± 1.2	11.0 <sup>a</sup> ± 0.5	0.8520	< 0.0001	0.8594	< 0.0001	0.8594	
%yellow	33.8 <sup>a</sup> ± 0.6	34.8 <sup>a</sup> ± 1.1	36.1 <sup>a</sup> ± 0.8	34.7 <sup>a</sup> ± 0.4	37.1 <sup>ab</sup> ± 1.2	38.3 <sup>b</sup> ± 0.9	0.0180	0.0112	0.7040	0.0112	0.7040	
%red	52.7 <sup>a</sup> ± 0.7	52.4 <sup>a</sup> ± 1.2	51.5 <sup>a</sup> ± 0.7	53.3 <sup>a</sup> ± 0.4	50.8 <sup>a</sup> ± 1.3	50.1 <sup>a</sup> ± 1.1	0.2915	0.0812	0.4450	0.0812	0.4450	
%blue	13.5 <sup>b</sup> ± 0.2	12.8 <sup>ab</sup> ± 0.2	12.5 <sup>b</sup> ± 0.3	12.0 <sup>a</sup> ± 0.1	12.1 <sup>a</sup> ± 0.2	11.7 <sup>a</sup> ± 0.2	< 0.0001	0.0087	0.1000	0.0087	0.1000	
L*	29.9 <sup>a</sup> ± 2.8	39.0 <sup>ab</sup> ± 2.8	48.1 <sup>b</sup> ± 2.5	31.3 <sup>a</sup> ± 0.9	40.3 <sup>b</sup> ± 2.4	52.0 <sup>c</sup> ± 1.5	0.2502	< 0.0001	0.8003	< 0.0001	0.8003	
C*	56.1 <sup>b</sup> ± 1.3	54.9 <sup>ab</sup> ± 1.9	48.9 <sup>a</sup> ± 1.7	61.0 <sup>b</sup> ± 0.2	55.9 <sup>b</sup> ± 2.2	47.5 <sup>a</sup> ± 2.0	0.2780	< 0.0001	0.1843	< 0.0001	0.1843	
h	18.9 <sup>a</sup> ± 2.0	16.4 <sup>a</sup> ± 1.5	14.1 <sup>a</sup> ± 1.6	25.5 <sup>a</sup> ± 1.3	23.4 <sup>a</sup> ± 2.1	19.7 <sup>a</sup> ± 2.1	0.0002	0.0206	0.9108	0.0206	0.9108	
a*	53.5 <sup>b</sup> ± 0.6	52.6 <sup>ab</sup> ± 1.9	47.4 <sup>a</sup> ± 1.8	54.9 <sup>b</sup> ± 0.4	51.1 <sup>b</sup> ± 2.1	44.6 <sup>a</sup> ± 1.9	0.4673	0.0001	0.4182	0.0001	0.4182	
b*	18.2 <sup>b</sup> ± 2.1	15.6 <sup>ab</sup> ± 1.6	11.8 <sup>a</sup> ± 1.1	26.4 <sup>b</sup> ± 1.4	22.2 <sup>ab</sup> ± 2.2	16.0 <sup>a</sup> ± 1.8	0.0002	0.0003	0.5169	0.0003	0.5169	
CC (%)	6.0 <sup>b</sup> ± 1.1	6.7 <sup>a</sup> ± 0.7	8.0 <sup>a</sup> ± 0.7	3.9 <sup>a</sup> ± 0.7	4.2 <sup>a</sup> ± 0.9	8.0 <sup>b</sup> ± 0.7	0.0263	0.0007	0.2813	0.0007	0.2813	
CP (%)	45.8 <sup>a</sup> ± 1.4	47.4 <sup>a</sup> ± 1.6	43.0 <sup>a</sup> ± 1.6	52.6 <sup>b</sup> ± 0.9	48.4 <sup>ab</sup> ± 1.5	46.3 <sup>a</sup> ± 1.5	0.0063	0.0162	0.2491	0.0162	0.2491	
TP (GAE, mg/L)	3905.0 <sup>b</sup> ± 267.8	3110.6 <sup>ab</sup> ± 274.4	2667.5 <sup>a</sup> ± 87.6	3944.3 <sup>b</sup> ± 348.3	3251.6 <sup>ab</sup> ± 256.0	2765.3 <sup>a</sup> ± 115.9	0.4054	0.0014	0.8361	0.0014	0.8361	
PA (catechin, mg/L)	6222.1 <sup>b</sup> ± 352.7	5759.4 <sup>b</sup> ± 145.8	4502.3 <sup>a</sup> ± 138.9	4947.8 <sup>a</sup> ± 448.3	5171.4 <sup>a</sup> ± 406.5	4688.9 <sup>a</sup> ± 206.7	0.0618	0.0119	0.0336	0.0119	0.0336	
FL (catechin, mol/L)	2.2 x 10 <sup>-3b</sup> ± 1.0 x 10 <sup>-4</sup>	2.1 x 10 <sup>-3b</sup> ± 6.6 x 10 <sup>-5</sup>	1.7 x 10 <sup>-3a</sup> ± 2.4 x 10 <sup>-5</sup>	2.4 x 10 <sup>-3b</sup> ± 9.1 x 10 <sup>-5</sup>	1.9 x 10 <sup>-3a</sup> ± 9.5 x 10 <sup>-5</sup>	1.9 x 10 <sup>-3b</sup> ± 1.2 x 10 <sup>-4</sup>	0.5301	0.0001	0.0274	0.0001	0.0274	
GI (%)	74.2 <sup>a</sup> ± 1.5	72.9 <sup>a</sup> ± 2.7	73.1 <sup>a</sup> ± 1.3	66.8 <sup>a</sup> ± 10.3	71.7 <sup>a</sup> ± 3.4	74.4 <sup>a</sup> ± 2.9	0.3230	0.6580	0.4592	0.6580	0.4592	

TA, total anthocyanins; FA, free anthocyanins; CA, combined anthocyanins; CI, color intensity; CIELab coordinates (L\*, lightness; C\*, chroma; h, hue; a\*, red-greenness; b\*, yellow-blueness); CC, color due to copigmentation; CP, color due to polymeric pigments; TP, total phenols; PA, proanthocyanidins; FL, molar concentration of flavanols; GI, gelatin index. All data are expressed as the arithmetic mean ± standard error (n=5). Different letters within the same row indicate significant differences (p<0.05) among price segments for the same variety, according to a Tukey HSD test. <sup>d</sup> Interaction effect between variety and price segment. <sup>e</sup> Considered significant when pvalue<0.05.

In order to evaluate the colorimetric difference amongst wines of different commercial value, the total color difference ( $\Delta E^*$ ) was determined. This parameter could be very important for the wine industry as expresses the human eye's ability to discriminate between the colors of two wines. It is generally accepted that tasters can only distinguish the color of two wines through the glass when  $\Delta E^* \geq 5$  units (Pérez-Magariño & González-Sanjosé, 2003). In our study, the mean  $\Delta E^*$  among MB samples of different price segments were 20.5 (between high and low), 14.0 (between medium and low), and 10.0 units (between high and medium); and for CS, 25.7, 16.8 and 11.8 units, respectively. These values obtained indicate its actual impact on the visual quality of wine

Parallel to that observed in the color, the total anthocyanin concentration showed a positive upward trend with increasing the commercial value of wines. This behavior was similar for combined anthocyanins, while for free anthocyanins there was no difference among price segments. The higher proportion of combined anthocyanins in high-end wines could be explained by the higher level of flavanols found in those segments, which confirm the condensation reaction between both compound families (Terrier et al., 2009). In addition, when comparing both cultivars it was observed a significant difference ( $p < 0.05$ ), with higher anthocyanin content in MB than in CS wines (**Table 1**). These results are in agreement with those obtained by other authors in wines from the same varieties (Fanzone et al., 2010; Kontoudakis et al., 2011c).

Analyzing the contribution of %CC and %CP to the total wine color we observed an opposite pattern, showing an increase in %CP and a decrease in %CC with augmenting the commercial value of wines, particularly in the CS variety. The high proportion of copigmentation in low segment wines was probably due to their short aging time (wines of the year) compared to the rest. This is in agreement with Boulton (2001) who suggested that up to 30-50% of the red color of young red wines is dependent on the development and concentration of copigmented anthocyanins. By contrast, the polymerization observed in the upper segments confirms the obtained levels of combined anthocyanins, and it supposes the formation of new pigments by means of condensation and cycloaddition reactions (Monagas & Bartolomé, 2009; Terrier et al., 2009). Finally, when analyze the pooled data of the wines, we observed a significant difference between varieties in the level of the parameters mentioned, with a higher proportion of %CP in CS wines (**Table 1**).

### 3.2. Anthocyanins and derived pigments

The identified and quantified compounds in the wine samples are summarizes in **Table 2**. They were grouped in non-acylated glucosides, acetyl-glucosides, coumaroyl-glucosides, and a group formed by more complex anthocyanin-derived pigments (pyranoanthocyanins). All identified compounds were detected in all of the wines studied. The overall results were similar to those obtained by spectrophotometry, although the values were significantly lower. This is because HPLC

analysis only detects free anthocyanins, whereas spectrophotometric analysis overestimates their total amount including other pigments (Canals, Llaudy, Canals, & Zamora, 2008).

Remarkable quantitative differences could be noticed in the anthocyanin profile of wines from different commercial value, reconfirming the richness of the upper segments. Coincident with the spectrophotometric determination, the MB and CS wines of high segment had the highest content of total monomeric anthocyanins (188.0 and 158.7 mg/L, respectively), showing a significant difference between varieties (**Table 2**). A similar tendency was observed in monoglucosides and pyranoanthocyanins for the cultivar MB; and in all of the groups for CS wines.

The mean proportions of some anthocyanic forms were different between varieties, but the relations amongst anthocyanic groups seem to be characteristic of them (**Table 2**). The group of monoglucosides represented the highest proportion of all anthocyanins, ranging from 61.2 to 65.9% (MB) and from 56.5 to 62.2% (CS). These results are in agreement with those published by others authors for the same cultivars (Fanzone et al., 2010; González-Neves et al., 2007; Hermosín Gutiérrez, Sánchez-Palomo Lorenzo, & Vicario Espinosa, 2005; Puértolas, Hernández-Orte, Saldaña, Álvarez, & Raso, 2010). Considering the acylated derivatives, both varieties showed a similar proportion of acetyl-glucosides, whereas presented a significant difference with regard to coumaroyl-glucosides. These results are consistent with the literature (Fanzone et al., 2010; González-Neves et al., 2007; Monagas, Núñez, Bartolomé, & Gómez-Cordovés, 2003a).

As shown in **Table 2**, the malvidin was the most abundant anthocyanidin in MB and CS samples while the cyanidin derivatives showed the lowest proportion, confirming its behavior observed in previous studies (Cerezo, Cuevas, Winterhalter, García-Parrilla, & Troncoso, 2010; Fanzone et al., 2010; González-Neves et al., 2007).

Pyranoanthocyanins are of interest for winemakers because they have high stability during the aging of red wines, are more resistant to elevated pH values and bisulphite bleaching than anthocyanins, and express more color than other pigments at the typical pH of wine (Monagas, Núñez, Bartolomé, & Gómez-Cordovés, 2003a). In our study, the MB and CS wines of high segment contained the highest levels of all derived pigments, which support the greater proportion of combined anthocyanins and polymeric pigments obtained by spectrophotometry (**Table 1**).

Taken together, these results indicate the great incidence of the main compounds responsible for wine color on the commercial value of wines.

Compound	Malbec						Cabernet Sauvignon			Factor	
	Price segment						Variety	Segment	P <sub>value</sub> <sup>d</sup>	Variety x Segment <sup>e</sup>	
	High	Medium	Low	High	Medium	Low					
Delphinidin-3-glucoside	10.8 <sup>b</sup> ± 1.5	9.2 <sup>ab</sup> ± 0.9	6.5 <sup>a</sup> ± 0.4	8.7 <sup>b</sup> ± 0.4	8.9 <sup>b</sup> ± 1.4	5.4 <sup>a</sup> ± 0.7					
Cyanidin-3-glucoside	2.4 <sup>b</sup> ± 0.4	1.7 <sup>ab</sup> ± 0.1	1.3 <sup>a</sup> ± 0.1	2.2 <sup>ab</sup> ± 0.2	2.3 <sup>b</sup> ± 0.4	1.2 <sup>a</sup> ± 0.1					
Petunidin-3-glucoside	17.1 <sup>b</sup> ± 1.4	14.2 <sup>b</sup> ± 0.7	10.3 <sup>a</sup> ± 0.5	10.9 <sup>b</sup> ± 0.2	10.5 <sup>b</sup> ± 0.9	6.8 <sup>a</sup> ± 0.6					
Peonidin-3-glucoside	11.7 <sup>b</sup> ± 0.8	10.2 <sup>ab</sup> ± 0.8	8.4 <sup>a</sup> ± 0.5	9.4 <sup>ab</sup> ± 0.2	10.1 <sup>b</sup> ± 1.1	5.8 <sup>a</sup> ± 0.6					
Malvidin-3-glucoside	73.0 <sup>a</sup> ± 4.2	66.7 <sup>a</sup> ± 4.3	58.9 <sup>a</sup> ± 5.0	58.5 <sup>b</sup> ± 5.2	54.5 <sup>ab</sup> ± 4.2	41.9 <sup>a</sup> ± 1.2					
Total glucosylated	115.0 <sup>b</sup> ± 3.2 (61.2)	102.0 <sup>ab</sup> ± 6.2 (65.0)	85.4 <sup>a</sup> ± 6.1 (65.9)	89.7 <sup>b</sup> ± 4.6 (56.5)	86.3 <sup>b</sup> ± 3.6 (62.2)	61.1 <sup>a</sup> ± 3.0 (60.8)	<0.0001			0.2811	
Delphinidin-3-(6"-acetyl)glucoside	6.0 <sup>b</sup> ± 0.8	3.7 <sup>a</sup> ± 0.4	2.8 <sup>a</sup> ± 0.3	4.5 <sup>b</sup> ± 0.3	4.2 <sup>b</sup> ± 0.5	2.8 <sup>a</sup> ± 0.2					
Cyanidin-3-(6"-acetyl)glucoside	5.8 <sup>b</sup> ± 0.7	4.3 <sup>ab</sup> ± 0.7	2.4 <sup>a</sup> ± 0.2	5.7 <sup>b</sup> ± 0.8	3.5 <sup>a</sup> ± 0.2	2.8 <sup>a</sup> ± 0.3					
Petunidin-3-(6"-acetyl)glucoside	6.0 <sup>b</sup> ± 0.3	4.5 <sup>a</sup> ± 0.4	3.3 <sup>a</sup> ± 0.4	5.2 <sup>b</sup> ± 0.3	3.9 <sup>ab</sup> ± 0.3	3.0 <sup>a</sup> ± 0.2					
Peonidin-3-(6"-acetyl)glucoside	3.9 <sup>b</sup> ± 0.7	3.3 <sup>a</sup> ± 0.5	3.3 <sup>a</sup> ± 0.4	3.8 <sup>a</sup> ± 0.7	3.5 <sup>b</sup> ± 0.3	2.4 <sup>a</sup> ± 0.1					
Malvidin-3-(6"-acetyl)glucoside	9.7 <sup>b</sup> ± 1.0	8.7 <sup>a</sup> ± 0.9	9.3 <sup>a</sup> ± 1.6	14.1 <sup>a</sup> ± 3.4	10.7 <sup>b</sup> ± 2.1	9.9 <sup>a</sup> ± 0.9					
Total acetylated	31.5 <sup>a</sup> ± 2.2 (16.8)	24.5 <sup>a</sup> ± 2.9 (15.6)	21.2 <sup>a</sup> ± 2.7 (16.4)	33.1 <sup>b</sup> ± 4.8 (20.9)	25.8 <sup>ab</sup> ± 1.8 (18.6)	21.0 <sup>a</sup> ± 0.6 (20.9)	0.5280	<0.0001		0.8465	
Delphinidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside	1.8 <sup>a</sup> ± 0.1	1.6 <sup>a</sup> ± 0.2	1.3 <sup>a</sup> ± 0.2	1.6 <sup>b</sup> ± 0.2	1.2 <sup>ab</sup> ± 0.1	0.9 <sup>a</sup> ± 0.1					
Cyanidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside	0.20 <sup>b</sup> ± 0.04	0.13 <sup>a</sup> ± 0.02	0.15 <sup>a</sup> ± 0.02	0.20 <sup>b</sup> ± 0.01	0.17 <sup>a</sup> ± 0.03	0.20 <sup>b</sup> ± 0.04					
Petunidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside	0.7 <sup>b</sup> ± 0.1	0.6 <sup>b</sup> ± 0.1	0.6 <sup>a</sup> ± 0.1	0.15 <sup>a</sup> ± 0.04	0.33 <sup>b</sup> ± 0.03	0.13 <sup>a</sup> ± 0.03					
Peonidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside	3.1 <sup>a</sup> ± 0.7	2.0 <sup>b</sup> ± 0.5	1.5 <sup>a</sup> ± 0.4	2.6 <sup>b</sup> ± 0.4	2.3 <sup>b</sup> ± 0.3	0.9 <sup>a</sup> ± 0.1					
Malvidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside cis	0.47 <sup>a</sup> ± 0.10	0.30 <sup>a</sup> ± 0.04	0.28 <sup>a</sup> ± 0.04	0.30 <sup>b</sup> ± 0.01	0.37 <sup>a</sup> ± 0.12	0.13 <sup>a</sup> ± 0.06					
Malvidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside trans	7.6 <sup>b</sup> ± 0.9	5.4 <sup>a</sup> ± 0.6	5.6 <sup>a</sup> ± 1.1	4.6 <sup>ab</sup> ± 0.1	4.7 <sup>b</sup> ± 0.4	3.1 <sup>a</sup> ± 0.3					
Total coumaroylated	13.9 <sup>a</sup> ± 1.2 (7.4)	10.0 <sup>a</sup> ± 1.1 (6.4)	9.3 <sup>a</sup> ± 1.7 (7.2)	9.4 <sup>b</sup> ± 0.3 (5.9)	9.1 <sup>b</sup> ± 0.2 (6.6)	5.3 <sup>a</sup> ± 0.5 (5.3)	0.0001			0.0510	
Vitisin A	12.4 <sup>b</sup> ± 2.5	9.3 <sup>ab</sup> ± 1.7	5.2 <sup>a</sup> ± 0.5	12.4 <sup>b</sup> ± 0.8	7.2 <sup>a</sup> ± 1.2	6.0 <sup>a</sup> ± 1.0					
Vitisin B	8.0 <sup>b</sup> ± 0.5	5.6 <sup>a</sup> ± 0.5	4.2 <sup>a</sup> ± 0.4	6.7 <sup>b</sup> ± 0.1	5.1 <sup>b</sup> ± 0.5	3.4 <sup>a</sup> ± 0.3					
Peonidin-3-glucoside piruvate	3.2 <sup>b</sup> ± 0.6	2.2 <sup>ab</sup> ± 0.3	1.4 <sup>a</sup> ± 0.1	2.9 <sup>b</sup> ± 0.1	2.1 <sup>ab</sup> ± 0.4	1.5 <sup>a</sup> ± 0.2					
Malvidin-3-glucoside-ethyl-epicatechin	3.3 <sup>b</sup> ± 0.2	2.4 <sup>a</sup> ± 0.2	1.9 <sup>a</sup> ± 0.2	3.3 <sup>b</sup> ± 0.1	2.1 <sup>ab</sup> ± 0.3	1.5 <sup>a</sup> ± 0.2					
Malvidin-3-glucoside-4-vinylphenol	0.8 <sup>a</sup> ± 0.3	0.9 <sup>a</sup> ± 0.2	0.9 <sup>a</sup> ± 0.2	1.4 <sup>b</sup> ± 0.5	0.9 <sup>a</sup> ± 0.1	0.7 <sup>a</sup> ± 0.2					
Total derivatives	27.7 <sup>b</sup> ± 3.9 (14.7)	20.4 <sup>ab</sup> ± 2.6 (13.0)	13.6 <sup>a</sup> ± 1.2 (10.5)	26.6 <sup>b</sup> ± 0.3 (16.8)	17.5 <sup>a</sup> ± 2.3 (12.6)	13.0 <sup>a</sup> ± 1.4 (12.9)	0.2184	<0.0001		0.6610	
Total anthocyanins	188.0 <sup>b</sup> ± 7.2	156.9 <sup>ab</sup> ± 11.0	129.5 <sup>a</sup> ± 11.5	158.7 <sup>b</sup> ± 9.5	138.7 <sup>b</sup> ± 2.9	100.5 <sup>a</sup> ± 4.4	<0.0001			0.5378	

All data are expressed as the arithmetic mean (mg/L) ± standard error (n=5). Different letters in the same row indicate significant differences among price segments for the same variety (Tukey HSD, p<0.05). Values between parenthesis refer to the relationship (%) between anthocyanin derivatives by acylation and total anthocyanins. <sup>c</sup> Interaction effect between variety and price segment. <sup>d</sup> Considered significant when P<sub>value</sub><0.05.

### 3.3. Low molecular weight phenolic composition

**Table 3** presents the concentration of the low molecular weight phenolic compounds, individually and grouped and the relative proportions of each group, in the wine samples analyzed. Within the family of non-flavonoids, we identified 6 hydroxybenzoic acids/derivatives, 6 hydroxycinnamic acids/derivatives, 2 stilbenes, and 2 phenolic alcohols. While among the flavonoids, we found 8 flavanols, 10 flavonols, and 3 dihydroflavonols.

Coincident with the results obtained so far, there was a trend towards a higher content of non-anthocyanin phenolics with increasing the commercial value of wines, showing significant differences between varieties for some groups of compounds (**Table 3**). Flavonoids were the most abundant fraction (mean, 78.1% in MB and 72.7% in CS) compared to non-flavonoids (mean, 21.9% in MB and 27.3% in CS), as reported by other authors (Fanzone et al., 2010; Granato et al., 2011; Monagas et al., 2005). With regard to the non-flavonoids, hydroxybenzoic acids/derivatives and phenolic alcohols were the most abundant groups found in our samples, without significant differences among price segments for both varieties. Gallic acid showed by far the highest concentration of all benzoic derivatives (mean, 16.2 mg/L in MB and 17.6 mg/L in CS), and tyrosol was the main phenolic alcohol found (mean, 22.2 mg/L in MB and 23.5 mg/L in CS).

The hydroxycinnamic acids quantified in our wines were *trans*-caffeic and *trans-p*-coumaric acids, being CS richer than MB (**Table 3**). Analyzing their precursors (caftaric and coutaric acids), we observed a higher content of these compounds than of the free acids in all of the wines evaluated, according to other authors (Puértolas et al., 2010; Sáenz-Navajas, Tao, Dizy, Ferreira, Fernández-Zurbano, 2010b). In addition, CS wines of high segment presented a greater content of these precursors compared with wines of lesser commercial value.

Stilbenes were the minority non-flavonoid group in the wines analyzed, showing higher concentrations in MB compared to CS wines. These differences may be due not only to the grape variety but also to fungal infections, winemaking procedures, and weather conditions (Vitrac, Monti, Vercauteren, Deffieux, & Mérillon, 2002). In this work we detected *trans*- and *cis*-resveratrol glucoside, with a greater abundance of the *trans* isomer, in accordance with other authors (Monagas et al., 2005; Vitrac et al., 2002). Of particular interest, was the high total concentration observed in MB wines of high segment (7.2 mg/L) compared to the other segments. This could be explained by a possible elevated content in grapes. A previous study by our workgroup conducted in the Valle de Uco region (Mendoza) showed a high content of stilbenes in Malbec grape skins (Fanzone, Zamora, Jofré, Assof, & Peña-Neira, 2011). It is important to note that premium Malbec wines are mainly produced in Mendoza from grapes grown in high altitudes, such as Valle de Uco, where agroecological conditions could favor the synthesis of stilbenes.

Flavanols were the major class of non-anthocyanin phenolics present in the wines studied (mean, 38.4% in MB and 46.6% in CS). Also in this case, the amount of flavanols justifies the significant differences observed among wines of different commercial value, especially in CS samples (**Table 3**). The high segment wines showed the highest levels of these compounds, mainly oligomers (dimers and trimers), confirming the results obtained with regard to the proportion of polymeric pigments (%CP) in CS wines of upper commercial value (**Table 1**). In both varieties evaluated, the (+)-catechin levels were higher than those of (-)-epicatechin. These results are in agreement with those presented in the literature for the same varieties (Fanzone et al., 2010; Granato et al., 2011; Monagas, Gómez-Cordovés, Bartolomé, Laureano, & Da Silva, 2003b). On the other hand, the content of dimers and trimers was lower than the monomers in all samples, with the exception of compound called “procyanidin dimer 2” that showed greater levels (**Table 3**).

Concerning to flavonols, their importance in red wines lies in its health properties and its contribution to the color by the phenomenon of copigmentation (Ribéreau-Gayon et al., 2000). The total content in MB and CS samples ranged from 60.2 to 87.3 mg/L and from 55.5 to 67.2 mg/L, respectively, indicating a significant difference between varieties (**Table 3**). These elevated values for both varieties could be explained by the climatic conditions of Mendoza, characterized by high sunlight radiation during the ripening period of grapes, which appears to be associated with an increased accumulation of flavonols (Makris, Kallithraka, & Kefalas, 2006). Analyzing the distribution of flavonol structures, we can notice different proportions between varieties, in agreement to Mattivi, Guzzon, Vrhovsek, Stefanini and Velasco (2006). In the pattern of MB wines, the main flavonol was myricetin (mean = 31.7%), followed by quercetin (25.8%), kaempferol (16.3%), isorhamnetin (12.9%), syringetin (8.8%), and naringenin (4.5%), whereas in CS, quercetin (29.1%) was the main flavonol, followed by myricetin (27.9%), kaempferol (13.5%), isorhamnetin (13.0%), syringetin (10.2%), and naringenin (6.5%). Again, following the same tendency observed in other phenolic groups, the level of most of the flavonols was higher in high segment wines showing their positive impact on the commercial value. The particular higher concentration in high-end wines could be related to a greater potential in grapes. In a recent study by Berli, Fanzone, Piccoli and Bottini (2011), it was observed a significant effect of solar UV-B radiation by promoting the flavonol synthesis in grapes grown in Valle de Uco (Mendoza), a region primarily intended for production of premium wines.

**Table 3**  
 Low molecular weight phenolic compounds quantified in Malbec and Cabernet Sauvignon wines of different commercial value. Probability values for variety and price segment.

Compound	Malbec						Cabernet Sauvignon						Factor				
	High		Medium		Low		High		Medium		Low			P <sub>value</sub> <sup>e</sup>			
	High	Medium	Low	High	Medium	Low	High	Medium	Low	Variety	Segment	Variety x Segment <sup>d</sup>					
<i>Non-flavonoid phenolics</i>																	
Gallic acid	16.6 <sup>a</sup> ± 0.6	14.8 <sup>a</sup> ± 1.1	17.1 <sup>a</sup> ± 0.9	18.5 <sup>a</sup> ± 0.3	17.3 <sup>a</sup> ± 0.6	17.1 <sup>a</sup> ± 0.4	1.8 <sup>a</sup> ± 0.1	1.6 <sup>a</sup> ± 0.1	1.7 <sup>a</sup> ± 0.1	2.2 <sup>a</sup> ± 0.1	2.0 <sup>a</sup> ± 0.1	2.1 <sup>a</sup> ± 0.1	2.0 <sup>a</sup> ± 0.1	2.1 <sup>a</sup> ± 0.1	2.1 <sup>a</sup> ± 0.1	1.6 <sup>a</sup> ± 0.1	
Protocatechuic acid	2.9 <sup>b</sup> ± 0.1	2.0 <sup>b</sup> ± 0.1	2.1 <sup>a</sup> ± 0.2	1.8 <sup>a</sup> ± 0.1	1.7 <sup>a</sup> ± 0.1	1.6 <sup>a</sup> ± 0.1	0.88 <sup>a</sup> ± 0.02	2.6 <sup>a</sup> ± 0.2	2.7 <sup>a</sup> ± 0.2	2.5 <sup>a</sup> ± 0.2	0.94 <sup>a</sup> ± 0.02	0.90 <sup>a</sup> ± 0.04	0.90 <sup>a</sup> ± 0.04	0.93 <sup>a</sup> ± 0.05	0.96 <sup>a</sup> ± 0.07	0.94 <sup>a</sup> ± 0.02	
Syringic acid	3.5 <sup>a</sup> ± 0.3	2.6 <sup>a</sup> ± 0.2	2.7 <sup>a</sup> ± 0.2	2.3 <sup>a</sup> ± 0.1	2.3 <sup>a</sup> ± 0.1	2.6 <sup>a</sup> ± 0.1	3.5 <sup>a</sup> ± 0.3	2.6 <sup>a</sup> ± 0.2	2.7 <sup>a</sup> ± 0.2	2.3 <sup>a</sup> ± 0.1	2.3 <sup>a</sup> ± 0.1	3.5 <sup>a</sup> ± 0.3	2.6 <sup>a</sup> ± 0.2	2.7 <sup>a</sup> ± 0.2	2.3 <sup>a</sup> ± 0.1	2.6 <sup>a</sup> ± 0.1	
Gentisic acid	8.0 <sup>a</sup> ± 0.5	7.2 <sup>a</sup> ± 0.5	7.6 <sup>a</sup> ± 0.7	9.7 <sup>a</sup> ± 0.7	7.9 <sup>a</sup> ± 0.5	7.6 <sup>a</sup> ± 0.4	8.0 <sup>a</sup> ± 0.5	7.2 <sup>a</sup> ± 0.5	7.6 <sup>a</sup> ± 0.7	9.7 <sup>a</sup> ± 0.7	7.9 <sup>a</sup> ± 0.5	8.0 <sup>a</sup> ± 0.5	7.2 <sup>a</sup> ± 0.5	7.6 <sup>a</sup> ± 0.7	9.7 <sup>a</sup> ± 0.7	7.9 <sup>a</sup> ± 0.4	
Methyl gallate	33.7 <sup>a</sup> ± 1.0 (8.2)	29.2 <sup>a</sup> ± 1.6 (8.1)	32.1 <sup>a</sup> ± 1.7 (9.2)	35.4 <sup>a</sup> ± 1.1 (10.2)	32.4 <sup>a</sup> ± 1.0 (10.5)	31.9 <sup>a</sup> ± 0.7 (10.7)	33.7 <sup>a</sup> ± 1.0 (8.2)	29.2 <sup>a</sup> ± 1.6 (8.1)	32.1 <sup>a</sup> ± 1.7 (9.2)	35.4 <sup>a</sup> ± 1.1 (10.2)	32.4 <sup>a</sup> ± 1.0 (10.5)	31.9 <sup>a</sup> ± 0.7 (10.7)	33.7 <sup>a</sup> ± 1.0 (8.2)	29.2 <sup>a</sup> ± 1.6 (8.1)	32.1 <sup>a</sup> ± 1.7 (9.2)	35.4 <sup>a</sup> ± 1.1 (10.2)	0.3802
Ethyl gallate	4.0 <sup>a</sup> ± 0.3	3.5 <sup>a</sup> ± 0.3	3.1 <sup>a</sup> ± 0.3	8.2 <sup>b</sup> ± 0.1	5.7 <sup>ab</sup> ± 0.6	3.4 <sup>a</sup> ± 0.4	4.0 <sup>a</sup> ± 0.3	3.5 <sup>a</sup> ± 0.3	3.1 <sup>a</sup> ± 0.3	8.2 <sup>b</sup> ± 0.1	5.7 <sup>ab</sup> ± 0.6	3.4 <sup>a</sup> ± 0.4	4.0 <sup>a</sup> ± 0.3	3.5 <sup>a</sup> ± 0.3	3.1 <sup>a</sup> ± 0.3	3.4 <sup>a</sup> ± 0.4	
<i>Hydroxybenzoic acids/derivatives</i>	0.82 <sup>a</sup> ± 0.07	0.94 <sup>a</sup> ± 0.07	0.88 <sup>a</sup> ± 0.04	2.25 <sup>b</sup> ± 0.03	1.56 <sup>ab</sup> ± 0.14	1.32 <sup>a</sup> ± 0.06	0.82 <sup>a</sup> ± 0.07	0.94 <sup>a</sup> ± 0.07	0.88 <sup>a</sup> ± 0.04	2.25 <sup>b</sup> ± 0.03	1.56 <sup>ab</sup> ± 0.14	1.32 <sup>a</sup> ± 0.06	0.82 <sup>a</sup> ± 0.07	0.94 <sup>a</sup> ± 0.07	0.88 <sup>a</sup> ± 0.04	1.32 <sup>a</sup> ± 0.06	
<i>trans</i> -Catearic acid	3.0 <sup>a</sup> ± 0.2	3.2 <sup>a</sup> ± 0.3	3.0 <sup>a</sup> ± 0.3	7.3 <sup>c</sup> ± 0.3	5.2 <sup>b</sup> ± 0.5	3.3 <sup>a</sup> ± 0.2	3.0 <sup>a</sup> ± 0.2	3.2 <sup>a</sup> ± 0.3	3.0 <sup>a</sup> ± 0.3	7.3 <sup>c</sup> ± 0.3	5.2 <sup>b</sup> ± 0.5	3.3 <sup>a</sup> ± 0.2	3.0 <sup>a</sup> ± 0.2	3.2 <sup>a</sup> ± 0.3	3.0 <sup>a</sup> ± 0.3	3.3 <sup>a</sup> ± 0.2	
<i>trans</i> -Coutaric acid	3.4 <sup>a</sup> ± 0.2	3.0 <sup>a</sup> ± 0.1	3.0 <sup>a</sup> ± 0.1	2.95 <sup>a</sup> ± 0.03	3.08 <sup>a</sup> ± 0.06	2.86 <sup>a</sup> ± 0.15	3.4 <sup>a</sup> ± 0.2	3.0 <sup>a</sup> ± 0.1	3.0 <sup>a</sup> ± 0.1	2.95 <sup>a</sup> ± 0.03	3.08 <sup>a</sup> ± 0.06	2.86 <sup>a</sup> ± 0.15	3.4 <sup>a</sup> ± 0.2	3.0 <sup>a</sup> ± 0.1	3.0 <sup>a</sup> ± 0.1	2.86 <sup>a</sup> ± 0.15	
<i>trans</i> -Fentaric acid	2.6 <sup>a</sup> ± 0.1	2.9 <sup>a</sup> ± 0.3	3.3 <sup>a</sup> ± 0.3	3.4 <sup>a</sup> ± 0.3	3.6 <sup>a</sup> ± 0.3	3.7 <sup>a</sup> ± 0.3	2.6 <sup>a</sup> ± 0.1	2.9 <sup>a</sup> ± 0.3	3.3 <sup>a</sup> ± 0.3	3.4 <sup>a</sup> ± 0.3	3.6 <sup>a</sup> ± 0.3	3.7 <sup>a</sup> ± 0.3	2.6 <sup>a</sup> ± 0.1	2.9 <sup>a</sup> ± 0.3	3.3 <sup>a</sup> ± 0.3	3.7 <sup>a</sup> ± 0.3	
<i>trans</i> -Caffeic acid	3.0 <sup>a</sup> ± 0.2	4.2 <sup>ab</sup> ± 0.5	5.0 <sup>b</sup> ± 0.6	4.1 <sup>a</sup> ± 0.2	4.4 <sup>a</sup> ± 0.3	4.5 <sup>a</sup> ± 0.4	3.0 <sup>a</sup> ± 0.2	4.2 <sup>ab</sup> ± 0.5	5.0 <sup>b</sup> ± 0.6	4.1 <sup>a</sup> ± 0.2	4.4 <sup>a</sup> ± 0.3	4.5 <sup>a</sup> ± 0.4	3.0 <sup>a</sup> ± 0.2	4.2 <sup>ab</sup> ± 0.5	5.0 <sup>b</sup> ± 0.6	4.5 <sup>a</sup> ± 0.4	
<i>trans</i> -p-Coumaric acid	16.8 <sup>a</sup> ± 0.5 (4.1)	17.7 <sup>a</sup> ± 0.4 (4.9)	18.3 <sup>a</sup> ± 0.4 (5.3)	28.2 <sup>c</sup> ± 0.8 (8.1)	23.5 <sup>b</sup> ± 0.9 (7.6)	19.1 <sup>a</sup> ± 0.2 (6.3)	16.8 <sup>a</sup> ± 0.5 (4.1)	17.7 <sup>a</sup> ± 0.4 (4.9)	18.3 <sup>a</sup> ± 0.4 (5.3)	28.2 <sup>c</sup> ± 0.8 (8.1)	23.5 <sup>b</sup> ± 0.9 (7.6)	19.1 <sup>a</sup> ± 0.2 (6.3)	16.8 <sup>a</sup> ± 0.5 (4.1)	17.7 <sup>a</sup> ± 0.4 (4.9)	18.3 <sup>a</sup> ± 0.4 (5.3)	28.2 <sup>c</sup> ± 0.8 (8.1)	<0.0001
<i>Hydroxycinnamic acids/derivatives</i>	4.1 <sup>b</sup> ± 0.3	2.0 <sup>a</sup> ± 0.2	2.1 <sup>a</sup> ± 0.2	1.8 <sup>a</sup> ± 0.1	1.9 <sup>a</sup> ± 0.2	1.8 <sup>a</sup> ± 0.2	4.1 <sup>b</sup> ± 0.3	2.0 <sup>a</sup> ± 0.2	2.1 <sup>a</sup> ± 0.2	1.8 <sup>a</sup> ± 0.1	1.9 <sup>a</sup> ± 0.2	1.8 <sup>a</sup> ± 0.2	4.1 <sup>b</sup> ± 0.3	2.0 <sup>a</sup> ± 0.2	2.1 <sup>a</sup> ± 0.2	1.8 <sup>a</sup> ± 0.2	<0.0001
<i>trans</i> -Resveratrol-3-glucoside	3.1 <sup>b</sup> ± 0.2	1.8 <sup>a</sup> ± 0.2	1.9 <sup>a</sup> ± 0.1	1.3 <sup>a</sup> ± 0.1	1.2 <sup>a</sup> ± 0.1	1.3 <sup>a</sup> ± 0.1	3.1 <sup>b</sup> ± 0.2	1.8 <sup>a</sup> ± 0.2	1.9 <sup>a</sup> ± 0.1	1.3 <sup>a</sup> ± 0.1	1.2 <sup>a</sup> ± 0.1	1.3 <sup>a</sup> ± 0.1	3.1 <sup>b</sup> ± 0.2	1.8 <sup>a</sup> ± 0.2	1.9 <sup>a</sup> ± 0.1	1.3 <sup>a</sup> ± 0.1	<0.0001
<i>cis</i> -Resveratrol-3-glucoside	7.2 <sup>b</sup> ± 0.5 (1.7)	3.8 <sup>a</sup> ± 0.3 (1.1)	4.0 <sup>a</sup> ± 0.2 (1.1)	3.1 <sup>a</sup> ± 0.1 (0.9)	3.1 <sup>a</sup> ± 0.2 (1.0)	3.1 <sup>a</sup> ± 0.2 (1.0)	7.2 <sup>b</sup> ± 0.5 (1.7)	3.8 <sup>a</sup> ± 0.3 (1.1)	4.0 <sup>a</sup> ± 0.2 (1.1)	3.1 <sup>a</sup> ± 0.1 (0.9)	3.1 <sup>a</sup> ± 0.2 (1.0)	3.1 <sup>a</sup> ± 0.2 (1.0)	7.2 <sup>b</sup> ± 0.5 (1.7)	3.8 <sup>a</sup> ± 0.3 (1.1)	4.0 <sup>a</sup> ± 0.2 (1.1)	3.1 <sup>a</sup> ± 0.2 (1.0)	<0.0001
<i>Stilbenes</i>	22.1 <sup>a</sup> ± 1.5	21.4 <sup>a</sup> ± 1.3	23.2 <sup>a</sup> ± 1.1	23.4 <sup>a</sup> ± 0.5	22.9 <sup>a</sup> ± 1.5	24.2 <sup>a</sup> ± 1.5	22.1 <sup>a</sup> ± 1.5	21.4 <sup>a</sup> ± 1.3	23.2 <sup>a</sup> ± 1.1	23.4 <sup>a</sup> ± 0.5	22.9 <sup>a</sup> ± 1.5	24.2 <sup>a</sup> ± 1.5	22.1 <sup>a</sup> ± 1.5	21.4 <sup>a</sup> ± 1.3	23.2 <sup>a</sup> ± 1.1	23.4 <sup>a</sup> ± 0.5	
Tyrosol	4.6 <sup>a</sup> ± 0.3	4.3 <sup>a</sup> ± 0.2	5.8 <sup>b</sup> ± 0.3	3.4 <sup>a</sup> ± 0.1	3.6 <sup>a</sup> ± 0.4	3.6 <sup>a</sup> ± 0.3	4.6 <sup>a</sup> ± 0.3	4.3 <sup>a</sup> ± 0.2	5.8 <sup>b</sup> ± 0.3	3.4 <sup>a</sup> ± 0.1	3.6 <sup>a</sup> ± 0.4	3.6 <sup>a</sup> ± 0.3	4.6 <sup>a</sup> ± 0.3	4.3 <sup>a</sup> ± 0.2	5.8 <sup>b</sup> ± 0.3	3.6 <sup>a</sup> ± 0.3	
Tryptophol	26.7 <sup>a</sup> ± 1.5 (6.5)	25.7 <sup>a</sup> ± 1.2 (7.2)	29.0 <sup>a</sup> ± 1.3 (8.4)	26.8 <sup>a</sup> ± 0.3 (7.7)	26.5 <sup>a</sup> ± 1.8 (8.6)	27.8 <sup>a</sup> ± 1.7 (9.3)	26.7 <sup>a</sup> ± 1.5 (6.5)	25.7 <sup>a</sup> ± 1.2 (7.2)	29.0 <sup>a</sup> ± 1.3 (8.4)	26.8 <sup>a</sup> ± 0.3 (7.7)	26.5 <sup>a</sup> ± 1.8 (8.6)	27.8 <sup>a</sup> ± 1.7 (9.3)	26.7 <sup>a</sup> ± 1.5 (6.5)	25.7 <sup>a</sup> ± 1.2 (7.2)	29.0 <sup>a</sup> ± 1.3 (8.4)	26.8 <sup>a</sup> ± 0.3 (7.7)	0.7452
<i>Alcohols/related compounds</i>	84.4 <sup>a</sup> ± 2.7 (20.5)	76.4 <sup>a</sup> ± 2.5 (21.3)	83.4 <sup>a</sup> ± 2.5 (24.0)	93.5 <sup>b</sup> ± 1.6 (26.9)	85.5 <sup>a</sup> ± 1.3 (27.7)	81.9 <sup>a</sup> ± 1.9 (27.4)	84.4 <sup>a</sup> ± 2.7 (20.5)	76.4 <sup>a</sup> ± 2.5 (21.3)	83.4 <sup>a</sup> ± 2.5 (24.0)	93.5 <sup>b</sup> ± 1.6 (26.9)	85.5 <sup>a</sup> ± 1.3 (27.7)	81.9 <sup>a</sup> ± 1.9 (27.4)	84.4 <sup>a</sup> ± 2.7 (20.5)	76.4 <sup>a</sup> ± 2.5 (21.3)	83.4 <sup>a</sup> ± 2.5 (24.0)	93.5 <sup>b</sup> ± 1.6 (26.9)	0.0039
<i>Total non-flavonoids</i>																	0.0267

All data are expressed as the arithmetic mean (mg/L) ± standard error (n=5). Different letters in the same row indicate significant differences among price segments for the same variety (Tukey HSD, p<0.05). Values between parenthesis refer to the relationship (%) between phenolic groups and total phenolics. <sup>d</sup> Interaction effect between variety and price segment. <sup>e</sup> Considered significant when P<sub>value</sub><0.05.

Compound	Malbec			Cabernet Sauvignon			Factor	
	Price segment			Variety			Segment	Variety x Segment <sup>d</sup>
	High	Medium	Low	High	Medium	Low	P <sub>value</sub> <sup>e</sup>	P <sub>value</sub> <sup>e</sup>
<b>Flavonoid phenolics</b>								
(+)-Catechin	33.6 <sup>a</sup> ± 2.5	33.6 <sup>a</sup> ± 3.3	34.2 <sup>a</sup> ± 1.3	32.0 <sup>a</sup> ± 2.7	35.5 <sup>a</sup> ± 2.9	35.8 <sup>a</sup> ± 2.3		
(-)-Epicatechin	15.6 <sup>a</sup> ± 0.6	19.2 <sup>ab</sup> ± 1.0	20.9 <sup>b</sup> ± 1.5	30.8 <sup>b</sup> ± 2.0	21.1 <sup>a</sup> ± 1.1	22.6 <sup>a</sup> ± 1.2		
procianidin dimer 1	7.3 <sup>b</sup> ± 0.4	5.8 <sup>a</sup> ± 0.2	7.4 <sup>b</sup> ± 0.5	8.7 <sup>b</sup> ± 0.3	5.3 <sup>a</sup> ± 0.4	5.2 <sup>a</sup> ± 0.4		
Procianidin dimer 2	53.9 <sup>b</sup> ± 2.6	43.3 <sup>a</sup> ± 1.1	45.6 <sup>a</sup> ± 1.9	55.4 <sup>b</sup> ± 1.9	43.5 <sup>a</sup> ± 0.4	44.1 <sup>a</sup> ± 2.1		
Procianidin trimer 1	15.1 <sup>a</sup> ± 1.3	15.0 <sup>a</sup> ± 0.5	12.5 <sup>a</sup> ± 0.8	16.0 <sup>b</sup> ± 0.2	12.5 <sup>a</sup> ± 0.9	10.5 <sup>a</sup> ± 0.6		
Procianidin trimer 2	5.7 <sup>a</sup> ± 0.3	5.1 <sup>a</sup> ± 0.5	5.5 <sup>a</sup> ± 0.2	6.8 <sup>a</sup> ± 0.4	5.9 <sup>a</sup> ± 0.4	6.9 <sup>a</sup> ± 0.8		
Procianidin trimer 3	7.7 <sup>b</sup> ± 0.3	5.6 <sup>a</sup> ± 0.7	5.5 <sup>a</sup> ± 0.5	7.7 <sup>a</sup> ± 0.1	8.7 <sup>a</sup> ± 0.6	7.9 <sup>a</sup> ± 0.3		
Procianidin trimer 4	12.2 <sup>b</sup> ± 0.5	9.8 <sup>a</sup> ± 0.5	8.6 <sup>a</sup> ± 0.4	8.5 <sup>b</sup> ± 0.2	7.9 <sup>ab</sup> ± 0.2	7.2 <sup>a</sup> ± 0.2		
<b>Flavanols</b>	151.1 <sup>a</sup> ± 3.7 (36.7)	137.4 <sup>a</sup> ± 5.6 (38.2)	140.2 <sup>a</sup> ± 3.7 (40.3)	165.9 <sup>b</sup> ± 1.2 (47.6)	140.4 <sup>a</sup> ± 4.6 (45.2)	140.2 <sup>a</sup> ± 5.5 (47.1)	0.1229	0.0004
Myricetin-3-glucuronide	9.6 <sup>a</sup> ± 0.7	9.1 <sup>a</sup> ± 0.4	8.0 <sup>a</sup> ± 1.0	6.9 <sup>a</sup> ± 0.1	7.9 <sup>a</sup> ± 0.4	7.1 <sup>a</sup> ± 0.4		
Myricetin-3-galactoside	3.9 <sup>a</sup> ± 0.2	3.4 <sup>a</sup> ± 0.2	3.6 <sup>a</sup> ± 0.2	3.3 <sup>a</sup> ± 0.1	3.2 <sup>a</sup> ± 0.1	3.1 <sup>a</sup> ± 0.2		
Myricetin-3-glucoside	14.5 <sup>b</sup> ± 1.0	8.4 <sup>a</sup> ± 0.5	8.0 <sup>b</sup> ± 0.7	6.8 <sup>a</sup> ± 0.3	6.3 <sup>a</sup> ± 0.1	6.5 <sup>a</sup> ± 0.5		
Quercetin-3-glucuronide	10.9 <sup>b</sup> ± 0.9	7.2 <sup>a</sup> ± 0.6	5.7 <sup>a</sup> ± 0.3	9.2 <sup>b</sup> ± 0.2	7.0 <sup>ab</sup> ± 0.6	6.4 <sup>a</sup> ± 0.7		
Quercetin-3-glucoside	8.7 <sup>b</sup> ± 0.5	6.5 <sup>a</sup> ± 0.5	5.6 <sup>a</sup> ± 0.5	7.4 <sup>b</sup> ± 0.3	6.7 <sup>ab</sup> ± 0.3	5.7 <sup>a</sup> ± 0.5		
Quercetin-3-rhamnoside	4.6 <sup>b</sup> ± 0.5	5.0 <sup>b</sup> ± 0.5	1.9 <sup>a</sup> ± 0.2	2.6 <sup>a</sup> ± 0.2	5.0 <sup>c</sup> ± 0.2	3.5 <sup>b</sup> ± 0.2		
Isorhamnetin-3-glucoside	11.0 <sup>b</sup> ± 0.6	7.3 <sup>a</sup> ± 0.7	9.1 <sup>ab</sup> ± 0.8	10.5 <sup>b</sup> ± 0.4	7.4 <sup>a</sup> ± 0.8	6.2 <sup>a</sup> ± 0.3		
Syringetin-3-glucoside	7.2 <sup>a</sup> ± 0.5	5.8 <sup>a</sup> ± 0.4	5.7 <sup>a</sup> ± 0.7	7.4 <sup>b</sup> ± 0.2	5.6 <sup>a</sup> ± 0.2	5.7 <sup>a</sup> ± 0.2		
Naringenin	3.8 <sup>a</sup> ± 0.3	3.0 <sup>b</sup> ± 0.3	2.8 <sup>a</sup> ± 0.1	5.2 <sup>b</sup> ± 0.2	3.3 <sup>a</sup> ± 0.2	3.6 <sup>a</sup> ± 0.1		
Kaempferol	13.1 <sup>a</sup> ± 1.1	11.9 <sup>a</sup> ± 0.9	9.8 <sup>a</sup> ± 0.9	8.0 <sup>a</sup> ± 0.1	8.8 <sup>a</sup> ± 0.4	7.8 <sup>a</sup> ± 0.4		
<b>Flavanols</b>	87.3 <sup>b</sup> ± 1.8 (21.3)	67.6 <sup>a</sup> ± 2.0 (18.9)	60.2 <sup>a</sup> ± 2.2 (17.4)	67.2 <sup>b</sup> ± 0.2 (19.3)	61.2 <sup>ab</sup> ± 1.6 (19.7)	55.5 <sup>a</sup> ± 1.5 (18.7)	<0.0001	<0.0001
Dihydroquercetin-3-rhamnoside	12.6 <sup>b</sup> ± 0.9	11.1 <sup>ab</sup> ± 0.6	9.1 <sup>a</sup> ± 0.5	4.7 <sup>a</sup> ± 0.2	4.9 <sup>a</sup> ± 0.1	4.5 <sup>a</sup> ± 0.4		
Dihydrokaempferol-3-glucoside	26.9 <sup>b</sup> ± 1.8	22.9 <sup>ab</sup> ± 1.8	18.6 <sup>a</sup> ± 1.4	9.6 <sup>ab</sup> ± 0.5	10.6 <sup>b</sup> ± 0.4	8.5 <sup>a</sup> ± 0.3		
Dihydroquercetin-3-glucoside	48.9 <sup>a</sup> ± 3.7	44.3 <sup>a</sup> ± 3.0	36.2 <sup>a</sup> ± 3.7	7.4 <sup>a</sup> ± 0.2	7.6 <sup>a</sup> ± 0.2	7.0 <sup>b</sup> ± 0.3		
<b>Dihydroflavanols</b>	88.4 <sup>b</sup> ± 6.0 (21.5)	78.3 <sup>ab</sup> ± 4.5 (21.7)	63.9 <sup>a</sup> ± 4.9 (18.3)	21.7 <sup>ab</sup> ± 1.0 (6.2)	23.1 <sup>b</sup> ± 0.7 (7.4)	20.0 <sup>a</sup> ± 0.7 (6.8)	<0.0001	0.0081
<b>Total flavanoids</b>	326.8 <sup>b</sup> ± 7.0 (79.5)	283.3 <sup>a</sup> ± 10.1 (78.7)	264.3 <sup>a</sup> ± 8.3 (76.0)	254.8 <sup>b</sup> ± 0.5 (73.1)	224.7 <sup>a</sup> ± 5.7 (72.3)	215.7 <sup>a</sup> ± 3.9 (72.6)	<0.0001	<0.0001
<b>Total non-anthocyanins phenolics</b>	411.2 <sup>b</sup> ± 8.2	359.7 <sup>a</sup> ± 11.1	347.7 <sup>a</sup> ± 9.2	348.3 <sup>b</sup> ± 1.2	310.2 <sup>a</sup> ± 4.8	297.6 <sup>a</sup> ± 4.5	<0.0001	<0.0001

All data are expressed as the arithmetic mean (mg/L) ± standard error (n=5). Different letters in the same row indicate significant differences among price segments for the same variety (Tukey HSD, p<0.05). Values between parenthesis refer to the relationship (%) between phenolic groups and total phenolics. <sup>d</sup> Interaction effect between variety and price segment. <sup>e</sup> Considered significant when pvalue<0.05.



Finally, we want to highlight the presence of dihydroflavonols (dihydroquercetin-3-rhamnoside, dihydrokaempferol-3-glucoside and dihydroquercetin-3-glucoside) in all of the samples analyzed, showing levels 3-fold higher in MB compared to CS (**Table 3**). According to literature, these compounds contribute to a smaller fraction of total wine flavonoids, and they play functional roles in grape berries (Landrault et al., 2002; Vitrac et al., 2002). However, in previous studies by our research group have been detected elevated contents in Malbec grapes and wines from Mendoza, which could represent a distinctive feature of this variety (Berli et al., 2011; Fanzone et al., 2011; Fanzone et al., 2010). Evaluating the influence of these compounds on the range of wine, only in the case of MB it was observed the same tendency found so far, while CS wines of medium segment showed the highest levels of dihydroflavonols (**Table 3**).

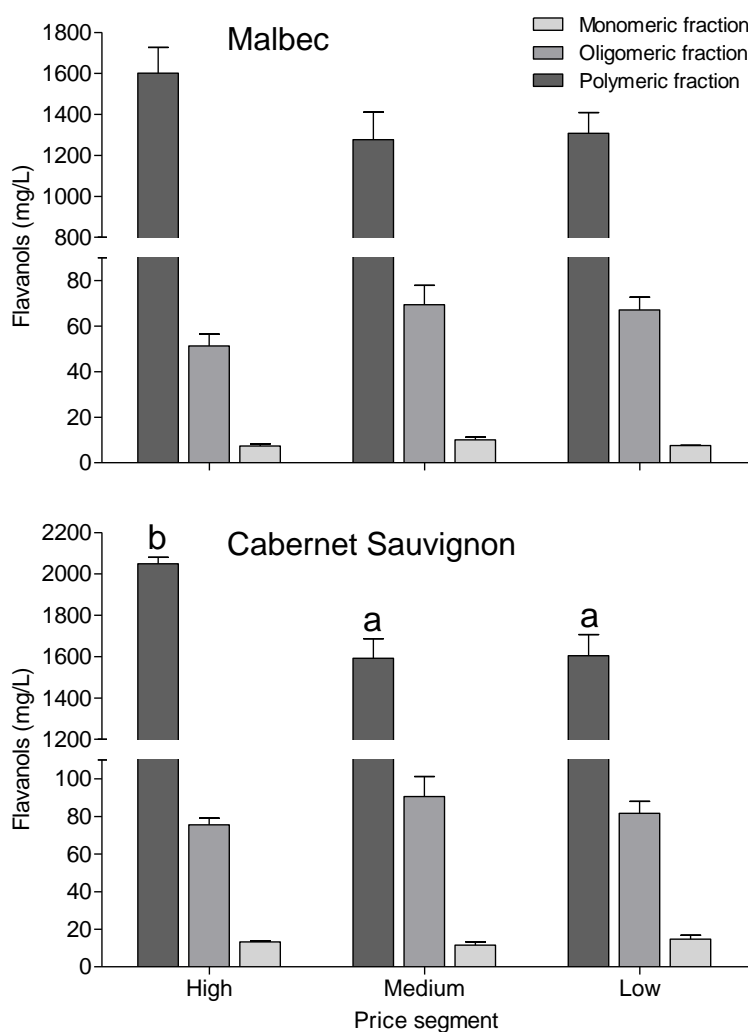
### 3.4. Distribution of flavanols according to polymerization degree

**Fig. 1** depicts the flavanol content, determined by the vanillin reaction, of MB and CS wine fractions (monomeric, oligomeric, and polymeric) obtained by C<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges. Sun, Leandro, Ricardo da Silva, & Spranger (1998a) indicate that the monomeric fraction (FI) consists only of (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-3-gallate, whereas the FII fraction is formed by procyanidin dimers, trimers and tetramers, and FIII fraction is composed of polymeric proanthocyanidins (over 4 units). For all red wines analyzed, polymeric proanthocyanidins were predominant (94.9% in MB, 94.7% in CS), followed by oligomeric fraction (4.5% in MB, 4.6% in CS), and monomeric flavanols were presented in the lowest concentration (0.6% in MB, 0.7% in CS).

It is interesting to note the no significant differences found in the content of FI and FII among wines of different commercial value. By contrast, the polymeric fraction tended to increase with the commercial value of wines, especially in CS where the high segment samples showed significantly higher content compared to the rest (**Fig. 1**).

As seen previously with other parameters, when analyze the pooled data of the wines, we observed a higher content of all fractions in CS samples compared to MB. This could be supported by a greater level of monomers and oligomers determined by HPLC (**Table 3**) and a larger molar concentration of flavanols by *p*-dimethylaminocinnamaldehyde assay (**Table 1**), observed in high-end CS wines.

The relative content of the various extractable fractions obtained in this work coincides with data reported in other studies (Cosme, Ricardo-Da-Silva, & Laureano, 2009; Monagas, Gómez-Cordovés, Bartolomé, Laureano, & Da Silva, 2003b). Nevertheless, the levels observed in our study are higher than those reported by these authors in Spanish and Portuguese wines.



**Fig. 1.** Monomeric (FI), oligomeric (FII), and polymeric (FIII) fractions of flavanols in Malbec and Cabernet Sauvignon wines of different commercial value. Different letters within the polymeric fraction mean significant differences ( $p < 0.05$ ) among price segment for CS variety, according to a Tukey HSD test.

### 3.5. Characterization of polymeric proanthocyanidins by phloroglucinolysis

**Table 4** shows the results of the analysis of proanthocyanidins, in MB and CS wines, by acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. The total proanthocyanidin concentration measured by this method was lower than those obtained by the acid butanol assay (**Table 1**), because of incomplete depolymerization of phenolic material into known proanthocyanidin subunits (Kennedy, Ferrier, Harbertson, & Peyrot des Gachons, 2006). However, the tendencies observed by both methods in the wine samples were very similar, the proanthocyanidin concentration of wines being higher when the commercial value was greater, for the MB variety; and without differences found for CS.

This method also allows the mean degree of polymerization (mDP), the percentage of the different monomers and the molecular weight average (aMW) of proanthocyanidins to be measured. Our results indicate that mDP was higher in wines of upper commercial value, without significant

differences between varieties ( $p = 0.1520$ ). As was expected, the aMW followed a similar trend to the mDP. These data suggest that high quality wines possibly come from riper grapes with higher density, or from vines subjected to viticultural practices that would reduce the berry size, i.e. increasing the amount of skins proanthocyanidins (Herderich & Smith, 2005; Kennedy, Matthew, & Waterhouse, 2002; Kontoudakis et al., 2011a). Analyzing the distribution of monomers, no significant differences ( $p > 0.05$ ) were found among MB and CS wines of different commercial value, with levels similar to those published by other authors (Canals et al., 2008; Kontoudakis et al., 2011a; Monagas, Gómez-Cordovés, Bartolomé, Laureano, & Da Silva, 2003b).

Taken together, these observations are consistent with the results described above, where MB and CS wines of high segment showed a higher concentration of polymeric proanthocyanidins (**Fig. 1**), and justify the strong influence of proanthocyanidin composition on the commercial value, and therefore on the final quality of wines.

Parameter	Malbec			Cabernet Sauvignon		
	Price segment					
	High	Medium	Low	High	Medium	Low
Total proanthocyanidins (mg/L)	315.6 <sup>b</sup> ± 17.9	232.6 <sup>a</sup> ± 26.9	211.1 <sup>a</sup> ± 6.7	284.6 <sup>a</sup> ± 32.0	290.4 <sup>a</sup> ± 11.6	242.8 <sup>a</sup> ± 8.4
mDP	6.1 <sup>b</sup> ± 0.4	5.0 <sup>ab</sup> ± 0.2	4.5 <sup>a</sup> ± 0.3	5.3 <sup>a</sup> ± 0.4	4.5 <sup>a</sup> ± 0.1	4.7 <sup>a</sup> ± 0.3
(+)-Catechin (%)	13.3 <sup>a</sup> ± 0.3	15.6 <sup>b</sup> ± 0.7	14.2 <sup>ab</sup> ± 0.5	13.8 <sup>a</sup> ± 0.8	14.2 <sup>a</sup> ± 0.2	14.1 <sup>a</sup> ± 0.5
(-)-Epicatechin (%)	57.9 <sup>a</sup> ± 0.6	57.4 <sup>a</sup> ± 2.1	58.2 <sup>a</sup> ± 1.3	58.6 <sup>a</sup> ± 0.5	56.8 <sup>a</sup> ± 2.2	56.2 <sup>a</sup> ± 2.6
(-)-Epigallocatechin (%)	27.0 <sup>a</sup> ± 0.9	25.3 <sup>a</sup> ± 1.7	26.1 <sup>a</sup> ± 1.2	25.5 <sup>a</sup> ± 1.4	27.2 <sup>a</sup> ± 2.2	27.8 <sup>a</sup> ± 2.3
(-)-Epicatechin-3-gallate (%)	1.8 <sup>a</sup> ± 0.1	1.8 <sup>a</sup> ± 0.1	1.6 <sup>a</sup> ± 0.1	2.2 <sup>a</sup> ± 0.1	1.8 <sup>a</sup> ± 0.2	2.0 <sup>a</sup> ± 0.2
aMW (Da)	1770.7 <sup>b</sup> ± 89.7	1450.7 <sup>a</sup> ± 54.5	1312.9 <sup>a</sup> ± 72.6	1561.5 <sup>b</sup> ± 52.3	1302.0 <sup>a</sup> ± 39.4	1323.8 <sup>a</sup> ± 79.3

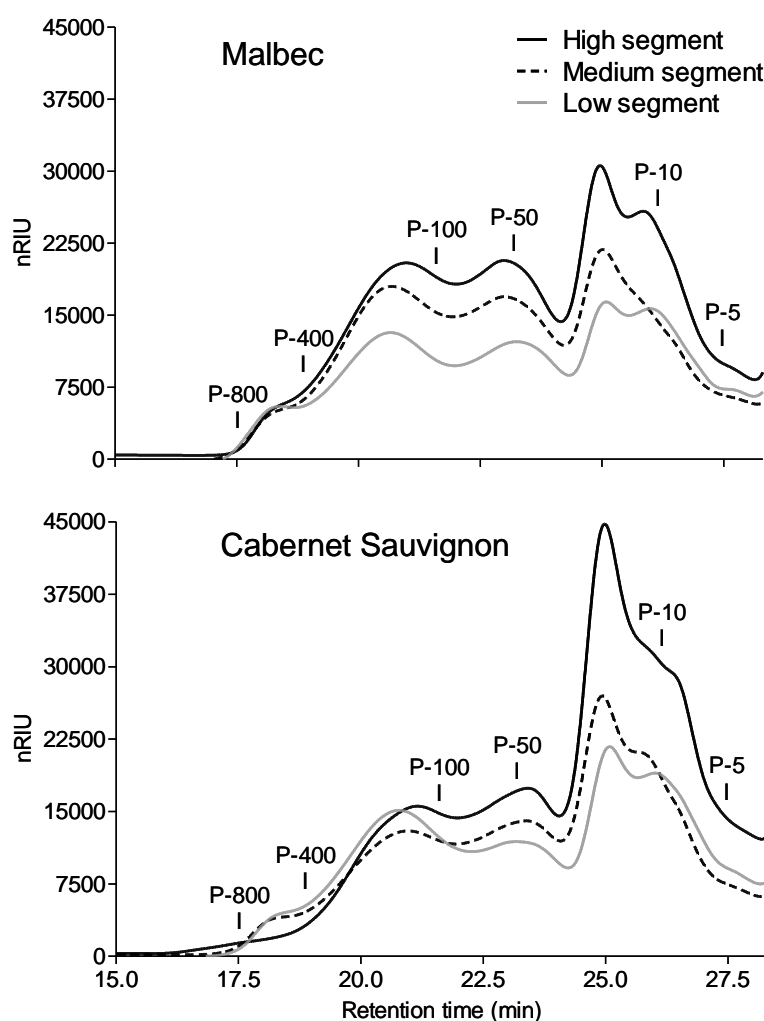
All data are expressed as the arithmetic mean (mg/L) ± standard error (n=5). mDP, mean degree of polymerization; aMW, molecular weight average. Different letters within the same row mean significant differences ( $p < 0.05$ ) among price segments for the same variety, according to a Tukey HSD test.

### 3.6. Polysaccharides profile and content of different fractions

First, it is noteworthy that the chromatographic technique used in our study does not allow the separation of polysaccharides according to their chemical nature. Therefore, the fractions obtained of different molecular weight may contain polysaccharides from grapes, from microorganisms (yeasts and bacteria) or, more likely, a mixture of both. However, it is considered an appropriate technique for the purposes of determining its concentration in wines and assessing their impact on the commercial value.

**Fig. 2** shows the distribution of the molecular weights of the polysaccharides in MB and CS wines of different price segments. We detected four peaks that eluted at approximately 18.5, 20.5, 23.2 and 25.2 min; and corresponded to fractions with a number average molecular weight of 450 kDa, between 830 and 380 kDa (F1); 150kDa, between 380 and 70 kDa (F2); 50 kDa, between 75 and

25 kDa (F3); and 15 kDa, between 25 and 5 kDa (F4). According to the literature these fractions might belong to yeast polysaccharides (mannans and MPs), as well as to other grape polysaccharides such as arabinogalactans, AGPs and RG-II dimers (Ayestarán, Guadalupe, & León, 2004). The polysaccharides profile observed in our study is similar to previously described in Merlot (Ducasse et al., 2010) and Tempranillo wines (Fernández et al., 2011).



**Fig. 2.** Molecular weight distribution of polysaccharides soluble fractions, by HRSEC-RID, in Malbec and Cabernet Sauvignon wines of different commercial value. Elution times of pullulan standards (P-5 → P-800) are also shown.

The content of total polysaccharides and polysaccharides per fraction is shown in **Table 5**. For all samples, total polysaccharides ranged from 524.3 to 691.7 and from 571.3 to 776.5 mg/L in MB and CS, respectively. These values are in the range described in other studies for red varieties (Ayestarán, Guadalupe, & León, 2004; Fernández et al., 2011). In the pattern of MB wines, the main fraction was F4 (mean = 42.9%), followed by F2 (31.5%), F3 (21.9%), and F1 (3.8%); whereas in CS, the mean proportions changed, with F4 accounted for 53.2% of the total polysaccharides, followed

by F2 (23.8%), F3 (20.4%), and F1 (2.6%). Once again, significant differences were observed among wines of different commercial value. For both varieties, the wines of high segment showed the highest level of these compounds, while the lowest content was observed in the low segment. These findings support the elevated values of proanthocyanidins and color parameters observed in premium wines, possibly due to the capacity of polysaccharides to enhance or inhibit tannin aggregation playing a significant role in color stability and wine aging (Terrier et al., 2009). In addition, premium wines generally come from riper grapes subjected to prolonged maceration times, increasing the extraction of these compounds into the wine. On the other hand, not all polysaccharides show the same behavior with respect to wines; their influence on wine characteristics will depend not only of the quantity of polysaccharidic compounds but also of their structure, composition, and distribution. Therefore, it is necessary a deep knowledge of the cultural and environmental factors that affect these parameters, to understand their interaction with the other compounds and to predict their expression into the wine, to reach a product with the wanted quality.

Table 5						
Polysaccharides in Malbec and Cabernet Sauvignon wines of different commercial value.						
Polysaccharides	Malbec			Cabernet Sauvignon		
	Price segment					
	High	Medium	Low	High	Medium	Low
F1 (450 KDa)	32.4 <sup>b</sup> ± 0.7 (4.7)	20.0 <sup>a</sup> ± 1.1 (3.1)	18.2 <sup>a</sup> ± 1.8 (3.5)	18.8 <sup>a</sup> ± 0.6 (2.4)	15.6 <sup>a</sup> ± 1.0 (2.8)	14.4 <sup>a</sup> ± 2.1 (2.5)
F2 (150 KDa)	215.5 <sup>b</sup> ± 3.0 (31.2)	188.0 <sup>ab</sup> ± 11.5 (29.5)	177.4 <sup>a</sup> ± 10.2 (33.8)	146.2 <sup>ab</sup> ± 3.2 (18.8)	132.4 <sup>a</sup> ± 3.0 (23.4)	166.3 <sup>b</sup> ± 12.2 (29.1)
F3 (50 KDa)	143.9 <sup>a</sup> ± 8.9 (20.8)	138.2 <sup>a</sup> ± 4.0 (21.7)	121.4 <sup>a</sup> ± 4.2 (23.2)	150.6 <sup>b</sup> ± 2.5 (19.4)	124.5 <sup>a</sup> ± 4.8 (22.0)	112.8 <sup>a</sup> ± 5.4 (19.7)
F4 (15 KDa)	299.9 <sup>b</sup> ± 4.7 (43.4)	291.2 <sup>b</sup> ± 16.2 (45.7)	207.3 <sup>a</sup> ± 10.7 (39.5)	460.9 <sup>b</sup> ± 6.6 (59.4)	292.4 <sup>a</sup> ± 6.5 (51.8)	277.8 <sup>a</sup> ± 17.4 (48.6)
Total	691.7 <sup>b</sup> ± 7.1	637.4 <sup>b</sup> ± 18.5	524.3 <sup>a</sup> ± 15.4	776.5 <sup>b</sup> ± 6.5	565.0 <sup>a</sup> ± 8.3	571.3 <sup>a</sup> ± 13.6

All data are expressed as the arithmetic mean (mg/L) ± standard error (n=5). Different letters within the same row mean significant differences (p<0.05) among price segments for the same variety, according to a Tukey HSD test. Values between parentheses refer to the relationship (%) between the fractions and total polysaccharides content.

### 3.7. Descriptive sensory analysis

Sensory evaluations of wines were carried out to complement the chemical analyses and to verify if the existent differences among samples of different commercial value can be appreciated by the organoleptic perception.

In this study, there were no significant differences in the scores given by the judges for each attribute (p>0.05), indicating that all the panelists used all attributes reproducibly. From the ANOVA of the sensory descriptive data for the 30 wines (MB and CS), it was found that all of the attributes assessed by the panel differed significantly (p<0.05) across the samples of different commercial value (**Table 6**). With regard to color intensity, the scores were significantly higher toward increased commercial value of MB and CS wines, while for the gustatory attributes there were some

differences between varieties. In the case of MB, the panel found no difference in bitterness and astringency between low and medium segments, observing the same pattern between medium and high segments for the rest of the attributes. Concerning CS wines, the tasters did not appreciate differences in bitterness, while the other parameters showed a similar trend to MB.

Analyzing the perception of astringency, the highest scores achieved by the wines of upper commercial value justify the observed level of proanthocyanidins (**Table 4**). According to Vidal et al. (2003) astringency augments when the degree of proanthocyanidin polymerization increases. Given that high-end wines presented higher proanthocyanidin concentration and that their proanthocyanidins also presented a higher mDP, it is logical that their astringency was greater too. However, these results do not agree with the high levels of polysaccharides found, which should diminish the astringency sensation (Vidal et al., 2004).

In general terms, these data obtained in the wine tasting were in good agreement with our previous analytical results. The wines of greater commercial value, with the best visual and gustatory scores, coinciding with higher levels of the phenolic parameters determined.

<b>Table 6</b>						
Sensory attributes evaluated in Malbec and Cabernet Sauvignon wines of different commercial value.						
Attribute	Malbec			Cabernet Sauvignon		
	Price segment					
	High	Medium	Low	High	Medium	Low
Color intensity	8.8 <sup>c</sup> ± 0.1	7.3 <sup>b</sup> ± 0.1	6.4 <sup>a</sup> ± 0.2	8.0 <sup>c</sup> ± 0.2	7.0 <sup>b</sup> ± 0.2	6.0 <sup>a</sup> ± 0.3
Fullness	6.1 <sup>b</sup> ± 0.2	5.5 <sup>b</sup> ± 0.2	4.6 <sup>a</sup> ± 0.2	6.1 <sup>b</sup> ± 0.2	5.5 <sup>ab</sup> ± 0.3	4.9 <sup>a</sup> ± 0.2
Bitterness	5.4 <sup>b</sup> ± 0.2	4.4 <sup>a</sup> ± 0.2	4.2 <sup>a</sup> ± 0.2	4.6 <sup>a</sup> ± 0.3	4.2 <sup>a</sup> ± 0.3	3.8 <sup>a</sup> ± 0.3
Astringency	6.4 <sup>b</sup> ± 0.3	5.3 <sup>a</sup> ± 0.3	4.5 <sup>a</sup> ± 0.2	6.3 <sup>b</sup> ± 0.3	4.9 <sup>a</sup> ± 0.2	4.6 <sup>a</sup> ± 0.2
Persistence	7.3 <sup>b</sup> ± 0.2	6.6 <sup>b</sup> ± 0.2	5.7 <sup>a</sup> ± 0.2	6.5 <sup>b</sup> ± 0.2	6.1 <sup>ab</sup> ± 0.3	5.2 <sup>a</sup> ± 0.2
Global quality	7.2 <sup>b</sup> ± 0.2	6.8 <sup>b</sup> ± 0.3	6.0 <sup>a</sup> ± 0.2	7.1 <sup>b</sup> ± 0.3	6.7 <sup>b</sup> ± 0.1	5.4 <sup>a</sup> ± 0.3

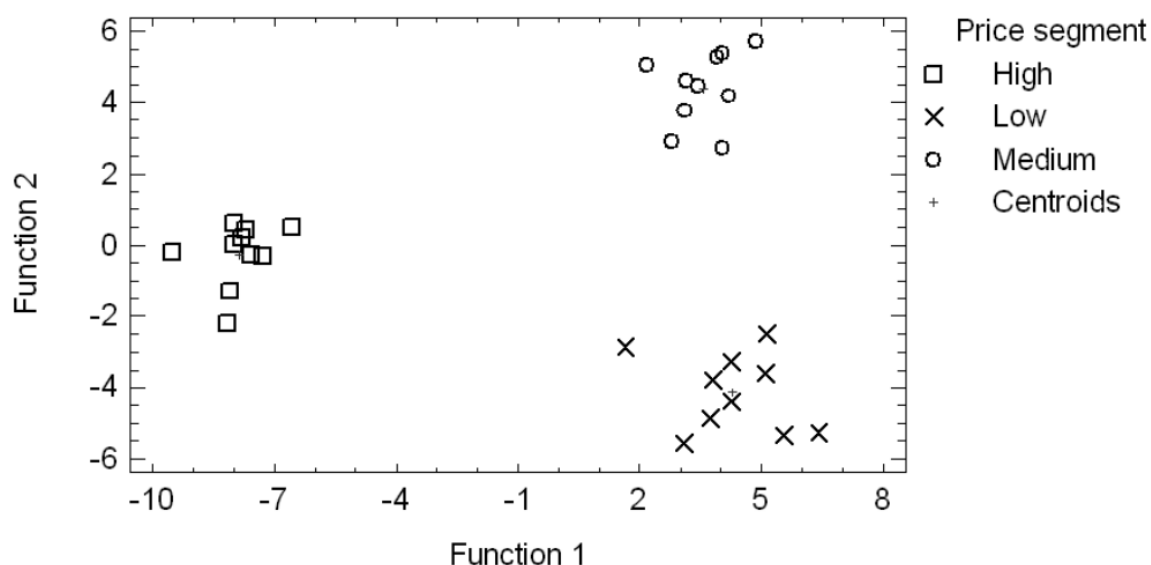
All data are expressed as the mean scores of 10 judges ± standard error (n=5). Different letters within the same row mean significant differences among price segments for the same variety, according to a Tukey HSD test (p<0.05).

### 3.8. Classification of wines according to commercial value

In the present study, the different chemical composition observed among the wines analyzed, indicates the influence of the grape cultivar and other factors like environmental conditions, viticultural practices and winemaking techniques on the commercial quality. In order of classifying the samples according to commercial value, independently of variety, we employed the anthocyanin and non-anthocyanin profiles in a separate multivariate analysis. The main reason for this choice is due to the high correlation and dependence between these two groups of variables, as well as with the rest of the chemical parameters determined (seen through an exploratory statistical

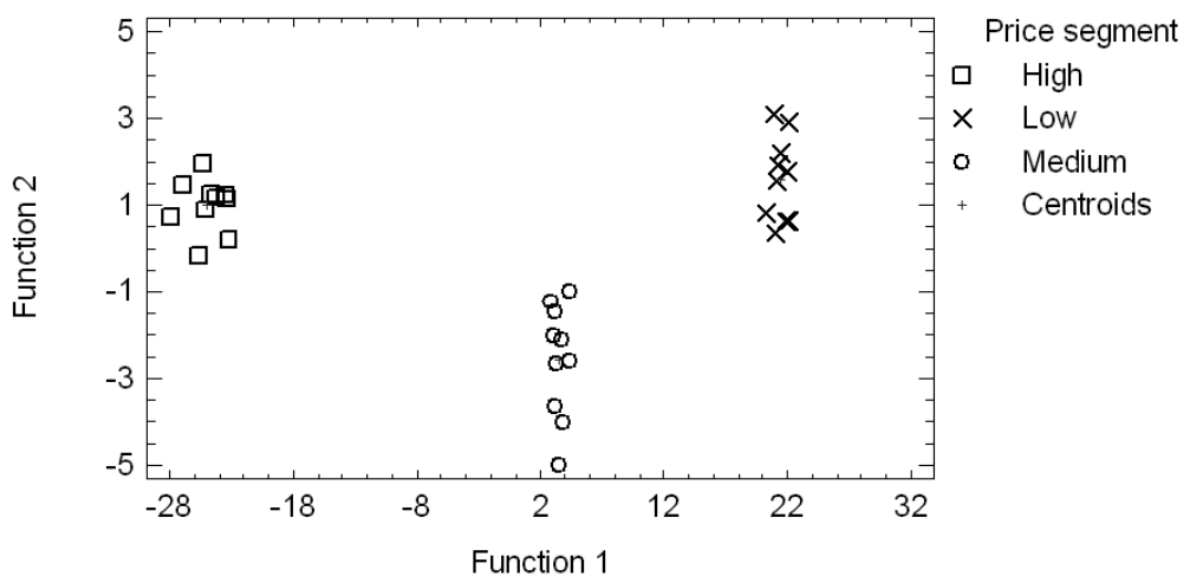
analysis). Moreover, it is interesting to evaluate the potential for classification of both groups in order to simplify the determinations in future studies.

In the multivariate analysis is first necessary to select appropriate variables for sample classification. To achieve this goal is required the elimination of redundant variables to avoid overfitting problems, by applying different methodologies of feature selection: forward selection, backward selection, principal component analysis or genetic algorithms (Kruzlicova et al., 2009). Canonical discriminant analysis (CDA) with backward selection method was carried out to provide a visualization of data in a reduced-dimension plot, using the information given in **Tables 2 and 3**. The first CDA, using individual anthocyanins as predictor variables, resulted in two discriminant functions (DF) containing 14 variables that accounted jointly for 100% of the total variance, with  $p < 0.05$  and statistical significance at 95% confidence level. The first function, assigned as DF1, accounted for 71.8% of total variability, while DF2 for 28.2%. Both functions showed Wilks'lambda values of  $1.9 \times 10^{-3}$  and  $6.8 \times 10^{-2}$ , respectively, indicating a satisfactory discrimination. The variables with higher incidence on DF1 were malvidin-3-glucoside, Vitisin A and cyanidin-3-glucoside, in a positive way, and Vitisin B, petunidin-3-(6''-acetyl)glucoside and peonidin-3-glucoside, in a negative way; while DF2 was strongly influenced by malvidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside, in a positive way, and by Vitisin B and peonidin-3-glucoside, in a negative way. **Fig. 3** depicts the distribution of wines samples in the plane defined by DF1 and DF2. Both functions allowed the classification of 100% of the wines studied according to commercial value. MB and CS wines of low and medium segments showed positive score of DF1, while high segments wines presented negative score. While regarding the DF2, MB and CS wines of medium segment showed positive score, low segment wines presented opposite behavior, and high segment wines exhibited intermediate values.



**Fig. 3.** Discriminant plot of anthocyanins for Malbec and Cabernet Sauvignon wines from Mendoza, according to price segment (n=30).

In the same framework described for anthocyanins, a second CDA, with low molecular weight phenolics as predictor variables, also resulted in two discriminant functions containing 20 variables, with only DF1 statistically significant. DF1 accounted for 99.1% of total variability, while DF2 for 0.9%. A scatter plot of the wines in the plane defined by these two functions is presented in **Fig. 4**, where there was a perfect prediction (100%) of the samples and a clear differentiation of wines by the commercial value. The main axis of differentiation (DF1) was strongly influenced by phenolic acids/derivatives (syringic, *trans*- and *cis*-coumaric, *p*-coumaric and gallic acids, methyl and ethyl gallates), *cis*-resveratrol-3-glucoside, flavanols ((+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin dimers and trimers) and dihydroflavonols (dihydroquercetin-3-glucoside and dihydroquercetin-3-rhamnoside). All the samples were discriminated with this function, showing a negative score for MB and CS of high segment, and a positive score for the other segments. Additionally, DF2 was principally associated with flavanols and phenolic acids allowing the classification of low and high segment wines, in a positive way; and medium segment wines, in a negative way.



**Fig. 4.** Discriminant plot of non-anthocyanin phenolics for Malbec and Cabernet Sauvignon wines from Mendoza, according to price segment (n=30).

The discriminant analysis revealed that cyanidin, peonidin and malvidin non-acylated, and pyranoanthocyanins, as well as the phenolic acids, flavanols and dihydroflavonols, exerted a significant influence in wine differentiation based on commercial value. However, the other phenolic groups had a rather minor impact. Given these results, we can select the phenolic variables for categorizing future samples, taking into account the complexity, time and cost of appropriate analytical technique.



#### 4. Conclusions

A comprehensive study of chemical composition and sensory properties was conducted for Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines of different price segments. The data obtained provide an interesting insight, no reported so far, on the impact of phenolic and polysaccharidic composition in the final quality of the products and therefore in its market value. In general, there was a trend towards greater concentration of these with increasing the commercial value of wines. Particularly, we found that general phenolic composition, color-related compounds, main flavonoid groups and polysaccharides appear as relevant variables differing among segments and showing some differences between varieties. Additionally, the sensory wine description was in good agreement with the analytical results. The wines of greater commercial value, with the best visual and gustatory scores, coinciding with higher levels of the phenolic parameters determined.

Moreover, the successful classification of wine samples using polyphenolic data and multivariate methods has been demonstrated. We must be emphasized that, in spite of the low number of samples, discriminant analysis demonstrated the high potential of some compounds (anthocyanins, phenolic acids, flavanols and dihydroflavonols) for unambiguous differentiation and classification of wines according to the commercial value.

Therefore, the knowledge of chemical indices of quality in grapes and its expression in the wine is of great interest for wine producers, providing useful information to improve the final product. Further studies of this topic and of their relationship with viticultural management, environmental conditions, winemaking and aging process are necessary to produce wines of consistent styles for different consumers.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to the Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), projects AETA282831, AETA282821 and PTRMZASJ510071 for the economical support of this work, and to all nine wineries for providing the samples of this study. Special thanks are due to Bastián Bravo, and to the members of the sensory panel (INTA) for their technical assistance.

#### References

- Ayala, F., Echávarri, J. F., & Negueruela, A. I. (1997). A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rose wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 357-363.
- Ayala, F., Echávarri, J. F., & Negueruela, A. I. (2001). Universidad de Zaragoza website. [http://www.unizar.es/negueruela/html/grupo\\_color.htm](http://www.unizar.es/negueruela/html/grupo_color.htm)

- Ayestarán, B., Guadalupe, Z. & León, D. (2004). Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 513, 29-39.
- Berli, F., Fanzone, M., Piccoli, P., & Bottini, R. (2011). Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of *Vitis vinifera* L. increasing biosynthesis of berry skin polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4874–4884.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67-87.
- Canals, R., Llaudy, M. C., Canals, J. M., & Zamora, F. (2008). Influence of the elimination and addition of seeds on the colour, phenolic composition and astringency of red wine. *European Food Research and Technology*, 226, 1183-1190.
- Cerezo, A. B., Cuevas, E., Winterhalter, P., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2010). Anthocyanin composition in Cabernet Sauvignon red wine vinegar obtained by submerged acetification. *Food Research International*, 43, 1577-1584.
- Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M. & Teissedre, P. L. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry*, 126, 1971–1977.
- Cosme, F., Ricardo-Da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2009). Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry*, 112, 197-204.
- Ducasse, M. A., Canal-Llauberes, R. S., Lumley, M., Williams, P., Souquet, J. M., Fulcrand, E., Doco, T., & Cheynier, V. (2010). Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry*, 118, 369-376.
- Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J. & Ferreira, V. (2007). Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4501-4510.
- Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., & Peña-Neira, A. (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.
- Fanzone, M., Peña-Neira, A., Jofré, V., Assof, M. & Zamora, F. (2010). Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2388-2397.
- Fernández, O., Martínez, O., Hernández, Z., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2011). Effect of the presence of lysated lees on polysaccharides, color and main phenolic compounds of red wine during barrel ageing. *Food Research International*, 44, 84-91.

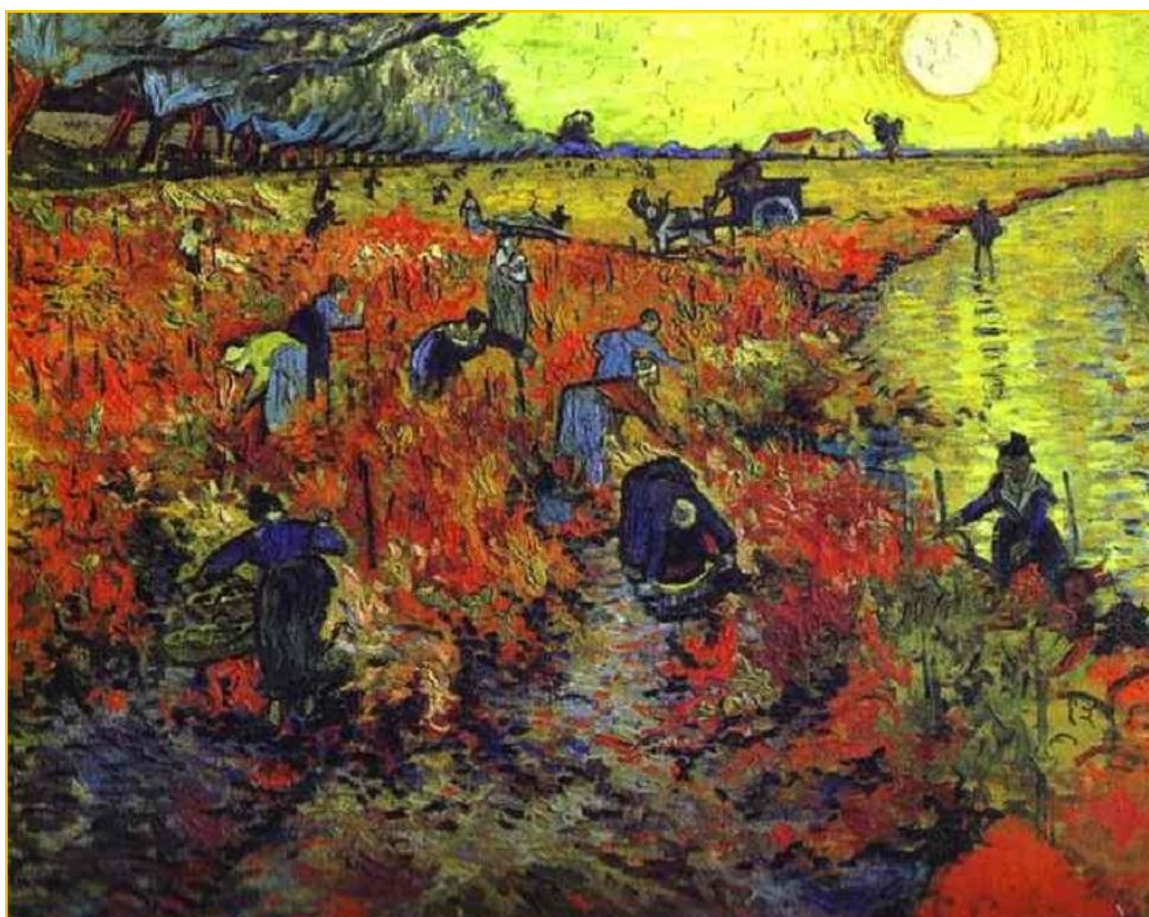
- Ferreira, V., Juan, F. S., Escudero, A., Cullere, L., Fernández-Zurbano, P., Sáenz-Navajas, M. P. & Cacho, J. (2009). Modeling quality of premium Spanish red wines from gas chromatography-olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 7490-7498.
- Ginjom, I. R., D'Arcy, B. R., Caffin, N. A. & Gidley, M. J. (2010) Phenolic contents and antioxidant activities of major Australian red wines throughout the winemaking process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 10133-10142.
- Glories, Y. (1984a). La couleur des vins rouges. 1ère partie. Les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, *18*, 195-217.
- Glories, Y. (1984b). La couleur des vins rouges. 2ème partie. Mesure, origine et interprétation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, *18*, 253-271.
- Goldner, M. C. & Zamora, M. C. (2007). Sensory characterization of *Vitis vinifera* cv. Malbec wines from seven viticulture regions of Argentina. *Journal of Sensory Studies*, *22*, 520-532.
- González-Neves, G., Charamelo, D., Balado, J., Barreiro, L., Bochicchio, R., Gatto, G., Gil, G., Tessore, A., Carbonneau, A., & Moutounet, M. (2004). Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Analytica Chimica Acta*, *513*, 191-196.
- González-Neves, G., Franco, J., Barreiro, L., Gil, G., Moutounet, M. & Carbonneau, A. (2007). Varietal differentiation of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and wines according to their anthocyanic composition. *European Food Research and Technology*, *225*, 111-117.
- Granato, D., Katayama, F. C. U., & de Castro, I. A. (2011). Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chemistry*, *129*, 366-373.
- Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2005). Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*, 205-214.
- Hermosín Gutiérrez, I. (2003). Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 4079-4083.
- Hermosín Gutiérrez, I., Sánchez-Palomo Lorenzo, E. & Vicario Espinosa, A. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, *92*, 269-283.
- Holt, H. E., Francis, I. L., Field, J., Herderich, M. J. & Iland, P. G. (2008). Relationships between wine phenolic composition and wine sensory properties for Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *14*, 162-176.
- International Organization for Standardization (1977) ISO 3591: 1977. Sensory analysis: Apparatus: Wine-tasting glass. Geneva, Switzerland, pp. 1-3.

- INV (2009). Instituto Nacional de Vitivinicultura website. (Argentinean Government)  
[http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/REGISTRO\\_VINEDOS2009\\_JULIO.pdf](http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/REGISTRO_VINEDOS2009_JULIO.pdf)
- Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 1740–1746.
- Kennedy, J. A., Ferrier, J., Harbertson, J. F., & Peyrot des Gachons, C. (2006). Analysis of tannins in red wine using multiple methods: correlation with perceived astringency. *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*, 481-485.
- Kennedy, J. A., Matthew, M. A., & Waterhouse, A. L. (2002). Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture*, *53*, 268-274.
- Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., De Freitas, V., & Zamora, F. (2011a). Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chemistry*, *124*, 767-774.
- Kontoudakis, N., González, E., Gil, M., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2011b). Influence of wine pH on changes in color and polyphenol composition induced by micro-oxygenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 1974-1984.
- Kruzlicova, D., Mocak, J., Balla, B., Petka, J., Farkova, M., & Havel, J. (2009). Classification of Slovak white wines using artificial neural networks and discriminant techniques. *Food Chemistry*, *112*, 1046-1052.
- Landrault, N., Larronde, F., Delaunay, J. C., Castagnino, C., Vercauteren, J., Merillon, J. M., Gasc, F., Cros, G., & Teissedre, P. L. (2002). Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2046-2052.
- Langlois, J., Ballester, J., Campo, E., Dacremont, C. & Dominique, P. (2010). Combining olfactory and gustatory clues in experts judgment of aging potential of red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *61*, 15-22.
- Makris, D. P., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, 396-404.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., & Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 7692-7702.
- Monagas, M, & Bartolomé, B. (2009). Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Compounds. In M. V. Moreno-Arribas, & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 439-456). New York: Springer.

- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., & Da Silva, J. R. (2003b). Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 6475-6481.
- Monagas, M., Núñez, V., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2003a). Anthocyanin-derived pigments in Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon wines produced in Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, *54*, 163-169.
- Monagas, M., Suarez, R., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2005). Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture*, *56*, 139-147.
- OIV (2010). Organización Internacional de la Viña y el Vino. [http://news.reseau-concept.net/images/oiv\\_es/Client/DIAPORAMA\\_STATISTIQUES\\_Tbilissi\\_2010\\_EN.ppt](http://news.reseau-concept.net/images/oiv_es/Client/DIAPORAMA_STATISTIQUES_Tbilissi_2010_EN.ppt)
- Pérez-Magariño, S., & González-Sanjosé, M. L. (2003). Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. *Food Chemistry*, *81*, 301-306.
- Porter, L.J., Hritsch, L. N., Chan, B. G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, *25*, 223-230.
- Puértolas, E., Hernández-Orte, P., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Improvement of winemaking process using pulsed electric fields at pilot-plant scale. Evolution of chromatic parameters and phenolic content of Cabernet Sauvignon red wines. *Food Research International*, *43*, 761-766.
- Renaud, S. and de Lorgeril, M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, *339*, 1523-1526.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2000). Phenolic compounds. In P. Ribéreau-Gayon (Ed.), *Handbook of enology, Vol 2: The chemistry of wine stabilization and treatments* (pp. 129-186). Chichester, U.K.: John Wiley & Sons Ltd.
- Sáenz-Navajas, M. P., Tao, Y. S., Dizy, M., Ferreira, V. & Fernández-Zurbano, P. (2010b). Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 12407–12416.
- Sáenz-Navajas, M., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010a). An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry*, *121*, 1139-1149.
- Sun, B. S., Leandro, C., Ricardo da Silva, J. M., & Spranger, I. (1998a). Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 1390–1396.

- Sun, B. S., Ricardo da Silva, J. M., & Spranger, M. I. (1998b). Critical factors of the vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 4267–4274.
- Terrier, N., Poncet-Legrand, C., & Cheynier, V. (2009). Phenolic Compounds. Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. In M. V. Moreno-Arribas, & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 463-496). New York: Springer.
- Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., & Cheynier, V. (2004). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, *15*, 209-217.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *83*, 564-573.
- Vitrac, X., Monti, J. P., Vercauteren, J., Deffieux, G., & Mérillon, J. M. (2002). Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, *458*, 103-110.
- Vivas, N., Glories, Y., Lagune, L., Saucier, C., & Augustin, M. (1994). Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au *p*-dimethylaminocinnamaldéhyde. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, *28*, 319–336.
- Zoecklein, B., Fugelsang, K., Gump, B., & Nury, F. (2001). *Análisis y Producción de Vino*. Zaragoza, Spain: Acribia, (634 pp).

## **Estudio comparativo de la composición fenólica de vinos Malbec con vinos provenientes de las otras cinco variedades tintas más cultivadas en la Provincia de Mendoza**



**Vincent Van Gogh, *Red vineyard* (1888).**

**“Phenolic characterization of red wines from different grape varieties  
cultivated in Mendoza province (Argentina)”**

Artículo publicado en la revista  
*Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, 92 (3), 704-718

## Phenolic characterization of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina)

Martín Fanzone,<sup>a</sup> Fernando Zamora,<sup>b</sup> Viviana Jofré,<sup>a</sup> Mariela Assof,<sup>a</sup> Carmen Gómez-Cordovés<sup>c</sup> and Álvaro Peña-Neira<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales, Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), San Martín 3853, 5507 Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina, <sup>b</sup>Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, Universidad Rovira i Virgili, C/ Marcel·li Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain, <sup>c</sup>Instituto de Fermentaciones Industriales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain, <sup>d</sup>Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile

*Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, 92 (3), 704-718

Received June 14, 2011. Accepted August 1, 2011.

### ABSTRACT

**BACKGROUND:** Knowledge of the chemical composition of wine and its association with the grape variety/cultivar is of paramount importance in oenology and a necessary tool for marketing. Phenolic compounds are very important quality parameters of wines because of their impact on colour, taste and health properties. The aim of the present work was to study and describe the non-flavonoid and flavonoid composition of wines from the principal red grape varieties cultivated in Mendoza (Argentina).

**RESULTS:** Sixty phenolic compounds, including phenolic acids/derivatives, stilbenes, anthocyanins, flavanols, flavonols and dihydroflavonols, were identified and quantified using high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled with electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-DAD/ESI-MS). Marked quantitative differences could be seen in the phenolic profile among varieties, especially in stilbenes, acylated anthocyanins and other flavonoids.

**CONCLUSION:** The polyphenolic content of Malbec wines was higher compared with the other red varieties. Dihydroflavonols represent a significant finding from the chemotaxonomic point of view, especially for Malbec variety. This is the first report on the individual phenolic composition of red



wines from Mendoza (Argentina) and suggests that anthocyanins, flavanols and phenolic acids exert a great influence on cultivar-based differentiation.

**KEYWORDS:** dihydroflavonols; Malbec; phenolics; red wine; variety.

## INTRODUCTION

Wine is considered one of the world's oldest beverages and constitutes an essential cultural component of many traditional producer countries. In the last few decades, its production has also spread to other countries. Argentina is a 'newworld' wine producer and consumer in the southern hemisphere, with 228 575 ha of vineyards representing ~3% of the global wine grape cultivation area. Mendoza province has ~70% of all Argentinean vineyards with 160 704 ha, and the main red grape variety produced (29%) is Malbec (*Vitis vinifera* L.), considered the emblematic cultivar of Argentina. In addition to Malbec, the other five common red varieties used for winemaking in this country are Bonarda, Cabernet Sauvignon, Shiraz, Tempranillo and Merlot, accounting for 90% of red wine grapes produced in Mendoza.<sup>1,2</sup>

Knowledge of the chemical composition of wine and its association with the grape variety/cultivar is of paramount importance in oenology and a necessary tool for marketing. This has stimulated research on analytical methods to verify the authenticity of wines as well as other factors such as their geographical and technological origin. The differentiation of wines according to their variety has been carried out by analyzing physicochemical parameters such as proteins,<sup>3</sup> amino acids and aroma compounds<sup>4</sup> or by DNA analysis.<sup>5</sup>

Phenolic compounds have also been suggested as chemical markers for the authentication and varietal differentiation of grapes and wines. In recent years the cultivar-characteristic profiles of monomeric anthocyanins have been widely used for the classification and differentiation of grape cultivars and monovarietal wines.<sup>6-8</sup> Other studies have demonstrated that flavonol profiles can also be used as a chemical indicator for the authenticity of both red and white grape cultivars and their corresponding single-cultivar wines.<sup>9,10</sup> Polyphenols are one of the most important quality parameters of wines and belong to two main groups of compounds, non-flavonoids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids and their derivatives, stilbenes and phenolic alcohols) and flavonoids (anthocyanins, flavanols, flavonols and dihydroflavonols). These compounds contribute to the organoleptic characteristics of wines, such as colour, astringency and bitterness, are active in biochemical processes and have nutraceutical effects on human health, including antimicrobial, anticarcinogenic and antioxidant properties.<sup>11</sup> The phenolic profile of a wine depends mainly on the grape variety, the geographical location of the vineyard, factors that affect berry development (soil,

weather, viticultural practices, etc.), grape maturity and the winemaking technique used.<sup>12,13</sup> Owing to its biological and agricultural importance, the genetics and biochemistry of the flavonoid biosynthetic pathway have been widely studied in different grape varieties.<sup>14,15</sup>

Numerous analytical methods have been used to detect and quantify phenolic compounds in wines, but high-performance liquid chromatography (HPLC) is the most widely employed technique for the analysis of individual compounds. The use of mass spectrometry (MS) techniques such as electrospray ionisation (ESI) coupled with HPLC to confirm the structure of the main phenolics and/or detect novel compounds is of great value in assessing the peculiar characteristics of different grape varieties, optimising oenological processes, obtaining wines with original and improved characteristics and achieving a better understanding of wine physiological properties.<sup>16</sup>

In order to improve the analytical information about wine composition and to assess wine authenticity, the development/employment of chemometric techniques has been of great value in obtaining reliable results. Several chemometric procedures have been used as the basis for discrimination of wines according to winemaking technology and classification according to region, type and variety. Various pattern recognition techniques such as principal component analysis,<sup>17</sup> cluster analysis<sup>18</sup> and discriminant analysis,<sup>18,19</sup> among others, have been used for this purpose.

To the best of our knowledge, there has been no report so far on the individual phenolic composition of Argentinean red wines. Considering this, the first aim of the present work was to study and describe the non-flavonoid and flavonoid composition of wines from the principal red grape varieties cultivated in Mendoza (Argentina). Taking into account the considerable number of chemical variables analysed, the second aim of the study was to obtain a classification model of red wine varieties by chemometric techniques of multivariate analysis.

## EXPERIMENTAL

### Wine samples

Thirty red wines produced on a commercial scale were collected in bottles (750 mL), at the end of malolactic fermentation, directly from the ten collaborating wineries in order to guarantee their varietal purity. The samples corresponded to five different wines for each of the six red varieties cultivated in Mendoza: Malbec (MB), Bonarda (BN), Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (MT), Shiraz (SH) and Tempranillo (TP). All wines were pure monovarietals from the 2010 vintage. They were stored in darkness at 12-15 °C, and each wine bottle was opened immediately before the analyses. Owing to the time required for completing all analyses (about 1 month), the wine samples were transferred under a nitrogen gas stream to completely filled amber bottles to ensure their preservation.

## Standards and reagents

Standards of gallic acid (149-91-7), syringic acid (530-57-4), caffeic acid (331-39-5), *p*-coumaric acid (501-98-4), ethyl gallate (831-61-8), tryptophol (526-55-6), (+)-catechin (7295-85-4), (-)-epicatechin (490-46-0), resveratrol (501-36-0), myricetin (529-44-2), kaempferol (520-18-3), quercetin-3-glucoside (21 637-25-2), *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (6203-18-5) and polyvinylpyrrolidone (PVPP, 25 249-54-1) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), tyrosol (501-94-0) from Fluka (St Louis, MO, USA) and protocatechuic acid (99-50-3), quercetin (117-39-5) and malvidin-3-glucoside chloride (7228-78-6) from Extrasynthese (Lyon, France). Sodium chloride and sodium metabisulphite were obtained from Anedra (Buenos Aires, Argentina). Ammonium iron (II) sulfate and butanol were purchased from Dalton (Mendoza, Argentina). Ethyl ether and ethyl acetate were acquired from Sintorgan (Buenos Aires, Argentina). Anhydrous sodium sulfate, gelatin, acetaldehyde, hydrochloric acid, acetic acid, formic acid, ethanol, chromatography-grade methanol and acetonitrile were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All reagents were of analytical grade or superior. Ultrapure water was obtained from a RiO/Elix3-Sinergy185 purification system (Millipore, Sao Pablo, Brazil). Cellulose filters (3 µm pore size) and nylon membranes (0.45 µm pore size) were purchased from Microclar (Buenos Aires, Argentina). Nitrogen gas was supplied by Linde SA (Mendoza, Argentina).

## Instrumentation

pH was measured using a TPX-1 digital pH meter (Altronix, Buenos Aires, Argentina). Centrifugation was performed in a CM4080 centrifuge (Rolco, Buenos Aires, Argentina). Absorbance measurements were made with a PerkinElmer Lambda 25 UV-visible spectrophotometer (PerkinElmer, Hartford, CT, USA). For quantification of individual phenolic compounds, a PerkinElmer Series 200 high-performance liquid chromatograph equipped with a diode array detector, a quaternary pump and an autosampler (HPLC-DAD; PerkinElmer, Shelton, CT, USA) was employed. The chromatographic system used for compound identification and confirmation consisted of a Hewlett-Packard Series 1100 high-performance liquid chromatograph equipped with a diode array detector and a quadrupole mass spectrometer with an electrospray interface (HPLC-DAD/ESI-MS; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). A reverse phase Chromolith Performance C<sub>18</sub> column (100 mm × 4.6 mm i.d., 2 µm) with a Chromolith guard cartridge (10 mm × 4.6 mm i.d.) (Merck, Darmstadt, Germany) was used for individual anthocyanin analysis. A reverse phase Nova-Pak C<sub>18</sub> column (300 mm × 3.9 mm i.d., 4 µm; Waters Corp., Milford, MA, USA) was used for low-molecular-weight phenolic compound analysis.

### Spectrophotometric characterisation

Total phenols were determined by direct reading of the absorbance of the samples (1 : 100 dilution) at 280 nm.<sup>20</sup> Total phenols were calculated from a calibration curve made with standard solutions of gallic acid (five replicates) in the range between 0 and 50 mg L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0.99$ ) and expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) L<sup>-1</sup>.

Total anthocyanins were measured by diluting the extract with 20 mL L<sup>-1</sup> hydrochloric acid in ethanol and comparing spectrophotometric readings at 520 nm of single aliquots treated with either sodium metabisulfite or water.<sup>20</sup> Total anthocyanins were expressed as mg malvidin-3-glucoside L<sup>-1</sup>. Free and combined anthocyanins were calculated using the PVPP index.<sup>21</sup>

For total proanthocyanidins the analytical method applied was the acid butanol assay.<sup>22</sup> This method is based on the acid catalysed oxidative cleavage of the C–C interflavanic bond of proanthocyanidins in butanol-HCl. Total proanthocyanidins were expressed as mg (+)-catechin L<sup>-1</sup>.

Gelatin index (GI) was measured using the methodology described by Glories.<sup>23</sup> To two tubes with 10 mL of wine was added 1 mL of distilled water (total tannin) or 1 mL of 70 g L<sup>-1</sup> gelatin solution (tannin precipitated with gelatin). After 3 days the samples were centrifuged at 2038×g for 10 min. The supernatants were assayed to determine the tannin concentration.<sup>22</sup> GI (%) was expressed as the ratio between residual tannin (difference between total wine tannin and tannin after gelatin precipitation) and total tannin concentration.

Colour intensity (CI), percentage of yellow (%Yellow), percentage of red (%Red) and percentage of blue (%Blue) were estimated using the method described by Glories.<sup>21,23</sup> The CIELAB coordinates lightness ( $L^*$ ), chroma or saturation ( $C^*$ ), hue angle ( $h$ ), redness/greenness ( $a^*$ ) and yellowness/blueness ( $b^*$ ) were determined according to Ayala et al.<sup>24</sup> and the data were processed with MSCV® software.<sup>25</sup> The total colour difference ( $\Delta E^*$ ) between two samples was obtained using the expression<sup>26</sup>

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

The contribution of copigmented anthocyanins to the total wine colour at pH 3.6 (colour due to copigmentation, CC%) and the degree of anthocyanin polymerisation (colour due to polymeric pigments, CP%) were determined following the method described by Hermosín Gutiérrez.<sup>27</sup>

Other chemical parameters measured in the samples were molar concentration of flavanols by *p*-dimethylaminocinnamaldehyde assay<sup>28</sup> and pH, titratable acidity and ethanol content as described by Zoecklein et al.<sup>29</sup>

### HPLC analysis of anthocyanins

A 2 mL aliquot of wine was filtered through a 0.45 µm pore size nylon membrane, then 100 µL of the filtrate was injected onto the column. Separation was carried out at 25 °C. A gradient

consisting of solvent A (water/formic acid, 90:10 v/v) and solvent B (acetonitrile) was applied at a flow rate of 1.1 mL min<sup>-1</sup> from 0 to 22 min and 1.5 mL min<sup>-1</sup> from 22 to 35 min as follows: 96–85% A/4–15% B from 0 to 12 min, 85% A/15% B from 12 to 22 min and 85–70% A/15–30% B from 22 to 35 min; this was followed by a final wash with pure methanol and re-equilibration of the column. Diode array detection was performed from 210 to 600 nm and quantification was carried out by peak area measurements at 520 nm. Anthocyanin content was expressed using malvidin-3-glucoside chloride as standard for a calibration curve ( $R^2 = 0.99$ ). ESI parameters were as follows: drying gas (N<sub>2</sub>) flow, 11 L min<sup>-1</sup>; temperature, 350 °C; nebuliser pressure, 380 Pa (55 psi); capillary voltage, 4000 V. The ESI was operated in positive mode scanning from  $m/z$  100 to 1500 using the following fragmentation voltage gradient: 100 V from 0 to 15 min and 120 V from 15 to 35 min.<sup>6</sup>

### HPLC analysis of low-molecular-weight phenolic compounds

A 50 mL aliquot of wine was mixed with 1 g of sodium chloride and extracted three times with 20 mL of ethyl ether and three times with 20 mL of ethyl acetate. The organic fractions were combined, dehydrated with 2.5 g of anhydrous sodium sulfate, filtered throughout a 3 µm pore size cellulose filter and evaporated to dryness under a gentle nitrogen gas stream at 35 °C. The solid residue was dissolved in 2 mL of methanol/water (1:1 v/v) and filtered through a 0.45 µm pore size nylon membrane, then 30 µL of the filtrate was injected into the HPLC system. Separation was performed at 25 °C. Two mobile phases were employed for elution: A (water/acetic acid, 98:2 v/v) and B (water/acetonitrile/acetic acid, 78:20:2 v/v/v). The gradient profile was as follows: 0–55 min, 100–20% A/0–80% B; 55–57 min, 20–10% A/80–90% B; 57–70 min, 10% A/90% B isocratic; 70–80 min, 10–0% A/90–100% B; 80–125 min, 0% A/100% B isocratic; this was followed by a final wash with pure methanol and re-equilibration of the column. The flow rate was 0.9 mL min<sup>-1</sup> from 0 to 55 min and 1 mL min<sup>-1</sup> from 55 to 125 min. Diode array detection was performed by scanning from 210 to 360 nm with an acquisition time of 1 s. ESI parameters were as follows: drying gas (N<sub>2</sub>) flow, 11 L min<sup>-1</sup>; temperature, 350 °C; nebuliser pressure, 380 Pa (55 psi); capillary voltage, 4000 V. The ESI was operated in negative mode scanning from  $m/z$  100 to 3000 using the following fragmentation programme: from  $m/z$  0 to 200 (100 V) and from  $m/z$  200 to 3000 (200 V).<sup>16</sup> Quantitative determinations were made using the external standard method with commercial standards. The calibration curves were obtained by injection of standard solutions, under the same conditions as for the samples analysed, over the range of concentrations observed ( $R^2 \geq 0.94$ ). Compounds for which no standards were available were quantified with the curves of quercetin (dihydroflavonols), quercetin-3-glucoside (quercetin and flavonol glycosides), myricetin (myricetin glycosides), resveratrol (*trans* and *cis*-resveratrol glucoside), caffeic acid (ferric, caffeic and coumaric acids), gallic acid (gentisic acid), ethyl gallate (methyl gallate) and (+)-catechin (procyanidins).

## Statistical analysis

All analyses (including extractions) were carried out in triplicate. Statistical analysis was assessed with Statgraphics Plus Version 4.0 (Statistical Graphics Corp., Warrenton, VA, USA). All results were tested for homogeneity of variance using Cochran's test and subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's honestly significant difference (HSD) test. A  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant. Canonical discriminant analyses were performed to examine varietal differences in red wines from Mendoza using the individual phenolic parameters.

## RESULTS AND DISCUSSION

### General chemical composition

**Table 1** presents the results for the general analytical parameters evaluated in the monovarietal red wines studied. Among all samples analysed, titratable acidity varied from 4.4 to 6.8 g L<sup>-1</sup>, pH from 3.60 to 3.84 and ethanol content from 13.0 to 15.2%. These results show a considerable dispersion for these important parameters that influence not only the sensory quality of wine but also the colour intensity expression and microbiological stability.<sup>29</sup> MB wines presented significantly higher acidity and also reached higher ethanol content than the other varieties.

For all samples, total phenols ranged between 1585.6 and 4203.2 mg L<sup>-1</sup>. On average, MB wines contained slightly higher phenolic levels than MT, CS, BN and TP, without significant differences ( $P > 0.05$ ) among the five varieties. By contrast, SH wines had the lowest values for this parameter. These results are comparable to those reported for Tempranillo wines from Spain,<sup>30</sup> Malbec wines from Argentina<sup>2</sup> and Shiraz, Cabernet Sauvignon and Merlot wines from Australia.<sup>31</sup>

Proanthocyanidins accounted for >70% of the total phenolic compounds in the red wines analysed. Among the six varieties, MB showed the highest values, with concentrations similar to those of a previous study.<sup>2</sup> Besides the influence of genetic and agroecological factors on the biosynthesis of these compounds, the high content of alcohol in MB wines could enhance the extraction of proanthocyanidins during the winemaking process. The astringency measured by GI showed a parallel behaviour to proanthocyanidins, with values between 75.1 and 83.7%.

Regarding colour parameters, statistically significant differences were observed among samples. MB wines presented significantly higher values of CI and  $h$  and lower  $L^*$  values (more dark colour) than the other varieties. This higher CI was principally due to the red component of the colour. When analysing the other cultivars, we found that BN, CS and MT had similar values for all colour components, TP showed slightly lower values and SH was the least coloured variety.

**Table 1.** General analytical parameters of monovarietal red wines from Mendoza

Parameter	Malbec	Bonarda	Cabernet Sauvignon	Merlot	Shiraz	Tempranillo
Titrateable acidity (g tartaric acid L <sup>-1</sup> )	6.8 ± 0.3b	5.3 ± 0.2a	6.7 ± 0.3b	5.8 ± 0.4ab	4.4 ± 0.2a	5.6 ± 0.3ab
pH	3.60 ± 0.06a	3.80 ± 0.04a	3.73 ± 0.09a	3.73 ± 0.09a	3.80 ± 0.06a	3.84 ± 0.07a
Ethanol (% v/v)	15.2 ± 0.4d	13.0 ± 0.3a	14.5 ± 0.3bcd	14.5 ± 0.1cd	13.6 ± 0.2ab	13.8 ± 0.2bc
TA (mg malvidin-3-glucoside L <sup>-1</sup> )	1044.5 ± 88.2c	739.8 ± 55.0bc	681.8 ± 100.8b	644.1 ± 37.6b	301.4 ± 18.9a	717.6 ± 41.9b
FA (mg malvidin-3-glucoside L <sup>-1</sup> )	690.0 ± 139.6b	418.9 ± 33.3ab	417.2 ± 45.4ab	409.7 ± 45.2ab	226.1 ± 11.1a	407.1 ± 40.4a
CA (mg malvidin-3-glucoside L <sup>-1</sup> )	354.4 ± 55.3b	321.0 ± 28.0b	264.6 ± 56.9b	234.4 ± 14.5ab	75.2 ± 8.0a	310.5 ± 24.5b
Cl(A <sub>420nm</sub> +A <sub>520nm</sub> +A <sub>620nm</sub> ) × 10	31.9 ± 1.3d	15.0 ± 1.4bc	15.2 ± 0.9bc	17.3 ± 0.5c	5.8 ± 0.1a	12.0 ± 0.7b
% Yellow	27.5 ± 0.1a	32.3 ± 0.7b	33.0 ± 0.9b	33.3 ± 0.9b	36.3 ± 0.3c	33.1 ± 0.3b
% Red	61.2 ± 0.1b	54.5 ± 1.1a	55.2 ± 1.3a	55.3 ± 1.1a	51.6 ± 0.4a	53.8 ± 1.0a
% Blue	11.3 ± 0.1a	13.2 ± 0.4a	11.8 ± 0.4a	11.3 ± 0.2a	12.1 ± 0.4a	13.1 ± 0.8a
L*	22.3 ± 2.0a	40.5 ± 3.0b	40.7 ± 2.4b	38.0 ± 1.8b	68.5 ± 1.2c	46.5 ± 1.8b
C*	57.6 ± 1.5c	52.7 ± 2.3bc	56.2 ± 1.5bc	58.6 ± 2.1c	32.1 ± 0.4a	49.8 ± 1.4b
h	21.6 ± 0.8c	9.0 ± 2.6a	10.8 ± 1.9ab	19.2 ± 1.9bc	3.6 ± 2.0a	4.9 ± 1.1a
a*	53.5 ± 1.6b	51.9 ± 2.0b	55.2 ± 1.5b	55.4 ± 2.6b	32.0 ± 0.5a	49.6 ± 1.3b
b*	21.1 ± 0.6c	8.4 ± 2.7ab	10.5 ± 1.9b	19.2 ± 1.1c	2.0 ± 1.1a	4.4 ± 1.0ab
CC (%)	49.2 ± 2.8b	24.1 ± 1.7a	20.3 ± 0.8a	22.1 ± 5.0a	22.0 ± 0.8a	25.2 ± 3.2a
CP (%)	11.0 ± 0.6a	25.4 ± 0.7b	27.4 ± 1.2b	26.6 ± 2.8b	23.1 ± 0.6b	21.3 ± 2.1b
TTP (mg GAE L <sup>-1</sup> )	4203.2 ± 412.8b	3372.1 ± 453.0b	3377.6 ± 369.6b	3447.5 ± 372.3b	1585.6 ± 50.6a	3137.4 ± 152.9b
PA (mg catechin L <sup>-1</sup> )	5013.0 ± 507.2b	3925.4 ± 556.3b	3860.7 ± 439.6ab	4439.9 ± 498.5b	1922.6 ± 160.1a	3200.7 ± 250.9ab
FL (mol catechin L <sup>-1</sup> )	1.6 × 10 <sup>-3</sup> ± 6.3 × 10 <sup>-5b</sup>	2.1 × 10 <sup>-3</sup> ± 1.8 × 10 <sup>-4bc</sup>	2.7 × 10 <sup>-3</sup> ± 1.7 × 10 <sup>-4c</sup>	2.2 × 10 <sup>-3</sup> ± 2.0 × 10 <sup>-4bc</sup>	8.8 × 10 <sup>-7</sup> ± 3.7 × 10 <sup>-5a</sup>	1.7 × 10 <sup>-3</sup> ± 6.8 × 10 <sup>-5b</sup>
GI (%)	83.7 ± 2.0a	78.3 ± 0.9a	79.1 ± 1.7a	79.2 ± 4.2a	75.1 ± 1.7a	80.9 ± 2.5a

Values are expressed as mean ± standard error (n = 5). Different letters in the same row indicate significant differences (P < 0.05) according to a Tukey's HSD test. TA, total anthocyanins; FA, free anthocyanins; CA, combined anthocyanins; Cl, colour intensity; L\*, lightness; C\*, chroma; h, hue angle; a\*, redness/greenness; b\*, yellowness/blueness; CC, colour due to copigmentation; CP, colour due to polymeric pigments; TTP, total phenols; PA, proanthocyanidins; FL, molar concentration of flavanols; GI, gelatin index.

**Table 2** shows  $\Delta E^*$  values among wines of the different varieties. This parameter can be very important for the wine industry as it expresses the human eye's ability to discriminate between the colours of two wines. It is generally accepted that tasters can only distinguish the colours of two wines through the glass when  $\Delta E^* \geq 5$  units.<sup>26</sup> In our study,  $\Delta E^*$  values among all red wine varieties were greater than 5 units.

Parallel to what was observed for colour, total anthocyanin concentration ranged from 301.4 mg L<sup>-1</sup> (SH) to 1044.5 mg L<sup>-1</sup> (MB). This behaviour was similar for free and combined anthocyanins. These results are in agreement with those determined by other authors.<sup>2,13,31,32</sup> As for proanthocyanidins, the extracting effect of ethanol during maceration may be favoured by lower pH values in MB wines. A lower pH may also protect anthocyanins against oxidation.<sup>21</sup> The total anthocyanins determined by spectrophotometry were much higher than those obtained by HPLC. This is because spectrophotometric analysis overestimates the total anthocyanin concentration since it includes the contribution from other pigments,<sup>33</sup> whereas only monomeric anthocyanins are detected by the HPLC method.

Analysing the contribution of CC% to the total wine colour, we observed a higher proportion (49.2%) in MB wines, probably owing to the higher content of anthocyanins and other copigments. Conversely, the remaining red varieties, especially BN, MT and CS, had higher values for CP% than MB, which could be explained by higher levels of flavanols (**Table 1**). It is well known that the main reaction involving monomeric anthocyanins is the formation of polymeric red pigments through condensation with flavanols (especially oligomers), and this reaction can be mediated and accelerated by acetaldehyde.<sup>34</sup>

Finally, we note that the low concentration observed in SH wines for the phenolic parameters evaluated can be attributed mainly to the high yield of the vineyards from which they come. Peña-Neira et al.<sup>35</sup> studied the effect of cluster thinning in Shiraz grapes and observed a higher concentration of phenolic compounds in berries from low-yield plants. In general, the SH vines of our study yielded close to 20 000 kg ha<sup>-1</sup>, about double compared with the other varieties.

<b>Table 2.</b> Total colour differences ( $\Delta E^*$ ) among monovarietal red wines						
Variety	MB	BN	CS	MT	SH	TP
<b>MB</b>		22.9 ± 2.5	21.6 ± 3.0	16.6 ± 0.6	54.5 ± 0.6	29.8 ± 1.4
<b>BN</b>	22.9 ± 2.5		10.1 ± 2.7	12.7 ± 1.9	35.1 ± 2.6	9.2 ± 2.1
<b>CS</b>	21.6 ± 3.0	10.1 ± 2.7		10.4 ± 1.5	37.3 ± 2.3	12.5 ± 3.0
<b>MT</b>	16.6 ± 0.6	12.7 ± 1.9	10.4 ± 1.5		42.1 ± 1.2	18.7 ± 1.5
<b>SH</b>	54.5 ± 0.6	35.1 ± 2.6	37.3 ± 2.3	42.1 ± 1.2		28.5 ± 1.4
<b>TP</b>	29.8 ± 1.4	9.2 ± 2.1	12.5 ± 3.0	18.7 ± 1.5	28.5 ± 1.4	

Values are expressed as mean ± standard error ( $n = 5$ ). MB, Malbec; BN, Bonarda; CS, Cabernet Sauvignon; MT, Merlot; SH, Shiraz; TP, Tempranillo.



## Anthocyanins and pyranoanthocyanins

The identified and quantified compounds in the wine samples were grouped according to acylation (non-acylated glucosides, acetyl-glucosides and cinnamoyl-glucosides) and anthocyanidin (delphinidins, cyanidins, petunidins, peonidins and malvidins) characteristics. Cinnamoyl-glucosides included both *p*-coumaroyl and caffeoyl anthocyanins. Another group was formed by more complex anthocyanin-derived pigments (pyranoanthocyanins). The molecular ions  $[M]^+$ , the fragments corresponding to the anthocyanidins after cleavage of the glucose moiety, and the spectral information are shown in **Table 3**. All identified compounds were detected in all varieties studied, except cyanidin-3-(6''-*p*-coumaroyl)glucoside that was absent in CS and malvidin-3-glucoside acetate (vitisin B) that was absent in SH.

Compound	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[M]^+$ ( <i>m/z</i> )	Fragments ( <i>m/z</i> )	Wines					
				MB	BN	CS	MT	SH	TP
Delphinidin-3-glucoside	526	465	303	X	X	X	X	X	X
Cyanidin-3-glucoside	516	449	287	X	X	X	X	X	X
Petunidin-3-glucoside	528	479	317	X	X	X	X	X	X
Peonidin-3-glucoside	518	463	301	X	X	X	X	X	X
Malvidin-3-glucoside	528	493	331	X	X	X	X	X	X
Delphinidin-3-(6''-acetyl)glucoside	518	507	303	X	X	X	X	X	X
Cyanidin-3-(6''-acetyl)glucoside	518	491	287	X	X	X	X	X	X
Petunidin-3-(6''-acetyl)glucoside	530	521	317	X	X	X	X	X	X
Peonidin-3-(6''-acetyl)glucoside	520	505	301	X	X	X	X	X	X
Malvidin-3-(6''-acetyl)glucoside	530	535	331	X	X	X	X	X	X
Delphinidin-3-(6''- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside	532	611	303	X	X	X	X	X	X
Cyanidin-3-(6''- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside	526	595	287	X	X	—	X	X	X
Malvidin-3-(6''-caffeoyl)glucoside	526	655	331	X	X	X	X	X	X
Petunidin-3-(6''- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside	532	625	317	X	X	X	X	X	X
Peonidin-3-(6''- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside	524	609	301	X	X	X	X	X	X
Malvidin-3-(6''- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside <i>cis</i>	540	639	331	X	X	X	X	X	X
Malvidin-3-(6''- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside <i>trans</i>	535	639	331	X	X	X	X	X	X
Malvidin-3-glucoside pyruvate (vitisin A)	512	561	399	X	X	X	X	X	X
Malvidin-3-glucoside acetate (vitisin B)	492	517	355	X	X	X	X	—	X
Peonidin-3-glucoside pyruvate	520	531	369	X	X	X	X	X	X
Malvidin-3-(6''-acetyl)glucoside pyruvate	518	603	399	X	X	X	X	X	X
Malvidin-3-glucoside-ethyl-epicatechin	545	809	—	X	X	X	X	X	X
Malvidin-3-glucoside-4-vinylphenol	504	609	447	X	X	X	X	X	X

x, detected; —, not detected.

**Table 4** summarises the concentrations of individual anthocyanins and pyranoanthocyanins in the different monovarietal red wines. Marked quantitative differences could be seen in the anthocyanin profile of the six varieties. Coincident with the results observed in the

spectrophotometric determination of anthocyanins, MB wines had the highest content of total monomeric anthocyanins ( $587.2 \text{ mg L}^{-1}$ ), followed by TP, BN, MT, CS and SH. The mean proportions of some anthocyanic forms were different among varieties, but the relations between anthocyanic groups seem to be characteristic of them. The group of simple glucosides represented the highest proportion of all anthocyanins in all varieties, ranging from 54.8% (SH) to 75.8% (TP). These results are in agreement with those published by others authors for the same cultivars.<sup>2,6,34,36,37</sup> Acylated derivatives showed the largest differences among varieties. Considering the acetyl-glucosides, SH wines had the highest proportion, similar to CS and MT, followed by MB and BN, and the lowest values were observed in TP (26.5, 25.0, 22.5, 16.7, 14.3 and 8.7% respectively). However, the proportion of cinnamoyl-glucosides was very similar in SH and TP, higher than in BN, MB and MT, whereas in CS it was approximately half that of the other varieties (**Table 4**). These results are consistent with the literature.<sup>2,6,34,36,38,39</sup>

The ratio of acetyl- and coumaroyl-glucosides ( $\Sigma$ acetylated/ $\Sigma$ coumaroylated) was also calculated. It is related to the activity of enzymes of the anthocyanin synthesis pathway in grapes and is proposed by some authors for the verification of varietal authenticity in red wines.<sup>8</sup> The values obtained for the six varieties were significantly different ( $P < 0.05$ ), i.e. 2.1 for MB, 1.6 for BN, 5.2 for CS, 2.9 for MT, 2.0 for SH and 0.8 for TP, in accordance with other studies.<sup>2,6,36</sup>

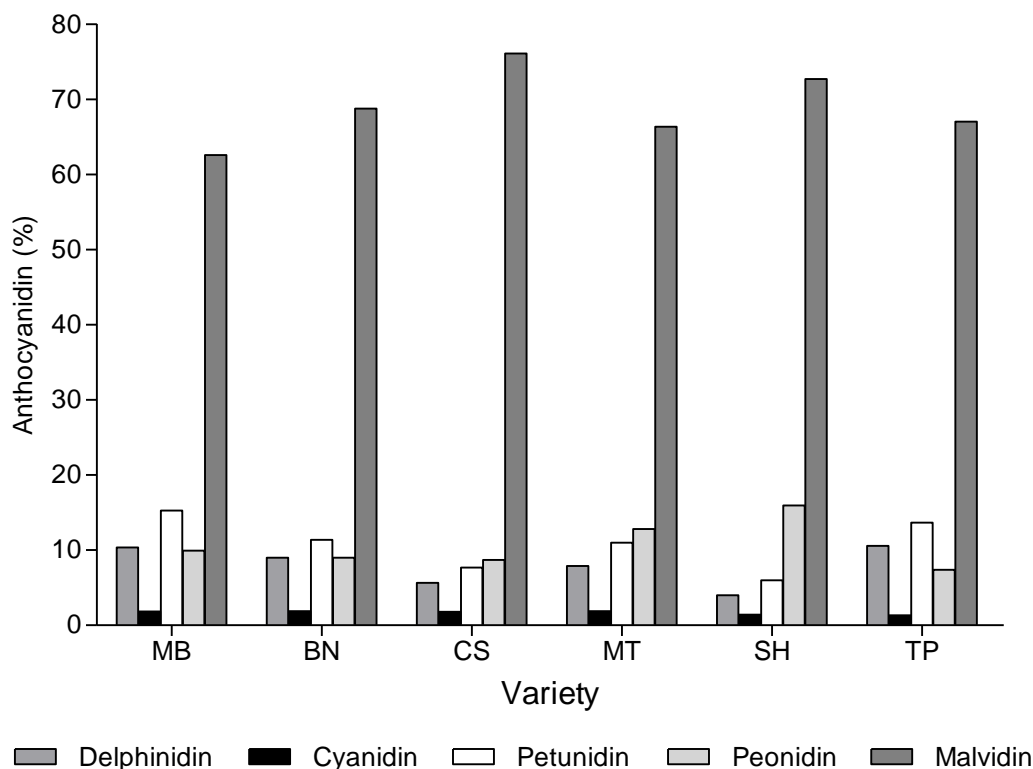
As shown in **Fig. 1**, the malvidin derivatives were the most abundant anthocyanins in all samples, while the cyanidin derivatives showed the lowest proportion, confirming its behaviour observed in previous studies.<sup>2,36</sup> In accordance with Roggero et al.,<sup>40</sup> the results of our study suggest that the enzyme activity involved in anthocyanin biosynthesis is different in each variety. MT and SH seem to have weaker flavonoid-3',5'-hydroxylase activity, favouring the accumulation of peonidin. MB, TP and BN seem to have less *o*-dihydroxyphenol-*O*-methyltransferase activity, allowing the accumulation of delphinidin and petunidin. Finally, CS seems to have strong activity of both enzymes, permitting the highest accumulation of malvidin.

Pyranoanthocyanins are of interest for winemakers because they show high stability during the aging of red wines, are more resistant to elevated pH values and bisulphite bleaching than anthocyanins and express more colour than other pigments at the typical pH of wine. **Table 4** shows that MB wines contained the highest levels of all derived pigments, which seems to be related to a larger concentration of its corresponding anthocyanin precursors. Moreover, the differences observed in levels of these compounds among the samples may be a varietal characteristic or due to different winemaking conditions.<sup>6</sup>

Table 4. Anthocyanins (mg L<sup>-1</sup>) quantified in different monovarietal red wines from Mendoza

Compound	Malbec	Bonarda	Cabernet Sauvignon	Merlot	Shiraz	Tempranillo
Delphinidin-3-glucoside	41.2 ± 2.4e	18.9 ± 1.5c	10.1 ± 1.0b	14.5 ± 1.1bc	2.7 ± 0.1a	26.5 ± 1.5d
Cyanidin-3-glucoside	5.48 ± 0.28c	2.44 ± 0.20b	2.10 ± 0.20b	2.46 ± 0.17b	0.66 ± 0.04a	2.42 ± 0.15b
Petunidin-3-glucoside	61.8 ± 2.3e	28.7 ± 2.0cd	14.4 ± 0.9b	23.2 ± 1.9c	6.0 ± 0.3a	35.0 ± 0.7d
Peonidin-3-glucoside	40.3 ± 2.4c	16.6 ± 1.2a	14.9 ± 1.3a	24.3 ± 2.3b	14.3 ± 1.0a	17.0 ± 1.0a
Malvidin-3-glucoside	257.0 ± 8.0d	146.2 ± 6.4bc	141.3 ± 12.2bc	119.3 ± 10.6b	73.7 ± 2.2a	162.0 ± 7.6c
Total glucosylated	405.8 ± 11.8d (69.1 <sup>a</sup> )	212.8 ± 10.1bc (69.2)	182.8 ± 14.8b (63.2)	183.8 ± 10.8b (62.5)	97.4 ± 3.3a (54.8)	242.9 ± 10.8c (75.8)
Delphinidin-3-(6"-acetyl)glucoside	11.08 ± 0.48d	4.42 ± 0.28b	4.06 ± 0.24b	6.00 ± 0.43c	1.68 ± 0.05a	3.12 ± 0.19b
Cyanidin-3-(6"-acetyl)glucoside	4.62 ± 0.05c	2.80 ± 0.24b	3.18 ± 0.38b	2.66 ± 0.20b	1.46 ± 0.05a	1.32 ± 0.09a
Petunidin-3-(6"-acetyl)glucoside	22.9 ± 1.8b	4.5 ± 0.3a	7.4 ± 0.4a	7.5 ± 0.5a	4.0 ± 0.2a	5.6 ± 0.3a
Peonidin-3-(6"-acetyl)glucoside	6.6 ± 0.3c	4.4 ± 0.4b	6.4 ± 0.5c	7.4 ± 0.4c	7.6 ± 0.5c	1.7 ± 0.1a
Malvidin-3-(6"-acetyl)glucoside	52.6 ± 0.9d	27.8 ± 1.9ab	51.1 ± 5.0d	42.7 ± 5.4cd	32.4 ± 1.7bc	16.0 ± 0.4a
Total acetylated	97.8 ± 2.3d (16.7)	43.9 ± 2.6ab (14.3)	72.1 ± 6.1c (25.0)	66.3 ± 5.9c (22.5)	47.1 ± 1.6b (26.5)	27.7 ± 1.0a (8.7)
Delphinidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside	8.6 ± 0.5c	4.4 ± 0.2b	2.3 ± 0.1a	2.6 ± 0.1a	2.7 ± 0.1a	4.3 ± 0.1b
Cyanidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside	0.84 ± 0.07c	0.58 ± 0.04b	ND	0.42 ± 0.05ab	0.32 ± 0.02a	0.60 ± 0.05b
Malvidin-3-(6"-caffeoyl)glucoside	1.46 ± 0.09c	0.82 ± 0.07b	0.76 ± 0.05b	0.72 ± 0.06b	0.32 ± 0.02a	1.42 ± 0.10c
Petunidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside	5.18 ± 0.34e	1.98 ± 0.15c	0.26 ± 0.02a	1.16 ± 0.10b	0.62 ± 0.05ab	3.04 ± 0.04d
Peonidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside	6.2 ± 0.4c	3.7 ± 0.2b	1.3 ± 0.1a	3.3 ± 0.3b	5.1 ± 0.3c	2.9 ± 0.1b
Malvidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside cis	1.78 ± 0.22b	1.20 ± 0.10a	0.84 ± 0.10a	0.98 ± 0.08a	1.28 ± 0.04ab	1.78 ± 0.07b
Malvidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside trans	23.5 ± 0.8c	16.1 ± 0.3b	9.2 ± 0.3a	14.4 ± 1.1b	13.5 ± 0.5b	21.9 ± 0.9c
Total coumaroylated	46.1 ± 2.0e (7.8)	28.0 ± 0.7c (9.1)	13.9 ± 0.5a (4.8)	22.9 ± 1.4b (7.8)	23.5 ± 0.5bc (13.3)	34.5 ± 1.0d (10.8)
Total cinnamoylated	47.6 ± 1.9e (8.1)	28.8 ± 0.7c (9.4)	14.7 ± 0.5a (5.0)	23.6 ± 1.4b (8.0)	23.8 ± 0.5bc (13.5)	35.9 ± 1.0d (11.2)
Vitisin A	12.8 ± 0.6d	5.6 ± 0.4bc	5.4 ± 0.3bc	6.4 ± 0.5c	2.0 ± 0.1a	4.0 ± 0.3b
Vitisin B	6.0 ± 0.4d	4.6 ± 0.3c	4.4 ± 0.2bc	3.3 ± 0.3ab	ND	2.3 ± 0.2a
Peonidin-3-glucoside pyruvate	5.24 ± 0.34c	2.90 ± 0.19b	2.44 ± 0.16b	2.46 ± 0.17b	1.32 ± 0.05a	2.10 ± 0.08ab
Malvidin-3-(6"-acetyl)glucoside pyruvate	3.9 ± 0.3c	3.3 ± 0.3bc	2.7 ± 0.3ab	3.0 ± 0.2bc	3.3 ± 0.1bc	1.9 ± 0.1a
Malvidin-3-glucoside-ethyl-epicatechin	7.5 ± 0.5d	4.6 ± 0.3c	4.2 ± 0.3bc	4.6 ± 0.4c	2.2 ± 0.1a	2.9 ± 0.2ab
Malvidin-3-glucoside-4-vinylphenol	0.60 ± 0.03a	0.94 ± 0.08b	0.62 ± 0.07a	0.62 ± 0.06a	0.48 ± 0.04a	0.60 ± 0.03a
Total pyranocoumaroylated	36.0 ± 0.9d (6.1)	21.9 ± 1.2c (7.2)	19.8 ± 0.9c (6.8)	20.4 ± 1.5c (6.9)	9.3 ± 0.3a (5.2)	13.8 ± 0.7b (4.3)
Total anthocyanins	587.2 ± 16.5c	307.4 ± 10.6b	289.4 ± 21.3b	294.1 ± 17.5b	177.6 ± 5.1a	320.3 ± 10.2b
Σ glucosylated / Σ acetylated	4.1	4.8	2.5	2.8	2.1	8.8
Σ glucosylated / Σ coumaroylated	8.8	7.6	13.2	8.1	4.1	7.0
Σ coumaroylated / Σ acetylated	0.5	0.6	0.2	0.3	0.5	1.2
Σ acetylated / Σ coumaroylated	2.1	1.6	5.2	2.9	2.0	0.8

Values are expressed as mean ± standard error (n = 5). Different letters in the same row indicate significant differences between varieties for each compound (Tukey's HSD test, P < 0.05). ND, not detected. <sup>a</sup>Ratio (%) between anthocyanin derivatives by acylation and total anthocyanins.



**Figure 1.** Anthocyanin distribution by anthocyanidins in Malbec (MB), Bonarda (BN), Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (MT), Shiraz (SH) and Tempranillo (TP) wines.

### Low-molecular-weight phenolic composition

The identified and quantified low-molecular-weight phenolic compounds (non-anthocyanins) in the red wines analysed were grouped into non-flavonoids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids and their derivatives, stilbenes and phenolic alcohols) and flavonoids (flavanols, flavonols and dihydroflavonols). **Table 5** shows the ESI-MS data of these compounds and their distribution in the six varieties studied.

The concentrations of low-molecular-weight phenolic compounds, individually and grouped, and the relative proportions of each group in the wine samples are presented in **Table 6**. Flavonoid compounds were the most abundant fraction (mean 75.5%) of non-anthocyanin phenolics compared with non-flavonoids (mean 24.5%) in the six varieties, as reported by other authors.<sup>2,16,34</sup> Coincident with the results observed for the general parameters evaluated (total phenols, proanthocyanidins, anthocyanins) and the monomeric anthocyanins determined by HPLC, MB wines had the highest concentration of total non-anthocyanin phenolic compounds ( $495.9 \pm 37.9 \text{ mg L}^{-1}$ ), indicating their polyphenolic richness compared with the other varieties. Regarding the non-flavonoids, hydroxybenzoic acids/derivatives and phenolic alcohols were the most abundant groups found in our samples, ranging from 5.4% (MB) to 9.9% (BN) and from 7.4% (MB) to 13.4% (TP) of total phenolics quantified respectively. Gallic acid showed the highest concentration of all benzoic derivatives (mean

47.3%), especially in BN wines (mean 20.7mg L<sup>-1</sup>) compared with the other varieties. These results are in agreement with other studies on Spanish red wines<sup>16,41</sup> and Malbec wines from Argentina.<sup>2</sup>

The hydroxycinnamic acids found in the wines studied were *trans*-caffeic and *trans*-*p*-coumaric acids, BN being the variety richest in these compounds (9.9 mg L<sup>-1</sup>). Analysing their precursors (tartaric esters of hydroxycinnamic acids), we observed a higher content of these compounds than of the free acids in all wines evaluated, in accordance with Monagas et al.<sup>16</sup> and Hermosín Gutiérrez et al.<sup>34</sup> In addition, there were significant differences among varieties, with larger values of caftaric, coutaric and fertaric acids in SH wines, followed by MB, MT, CS, TP and BN.

**Table 5.** Low-molecular-weight phenolic compounds identified by HPLC-DAD/ESI-MS in wines from *Vitis vinifera* L. cvs. Malbec (MB), Bonarda (BN), Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (MT), Shiraz (SH) and Tempranillo (TP)

Compound	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragments (m/z)	Wines					
				MB	BN	CS	MT	SH	TP
Gallic acid	272	169	125	X	X	X	X	X	X
Protocatechuic acid	290, 260	153	109	X	X	X	X	X	X
Syringic acid	278	197	—	X	X	X	X	X	X
Gentisic acid	328 (sh), 292	153	125, 109	X	X	X	X	X	X
Methyl gallate	276	183	169, 125	X	X	X	X	X	X
Ethyl gallate	278	197	169, 125	X	X	X	X	X	X
<i>trans</i> -Caftaric acid	326, 298 (sh)	311	179	X	X	X	X	X	X
<i>cis</i> -Coutaric acid	313, 290 (sh)	295	163	X	X	X	X	X	X
<i>trans</i> -Coutaric acid	313, 290 (sh)	295	163	X	X	X	X	X	X
<i>trans</i> -Fertaric acid	292, 260	325	193	X	X	X	X	X	X
<i>trans</i> -Caffeic acid	320	179	135	X	X	X	X	X	X
<i>trans</i> - <i>p</i> -Coumaric acid	309	163	119	X	X	X	X	X	X
<i>trans</i> -Resveratrol-3-glucoside	318 (sh), 304	389	227	X	X	X	X	X	X
<i>cis</i> -Resveratrol-3-glucoside	285	389	227	X	X	X	X	X	X
Tyrosol	275	137	—	X	X	X	X	X	X
Tryptophol	279	160	—	X	X	X	X	X	X
(+)-Catechin	279	289	—	X	X	X	X	X	X
(-)-Epicatechin	279	289	—	X	X	X	X	X	X
Procyanidin dimers	280	577	425, 407, 289	X	X	X	X	X	X
Procyanidin trimers	280	865	713, 577, 289	X	X	X	—	X	X
Myricetin-3-glucuronide	350, 300 (sh), 262	493	317	X	X	X	X	X	X
Myricetin-3-galactoside	350, 300 (sh), 263	479	317	X	X	—	—	—	—
Myricetin-3-glucoside	350, 300 (sh), 264	479	317	X	—	X	X	X	X
Quercetin-3-glucuronide	354, 296 (sh), 256	477	301	X	X	X	X	X	X
Quercetin-3-glucoside	354, 292 (sh), 254	463	301	X	X	X	X	X	X
Quercetin-3-rhamnoside	348, 286 (sh), 266	447	301	X	X	X	X	X	X
Isorhamnetin-3-glucoside	360, 286 (sh), 254	477	315	X	X	X	X	X	X
Syringetin-3-glucoside	357, 304 (sh), 252	507	345	—	X	X	—	X	X
Naringenin	364, 300 (sh), 252	271	177, 151	X	X	X	X	X	X
Kaempferol	370, 302 (sh), 254	285	257	X	X	X	X	X	X
Dihydroquercetin-3-rhamnoside	336 (sh), 292	449	303	X	—	—	—	—	—
Dihydrokaempferol-3-glucoside	340 (sh), 292	449	287	X	X	X	X	X	—
Dihydroquercetin-3-glucoside	336 (sh), 292	465	303	X	X	X	X	X	—

X, detected; —, not detected; (sh), shoulder.

**Table 6.** Low-molecular-weight phenolic compounds (mg L<sup>-1</sup>) quantified in different monovarietal red wines from Mendoza

Compound	Malbec	Bonarda	Cabernet sauvignon	Merlot	Shiraz	Tempranillo
Non-flavonoid phenolics						
Galic acid	11.6 ± 1.3a	20.7 ± 0.6b	15.9 ± 1.0a	15.1 ± 1.3a	11.2 ± 1.2a	11.1 ± 1.3a
Protocatechuic acid	1.4 ± 0.2a	1.1 ± 0.1a	1.2 ± 0.1a	2.7 ± 0.2b	1.5 ± 0.1a	1.1 ± 0.1a
Syringic acid	3.0 ± 0.4b	2.5 ± 0.3b	1.6 ± 0.1a	2.7 ± 0.2b	3.1 ± 0.4b	3.2 ± 0.2b
Gentisic acid	1.4 ± 0.3a	1.5 ± 0.2a	1.6 ± 0.1a	1.3 ± 0.1a	1.1 ± 0.2a	1.8 ± 0.3a
Methyl gallate	2.3 ± 0.2ab	2.6 ± 0.2ab	2.5 ± 0.1ab	2.5 ± 0.3ab	1.6 ± 0.1a	2.7 ± 0.2b
Ethyl gallate	7.0 ± 1.2ab	13.0 ± 0.8c	8.8 ± 0.7b	10.2 ± 0.8bc	4.7 ± 0.5a	3.8 ± 0.6a
Hydroxybenzoic acids/derivatives	26.7 ± 2.8ab (5.4 <sup>a</sup> )	41.4 ± 0.8c (9.9)	31.6 ± 1.9ab (8.7)	34.5 ± 2.6bc (8.6)	23.2 ± 0.8a (8.2)	23.7 ± 1.3a (9.0)
trans-Cattaric acid	5.6 ± 1.1c	1.4 ± 0.1a	3.6 ± 0.4bc	4.2 ± 0.5c	5.4 ± 0.4c	1.9 ± 0.3ab
cis-Coutaric acid	1.2 ± 0.2a	0.6 ± 0.1a	1.3 ± 0.2a	1.3 ± 0.1a	2.5 ± 0.2b	1.4 ± 0.3a
trans-Coutaric acid	3.9 ± 0.4b	2.0 ± 0.1a	2.3 ± 0.3a	3.6 ± 0.4b	6.1 ± 0.2c	3.1 ± 0.2ab
trans-Fertaric acid	3.55 ± 0.25bc	2.30 ± 0.04a	2.73 ± 0.25ab	3.64 ± 0.15c	2.50 ± 0.06ab	2.07 ± 0.03a
trans-Caffeic acid	1.7 ± 0.2a	5.6 ± 0.6b	3.3 ± 0.5a	3.3 ± 0.2a	2.2 ± 0.1a	1.8 ± 0.2a
trans-p-Coumaric acid	2.6 ± 0.1abc	4.3 ± 0.6c	3.3 ± 0.4bc	3.2 ± 0.2bc	2.1 ± 0.2ab	1.4 ± 0.4a
Hydroxycinnamic acids/derivatives	18.6 ± 1.8bc (3.8)	16.2 ± 1.1ab (3.9)	16.5 ± 0.8b (4.6)	19.2 ± 0.8bc (4.8)	20.8 ± 0.8c (7.4)	11.7 ± 0.4a (4.5)
trans-Resveratrol-3-glucoside	9.2 ± 1.0c	3.2 ± 0.4ab	2.1 ± 0.3ab	4.1 ± 0.6b	2.2 ± 0.4ab	1.9 ± 0.1ab
cis-Resveratrol-3-glucoside	4.4 ± 0.7bc	2.9 ± 0.4b	1.2 ± 0.2a	4.8 ± 0.4c	2.3 ± 0.1ab	2.7 ± 0.4ab
Stilbenes	13.6 ± 1.7c (2.7)	6.1 ± 0.5ab (1.5)	3.3 ± 0.5a (0.9)	8.9 ± 1.0b (2.2)	4.5 ± 0.4a (1.6)	4.6 ± 0.4a (1.8)
Tyrosol	24.3 ± 4.0a	24.9 ± 1.7a	22.3 ± 2.1a	30.1 ± 2.1a	24.0 ± 1.7a	20.9 ± 0.8a
Tryptophol	12.6 ± 2.3ab	10.2 ± 1.0ab	6.3 ± 0.5a	9.5 ± 1.3ab	6.5 ± 0.9a	14.4 ± 2.2b
Alcohols/related compounds	36.9 ± 6.2ab (7.4)	35.1 ± 1.2ab (8.4)	28.6 ± 2.5a (7.9)	39.6 ± 3.0b (9.8)	30.5 ± 2.6ab (10.8)	35.3 ± 1.6ab (13.4)
Total non-flavonoids	95.8 ± 8.9ab (19.3)	98.8 ± 1.9ab (23.7)	80.0 ± 4.4a (22.1)	102.2 ± 6.3b (25.4)	79.0 ± 3.4a (28.0)	75.3 ± 2.5a (28.7)

Values are expressed as mean ± standard error (n = 5). Different letters in the same row indicate significant differences between varieties for each compound (Tukey's HSD test, P < 0.05). ND, not detected. <sup>a</sup>Ratio (%) between phenolic groups and total phenolics.

Table 6 (Continued)

Compound	Malbec	Bonarda	Cabernet sauvignon	Merlot	Shiraz	Tempranillo
<b>Flavonoid phenolics</b>						
(+)-Catechin	52.7 ± 6.5bc	58.7 ± 5.4c	52.2 ± 3.7c	44.0 ± 3.5bc	28.5 ± 5.7ab	19.9 ± 0.3a
(-)-Epicatechin	21.8 ± 3.3ab	34.8 ± 3.0c	26.0 ± 1.4bc	31.7 ± 1.9bc	14.9 ± 3.6a	12.3 ± 1.4a
Procyanidin dimer 1	16.0 ± 1.5b	15.3 ± 1.9b	10.7 ± 1.1ab	11.9 ± 1.2ab	7.9 ± 1.5a	6.2 ± 0.6a
Procyanidin dimer 2	49.5 ± 1.1bcd	58.4 ± 3.2cd	62.8 ± 3.2d	44.6 ± 4.1abc	28.5 ± 3.8a	36.0 ± 1.8ab
Procyanidin trimer 1	15.6 ± 2.1b	14.6 ± 0.4b	9.9 ± 1.0ab	30.5 ± 2.6c	3.0 ± 0.3a	8.1 ± 0.4ab
Procyanidin trimer 2	11.3 ± 1.2ab	14.2 ± 1.1ab	11.6 ± 1.2ab	15.2 ± 1.6b	8.1 ± 1.0a	8.5 ± 0.6a
Procyanidin trimer 3	12.9 ± 0.8ab	17.9 ± 1.7b	12.2 ± 1.0a	12.5 ± 0.9a	12.6 ± 1.0ab	10.8 ± 0.2a
Procyanidin trimer 4	14.1 ± 2.8b	7.0 ± 0.7a	6.4 ± 0.6a	ND	6.0 ± 0.6a	4.7 ± 0.3a
<i>Flavanols</i>	193.9 ± 19.1b (39.1 <sup>a</sup> )	220.9 ± 14.1b (52.9)	191.8 ± 10.0b (53.0)	190.4 ± 13.3b (47.2)	109.5 ± 17.0a (38.8)	106.5 ± 1.8a (40.6)
Myricetin-3-glucuronide	12.4 ± 1.9b	9.3 ± 1.1ab	8.0 ± 1.1ab	8.8 ± 1.1ab	5.3 ± 0.7a	6.6 ± 0.1ab
Myricetin-3-galactoside	11.5 ± 1.4a	15.8 ± 0.4b	ND	ND	ND	ND
Myricetin-3-glucoside	15.6 ± 2.7abc	ND	10.8 ± 1.1a	19.9 ± 2.0c	9.8 ± 1.2a	18.7 ± 2.2bc
Quercetin-3-glucuronide	11.9 ± 1.4ab	9.2 ± 0.9ab	6.8 ± 0.7a	12.3 ± 1.8b	9.6 ± 0.9ab	5.9 ± 0.7a
Quercetin-3-glucoside	9.4 ± 1.3a	8.0 ± 1.1a	8.5 ± 1.0a	9.5 ± 1.4a	11.7 ± 1.9a	6.1 ± 1.1a
Quercetin-3-rhamnoside	4.6 ± 0.6abc	4.5 ± 0.4bc	2.8 ± 0.2a	5.6 ± 0.5c	5.5 ± 0.4c	3.2 ± 0.2ab
Isorhamnetin-3-glucoside	7.4 ± 1.2ab	7.6 ± 0.9ab	11.3 ± 1.4b	11.9 ± 1.2b	7.5 ± 1.2ab	5.4 ± 0.9a
Syringetin-3-glucoside	ND	3.1 ± 0.3a	4.1 ± 0.6ab	ND	6.4 ± 0.9b	4.3 ± 0.7ab
Naringenin	10.4 ± 1.4b	5.3 ± 0.9a	5.8 ± 0.4a	8.1 ± 1.0ab	8.0 ± 0.4ab	5.7 ± 0.8a
Kaempferol	29.7 ± 5.6b	19.9 ± 2.3ab	16.2 ± 1.3a	21.7 ± 1.3ab	18.9 ± 1.4ab	24.9 ± 3.0ab
<i>Flavanols</i>	112.9 ± 8.0b (22.8)	82.7 ± 3.5ab (19.8)	74.3 ± 5.0a (20.5)	97.8 ± 6.9b (24.3)	82.7 ± 3.7ab (29.3)	80.8 ± 7.5ab (30.8)
Dihydroquercetin-3-rhamnoside	4.7 ± 0.7a	ND	ND	ND	ND	ND
Dihydrokaempferol-3-glucoside	33.2 ± 1.8c	10.4 ± 0.3b	8.2 ± 0.3a	9.5 ± 0.2ab	8.6 ± 0.2ab	ND
Dihydroquercetin-3-glucoside	55.4 ± 0.5c	4.6 ± 0.3a	7.6 ± 0.9b	3.2 ± 0.3a	2.6 ± 0.1a	ND
<i>Dihydroflavonols</i>	93.3 ± 2.0c (18.8)	15.0 ± 0.5ab (3.6)	15.8 ± 0.9b (4.4)	12.7 ± 0.4a (3.2)	11.2 ± 0.2a (4.0)	ND
<i>Total flavonoids</i>	400.1 ± 29.1d (80.7)	318.6 ± 16.5cd (76.3)	281.9 ± 15.4bc (77.9)	300.9 ± 20.0c (75.0)	203.4 ± 19.7ab (72.1)	187.3 ± 8.0a (71.0)
Total non-anthocyanin phenolics	495.9 ± 37.9c	417.4 ± 17.4bc	361.9 ± 19.2ab	403.1 ± 25.7bc	282.4 ± 22.8a	262.6 ± 6.8a

Values are expressed as mean ± standard error ( $n = 5$ ). Different letters in the same row indicate significant differences between varieties for each compound (Tukey's HSD test,  $P < 0.05$ ). ND, not detected. a Ratio (%) between phenolic groups and total phenolics.

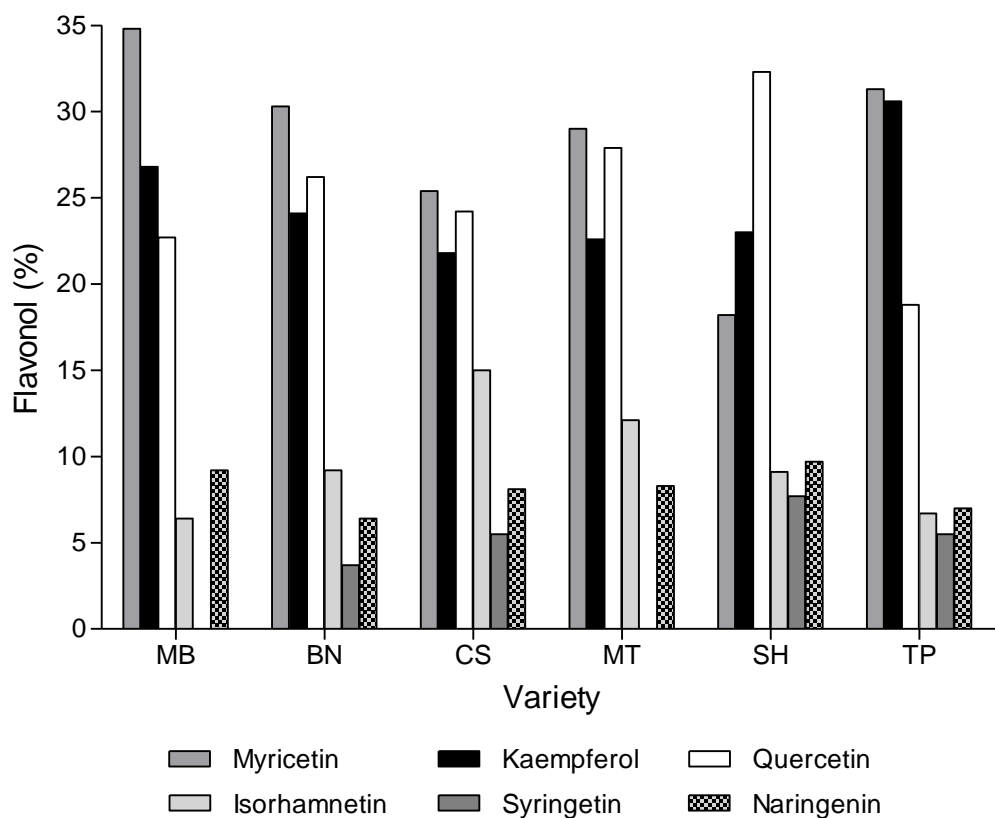
Among non-flavonoids, stilbenes are the most important compounds related to nutraceutical properties. In this work we detected *trans*- and *cis*-resveratrol glucoside, with a greater abundance of the *trans* isomer, in accordance with other authors.<sup>16,42</sup> Of particular interest was the extremely low total concentration observed in CS wines ( $3.3 \text{ mg L}^{-1}$ ) compared with the other varieties, especially MB, which had the highest level ( $13.6 \text{ mg L}^{-1}$ ). These differences may be due not only to the grape variety but also to fungal infections, winemaking procedures and weather conditions.<sup>42</sup>

Flavanols were the major class of phenolic compounds present in the wines studied (mean 45.3%). When comparing the different cultivars, we found that BN, MB, CS and MT had similar values, whilst SH and TP showed much lower contents. In all wines analysed, (+)-catechin levels were higher than those of (-)-epicatechin. These results are in agreement with those found in the literature for the same varieties.<sup>2,16,43,44</sup> Considering the (+)-catechin/(-)-epicatechin ratio, we observed variations among cultivars (2.4 for MB, 1.7 for BN, 2.0 for CS, 1.4 for MT, 1.9 for SH and 1.6 for TP), confirming differences in the activity of enzymes involved in their biosynthesis. From these results it can be assumed that the enzyme leucoanthocyanidin reductase is more active than anthocyanidin reductase in the grapes of all varieties studied. On the other hand, the concentration of dimers and trimers detected was lower than that of monomers in all samples, with the exception of a compound called 'procyanidin dimer 2' that showed high levels (**Table 6**).

Concerning flavonols, their importance in red wines lies in their health properties and their contribution to colour via the phenomenon of copigmentation.<sup>20</sup> The total content in the samples ranged from  $74.3 \text{ mg L}^{-1}$  (CS) to  $112.9 \text{ mg L}^{-1}$  (MB). These elevated values for all varieties could be explained by the climatic conditions of Mendoza, characterised by high sunlight intensity during the ripening period of the grapes, which appears to be associated with an increased accumulation of flavonols.<sup>45</sup> The particularly higher concentration in MB can be related to the greater CC% observed in these wines, given the behaviour of the flavonols as copigments. **Figure 2** shows the distribution pattern of flavonol structures in the red varieties evaluated. The main compound in the samples analysed was myricetin (mean 28.2%), followed by quercetin (mean 25.4%) and kaempferol (mean 24.8%), then, in descending order, isorhamnetin, naringenin and syringetin (means 9.7, 8.1 and 3.7% respectively). Looking at variety, we can see different proportions, in agreement with other authors,<sup>9</sup> indicating possible variations in activity of the enzymes flavonol synthase and/or methyltransferase in the different cultivars. The majority of the flavonols found in the six varieties were glycosides, mainly myricetin-3-glucoside, quercetin-3-glucuronide and quercetin-3-glucoside (**Table 6**), in accordance with Castillo-Muñoz et al.<sup>46</sup> From a biosynthetic point of view, the results suggest differences in substrate selectivity of the glycosyltransferase enzymes that might be involved in the biosynthesis of flavonol-3-glycosides. The 3-glucosides were the main flavonol derivatives synthesised in CS, MT, SH and TP, accounting for 66.3, 60.7, 63.4 and 68.7% of the overall flavonol-3-



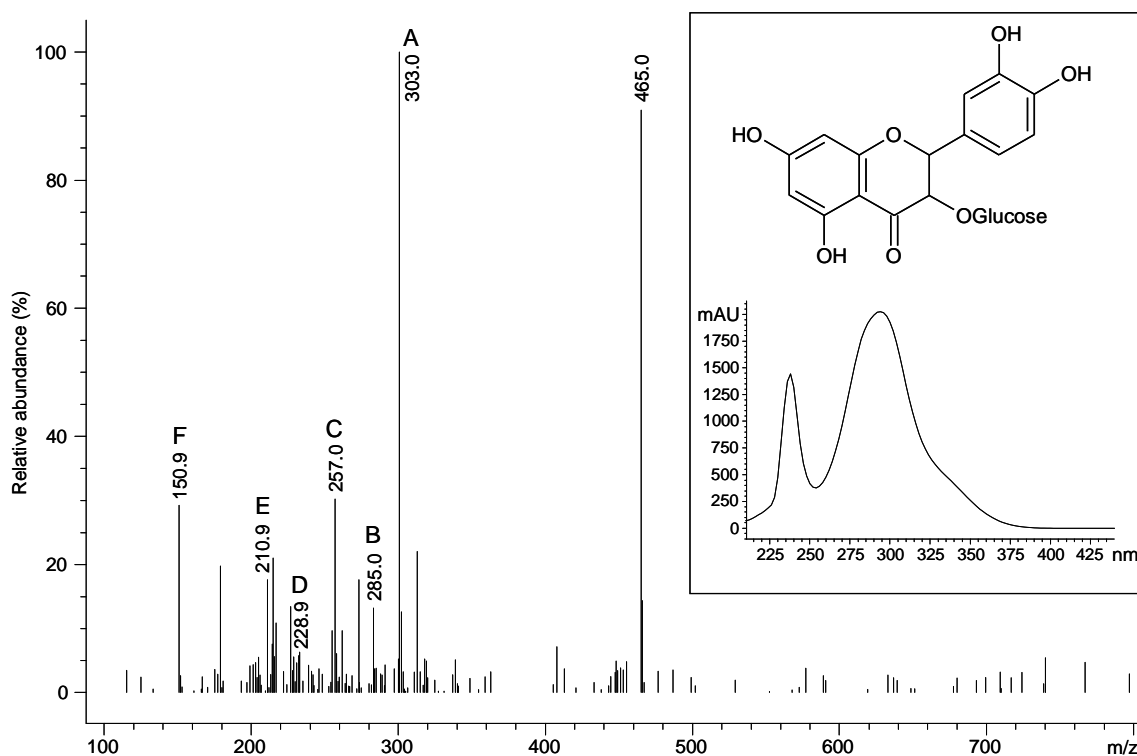
glycosides respectively. In the case of MB and BN the 3-galactosides and 3-glucuronides were the predominant derivatives, with 55.5 and 67.5% of the total respectively for both varieties.



**Figure 2.** Flavonol distribution in Malbec (MB), Bonarda (BN), Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (MT), Shiraz (SH) and Tempranillo (TP) wines.

Rounding out the flavonoids studied, we would like to highlight the presence of dihydroflavonols (flavanonols) in the wines analysed. These compounds play functional roles in plants, but there are few data on them in grapes and wines. In our experiment the flavanonols characterised by HPLC-DAD/ESIMS and UV spectral information were dihydroquercetin-3-glucoside, dihydrokaempferol-3-glucoside and dihydroquercetin-3-rhamnoside (astilbin) (**Table 5**). The first two compounds were detected in MB, BN, CS, MT and SH, while the last one was only detected in MB. We found no dihydroflavonols in TP. According to the literature, astilbin and dihydrokaempferol-3-glucoside have been reported in white and red wines,<sup>47-49</sup> while dihydroquercetin-3-glucoside has only been detected in white grape varieties.<sup>47,50,51</sup> Dihydroquercetin-3-glucoside was the major compound among the low-molecular-weight phenolics in the MB wines studied, representing 11.2% of the total phenolic content, while the other varieties had much lower concentrations of this compound, about 10% of that found in MB. The UV characteristics ( $\lambda_{\max}$  292 nm,  $\lambda_{\text{shoulder}}$  336 nm) and mass spectrum of dihydroquercetin-3-glucoside are shown in **Fig. 3**. The fragment ions obtained in

our study are consistent with the fragmentation mechanism proposed by Abad-García et al.<sup>52</sup> Based on the results, we have observed the same profile behaviour in skin samples from Malbec grape berries compared with those of Cabernet Sauvignon from different zones of Mendoza (data not yet published). In addition, this finding confirms the results obtained in our previous study<sup>2</sup> and could represent a distinctive feature of this variety.



**Figure 3.** Negative ion ESI mass spectrum, chemical structure and UV spectrum of dihydroquercetin-3-glucoside. Fragments ions obtained according to Abad-García et al.<sup>52</sup>: A,  $m/z$  303 (dihydroquercetin); B,  $m/z$  285 ( $303-H_2O$ ); C,  $m/z$  257 ( $303-H_2O-CO$ ); D,  $m/z$  229 ( $303-H_2O-2CO$ ); E,  $m/z$  211 ( $303-2H_2O-2CO$ ); F,  $m/z$  151 ( $303-C_8H_8O_3$ ).

### Classification of red wines according to variety

Since the phenolic compounds in a wine come primarily from grape berries, phenol profiling in a non-aged wine is determined to a great extent by the grape itself. In the present study the differences in phenolic composition observed among the wines analysed indicate that the biosynthesis of phenolic compounds depends largely on the genotypes of the grape cultivar rather than other factors (environmental conditions, viticultural practices and winemaking techniques). In order to classify the samples according to variety, we used the anthocyanin and non-anthocyanin profiles in separate multivariate analyses. The main reason for this choice is the high correlation and dependence between the two groups of variables (seen through an exploratory statistical analysis). Moreover, it is interesting to evaluate the potential for classification of both groups in order to simplify the determinations in future studies.

In multivariate analysis it is first necessary to select appropriate variables for sample classification. To achieve this goal, the elimination of redundant variables is required to avoid overfitting problems, by applying different methodologies of feature selection: forward selection, backward selection, principal component analysis or genetic algorithms.<sup>53</sup> Canonical discriminant analysis (CDA) with backward selection was carried out to provide a visualisation of the data in a reduced-dimension plot, using the information given in **Tables 4 and 6**. The first CDA, using individual anthocyanins as predictor variables, resulted in five discriminant functions (DFs) that accounted jointly for 100% of the total variance, with  $P < 0.05$  and statistical significance at 95% confidence level (**Table 7**). The first function, assigned as DF1, accounted for 56.0% of the total variability, while DF2 accounted for 32.6%. The two functions showed Wilks'  $\lambda$  values of  $3.6 \times 10^{-9}$  and  $1.5 \times 10^{-6}$  respectively, indicating satisfactory discrimination. **Table 7** shows the standardised coefficients for the predictor variables in the two DFs. The variables with higher incidence on DF1 were delphinidin-3-glucoside, malvidin-3-(6''-acetyl)glucoside and vitisin A in a positive way and petunidin-3-glucoside, cyanidin-3-(6''-acetyl)glucoside and malvidin-3-(6''-acetyl)glucoside pyruvate in a negative way, while DF2 was strongly influenced by delphinidin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside pyruvate in a positive way and by delphinidin-3-(6''-acetyl)glucoside, petunidin-3-(6''-acetyl)glucoside, vitisin A and cyanidin-3-(6''-p-coumaroyl)glucoside in a negative way. **Figure 4** depicts the distribution of red wine samples in the plane defined by DF1 and DF2. These two functions allowed the classification of 100% of the wines studied according to grape variety. MB, BN and TP wines showed a negative score on DF1, while SH, CS and MT presented a positive score. Regarding DF2, MB and MT showed a negative score and the other varieties presented a positive score.

In the same framework described for anthocyanins, a second CDA with low-molecular-weight phenolics as predictor variables also resulted in five discriminant functions, statistically significant at 95% confidence level (**Table 8**). DF1 accounted for 93.3% of the total variability, while DF2 accounted for 4.5%. A scatter plot of the wines in the plane defined by these two functions is presented in **Fig. 5**, where there was a perfect prediction (100%) of the samples and a clear differentiation of the six varieties. The main axis of differentiation (DF1) was strongly influenced by phenolic acids (*trans*-caftaric, *trans*- and *cis*-coutaric and gallic acids), tyrosol, *cis* resveratrol-3-glucoside and procyanidin dimer 2. All samples were discriminated with this function, showing a negative score for MB and CS and a positive score for the other varieties. Additionally, DF2 was associated with flavanols ((+)-catechin and procyanidin dimers 1 and 2) as well as with phenolic acids (protocatechuic, fertaric and *trans*-caftaric acids), allowing the classification of MT, CS and SH in a positive way and MB, TP and BN in a negative way.

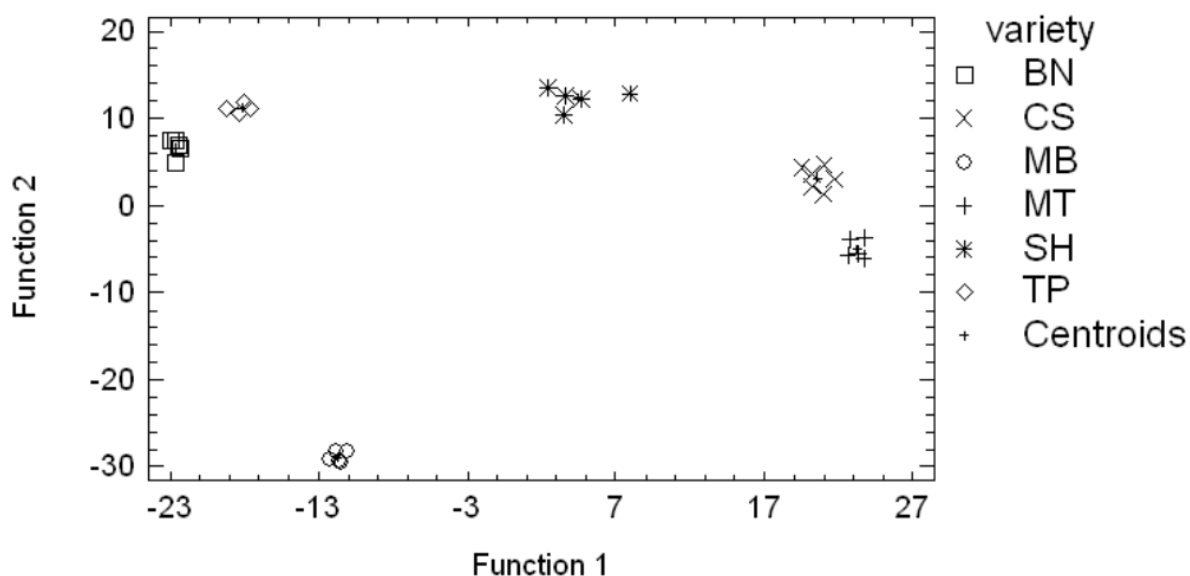
The discriminant analysis revealed that non-acylated delphinidin and petunidin, acetylated anthocyanins and pyranoanthocyanins as well as flavanols and phenolic acids exerted a profound

influence on cultivar-based differentiation. However, the other phenolic groups had a rather minor impact. This performance is in agreement with other studies.<sup>19,36</sup> Given these results, we can select the phenolic variables for categorising future samples, taking into account the complexity, time and cost of the appropriate analytical technique.

**Table 7.** Results of canonical discriminant analysis for red wines using variety as discriminating factor. Standardised coefficients for anthocyanins in discriminant functions

	Discriminant functions				
	1	2	3	4	5
Eigenvalue	409.7 <sup>a</sup>	238.0 <sup>a</sup>	72.8	6.7	4.0
Variance (%)	56.0	32.6	10.0	0.9	0.5
Canonical correlation	0.9988	0.9979	0.9932	0.9324	0.8946
Wilks'λ	3.6 x 10 <sup>-9</sup>	1.5 x 10 <sup>-6</sup>	3.5 x 10 <sup>-4</sup>	2.6 x 10 <sup>-2</sup>	2.0 x 10 <sup>-1</sup>
P Value	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0009
Delphinidin-3-glucoside	22.3	4.8	20.1	3.6	5.1
Cyanidin-3-glucoside	-4.9	-0.5	-5.9	-2.8	-0.4
Petunidin-3-glucoside	-22.1	0.6	-12.3	-2.0	-5.0
Malvidin-3-glucoside	-2.9	-0.3	-1.1	-2.5	0.2
Delphinidin-3-(6"-acetyl)glucoside	3.9	-5.8	2.9	1.4	-0.2
Cyanidin-3-(6"-acetyl)glucoside	-5.6	0.8	7.4	-0.6	0.5
Petunidin-3-(6"-acetyl)glucoside	3.7	-3.4	-0.4	-2.1	1.1
Peonidin-3-(6"-acetyl)glucoside	0.7	1.5	-3.3	-0.7	0.6
Malvidin-3-(6"-acetyl)glucoside	5.5	-0.3	-1.5	0.6	-1.3
Delphinidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside	-1.7	-0.6	1.3	1.1	1.0
Cyanidin-3-(6"-p-coumaroyl)glucoside	1.3	-2.3	0.3	2.0	0.1
Vitisin A	9.0	-3.7	-6.7	-0.4	0.9
Peonidin-3-glucoside pyruvate	-0.8	4.7	1.1	1.4	-1.0
Malvidin-3-(6"-acetyl)-glucoside pyruvate	-7.5	1.8	-4.7	-3.2	-1.4
Malvidin-3-glucoside-ethyl-epicatechin	2.2	-0.6	3.6	3.8	0.2

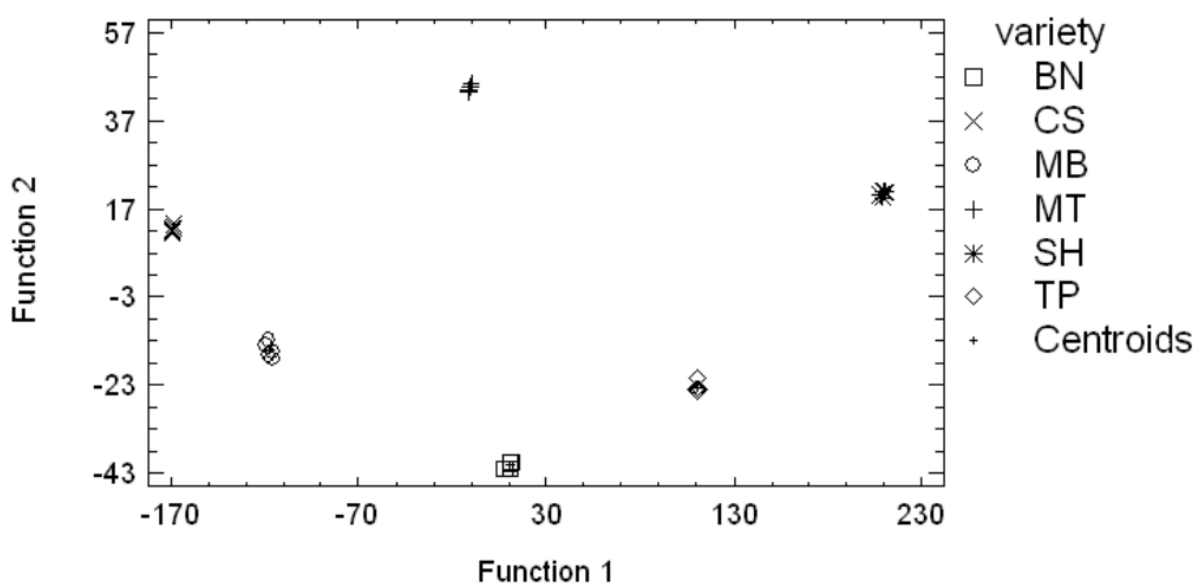
<sup>a</sup> First two discriminant functions using in the analysis.



**Figure 4.** Discriminant plot of anthocyanins for red wines from Mendoza according to variety ( $n = 30$ ). BN, Bonarda; CS, Cabernet Sauvignon; MB, Malbec; MT, Merlot; SH, Shiraz; TP, Tempranillo.

	Discriminant functions				
	1	2	3	4	5
Eigenvalue	20892.8 <sup>a</sup>	1013.3 <sup>a</sup>	419.4	60.3	11.5
Variance (%)	93.3	4.5	1.8	0.3	0.1
Canonical correlation	0.9999	0.9995	0.9988	0.9918	0.9592
Wilks'λ	1.5 x 10 <sup>-13</sup>	3.1 x 10 <sup>-9</sup>	3.1 x 10 <sup>-6</sup>	1.3 x 10 <sup>-3</sup>	8.0 x 10 <sup>-2</sup>
P Value	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001
Gallic acid	22,1	-0,8	-1,3	-2,1	0,6
Protocatechuic acid	-8,3	10,5	2,4	1,1	-1,1
Syringic acid	5,7	-5,9	-3,1	0	0,1
Gentisic acid	2	-4,4	-1,8	1,1	-0,4
Methyl gallate	-8,5	-5,8	-7,2	-1,3	0,4
Ethyl gallate	-11,8	-2,2	3,6	2,6	0,1
<i>trans</i> -Caftaric acid	-32,6	-6,3	-9	-2,4	1,2
<i>cis</i> -Coutaric acid	15,3	-1,6	1,6	-0,3	-0,1
<i>trans</i> -Coutaric acid	32,1	4,4	8,7	2,1	0
<i>trans</i> -Fertaric acid	-9,1	12,2	5,1	-0,6	0,3
<i>trans</i> -Caffeic acid	5,1	3,9	0,2	-0,1	1
Tyrosol	-17,8	3,3	-8,7	-2,6	1
<i>cis</i> -Resveratrol-3-glucoside	16,5	-5,3	-3,2	-1,4	0,5
(+)-Catechin	2,4	-13	-8,7	0,1	-0,5
(-)-Epicatechin	4,6	4,5	6,4	1,2	0,8
Procyanidin dimer 1	4,8	-11,8	-11,3	0,5	-0,5
Procyanidin dimer 2	-22	8,1	10,8	1,1	-0,9
Procyanidin trimer 4	-8,5	5,7	7,3	-0,8	0,3
Quercetin-3-glucoside	5,2	3,8	2,2	-0,6	0,4

<sup>a</sup> First two discriminant functions using in the analysis.



**Figure 5.** Discriminant plot of non-anthocyanin phenolics for red wines from Mendoza according to variety ( $n = 30$ ). BN, Bonarda; CS, Cabernet Sauvignon; MB, Malbec; MT, Merlot; SH, Shiraz; TP, Tempranillo.

## CONCLUSIONS

The phenolic composition of wines from the principal red grape varieties cultivated in Mendoza (Argentina) is reported for the first time. Sixty phenolic compounds, including anthocyanins, phenolic acids/derivatives, stilbenes, flavanols, flavonols and dihydroflavonols, were identified and quantified using HPLC-DAD/ESI-MS. Some flavonoids detected in our study represent a significant finding from the chemotaxonomic point of view, especially for Malbec variety. This is the case of dihydroflavonols, because, as far as we know, only three (dihydroquercetin-3-rhamnoside, dihydromyricetin-3-rhamnoside and dihydrokaempferol-3-glucoside) have been described so far in *Vitis vinifera* L. red varieties. The compound dihydroquercetin-3-glucoside, not reported before in wines from the six red varieties studied and tentatively identified by ESI-MS in our research, needs to be isolated and finally characterised by molecular spectrometric techniques (MS/MS, NMR, IR).

The classification of red wine samples using chemical data and multivariate methods has been achieved successfully. It must be emphasised that, in spite of the small number of samples, both discriminant analyses yielded an unambiguous classification of samples according to grape variety without overlapping, which clearly demonstrates the high potential of phenol-based analysis for red wine differentiation. This outcome could be regarded as an additional criterion for studies pertaining to red wine quality control and authenticity.

The results are indicative of the polyphenolic richness of Malbec grapes compared with the other red varieties from Mendoza and their potential to produce quality wines. Future studies on wines from different geographical origins and obtained by different winemaking practices should be carried out to confirm these observations and to obtain products with identity.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to the Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), projects AETA282831 and PTRMZASJ510071, for the financial support of this work and to all ten wineries for providing the samples for the study. Special thanks are due to Mariana de la Cruz and Eugenia Turaglio for their technical assistance.

## LITERATURE CITED

- 1 Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV), Argentinean Government, Registro de viñedos y superficie. [Online]. Available: [http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/REGISTRO\\_VINEDOS2009\\_JULIO.pdf](http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/REGISTRO_VINEDOS2009_JULIO.pdf) [13 May 2011].
- 2 Fanzone M, Peña-Neira A, Jofré V, Assof M and Zamora F, Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). *J Agric Food Chem* **58**:2388-2397 (2010).

- 3 Garde-Cerdán T, Lorenzo C, Lara JF, Pardo F, Ancín-Azpilicueta C and Salinas MR, Study of the evolution of nitrogen compounds during grape ripening. Application to differentiate grape varieties and cultivated systems. *J Agric Food Chem* **57**:2410-2419 (2009).
- 4 Hernández-Orte P, Cacho JF and Ferreira V, Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *J Agric Food Chem* **50**:2891-2899 (2002).
- 5 Siret R, Boursiquot JM, Merle MH, Cabanis JC and This P, Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers. *J Agric Food Chem* **48**:5035-5040 (2000).
- 6 Monagas M, Núñez V, Bartolomé B and Gómez-Cordovés C, Anthocyanin-derived pigments in Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon wines produced in Spain. *Am J Enol Vitic* **54**:163-169 (2003).
- 7 Núñez V, Monagas M, Gómez-Cordovés MC and Bartolomé B, *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biol Technol* **31**:69-79 (2004).
- 8 Otteneder H, Marx R and Zimmer M, Analysis of the anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Portugieser wines provides an objective assessment of the grape varieties. *Aust J Grape Wine Res* **10**:3-7 (2004).
- 9 Mattivi F, Guzzon R, Vrhovsek U, Stefanini M and Velasco R, Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *J Agric Food Chem* **54**:7692-7702 (2006).
- 10 Castillo-Muñoz N, Gómez-Alonso S, García-Romero E and Hermosín-Gutiérrez I, Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J Agric Food Chem* **55**:992-1002 (2007).
- 11 Renaud S and de Lorgeril M, Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**:1523-1526 (1992).
- 12 Soto Vázquez E, Río Segade S and Orriols Fernández I, Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. *Eur Food Res Technol* **231**:789-802 (2010).
- 13 Kontoudakis N, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, De Freitas V and Zamora F, Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chem* **124**:767-774 (2011).
- 14 Boss PK, Davies C and Robinson SP, Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol* **111**:1059-1066 (1996).
- 15 Zhao J, Pang Y and Dixon RA, The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant Physiol* **153**:437-443 (2010).

- 16 Monagas M, Suarez R, Gómez-Cordovés C and Bartolomé B, Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *Am J Enol Vitic* **56**:139-147 (2005).
- 17 Boselli E, Boulton RB, Thorngate JH and Frega NG, Chemical and sensory characterization of DOC red wines from Marche (Italy) related to vintage and grape cultivars. *J Agric Food Chem* **52**:3843-3854 (2004).
- 18 de Villiers A, Majek P, Lynen F, Crouch A, Lauer H and Sandra P, Classification of South Africa red and white wines according to grape variety based on the non-coloured phenolic content. *Eur Food Res Technol* **221**:520-528 (2005).
- 19 Makris DP, Kallithraka S and Mamalos A, Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal phenolic constituents. *Talanta* **70**:1143-1152 (2006).
- 20 Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A and Dubourdieu D, Phenolic compounds, in *Handbook of enology, Vol 2: The chemistry of wine stabilization and treatments*, ed. by Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A and Dubourdieu D. Wiley, Chichester, pp. 129-186 (2000).
- 21 Glories Y, La couleur des vins rouges. 1ère partie. Les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Conn Vigne Vin* **18**:195-217 (1984).
- 22 Porter LJ, Hritsch LN and Chan BG, The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* **25**:223-230 (1986).
- 23 Glories Y, La couleur des vins rouges. 2ème partie. Mesure, origine et interprétation. *Conn Vigne Vin* **18**:253-271 (1984).
- 24 Ayala F, Echávarri JF and Negueruela AI, A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rose wines. *Am J Enol Vitic* **48**:357-363 (1997).
- 25 Ayala F, Echávarri JF and Negueruela AI, Método simplificado para el color del vino. [Online]. Available: [http://www.unizar.es/negueruela/html/grupo\\_color.htm](http://www.unizar.es/negueruela/html/grupo_color.htm) [13 May 2011].
- 26 Pérez-Magariño S and González-Sanjosé ML, Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. *Food Chem* **81**:301-306 (2003).
- 27 Hermosín Gutiérrez I, Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. *J Agric Food Chem* **51**:4079-4083 (2003).
- 28 Vivas N, Glories Y, Lagune L, Saucier C and Augustin M, Estimation du degré de polymérisation des procyanidins du raisin et du vin par la méthode au p-diméthylaminocinnamaldéhyde. *J Int Sci Vigne Vin* **28**:319-336 (1994).
- 29 Zoecklein B, Fugelsang K, Gump B and Nury F, *Análisis y Producción de Vino*. Acribia, Zaragoza, Spain, 634 pp. (2001).



- 30 Monagas M, Gómez-Cordovés C and Bartolomé B, Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chem* **95**:405-412 (2006).
- 31 Ginjom IR, D'Arcy BR, Caffin NA and Gidley MJ, Phenolic contents and antioxidant activities of major Australian red wines throughout the winemaking process. *J Agric Food Chem* **58**:10133-10142 (2010).
- 32 González-Neves G, Charamelo D, Balado J, Barreiro L, Bochicchio R, Gatto G, Gil G, Tessore A, Carbonneau A and Moutounet M, Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Anal Chim Acta* **513**:191-196 (2004).
- 33 Rivas-Gonzalo JC, Gutiérrez Y, Hebrero E and Santos-Buelga C, Comparisons of methods for the determination of anthocyanins in red wines. *Am J Enol Vitic* **43**:210-214 (1992).
- 34 Hermosín Gutiérrez I, Sánchez-Palomo Lorenzo E and Vicario Espinosa A, Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chem* **92**:269-283 (2005).
- 35 Peña-Neira A, Cáceres A and Pastenes C, Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of clusters thinning and vineyard yield. *Food Sci Technol Int* **13**:153-158 (2007).
- 36 González-Neves G, Franco J, Barreiro L, Gil G, Moutounet M and Carbonneau A, Varietal differentiation of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and wines according to their anthocyanic composition. *Eur Food Res Technol* **225**:111-117 (2007).
- 37 Ristic R, Bindon K, Francis LI, Herderich MJ and Iland PG, Flavonoids and C13-norisoprenoids in *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz: relationships between grape and wine composition, wine colour and wine sensory properties. *Aust J Grape Wine Res* **16**:369-388 (2010).
- 38 García-Beneytez E, Cabello F and Revilla E, Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *J Agric Food Chem* **51**:5622-5629 (2003).
- 39 Revilla E, García-Beneytez E and Cabello F, Anthocyanin fingerprint of clones of Tempranillo grapes and wines made with them. *Aust J Grape Wine Res* **15**:70-78 (2009).
- 40 Roggero J, Coen S and Ragonnet B, High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. *Am J Enol Vitic* **37**:77-83 (1986).
- 41 García-Falcón MS, Pérez-Lamela C, Martínez-Carballo E and Simal-Gándara J, Determination of phenolic compounds in wines: influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chem* **105**:248-259 (2007).
- 42 Vitrac X, Monti JP, Vercauteren J, Deffieux G and Mérillon JM, Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal Chim Acta* **458**:103-110 (2002).

- 43 Goldberg D, Karumanchiri A, Tsang E and Soleas G, Catechin and epicatechin concentrations of red wine: regional and cultivar-related differences. *Am J Enol Vitic* **49**:23-34 (1998).
- 44 Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B, Laureano O and Da Silva JR, Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J Agric Food Chem* **51**:6475-6481 (2003).
- 45 Makris DP, Kallithraka S and Kefalas P, Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *J Food Compos Anal* **19**:396-404 (2006).
- 46 Castillo-Muñoz N, Gómez-Alonso S, García-Romero E, Gómez MV, Velders AH and Hermosín-Gutiérrez I, Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* cv. Petit Verdot red wine grapes. *J Agric Food Chem* **57**:209-219 (2009).
- 47 Baderschneider B and Winterhalter P, Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *J Agric Food Chem* **49**:2788-2798 (2001).
- 48 Landrault N, Larronde F, Delaunay JC, Castagnino C, Vercauteren J, Merillon JM, Gasc F, Cros G and Teissedre PL, Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *J Agric Food Chem* **50**:2046-2052 (2002).
- 49 Jeffery DW, Parker M and Smith PA, Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. *Aust J Grape Wine Res* **14**:153-161 (2008).
- 50 Trousdale EK and Singleton VL, Astilbin and engeletin in grapes and wine. *Phytochemistry* **22**:619-620 (1983).
- 51 Masa A, Vilanova M and Pomar F, Varietal differences among the flavonoid profiles of white grape cultivars studied by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1164**:291-297 (2007).
- 52 Abad-García B, Garmón-Lobato S, Berrueta LA, Gallo B and Vicente F, A fragmentation study of dihydroquercetin using triple quadrupole mass spectrometry and its application for identification of dihydroflavonols in Citrus juices. *Rapid Commun Mass Spectrom* **23**:2785-2792 (2009).
- 53 Kruzlicova D, Mocak J, Balla B, Petka J, Farkova M and Havel J, Classification of Slovak white wines using artificial neural networks and discriminant techniques. *Food Chem* **112**:1046-1052 (2009).

# Evaluación de la dihidroquercetina y otros fenoles de importancia en vinos de la variedad Malbec como compuestos de copigmentación de malvidina-3-glucósido



Pablo Picasso, *La botella de vino* (1925).

## 1. Consideraciones generales

El color constituye uno de los parámetros de calidad más importantes del vino tinto determinando significativamente su apreciación sensorial. En general, es la primera característica percibida, y por lo tanto, desempeña un papel clave en el proceso de toma de decisiones de los consumidores, con preferencias usualmente tendientes hacia coloraciones intensas. Los compuestos fenólicos, que participan del color del vino, se extraen de los hollejos y semillas de las uvas y difunden al mosto/vino durante el proceso de vinificación (González-Manzano et al., 2004; Boido et al., 2011). Mientras que las antocianinas son los pigmentos directamente responsables del color de vino tinto, otros flavonoides y no-flavonoides participan en su estabilización a través de reacciones de copigmentación y/o condensación (Monagas y Bartolomé, 2009).

La copigmentación es un fenómeno de solución que involucra la asociación entre formas monoméricas antociánicas coloreadas y espacialmente planares (forma flavilium y base quinoidal) y otros compuestos orgánicos no coloreados (copigmentos), determinando complejos  $\pi$ - $\pi$  de apilamiento vertical, mantenidos por enlaces lábiles y de baja energía (fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas) que se estabilizan por disposición de las moléculas de azúcar en la parte externa del complejo, entre las cuales se establecen uniones por puentes de hidrógeno (Boulton, 2001). Se asume que este arreglo tipo “*sándwich*” es el más favorable para mantener las moléculas de agua alejadas del cromóforo del catión flavilium, evitando la hidratación nucleofílica y la formación de bases carbinol incoloras al hacer que el equilibrio se desplace hacia las formas coloreadas (Brouillard et al., 2003; Gómez-Míguez et al., 2006). Adicionalmente a esta interacción intermolecular, también se ha descrito el mecanismo de asociación covalente del cromóforo antociánico con los residuos aromáticos de su propia molécula (interacción intramolecular), la autoasociación de antocianinas y la copigmentación mediada por cationes metálicos (Asen et al., 1972; Dangles et al., 1993; Fernández et al., 2006). Como resultado de este fenómeno, las soluciones copigmentadas habitualmente muestran un desplazamiento de la longitud de onda máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) en el espectro visible hacia longitudes de onda mayores (efecto batocrómico) o menores (efecto hipsocrómico), acompañado de un incremento de absorbancia (efecto hiperocrómico). La amplitud de estos efectos depende de varios factores tales como el pH, la temperatura, el contenido de etanol, la naturaleza del cromóforo y del copigmento, y la relación molar pigmento/copigmento (Boulton, 2001). Entre los componentes del vino tinto, los flavonoides y los ácidos hidroxicinámicos constituyen los principales copigmentos. En ensayos realizados en soluciones símil-vino, los flavonoles mostraron un mayor potencial de copigmentación, seguido por los ácidos hidroxicinámicos y finalmente por los flavanoles (Brouillard et al., 1991; Gómez-Míguez et al., 2006). La capacidad limitada de estos últimos para interactuar con las antocianinas se atribuye a la ausencia

de estructura planar, observándose una eficiencia diferencial de acuerdo al origen y conformación molecular del flavanol involucrado (Berké y De Freitas, 2005; González-Manzano et al., 2009).

La copigmentación es un proceso de gran interés enológico, ya que resulta vital para la comprensión de la relación entre la composición fenólica de la uva y el color de los vinos tintos jóvenes (Boulton, 2001). Asimismo, diversos autores han señalado su posible participación en la evolución del color durante la maduración y crianza del vino, al constituir la primera etapa en la formación de pigmentos más estables (Brouillard y Dangles, 1994), habiéndose demostrado que vinos tintos jóvenes con altos porcentajes de color copigmentado dan lugar a vinos con altos porcentajes de color polimérico (Lorenzo et al., 2005; Cliff et al., 2007).

Con el fin de interpretar la influencia de diferentes factores en el color del vino y su evolución durante la conservación, se han llevado a cabo numerosos estudios en soluciones modelo empleando como pigmento malvidina-3-glucósido (por ser la antocianina mayoritaria en vinos tintos) y diversos copigmentos (ácido cafeico, ácido ferúlico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidinas, quercetina, etc.). No obstante, las concentraciones de pigmento y copigmentos y las relaciones molares probadas han sido mayores que las encontradas realmente en los vinos (Dimitric-Markovic et al., 2000; Eiro y Heinonen, 2002; Berké y De Freitas, 2005; Lambert et al., 2011).

A partir de los estudios realizados en el marco del presente proyecto de Tesis Doctoral, tendientes a caracterizar la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec, se observó la presencia de dihidroflavonoles como compuestos importantes entre los fenoles de bajo peso molecular identificados. Este grupo de compuestos ha sido reportado especialmente en variedades blancas (Baderschneider y Winterhalter, 2001; Masa et al., 2007), y se los relaciona con propiedades de defensa de la planta ante el ataque de hongos y con efectos quimiopreventivos sobre la salud humana (Landrault et al., 2002). Los altos niveles encontrados en Malbec podrían indicar un rasgo taxonómico distintivo de esta variedad. En todas las situaciones evaluadas, la dihidroquercetina-3-glucósido fue el compuesto mayoritario con concentraciones superiores (> 40 mg/L) al resto de los flavonoides y no-flavonoides identificados en los vinos (Fanzone et al., 2010 y 2012). Debido a los resultados obtenidos y a la ausencia de información sobre su comportamiento a nivel enológico/tecnológico, resulta de interés evaluar su potencial para la copigmentación.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de interacción entre dihidroquercetina y malvidina-3-glucósido en comparación con otros copigmentos y conocer sus efectos sobre los parámetros de color, en soluciones modelo con relaciones molares antocianina/copigmento similares a las existentes en los vinos.

## 2. Condiciones experimentales

En este estudio se evaluaron 4 copigmentos correspondientes a ácido cafeico, (+)-catequina, quercetina y dihidroquercetina, junto con el pigmento (cloruro de malvidina-3-glucósido), para lo cual se emplearon los estándares comerciales descritos en el Anexo I.

Para preparar las distintas soluciones de trabajo (soluciones modelo) se empleó un tampón constituido por biftalato de potasio (0,1 M), ácido clorhídrico (0,1 M) y etanol (12%). La fuerza iónica del mismo fue ajustada a 0,2 M por adición de cloruro de sodio, y el pH fue de 3,7. Se prepararon soluciones patrones individuales de malvidina-3-glucósido (0,5 mM), ácido cafeico (10,9 mM), (+)-catequina (9,5 mM), quercetina (6,6 mM) y dihidroquercetina (5,9 mM). A partir de estos patrones concentrados, se obtuvieron soluciones diluidas de cada compuesto. La solución de referencia presentó una concentración final 0,05 mM de malvidina-3-glucósido. Las soluciones restantes, correspondientes a cada copigmento, presentaron la misma concentración de antocianina (0,05 mM) y de copigmento empleando una relación molar pigmento/copigmento (1:1). Paralelamente se evaluaron relaciones molares antocianina/copigmento 1:10, 1:25 y 1:50 para ácido cafeico y (+)-catequina, mientras que para dihidroquercetina y quercetina sólo la relación 1:1, debido a su limitada solubilidad en el tampón. Todas las soluciones fueron preparadas por triplicado, transferidas a viales ámbar y almacenadas en la oscuridad a 25 °C hasta el momento de análisis.

La magnitud de copigmentación de las soluciones estudiadas fue estimada por comparación de la absorbancia medida a 520 nm de la solución de referencia con malvidina-3-glucósido ( $A_0$ ) y la absorbancia a 520 nm de las soluciones con los distintos copigmentos ( $A$ ). Estas mediciones fueron realizadas a diferentes tiempos después de preparadas las reacciones de copigmentación: 3 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 semanas. La magnitud de interacción fue expresada en porcentaje según la siguiente ecuación (Boulton, 1996):

$$[(A - A_0) / A_0] \times 100 \quad (1)$$

Con respecto a las determinaciones colorimétricas, se realizaron las mediciones espectrofotométricas en todo el rango visible (entre 380 y 770 nm) con un  $\Delta\lambda = 1$  nm, empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las coordenadas CIELAB, claridad ( $L^*$ ), saturación ( $C^*$ ), tonalidad/Hue ( $h$ ), intensidad rojo-verde ( $a^*$ ) y amarillo-azul ( $b^*$ ), y la diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) fueron determinadas empleando la metodología descrita en el Anexo I.

El análisis cromatográfico de las soluciones modelo se llevó a cabo empleando un sistema constituido por un cromatógrafo en fase líquida de alta resolución Perkin-Elmer Series 200 equipado con un detector de arreglo de diodos, una bomba cuaternaria y un automuestreador (HPLC-DAD; PerkinElmer, Shelton, CT, Estados Unidos). La separación de compuestos fue realizada en fase reversa mediante una columna  $C_{18}$  Chromolith Performance (100 mm x 4,6 mm D.I., 2  $\mu$ m; Merck,

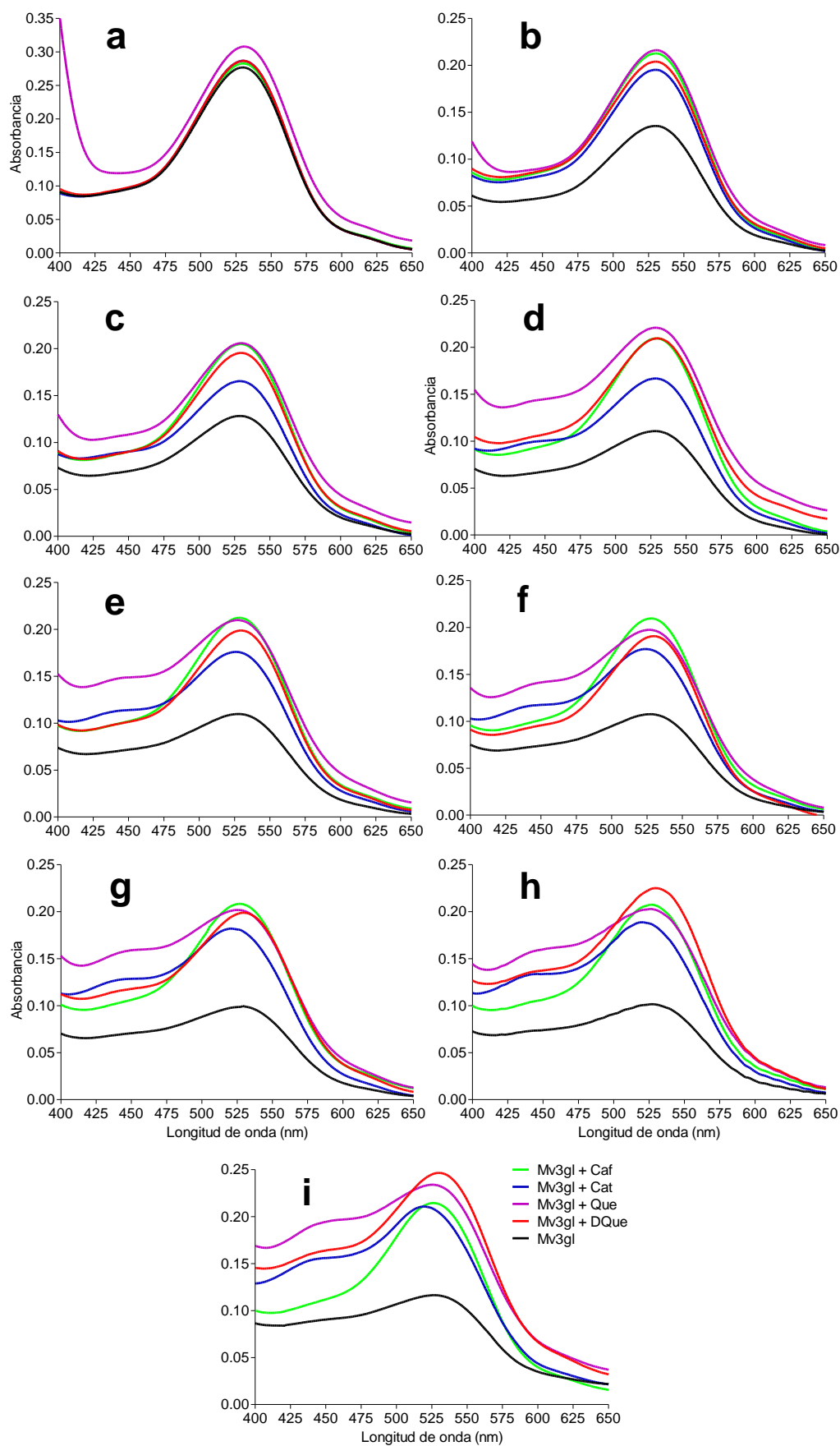
Darmstadt, Alemania) provista de un cartucho guarda columna Chromolith (10 mm x 4,6 mm), a 25 °C. Se empleó un gradiente de dos solventes: A (agua/ácido fórmico, 90:10, v/v) y B (acetonitrilo), aplicados con un flujo de 1,1 mL/min desde 0 a 22 min y de 1,5 mL/min desde 22 a 35 min, según el siguiente programa: 96-85% A y 4-15% B desde 0 a 12 min, 85% A y 15% B desde 12 a 22 min, 85-70% A y 15-30% B desde 22 a 35 min, finalizando con un lavado con metanol durante 5 minutos y posterior restablecimiento de condiciones iniciales hasta equilibrar el sistema. Se inyectaron 100 µL de las distintas soluciones previamente filtradas a través de membrana de 0,45 µm, a las 3 horas, y a las 4 y 8 semanas de iniciado el estudio. La detección fue realizada en todo el espectro UV-Visible comprendido entre 210 y 600 nm, utilizando 280 y 520 nm como longitudes de onda de preferencia.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Efecto de copigmentación

El estudio de copigmentación intermolecular de malvidina-3-glucósido a pH 3,7 se llevó a cabo empleando una concentración de pigmento 0,05 mM (25 mg/L) para evitar el posible efecto de autoasociación (Lambert et al., 2011). Asimismo, se evaluaron relaciones molares pigmento/copigmento similares a las encontradas en vinos tintos. La **Figura 1** muestra los incrementos de absorbancia en el rango visible producidos por la adición de los distintos copigmentos a la solución de referencia en relación molar pigmento/copigmento (1:1), durante el almacenamiento a 25 °C.

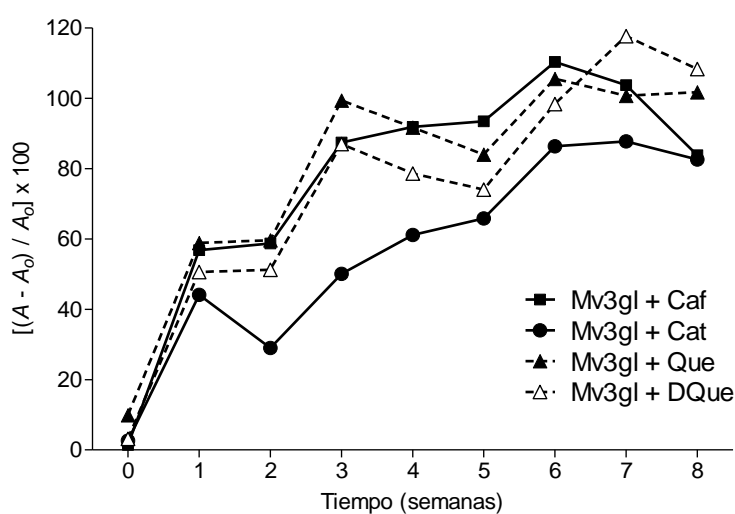
Según diversos autores la magnitud de copigmentación depende de la naturaleza del copigmento y puede ser medida por la relación  $(A - A_0)/A_0$  propuesta por Boulton (1996). Tal como se indica en la **Figura 2**, se observó un incremento diferencial de esta relación en todas las soluciones evaluadas (pigmento/copigmento, 1:1) dependiendo del copigmento involucrado y del tiempo de reacción. La (+)-catequina mostró la menor efectividad, mientras que el ácido cafeico y la quercetina presentaron un mejor comportamiento durante todo el proceso. Estos resultados coinciden con otros estudios que indican el gran potencial de copigmentación de los flavonoles y ácidos hidroxicinámicos frente a los monómeros de flavanol (Brouillard et al., 1991; Baranac et al., 1996; Mirabel et al., 1999; Darias-Martín et al., 2001; Gómez-Míguez et al., 2006; Lambert et al., 2011). Por último, cabe destacar la gran capacidad de interacción de la dihidroquercetina, constituyendo el copigmento más efectivo del estudio.



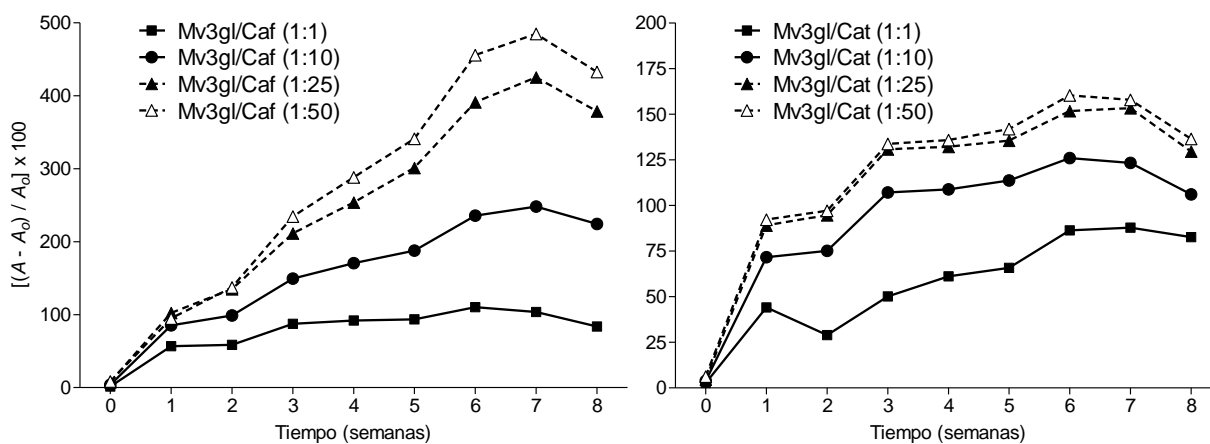
**Figura 1.** Espectro de absorbancia de malvidina-3-glucósido (Mv3gl; 0,05 mM) en presencia y ausencia de ácido cafeico (Caf), (+)-catequina (Cat), quercetina (Que) y dihidroquercetina (DQue) en relación molar pigmento/copigmento (1:1), durante el almacenamiento después de 3 horas (a), 1 (b), 2 (c), 3 (d), 4 (e), 5 (f), 6 (g), 7 (h) y 8 (i) semanas a 25 °C.



Al analizar la evolución de este fenómeno durante el almacenamiento, todas las soluciones modelo (pigmento/copigmento, 1:1) produjeron un desplazamiento hipercrómico progresivo hasta la sexta semana. A partir de este momento, sólo la solución con dihidroquercetina siguió la misma tendencia hacia el final del estudio, en tanto las restantes mostraron una leve disminución en la magnitud de copigmentación. Un comportamiento similar fue observado al evaluar distintas relaciones molares pigmento/copigmento (**Figura 3**), sugiriendo que la copigmentación no sucede inmediatamente, sino en forma progresiva, tal como se describe en estudios previos (Gómez-Míguez et al., 2006; González-Manzano et al., 2009) señalando además que el proceso es controlado principalmente desde el punto de vista termodinámico más que cinético.



**Figura 2.** Cambios en la relación  $[(A - A_0)/A_0] \times 100$  en las soluciones modelo con malvidina-3-glucósido (Mv3gl) y los diferentes copigmentos (1:1), durante el almacenamiento a 25 °C. Acido cafeico (Caf), (+)-catequina (Cat), quercetina (Que), dihidroquercetina (DQue).



**Figura 3.** Cambios en la relación  $[(A - A_0)/A_0] \times 100$  en soluciones modelo con distintas relaciones molares Mv3gl/copigmento, durante el almacenamiento a 25 °C. Acido cafeico (Caf), (+)-catequina (Cat).

La **Tabla 1**, muestra la longitud de onda en el pico de máxima absorción de las soluciones probadas (pigmento/copigmento, 1:1). La solución de referencia presentó un pico de máxima absorción a 530 nm, que se modificó a 527 nm después de 8 semanas. En ensayos previos conducidos en soluciones modelo con distintos copigmentos (Mirabel et al., 1999; Berké y De Freitas, 2005 y 2007), la copigmentación produjo un efecto batocrómico sobre la máxima absorbancia. Sin embargo, en el presente estudio no se observó un efecto significativo de los copigmentos sobre la longitud de onda, con excepción de la solución con dihidroquercetina que mostró un leve desplazamiento batocrómico de  $\lambda_{\text{máx}}$  respecto a la solución de referencia durante todo el proceso. Por el contrario, el resto de los copigmentos no modificaron este parámetro hasta la quinta semana a partir de la cual indujeron un efecto hipsocrómico.

<b>Tabla 1.</b> Longitud de onda en el pico de máxima absorción de la solución de referencia con malvidina-3-glucósido y con los distintos copigmentos (1:1), durante el almacenamiento a 25°C.										
<b>Tiempo (semanas)</b>	<b>Copigmento</b>									
	<b>Mv3gl</b>		<b>Caf</b>		<b>Cat</b>		<b>Que</b>		<b>Dque</b>	
	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	A	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	A	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	A	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	A	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	A
<b>0</b>	530	0,2768	530	0,2828	530	0,2868	531	0,3081	530	0,2866
<b>1</b>	530	0,1354	530	0,2127	530	0,1953	531	0,2162	530	0,2040
<b>2</b>	529	0,1283	530	0,2049	529	0,1655	529	0,2059	530	0,1955
<b>3</b>	529	0,1107	529	0,2096	529	0,1668	529	0,2209	530	0,2096
<b>4</b>	528	0,1098	529	0,2123	526	0,1760	528	0,2099	530	0,1988
<b>5</b>	528	0,1076	528	0,2097	525	0,1771	527	0,1975	530	0,1908
<b>6</b>	529	0,0996	527	0,2084	521	0,1820	526	0,2018	530	0,1989
<b>7</b>	528	0,1016	526	0,2075	520	0,1887	526	0,2029	530	0,2251
<b>8</b>	527	0,1164	526	0,2146	519	0,2108	526	0,2341	530	0,2466

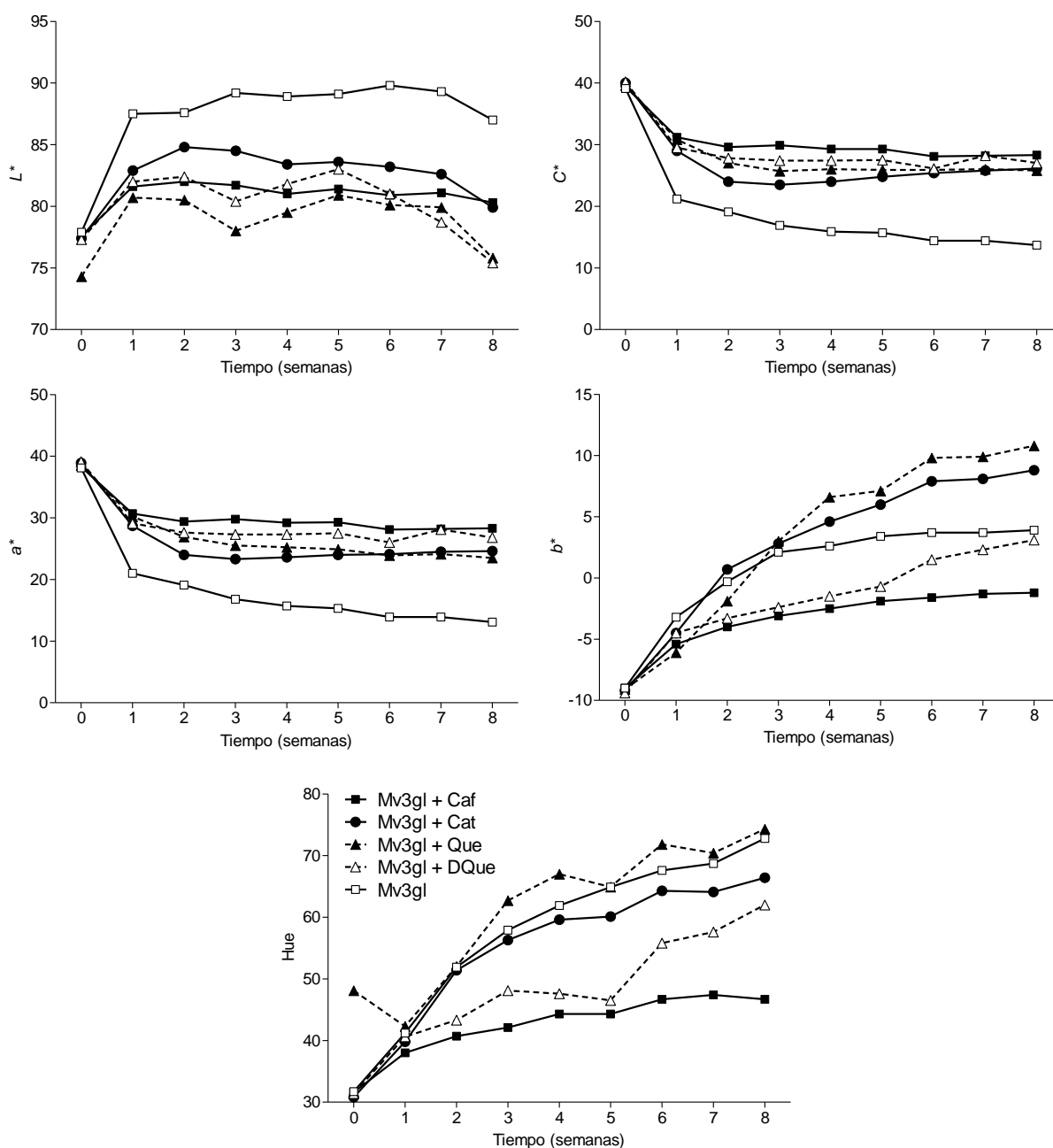
Mv3gl (malvidina-3-glucósido), Caf (ácido cafeico), Cat (catequina), Que (quercetina), DQue (dihidroquercetina).

### 3.2. Influencia de la copigmentación en los parámetros de color

Con el objetivo de evaluar el efecto del fenómeno de copigmentación sobre la expresión del color de la malvidina-3-glucósido, se analizaron los parámetros colorimétricos descritos por las coordenadas CIELAB, de forma tal de visualizar las modificaciones en todo el espectro visible. Todas las determinaciones se realizaron en las soluciones modelo con relación molar pigmento/copigmento (1:1), para predecir la posible influencia de los cofactores en niveles similares a los presentes en vinos tintos. La **Figura 4** muestra la evolución de los parámetros de color en todas las soluciones durante el período de almacenamiento. Se observó que la adición de copigmentos a la solución de referencia indujo una disminución en la claridad ( $L^*$ ) y un aumento en los valores de saturación ( $C^*$ ), indicando una mayor intensidad de color de las soluciones copigmentadas especialmente con quercetina y dihidroquercetina. Este efecto hipercrómico demuestra la capacidad de los copigmentos

de mantener el color en soluciones con presencia de antocianinas, tal como se establece en otros estudios (Gómez-Míguez et al., 2006; González-Manzano et al., 2009).

Al analizar los parámetros  $h$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , se observó la tendencia del ácido cafeico y la dihidroquercetina a modificar el color de la solución hacia tonalidades rojo-violáceas, mientras que el resto de los copigmentos mostraron un desplazamiento hacia tonalidades rojo-anaranjadas. La magnitud de estos cambios, al igual que el grado de copigmentación (**Figura 2**), fue mayor con el tiempo de almacenamiento.



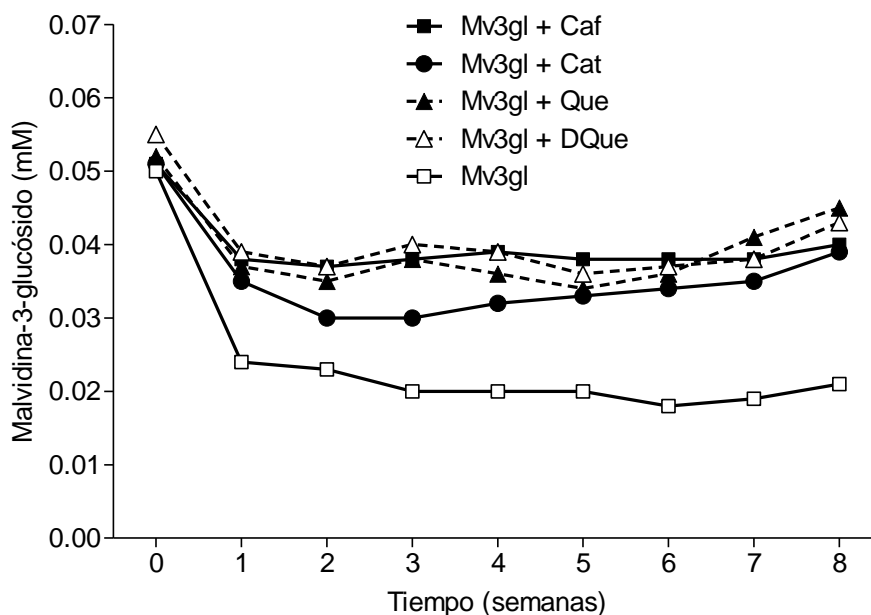
**Figura 4.** Evolución de los parámetros de color de la solución de referencia con malvidina-3-glucósido (Mv3gl) y de las soluciones con los diferentes copigmentos (1:1), durante el almacenamiento a 25 °C. Acido cafeico (Caf), (+)-catequina (Cat), quercetina (Que), dihidroquercetina (DQue).

Con el fin de establecer si los cambios generados en los parámetros colorimétricos son visualmente relevantes, se determinaron las diferencias de color ( $\Delta E^*$ ) entre la solución de referencia y las soluciones copigmentadas (**Tabla 2**). Se ha indicado que el ojo humano es capaz de distinguir el color de dos vinos a través de una copa de vidrio cuando el  $\Delta E^*$  es mayor a 5 unidades (Pérez-Magariño y González-Sanjosé, 2003). Basándose en esta generalización, los resultados del presente estudio indican que las diferencias de color entre las soluciones, para todos los copigmentos evaluados, son detectadas recién después de la primera semana de reacción, siendo la (+)-catequina el copigmento que generó las menores diferencias de color.

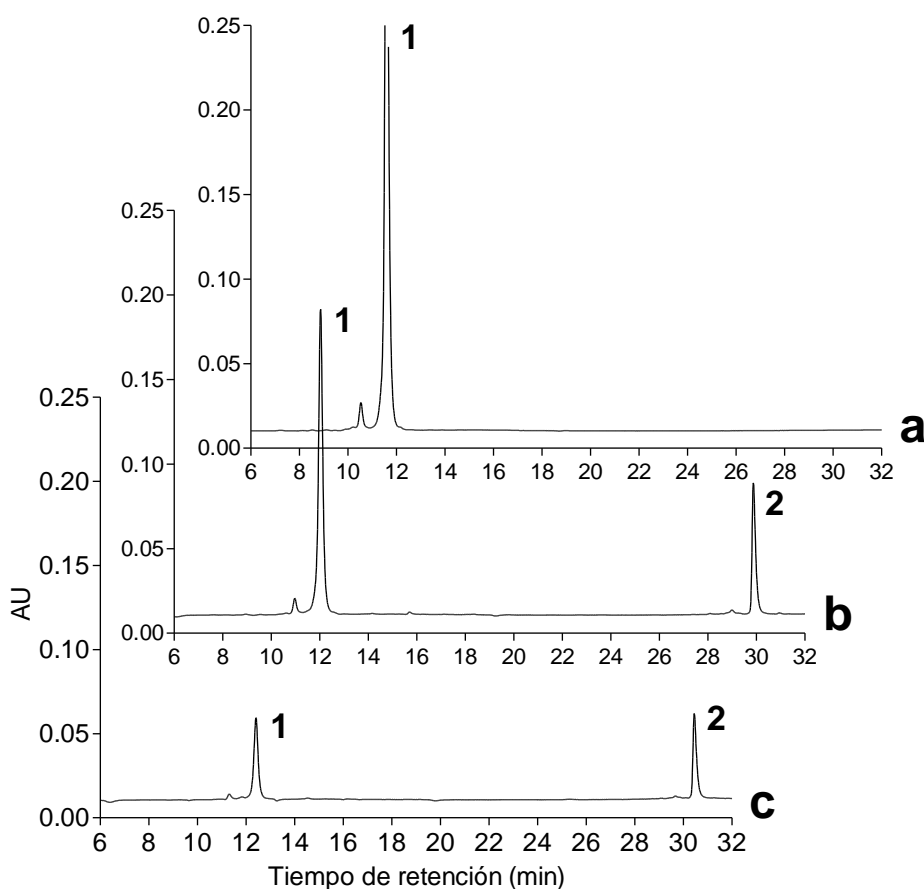
<b>Tabla 2.</b> Diferencias de color ( $\Delta E^*$ ) entre la solución de referencia con malvidina-3-glucósido y las soluciones con los distintos copigmentos (1:1), durante el almacenamiento a 25°C.				
<b>Tiempo (semanas)</b>	<b>Copigmento</b>			
	<b>Acido cafeico</b>	<b>(+)-Catequina</b>	<b>Quercetina</b>	<b>Dihidroquercetina</b>
<b>0</b>	0,38	1,01	3,63	1,22
<b>1</b>	11,58	9,07	11,82	9,92
<b>2</b>	12,25	5,70	10,67	10,39
<b>3</b>	15,85	8,08	14,22	14,39
<b>4</b>	16,44	9,80	13,92	14,21
<b>5</b>	16,78	10,60	13,14	14,23
<b>6</b>	17,58	12,90	15,26	15,15
<b>7</b>	17,17	13,21	15,11	17,78
<b>8</b>	17,32	14,34	16,72	17,95

### 3.3. Cambios químicos en las soluciones modelo durante el almacenamiento

La **Figura 5** muestra la evolución de la concentración de malvidina-3-glucósido en todas las soluciones evaluadas (pigmento/copigmento, 1:1) durante los 2 meses de almacenamiento. Se observó un efecto protector de los distintos copigmentos sobre la malvidina-3-glucósido disminuyendo su degradación en el tiempo. Mientras que la concentración del pigmento en la solución de referencia disminuyó un 57% hacia el final del estudio, la reducción fue menor en presencia de dihidroquercetina (13%), quercetina (21%), ácido cafeico (22%) y (+)-catequina (24%). Estos resultados, conjuntamente con la estabilidad del color descrita anteriormente, confirman la existencia de copigmentación y la subsecuente protección de la antocianina contra la hidratación nucleofílica, disminuyendo la formación de bases carbinol incoloras al desplazar el equilibrio hacia las formas coloreadas del pigmento (Brouillard et al., 2003; Gómez-Míguez et al., 2006; Terrier et al., 2009). Asimismo, los cambios observados en los parámetros de color podrían deberse también a la aparición de nuevos pigmentos.

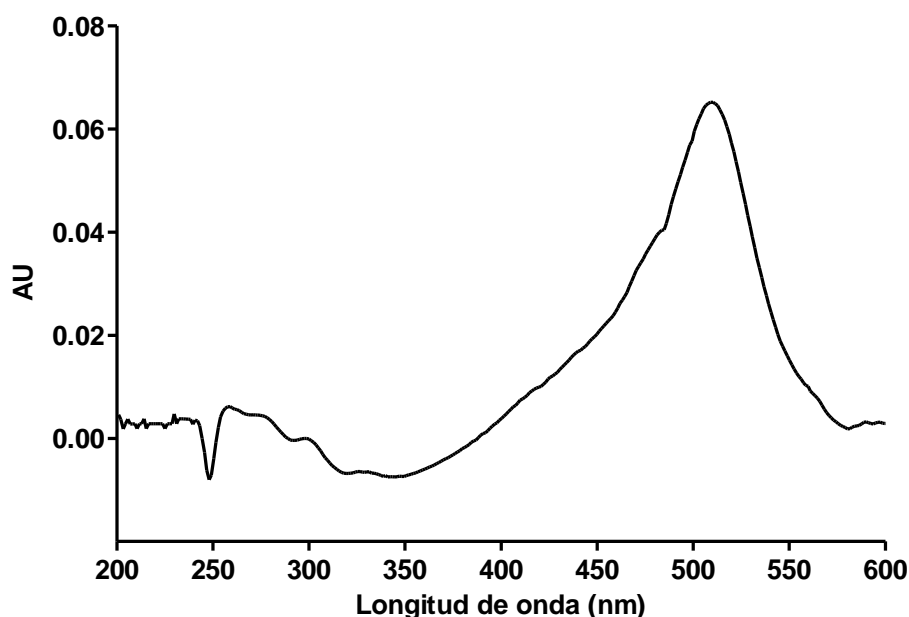


**Figura 5.** Cambios en la concentración de malvidina-3-glucósido (Mv3gl) en la solución de referencia y con los diferentes copigmentos (1:1), durante el almacenamiento a 25 °C. Acido cafeico (Caf), (+)-catequina (Cat), quercetina (Que), dihidroquercetina (DQue).



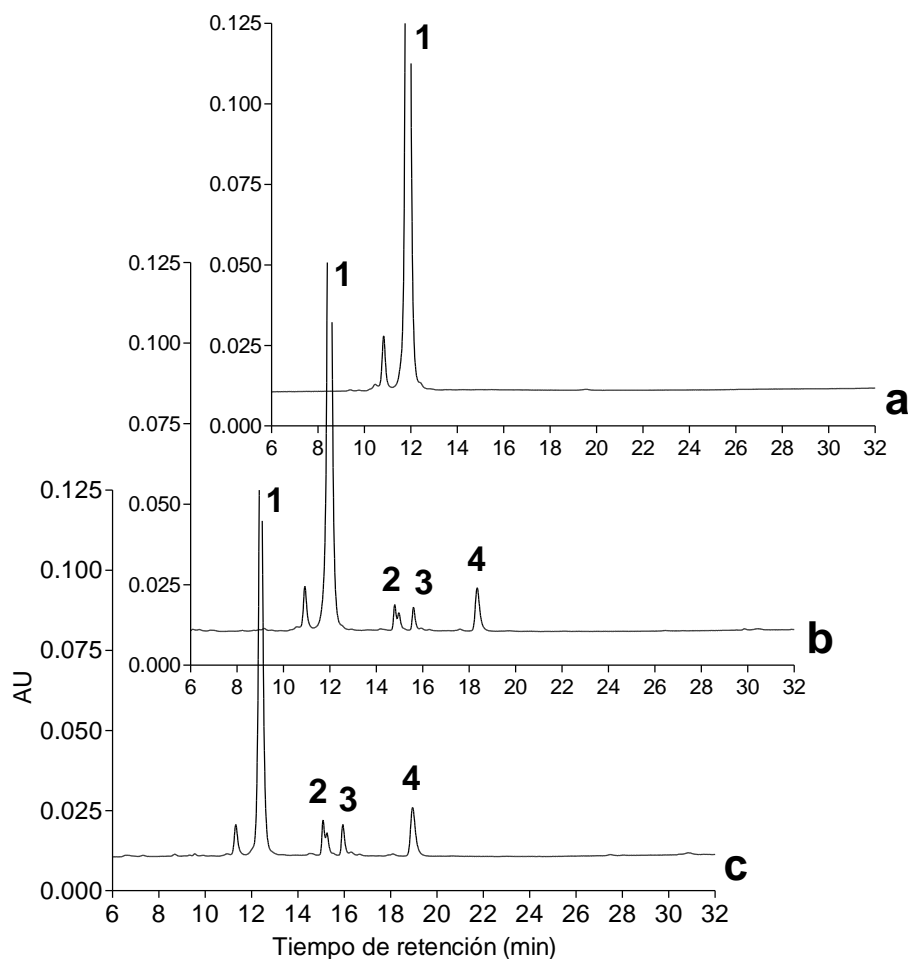
**Figura 6.** Cromatogramas (HPLC-DAD, 520 nm) de la solución de malvidina-3-glucósido/ácido cafeico (1:50), a las 3 horas de reacción (a), y después de 4 semanas (b) y 8 semanas (c) de almacenamiento a 25 °C. Referencias de picos cromatográficos: malvidina-3-glucósido (1) y nuevo pigmento (2).

Con el propósito de revelar la formación de nuevos pigmentos, entre los cofactores y la malvidina-3-glucósido, se analizaron las distintas soluciones en 3 momentos (después de 3 horas de reacción, y a las 4 y 8 semanas de almacenamiento) por HPLC-DAD, siguiendo el método descrito previamente. En primer lugar, es importante aclarar que en el caso del ácido cafeico y la (+)-catequina se analizaron las soluciones con relación molar pigmento/copigmento (1:1 y 1:50). Para ambos cofactores, las soluciones con relación 1:1 no mostraron cambios durante el período de almacenamiento estudiado, mientras que las relaciones 1:50, caracterizadas por presentar el mayor potencial de copigmentación (**Figura 3**), permitieron visualizar la aparición de nuevos compuestos. Así, en la solución con ácido cafeico, se observó un nuevo pigmento visible a las 4 y 8 semanas de almacenamiento, utilizando ambas longitudes de onda (280 y 520 nm). Este pigmento (pico 2, **Figura 6**) mostró un espectro de absorción (**Figura 7**) con una  $\lambda_{\text{máx}} = 508$  nm, que según sus características espectrales y tiempo de retención podría corresponder al aducto entre 4-vinilcatecol y malvidina-3-glucósido, reportado por otros autores (Gómez-Míguez et al., 2006).

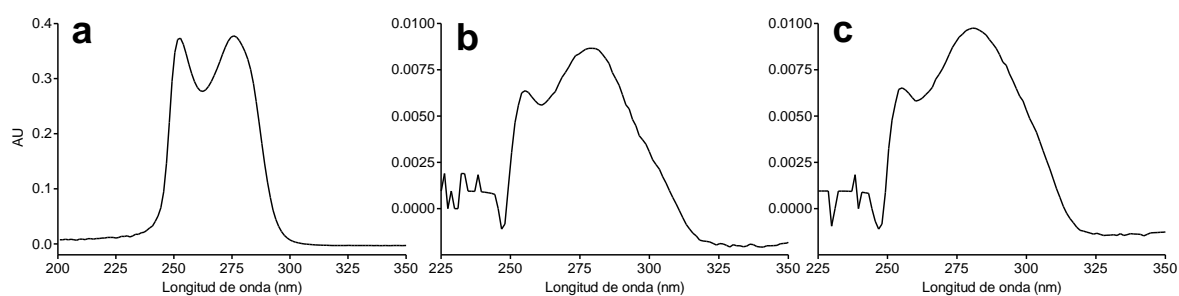


**Figura 7.** Espectro UV-Visible del pigmento (pico 2, Figura 6) identificado en la solución de malvidina-3-glucósido/ácido cafeico, durante el almacenamiento a 25 °C.

El análisis cromatográfico (a 280 y 520 nm) de la solución copigmentada con (+)-catequina también permitió la identificación de 3 nuevos compuestos, con  $\lambda_{\text{máx}}$  en la región ultravioleta del espectro y, por lo tanto, con escasa contribución al color de la solución (picos 2, 3 y 4, **Figura 8**). La **Figura 9** muestra los espectros de absorción de los picos encontrados.



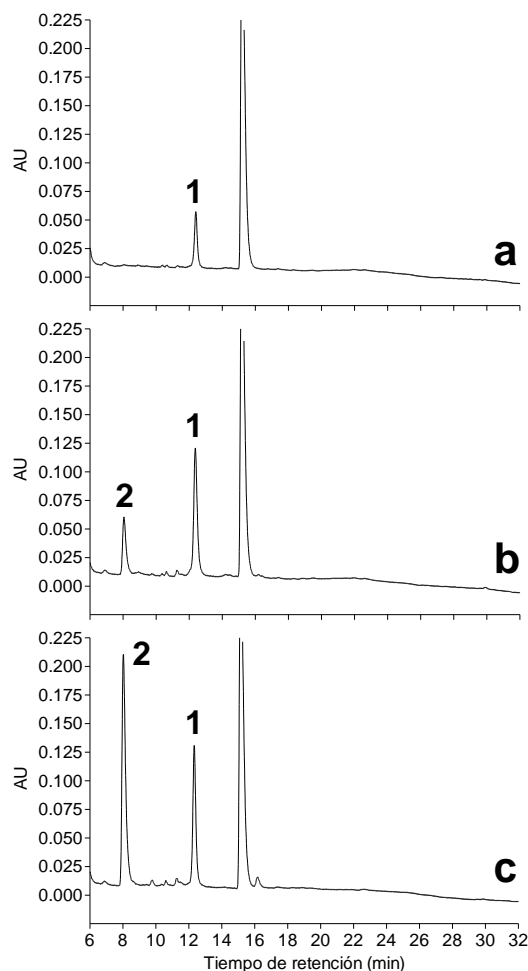
**Figura 8.** Cromatogramas (HPLC-DAD, 520 nm) de la solución de malvidina-3-glucósido/(+)-catequina (1:50), a las 3 horas de reacción (a), y después de 4 semanas (b) y 8 semanas (c) de almacenamiento a 25 °C. Referencias de picos cromatográficos: malvidina-3-glucósido (1) y nuevos compuestos (2, 3 y 4).



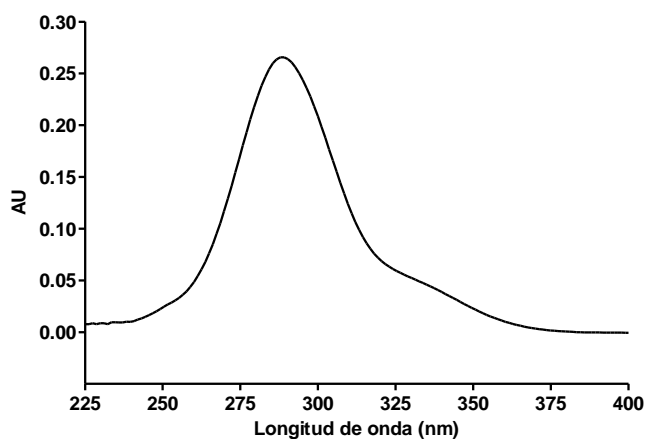
**Figura 9.** Espectro UV-Visible de los compuestos identificados en la solución de malvidina-3-glucósido/(+)-catequina, durante el almacenamiento a 25 °C. Referencias: a (pico 2, Figura 8), b (pico 3, Figura 8), c (pico 4, Figura 8).

Finalmente, en el estudio exploratorio de las soluciones con quercetina y dihidroquercetina (pigmento/copigmento, 1:1) no se observó ningún compuesto nuevo bajo las condiciones cromatográficas empleadas, debido posiblemente a la baja proporción de copigmento. Si bien mediante HPLC-DAD no es posible identificar con exactitud las principales estructuras fenólicas, en

los cromatogramas de ambas soluciones, obtenidos a 280 nm (Figura 10), se identificó tentativamente dihidroquercetina con un espectro UV (Figura 11) caracterizado por presentar una  $\lambda_{\text{máx}} = 290$  nm y un hombro entre 330 y 336 nm (Abad-García et al., 2009).



**Figura 10.** Cromatogramas (HPLC-DAD, 280 nm) de la solución de referencia (a) y de las copigmentadas con quercetina (b) y dihidroquercetina (c), en relación molar pigmento/copigmento (1:1), después 8 semanas de almacenamiento a 25 °C. Referencias de picos cromatográficos: malvidina-3-glucósido (1) y dihidroquercetina (2).

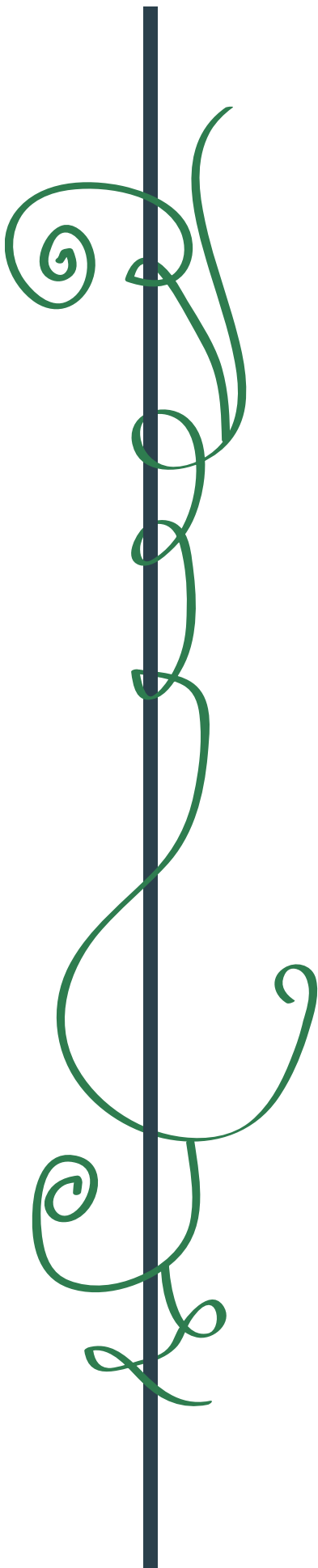


**Figura 11.** Espectro UV-Visible de la dihidroquercetina (pico 2, Figura 10) identificada en las soluciones de malvidina-3-glucósido copigmentadas con quercetina y dihidroquercetina.



En conclusión, los resultados presentados demuestran la existencia de copigmentación intermolecular empleando dihidroquercetina en comparación con otros cofactores y su incidencia sobre la expresión del color de malvidina-3-glucósido en soluciones modelo. La evaluación de este fenómeno empleando los parámetros colorimétricos triestímulo revelaron su tendencia a la disminución de  $L^*$  y a un aumento de  $C^*$  durante el almacenamiento, indicando una mayor intensidad de color de las soluciones copigmentadas, especialmente con quercetina y dihidroquercetina. Por otro lado, su incidencia sobre la tonalidad mostró el efecto protector de la dihidroquercetina y el ácido cafeico sobre la malvidina, generando un desplazamiento del color hacia tonalidades rojo-violáceas. Para todas las soluciones ensayadas, las diferencias de color con la solución de referencia fueron perceptibles ( $\Delta E^* > 5$ ) a partir de la primera semana del estudio. El copigmento de mayor eficacia fue la dihidroquercetina y el menos efectivo la (+)-catequina.

Los altos niveles de dihidroquercetina observados en uvas y vinos cv. Malbec en comparación al resto de los fenoles no-antocianínicos (Capítulos I al V), conjuntamente con los resultados descritos anteriormente, permiten suponer la capacidad potencial de este copigmento sobre la estabilidad de las antocianinas y la contribución al color de los vinos de esta variedad. Sin embargo, es importante destacar la limitación de extrapolar estas observaciones a la matriz vino, donde su gran complejidad genera múltiples reacciones complementarias. Por lo tanto, se sugiere profundizar el estudio evaluando la influencia de variables genéticas, vitícolas y enológicas sobre la biosíntesis y acumulación de estos copigmentos en las bayas y su expresión en el vino, con el objetivo de comprender este fenómeno y lograr el efecto buscado.



## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

## Conclusiones generales

De acuerdo a lo planteado en las hipótesis y objetivos de la presente Tesis Doctoral, se ha realizado por primera vez la caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos del cultivar Malbec, y se ha demostrado a lo largo de esta memoria la influencia de diversos factores (variedad de uva, región geográfica de procedencia, año de vendimia, y manejos vitícolas/enológicos realizados durante el proceso vitivinícola) sobre estos compuestos. Asimismo, se ha evaluado y confirmado el impacto significativo de los mismos en el valor comercial de los vinos.

Por consiguiente, todos los trabajos realizados y presentados en el marco de este proyecto de tesis, pretenden contribuir de alguna manera al conocimiento de la composición química de uvas y vinos de esta variedad.

A continuación se exponen las principales conclusiones derivadas de la misma.

**Capítulo I.** Influencia del origen geográfico sobre la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (*Vitis vinifera* L.).

- ✓ **Caracterización fenólica de uvas:** el estudio comparativo de bayas de los cultivares Malbec y Cabernet Sauvignon, provenientes de distintas zonas geográficas de la Provincia de Mendoza, mostró algunas diferencias en los parámetros fenólicos globales y en el perfil de compuestos flavonoides y no-flavonoides. En los hollejos de ambas variedades, se identificaron 17 antocianinas individuales y 30 compuestos fenólicos de bajo peso molecular (no-flavonoides y flavonoides), mientras que en el cv. Malbec se detectaron adicionalmente los ácidos *trans*-caftárico y cutárico, kaempferol-3-galactósido y dihidroquercetina-3-ramnósido. En general, se observó mayor concentración de fenoles totales, derivados antociánicos y estilbenos a medida que aumenta la altitud del viñedo. Con respecto a los flavonoides (flavanoles, flavonoles y dihidroflavonoles), no se observaron diferencias en Malbec; mientras que para Cabernet Sauvignon, los hollejos provenientes de las uvas de Agrelo presentaron contenidos superiores de estos compuestos. Por su parte, en semillas, se identificaron 3 monómeros de flavanoles [(+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-3-galato], 12 procianidinas y ácido gálico. En ambos cultivares, la zona de Agrelo generó los mayores niveles de fenoles y proantocianidinas totales; mientras que los monómeros y oligómeros de flavanoles siguieron el mismo patrón observado en hollejos, en general las zonas más altas exhibieron niveles superiores de estos compuestos. Con respecto a la pulpa, en Malbec se identificaron 8 compuestos no-flavonoides y 7 flavonoides, mientras que en Cabernet Sauvignon sólo se detectaron 7 compuestos no-flavonoides y 3 flavonoides. Comparativamente, las bayas Malbec presentaron una mayor riqueza fenólica en hollejo y pulpa, mientras que Cabernet Sauvignon se caracterizó por un contenido superior en

semillas, sugiriendo la influencia del cultivar sobre la actividad enzimática involucrada en la biosíntesis y acumulación de estos compuestos en las diferentes partes de la baya. Finalmente, es importante destacar la presencia de dihidroflavonoles (dihidroquercetina-3-glucósido, dihidroquercetina-3-ramnósido y dihidrokaempferol-3-glucósido) en el cultivar Malbec, representando entre 37,3 y 43,7% del contenido total de fenoles no-antociánicos, e indicando posiblemente un rasgo distintivo desde el punto de vista taxonómico.

- ✓ **Caracterización fenólica de vinos:** el estudio de vinos Malbec provenientes de diversas zonas vitícolas de la Provincia de Mendoza, en dos vendimias diferentes, permitió confirmar la presencia de los distintos compuestos identificados en uvas y la influencia de la región geográfica de procedencia sobre la composición fenólica. En forma complementaria al perfil observado en uvas, se detectaron 5 piranoantocianinas, y algunos compuestos no-flavonoides tales como ácido genticónico, glucósido de *cis*-resveratrol, tirosol y triptofol. En general, se observó una mayor concentración de parámetros fenólicos globales, fracciones flavánicas, antocianinas individuales, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, flavonoides y un mayor porcentaje de galoilación, en vinos provenientes de las zonas de mayor altitud (región del Valle de Uco). Estas observaciones revelan la incidencia de las condiciones edafoclimáticas zonales (suelo, luz solar, temperatura, etc.) sobre la expresión génica y la actividad enzimática involucrada en la biosíntesis de estos metabolitos secundarios. Asimismo, la aplicación de herramientas quimiométricas de análisis multivariado como el análisis canónico discriminante permitió la correcta diferenciación y clasificación de los vinos de acuerdo al origen, empleando como variables predictoras algunos ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoles, dihidroflavonoles y antocianinas. En conclusión, los resultados obtenidos demuestran el gran potencial de algunas zonas de Mendoza para la producción de vinos Malbec de gran complejidad y estructura fenólica, con coloraciones intensas y estables en el tiempo, adecuados para una crianza prolongada (vinos de guarda).

**Capítulo II.** Efecto del control de carga (aclareo o raleo de racimos), año de cosecha y ubicación geográfica del viñedo sobre la composición fenólica de uvas y vinos Malbec.

- ✓ Durante la maduración de las bayas cv. Malbec, la composición fenólica de hollejos y semillas mostró una evolución similar a la reportada en la literatura para otras variedades tintas cultivadas en diferentes regiones del mundo. Con respecto a los hollejos, se observó un aumento inicial de los derivados antociánicos seguido de una disminución hacia la cosecha, mientras que las proantocianidinas disminuyeron progresivamente durante todo el estudio. Por su parte, el perfil de compuestos fenólicos de bajo peso molecular reveló un descenso en la abundancia relativa de ácidos fenólicos y flavonoles desde envero hasta cosecha, acompañado de un incremento en la proporción de estilbenos, flavanoles y dihidroflavonoles. En cuanto a las

semillas, el contenido de flavanoles (monómeros, oligómeros y polímeros) mostró una caída sostenida hacia la cosecha, indicando procesos de oxidación e interacción con otros componentes de la pared celular durante la maduración, disminuyendo su extractabilidad.

- ✓ En las condiciones de estudio, los tratamientos de aclareo de racimos, independientemente del momento de realización, modificaron significativamente los componentes del rendimiento de las plantas con excepción del peso de racimo y del número de bayas/racimo. Asimismo, no incidieron significativamente sobre los parámetros físicos (peso de bayas, de hollejos y de semillas), indicando ausencia de compensación productiva del viñedo. Con respecto a la composición fenólica de las uvas y vinos, se observó un efecto moderado de los tratamientos aplicados, y las principales diferencias respecto al control fueron debidas fundamentalmente a los factores “año de cosecha y ubicación geográfica del viñedo”. En general, los aclareos realizados en etapas tempranas del desarrollo de la baya (tamaño de grano de arveja y envero) tendieron a aumentar la biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos en hollejos y semillas, trasladándose este efecto a la composición de los vinos. Sin embargo, en la mayoría de los casos esta tendencia careció de significancia estadística, destacándose la incidencia de las condiciones edafoclimáticas propias de cada zona y el efecto de la añada en el producto final. Así, el aclareo puede ser efectivo cuando las condiciones medioambientales determinan rendimientos excesivos y un entorno restrictivo para la planta, como la situación observada durante la vendimia 2008. Mientras que con respecto a la zona de cultivo, si bien las bayas de Gualtallary mostraron una mayor riqueza fenólica en comparación con Altamira, el gran potencial de ambas zonas para la producción de uvas tintas de alta calidad posiblemente enmascare los efectos del aclareo de racimos. Por consiguiente, probablemente se obtengan mejores resultados al aplicar este manejo en zonas muy productivas con características menos favorables para la maduración fenólica de las bayas, como por ejemplo la zona este de la Provincia de Mendoza.
- ✓ A partir de las observaciones realizadas resulta evidente la necesidad de evaluar cuidadosamente esta práctica, por un lado eligiendo adecuadamente el viñedo y el año de aplicación, y por otro lado analizando su implicancia económica (costo involucrado en la labor cultural y pérdidas de uva), especialmente si la mejora en la calidad de la uva y el vino no es tan notoria.

### **Capítulo III.** Efecto de la técnica de sangrado sobre la composición fenólica de vinos Malbec.

- ✓ La aplicación de sangrados parciales de jugo previos a la fermentación alcohólica puede resultar una práctica aconsejable para mejorar la composición fenólica (color, estructura) de vinos cv. Malbec y favorecer la capacidad de envejecimiento en productos de guarda, aunque la intensidad del tratamiento debe decidirse en función de las características iniciales de la uva. Los resultados

obtenidos en dos vendimias consecutivas (2010-2011), con uvas cultivadas en la zona de Altamira, indicaron un mayor potencial fenólico de las bayas en el año 2011. Comenzando con la evaluación de distintos niveles de sangrado en 2010, se confirmó que las diferencias producidas en la proporción sólido/líquido del mosto durante la vinificación no se traducen en modificaciones composicionales proporcionales al tratamiento efectuado. En general, los tratamientos T1 (10%) y T2 (20%) mostraron un comportamiento similar, y en muchos casos no significativo, sobre los compuestos fenólicos, comparados con el control; mientras que el tratamiento más drástico (T3, 30%) generó modificaciones sustanciales especialmente en el contenido de antocianinas. Al comparar el efecto de T3 en las dos vendimias, este tratamiento modificó diferencialmente la composición de los vinos, con incrementos superiores de los parámetros fenólicos globales, compuestos no-flavonoides (ácidos hidroxicinámicos y estilbenos) y flavonoides (flavanoles y dihidroflavanoles) en el año 2011.

- ✓ Por otra parte, el proceso de vinificación generó cambios sistemáticos en el perfil fenólico de los vinos. Los compuestos determinados alcanzaron su máxima concentración durante la maceración/fermentación alcohólica, y se estabilizaron o disminuyeron lentamente durante el almacenamiento en botella, coincidiendo con los datos reportados en la literatura. Sin embargo, las diferencias observadas en los parámetros fenólicos determinados al momento del descube, entre los vinos obtenidos con y sin sangrado, se mantuvieron hacia el final del estudio.
- ✓ A partir de las observaciones realizadas, se puede evidenciar la influencia del factor “año de cosecha” sobre la composición fenólica de los vinos en adición al efecto de la técnica de sangrado. Los resultados revelan la necesidad de evaluar exhaustivamente esta práctica enológica de acuerdo al objetivo buscado, ya que su influencia sobre la calidad del vino dependerá, entre otros factores, de la variedad de uva, de las características físicas y químicas de las bayas al momento de cosecha y de sus cambios producidos año a año.

**Capítulo IV.** Impacto de la composición fenólica y polisacáridica en el valor comercial de vinos Malbec de la Provincia de Mendoza.

- ✓ El estudio comparativo de vinos Malbec y Cabernet Sauvignon de distintos segmentos de precio, mostró algunas diferencias en los parámetros fenólicos globales, en los componentes del color y en el perfil de flavonoides, no-flavonoides y polisacáridos. En general, se observó una tendencia hacia mayores concentraciones de estos compuestos con el incremento del valor comercial de los vinos. Los vinos Malbec, independientemente del segmento evaluado, presentaron niveles superiores de derivados antociánicos (glucosilados, cumarilados y totales), estilbenos y flavonoides (flavanoles y dihidroflavanoles); mientras que los vinos Cabernet Sauvignon se

caracterizaron por un mayor contenido de ácidos hidroxicinámicos y de las distintas fracciones flavánicas determinadas, coincidiendo con las observaciones realizadas en bayas (Capítulo I).

- ✓ La descripción sensorial de los vinos fue concordante con los resultados químicos. Los vinos de alta gama presentaron mayores registros de los atributos visuales y gustativos, coincidiendo con niveles elevados de los parámetros fenólicos determinados.
- ✓ El análisis discriminante reveló que algunas antocianinas (cianidina, peonidina y malvidina no-aciladas) y piranoantocianinas (vitisinas A y B), como también los ácidos fenólicos, flavanoles y dihidroflavonoles, ejercen una influencia significativa en la diferenciación de los vinos por el valor comercial.
- ✓ El conocimiento de índices químicos de calidad de la uva y su expresión en el vino proporcionan información útil para mejorar el producto final. Más estudios sobre este tema y su relación con la gestión vitícola, las condiciones medioambientales, la elaboración y la crianza, son necesarios para la producción de vinos destinados a diferentes estilos de consumidores.

**Capítulo V.** Estudio comparativo de la composición fenólica de vinos Malbec con vinos provenientes de las otras cinco variedades tintas más cultivadas en la Provincia de Mendoza.

- ✓ El estudio comparativo de vinos cvs. Malbec, Bonarda, Cabernet Sauvignon, Merlot, Shiraz y Tempranillo mostró diferencias cualitativas y cuantitativas en los parámetros fenólicos globales, en los componentes del color, y en el perfil de flavonoides y no-flavonoides, confirmando la influencia del factor “variedad” sobre estos compuestos.
- ✓ En todas las variedades se identificaron un total de 23 antocianinas, incluyendo 17 compuestos procedentes de la uva y 6 pigmentos derivados (piranoantocianinas); a excepción de cianidina-3-(6''-*p*-cumaril)glucósido, no detectada en Cabernet Sauvignon, y vitisina B, ausente en Shiraz. Los perfiles antociánicos de los cultivares evaluados se distinguieron de acuerdo a sus patrones de acilación y antocianidina, revelando diferencias en la actividad enzimática involucrada en la biosíntesis de estos compuestos.
- ✓ Respecto al perfil de fenoles no-antociánicos, se determinaron 16 compuestos no-flavonoides (ácidos fenólicos/derivados, estilbenos, y alcoholes/compuestos relacionados) y 21 flavonoides (flavanoles, flavonoles y dihidroflavonoles). En general, los vinos cvs. Tempranillo, Shiraz y Merlot se caracterizaron por una alta proporción de compuestos no-flavonoides y flavonoles, los vinos Bonarda y Cabernet Sauvignon por el elevado contenido de flavanoles, y los vinos Malbec por la mayor proporción de dihidroflavonoles. Asimismo, se observó un patrón diferencial en la estructura de los flavonoles y dihidroflavonoles entre las variedades estudiadas, indicando nuevamente variaciones en la ruta fenilpropanoide inducidas por el factor “cultivar”.

- ✓ En términos cuantitativos, los vinos Malbec presentaron los mayores niveles de los parámetros fenólicos globales, derivados antociánicos y fenoles no-antociánicos totales, revelando su riqueza fenólica en comparación al resto de las variedades.
- ✓ El análisis discriminante permitió la correcta diferenciación y clasificación de los vinos de acuerdo a la variedad, empleando como variables predictoras algunas antocianinas, ácidos fenólicos y flavanoles.
- ✓ Para confirmar estas observaciones y obtener productos con identidad propia sería adecuado evaluar estos cultivares en diferentes zonas agroecológicas y bajo distintas condiciones de vinificación.

**Capítulo VI.** Evaluación de la dihidroquercetina y otros fenoles de importancia en vinos de la variedad Malbec como compuestos de copigmentación de malvidina-3-glucósido.

- ✓ Los resultados del estudio demostraron la gran capacidad de interacción de la dihidroquercetina con malvidina-3-glucósido en soluciones modelo, constituyendo el copigmento más efectivo en comparación con quercetina, ácido cafeico y (+)-catequina.
- ✓ La dihidroquercetina incidió significativamente sobre la expresión del color de malvidina-3-glucósido, mostrando un efecto hiperocrómico, batocrómico y protectorio sobre este compuesto, y generando un desplazamiento del color hacia tonalidades rojo-violáceas.
- ✓ A partir de los niveles elevados de dihidroquercetina observados en uvas y vinos cv. Malbec (Capítulos I al V) y de los resultados descritos en este capítulo, es posible suponer la capacidad potencial de este copigmento sobre la estabilidad de las antocianinas y su contribución al color de los vinos de esta variedad.
- ✓ Se sugiere evaluar la influencia de variables genéticas, vitícolas y enológicas sobre la biosíntesis, acumulación y expresión de este compuesto en uvas y vinos cv. Malbec, con el objetivo de profundizar el estudio sobre este fenómeno y obtener los resultados buscados.



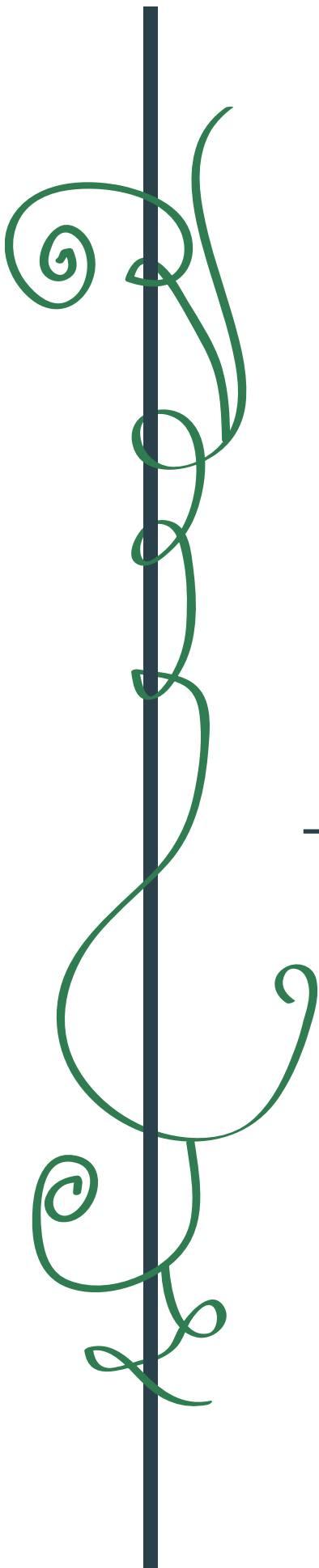
## **Perspectivas futuras**

Como complemento a la temática desarrollada en la presente Tesis Doctoral, a continuación se mencionan algunas pautas sugeridas para investigaciones futuras.

- ✓ Para confirmar las observaciones realizadas en este trabajo y mejorar la calidad polifenólica del cultivar Malbec, se sugiere continuar el estudio de la composición fenólica de uvas provenientes de zonas específicas con condiciones vitícolas controladas, y de vinos obtenidos con diferentes manejos enológicos. Además, en este aspecto, sería conveniente consensuar criterios que contribuyan a definir vinos con estilos únicos y diferenciales.
  
- ✓ Paralelamente, sería adecuado avanzar en el tema de zonificación, definiendo y delimitando con precisión las diferentes regiones geográficas de la Argentina mediante el empleo de criterios o parámetros constantes en el tiempo, tales como la exposición solar, las pendientes del terreno, la estructura y textura de los suelos, la composición del agua superficial y subterránea, etc. Este trabajo, si bien es a mediano o largo plazo, permitiría proporcionar identidad a las uvas y vinos de diferentes localidades y promover productos con características particulares.
  
- ✓ Adicionalmente, debido a la importancia de la madurez fenólica de las uvas en la calidad química y sensorial del vino, y a la limitada información existente sobre su predicción analítica, resulta esencial continuar esta línea de investigación tendiendo a optimizar metodologías adecuadas para su estimación. Idealmente, estos métodos deberían cumplir los requisitos de fiabilidad, repetibilidad, simplicidad, rapidez, estandarización y bajo costo. Asimismo, deberían utilizar reactivos y solventes pocos nocivos y fáciles de manipular, permitir la posibilidad de diferir el momento de análisis mediante métodos adecuados de conservación de las muestras, y responder a los siguientes objetivos: decidir el momento adecuado de cosecha, clasificar las uvas en función de su calidad o precio, ayudar a la gestión de las vinificaciones y predecir las características del vino.
  
- ✓ Por otro lado, teniendo en cuenta la incidencia del calentamiento global en zonas vitivinícolas como Mendoza, para alcanzar una madurez fenólica adecuada del cv. Malbec, especialmente en semillas, en muchos casos se debe realizar la cosecha con niveles elevados de azúcar y baja acidez, obteniéndose vinos con altos contenidos de etanol y pH elevados. Esta situación, tal como proponen algunos autores, puede ser abordada desde el ámbito vitícola o enológico, por lo que se sugiere continuar estudiando diferentes estrategias para mitigar este inconveniente. Por

ejemplo, considerando la práctica de aclareo de racimos evaluada en la presente tesis, una alternativa interesante puede ser el empleo de la uva (inmadura) extraída durante este tratamiento, su vinificación y utilización para sustituir parte del vino obtenido con las uvas maduras, disminuyendo de esta forma el contenido de etanol. Es un procedimiento sencillo, económico y no requiere ningún equipamiento específico (Kontoudakis et al., 2011a). A nivel enológico, la evaluación de alternativas para regular el pH mediante electrodiálisis (Fidaleo y Moresi, 2006) y el nivel de alcohol mediante ósmosis inversa (Diban et al., 2008) puede ser de gran utilidad, para lo cual es necesario profundizar su estudio y determinar su incidencia sobre la composición química de vinos de esta variedad. Por último, también sería conveniente investigar técnicas de extracción/maceración diferenciada entre hollejos y semillas, como la flash-expansión (flash-détente) (Morel-Salmi et al., 2006; Doco et al., 2007), que permitan la vinificación de bayas cosechadas en estados de maduración temprana, evitando la extracción de proantocianidinas de semillas y consiguiendo productos con altos contenidos de polifenoles y polisacáridos provenientes de hollejos, pH adecuados y niveles moderados de etanol.

- ✓ Complementariamente al estudio del Malbec, y debido al crecimiento productivo y económico del cv. Bonarda para la vitivinicultura argentina, otro tema interesante sería la evaluación química (polifenoles y polisacáridos) de mezclas o cortes específicos entre vinos de ambas variedades obtenidos bajo condiciones controladas.



## **ANEXO I**

### **Desarrollo Experimental Materiales y Métodos**

---

---

## **1. Lugar de trabajo**

## **2. Materiales**

### **2.1. Instrumental analítico**

### **2.2. Material volumétrico de vidrio y material auxiliar**

## **3. Reactivos**

### **3.1. Estándares químicos**

### **3.2. Solventes y otros reactivos**

## **4. Análisis de uvas**

### **4.1. Muestreo de bayas**

### **4.2. Determinación de parámetros analíticos generales**

### **4.3. Preparación de extractos de hollejos, semillas y pulpa**

### **4.4. Determinación de parámetros fenólicos generales**

### **4.5. Determinación de antocianinas individuales**

### **4.6. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular**

## **5. Protocolo de vinificación**

## **6. Análisis de vinos**

### **6.1. Determinación de parámetros analíticos generales**

### **6.2. Determinación de parámetros fenólicos generales**

### **6.3. Determinación de antocianinas individuales**

### **6.4. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular**

### **6.5. Análisis de flavanoles**

#### **6.5.1. Fraccionamiento de flavanoles en monómeros, oligómeros y polímeros**

#### **6.5.2. Análisis de proantocianidinas mediante floroglucinólisis**

### **6.6. Análisis de polisacáridos**

#### **6.6.1. Extracción de polisacáridos de la matriz vino**

#### **6.6.2. Determinación de polisacáridos por HRSEC-RID**

### **6.7. Evaluación sensorial**

#### **6.7.1. Análisis descriptivo estructurado**

#### **6.7.2. Test triangular**

## **7. Análisis estadístico**

---

## 1. Lugar de trabajo

- ✓ El desarrollo experimental del presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales de la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza (EEA Mendoza) del Centro Regional Mendoza-San Juan, perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Mendoza, Argentina.
- ✓ Las determinaciones analíticas de compuestos fenólicos, por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), y de polisacáridos, por cromatografía de exclusión molecular con detector de índice de refracción (HRSEC-RID), se realizaron en forma conjunta entre:
  - Laboratorio de Aromas y Sustancias Naturales (EEA Mendoza, INTA)
  - Laboratorio de Cromatografía del Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile (Santiago, Chile), bajo la dirección del Dr. Alvaro Peña-Neira.
  - Laboratorio de Enología del Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología, Universidad Rovira i Virgili (Tarragona, España), bajo la dirección del Dr. Fernando Zamora.
- ✓ La identificación y confirmación de compuestos fenólicos, por HPLC-DAD y espectrometría de masas con ionización electrospray (ESI-MS), se realizó en el Instituto de Fermentaciones Industriales, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid, España), bajo la dirección de la Dra. Carmen Gómez-Cordovés.

## 2. Materiales

### 2.1. Instrumental analítico

- Cromatógrafo en fase líquida de alta resolución Perkin-Elmer Series 200 equipado con un detector de arreglo de diodos, una bomba cuaternaria y un automuestreador (HPLC-DAD; PerkinElmer, Shelton, CT, Estados Unidos). Cromatógrafo en fase líquida de alta resolución Merck-Hitachi equipado con un detector de arreglo de diodos modelo L-7455, una bomba modelo L-6200 y un automuestreador modelo L-7200 (HPLC-DAD; Merck-Hitachi, Darmstadt, Alemania). Cromatógrafo en fase líquida de alta resolución Agilent Series 1100 equipado con un detector de arreglo de diodos modelo G1315B, una bomba cuaternaria modelo G1311A y un automuestreador modelo G1329A (HPLC-DAD; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estados

Unidos). Estos sistemas fueron utilizados para la determinación y cuantificación de compuestos fenólicos individuales.

- Cromatógrafo en fase líquida de alta resolución Hewlett-Packard Series 1100 equipado con un detector de arreglo de diodos y un espectrómetro de masas cuadrupolar acoplado a una interfase de ionización por electrospray (HPLC-DAD/ESI-MS; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, Estados Unidos). Este sistema fue utilizado para la identificación y confirmación de compuestos fenólicos individuales.
- Cromatógrafo en fase líquida de exclusión molecular Agilent Series 1200 equipado con un detector de índice de refracción modelo G1362A, una bomba cuaternaria modelo G1311A, un horno de columna modelo G1316A y un automuestreador modelo G1329A (HRSEC-RID; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estados Unidos). Este sistema fue utilizado para la determinación de polisacáridos.
- Espectrofotómetro UV-Visible Perkin-Elmer serie Lambda 25 (PerkinElmer, Hartford, CT, Estados Unidos).
- Mezclador homogeneizador (Omni International, Alemania). Este equipo fue utilizado para la molienda de hollejos y pulpa de bayas.
- Molino ultracentrífugo Retsch ZM 200 (Retsch, Newtown, PA, Estados Unidos). Este equipo fue utilizado para la molienda de semillas de bayas.
- Agitador orbital (Decalab, Buenos Aires, Argentina).
- Liofilizador Rificor modelo L-I-E300-CRT (Rificor, Buenos Aires, Argentina).
- Baño ultrasónico 8891 42Hz-100W (Cole Parmer, Vernon, IL, Estados Unidos).
- Agitador magnético Ret Control Visc IKAMAG Safety Control (IKA, Wilmington, Estados Unidos).
- Balanza analítica Mettler Toledo AL54 (Mettler-Toledo AG, Laboratory and Weighing Technologies, Greifensee, Suiza).
- Sistema de ultrapurificación de agua RiO/Elix3-Sinergy185 (Millipore, San Pablo, Brasil).
- Centrífuga CM 4080 Rolco (Rolco, Buenos Aires, Argentina).
- Centrífuga 5810R Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Alemania).
- Evaporador al vacío Univapo 100ECH (Uniequip, Martinsried, Alemania).
- Vortex CK-Tech (CK-Tech, Buenos Aires, Argentina).
- pHmetro Altronix TPX1 (Altronix, Buenos Aires, Argentina).
- Termobloque Cole-Parmer StableTemp 125D (Cole Parmer, Vernon, IL, Estados Unidos).
- Refractómetro Atago ATC-1 (Atago, Tokyo, Japón).
- Freezer horizontal Bosch HC55B (Bosch, San Pablo, Brasil).
- Heladera Bosch EcoPlus 430 (Bosch, San Pablo, Brasil).
- Ultrafreezer ScienTemp (Adrian, Miami, Estados Unidos).

- Moledora de uva horizontal (Metal Liniers S.A., Mendoza, Argentina).
- Bomba de cavidad progresiva 1SB45 (Metalúrgica San Francisco S.A., Mendoza, Argentina).

## 2.2. Material volumétrico de vidrio y material auxiliar

- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y cubetas de vidrio de 1 mm y 1 cm, UV/VIS spectroscopy cells, Perkin Elmer Instruments (Perkin Elmer Inc., Beaconsfield, Massachusetts, Estados Unidos).
- Erlenmeyers de 250 mL (IVA, Buenos Aires, Argentina).
- Matraces aforados certificados de 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 mL (IVA, Buenos Aires, Argentina).
- Probetas graduadas de 50, 100 y 500 mL (IVA, Buenos Aires, Argentina).
- Vasos de precipitado de 50, 100, 250 y 500 mL (IVA, Buenos Aires, Argentina).
- Pipetas aforadas (doble aforo) certificadas de 1, 2, 3, 4, 5 y 10 mL (IVA, Buenos Aires, Argentina).
- Pipetas automáticas de volumen variable de 10, 100, 200, 1000 y 5000  $\mu$ L (Eppendorf Research, Eppendorf, Hamburg, Alemania).
- Ampollas de decantación de 100 mL (IVA, Buenos Aires, Argentina).
- Balones de concentración de 100 mL (IVA, Buenos Aires, Argentina).
- Embudos de vidrio (IVA, Buenos Aires, Argentina).
- Densímetro de inmersión de vidrio (Ludwig Schneider, Alemania).
- Termómetro de inmersión de mercurio (Ludwig Schneider, Alemania).
- Tubos de centrifuga plásticos con tapa a rosca de fondo cónico de 15 mL.
- Tubos plásticos de 5 mL con tapa.
- Tubos de vidrio de 10 mL con tapa a rosca.
- Frascos de vidrio ámbar con tapa a rosca de 25, 50, 100, 250 y 500 mL.
- Viales de vidrio ámbar con tapa a rosca y septa de silicona/PTFE de 2, 5 y 10 mL (Varian, Lake Forest, CA, Estados Unidos).
- Jeringas plásticas descartables de 15 mL (Terumo Elkton, Estados Unidos).
- Cartuchos C<sub>18</sub> Sep-Pak Plus (400 mg) y Environmental (900 mg) tC<sub>18</sub> (Waters, Milford, MA, Estados Unidos).
- Membranas de celulosa de 3  $\mu$ m de tamaño de poro (Microclar, Buenos Aires, Argentina).
- Membranas de nylon de 0.45  $\mu$ m de tamaño de poro (Microclar, Buenos Aires, Argentina).
- Malla de filtración plástica de 0,5 mm de tamaño de poro.
- Bolsas plásticas herméticas con cierre deslizable (Ziploc, Buenos Aires, Argentina).
- Parafilm M (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, Estados Unidos).
- Gas nitrógeno y aire medicinal sintético (Linde S.A., Mendoza, Argentina).

- Bidones plásticos, de uso alimentario, para vinificación de 30 L.
- Tanques de acero inoxidable para vinificación de 100 L, con cierre hermético y sistema de incorporación de gas inerte.
- Recipientes de vidrio de 20 L para estabilización tartárica de los vinos.
- Botellas de vidrio de 750 mL línea Burdeos Cuyana con picada (Saint Gobain Rayen Cura, Mendoza, Argentina).
- Corchos naturales calidad “Súper” de 45 x 24 mm (Rich-Xiberta Argentina S.A.).

### 3. Reactivos

#### 3.1. Estándares químicos

Ácido gálico [149-91-7], ácido siríngico [530-57-4], ácido cafeico [331-39-5], ácido *p*-cumárico [501-98-4], galato de etilo [831-61-8], triptofol [526-55-6], (+)-catequina [7295-85-4], (-)-epicatequina [490-46-0], resveratrol [501-36-0], miricetina [529-44-2], kaempferol [520-18-3], y quercetina-3-glucósido [21637-25-2], fueron adquiridos en la firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos); el tirosol [501-94-0] fue provisto por Fluka (St. Louis, MO, Estados Unidos); mientras que el ácido protocatéquico [99-50-3], quercetina [117-39-5], kaempferol-3-glucósido [480-10-4], (-)-epigallocatequina [970-74-1], (-)-epicatequina-3-galato [1257-08-5], dihidroquercetina [17654-26-1], cloruro de malvidina-3-glucósido [7228-78-6] y cloruro de cianidina [528-58-5] fueron suministrados por Extrasynthese (Lyon, Francia).

Para la calibración de las columnas de HRSEC-RID, se empleó un kit de calibración de pululanos Shodex P-82 (P-5, Mw=5,9 KDa; P-10, Mw=11,8 KDa; P-20, Mw=22,8 KDa; P-50, Mw=47,5 KDa; P-100, Mw=112 KDa; P-200, Mw=212 KDa; P-400, Mw=404 KDa; P-800, Mw=788 KDa) suministrado por Waters (Barcelona, España), junto con un pululano de 1.3 KDa y cuatro dextranos BioChemika (12, 25, 50 y 80 KDa) suministrados por Fluka (St. Louis, MO, Estados Unidos). Los polisacáridos utilizados como estándares externos fueron pectinas de cítricos y dextranos sintetizados por *Leuconostoc mesenteroides*, adquiridos de la firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos).

#### 3.2. Solventes y otros reactivos

Metanol y acetonitrilo LiChrosolv®; ácido acético, ácido fórmico y etanol pro-análisis fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania). Acetona, éter etílico y acetato de etilo fueron adquiridos en Sintorgan (Buenos Aires, Argentina).

Formiato de amonio [540-69-2], *p*-dimetilaminocinamaldehído [6203-18-5], ácido L-ascórbico [50-81-7], floroglucinol [108-73-6], y polivinilpolipirrolidona [25249-54-1] fueron suministrados por



Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados). Cloruro de sodio, metabisulfito de sodio y potasio, hidróxido de sodio, ácido tartárico y biftalato de potasio (Cicarelli, Santa Fe, Argentina); sulfato de amonio y hierro (II), butanol, fenolftaleína y azul de bromotimol (Dalton, Mendoza, Argentina); sulfato de sodio anhidro, fosfato ácido de potasio, acetato de sodio, vainillina, gelatina, acetaldehído, ácido clorhídrico (Merck, Darmstadt, Alemania). Todos los reactivos fueron de grado analítico o superior. El agua utilizada se obtuvo a través de un sistema de ultrapurificación RiO/Elix3-Sinergy185 (Millipore, Sao Pablo, Brasil). Levadura seca activa *Saccharomyces cerevisiae bayanus* cepa EC1118 (Lallemand, Montreal, Canadá). Activador de fermentación Go-Ferm® y suplemento nutritivo amónico Fermaid® (Lallemand, Montreal, Canadá). Lisozima para la inhibición de bacterias lácticas Lysocid®W (Pascal Biotech, Brescia, Italia). Acido L(+)-tartárico de uso enológico (Derivados vinícos S.A., Argentina).

#### **4. Análisis de uvas**

##### **4.1. Muestreo de bayas**

En todos los ensayos realizados en uvas, y para cada tratamiento evaluado, las muestras de bayas fueron tomadas a partir de 30 plantas, seleccionadas empleando el criterio de homogeneidad en vigor en función del largo de sus entrenudos, grosor y tamaño del brote en su expresión de crecimiento. La unidad experimental en todos los casos fue de 300 bayas. El procedimiento de muestreo consistió en la selección aleatoria de 5 racimos por planta. De cada racimo se tomaron 2 bayas, siempre de la parte central del mismo, una baya de la cara anterior y la otra baya de la cara posterior, alcanzando un total de 10 bayas por planta. Las mismas fueron cortadas con tijera por encima de la inserción del pedicelo, evitando la rotura del hollejo, se colocaron en una bolsa plástica y se conservaron a -80 °C hasta el momento del análisis.

##### **4.2. Determinación de parámetros analíticos generales**

Se seleccionaron aleatoriamente 100 bayas de cada unidad experimental, se colocaron en una bolsa plástica, se descongelaron a temperatura ambiente y se presionaron manualmente hasta obtener un mosto. El mosto, previamente filtrado a través una malla plástica de 0,5 mm de tamaño de poro para eliminar restos sólidos, se utilizó en la determinación de sólidos solubles (°Brix), pH y acidez titulable (ácido tartárico, g/L), siguiendo los procedimientos descritos por Zoecklein et al. (2001). Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

##### **4.3. Preparación de extractos de hollejos, semillas y pulpa**

Con el objetivo de analizar los compuestos fenólicos presentes en las uvas, se procedió en primer lugar a la extracción de los mismos de las diferentes partes de la baya. Se empleó la

metodología propuesta por Venencie et al. (1997). Se seleccionaron aleatoriamente 100 bayas de cada unidad experimental, se pesaron y se procedió a la separación manual de hollejos, semillas y pulpa. Cada fracción fue pesada y tratada por separado siguiendo el procedimiento descrito a continuación: se realizó la molienda de cada fracción con 30 mL de agua ultrapura y 40 mL de solución hidroalcohólica (etanol/agua, 12:88, v/v; 5 g/L de ácido tartárico), la suspensión obtenida fue colocada en un erlenmeyer de 250 mL, se ajustó el peso de la misma a 200 g con agua ultrapura y el pH a 3,6, empleando NaOH o HCl. Los extractos fueron macerados durante 2 horas a 25 °C, utilizando un agitador orbital a 200 rpm. Finalmente, se centrifugaron durante 15 min. a 2038g, se colocaron en frascos ámbar y se conservaron a 3-6 °C hasta el momento del análisis.

#### 4.4. Determinación de parámetros fenólicos generales

La determinación de los parámetros fenólicos generales fue realizada por espectrofotometría UV-Visible, empleando el instrumental descrito en el ítem 2.1. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

- *Fenoles totales*: se realizó una dilución de la muestra (hollejos, 1:100; semillas y pulpa, 1:20) con agua y se efectuó la medición de absorbancia a 280 nm, en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). La concentración de fenoles totales fue calculada a partir de una curva de calibración realizada con ácido gálico, empleando soluciones patrones (quintuplicado) en el rango comprendido entre 0 y 50 mg/L ( $R^2 = 0,99$ ). Los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (EAG, mg/g).
- *Antocianos totales*: se realizó una dilución del extracto de hollejos con HCl 2% en etanol, la misma se dividió en dos alícuotas a las cuales se les adicionó metabisulfito de sodio al 15% (A) y agua (B). Después de 20 min., se efectuó la medición de absorbancia de ambas alícuotas (A y B) a 520 nm en cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). La concentración de antocianos se calculó a través de la diferencia entre ambas alícuotas, a partir de una curva de calibración realizada con cloruro de malvidina-3-glucósido empleando soluciones patrones (quintuplicado) en el rango comprendido entre 0 y 1500 mg/L ( $R^2 = 0,99$ ). Los resultados fueron expresados en miligramos de cloruro de malvidina-3-glucósido por gramo de extracto (Mv3gl, mg/g).
- *Proantocianidinas totales*: se aplicó el método propuesto por Porter et al. (1986), con algunas modificaciones presentadas por Ojeda (1999). Este método se basa en la ruptura oxidativa catalizada por HCl de la unión interflavánica C-C de las proantocianidinas, en presencia de butanol y sal de hierro para optimizar la reacción. Se realizó una dilución de la muestra 1:10 con butanol y se tomaron dos alícuotas a las cuales se les adicionó una solución ácida de sulfato de amonio y hierro (A) y butanol acidificado (B). La alícuota A se calentó a 100 °C durante 20 min.,

mientras que la alícuota B se mantuvo a temperatura ambiente (20-25 °C). Posteriormente, se efectuó la medición de absorbancia de ambas alícuotas (A y B) a 547 nm, en una cubeta de 1 cm de paso óptico. La concentración de proantocianidinas se calculó a través de la diferencia entre ambas alícuotas, a partir de una curva de calibración realizada con cianidina empleando soluciones patrones (quintuplicado) en el rango comprendido entre 0 y 500 mg/L ( $R^2 = 0,99$ ). Los resultados finales fueron expresados en miligramos de (+)-catequina por gramo de extracto (Cat, mg/g).

- *Intensidad colorante y matiz*: se realizó la medición directa de la absorbancia de la muestra a 420, 520 y 620 nm, en una cubeta de vidrio de 1 mm de paso óptico, según el método descrito por Glories (1984a), y se calcularon los siguientes índices:

$$\text{Intensidad colorante (IC)} = (A_{420\text{ nm}} + A_{520\text{ nm}} + A_{620\text{ nm}}) \times 10 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\text{Matiz} = (A_{420\text{ nm}} / A_{520\text{ nm}}) \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

- *Flavanoles DMACH*: se aplicó el método propuesto por Vivas et al. (1994), basado en una reacción colorimétrica empleando *p*-dimetilaminocinamaldehído como agente cromóforo en medio ácido. Se realizó una dilución de la muestra 1:100 con metanol, se efectuó la reacción con el cromóforo y posterior medición de la absorbancia a 640 nm, en una cubeta de 1 cm de paso óptico. La concentración de flavanoles se calculó a partir de una curva de calibración realizada con (+)-catequina empleando soluciones patrones (quintuplicado) en el rango comprendido entre 0 y 10 mg/L ( $R^2 = 0,99$ ). Los resultados fueron expresados en miligramos de (+)-catequina por gramo de extracto (Cat, mg/g).

#### 4.5. Determinación de antocianinas individuales

La caracterización y cuantificación de antocianinas individuales se realizó por HPLC-DAD, empleando el instrumental descrito en el ítem 2.1. La separación de compuestos fue realizada en fase reversa mediante una columna  $C_{18}$  Chromolith Performance (100 mm x 4,6 mm D.I., 2  $\mu\text{m}$ ; Merck, Darmstadt, Alemania) provista de un cartucho guarda columna Chromolith (10 mm x 4,6 mm), a 25 °C. Se empleó un gradiente de dos solventes: A (agua/ácido fórmico, 90:10, v/v) y B (acetonitrilo), aplicados con un flujo de 1,1 mL/min. desde 0 a 22 min., y de 1,5 mL/min. desde 22 a 35 min.; según el siguiente programa: 96-85% A y 4-15% B desde 0 a 12 min., 85% A y 15% B desde 12 a 22 min., 85-70% A y 15-30% B desde 22 a 35 min., finalizando con un lavado con metanol durante 5 minutos y posterior restablecimiento de condiciones iniciales hasta equilibrar el sistema. Se inyectaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra previamente filtrada a través de membrana de nylon (0,45  $\mu\text{m}$ ). La detección fue realizada en todo el espectro UV-Visible comprendido entre 210 y 600 nm, y la cuantificación mediante la determinación del área de los picos a 520 nm. La concentración de antocianinas fue calculada a partir de una curva de calibración realizada con Mv3gl como estándar

externo, empleando soluciones patrones (quintuplicado) en el rango comprendido entre 0 y 500 mg/L ( $R^2 = 0,98$ ). La concentración en hollejos fue expresada en miligramos de Mv3gl por kilogramo de extracto (Mv3gl, mg/kg). Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

La identificación y confirmación de los pigmentos antocianicos se realizó por HPLC-DAD/ESI-MS, empleando el instrumental descrito en el ítem 2.1. Los parámetros del detector fueron: flujo del gas de secado ( $N_2$ ), 11 L/min.; temperatura, 350 °C; presión del nebulizador, 380 Pa (55 psi); voltaje del capilar, 4000 V. El detector fue operado en modo positivo, empleando un rango de masas entre  $m/z$  100 y 1500 y el siguiente gradiente de voltaje de fragmentación: 100 V desde 0 a 15 min., y 120 V desde 15 a 35 min. (Monagas et al., 2003a).

#### 4.6. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

La caracterización y cuantificación de fenoles no-antocianicos se realizó por HPLC-DAD, empleando el instrumental descrito en el ítem 2.1. Inicialmente, se efectuó una purificación y concentración de los mismos mediante la aplicación de la técnica de extracción líquido-líquido (Peña-Neira et al., 2007; Obreque-Slier et al., 2010), siguiendo el procedimiento resumido a continuación: en una ampolla de decantación de 100 mL se colocaron 50 mL de extracto (hollejo, semilla, pulpa), se adicionó 1 g de cloruro de sodio, y se realizaron 3 extracciones sucesivas con 20 mL de éter etílico y 3 extracciones con 20 mL de acetato de etilo. La fracción acuosa se descartó, mientras que las fracciones orgánicas se combinaron en un erlenmeyer de 250 mL y se deshidrataron durante 30 min con aproximadamente 3 g de sulfato de sodio anhidro. Posteriormente, el extracto se filtró a través de membrana de celulosa (3  $\mu$ m) y se evaporó a sequedad bajo corriente continua de  $N_2$  a 35 °C. Finalmente, el extracto sólido se redisolvió en 2 mL de metanol/agua (1:1), se filtró a través de membrana de nylon (0,45  $\mu$ m), y se inyectó (30  $\mu$ L) en el sistema cromatográfico. La separación de compuestos fue realizada en fase reversa mediante una columna  $C_{18}$  Nova-Pak (300 mm x 3,9 mm I.D., 4  $\mu$ m; Waters Corp., Milford, MA, Estados Unidos) a 25 °C. Se empleó un gradiente de dos solventes: A (agua/ácido acético, 98:2, v/v) y B (agua/acetonitrilo/ácido acético, 78:20:2, v/v/v), aplicados con un flujo de 0,9 mL/min. desde 0 a 55 min., y de 1 mL/min. desde 55 a 125 min.; según el siguiente programa: 100-20% A y 0-80% B desde 0 a 55 min., 20-10% A y 80-90% B desde 55 a 57 min., 10% A y 90% B isocrático desde 57 a 70 min., 10-0% A y 90-100% B desde 70 a 80 min., 100% B isocrático desde 80 a 125 min., finalizando con un lavado con metanol durante 5 minutos y posterior restablecimiento de condiciones iniciales hasta equilibrar el sistema. La detección fue realizada en todo el espectro comprendido entre 210 y 360 nm. La identificación de los compuestos individuales se realizó por comparación de espectros y tiempos de retención con estándares comerciales. La cuantificación se llevó a cabo por el método del estándar externo con estándares comerciales (ítem 3.1). Las curvas de calibración para cada estándar fueron obtenidas por inyección de soluciones

patrones (quintuplicado), bajo las mismas condiciones que las muestras problema, en el rango comprendido entre 0 y 1,5 g/L ( $R^2 \geq 0,94$ ). Los compuestos para los cuales no se disponía de estándares comerciales fueron cuantificados con las curvas de quercetina (dihidroflavonoles), quercetina-3-glucósido (glicósidos de quercetina y otros flavonoles), miricetina (glicósidos de miricetina), kaempferol-3-glucósido (kaempferol-3-galactósido), resveratrol (glucósidos de resveratrol *cis* y *trans*), ácido cafeico (ácido *trans*-ferárico y ácido fenólico desconocido), galato de etilo (galato de metilo), y (+)-catequina (prociandinas). La concentración de cada compuesto fue expresada en miligramos por kilogramo de extracto (mg/kg). Todos los análisis (incluyendo las extracciones líquido-líquido) fueron realizados por triplicado.

La confirmación de los fenoles no-antocianicos se realizó por HPLC-DAD/ESI-MS, empleando el instrumental descrito en el ítem 2.1. Los parámetros del detector fueron: flujo del gas de secado ( $N_2$ ), 11 L/min.; temperatura, 350 °C; presión del nebulizador, 380 Pa (55 psi); voltaje del capilar, 4000 V. El detector fue operado en modo negativo, empleando un rango de masas entre  $m/z$  100 y 3000 y el siguiente gradiente de voltaje de fragmentación: de  $m/z$  0 a 200 (100 V), y de  $m/z$  200-3000 (200 V) (Monagas et al., 2005d).

## 5. Protocolo de vinificación

Con el objetivo de evaluar la incidencia de distintos tratamientos vitícolas y enológicos, realizados en el marco del presente trabajo de Tesis Doctoral, sobre la composición química del vino, se procedió a la vinificación de las uvas correspondientes a cada réplica de cada tratamiento. La elaboración de los vinos se realizó en la bodega experimental de la EEA Mendoza (INTA), siguiendo el protocolo estándar detallado a continuación:

- Las uvas se cosecharon manualmente y se trasladaron inmediatamente a la bodega, donde se realizó un control visual del estado sanitario y se eliminaron los racimos indeseables.
- Se realizó el descobajado, molienda y encubado en bidones plásticos de 30 L de capacidad (Capítulo II, Apartado II.2) o tanques de acero inoxidable de 100 L (Capítulo III), hasta completar aproximadamente el 75-80% del volumen de los mismos. Durante el encubado, se dosificó una solución acuosa de metabisulfito de potasio (100 mg/L) y lisozima (25 mg/hL) para inhibir levaduras y bacterias lácticas nativas y se homogeneizó el contenido mediante un pisoneo manual. Los tanques fueron colocados en una sala de fermentación acondicionada (25-28 °C, 60% de humedad relativa, corriente de aire forzada).
- Aproximadamente 4 horas después, los mostos fueron inoculados con levaduras seleccionadas (30 g/hL), adicionándose durante la hidratación de las mismas un activador de fermentación (30 g/hL). Una vez alcanzado aproximadamente 1/3 de la fermentación alcohólica (densidad = 1,040

g/mL), se agregó un suplemento nutritivo amónico (20 g/hL) y se realizó la corrección de la acidez total con ácido tartárico de uso enológico, llevando la misma a 7 g/L.

- En todos los casos los mostos fueron fermentados a una temperatura controlada entre 26-28° C hasta rastros de azúcar (< 1,8 g/L). Se efectuaron diariamente 2 remontajes manuales seguidos de un bazuqueo, y se ajustó el tiempo de maceración en 15 días para todos los tratamientos.
- Para favorecer el proceso de fermentación/maceración, se realizó diariamente la aireación del mosto/vino empleando aire medicinal sintético hasta una densidad aproximada de 1,000 g/mL. Las vinificaciones fueron controladas diariamente a través de la medición de densidad y temperatura.
- Una vez completada la fermentación alcohólica, se realizó el descube, los vinos se trasvasaron a recipientes de vidrio de 20 L de capacidad, se sulfitaron (50 mg/L) y se colocaron en cámara de frío (3-4 °C) durante 2 semanas para la estabilización tartárica. Posteriormente, se ajustó el nivel de SO<sub>2</sub> libre a 35 mg/L.
- Finalmente, se procedió al envasado en atmósfera inerte (barrido con N<sub>2</sub>) empleando botellas de vidrio de 750 mL con corcho natural. Las botellas se etiquetaron adecuadamente y se almacenaron en posición horizontal (13-15 °C, 40-50% de humedad relativa, oscuridad) hasta el momento de análisis.

## 6. Análisis de vinos

### 6.1. Determinación de parámetros analíticos generales

El análisis de acidez titulable (ácido tartárico, g/L), pH y contenido de alcohol (% v/v) fue realizado siguiendo los procedimientos descritos por Zoecklein et al. (2001). Los análisis fueron realizados por triplicado.

### 6.2. Determinación de parámetros fenólicos generales

La determinación de los parámetros fenólicos generales fue realizada por espectrofotometría UV-Visible, empleando el instrumental descrito en el ítem 2.1. Inicialmente, las muestras se centrifugaron durante 15 min. a 2038g. Todos los análisis fueron realizados por triplicado. Para la determinación de fenoles totales (mg/L), antocianos totales (mg/L), proantocianidinas totales (mg/L), flavanoles DMACH (mol/L), intensidad colorante y matiz, se siguieron los procedimientos detallados en el ítem 4.4. Los análisis complementarios realizados en vinos fueron:

- *Antocianos libres y combinados*: estos parámetros fueron determinados empleado el índice de PVPP propuesto por Glories (1984a). El procedimiento resumido fue el siguiente: se preparó una suspensión de agua con PVPP (polivinilpolipirrolidona) en una jeringa plástica, se compactó el

adsorbente para eliminar el agua, se eluyó 1 mL de muestra, luego se adicionaron 10 mL de agua para eliminar interferencias, y finalmente se eluyeron los antocianos libres con la solución de extracción (70 mL etanol + 30 mL agua + 1 mL HCl). La concentración de antocianos libres (mg/L) se determinó siguiendo el método descrito en el ítem 4.4 para antocianos totales. La concentración de antocianos combinados (mg/L) se calculó a través de la diferencia entre antocianos totales y libres.

- *Color copigmentado y color polimérico*: la contribución de las antocianinas copigmentadas al color total de vino a pH 3,6 (color copigmentado, CC, expresado en %), y el grado de polimerización de los antocianinas (color debido a los pigmentos poliméricos, CP, expresado en %), se determinaron siguiendo el método descrito por Herminos Gutiérrez (2003). El procedimiento resumido fue el siguiente: se ajustó el pH de la muestra a 3,6 con NaOH o HCl y se centrifugó a 2500g durante 15 min. Se tomaron 2 mL de muestra, se adicionaron 20 µL de una solución de acetaldehído al 10% en agua, y después de 45 min. se realizó la medición de absorbancia a 520 nm en cubeta de vidrio de 1 mm ( $A^{acet}$ ). Esta muestra se diluyó 1:20 con una solución simil vino (5 g/L de ácido tartárico; pH 3,6; igual contenido de etanol que la muestra problema) y se realizó la medición de absorbancia a 520 nm en cubeta de vidrio de 1 cm ( $A^{dil}$ ). Paralelamente, se tomaron 2 mL de muestra con pH ajustado, se adicionaron 160 µL de SO<sub>2</sub> al 5% y se realizó la medición de absorbancia a 520 nm en cubeta de vidrio de 1 mm ( $A^{SO_2}$ ). Las mediciones obtenidas se utilizaron en las siguientes ecuaciones:

$$CC (\%) = [A^{acet} - (2 \times A^{dil})] / A^{acet} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

$$CP (\%) = (A^{SO_2} / A^{acet}) \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

- *Índices colorimétricos*: a partir de las mediciones directas de la absorbancia de la muestra a 420, 520 y 620 nm, en cubeta de vidrio de 1 mm, se calcularon los siguientes índices de color (Glories, 1984b):

$$\% \text{ de color amarillo} = (A_{420 \text{ nm}} / IC) \times 1000 \quad (\text{Ec. 5})$$

$$\% \text{ de color rojo} = (A_{520 \text{ nm}} / IC) \times 1000 \quad (\text{Ec. 6})$$

$$\% \text{ de color azul} = (A_{620 \text{ nm}} / IC) \times 1000 \quad (\text{Ec. 7})$$

- *Parámetros de color según método CIELAB*: las coordenadas CIELAB, claridad ( $L^*$ ), saturación ( $C^*$ ), tonalidad/Hue ( $h$ ), intensidad rojo-verde ( $a^*$ ) y amarillo-azul ( $b^*$ ) fueron determinadas empleando el software MSCV® (Ayala et al., 2001), siguiendo las recomendaciones de la Commission Internationale de L'Eclairage (CIE, 1986). La diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) entre dos muestras fue obtenida a través de la siguiente ecuación (Pérez-Magariño y González-Sanjosé, 2003):

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{Ec. 8})$$

- **Índice de gelatina:** se utilizó el método propuesto por Glories (1984b). El procedimiento resumido fue el siguiente: se tomaron 2 tubos de vidrio y se adicionaron 10 mL de muestra a cada uno. Se agregó 1 mL de agua a uno de los tubos (*T1*) y 1 mL de una solución acuosa (70 g/L de gelatina) al restante (*T2*). Se almacenaron durante 72 h a 3-6 °C, se centrifugaron a 2500g durante 10 min., y se determinó la concentración de proantocianidinas en el sobrenadante de ambos tubos (Porter et al., 1986). El índice de gelatina fue calculado según la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de gelatina (IG, \%)} = [(T1 - T2) / T1] \times 100 \quad (\text{Ec. 9})$$

### 6.3. Determinación de antocianinas individuales

La caracterización y cuantificación de antocianinas individuales se realizó siguiendo la metodología detallada en el ítem 4.5. La concentración de cada compuesto fue expresada en miligramos de Mv3gl por litro de vino (Mv3gl, mg/L).

### 6.4. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

La caracterización y cuantificación de fenoles no-antociánicos se realizó siguiendo la metodología detallada en el ítem 4.6. Inicialmente, se efectuó una purificación y concentración de los mismos mediante la aplicación de la técnica de extracción líquido-líquido (Peña-Neira et al., 2007; Obreque-Slier et al., 2010) sobre 50 mL de vino, siguiendo el procedimiento detallado en el ítem 4.6. La concentración de cada compuesto fue expresada en miligramos por litro de vino (mg/L).

### 6.5. Análisis de flavanoles

#### 6.5.1. Fraccionamiento de flavanoles en monómeros, oligómeros y polímeros

Las muestras de vino fueron sometidas al fraccionamiento de flavanoles mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE), siguiendo el método propuesto por Sun et al. (1998a). El procedimiento resumido fue el siguiente: se tomaron 5 mL de vino (*M*) previamente centrifugados (15 min., 2038g) y se concentraron a sequedad en un evaporador al vacío. El extracto obtenido se disolvió en 20 mL de buffer fosfato (67 mM, pH 7). Paralelamente, se preparó el sistema de SPE constituido por dos cartuchos Sep-Pak C<sub>18</sub> acoplados en serie (900 mg y 400 mg de adsorbente en la parte superior e inferior, respectivamente), los cuales se acondicionaron de forma secuencial con metanol (10 mL), agua (2 x 10 mL), y buffer fosfato (10 mL). Se realizó el pasaje de la muestra a través de los cartuchos (2 mL/min.), seguido por la adición de 10 mL de buffer para eliminar interferencias. Los cartuchos se secaron durante 2 h con nitrógeno gaseoso. Se efectuó la elución de las fracciones monoméricas y oligoméricas de flavanoles (FI y FII) mediante la adición de 25 mL de acetato de etilo, seguido por la elución de la fracción polimérica (FIII) con 15 mL de metanol. La fracción de acetato de



etilo se evaporó a sequedad bajo vacío, se redisolvió en 20 mL de buffer y se volvió a depositar en el mismo sistema SPE, reacondicionado según lo descrito anteriormente. Los cartuchos se secaron nuevamente con nitrógeno y se realizó la elución secuencial de la FI y la FII con 25 mL de éter etílico y 15 mL de metanol, respectivamente. Las tres fracciones (FI, FII y FIII) se evaporaron a sequedad y se redisolviéron finalmente en 5 mL de metanol (*DI*, *DII* y *DIII*) para su análisis.

El contenido total de flavanoles de cada fracción fue determinado mediante el ensayo con vainillina descrito por Sun et al. (1998b), y empleando el instrumental descrito en el ítem 2.1. El procedimiento resumido fue el siguiente: se tomaron 2 tubos de vidrio y se adicionaron, a cada uno, 1 mL de muestra (*DI*, *DII* o *DIII*) y 2,5 mL de la solución A (ácido sulfúrico/metanol, 25:75, v/v). A uno de ellos se le agregó 2,5 mL de la solución B (vainillina/metanol, 1:99, p/v), y al restante 2,5 mL de metanol (control). Los tubos se mantuvieron a 30 °C durante 15 min. (FI) y por un período de tiempo suficiente para alcanzar la máxima reacción (FII y FIII), y se efectuó la medición de absorbancia a 500 nm. Los análisis fueron realizados por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo a través de curvas de calibración preparadas a partir de (+)-catequina y procianidinas oligoméricas y poliméricas purificadas de semillas de uva, según lo descrito por Sun et al. (1998b y 2001b). Los resultados de cada fracción fueron expresados en mg/L, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{Monómeros (mg/L)} = (A_{500\text{ nm}} \times DI) / (0,0037 \times M) \quad (\text{Ec. 10})$$

$$\text{Oligómeros (mg/L)} = (A_{500\text{ nm}} \times DII) / (0,0046 \times M) \quad (\text{Ec. 11})$$

$$\text{Polímeros (mg/L)} = (A_{500\text{ nm}} \times DIII) / (0,0081 \times M) \quad (\text{Ec. 12})$$

Donde,  $A_{500\text{ nm}}$  es la diferencia entre la absorbancia de la muestra y el control.

### 6.5.2. Análisis de proantocianidinas mediante floroglucínólisis

La determinación de la composición monomérica y del grado medio de polimerización (*mDP*) de las proantocianidinas en las muestras de vino se realizó siguiendo el método propuesto por Kennedy y Jones (2001). El procedimiento resumido fue el siguiente: se tomaron 5 mL de vino previamente centrifugados (15 min., 2038g) y se concentraron a sequedad en un evaporador al vacío. El extracto obtenido se disolvió en 3 mL de agua, y se sembró en un cartucho Sep-Pak C<sub>18</sub> (900 mg), previamente acondicionado con 10 mL de metanol y 15 mL de agua. Luego, se adicionaron 10 mL de agua para eliminar interferencias y se procedió a la elución de las proantocianidinas con 6 mL de metanol, seguido por la evaporación a sequedad y posterior redisolución en 1 mL de metanol. Finalmente, se tomaron 100 µL de este extracto y se adicionaron 100 µL de solución de floroglucínol (HCl 0,2 N en metanol, 100 g/L de floroglucínol, 20 g/L de ácido ascórbico), manteniendo la reacción durante 20 min. a 50 °C. Transcurrido este tiempo, se añadió 1 mL de solución acuosa de acetato de sodio (40 mM) para detener la reacción. La muestra obtenida fue analizada por HPLC-DAD (Kennedy y Jones, 2001), empleando el instrumental descrito en el ítem 2.1. Paralelamente, se analizó la

muestra sin adición de floroglucinol con el propósito de medir el contenido de monómeros naturalmente presente en el vino. La separación de compuestos fue realizada en fase reversa mediante una columna C<sub>18</sub> Zorbax Eclipse Plus (150 mm x 4,6 mm I.D., 5 µm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estados Unidos) a 25 °C. Se empleó un gradiente de dos solventes: A (agua/ácido acético, 99:1, v/v) y B (metanol), aplicados con un flujo de 1 mL/min.; según el siguiente programa: 5% B durante 10 min., 5-20% B desde 10 a 30 min., 20-40% B desde 30 a 55 min., finalizando con un lavado con 90% B durante 10 min. y posterior restablecimiento de condiciones iniciales hasta equilibrar el sistema. La detección fue realizada en todo el espectro comprendido entre 210 y 400 nm. La identificación de (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y (-)-epicatequina-3-galato fue realizada por HPLC-TOF, según el procedimiento descrito por Kontoudakis et al. (2011b). Los análisis fueron realizados por triplicado.

El número de subunidades terminales fue considerado como la diferencia entre la totalidad de monómeros medidos en condiciones normales (con adición de floroglucinol) y los obtenidos sin la adición de floroglucinol. El número de subunidades de extensión fue considerado como la sumatoria de todos los aductos de flavanoles con floroglucinol. El grado medio de polimerización (*mDP*) fue calculado por el cociente entre la totalidad de las subunidades identificadas (terminales y extensión, en moles) y las subunidades terminales (en moles). La concentración total de proantocianidinas fue obtenida mediante la suma de todas las subunidades terminales y de extensión. Debido a que la reacción de floroglucinólisis no es completa, el rendimiento real de la reacción fue medido empleando el dímero puro B2 [(-)-epicatequina-(4β→8)-(-)-epicatequina]. El rendimiento obtenido fue utilizado en la determinación de la concentración total de proantocianidinas. El porcentaje de galoilación (%*G*) se obtuvo por el cociente entre la totalidad de flavanoles galoilados y la totalidad de flavanoles identificados. Finalmente, el peso molecular promedio (*aMW*) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$aMW = mDP \times [288 + (152 \times \%G) / 100] + 2 \quad (\text{Ec. 13})$$

## 6.6. Análisis de polisacáridos

### 6.6.1. Extracción de polisacáridos de la matriz vino

Las muestras de vino fueron procesadas empleando la metodología propuesta por Ayestarán et al. (2004). El procedimiento resumido fue el siguiente: se tomaron 10 mL de vino, se centrifugaron (20 min., 9500g, 4 °C), y el sobrenadante se concentró, en un evaporador al vacío, hasta un volumen final de 2 mL. La totalidad de polisacáridos solubles presentes en la muestra se precipitaron por la adición de 10 mL de etanol acidificado (0,3 M HCl en etanol, 4 °C) y posterior almacenamiento durante 24 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se procedió a la centrifugación (10 min., 9000g, 4 °C),

se descartó el sobrenadante, y el pellet obtenido fue lavado 4 veces con etanol (4 mL, 4 °C) para remover las interferencias. Finalmente, el precipitado se disolvió en 1 mL de agua, se congeló a -80 °C, y se liofilizó para su conservación hasta el momento de análisis.

### 6.6.2. Determinación de polisacáridos por HRSEC-RID

Con el fin de determinar la distribución molecular de polisacáridos y cuantificar las distintas fracciones solubles presentes en el vino, se utilizó la técnica cromatográfica de exclusión molecular con detección por índice de refracción (HRSEC-RID) empleando el instrumental descrito el ítem 2.1. La muestra liofilizada (ítem 6.6.1) se resuspendió en 1 mL de solución de formiato de amonio (30 mM), se filtró (0,45 µm), y se inyectó (100 µL) en el sistema cromatográfico. La separación de polisacáridos fue realizada a 20 °C, empleando dos columnas (Shodex OHpak SB-803 HQ y SB-804 HQ; 300 mm x 8 mm I.D.; Showa Denko, Japan) conectadas en serie. Se utilizó una fase móvil constituida por una solución acuosa de formiato de amonio (30 mM), aplicada con un flujo constante de 0,6 mL/min. durante 60 min. Los análisis fueron realizados por triplicado.

Al fraccionar polímeros mediante un sistema cromatográfico de exclusión molecular, las macromoléculas más grandes eluyen antes al no pasar por los poros del empaquetamiento de la columna, mientras que las moléculas más pequeñas eluyen después. La relación entre el peso molecular de los polisacáridos y el tiempo de retención de los mismos mostró una tendencia logarítmica. La distribución de peso molecular de las distintas fracciones de polisacáridos se determinó a través de una curva de calibración con estándares de pululanos y dextranos de diferente peso molecular (ítem 3.1), analizados por triplicado. Se emplearon ambos grupos de patrones para abarcar las diferentes estructuras moleculares presentes en el vino, ya que los pululanos utilizados son polisacáridos lineales, mientras que los dextranos constituyen estructuras ramificadas con cadenas laterales de la misma composición glucídica que el esqueleto principal, y en conjunto permitirían interpretar el comportamiento cromatográfico de los polisacáridos del vino. El peso molecular aparente ( $M_n$ ) se calculó a partir de la siguiente ecuación ( $R^2 = 0,99$ ):

$$\log M_n (KDa) = [(t_R - 43,67) / -4,45] / 1000 \quad (\text{Ec. 14})$$

Donde,  $t_R$  es el tiempo de retención en columna del punto máximo del pico cromatográfico.

Adicionalmente, la cuantificación de polisacáridos se realizó en función del área del pico cromatográfico correspondiente a cada fracción detectado por el RID, empleando el método del estándar externo con estándares comerciales de pectinas y dextranos (ítem 3.1), debido a la imposibilidad de contar con patrones comerciales de los polisacáridos del vino. Se seleccionaron las pectinas por constituir patrones adecuados para cuantificar los polisacáridos de origen vegetal, mientras que los dextranos podrían utilizarse para cuantificar los polisacáridos de origen

microbiológico. Debido a que la técnica cromatográfica empleada no permite separar los polisacáridos en función de su naturaleza química, las fracciones obtenidas en función de su peso molecular podrían contener polisacáridos de origen vegetal, de origen microbiológico o, más probablemente, una mezcla de ambos. Por ello, se realizó una curva de calibración empleando ambos grupos de estándares a través del análisis cromatográfico, por triplicado, de soluciones patrones en el rango comprendido entre 0 y 2 g/L. La concentración de polisacáridos se calculó a partir de la siguiente ecuación ( $R^2 = 0,99$ ):

$$\text{Polisacáridos (g/L)} = (\text{Area} + 12482,5) / 1330597,3 \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde, *Area* es al área del pico cromatográfico correspondiente a cada fracción de polisacáridos.

## 6.7. Evaluación sensorial

### 6.7.1. Análisis descriptivo estructurado

Esta herramienta analítica se utilizó con el objetivo de describir cualitativa y cuantitativamente las características sensoriales de distintos vinos y determinar la naturaleza de sus diferencias, en el caso de ser netamente perceptibles. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se aplicó en la descripción y diferenciación de vinos cvs. Malbec y Cabernet Sauvignon de diferente valor comercial (Capítulo IV).

Todos los vinos fueron evaluados por un grupo de 10 degustadores entrenados (4 mujeres y 6 hombres) pertenecientes a la EEA Mendoza (INTA). Estos degustadores forman parte de un panel de análisis sensorial que participa regularmente en la evaluación de vinos tintos (cvs. Malbec, Cabernet Sauvignon, Merlot, Shiraz, Bonarda) con diferentes características, provenientes de diversos ensayos vitícolas y enológicos. En una sesión de degustación preliminar, los integrantes del panel seleccionaron y definieron por consenso los atributos más uniformes y adecuados para describir los vinos. Estos incluyeron: un atributo visual (intensidad colorante), cuatro de boca (amargor, astringencia, volumen o plenitud y persistencia) y uno general (calidad global). La intensidad de estos atributos se determinó a partir de una escala estructurada de 10 puntos, pudiendo tomar valores desde 1 (ausencia de sensación) hasta 10 (máxima intensidad del atributo). Se realizaron 5 sesiones de aproximadamente 60 minutos cada una, distribuidas en dos sesiones por semana entre las 10:30 y 11:30 horas a.m., durante tres semanas. Durante una sesión, cada miembro del panel evaluó dos bloques constituidos por tres vinos de diferente valor comercial para cada variedad en estudio (un total de 6 vinos por sesión). Las copas correspondientes a cada vino fueron presentadas a los degustadores de manera aleatoria, empleando un código de tres dígitos obtenidos a partir de una tabla de números aleatorios. El análisis sensorial se llevó a cabo en la sala de degustación del Laboratorio de Enología (EEA Mendoza INTA), perfectamente acondicionada para tal

fin. La temperatura de servicio de las muestras fue de 18-20 °C, el volumen de muestra de 30-40 mL y las copas utilizadas de cristal transparente y dimensiones normalizadas (ISO 3591, 1977). Con el fin de determinar la consistencia en la respuesta de los jueces, se repitió una muestra en cada sesión. Durante cada sesión, sólo se informó a los panelistas sobre la variedad de uva de los vinos evaluados en cada bloque.

### 6.7.2. Test triangular

Con el fin de determinar diferencias entre muestras de vino provenientes de distintos tratamientos vitícolas y enológicos, se realizó un Test Triangular de Elección Forzada (Norma IRAM 20008, 1997). El procedimiento resumido fue el siguiente: se presentaron simultáneamente, en forma aleatoria, tres muestras de vino a los degustadores, dos de las cuales eran idénticas (ya que pertenecían al mismo tratamiento) y se indicó a los mismos que identificaran la muestra distinta. La modalidad “forzada” implica que el degustador debe efectuar obligatoriamente una elección, computándose como respuesta incorrecta en el caso de no realizar la elección solicitada. Si el panelista no está seguro de la diferencia, debe elegir una muestra al azar. Por lo tanto, la probabilidad de una respuesta correcta por azar es del 33,3%. Adicionalmente se solicitó a los panelistas que, de ser posible, indicaran la naturaleza de la diferencia percibida (color, aroma, sabor, o todos) de modo cualitativo, sin emplear ninguna escala cuantitativa.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, esta prueba discriminativa se aplicó en la evaluación de la incidencia del aclareo de racimos y de la técnica de sangrado sobre la composición fenólica de vinos Malbec (Capítulos II y III). En ambos casos, las sesiones se realizaron luego de tres meses de estiba en botella, coincidiendo con un período típico para el caso de vinos sin crianza oxidativa (Heatherbell et al., 1997). Inicialmente, el test triangular se utilizó para evaluar la homogeneidad entre las réplicas de cada tratamiento. Posteriormente, se compararon los tratamientos de a pares, sirviendo a los degustadores, de manera aleatoria durante una misma sesión, grupos de tres vinos distribuidos en la cantidad de series necesarias en cada estudio para comparar todos los tratamientos. En el Apartado II.2 (Capítulo II), se evaluaron seis series consecutivas: en la primera serie se comparó el tratamiento codificado como C versus el T1, en la segunda el tratamiento C versus el T2, en la tercera el C versus T3, en la cuarta T1 versus T2, en la quinta T1 versus T3, y en la sexta T2 versus T3. Mientras que en el Capítulo III, se analizó una serie donde se comparó el tratamiento codificado como C versus el T3. El par de tratamientos comparados en cada serie también fue oportunamente aleatorizado. El análisis sensorial se llevó a cabo bajo las mismas condiciones detalladas para el análisis descriptivo (ítem 6.7.1).

## 7. Análisis estadístico

Para la construcción de las curvas de calibración, se comprobó inicialmente que las respuestas instrumentales obtenidas para cada analito (entre sus distintas réplicas y niveles de concentración) cumplieran con los requisitos estadísticos básicos. Es decir, se verificó la normalidad de los datos por el test de Shapiro-Wilks  $W$ , y se evaluó la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Cochran. Posteriormente, se efectuó un análisis de regresión individual para cada analito (respuesta versus concentración). En este análisis se verificó que los residuos del modelo fueran independientes, mediante el test de Durbin-Watson ( $\alpha = 0,05$ ). Los estudios estadísticos se realizaron con un nivel de significancia del 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

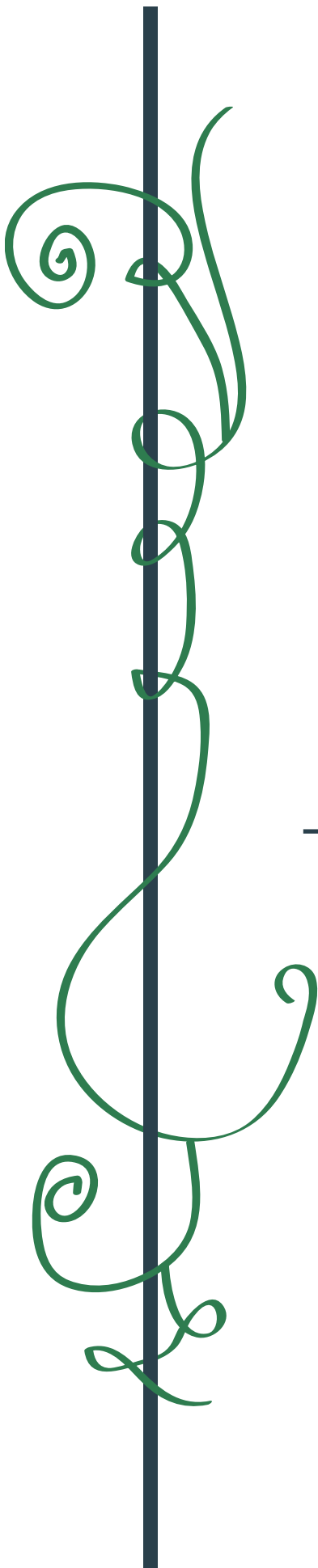
En la evaluación de las muestras problema, se verificó la normalidad de los datos analíticos y la homogeneidad de las varianzas de acuerdo a lo mencionado anteriormente. Los resultados de cada parámetro o analito fueron expresados como la media aritmética de las réplicas con el correspondiente error estándar. Para cada analito en cuestión, se realizó el análisis de varianza unifactorial o multifactorial (ANOVA) y la comparación múltiple de medias por el test de Tukey HSD. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Los estudios estadísticos se realizaron con un nivel de significancia del 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

En el análisis sensorial descriptivo, los resultados de cada atributo evaluado fueron expresados como la media aritmética de las respuestas de los panelistas con el correspondiente error estándar. Para cada atributo en cuestión, se realizó el análisis de varianza unifactorial o multifactorial (ANOVA) y la comparación múltiple de medias por el test de Tukey HSD. En el caso del test triangular, la interpretación de las respuestas para el nivel de significancia seleccionado (5%) fue obtenida según el procedimiento descrito por Roessler et al. (1948).

Con el objetivo de identificar relaciones y/o vínculos entre las muestras analizadas (vinos), se aplicaron herramientas quimiométricas de análisis multivariado. Se utilizó el análisis canónico discriminante (CDA) como método de clasificación supervisado, acoplado al análisis exploratorio de datos de “selección hacia atrás” o “backward selection”. Esta última técnica consiste en partir con todas las variables del estudio y probar la significancia estadística de cada una, eliminando las no significativas, es decir permite reducir el conjunto de datos preservando la máxima cantidad de información original. Mientras que el objetivo del CDA es lograr la mejor separación posible de las muestras en distintos grupos. Este análisis cubre dos aspectos: la determinación de grupos definidos previamente, y la separación de un conjunto de grupos definidos *a priori* por alguna o algunas variables. La determinación de las variables que sirven para discriminar el conjunto de datos se realiza considerando la relación entre las varianzas intra e intergrupo. Una vez obtenida esta relación, se compara con el valor  $F$  de Fisher-Snedecor, teniendo en cuenta los grados de libertad.

Así, el CDA asigna una muestra (vino) a un grupo cuyo promedio es cercano al valor de esta observación (Escofier y Pagès, 1994).

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el software Statgraphics Plus versión 4.0 (Copyright 1994-1999, Statistical Graphics Corp., Warrenton, VA, Estados Unidos).



## **ANEXO II**

### **Publicaciones y Comunicaciones Científicas**

---



Los resultados presentados en la presente Tesis Doctoral han originado hasta la fecha las siguientes publicaciones y comunicaciones científicas:

### Publicaciones en revistas SCI

- ✓ Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., Gómez-Cordovés, C., & Peña-Neira, A. (2012). Phenolic characterisation of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92 (3), 704-718.
- ✓ Fanzone, M., Peña-Neira, A., Gil, M., Jofré, V., Assof, M., & Zamora, F. (2012). Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. *Food Research International*, 45 (1), 402-414.
- ✓ Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., & Peña-Neira, A. (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 (11), 6120-6136.
- ✓ Fanzone, M., Peña-Neira, A., Jofré, V., Assof, M., & Zamora, F. (2010). Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (4), 2388-2397.

### Publicaciones en colaboración, relacionadas con la temática abordada

- ✓ Berli, F.J., Fanzone, M., Piccoli, P., & Bottini, R. (2011). Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of *Vitis vinifera* L. increasing biosynthesis of berry skin polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (9), 4874-4884.

### Comunicaciones a congresos de relevancia nacional e internacional

- ✓ Fanzone, M., Otaiza, I., Jofré, V., Assof, M., Zamora, F., & Peña-Neira, A. Caracterización flavánica de vinos Malbec de diferentes zonas geográficas de Mendoza (Argentina). *XIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Santiago, Chile, Noviembre de 2011 (Póster).
- ✓ Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., & Peña-Neira, A. Composición fenólica de uvas cv. Malbec y Cabernet Sauvignon de distintas zonas vitícolas de Mendoza (Argentina). *XIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Santiago, Chile, Noviembre de 2011 (Póster).
- ✓ Fanzone, M., Rodríguez, F., Jofré, V., Assof, M., Zamora, F., & Peña-Neira, A. Composición fenólica de uvas cv. Malbec del Valle de Uco (Mendoza, Argentina) durante la maduración. Efecto del raleo de racimos. *XIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Santiago, Chile, Noviembre de 2011 (Póster).
- ✓ Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., Gómez-Cordovés, C., & Peña-Neira, A. Composición fenólica de vinos monovarietales de los principales cepajes tintos cultivados en Mendoza (Argentina). *XIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Santiago, Chile, Noviembre de 2011 (Póster).

- ✓ Fanzone, M., Urvieta, R., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., & Peña-Neira, A. Efecto de la técnica de sangrado sobre la composición fenólica de vinos cv. Malbec del Valle de Uco (Mendoza, Argentina). *XIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Santiago, Chile, Noviembre de 2011 (Póster).
- ✓ Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., & Peña-Neira, A. Impacto de la composición química en el valor comercial de vinos cv. Malbec y Cabernet Sauvignon de Mendoza (Argentina). *XIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Santiago, Chile, Noviembre de 2011 (Comunicación oral).
- ✓ Fanzone, M., Jofré, V., Assof, M., & Peña-Neira, A. Composición flavánica de vinos Malbec de diferentes zonas geográficas de Mendoza (Argentina). *1º Simposio Argentino de Viticultura y Enología*, Mendoza, Argentina, Noviembre de 2011 (Póster).
- ✓ Fanzone, M., Rodríguez, F., Jofré, V., Assof, M., Zamora, F., & Peña-Neira A. Efecto del raleo de racimos sobre la composición fenólica de uvas cv. Malbec del Valle de Uco (Mendoza, Argentina). *1º Simposio Argentino de Viticultura y Enología*, Mendoza, Argentina, Noviembre de 2011 (Póster).
- ✓ Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., Gómez-Cordovés, C., & Peña-Neira, A. Diferenciación varietal de vinos tintos de Mendoza (Argentina) de acuerdo a su composición fenólica mediante la aplicación de técnicas quimiométricas. *VI Congreso Argentino de Química Analítica*, Santa Fe, Argentina, Septiembre de 2011 (Póster).
- ✓ Fanzone, M., Jofré, V., Assof, M., Peña-Neira, A., & Zamora, F. Composición antocianica de vinos Malbec provenientes de distintas zonas vitícolas de Mendoza. *XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Montevideo, Uruguay, Noviembre de 2009 (Comunicación oral).
- ✓ Fanzone, M., Jofré, V., Assof, M., & Peña-Neira, A. Efecto del raleo de racimos sobre la composición antocianica de uvas cv. Malbec en el Valle de Uco (Mendoza, Argentina). *XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Montevideo, Uruguay, Noviembre de 2009 (Póster).
- ✓ Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., & Peña-Neira, A. Phenolic characterization of Malbec wines from different zones of Mendoza (Argentina). *Congreso In Vino Analytica Scientia*, Angers, Francia, Julio de 2009 (Póster).

### Comunicaciones a congresos en colaboración, relacionadas con la temática abordada

- ✓ Rodríguez, F., Urvieta, R., Virgillito, P., & Fanzone, M. Efectos del raleo de racimos sobre el rendimiento y la calidad enológica de bayas y vinos cv. Malbec del Valle de Uco (Mendoza, Argentina). *XIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Santiago, Chile, Noviembre de 2011 (Póster).
- ✓ Sturm, M.E., Rojo, M.C., Fanzone, M., Jofré, V., Ramirez, M.L., & Combina, M. Efecto de los ácidos fenólicos sobre el desarrollo y producción de etilfenoles por cepas nativas de *Dekkera bruxellensis*. *XIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Santiago, Chile, Noviembre de 2011 (Comunicación oral).
- ✓ Virgillito, P., Rodríguez, F., Urvieta, R., & Fanzone, M. Efecto del deshoje sobre la concentración de antocianos y taninos en vinos cv. Malbec del Valle de Uco (Mendoza, Argentina). *XIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Santiago, Chile, Noviembre de 2011 (Póster).

- ✓ Berli, F., Fanzone, M., Piccoli, P., & Bottini, R. La radiación solar ultravioleta-B y el ácido abscísico incrementan polifenoles del hollejo en vid cv. Malbec. *1º Simposio Argentino de Viticultura y Enología*, Mendoza, Argentina, Noviembre de 2011 (Póster).
- ✓ Sturm, M.E., Rojo, M.C., Fanzone, M., Jofré, V., Ramirez, M.L., & Combina, M. Relación entre la concentración de ácidos hidroxicinámicos y la síntesis de fenoles volátiles asociados a *Dekkera/Brettanomyces* en vinos tintos. *1º Simposio Argentino de Viticultura y Enología*, Mendoza, Argentina, Noviembre de 2011 (Póster).
- ✓ Jofré, V.P., Assof, M.V., Fanzone, M.L., & Silva, M.F. Perfil volátil odorante de vinos Malbec (Mendoza, Argentina): clasificación de vinos en función de la zona agroecológica de procedencia. *VI Congreso Argentino de Química Analítica*, Santa Fe, Argentina, Septiembre de 2011 (Póster).
- ✓ Bottini, R., Berli, F., Fanzone, M., Piccoli, P., & Alonso, R. ABA and solar UV-B radiation effects on phenolics profile of *Vitis vinifera* L. cv. Malbec berry skins. *20th IPGSA Conference*, Tarragona, España, Julio de 2010 (Póster).
- ✓ Assof, M., Jofré, V., & Fanzone, M. Perfil odorante e identificación de marcadores varietales de vinos cv. Malbec de Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina. XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, Montevideo, Uruguay, Noviembre de 2009 (Comunicación oral).
- ✓ Casassa, F., Catania, C., Sari, S., & Fanzone, M. Año climático o maceración prefermentativa en frío: cuál es el factor determinante? XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, Montevideo, Uruguay, Noviembre de 2009 (Póster).
- ✓ Casassa, F., Catania, C., Sari, S., Fanzone, M., & Jofré, V. Maceración prefermentativa en frío: efectos sobre el perfil antociánico de tres vinos varietales. *XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Montevideo, Uruguay, Noviembre de 2009 (Póster).



## **BIBLIOGRAFIA**

---

- Abad-García, B., Garmón-Lobato, S., Berrueta, L.A., Gallo, B., & Vicente, F. (2009). A fragmentation study of dihydroquercetin using triple quadrupole mass spectrometry and its application for identification of dihydroflavonols in Citrus juices. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 2785-2792.
- Adams, D. (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 249-256.
- Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J.C. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. *Anal. Chim. Acta*, 563, 238-254.
- Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J.C. (2007). Identification of dimeric anthocyanins and new oligomeric pigments in red wine by means of HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>. *J. Mass Spect.*, 42, 735-748.
- Alonso, A.M., Guillén, D.A., Barroso, C.G., Puertas, B., & García, A. (2002). Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5832-5836.
- Amati, A., Piva, A., Castellari, M., & Arfelli, G. (1996). Preliminary studies on the effect of *Oidium tuckeri* on the phenolic composition of grapes and wine. *Vitis*, 35, 149-150.
- Aron, P.M., & Kennedy, J.A. (2007). Compositional investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir during fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 5670-5680.
- Aronson, J., & Ebeler, S.E. (2004). Effect of polyphenol compounds on the headspace volatility of flavors. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55, 13-21.
- Asen, S., Stewart, R.N., & Norris, K.H. (1972). Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11, 1139-1144.
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002a). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Anal. Chim. Acta*, 458, 15-27.
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Le Guerneve, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002b). Structure of new dimeric acetaldehyde malvidin-3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Lett.*, 43, 6151-6153.
- Ayala, F., Echávarri, J.F., & Negueruela, A.I. (1997). A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rose wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48, 357-363.
- Ayala, F., Echávarri, J.F., & Negueruela, A.I. (2001). Universidad de Zaragoza. [http://www.unizar.es/negueruela/html/grupo\\_color.htm](http://www.unizar.es/negueruela/html/grupo_color.htm). Acceso 13 de Mayo de 2011.
- Ayestarán, B., Guadalupe, Z. & León, D. (2004). Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Anal. Chim. Acta*, 513, 29-39.
- Baderschneider, B., & Winterhalter, P. (2001). Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food. Chem.*, 49, 2788-2798.
- Baiano, A., Terracone, C., Gambacorta, G., & La Notte, E. (2009). Phenolic content and antioxidant activity of Primitivo wine: comparison among winemaking technologies. *J. Food Sci.*, 74, C258-C267.

- Bakker, J., & Timberlake, C. (1997). Isolation, identification and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 35-43.
- Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S.J., García-Viguera, C., Reader, H.P., & Watkins, S.J. (1998). Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine. *J. Sci. Food Agric.*, 78, 297-307.
- Baranac, J.M., Petranovic, N.A., & Dimitric-Markovic, J.M. (1996). Spectroscopic study of anthocyanin copigmentation reactions. *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 1333-1336.
- Barcenilla, J., Estrella, I., Gómez-Cordovés, C., Hernández, T., & Hernández, L. (1989). The influence of yeasts on certain non-volatile components of wine. *Food Chem.*, 31, 177-187.
- Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., & Pellerin, P. (2000). Analysis of cell wall neutral sugar composition,  $\beta$ -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant Physiol. Biochem.*, 38, 289-300.
- Baumes, R., Wirth, J., Bureau, S., Gunata, Y., & Razungles, A. (2002). Biogenesis of C<sub>13</sub>-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Anal. Chim. Acta*, 458, 3-14.
- Bautista-Ortín, A.B., Fernández-Fernández, J.I., López-Roca, J.M., & Gómez-Plaza, E. (2007). The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *J. Food Comp. Anal.*, 20, 546-552.
- Bautista-Ortín, A.B., Fernández-Fernández, J.I., López-Roca, J.M., & Gómez-Plaza, E. (2004). Wine-making of high coloured wines: extended pomace contact and run-off of juice prior to fermentation. *Food Sci. Tech. Int.*, 10, 287-295.
- Bavaresco, L., Pezzutto, S., Gatti, M., & Mattivi, F. (2007). Role of the variety and some environmental factors on grape stilbenes. *Vitis*, 46, 57-61.
- Bayonove, C., Baumes, R., Crouzet, J., Günata, Z. (2000). Aromas. En *Enología. Fundamentos Científicos y Tecnológicos*; Flanzy, C. (Ed.), AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, 1st ed., pp. 137-176.
- Berké, B., & De Freitas, V. (2007). A colorimetric study of oenin copigmented by procyanidins. *J. Sci. Food Agric.*, 87, 260-265.
- Berké, B., & De Freitas, V.A.P. (2005). Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin. *Food Chem.*, 90, 453-460.
- Berli, F., D'Angelo, J., Cavagnaro, B., Bottini, R., Wuilloud, R., & Silva, M.F. (2008). Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levels by capillary zone electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 2892-2898.
- Berli, F.J., Fanzone, M., Piccoli, P., & Bottini, R. (2011). Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of *Vitis vinifera* L. increasing biosynthesis of berry skin polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 4874-4884.
- Bertelli, A., Migliori, M., Bertelli, A.A.E., Origlia, N., Filippi, C., Panichi, V., Falchi, M., & Giovannini, L. (2002). Effect of some white wine phenols in preventing inflammatory cytokine release. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 28, 11-15.

- Bishop, P.D., & Nagel, C.W. (1984). Characterization of the condensation product of malvidin-3,5-diglucoside and catechin. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 1022-1026.
- Bogs, J., Downey, M., Harvey, J., Ashton, A., Tanner, G., & Robinson, S. (2005). Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiol.*, 139, 652-663.
- Bogs, J., Ebadi, A., McDavid, D., & Robinson, S.P. (2006). Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiol.*, 140, 279-291.
- Boido, E., García-Marino, M., Dellacassa, E., Carrau, F., Rivas-Gonzalo, J.C., & Escribano-Bailón, M.T. (2011). Characterisation and evolution of grape polyphenol profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat during ripening and vinification. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 17, 383-393.
- Boselli, E., Boulton, R.B., Thorngate, J.H., & Frega, N.G. (2004). Chemical and sensory characterization of DOC red wines from Marche (Italy) related to vintage and grape cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3843-3854.
- Boss, P.K., Davies, C., & Robinson, S.P. (1996a). Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.*, 111, 1059-1066.
- Boss, P.K., Davies, C., & Robinson, S.P. (1996b). Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2, 163-170.
- Boulton, R. (1995). Red wines. En *Fermented Beverages Production*; A.G.H. Lea, & J.R. Piggot (Eds.), Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall: London, pp. 121-158.
- Boulton, R. (1996). A method for the assessment of copigmentation in red wines. Presented at the *Forty-seventh Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture*, Reno, NV, USA.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 67-87.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., & Kunkee, R.E. (2002). Viticultura para elaboradores de vino. En *Teoría y Práctica de la Elaboración del Vino*; Acribia (Ed.): Zaragoza, España; pp. 15-85.
- Bourzeix, M., Weiland, D., Heredia, N., & Desfeux, C. (1986). Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull. OIV*, 59, 669-670, 1171-1254.
- Bozan, B., Tosun, G., & Özcan, D. (2008). Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. *Food Chem.*, 109, 426-430.
- Brouillard, R., & Dangles, O. (1994). Anthocyanin molecular interactions : the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chem.*, 51, 365-371.
- Brouillard, R., Chassaing, A., & Fourgerousse, A. (2003). Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red color wine last so long? *Phytochemistry*, 64, 1179-1186.

Brouillard, R., Wigand, M.C., Dangles, O., & Cheminat, A. (1991). pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine-derivatives. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, 2, 1235-1241.

Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J.M., Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J.I., & Bautista-Ortín, A.B. (2010). Effect of different enological practices on skin and seed proanthocyanidins in three varietal wines. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 11333–11339.

Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J.M., Gil-Muñoz, R., & Bautista-Ortín, A.B. (2011). The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 5450-5455.

Buttrose, M.S., Hale, C.R., & Kliewer, W.M. (1971). Effect of temperature on the composition of 'Cabernet Sauvignon' berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, 22, 71-75.

Cabanis, J.C. (2000). Ácidos orgánicos, sustancias minerales, vitaminas y lípidos. En *Enología. Fundamentos Científicos y Tecnológicos*; Flanzy, C. (Ed.), AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, 1st ed., pp. 43-65.

Cabanis, J.C., Cabanis, M.T., Cheynier, V., & Teissedre, P.L. (2000). Tablas de composición. En *Enología. Fundamentos Científicos y Tecnológicos*; Flanzy, C. (Ed.), AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, 1st ed., pp. 218-231.

Cakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S., & Atanassova, R. (2003). A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15, 2165-2180.

Canals, R., Llaudy, M.C., Canals, J.M., & Zamora, F. (2008). Influence of the elimination and addition of seeds on the colour, phenolic composition and astringency of red wine. *Eur. Food Res. Technol.*, 226, 1183-1190.

Canals, R., Llaudy, M.C., Valls, J., Canals, J.M., & Zamora, F. (2005). Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4019-4025.

Carando, S., Teissedre, P.L., Pascual-Martínez, L., & Cabanis, J.C. (1999). Levels of flavan-3-ols in French wines. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4161-4166.

Carbonneau, A. (1995). La surface foliaire exposée potentielle – guide pour sa mesure. *Progr. Agric. Vitic.*, 112, 204-212.

Carmona, M.J., Chaïb, J., Martínez-Zapater, J.M., & Thomas, M.R. (2008). A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *J. Exp. Bot.*, 59, 2579-2596.

Casassa, F.L. (2007). Efecto de dos variantes de maceración prefermentativa en frío (MPF) sobre la composición y características organolépticas de vinos Malbec. *Tesis para optar el grado de Magíster Scientiae en Viticultura y Enología*. Mendoza, Argentina. 167 p.

Castellarin, S., & Di Gaspero, G. (2007a). Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biol.*, 7, 1-10.



- Castellarin, S.D., Pfeiffer, A., Sivilotti, P., Degan, M., Peterlunger, E., & Di Gaspero, G. (2007b). Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell Environ.*, 30, 1381-1399.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 992-1002.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M.V., Velders, A.H., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2009). Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* cv. Petit Verdot red wine grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 209-219.
- Catania, C., & Avagnina de del Monte, S. (1994). Las Regiones Vitícolas Argentinas. *Rev. Agro Cuyo INTA*, 4, 78-84.
- Catania, C., & Avagnina, S. (2010). Los vinos varietales y espumantes. En *La interpretación sensorial del vino*; Caviar Bleu (Ed.): Mendoza, Argentina; pp. 230-239.
- Cerezo, A.B., Cuevas, E., Winterhalter, P., García-Parrilla, M.C., & Troncoso, A.M. (2010). Anthocyanin composition in Cabernet Sauvignon red wine vinegar obtained by submerged acetification. *Food Res. Int.*, 43, 1577-1584.
- Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T., & Gunata, Z. (2007). Interaction between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem.*, 100, 22-30.
- Chassaing, S., Lefeuvre, D., Jacquet, R., Jourdes, M., Ducasse, L., Galland, S., Grelard, A., Saucier, C., Teissedre, P.L., Dangles, L., & Quideau, S. (2010). Physicochemical studies of new anthocyanellagittannin hybrid pigments: About the origin of the influence of oak C-glycosidic ellagittannins on wine color. *Eur. J. Org. Chem.*, 1, 55-63.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N.; & Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.*, 60, 165-178.
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 223-229.
- Cheyrier, V., & Ricardo Da Silva, J.M. (1991). Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyl tartaric acid and grape polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1047-1049.
- Cheyrier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 298-305.
- Cheyrier, V., Moutounet, M., & Sarni-Manchado, P. (2000). Los compuestos fenólicos. En *Enología. Fundamentos Científicos y Tecnológicos*; Flanzy, C. (Ed.), AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, 1st ed., pp. 114-136.
- Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M. & Teissedre, P.L. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chem.*, 126, 1971-1977.
- CIE. (1986). Colorimetrie, 2nd. Viena. Central Bureau of the Commission Internationale de L'Eclairage. *Publication C.I.E.*, 15, 2.

- Cliff, M.A., King, M.C., & Schlosser, J. (2007). Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Res. Int.*, 40, 92-100.
- Cohen, S.D., Tarara, J.M., & Kennedy, J.A. (2008). Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism. *Anal. Chim. Acta*, 621, 57-67.
- Comuzzo, P., Tat, L., Tonizzo, A., & Battistutta, F. (2006). Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. *Food Chem.*, 99, 217-230.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., & Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1, 1-22.
- Coombe, B.G. (1992). Research on development and ripening of the grape berry. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 101-110.
- Coombe, B.G., & McCarthy, M.G. (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 6, 131-135.
- Coombe, B.J. (1995). Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 1, 104-110.
- Cortell, J.M., & Kennedy, J.A. (2006). Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) Pinot Noir fruit and extraction in a model system. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 8510-8520.
- Cortell, J.M., Halbleib, M., Gallagher, A.V., Righetti, T.L., & Kennedy, J.A. (2005). Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir) and wine proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5798-5808.
- Cosme, F., Ricardo-Da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2009). Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chem.*, 112, 197-204.
- Creasy, G.L., Price, S.F., Lombard, P.B. (1993). Evidence for xylem discontinuity in Pinot noir and Merlot grapes: Dye uptake and mineral composition during berry maturation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 187-192.
- Crespy, A., Bessiere, A., & Pujol, F. (2005). La Cryo-flash: un nouvel outil d'aide à l'obtention de vins fruités. *Revue Française d'Oenologie*, 215, 30-35.
- Da Silva, L., Kretschmar, A., Rufato, L., Brighenti, A., & Schlemper, C. (2008). Load levels in vineyards of Malbec cv. and their effects on evolution and phenolic maturation. *Rev. Bras. Frutic.*, 30, 675-680.
- Dangles, O., Saito, N., & Brouillard, R. (1993). Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*, 34, 119-124.
- Darias-Martín, J., Carrillo, M., Díaz, E., & Boulton R.B. (2001). Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chem.*, 73, 217-220.
- Darias-Martín, J., Martín-Luis, B., Carrillo-López, M., Lamuela-Raventós, R., Díaz-Romero, C., Boulton, R. (2002). Effect of caffeic acid on the color of red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2062-2067.

- Dávalos, A., & Lasunción, M.A. (2009). Health-Promoting Effects of Wine Phenolics. En *Wine Chemistry and Biochemistry*; M.V. Moreno-Arribas, & M.C. Polo (Eds.), Springer: New York, USA, pp. 571-591.
- de Villiers, A., Majek, P., Lynen, F., Crouch, A., Lauer, H., & Sandra, P. (2005). Classification of South African red and white wines according to grape variety based on the non-coloured phenolic content. *Eur. Food Res. Technol.*, 221, 520-528.
- de Villiers, A., Vanhoenacker, G., Majek, P., & Sandra, P. (2004). Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. *J. Chromatogr. A*, 1054, 195-204.
- Delgado, R., Martín, P., del Álamo, M., & González, M.R. (2004). Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilization rates. *J. Sci. Food Agric.*, 84, 623-630.
- Deluc, L.G., Grimplet, J., Wheatley, M.D., Tillett, R.L., Quilici, D.R., Osborne, C., Schooley, D.A., Schlauch, K.A., Cushman, J.C., & Cramer, G.R. (2007). Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics*, 8, 429.
- Di Stefano, R. (1999). Advances in the study of secondary metabolites occurring in grapes and wines. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 25, 53-56.
- Diago, M.P., Vilanova, M., Blanco, J.A., & Tardaguila, J. (2010). Effects of mechanical thinning on fruit and wine composition and sensory attributes of Grenache and Tempranillo varieties (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.*, 16, 314-326.
- Diban, N., Athes, V., Bes, M., & Souchon, I. (2008). Ethanol and aroma compounds transfer study for partial dealcoholization of wine using membrane contactor. *J. Membr. Sci.*, 311, 136-146.
- Dimitric-Markovic, J., Petranovic, N.A., & Baranac, J.M. (2000). A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5530-5536.
- Doco, T., Williams, P., & Cheynier, V. (2007). Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 6643-6649.
- Doco, T., Williams, P., Pauly, M., O'Neill, M.A., & Pellerin, P. (2003). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydr. Polymers*, 53: 253-261.
- Downey, M.O., Dokoozlian, N.K., & Krstic, M.P. (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 257-268.
- Downey, M.O., Harvey, J.S., & Robinson, S.P. (2003a). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 9, 15-27.
- Downey, M.O., Harvey, J.S., & Robinson, S.P. (2003b). Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.*, 9, 110-121.
- Downey, M.O., Harvey, J.S., & Robinson, S.P. (2004). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 10, 55-73.

Ducasse, M.A., Canal-Llauberes, R.S., Lumley, M., Williams, P., Souquet, J.M., Fulcrand, E., Doco, T., & Cheynier, V. (2010). Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chem.*, 118, 369-376.

Dueñas, M., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2006). Formation of anthocyanin-flavanol adducts in model solutions. *Anal. Chim. Acta*, 563, 15-25.

Dufour, C., & Bayonove, C.L. (1999). Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 671-677.

Düring, H., & Davtyan, A. (2002). Development changes of primary processes of photosynthesis in sun- and shade-adapted berries of two grapevine cultivars. *Vitis*, 41, 63-67.

Eiro, M.J., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7461-7466.

Escofier, B., & Pagès, J. (1994). *Análisis factoriales simples y múltiples. Objetivos, métodos e interpretación*. Servicio Editorial, Universidad del País Vasco, Bilbao, España.

Escribano-Bailón, T., Alvarez-García, M., Rivas-Gonzalo, J.C., Heredia, F.J., & Santos-Buelga, C. (2001). Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin 3-O-glucoside and (+)-catechin. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1213-1217.

Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4501-4510.

Esteban, M.A., Villanueva, M.J., & Lissarrague, J.R. (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis Vinifera* L.) grape berries during ripening. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 409-420.

Fanzone, M., Peña-Neira, A., Jofré, V., Assof, M., & Zamora, F. (2010). Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). *J. Agric. Food Chem.*, 58, 2388-2397.

Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., & Peña-Neira, A. (2011). Phenolic composition of Malbec grape skins and seeds from Valle de Uco (Mendoza, Argentina) during ripening. Effect of cluster thinning. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 6120-6136.

Fanzone, M., Zamora, F., Jofré, V., Assof, M., Gómez-Cordovés, C., & Peña-Neira, A. (2012). Phenolic characterisation of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). *J. Sci. Food Agric.*, 92, 504-518.

Fernández, J., Santamaría, C., & Sparza, I. (2006). Chromatic characterization of three consecutive vintages of *Vitis vinifera* red wine. Effect of dilution and iron addition. *Anal. Chim. Acta*, 563, 331-337.

Fernández, O., Martínez, O., Hernández, Z., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2011). Effect of the presence of lysated lees on polysaccharides, color and main phenolic compounds of red wine during barrel ageing. *Food Res. Int.*, 44, 84-91.

Ferreira, V., San Juan, F., Escudero, A., Cullere, L., Fernández-Zurbano, P., Sáenz-Navajas, M.P. & Cacho, J. (2009). Modeling quality of premium Spanish red wines from gas chromatography-olfactometry data. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 7490-7498.

Feuillat, M., Charpentier, C., & Mauhean, A. (2000). Los compuestos nitrogenados. En *Enología. Fundamentos Científicos y Tecnológicos*; Flanzy, C. (Ed.), AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, 1st ed., pp. 97-113.

Fidaleo, M., & Moresi, M. (2006). Electrodialysis applications in the food industry. *Adv. Food Nutr. Res.*, 51, 265-360.

Fournand, D., Vicens, A., Sidhoum, L., Souquet, J.M., Moutounet, M., & Cheynier, V. (2006). Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7331-7338.

Francis, I.L., Sefton, M.A., & Williams, P. (1992). Sensory descriptive analysis of hydrolysed precursor fractions from Semillon, Chardonnay and Sauvignon Blanc grape juices. *J. Sc. Food Agric.*, 59, 511-520.

Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., & Teissedre, P.L. (1995). Principal phenolics phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 890-894.

Fuhrman, B., Lavy, A., & Aviram, M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid lipoperoxidation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61, 549-554.

Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1998). A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, 47, 1401-1407.

Fulcrand, H., Cameira Dos Santos, P.J., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & FabreBonvin, J. (1996). Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1, 735-739.

Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., & Cheynier, V. (2006). Phenolic reactions during winemaking and aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 289-297.

Fuster, A., & Escot, S. (2002). Élevage des vins rouges sur lies fines: choix de la levure fermentaire et ses conséquences sur les interactions polysaccharydés pariétaux/polyphénols. *Rev. Oenol.*, 104, 20-22.

Gao, L., Girard, B., Mazza, G., & Reynolds, A.G. (1997). Changes in anthocyanins and color characteristics of Pinot noir wines during different vinification processes. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2003-2008.

García-Beneytez, E., Cabello, F., & Revilla, E. (2003). Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5622-5629.

García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, C., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2007). Determination of phenolic compounds in wines: influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chem.*, 105, 248-259.

García-Marino, M., Hernández-Hierro, J.M., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, M.T. (2010). Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Anal. Chim. Acta*, 660, 134-142.

- Garde-Cerdán, T., Lorenzo, C., Lara, J.F., Pardo, F., Ancín-Azpilicueta, C., & Salinas, M.R. (2009). Study of the evolution of nitrogen compounds during grape ripening. Application to differentiate grape varieties and cultivated systems. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2410-2419.
- Gawel, R. (1998). Red wine astringency: a review. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 4, 74-95.
- Gawel, R., Iland, P.G., Leske, P.A., & Dunn, C.G. (2001). Compositional and sensory differences in Syrah wines following juice run-off prior to fermentation. *J. Wine Res.*, 12, 5-18.
- Giaquinta, R.T. (1983). Phloem loading of sucrose. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 34, 347-387.
- Gil, C., & Gómez-Cordovés, C. (1986). Tryptophol content of young wines made from Tempranillo, Garnacha, Viura and Airén grapes. *Food Chem.*, 22, 59-65.
- Gil-Muñoz, R., Gómez-Plaza, E., Martínez, A., & López-Roca, J.M. (1997). Evolution of the CIELAB and other spectrophotometric parameters during wine fermentation. Influence of some pre and postfermentative factors. *Food Res. Int.*, 30, 699-705.
- Gil-Muñoz, R., Gómez-Plaza, E., Martínez, A., & López-Roca, J.M. (1999). Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation: influence of grape temperature. *J. Food Comp. Anal.*, 12, 259-272.
- Ginjom, I., D'Arcy, B., Caffin, N., & Gidley, M. (2011). Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. *Food Chem.*, 125, 823-834.
- Ginjom, I.R., D'Arcy, B.R., Caffin, N.A., & Gidley, M.J. (2010). Phenolic contents and antioxidant activities of major Australian red wines throughout the winemaking process. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 10133-10142.
- Giovannoni, J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 725-749.
- Girard, B., Kopp, T.G., Reynolds, A., Cliff, M. (1997). Influence of vinification treatments on aroma constituents and sensory descriptors of Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48, 198-206.
- Glories, Y. (1984a). La couleur des vins rouges. 1ère partie. Les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaiss. Vigne Vin*, 18, 195-217.
- Glories, Y. (1984b). La couleur des vins rouges. 2ème partie. Mesure, origine et interprétation. *Connaiss. Vigne Vin*, 18, 253-271.
- Glories, Y., & Saucier, C. (2000). Tannin evolution from grape to wine. Effects on wine taste. En *Proceedings of the ASEV 50th Anniversary Annual Meeting*; J.M. Rantz (Ed.), ASEV: Davis, CA, pp. 353-355.
- Goldberg, D., Karumanchiri, A., Tsang, E., & Soleas, G. (1998). Catechin and epicatechin concentrations of red wine: regional and cultivar-related differences. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49, 23-34.
- Goldner, M.C., & Zamora, M.C. (2007). Sensory characterization of *Vitis vinifera* cv. Malbec wines from seven viticulture regions of Argentina. *J. Sens. Stud.*, 22, 520-532.
- Gollop, R., Even, S., Colova-Tsolova, V., & Perl, A. (2002). Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. *J. Exp. Bot.*, 53, 1397-1409.

- Gómez, E., Martínez, A., & Laencina, J. (1994). Localization of free and bound aromatic compounds among skin, juice and pulp fractions of some grapes varieties. *Vitis*, 33, 1-4.
- Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *J. Food Compos. Anal.*, 20, 618-626.
- Gómez-Míguez, M., & Heredia, F.J. (2004). Effect of the maceration technique on the relationships between anthocyanin composition and objective color of Syrah wines. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5117-5123.
- Gómez-Míguez, M., González-Manzano, S., Teresa Escribano-Bailón, M., Heredia, F.J., & Santos-Buelga, C. (2006). Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin-3-glucoside. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 5422-5429.
- Gómez-Plaza, E., Romero-Cascales, I., Fernández-Fernández, J.I., & López-Roca, J.M. (2005). The maceration process during winemaking extraction of anthocyanins from grape skins into wine. *Eur. Food Res. Tech.*, 221: 163-167.
- González, G., Nazrala, J., Beltrán, M., Navarro, A., de Borbón, L., Senatra, L., Albornoz, L., Hidalgo, A., López, M., Gez, M.I., Mercado, L., Poetta, S., & Alberto, M. (2009). Characterization of wine grape from different regions of Mendoza (Argentina). *Rev. FCA UNCuyo*, 41, 165-175.
- González-Manzano, S., Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, M.T., & Santos-Buelga, C. (2009). Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chem.*, 114, 649-656.
- González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J.C., & Santos-Buelga, C. (2004). Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta*, 513, 283-289.
- González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Pérez-Alonso, J.J., Rivas-Gonzalo, J.C., & Escribano-Bailón, M.T. (2006). Characterization of the mean degree of polymerization of proanthocyanidins in red wines using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4326-4332.
- González-Neves, G., Charamelo, D., Balado, J., Barreiro, L., Bochicchio, R., Gatto, G., Gil, G., Tessore, A., Carbonneau, A., & Moutounet, M. (2004). Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Anal. Chim. Acta*, 513, 191-196.
- González-Neves, G., Franco, J., Barreiro, L., Gil, G., Moutounet, M., & Carbonneau, A. (2007). Varietal differentiation of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and wines according to their anthocyanic composition. *Eur. Food Res. Technol.*, 225, 111-117.
- González-Neves, G., Gil, G., & Ferrer, M. (2002). Effect of different vineyard treatments on the phenolic contents in Tannat (*Vitis vinifera* L.) grapes and their respective wines. *Food Sci. Tech. Int.*, 8, 315-321.
- Granato, D., Katayama, F.C.U., & de Castro, I.A. (2011). Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chem.*, 129, 366-373.
- Gross, M. (2004). Flavonoids and cardiovascular disease. *Pharm. Biol.*, 42, 21-35.

- Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2008). Changes in the color components and phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. cv. "Tempranillo" during vinification and aging. *Eur. Food Res. Technol.*, 228, 29-38.
- Guebailia, H.A., Chira, K., Richard, T., Mabrouk, T., Furiga, A., Vitrac, X., Monti, J.P., Delaunay, J.C., & Mérillon, J.M. (2006). Hopeaphenol: The first resveratrol tetramer in wines from North Africa. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9559-9564.
- Guendez, R., Kallithraka, S., Makris, D.P., & Kefalas, P. (2005). Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chem.*, 89, 1-9.
- Guidoni, S., Ferrandino, A., & Novello, V. (2008). Effects of seasonal and agronomical practices on skin anthocyanin profile of Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 59, 22-29.
- Guilford, J.M., & Pezzuto, J.M. (2011). Wine and health: a review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 62, 471-486.
- Hagerman, A. E. (1989). Chemistry of tannin-protein complexation. En *Chemistry and significance of condensed tannins*; R.W. Hemingway, & J.J. Karchesy (Eds.), Plenum Press: New York, USA, pp. 323-331.
- Hale, C.R., Coombe, B.G., & Hawker, J.S. (1970). Effects of ethylene and 2-chloroethylphosphonic acid of the ripening of grapes. *Plant Physiol.*, 45, 620-623.
- Harbertson, J.F., Kennedy, J.A., & Adams, D.O. (2002). Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 54-59.
- Harbertson, J.F., Mireles, M.S., Harwood, E.D., Weller, K.M., & Ross, C.F. (2009). Chemical and sensory effects of saignée, water addition, and extended maceration on high brix must. *Am. J. Enol. Vitic.*, 60, 450-460.
- Haselgrove, L., Botting, D., van Heeswijck, R., Hoj, P.B., Dry, P.R., Ford, C., & Iland, P.G. (2000). Canopy microclimate and berry composition: The effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 6, 141-149.
- Haslam, E. (1980). In *Vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines*. *Phytochemistry*, 16, 1625-1670.
- Haslam, E., & Lilley, T. H. (1988). Natural astringency in foodstuffs. A molecular interpretation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 27, 1-40.
- Haslam, E., Lilley, T.H., Warminski, E., Liao, H., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S.H., Goulding, P.N., & Luck, G. (1992). Polyphenol complexation. A study in molecular recognition. En *Phenolic compounds in food and their effects on health. Analysis, occurrence and chemistry*; C.T. Ho, C.Y. Lee, & M.T. Huang (Eds.), American Chemical Society: Washington, DC, pp. 8-50.
- Hayasaka, Y., & Asenstorfer, R.E. (2002). Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 756-761.
- He, J., Santos-Buelga, C., Silva A.M.S., Mateus N., & De Freitas, V. (2006). Isolation and quantification of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments from red wines by combination of column chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A*, 1134, 215-225.



Heatherbell, D., Dicey, M., Goldsworthy, S., & Vanhanen, L. (1997). Effect of prefermentation cold maceration on the composition, colour and flavor of Pinot noir wine. En *Proceedings of the Fourth International Symposium on Cool Climate Viticulture & Enology*; Cornell University Press: New York, VI-10-17.

Herderich, M.J., & Smith, P.A. (2005). Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 11, 205-214.

Hermosín Gutiérrez, I. (2003). Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4079-4083.

Hermosín Gutiérrez, I., Sánchez-Palomo Lorenzo, E., & Vicario Espinosa, A. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chem.*, 92, 269-283.

Hernández, T., Estrella, I., Carlavilla, D., Martín-Alvarez, P.J., & Moreno-Arribas, M.V. (2006). Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Anal. Chim. Acta*, 563, 116-125.

Hernández-Orte, P., Cacho, J.F., & Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2891-2899.

Hmamouchi, M., Es-Safi, N., Lahrichi, M., Fruchier, A., & Essassi, E. M. (1996). Flavones and flavonols in leaves of some Moroccan *Vitis vinifera* cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 186-192.

Holt, H.E., Francis, I.L., Field, J., Herderich, M.J., & Iland, P.G. (2008). Relationships between wine phenolic composition and wine sensory properties for Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.*, 14, 162-176.

Hrazdina, E., & Wagner, G. (1985). Metabolic pathways as enzyme complexes: Evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 237, 88-100.

Hufnagel, J.C., & Hofmann, T. (2008). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 1376-1386.

Hunter, J.J., de Villiers, O.T., & Watts, J.E. (1991). The effect of partial defoliation on quality characteristics of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grapes. II. Skin, skin sugar, and wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 13-18.

Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., & Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J. Food Comp. Anal.*, 21, 589- 598.

Intrigliolo, D.S., & Castel, J.R. (2011). Interactive effects of deficit irrigation and shoot and cluster thinning on grapevine cv. Tempranillo. Water relations, vine performance and berry and wine composition. *Irrig. Sci.*, 29, 443-454.

INV (2008a). Instituto Nacional de Vitivinicultura, Argentina. <http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/registrovinedossuperficie2007total%20pais.pdf>. Acceso 15 de julio de 2008.

INV (2008b). Instituto Nacional de Vitivinicultura, Argentina. <http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/registrovodos2007-mendoza.pdf>. Acceso 15 de julio de 2008.

INV (2009). Instituto Nacional de Vitivinicultura, Argentina. [http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/REGISTRO\\_VINEDOS2009\\_JULIO.pdf](http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/RegistroVinedos/REGISTRO_VINEDOS2009_JULIO.pdf). Acceso 13 de mayo de 2011.

INV (2010a). Instituto Nacional de Vitivinicultura, Argentina. [http://www.inv.gov.ar/noticias/CD-Anuario2009/SINTESIS\\_ACTUALIZADA\\_Julio2010.xls](http://www.inv.gov.ar/noticias/CD-Anuario2009/SINTESIS_ACTUALIZADA_Julio2010.xls). Acceso 28 de noviembre de 2011.

INV (2010b). Instituto Nacional de Vitivinicultura, Argentina. <http://www.inv.gov.ar/PDF/Estadisticas/Exportaciones/Total2010/CompVinyMostHIFobMensual10.PDF>. Acceso 28 de noviembre de 2011.

ISO, International Organization for Standardization (1977) ISO 3591: 1977. Sensory analysis: Apparatus: Wine-tasting glass. Geneva, Switzerland, pp. 1-3.

Jackson, D.I., & Lombard, P.B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality: A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 409-430.

Jéandet, P., Bessis, R., & Gautheron, B. (1991). The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 41-46.

Jeffery, D.W., Parker, M., & Smith, P.A. (2008). Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 14, 153-161.

Jeong, S.T., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S., & Esaka, M. (2004). Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Sci.*, 167, 247-252.

Jofré, V.P. (2011). Determinación de compuestos azufrados en uvas y vinos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas y electroforesis capilar asociadas a metodologías analíticas de extracción y preconcentración. *Tesis para optar el grado de Doctor en Química*. San Luis, Argentina. 238 p.

Jurd, L., & Somers, T.C. (1970). The formation of xanthylum salts from proanthocyanidins. *Phytochemistry*, 9, 419-427.

Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Tzourou, E., & Lanaridis, P. (2006). Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chem.*, 99, 784-793.

Keller, M. (2010). Developmental Physiology. En *The Science of Grapevines. Anatomy and Physiology*; Elsevier Academic Press: USA, pp. 169-225.

Keller, M., Mills, L.J., Wample, R.L., & Spayd, S.E. (2005). Cluster thinning effects on three deficit-irrigated *Vitis vinifera* cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.*, 56, 91-103.

Keller, M., Smith, J.P., Bondada, B.R. (2006). Ripening grape berries remain hydraulically connected to the shoot. *J. Exp. Bot.*, 57, 2577-2587.

Keller, M., Smithyman, R.P., & Mills, L.J. (2008). Interactive effects of deficit irrigation and crop load on Cabernet Sauvignon in an arid climate. *Am. J. Enol. Vitic.*, 59, 221-234.

- Kennedy, J. A., Ferrier, J., Harbertson, J. F., & Peyrot des Gachons, C. (2006a). Analysis of tannins in red wine using multiple methods: correlation with perceived astringency. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 481-485.
- Kennedy, J., Saucier, C., & Glories, Y. (2006b). Grape and wine phenolics: history and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 239-248.
- 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.*, 49, 1740-1746.
- Kennedy, J.A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E.J., & Jones, G.P. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5348-5355.
- Kennedy, J.A., Matthew, M.A., & Waterhouse, A.L. (2002). Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 268-274.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., & Waterhouse, A.L. (2000a). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 6, 244-254.
- Kennedy, J.A., Troup, G.J., Pilbrow, J.R., Hutton, D.R., Hewitt, D., Hunter, C.R., Ristic, R., Iland, P.G., & Jones, G.P. (2000b). Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 6, 244-254.
- Kliewer, W.M. (1977). Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 28, 96-103.
- Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M., & Zamora, F. (2011a). Use of unripe grapes harvested during cluster thinning as a method for reducing alcohol content and pH of wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 17, 230-238.
- Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M., De Freitas, V., & Zamora, F. (2011b). Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chem.*, 124, 767-774.
- Kontoudakis, N., González, E., Gil, M., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M., & Zamora, F. (2011c). Influence of wine pH on changes in color and polyphenol composition induced by micro-oxygenation. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 1974-1984.
- Kruzlicova, D., Mocak, J., Balla, B., Petka, J., Farkova, M., & Havel, J. (2009). Classification of Slovak white wines using artificial neural networks and discriminant techniques. *Food Chem.*, 112, 1046-1052.
- Lambert, S.G., Asenstorfer, R.E., Williamson, N.M., Iland, P.G., & Jones, G.P. (2011). Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chem.*, 125, 106-115.
- Landrault, N., Larronde, F., Delaunay, J.C., Castagnino, C., Vercauteren, J., Merillon, J.M., Gasc, F., Cros, G., & Teissedre, P.L. (2002). Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2046-2052.
- Landrault, N., Pouchet, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G., & Teissedre, P. (2001). Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3341-3348.

- Langcake, P., & Pryce, R.J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Path.*, 9, 77-86.
- Langlois, J., Ballester, J., Campo, E., Dacremont, C., & Dominique, P. (2010). Combining olfactory and gustatory clues in experts judgment of aging potential of red wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 61, 15-22.
- Lenk, S., Buschmann, C., & Pfündel, E. (2007). In vivo assessing flavonols in white grape berries (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot Blanc) of different degrees of ripeness using chlorophyll fluorescence imaging. *Funct. Plant Biol.*, 34, 1092-1104.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., & Caboche, M. (2006). Genetics and biochemistry of seeds flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 405-430.
- Llaudy, M.C., Canals, R., Canals, J.M., & Zamora, F. (2008). Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. *Eur. Food Res. Tech.*, 226, 337-344.
- Llaudy, M.C., Canals, R., Canals, J.M., Rozés, N., Arola, L., & Zamora, F. (2004). New method for evaluating astringency in red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 742-746.
- Lorenzo, C., Pardo, F., Zalacain, A., Luis Alonso, G., & Salinas, M. (2005). Effect of red grapes co-winemaking in polyphenols and color of wines. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7609-7616.
- Lorrain, B., Chira, K., & Teissedre, P.L. (2011). Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chem.*, 126, 1991-1999.
- Makris, D.P., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2006a). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 396-404.
- Makris, D.P., Kallithraka, S., & Mamalos, A. (2006b). Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal phenolic constituents. *Talanta*, 70, 1143-1152.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O., & Amito, M.J. (2002). Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3299-3305.
- Mané, C., Souquet, J.M., Ollé, D., Verriés, C., Véran, F., Mazerolles, G., Cheynier, V., & Fulcrand, H. (2007). Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design: application to the characterization of Champagne grape varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7224-7233.
- Marrs, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M., & Walbot, V. (1995). A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by a maize gene *Bronze-2*. *Nature*, 375, 397-400.
- Masa, A., & Vilanova, M. (2008). Flavonoid and aromatic characterisation of cv. Albarín blanco (*Vitis vinifera* L.). *Food Chem.*, 107, 273-281.
- Masa, A., Vilanova, M., & Pomar, F. (2007). Varietal differences among the flavonoid profiles of white grape cultivars studied by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1164, 291-297.

Mateus, N., Carvalho, E., Carvalho, A.R.F., Melo, A., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Silva, A.M.S., & De Freitas, V. (2003a). Isolation and structural characterization of new acylated anthocyanin-vinyl-flavanol pigments occurring in aging red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 277-282.

Mateus, N., Machado, J., & De Freitas, V. (2002). Developmental changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *J. Sci. Food Agric.*, 82, 1689-1695.

Mateus, N., Marques, S., Gonçalves, A., Machado, J., & De Freitas, V. (2001a). Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro Valley during ripening: influence of cultivation altitude. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 115-121.

Mateus, N., Oliveira, J., Pizarra, J., González-Paramás, A.M., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C., Silva, A.M.S., & De Freitas, V. (2006). A new vinylpyranoanthocyanin pigment occurring in aged red wine. *Food Chem.*, 97, 689-695.

Mateus, N., Oliveira, J., Santos-Buelga, C., Silva, A.M.S., & De Freitas, V. (2004). NMR structural characterization of a new vinylpyranoanthocyanin-catechin pigment (a portisin). *Tetrahedron Lett.*, 45, 3455-3457.

Mateus, N., Silva M.S., A., Vercauteren, J., & De Freitas, V. (2001b). Occurrence of anthocyanin derived pigments in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4836-4840.

Mateus, N., Silva, A.M.S., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C., & De Freitas, V. (2003b). A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1919-1923.

Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., & Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7692-7702.

Mattivi, F., Reniero, F., & Korhammer, S. (1995). Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1820-1823.

Matus Picero, J.T. (2008). Effect of post-veraison sun light exposure on the transcriptional regulation of flavonoid synthesis in grape berry skin (*Vitis vinifera* L., cv. Cabernet Sauvignon). *Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias de la Agricultura*. Santiago, Chile. 214 p.

Matus, J., Loyola, R., Vega, A., Peña-Neira, A., Bordeu, E., Arce-Johnson, P., & Alcalde, J. (2009). Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *J. Exp. Bot.*, 60, 853-867.

Matus, M.S., Rodríguez, J.G., & Ocvirk, M.M. (2006). Raleo de racimos en *Vitis vinifera* cv. Malbec. Efecto sobre los componentes del rendimiento y la composición polifenólica de las bayas. *Rev. FCA UNCuyo*, 38, 105-112.

Mazza, G., & Brouillard, R. (1987). Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.*, 25, 207-225.

McDonald, M.S., Hughes, M., Burns, J., Lean, M.E.J., Matthews, D., & Crozier, A. (1998). Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 368-375.

McRae, J.M., & Kennedy, J.A. (2011). Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: a review of current research. *Molecules*, 16, 2348-2364.

- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2005). Yeast interactions with anthocyanins during red wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 56, 104-109.
- Miguel-Tabares, J.A., Martín-Luis, B., Carrillo-López, M., Díaz-Díaz, E., & Darias-Martín, J. (2002). Effect of altitude on the winemaking potential of Listan Negro and Ruby Cabernet cultivars in the south of Tenerife Island. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 36, 185-194.
- Minussi, R., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G., & Durán, N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem.*, 82, 409-416.
- Mirabel, M., Saucier, C., Guerra, C., & Glories, Y. (1999). Copigmentation in model wine solutions: occurrence and relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, 211-218.
- Monagas, M., & Bartolomé, B. (2009). Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Compounds. En *Wine Chemistry and Biochemistry*; M.V. Moreno-Arribas, & M.C. Polo (Eds.), Springer: New York, USA, pp. 439-456.
- Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. (2005a). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, 85-118.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2005b). Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Eur. Food Res. Technol.*, 220, 607-614.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2005c). Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. II. Non-anthocyanin phenolic compounds. *Eur. Food Res. Technol.*, 220, 331-340.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2006). Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chem.*, 95, 405-412.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2007). Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and colour characteristics of wines. *Food Chem.*, 104, 814-823.
- Monagas, M., Núñez, V., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2003a). Anthocyanin-derived pigments in Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon wines produced in Spain. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54, 163-169.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., & Da Silva, J.R. (2003b). Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6475-6481.
- Monagas, M., Suárez, R., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2005d). Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *Am. J. Enol. Vitic.*, 56, 139-147.
- Montaña, E. (2007). Identidad regional y construcción del territorio en Mendoza (Argentina): memorias y olvidos estratégicos. *Bulletin de l'Institut Français d'Études Andines*, 36, 277-297.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Calderón, F., & Suárez, J.A. (2006). Effects of pH, temperature and SO<sub>2</sub> on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *Int. J. Food Microbiol.*, 106, 123-129.

- Morel-Salmi, C., Souquet, J.M., Bes, M., & Cheynier, V. (2006). Effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4270-4276.
- Moreno, A., Castro, M., & Falqué, E. (2008). Evolution of *trans*- and *cis*-resveratrol content in red grapes (*Vitis vinifera* L. cv Mencía, Albarello and Merenza) during ripening. *Eur. Food Res. Technol.*, 227, 667-674.
- Moreno-Arribas, M.V., & Polo, M.C. (2009). Amino Acids and Biogenic Amines. En *Wine Chemistry and Biochemistry*; M.V. Moreno-Arribas, & M.C. Polo (Eds.), Springer: New York, USA, pp. 163-189.
- Moreno-Arribas, M.V., Pozo-Bayón, M.A., & Polo, M.C. (2009). Peptides. En *Wine Chemistry and Biochemistry*; M.V. Moreno-Arribas, & M.C. Polo (Eds.), Springer: New York, USA, pp. 191-212.
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., & Hashizume, K. (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J. Exp. Bot.*, 58, 1935-1945.
- Mori, K., Sugaya, S., & Gemma, H. (2005). Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci. Hortic.*, 105, 319-330.
- Murray, N.J., Williamson, M.P., Lilley, T.H., & Haslam, E. (1994). Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by 1H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, 219, 923-935.
- Nadal, M., & Arola, L. (1995). Effects of limited irrigation on the composition of must and wine of Cabernet Sauvignon under semiarid conditions. *Vitis*, 34, 151-154.
- Norma IRAM 20008. (1997). Análisis sensorial. Metodología. Ensayo triangular.
- Nunan, K.J., Sims, I.M., Bacic, A., Robinson, S.P., & Fincher, G.B. (1998). Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiol.*, 118, 783-792.
- Núñez, V., Monagas, M., Gómez-Cordovés, M.C., & Bartolomé, B. (2004). *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biol. Technol.*, 31, 69-79.
- Obreque-Slier, E., Peña-Neira, A., López-Solís, R., Zamora-Marín, F., Ricardo-Da Silva, J.M., & Laureano, O. (2010). Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 3591-3599.
- OIV (2010a). Organización Internacional de la Viña y el Vino. Estadísticas del sector vitivinícola mundial. <http://www.oiv.int/oiv/info/esstatistiquessecteurvitivinicole#bilan>. Acceso 28 de noviembre de 2011.
- OIV (2010b). Organización Internacional de la Viña y el Vino. [http://news.reseau-concept.net/images/oiv\\_es/Client/DIAPORAMA\\_STATISTIQUES\\_Tbilissi\\_2010\\_EN.ppt](http://news.reseau-concept.net/images/oiv_es/Client/DIAPORAMA_STATISTIQUES_Tbilissi_2010_EN.ppt). Acceso 15 de junio de 2011.
- Ojeda, H. (1999). Influence de la contrainte hydrique sur la croissance du péricarpe et sur l'évolution des phénols des baies de raisins (*Vitis vinifera* L.) cv. Syrah. *Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier*. Francia. 161 p.

Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., & Deloire, A. (2002). Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 261-267.

Ojeda, H., Catania, C.D., & Avagnina de Del Monte, S. (1994). Efecto de prácticas de manejo de canopia sobre la expresión vegetativa, rendimiento, composición del fruto y características del vino en cepas de la cv. Malbec. *Actas VI Congreso Latinoamericano de Viticultura & Enología*, Santiago, Chile.

Oliveira, M. (1998). Calculation of budbreak and flowering base temperatures for *Vitis vinifera* cv. Touriga Francesa in the Douro Region of Portugal. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49, 74-78.

Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J.M., López-Roca, J.M., & Gómez-Plaza, E. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Anal. Chim. Acta*, 563, 26-32.

Otteneder, H., Marx, R., & Zimmer, M. (2004). Analysis of the anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Portugieser wines provides an objective assessment of the grape varieties. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 10, 3-7.

Ough, C.S., & Nagaoka, R. (1984). Effect of cluster thinning and vineyard yields on grape and wine composition and wine quality of Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.*, 35, 30-34.

Pandolfi, C. (2000). El Malbec en cifras. Una realidad para reflexionar. *Jornadas Encuentro con el Malbec 2000*. Estación Experimental Agropecuaria Mendoza, INTA, 6 y 7 de abril. Mendoza, Argentina.

Park, J.W., Choi, Y.J., Jang, M.A., Lee, Y.S., Jun, D.Y., Suh, S.I., Baek, W.K., Suh, M.H., Jin, I.N., & Kwon, T.K. (2001). Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells. *Cancer Lett.*, 163, 43-49.

Peinado, R.A., Moreno, J., Bueno, J.E, Moreno, J.A., & Mauricio, J.C. (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chem.*, 84, 585-590.

Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., & Noble, A.C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 1123-1128.

Pellerin, P., & Cabanis, J.C. (2000). Los glúcidos. En *Enología. Fundamentos Científicos y Tecnológicos*; Flanzky, C. (Ed.), AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, 1st ed., pp. 66-96.

Peña-Neira, A., Cáceres, A., & Pastenes, C. (2007). Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of clusters thinning and vineyard yield. *Food Sci. Tech. Int.*, 13, 153-158.

Peña-Neira, A., Dueñas, M., Duarte, A., Hernández, T., Estrella, I., & Loyola, E. (2004). Effects of ripening stages and of plant vegetative vigor on the phenolic composition of grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon in the Maipo Valley (Chile). *Vitis*, 43, 51-57.

Peña-Neira, A., Hernández, T., García-Vallejo, C., Estrella, I., & Suarez, J. (2000). A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origins. *Eur. Food Res. Technol.*, 210, 445-448.



- Pereira, G.E., Gaudillere, J.P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., & Rolin, D. (2006). Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6765-6775.
- Pérez-Lamela, C., García-Falcón, M.S., Simal-Gándara, J., & Orriols-Fernández, I. (2007). Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chem.*, 101, 601-606.
- Pérez-Magariño, S., & González-Sanjosé, M.L. (2001). Differentiation parameters of Ribera del Duero wines from other Spanish denominations of origin. *Food Sci. Technol. Int.*, 7, 237-244.
- Pérez-Magariño, S., & González-Sanjosé, M.L. (2003). Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. *Food Chem.*, 81, 301-306.
- Perrone, G., Nicoletti, I., Pascale, M., De Rossi, A., De Girolamo, A., & Visconti, A. (2007). Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol-related compounds in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 6807-6812.
- Petrie, P.R., & Clingeleffer, P.R. (2006). Crop thinning (hand versus mechanical), grape maturity and anthocyanin concentration: outcomes from irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) in a warm climate. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 12, 21-29.
- Petrie, P.R., Trought, M.C.T., & Stanley Howell, G. (2000). Growth and dry matter partitioning of Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) in relation to leaf area and crop load. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 6, 40-45.
- Peynaud, E. (1984). *Knowing and making wine*; John Wiley & Sons Ltd. (Ed.): New York, USA; pp. 416.
- Pinelo-Jiménez, M., Arnous, A., & Meyer, A.S. (2006). Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Tech.*, 17: 579-590.
- Pirie, A.J.G., & Mullins, M.G. (1980). Concentration of phenolics in the skin of grape berries during fruit development and ripening. *Am. J. Enol. Vitic.*, 31, 34-36.
- Poni, S., Bernizzoni, F., Civardi, S., & Libelli, N. (2009). Effects of pre-bloom leaf removal on growth of berry tissues and must composition in two red *Vitis vinifera* L. cultivars. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 15, 185-193.
- Porter, L. J., Hritsch, L.N., & Chan, B.G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223-230.
- Poustka, F., Irani, N., Feller, A., Lu, Y., Pourcel, L., Frame, K., & Grotewold, E. (2007). A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein-sorting route in *Arabidopsis* and contributes to the formation of vacuolar inclusions. *Plant Physiol.*, 145, 1323-1335.
- Pozo-Bayón, M.A., Hernández, M.T., Martín-Alvarez, P.J., & Polo, M.C. (2003). Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2089-2095.
- Prajitna, A., Dami, I.E., Steiner, T.E., Ferree, D.C., Scheerens, J.C., & Schwartz, S.J. (2007). Influence of cluster thinning on phenolic composition, resveratrol, and antioxidant capacity in Chambourcin wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 58, 246-350.

- Pridham, J. (1965). Low molecular weight phenols in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 16, 13-16.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheyrier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochem.*, 36, 781-784.
- Puertas, B., Guerrero, R.F., Jurado, M.S., Jiménez, M.J., & Cantos-Villar, E. (2008). Evaluation of alternative winemaking processes for red wine color enhancement. *Food Sci. Tech. Int.*, 14, 21-27.
- Puértolas, E., Hernández-Orte, P., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Improvement of winemaking process using pulsed electric fields at pilot-plant scale. Evolution of chromatic parameters and phenolic content of Cabernet Sauvignon red wines. *Food Res. Int.*, 43, 761-766.
- Quideau, S., Jourdes, M., Lefeuvre, D., Montaudon, D., Saucier, C., Glories, Y., Pardon, P., & Pourquier, P. (2005). The chemistry of wine polyphenolic C-glycosidic ellagitannins targeting human topoisomerase II. *Chem. Eur. J.*, 11, 6503-6513.
- Quideau, S., Jourdes, M., Saucier, C., Glories, Y., Pardon, P., & Baudry, C. (2003). DNA topoisomerase inhibitor acutissimin A and other flavano-ellagitannins in red wine. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 6012-6014.
- Rapp, A., & Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia*, 42, 873-884.
- Razungles, A. (2006). Vinification traditionnelle en rouge: traitement de la vendange, macération et extraction. *Le Progrès Agricole et Viticole*, 9, 179-184.
- Reeve, J.R., Carpenter-Boggs, L., Reganold, J.P., York, A.L., McGourty, G., & McCloskey, L.P. (2005). Soil and winegrape quality in biodynamically and organically managed vineyards. *Am. J. Enol. Vitic.*, 56, 367-376.
- Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523-1526.
- Rentzsch, M., Wilkens, A., & Winterhalter, P. (2009). Non-flavonoid Phenolic Compounds. En *Wine Chemistry and Biochemistry*; M.V. Moreno-Arribas, & M.C. Polo (Eds.), Springer: New York, USA, pp. 509-527.
- Revilla, E., & Ryan, J.M. (2000). Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection without sample preparation. *J. Chromatogr. A*, 881, 461-469.
- Revilla, E., Carpena, O., & Mataix, J.J. (1985). Leaf polyphenolic composition of two grape vine cultivars (Airen Cencibel) during ripening. *An. Edafol. Agrobiol.*, 44, 787-797.
- Revilla, E., García-Beneytez, E., & Cabello, F. (2009). Anthocyanin fingerprint of clones of Tempranillo grapes and wines made with them. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 15, 70-78.
- Revilla, I., & González-Sanjosé, M.L. (2003). Compositional changes during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivate levels. *Food Chem.*, 80, 205-214.
- Reynolds, A.G., Pearson, E.G., De Savigny, C., Coventry, J., & Strommer, J. (2007). Interactions of vine age and reflective mulch upon berry, must, and wine composition of five *Vitis vinifera* cultivars. *Int. J. Fruit Sci.*, 7, 85-119.

Ribéreau-Gayon, P. (1985). The chemistry of red wine color. En *The Chemistry of Winemaking*; Webb, A.D. (Ed.); American Chemical Society: Washington, DC; Vol. 137, pp. 50-87.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2000). Phenolic compounds. En *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*; John Wiley & Sons Ltd. (Ed.); Chichester, U.K.; Vol. 2, pp. 129-186.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006a). Red Winemaking. En *Handbook of enology, The Microbiology of Wine and Vinifications, 2<sup>nd</sup> Edition*; John Wiley & Sons Ltd. (Ed.); Chichester, U.K.; Vol. 1, pp. 327-385.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006b). Phenolic compounds. En *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2<sup>nd</sup> Edition*; John Wiley & Sons Ltd. (Ed.); Chichester, U.K.; Vol. 2, pp. 129-186.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006c). Carbohydrates. En *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2<sup>nd</sup> Edition*; John Wiley & Sons Ltd. (Ed.); Chichester, U.K.; Vol. 2, pp. 65-90.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006d). The Grape and its Maturation. En *Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications, 2<sup>nd</sup> Edition*; John Wiley & Sons Ltd. (Ed.); Chichester, U.K.; Vol. 1, pp. 241-297.

Ricardo Da Silva, J.M., Cheynier, V., Souquet, J.M., Moutounet, M., Cabanis, J.C., & Bourzeix, M. (1991). Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *J. Sci. Food Agric.*, 57, 111-125.

Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model-effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 16, 17-23.

Ristic, R., & Iland, P.G. (2005). Relationships between seed and berry development of *Vitis Vinifera* L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 11, 43-58,

Ristic, R., Bindon, K., Francis, L.I., Herderich, M.J., & Iland, P.G. (2010). Flavonoids and C<sub>13</sub>-norisoprenoids in *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz: relationships between grape and wine composition, wine colour and wine sensory properties. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 16, 369-388.

Rivas-Gonzalo, J.C., Bravo-Haro, S., & Santos-Buelga, C. (1995). Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1444-1449.

Rivas-Gonzalo, J.C., Gutiérrez, Y., Hebrero, E., & Santos-Buelga, C. (1992). Comparisons of methods for the determination of anthocyanins in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 210-214.

Roby, G., & Matthews, M.A. (2004). Relative proportions of seed, skin and flesh in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 10, 74-82.

Roby, G., Harbertson, J.F., Adams, D.O., & Matthews, M.A. (2004). Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: anthocyanins and tannins. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 10, 100-107.

Rodríguez Montealegre, R., Romero Peces, R., Chacón Vozmediano, J.L., Martínez Gascueña, J., & García Romero, E. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 687-693.

Rodríguez, J., Matus, S., Catania, C., & Avagnina de Del Monte, S. (1999). El Malbec, cepaje emblemático de los vinos tintos argentinos. *Vinífera Año IV N° Extraordinario*, 61-64.

Roessler, E.B., Warren, J., & Guymon, J.F. (1948). Significance in triangular taste tests. *J. Food Sci.*, 13, 503-505.

Roggero, J., Coen, S., & Ragonnet, B. (1986). High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 77-83.

Rogiers, S.Y., Greer, D.H., Hatfield, J.M., Orchard, B.A., & Keller, M. (2006). Mineral sinks within ripening grape berries (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 45, 115-123.

Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L., & Polsinelli, M. (1994). Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 118, 213-218.

Romero-Cascales, I., Fernández-Fernández, J.I., López-Roca, J.M., & Gómez-Plaza, E. (2005). The maceration process during winemaking extraction of anthocyanins from grape skins into wine. *Eur. Food Res. Technol.*, 221, 163-167.

Romero-Pérez, A.I., Lamuela-Raventós R.M., Andrés-Lacueva, C., & de la Torre-Boronat, M.C. (2001). Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 210-215.

Romeyer, F.M., Macheix, J.J., Goiffon, J.P., Reminiac, C.C., & Sapis, J.C. (1983). The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 346-349.

Roubelakis-Angelakis, K.A., & Kliewer, W.M. (1986). Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 275-280.

Roubelakis-Angelakis, K.A., & Kliewer, W.M. (1992). Nitrogen metabolism in grapevine. *Hortic. Rev.*, 14, 407-452.

Ruffner, H.P. (1982). Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: A review – Part A. *Vitis*, 21, 247-259.

Sacchi, K.L., Bisson, L.F., & Adams, D.O. (2005). A Review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 56, 197-206.

Sáenz-Navajas, M., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010a). An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chem.*, 121, 1139-1149.

Sáenz-Navajas, M.P., Ferreira, V., Dizy, M., & Fernández-Zurbano, P. (2010b). Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta*, 673, 151-159.

- Sáenz-Navajas, M.P., Tao, Y.S., Dizy, M., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2010c). Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 12407-12416.
- Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W., & Szekeres, T. (2008). Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?. *Mutat. Res.*, 658, 68-94.
- Salas, E., Dueñas, M., Schwarz, M., Winterhalter, P., Cheynier, V., & Fulcrand, H. (2005). Characterization of pigments from different high speed countercurrent chromatography wine fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4536-4546.
- Salas, E., Fulcrand, H., Meude, E., & Cheynier, V. (2003). Reaction of anthocyanin and tannins in model solutions. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7951-7961.
- Santos-Buelga, C., & De Freitas, V. (2009). Influence of phenolics on wine organoleptic properties. En *Wine Chemistry and Biochemistry*; M.V. Moreno-Arribas, & M. C. Polo (Eds.), Springer: New York, USA, pp. 529-560.
- Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E.M., De Pascual-Teresa, S., & Rivas-Gonzalo, J.C. (1999). Contribution to the identification of the pigments responsible for the browning of anthocyanin-flavanol solutions. *Eur. Food Res. Technol.*, 209, 411-415.
- Sanz, M.L., Martínez-Castro, I., & Moreno-Arribas, M.V. (2008). Identification of the origin of commercial enological tannins by the analysis of monosaccharides and polyalcohols. *Food Chem.*, 111, 778-783.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1997). Reactions of polyphenoloxidase generated caftaric acid *o*-quinone with malvidin 3-*O*-glucoside. *Phytochemistry*, 45, 1365-1369.
- Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H., Souillol, V., Souquet, J.M., & Cheynier, V. (1995). Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *J. Sci. Food Agric.*, 69, 385-391.
- Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H., Souquet, J.M., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *J. Food Sci.*, 61, 938-941.
- Scarsi, H.A. (2000). Caracterización vitícola y enológica de 19 clones de Malbec argentinos obtenidos por selección clonal y sanitaria. *Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en Viticultura y Enología*. Mendoza, Argentina. 93 p.
- Schwarz, M., Jerz, G., & Winterhalter, P. (2003a). Isolation and structure of Pinotin A, a new anthocyanin derivative from Pinotage wine. *Vitis*, 42, 105-106.
- Schwarz, M., Wabnitz, T.C., & Winterhalter, P. (2003b). Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3682-3687.
- Shirley, B.W. (1996). Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends Plant Sci.*, 1, 377-382.
- Shrikhande, A.J. (2000). Wine by-products with health benefits. *Food Res. Int.*, 33, 469-474.
- Singh Brar, H., Singh, Z., & Swinny, E. (2008). Dynamics of anthocyanin and flavonol profiles in the Crimson Seedless grape berry skin during development and ripening. *Sci. Hort.*, 117, 349-356.

- Singleton, V. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems: observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38, 69-76.
- Singleton, V.L. (1972). Effects on red wine quality of removing juice before fermentation to simulate variation in berry size. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 63-70.
- Singleton, V.L., Timberlake, C.F., & Lea, A.G.H. (1978). The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *J. Sci. Food Agric.*, 29, 403-410.
- Siret, R., Boursiquot, J.M., Merle, M.H., Cabanis, J.C., & This, P. (2000). Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5035-5040.
- Somers, T.C. (1971). The phenolic nature of wine pigments. *Phytochemistry*, 10, 2175-2186.
- Somers, T.C., & Evans, M.E. (1979). Grape pigment phenomena: interpretation of major colour losses during vinification. *J. Sci. Food Agric.*, 30, 623-633.
- Somers, T.C., & Ziemelis, G. (1985). Flavonol haze in white wines. *Vitis*, 24, 43-50.
- Somers, T.C., Vérette, E., & Pocock, K.F. (1987). Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymatic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.*, 40, 67-78.
- Soto Vázquez, E., Río Segade, S., & Orriols Fernández, I. (2010). Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. *Eur. Food Res. Technol.*, 231, 789-802.
- Souquet, J.M., Cheyrier, V., Brossaud, F., & Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochem.*, 43, 509-512.
- Spayd, S.E., Tarara, J.M., Mee, D.L., & Ferguson, J.C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53, 171-182.
- Stafford, H.A., & Lester, H.H. (1984). Flavan-3-ol biosynthesis. The conversion of (+)-dihydroquercetin and flavan-3,4-*cis*-diol (leucocyanidin) to (+)-catechin by reductases extracted from cell suspension cultures of Douglas fir. *Plant Physiol.*, 76, 184-186.
- Su, T., & Singleton, V.L. (1969). Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry*, 8, 1553-1558.
- Sun, B., & Spranger, M.I. (2005). Changes in phenolic composition of Tinta Miuda red wines after 2 years of ageing in bottle: effect of wine-making technologies. *Eur. Food Res. Technol.*, 221, 305-312.
- Sun, B., Da Silva, J.M.R., & Spranger, M.I. (2001a). Quantification of catechins and proanthocyanidins in several Portuguese grapevine varieties and red wines. *Ciência Téc. Vitiv.*, 16, 23-34.
- Sun, B., Ribes, A.M., Conceição, M., Belchior, A.P., & Spranger, M.I. (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal. Chim. Acta*, 563, 382-390.
- Sun, B., Spranger, I., Roque-do-Vale, F., Leandro, C., & Belchior, P. (2001b). Effect of different winemaking technologies on phenolic composition in Tinta Miúda red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5809-5816.

- Sun, B.S., Leandro, C., Ricardo da Silva, J.M., & Spranger, I. (1998a). Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1390-1396.
- Sun, B.S., Ricardo da Silva, J.M., & Spranger, M.I. (1998b). Critical factors of the vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4267-4274.
- Terrier, N., Poncet-Legrand, C., & Cheynier, V. (2009). Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. En *Wine Chemistry and Biochemistry*; M.V. Moreno-Arribas, & M. C. Polo (Eds.), Springer: New York, USA, pp. 463-496.
- Timberlake, C.F., & Bridle, P. (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 27, 97-105.
- Timperio, A.M., D'Alessandro, A., Fagioni, M., Magro, P., & Zolla, L. (2012). Production of the phytoalexins trans-resveratrol and delta-viniferin in two economy-relevant grape cultivars upon infection with *Botrytis cinerea* in field conditions. *Plant Physiol. Biochem.*, 50, 65-71.
- Tominaga, T., Murat, M.L., Saucier, C., Glories, Y., & Dubourdieu, D. (2003). Effect of anthocyanins on stability of a key odorous compound, 3-mercaptohexan-1-ol, in Bordeaux rosé wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54, 135-138.
- Trousdale, E.K., & Singleton, V.L. (1983). Astilbin and engeletin in grapes and wine. *Phytochemistry*, 22, 619-620.
- Valdés, M.E., Moreno, D., Gamero, E., Uriarte, D., Prieto, M.H., Manzano, R., Picon, J., & Intrigliolo, D. S. (2009). Effects of cluster thinning and irrigation amount on water relations, growth, yield and fruit and wine composition of Tempranillo grapes in Extremadura (Spain). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 43, 67-76.
- Venencie, C., Uveira, M., & Guet, S. (1997). Maturité polyphénolique du raisin. Mise en place d'une méthode d'analyse de routine. *Rev. Franc. Oenol.*, 167, 36-41.
- Vian, M.A., Tomao, V., Coulomb, P.O., Lacombe, J.M., & Dangles, O. (2006). Comparison of the anthocyanin composition during ripening of Syrah grapes grown using organic or conventional agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 5230-5235.
- Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., & Cheynier, V. (2004b). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Qual. Prefer.*, 15, 209-217.
- Vidal, S., Damien, C., Souquet, J.M., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2002). Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2261-2266.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E.J. (2003a). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.*, 83, 564-573.
- Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E. (2004a). Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Anal. Chim. Acta*, 513, 57-65.
- Vidal, S., Meudec, E., Cheynier, V., Skouroumounis, G., & Hayasaka, Y. (2004c). Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7144-7151.

- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P. (2003b). The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydr. Polym.*, 54, 439-447.
- Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M.A., & Pellerin, P. (2001). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: Tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydr. Polym.*, 45, 315-323.
- Vigil, A., Ruiz de Peña y Lillo, A.M., & Vila, H. (2003). Nuevas estructuras de la vitivinicultura argentina. XIX.C Red Ibero-americana de Vitivinicultura. A Vitivinicultura nos Países Ibero-americanos: Impacto económico, social e técnico-científico. J.R. Díaz-Álvarez, O. Laureano (Eds), Programa CYTED Secretaría General, Madrid, España, pp. 7.
- Vilanova, M., Santalla, M., & Masa, A. (2009). Environmental and genetic variation of phenolic compounds in grapes (*Vitis vinifera*) from northwest Spain. *J. Agr. Sci.*, 147, 683-697.
- Vitrac, X., Castagnino, C., Waffo-Tégou, P., Delaunay, J.C., Vercauteren, J., Monti, J.P., Deffieux, G., & Mérillon, J.M. (2001). Polyphenols newly extracted in red wine from southwestern France by centrifugal partition chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5934-5938.
- Vitrac, X., Monti, J.P., Vercauteren, J., Deffieux, G., & Mérillon, J.M. (2002). Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*, 458, 103-110.
- Vivar-Quintana, A.M., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J.C. (2002). Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Anal. Chim. Acta*, 458, 147-155.
- Vivar-Quintana, A.M., Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E., & Rivas-Gonzalo, J.C. (1999). Formation of anthocyanin-derived pigments in experimental red wines. *Food Sci. Technol. Int.*, 5, 347-352.
- Vivas, N., Glories, Y., Lagune, L., Saucier, C., & Augustin, M. (1994). Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au *p*-diméthylaminocinnaldéhyde. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 28, 319-336.
- Von Baer, D., Mardones, C., Gutiérrez, L., Hofmann, G., Becerra, J., Hitschfeld, A., & Vergara, C. (2005). Varietal authenticity verification of Cabernet Sauvignon, Merlot and Carménère wines produced in Chile by their anthocyanin, flavonol and shikimic acid profiles. *Bull. O.I.V.*, 78, 45-57.
- Waterhouse, A.L., Ignelzi, S., & Shirley, J.R. (2000). A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 51, 383-389.
- Waters, E.J., & Colby, C.B. (2009). Proteins. En *Wine Chemistry and Biochemistry*; M.V. Moreno-Arribas, & M.C. Polo (Eds.), Springer: New York, USA, pp. 213-230.
- Watson, B.T., Price, S.F., & Valladao, M. (1995). Effect of fermentation practices on anthocyanin and phenolic composition of Pinot noir wines. *Abstr. Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 404.
- Wildenradt, H.L., & Singleton V.L. (1974). Production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 119-126.
- Xie, D., Sharma, S.B., Paiva, N.L., Ferreira, D., & Dixon, R.A. (2003). Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. *Science*, 299, 396-399.



Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomás-Barberán, F.A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S.S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food Hum. Nutr.*, 59, 113-122.

Yoshida, K., Toyama, Y., Kameda, K., & Kondo, T. (2000). Contribution of each cafferoyl residue of the pigment molecules of gentiodelphin to blue color development. *Phytochemistry*, 54, 85-92.

Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tintos: aspectos científicos y prácticos*; Madrid Vicente A. (Ed.), AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, 225 p.

Zamora, F., Luengo, G., Margalef, P., Magriña, M., & Arola, L. (1994). Nota. Efecto del sangrado sobre el color y la composición en compuestos fenólicos del vino tinto. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.*, 34, 663-671.

Zhao, J., Pang, Y., & Dixon, R.A. (2010). The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization<sup>1</sup>. *Plant Physiol.*, 153, 437-443.

Zimman, A., & Waterhouse, A.L. (2004). Incorporation of malvidin-3-glucoside into high molecular weight polyphenols during fermentation and wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55, 139-146.

Zoecklein, B., Fugelsang, K., Gump, B., & Nury, F. (2001). En *Análisis y Producción de Vino*; Acribia (Ed.): Zaragoza, Spain, 634 p.

Zoecklein, B.W., Hodson, E., McCarthy, B., & Villient, K. (2003). Effect of delestage on Merlot wine quality. *Abstracts for the ASEV Eastern Section 27<sup>th</sup> Annual Meeting. Am. J. Enol. Vitic.*, 54, 139A.