



## FLAVANOLS DE BAYAS Y VINOS Y LA INFLUENCIA DE FACTORES ENOLÓGICOS SOBRE SUS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y SENSORIALES

Alejandro Cáceres Mella

Dipòsit Legal: T.70-2014

**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 VIRGILI

Departament de Bioquímica i Biotecnologia  
Facultat d'Enologia

**TESIS DOCTORAL**

Flavanoles de bayas y vinos y la influencia de  
factores enológicos sobre sus características  
químicas y sensoriales



Alejandro Antonio Cáceres Mella

Tarragona

Julio, 2013

Alejandro Antonio Cáceres Mella

**FLAVANOLS DE BAYAS Y VINOS Y LA INFLUENCIA DE  
FACTORES ENOLÓGICOS SOBRE SUS CARACTERÍSTICAS  
QUÍMICAS Y SENSORIALES**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por

Dr. Joan Miquel Canals Bosch

Dr. Álvaro Peña-Neira

Dr. Remigio López-Solís

Departament de Bioquímica i Biotecnologia

Facultat d'Enologia



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

Tarragona

2013



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. Joan Miquel Canals, professor del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili, el Dr. Álvaro Peña Neira, professor del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile i el Dr. Remigio López-Solís, membre del Programa de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile

#### CERTIFIQUEN

Que aquest treball, titulat "FLAVANOLES DE BAYAS Y VINOS Y LA INFLUENCIA DE FACTORES ENOLÓGICOS SOBRE SUS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y SENSORIALES", que presenta ALEJANDRO CÁCERES MELLA 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, 23 de maig de 2013

Dr. Joan Miquel Canals

Dr. Álvaro Peña Neira

Dr. Remigio López Solís

**Dedicado a**

*Mi madre, Daniela y Rodrigo*

## Agradecimientos

*En esta sección quiero agradecer a todos quienes de una u otra manera estuvieron presentes durante estos años brindándome su apoyo, ayuda y cariño para enfrentar este desafío.*

*A Dios, por su amistad y compañía durante todos estos años. A mi madre Isabel por el cariño incondicional y su apoyo durante estos años de estudio y durante toda mi vida, gracias por tus enseñanzas que me acompañarán por siempre. A mi padre y familia en general, en especial a mis padrinos Emilio y María Angélica y a Paulo. A Rodrigo, abuelita Chela, abuelita Eli y Tío Pato que aunque ya no estén siempre me están cuidando.*

*A Daniela, por su amor, apoyo incondicional, aliento, comprensión y paciencia durante estos años de estudio. Gracias por cuidar de mí. A mi hijo Rodrigo, por ser la alegría de mi vida, por tu sonrisa y el correr a mis brazos luego de volver del trabajo.*

*A mis profesores tutores, Dr. Joan Miquel Canals, Dr. Álvaro Peña-Neira y Dr. Remigio López-Solís, por el invaluable aporte científico y la confianza depositada para concretar este proyecto. Gracias por los consejos brindados a lo largo de estos años, los cuales me hicieron crecer tanto en el ámbito profesional como personal. A Joan Miquel por su amabilidad y por hacer que la distancia no fuera un límite para realizar este trabajo. A Remigio, por su ayuda y buena disposición en contestar mis dudas. A Álvaro, que más puedo decir que agradecer enormemente tu confianza en mí, tus consejos, tu constante preocupación y tu apoyo incondicional.*

*Al Laboratorio de Química Enológica, en nombre de la Sra. Laura Cabello, Laboratorio de Cromatografía en nombre del Sr. Héctor Morales, Sala de Procesos Enológicos en nombre de la Dra. Carla Jara y Sra. Rosita Figueroa y Laboratorio de Evaluación Sensorial en nombre de la Dra. Marcela Medel, pertenecientes al Departamento de Agroindustria y Enología por el apoyo en cuanto al uso de las instalaciones para realizar todos los análisis presentados en esta investigación. Para no olvidarme de nadie también debo agradecer a todos los profesores, alumnos y personal del Departamento de Agroindustria y Enología perteneciente a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, por los gratos momentos compartidos durante estos años de estudio, espero que sigan siendo muchos más. Al Dr. Nikolaos Kontoudakis, Dra. Mireia Esteruelas, Dr. Fernando Zamora y Dr. Albert*

*Mas del Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, por su hospitalidad y amabilidad durante mi estancia en Tarragona. Al Dr. Martín Fanzone por su buena disposición y amistad forjada en Santiago y Mendoza.*

*A Pamela Aviles, Andrés Gálvez, Rafael Campos, Ersán Salas, Jaime Narváez, Jenny Parraguez y Pía Venegas por su incansable trabajo, valiosa ayuda y asistencia técnica en la realización de este trabajo.*

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

*Al Consorcio Tecnológico Tecnovid S.A y a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT), a través de los proyectos Fondecyt Chile n° 1080559 "Flavanols in bitterness and astringency: Its study to improve sensorial quality of Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc Chilean wines" y Fondecyt Chile n° 1110832 "Influence of both polysaccharides, anthocyanins and some technological aspects on the astringency and mouth-feel quality of Chilean wines" por el apoyo económico en la ejecución de este proyecto. Agradezco especialmente a todas las bodegas que aportaron sus instalaciones y vinos para la realización de este trabajo, especialmente a Viña Errázuriz, Viña De Martino y Viña William Fevre, así como también a la empresa Cristalchile S.A.*

*Finalmente agradecer al rock en todas sus expresiones, por expandir mi mente y que hicieron más llevadera la escritura de este trabajo y la lectura de numerosos papers, así como también los largos viajes desde mi casa a la universidad.*

*Muchas gracias a todos!!*

**Alejandro Cáceres Mella**

## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>5</b>  |
| 1. Morfología y composición de la baya.....  | 5         |
| 2. Composición fenólica de uvas y vinos.....   | 9         |
| 2.1. Compuestos no flavonoides.....  | 10        |
| 2.1.1. Ácidos fenólicos.....   | 10        |
| 2.1.2. Estilbenos.....   | 12        |
| 2.2. Compuestos flavonoides.....   | 13        |
| 2.2.1. Flavanoles y flavonas.....  | 13        |
| 2.2.2. Flavonoles.....   | 14        |
| 2.2.3. Antocianinas.....   | 15        |
| 2.2.4. Flavanoles.....   | 17        |
| 3. Biosíntesis de las proantocianidinas en la uva.....   | 19        |
| 3.1. Polimerización de las proantocianidinas durante la maduración de la uva.....  | 21        |
| 4. Fisiología de la maduración de la baya y evolución de las proantocianidinas.....                                      | 23        |
| 4.1. Factores que influyen en la acumulación y síntesis de proantocianidinas durante la maduración de la uva.....        | 25        |
| 5. Evolución de las proantocianidinas durante la vinificación y crianza del vino.....                                    | 27        |
| 5.1. Extracción de proantocianidinas durante la vinificación.....  | 28        |
| 5.2. Cambios en la composición de proantocianidinas durante la vinificación y crianza del vino.....                      | 31        |
| 5.2.1. Procesos enzimáticos.....   | 31        |
| 5.2.2. Reacciones químicas.....  | 32        |
| 5.2.2.1. Copigmentación.....   | 32        |
| 5.2.2.2. Condensación directa antocianina-flavanol y flavanol-flavanol.....  | 33        |
| 5.2.2.3. Condensación antocianina-flavanol y flavanol-flavanol mediada por aldehídos.....                                | 34        |
| 5.2.2.4. Polimerización de las proantocianidinas.....  | 35        |
| 5.2.2.5. Interacciones entre proantocianidinas y otras macromoléculas del vino.....                                      | 36        |
| 5.3. Implicancias sensoriales de las proantocianidinas.....  | 37        |
| 6. Metodologías de cuantificación de proantocianidinas y su relación con la percepción de astringencia.....              | 41        |
| 6.1. Métodos convencionales de análisis de proantocianidinas.....  | 42        |
| 6.2. Métodos cromatográficos de análisis de proantocianidinas.....   | 43        |
| 6.3. Métodos basados en la precipitación de proantocianidinas.....   | 46        |
| 7. La vitivinicultura chilena.....   | 48        |
| 7.1. Breve reseña histórica.....   | 48        |
| 7.2. Antecedentes generales.....   | 50        |
| 7.3. Situación productiva actual.....  | 52        |
| <b>HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....</b>  | <b>57</b> |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>CAPÍTULO 1. Flavanoles en bayas del cv. Cabernet Sauvignon y su relación con la calidad enológica.....</b>            | <b>63</b> |
| Subcapítulo I. Composición fenólica de uvas y vinos del cv. Cabernet Sauvignon y su relación con el valor comercial..... | 65        |



|   |     |
|---|-----|
| <b>CAPÍTULO 2.</b> Flavanoles en vinos: Comparación de métodos analíticos y relación entre composición química y calidad sensorial..... | 89  |
| Subcapítulo II.1. Cuantificación de proantocianidinas en vinos y su relación con la astringencia percibida.....                         | 92  |
| Subcapítulo II.2. Composición química de vinos comerciales y su relación con el precio de venta.....                                    | 112 |
| Subcapítulo II.3. Proantocianidinas en vinos tintos y su relación con la aceptabilidad de los consumidores.....                         | 125 |
| <b>CAPÍTULO 3.</b> Factores enológicos y su influencia sobre la composición de flavanoles en vinos blancos y tintos.....                | 139 |
| Subcapítulo III.1. Efecto de diferentes tratamientos enológicos sobre la composición fenólica de vinos Sauvignon Blanc.....             | 141 |
| Subcapítulo III.2. Mezcla de vinos tintos y su efecto sobre la composición fenólica y características sensoriales.....                  | 161 |
| <b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....  | 183 |
| <b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b> .....  | 193 |
| <b>ANEXO I.</b> Desarrollo experimental. Materiales y métodos.....  | 199 |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | 215 |



## **Introducció**

El vino es uno de los alimentos más complejos presentes en la dieta humana, conteniendo variados constituyentes orgánicos e inorgánicos. Entre estos constituyentes se encuentran los compuestos fenólicos los cuales en el último tiempo han suscitado un gran interés debido a los beneficios para la salud humana que tiene su consumo moderado dentro de una dieta normal, ayudando a la prevención de diversas enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. La importancia de los compuestos fenólicos en el vino no solo radica en su efecto benéfico para la salud, sino que también en que estos compuestos son los responsables de importantes características sensoriales tales como el color, la astringencia y el amargor, propiedades relacionadas directamente con la calidad final del producto. La astringencia y el amargor se producen por la presencia de flavanoles o también llamados proantocianidinas, ante lo cual para producir vinos de buena calidad y para obtener las características deseadas de astringencia y amargor equilibrados en este, es esencial el estudio de los flavanoles y sus fracciones en uvas y vinos y su comportamiento en cuanto a las características sensoriales percibidas por el consumidor. En esta primera parte se caracteriza la morfología y la composición química de la baya de uva, que es la materia prima para la elaboración de vinos.

## **1. Morfología y composición química de la uva**

La planta de vid presenta una serie de frutos (bayas) los cuales se agrupan en racimos y estos frutos (uvas) a su vez, se organizan en una estructura herbácea o leñosa conocida como escobajo o raspón. Cada baya se encuentra unida al escobajo por medio de una estructura vegetal de pequeño tamaño conocida como “pedicelo”, por el cual ingresan a la baya los vasos conductores que suministran el agua y nutrientes a la misma (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

Las bayas están constituidas por un grupo de tejidos (pericarpio) que rodea y protege a 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 esta constituido por la cutícula, que se encuentra recubierta por una capa cerosa denominada pruina, la cual cumple la función de proteger a la baya de las condiciones climáticas, disminuyendo la evaporación de la misma y reteniendo los microorganismos nativos. Luego de la cutícula hacia el interior se encuentra la epidermis, compuesta por dos capas de células alargadas en posición tangencial y termina en la hipodermis que presenta de seis a ocho capas de células inicialmente rectangulares y luego poligonales. Luego del hollejo se encuentra la pulpa que es la parte más voluminosa de la baya y se compone de veinticinco a treinta capas de

células poligonales grandes, de paredes celulares muy delgadas. Finalmente, en el interior de la baya se encuentran las semillas, que están encargadas de la reproducción sexual de la uva. Están conformadas desde el exterior hacia el interior por una cutícula, una epidermis de poco espesor, y tres tegumentos que rodean el albumen y el embrión (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). En la superficie de la uva, se encuentran generalmente de veinticinco a cuarenta estomas por baya, los cuales luego del envero pierden su funcionalidad. Las uvas cuando están verdes, presentan una limitada capacidad fotosintética y dependen de la importación de nutrientes desde el resto de la planta. La falta de sincronía en la maduración de la uva sugiere que las bayas son independientes entre sí (Robinson y Davies, 2000).

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 (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

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) dentro de la baya, que son conducidos hacia la misma principalmente a través del floema (Robinson y Davies, 2000; 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, ya que un déficit hídrico puede provocar una disminución del tamaño de la baya debido a una inhibición de la división y expansión celular (Conde et al., 2007).

Los azúcares representan normalmente más del 90% de los sólidos solubles totales en las bayas maduras, acumulándose 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* L., 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) (Keller, 2010). Las flores y uvas verdes 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 la enzima invertasa ( $\beta$ -fructosidasa) en sus

correspondientes hexosas, lo cual puede ocurrir en el apoplasto, el citoplasma o dentro de la vacuola de las células (Robinson y Davies, 2000). 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).

En cuanto a la acidez presente en las bayas, 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 con iones  $K^+$  y  $Na^+$ . La relación ácido málico/ácido tartárico y el contenido de cationes metálicos presentes, determina el pH del mismo (Keller, 2010).

En cuanto a la composición lipídica, las bayas poseen ceras en la cutícula, ácidos grasos, y lípidos de membrana en hollejo y pulpa, y ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y oleico) y saturados (palmítico y esteárico) en las semillas. Sin embargo, el grupo más importante de lípidos en términos de calidad de uvas y vinos corresponde a los carotenoides, especialmente  $\beta$ -caroteno y luteína, en adición a compuestos minoritarios como xantofilas, neoxantina, violaxantina y zeaxantina (Conde et al., 2007). Estos compuestos son precursores de compuestos volátiles, como los norisoprenoides, contribuyendo al aroma general de la uva (Baumes et al., 2002).

Con respecto al contenido de macronutrientes y micronutrientes, el más importante es el Nitrógeno, el cual se encuentra en las bayas maduras y en el mosto, en forma mineral ( $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$  y  $NO_3^-$ ) u en forma orgánica (aminoácidos libres, péptidos, proteínas, urea y derivados de ácidos nucleicos, entre otros), alcanzando una concentración total comprendida generalmente entre 100 y 1.200 mg/L y usualmente el vino tinto contiene cantidades mayores que el vino blanco, debido principalmente a las condiciones de vinificación de cada uno (Conde et al., 2007). 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 a 4 aminoácidos a grandes proteínas de más de 150 kDa. 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). El potasio también puede estar involucrado en los niveles de acidez y pH de la uva y posteriormente del vino, ya que cuando se encuentra en concentraciones altas, especialmente en las bayas sobremaduras, puede disminuir la acidez y aumentar el pH, perjudicando las características organolépticas y la estabilidad química y microbiológica del vino (Conde et al., 2007). También en la uva podemos encontrar calcio y magnesio con concentraciones promedio de 80 mg/L (Conde et al., 2007), y trazas de hierro, cobre, manganeso, zinc, boro, azufre y fósforo, entre otros (Rogiers et al., 2006).

La composición aromática de la uva comprende diversos tipos de sustancias químicas agrupadas como compuestos volátiles propios de la variedad y precursores no volátiles (Francis et al., 1992; Gómez et al., 1994). Los compuestos químicos volátiles se encuentran en la uva localizándose principalmente en el hollejo y también en la pulpa y el jugo (Gómez et al., 1994). La concentración de los mismos en las diferentes partes de la baya 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, manteniéndose durante todo el proceso fermentativo (Francis et al., 1992; Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Entre las sustancias volátiles conocidas relacionadas con la tipicidad aromática de la variedad pueden distinguirse tres familias químicas principales: los compuestos terpénicos, las metoxipirazinas y los norisoprenoides. Los compuestos terpénicos son especialmente importantes en la uva y el vino blanco. Por su parte las metoxipirazinas son responsables del aroma herbáceo de ciertos cultivares como Carménère y Cabernet Sauvignon. En cuanto a los precursores de aromas (componentes químicos no volátiles), éstos 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 dependiendo de diversos factores, especialmente ligados a las labores utilizadas en la vinificación de los vinos. Dentro de este grupo se distinguen, principalmente, los glicósidos, los carotenoides y los compuestos azufrados. Por ejemplo, algunos compuestos azufrados como la 4-mercapto-4-metil-penta-2-ona, participan en el aroma de cultivares como el Sauvignon Blanc (Di Stefano, 1999; Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

Por último, se destacan los compuestos fenólicos que constituyen un grupo químico esencial de las uvas y vinos, ya que son constituyentes que participan en importantes propiedades sensoriales que impactan fuertemente en la calidad del vino.

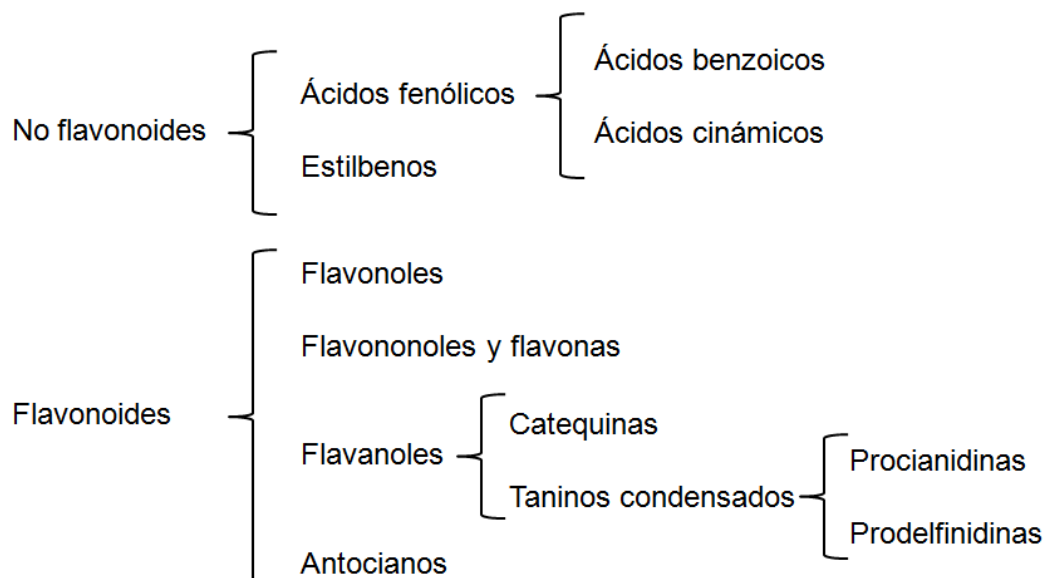
Es por esta razón que a continuación se comentará sobre estos compuestos, poniendo especial énfasis en las proantocianidinas.

## **2. Composición fenólica de uvas y vinos**

Los compuestos fenólicos representan una gran familia de compuestos presentes en la uva y el vino con un rol fundamental en la enología, debido principalmente a que son componentes importantes para la calidad del vino ya que contribuyen a las características de color, sabor, astringencia y amargor de los vinos, siendo también importantes para la capacidad de crianza de este (Brossaud et al., 2001; Gawel et al., 2001; Kennedy et al., 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Estos compuestos provienen del metabolismo secundario de las plantas superiores y cumplen diversas funciones como pigmentación, crecimiento, reproducción y resistencia a organismos patógenos (Lattanzio et al., 2008). Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos, en el último tiempo, han estado asociadas al consumo moderado del vino debido principalmente a su efecto en la prevención de enfermedades degenerativas y cardiovasculares (Zeyuan et al., 1998; Shao et al., 2003; Alén-Ruiz et al., 2009), su acción anticarcinogénica (Soleas et al., 2002) y a sus efectos neuroprotectores (Savaskan et al., 2003; Han et al., 2004).

Desde un punto de vista químico, estos compuestos se caracterizan por presentar uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos directamente a un anillo bencénico. La reactividad de estos compuestos se debe al carácter ácido de la función fenólica y al carácter nucleofílico del anillo bencénico (Monagas et al., 2005; Vermerris y Nicholson, 2006).

Una de las formas más comunes de clasificación de los compuestos fenólicos, es fijándose en su esqueleto carbonado, pudiendo en este caso clasificarse en dos grandes grupos, los compuestos flavonoides ( $C_3-C_6-C_3$ ) y los no flavonoides ( $C_6-C_1$ ,  $C_6-C_3$ ), presentando dentro de cada grupo diversas familias de compuestos (Figura 1) (Taiz y Zeiger, 2002; Monagas et al., 2005; Ribéreau-Gayon et al., 2006b; Vermerris y Nicholson, 2006).



**Figura 1.** Clasificación de los compuestos fenólicos (adaptado de Zamora, 2003).

La uva contiene compuestos fenólicos del grupo no flavonoides principalmente en la pulpa, en cambio presenta compuestos flavonoides en los hollejos, las semillas y en el escobajo (Monagas et al., 2005).

## 2.1. Compuestos no flavonoides

Dentro del grupo de compuestos no flavonoides encontrados en la uva podemos destacar los ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), en sus formas libres y esterificadas y los estilbenos.

### 2.1.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos, que se caracterizan por poseer un solo anillo de 6 átomos de carbono, se dividen en dos grupos, los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos.

Los ácidos hidroxibenzoicos derivan del ácido benzoico y poseen un esqueleto carbonado  $C_6-C_1$ . Los ácidos más comunes encontrados en los vinos junto a su forma química se pueden observar en la Figura 2. Estos ácidos principalmente se pueden encontrar en su forma libre o como ésteres (Zou et al., 2002; Pozo-Bayón et al., 2003; Monagas et al., 2005; Rentsch et al., 2009). El ácido gálico es uno de los ácidos hidroxibenzoicos que se encuentra en mayor concentración en las partes sólidas de la uva, en forma libre o como éster de flavan-3-ol ((-)-epicatequina-3-galato) (Su y



Singleton, 1969). En vinos blancos y tintos también se han encontrado derivados de estos ácidos, como por ejemplo vanillato de etilo, *p*-hidroxibenzoato de etilo, ésteres metílicos de los ácidos vainillínico y protocatéquico, galato de etilo, entre otros. La crianza del vino con presencia de madera produce taninos hidrolizables, con ésteres del ácido gálico (galotaninos) o ácido elágico (elagitaninos), los cuales mediante hidrólisis pueden producir los correspondientes ácidos (Monagas et al., 2005).

En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos, estos presentan un esqueleto carbonado, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, y se localizan en las vacuolas de las células de los hollejos y de la pulpa en la forma esterificada con ácido tartárico (Monagas et al., 2005), aunque también se pueden encontrar en forma libre o glucosilada. Los principales ácidos hidroxicinámicos presentes en las uvas son los ácidos caftárico, cutárico y fertárico en su forma *trans*, aunque también se han encontrado pequeñas cantidades del isómero *cis*, aunque la forma *trans* es más estable. Entre los ácidos hidroxicinámicos, el ácido caftárico es el predominante (Somers et al., 1987; Monagas et al., 2005; Rentsch et al., 2009). Los más importantes compuestos pertenecientes a este grupo, así como también algunos de sus derivados en uvas y vinos se pueden observar en la Figura 2.

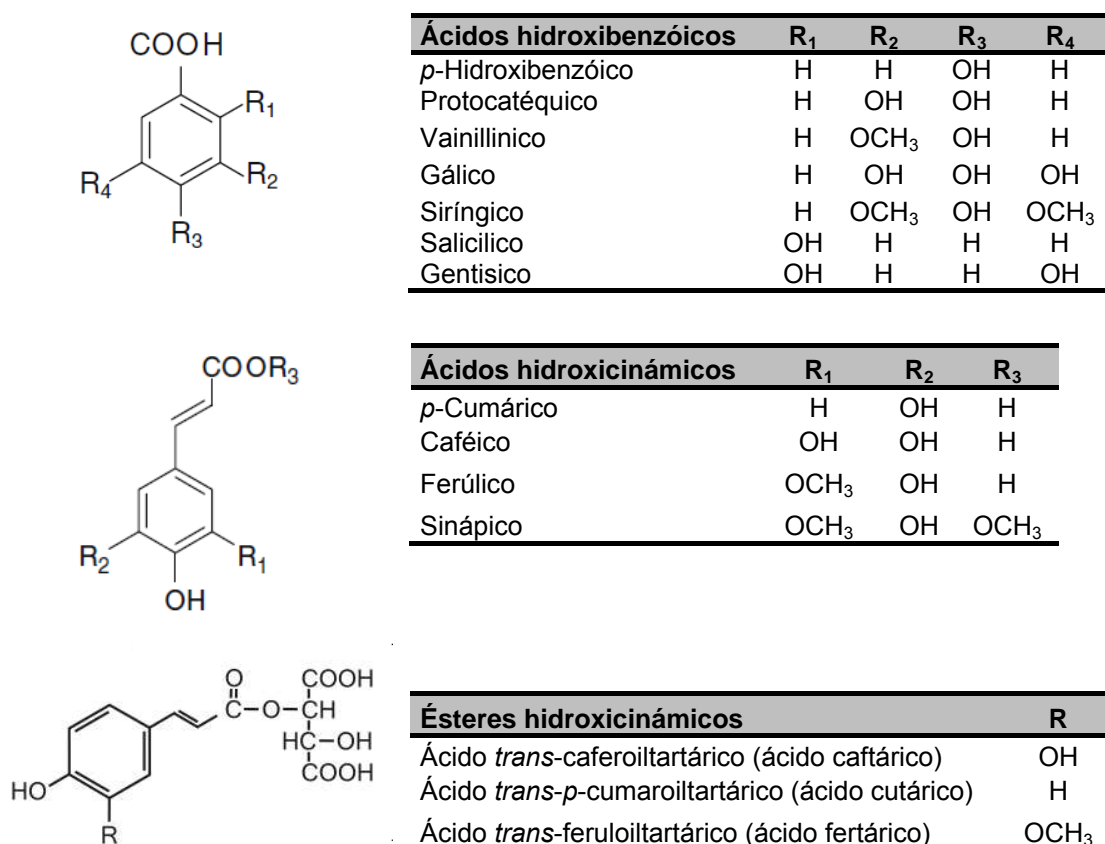
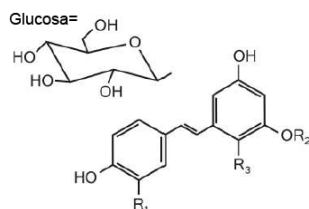


Figura 2. Ácidos fenólicos y sus derivados (adaptado de Monagas et al., 2005).

Estos compuestos no son coloreados y desde un punto de vista organoléptico no presentan un olor o sabor particular (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). En vinos blancos contribuyen al aumento de la coloración amarilla, debido principalmente a que el ácido caféico y su ester tartárico son los principales sustratos de la oxidación enzimática formando *o*-quinonas (Waterhouse y Laurie, 2006; Li et al., 2008), en cambio en vinos tintos aumentan la estabilización del color por fenómenos de copigmentación, principalmente debido la presencia de los ácidos caféico y *p*-cumárico (Boulton, 2001; Darias-Martín et al., 2002). Los ácidos ferúlico y cumárico pueden generar por degradación microbiana, principalmente debido a la presencia de levaduras del género *Brettanomyces*, fenoles volátiles, generando defectos olfativos, asociados a descriptores como “olor a establo” o “sudor de caballo”, disminuyendo la tipicidad natural de los vinos y la calidad de estos (Chatonnet et al., 1992).

### 2.1.2. Estilbenos

Los estilbenos en forma estructural presentan dos anillos bencénicos, los cuales generalmente están unidos por una cadena de eteno (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Uno de los más importantes en cuanto a su abundancia y a sus numerosos estudios es el *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno). Su estructura química y sus derivados glucosilados se pueden observar en la Figura 3. Los estilbenos también se pueden encontrar en sus formas oligoméricas y poliméricas (Rentzsch et al., 2009). Estos compuestos se sintetizan en la vid como una respuesta de defensa hacia condiciones de stress, tales como infecciones fúngicas y radiaciones ultravioletas encontrándose en los hollejos, hojas y raíces de la planta y su contenido también depende de factores climáticos, del tipo de uva y de las labores enológicas (Jeandet et al., 1994; Vitrac et al., 2002; Gambuti et al., 2004; Perrone et al., 2007).



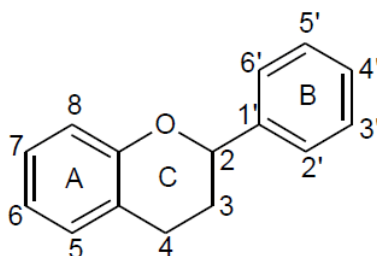
| Estilbenos                              | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> |
|---|----------------|----------------|----------------|
| <i>Trans</i> -resveratrol               | H              | H              | H              |
| <i>Trans</i> -resveratrol-3-O-glucósido | H              | Glucosa        | H              |
| <i>Trans</i> -resveratrol-2-O-glucósido | H              | H              | Glucosa        |
| <i>Trans</i> -astringina                | OH             | Glucosa        | H              |

**Figura 3.** Estilbenos y sus derivados glucosídicos (adaptado de Monagas et al., 2005).

Desde un punto de vista organoléptico, no tienen mayor importancia en el vino, aunque debido a sus efectos antioxidantes, anticarcinogénicos y neuroprotectores son uno de los compuestos más relevantes para la salud humana (Han et al., 2004).

## 2.2. Compuestos flavonoides

Los compuestos flavonoides se caracterizan por poseer un esqueleto carbonado de 15 átomos de carbono, con una estructura  $C_6-C_3-C_6$  con 2 anillos bencénicos polihidroxilados (A y B) unidos por un heterociclo central oxigenado (C) (Figura 4). El grado de insaturación del anillo C determina las distintas familias de compuestos en este grupo, los cuales se dividen en cuatro grandes grupos, siendo estos, los flavonoles, los flavanoles y flavonas, los flavanoles y las antocianinas. La diferenciación en cada familia de compuestos se debe a la presencia de grupos hidróxilos y metóxilos en el anillo B. La alta reactividad de estos compuestos en el vino, se debería a que estos compuestos pueden actuar tanto como electrófilos o como nucleófilos (Kennedy et al., 2006). Las antocianinas y flavanoles son los compuestos más abundantes en la uva y el vino y su importancia se debe a que entregan características que inciden directamente en la calidad de este (Monagas et al., 2005; Ribéreau-Gayon et al., 2006b; Vermerris y Nicholson, 2006).

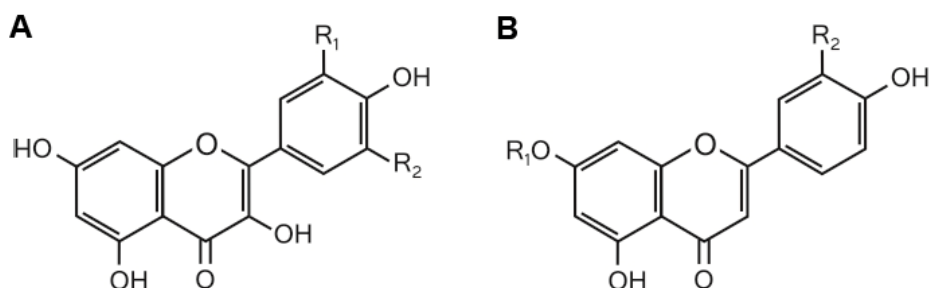


**Figura 4.** Estructura química básica de los compuestos flavonoides.

### 2.2.1. Flavanoles y flavonas

Las flavonas presentes en la uva y el vino son apigenina, luteolina y baicaleina, aunque no son muy abundantes en la vid (Monagas et al., 2005). En cuanto a los flavanoles encontrados en la uva podemos mencionar a la astilbina y engeletina, estando presentes en las pieles y el vino de las variedades blancas (Trousdale y Singleton, 1983). La astilbina también se ha encontrado en los orujos de uva, en los tallos y en el vino tinto (Lu y Foo, 1999; Vitrac et al., 2001; Monagas et al., 2005; Fanzone et al., 2012b). Estos compuestos también reciben el nombre de

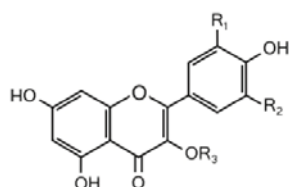
dihidroflavonoles, siendo la dihidroquercetina el compuesto mayormente identificado en las uvas y el vino (Ribéreau-Gayon et al., 2006b; Vermerris y Nicholson, 2006). En la vid desempeñan un rol funcional contra enfermedades fúngicas, presentando además propiedades funcionales para los seres humanos (Vitrac et al., 2001). La estructura química de estos compuestos se puede observar en la Figura 5.



**Figura 5.** Estructura química de flavanones (A) y flavonas (B) (adaptado de Monagas et al. 2005).

### 2.2.2. Flavonoles

Los flavonoles son pigmentos amarillos, localizándose principalmente en las vacuolas de las células epidermales de los hollejos de la uva (Cheynier y Rigaud, 1986), aunque también se han encontrado en la pulpa (Pereira et al., 2006). Estos compuestos actúan como protectores contra los rayos UV, previniendo el daño en los tejidos de las plantas (Flint et al., 1985). En las plantas actúan como copigmentos con los antocianos, sucediendo el mismo fenómeno en el vino tinto, produciendo una gran estabilización del color de estos (Price et al., 1995; McDonald et al., 1998; Haselgrove et al., 2000). En las uvas y el vino se pueden encontrar en su forma glicosilada o también en forma de aglicona, lo cual depende de la hidrólisis producida de las formas glicosiladas debido a las condiciones de vinificación (McDonald et al., 1998; Cheynier et al., 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2006b). En forma sensorial no son de importancia aunque algunos autores han señalado que la quercetina en grandes concentraciones en vinos tintos pueden aportar sensaciones de amargor y astringencia (Hufnagel y Hoffman, 2008; Sáenz-Navajas et al., 2010). Su estructura química y sus derivados glicosilados se pueden observar en la Figura 6.



| Flavonoles                 | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> |
|----------------------------|------------------|----------------|----------------|
| Kaempferol                 | H                | H              | H              |
| Kaempferol-3-O-glucósido   | H                | H              | Glu            |
| Kaempferol-3-O-galactósido | H                | H              | Gal            |
| Kaempferol-3-O-glucurónido | H                | H              | Gluc           |
| Quercetina                 | OH               | H              | H              |
| Quercetina-3-O-glucósido   | OH               | H              | Glu            |
| Quercetina-3-O-glucurónido | OH               | H              | Gluc           |
| Miricetina                 | OH               | OH             | H              |
| Miricetina-3-O-glucósido   | OH               | OH             | Glu            |
| Miricetina-3-O-glucurónido | OH               | OH             | Gluc           |
| Isoramnetina               | OCH <sub>3</sub> | H              | H              |
| Isoramnetina-3-O-glucósido | OCH <sub>3</sub> | H              | Glu            |

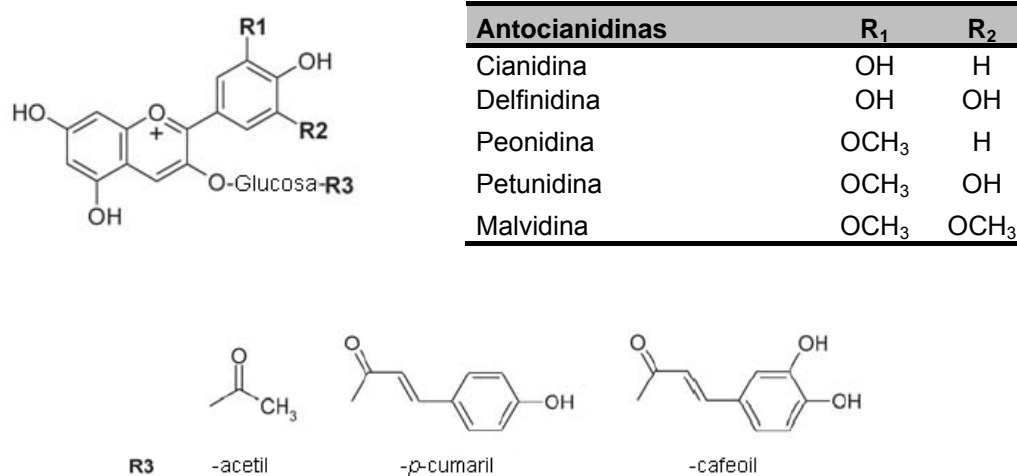
glu= glucosa; gluc= ácido glucurónido; gal= galactosa

**Figura 6.** Estructura química de los flavonoles (adaptado de Monagas et al. 2005).

### 2.2.3. Antocianinas

Las antocianinas o antocianos (del griego *anthos*, flor y *kianos*, azul), son los pigmentos más importantes de las plantas vasculares. Estos pigmentos son los responsables de colores como el anaranjado, rosado, rojo, violeta y azul que se encuentran en las flores y frutas de algunas plantas (Burns et al., 2002; Castañeda-Ovando et al., 2009). En la uva, los antocianos se localizan en las gruesas paredes de las células hipodermales de los hollejos, encontrándose también en la pulpa de las variedades tintoreras y además se presentan en grandes cantidades en las hojas de la vid, principalmente hacia el fin de la temporada de crecimiento (Adams, 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Los antocianos son pigmentos hidrosolubles, que consisten en una aglicona (antocianidina) con dos anillos aromáticos unidos a un anillo heterocíclico que contiene oxígeno. Esta estructura también se conoce como catión flavilio (Figura 7). Cuando las antocianidinas se encuentran en forma glicosilada se conocen como antocianinas (Wrolstad et al., 2005; Ribéreau-Gayon et al., 2006b). Las principales diferencias entre ellas son el número de grupos hidroxilados, la naturaleza y el número de azúcares unidos a la estructura, los carboxilados alifáticos o aromáticos unidos al azúcar en la molécula y la posición de esta unión (Kong et al., 2003). Las antocianinas identificadas en los hollejos de la uva y en el vino de *Vitis vinifera* L. son los 3-O-monoglucósidos y los 3-O-monoglucósidos acilados de las cinco principales antocianidinas: delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (Burns et al., 2002; Monagas et al., 2005) (Figura 7). La acilación ocurre en el carbono en posición 6 de la molécula de glucosa mediante esterificación con los ácidos acético, *p*-cumárico, caféico (Monagas et al., 2005) y también con ácido láctico (Alcalde-Eon et

al., 2006). En forma reciente, se ha confirmado la existencia de antocianinas 3,5 y 3,7-diglucósidos en uvas y vinos y oligómeros sobre las tres unidades en extractos de hollejos de uva (Vidal et al., 2004b; Alcalde-Eon et al., 2006; Castillo-Muñoz et al., 2009).



**Figura 7.** Estructura química de los antocianos (adaptado de Adams, 2006).

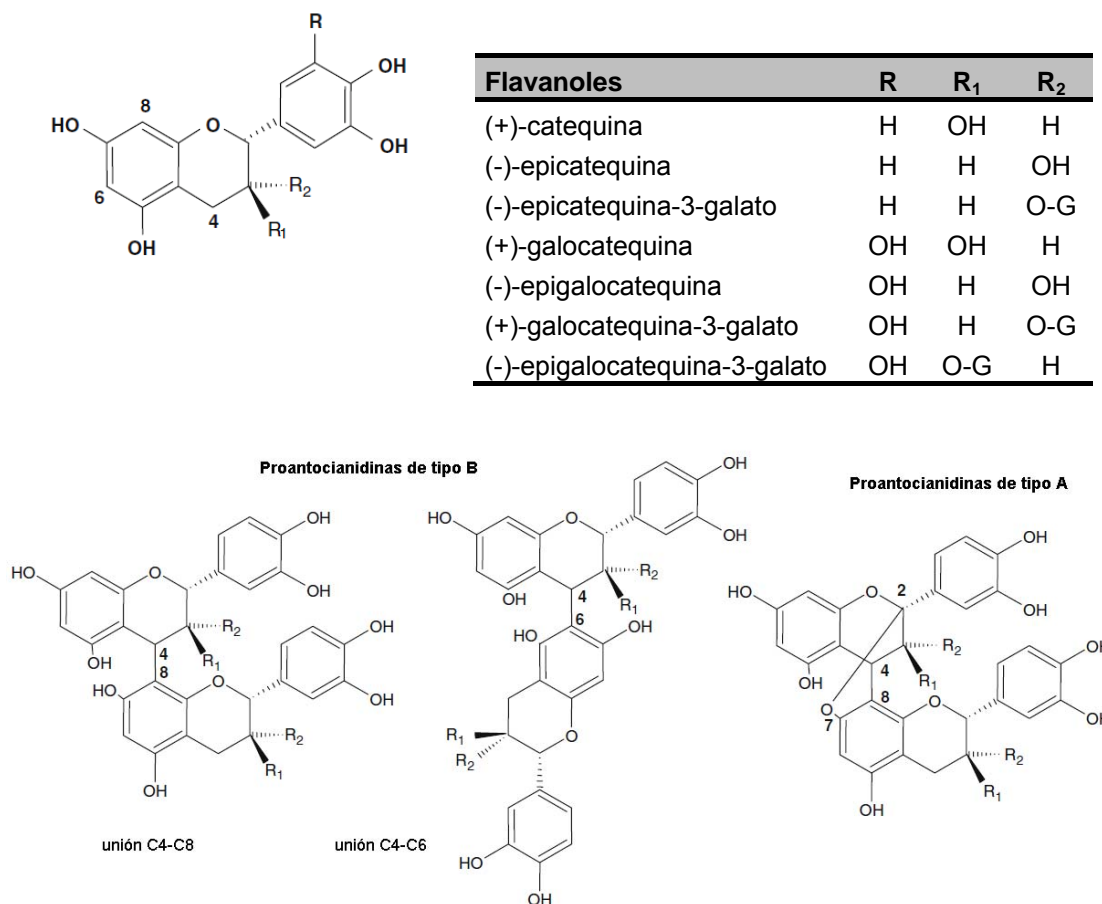
Las antocianinas contienen un núcleo flavilio con un oxígeno con carga positiva. En vista de la existencia de cadenas doble conjugadas, la carga está deslocalizada en toda la estructura cíclica, la cual está estabilizada por resonancia. Las antocianinas en un medio acuoso se pueden encontrar en diferentes formas químicas las cuales dependen del pH de la solución, siendo cuatro estructuras básicas, el catión flavilio, la base anhidra quinoidal, la pseudo-base carbinol y la base calcona. A pH < 2, el catión flavilio (de color rojo, forma A<sup>+</sup>) es la especie predominante y contribuye a los colores rojos y púrpuras. A medida que el pH aumenta, se produce una desprotonación del catión flavilio y la base quinoidal (forma AO) con especies de color azul-violáceo, que predominan en la solución. Ambas reacciones ocurren en forma simultánea de acuerdo a las constantes de equilibrio. A pH comprendidos entre 5 y 6 solo se pueden observar dos especies incoloras, las cuales son la pseudo-base carbinol (forma AOH) y una base calcona. Cuando el pH del medio es mayor a 7, las antocianinas están degradadas dependiendo de sus grupos constituyentes (reacciones de degradación). A valores de pH del vino, coexisten las cuatro formas estructurales de los antocianos, el catión flavilio, la base anhidra quinoidal, la pseudo-base carbinol incolora y la calcona de color amarillo pálido. El equilibrio entre la base quinona y la

base carbinol ocurre mediante el catión flavilio. Cuando el pH aumenta, también la cantidad de bases anhidras se incrementan y bajo condiciones más ácidas, las especies predominantes son el catión flavilio de color rojo (Kennedy y Waterhouse, 2000; Cooper-Driver, 2001; Ribéreau-Gayon et al., 2006b; Castañeda-Ovando et al., 2009).

#### 2.2.4. Flavanoles

Los flavanoles o flavan-3-oles son un gran grupo de compuestos que en la vid se encuentran presentes en la madera, tallos y hojas. Dentro de la baya de uva son particularmente abundantes en los hollejos y semillas (Souquet et al., 1996; Bogs et al., 2005). Estos compuestos son importantes para la calidad del vino ya que están implicados en la estabilidad del color en vinos tintos, a través de reacciones de copigmentación y/o condensación con los antocianos y en las sensaciones de astringencia y amargor. Además participan en reacciones de pardeamiento oxidativo y enzimático, especialmente importantes en vinos blancos, formando complejos con otras macromoléculas del vino y formando precipitados afectando la limpidez del vino (Terrier et al., 2009a; Santos-Buelga y De Freitas, 2009). Estos compuestos se pueden encontrar en forma monomérica (también llamados catequinas), así como también en formas oligoméricas y poliméricas.

Su estructura química, al igual que los compuestos flavonoides, consisten en un esqueleto carbonado de estructura  $C_6-C_3-C_6$ , con dos anillos fenólicos unidos (A y B) por un anillo heterocíclico pirano (C) (Figura 8). En los flavan-3-oles, el anillo C está saturado presentando dos carbonos asimétricos ( $C_2$  y  $C_3$ ). Esto permite la posibilidad de tener cuatro formas isoméricas para cada catequina, (+)/(-)-catequina y (+)/(-)-epicatequina, lo mismo sucede en el caso de las correspondientes (+)/(-)-galocatequina y (+)/(-)-epigalocatequina debido a la presencia de un grupo OH en el anillo B. En las uvas, los flavanoles monómeros encontrados en mayor concentración son la (+)-catequina, su isómero la (-)-epicatequina y la (-)-epicatequina-3-galato y en una menor proporción la (-)-epigalocatequina y la (+)-galocatequina (Terrier et al., 2009a).



**Figura 8.** Flavanoles monoméricos y proantocianidinas de tipo A y B (adaptado de Terrier et al., 2009a).

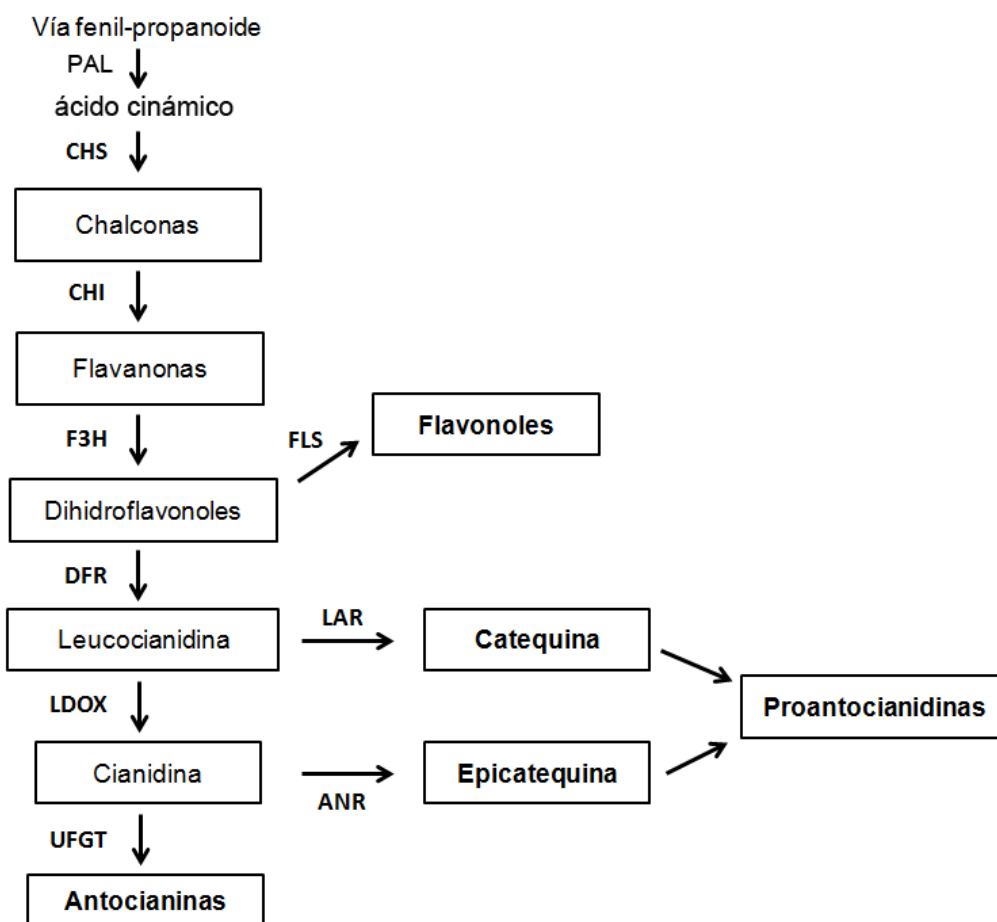
Los flavanoles en su forma oligomérica y polimérica también reciben el nombre de proantocianidinas o taninos condensados. El término tanino se refiere a la capacidad que tienen estos compuestos de interactuar con las proteínas y precipitarlas, lo cual es muy usado en la industria del curtido de cueros. Los flavanoles también pueden recibir el nombre de prodelfinidinas. Estos términos se derivan de la capacidad que tienen los flavanoles de en un medio ácido y con presencia de calor, hidrolizarse a antocianidinas, como resultado de una catálisis ácida de las uniones interflavánicas. Las proantocianidinas que se hidrolizan a cianidina se conocen como procianidinas y están compuestas de (+)-catequina y (-)-epicatequina. Por otra parte, si los polímeros de flavanol están formados por (+)-galocatequina y/o (-)-epigalocatequina, su hidrólisis producirá una delfinidina y se denominarán como prodelfinidinas (Porter et al., 1986; Hümmer y Schreier, 2008). Las procianidinas se encuentran solo en las semillas de la uva, en cambio los hollejos de las bayas poseen procianidinas y prodelfinidinas (Monagas et al., 2005).



Las proantocianidinas también se pueden distinguir dependiendo del número de unidades de flavanoles que forman la cadena y de la naturaleza de la unión interflavánica. Las proantocianidinas se pueden distinguir según su grado medio de polimerización (mDP), ocupándose los términos “oligómeros” con mDP entre 2 y 5 y “polímeros” con un mDP mayor a 5, aunque esta definición puede depender de las técnicas de medición (Waterhouse et al., 2000). Una mejor forma de definición es fijarse en el tipo de unión interflavánica, en donde se distinguen dos tipos de proantocianidinas, las de tipo A y las de tipo B (Figura 8). En las proantocianidinas de tipo B, las unidades de flavanol están unidas mediante enlaces C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> y/o C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>. En las proantocianidinas de tipo A, las unidades de flavanol están unidas por un doble enlace, con un enlace C<sub>4</sub>→C<sub>8</sub> o C<sub>6</sub> sumado a un enlace C<sub>2</sub>→C<sub>7</sub> o C<sub>5</sub>. En las uvas las proantocianidinas son esencialmente del tipo B, con las uniones C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> mucho más abundantes que las uniones C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> (Terrier et al., 2009a).

### 3. Biosíntesis de las proantocianidinas en la uva

La biosíntesis de los compuestos flavonoides corresponde a la vía fenilpropanoide contando con dos precursores acetil-CoA carboxilado (malonil-CoA) y el aminoácido fenilalanina (Downey et al., 2006). Ambos precursores derivan del metabolismo primario de la planta. La síntesis ocurre en el citoplasma de las células, asociado al retículo endoplasmático (Poustka et al., 2007; Zhao et al., 2010), en donde participan una gran diversidad de enzimas siendo generalmente hidrolasas, deshidrogenasas, reductasas y transferasas. El primer paso clave en la vía de síntesis se lleva a cabo por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), que es dependiente del suministro del aminoácido precursor y de la luz y la temperatura (Pirie y Mullins, 1980; Haselgrove et al., 2000). Posteriormente por la actividad de la enzima calcona sintasa (CHS), se desvía la ruta hacia la formación de los compuestos flavonoides, en donde participan las demás enzimas involucradas en la ruta de síntesis, la cual termina generalmente en la síntesis de antocianinas, pero a lo largo de la vía de síntesis se producen otros compuestos entre los cuales se encuentran los flavanoles. De todos las enzimas involucradas en la vía de síntesis de compuestos fenólicos, dos son las específicas para la biosíntesis de flavanoles, la leucoantocianidina reductasa (LAR) y la antocianidina reductasa (ANR), convirtiendo las antocianidinas a flavan-3-oles tales como la (+)-catequina y la (-)-epicatequina, respectivamente, tal como se observa en la Figura 9 (Xie et al., 2003; Bogs et al., 2005).



**Figura 9.** Resumen de la ruta de síntesis de compuestos flavonoides que conduce a la síntesis de proantocianidinas. Las enzimas involucradas en la vía de síntesis son las siguientes: PAL, fenilalanina amonio liasa; CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H, flavanona-3 $\beta$ -hidroxilasa; DFR, dihidroflavonol-4-reductasa; LDOX, leucoantocianidina dioxigenasa; FLS, flavonol sintasa; LAR, leucoantocianidina reductasa; ANR, antocianidina reductasa y UFGT, UDP- glucosa flavonoide-3-O-glucosil transferasa (adaptado de Bogs et al., 2007).

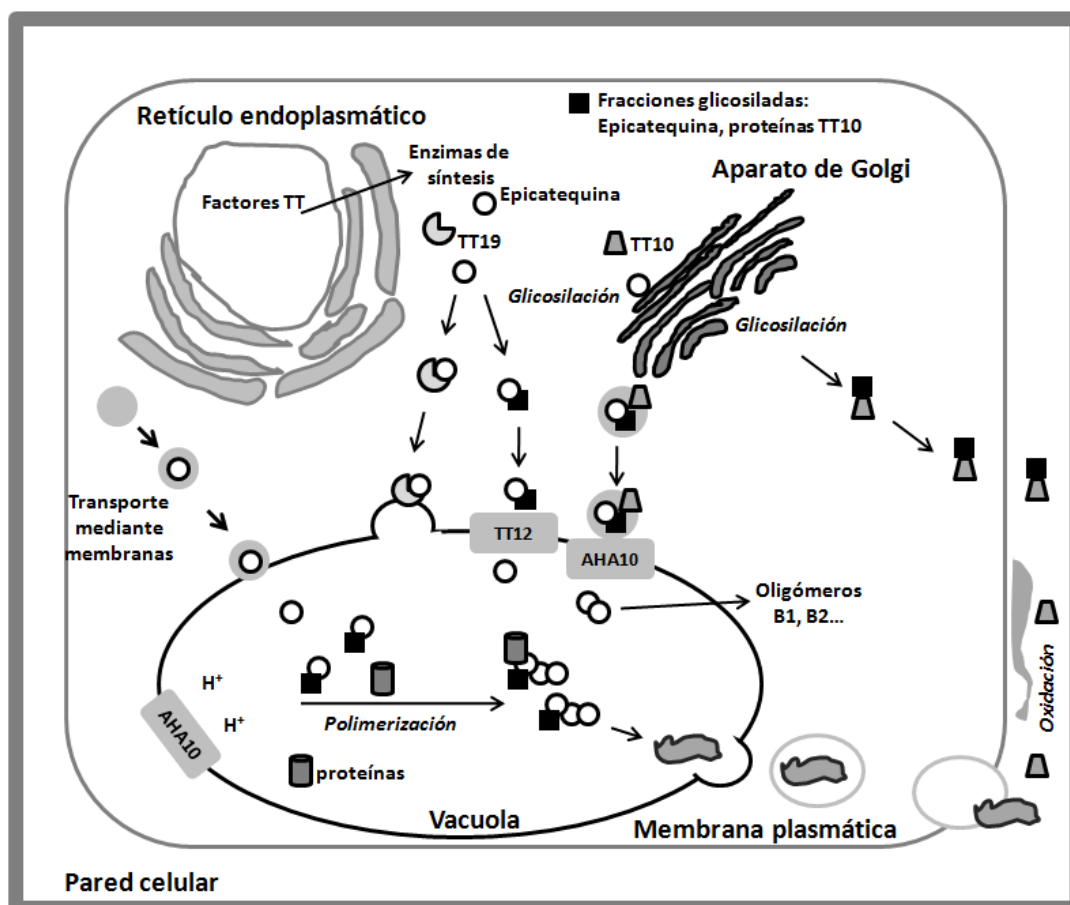
Además del conocimiento de los genes específicos, recientemente se han descubierto dos factores de transcripción que son específicos para la síntesis de las proantocianidinas debido a que regulan la expresión de los genes *LAR* y *ANR*, el VvMYBPA1, el cual se correlacionó en forma positiva con la acumulación de proantocianidinas durante los primeros estados de desarrollo de la baya y de la semilla y el VvMYBPA2, el cual se expresa principalmente en las bayas y en las hojas de vid (Bogs et al., 2007; Zhao et al., 2010). Además, se ha estudiado otro factor de transcripción, el VvMYB5b, el cual se expresa principalmente durante la maduración de la baya de uva (Deluc et al., 2008). Todos estos datos sugieren que la familia de factores de transcripción MYB, son los reguladores más comunes en la biosíntesis de

proantocianidinas en diversos tejidos, mostrando patrones de expresión diferenciales (Bogs et al., 2005).

### 3.1. Polimerización de las proantocianidinas durante la maduración de la uva

Aunque la vía de biosíntesis de los compuestos fenólicos, ha sido extensamente estudiada, conociéndose gran parte de los genes involucrados en ésta y los que forman parte de la ruta de síntesis de los flavan-3-oles, la unión de los monómeros de flavan-3-ol para formar las proantocianidinas aún es objeto de estudio. La polimerización de los monómeros de flavanol según los estudios se produciría en la vacuola de las células (Cadot et al., 2006). Aún cuando se han propuesto diversas maneras para explicar la polimerización de las proantocianidinas, el mecanismo aún no se conoce por completo. Estudios recientes, han señalado que la glucosilación del monómero (-)-epicatequina formando (-)-epicatequina-3-glucósido puede ser un transportador vacuolar de los monómeros de flavanol siendo parte integral del mecanismo de polimerización de las proantocianidinas, aunque se debe determinar en futuros estudios la naturaleza exacta de las unidades iniciales y de extensión de las proantocianidinas (Zhao et al., 2010). El estudio de TT19, una glutatión S-transferasa (GST) (TT: Transparent testa) como un transportador a larga distancia de compuestos flavonoides, al igual que MtMATE2 (TT12) (MATE: Multidrug and toxic compound extrusion) en mutantes de *Medicago truncatula* (planta leguminosa), pueden ser una posible respuesta al transporte de las proantocianidinas. Además se ha estudiado, TT10, la cual codifica una polifenol oxidasa que se ha propuesto como una participante en la oxidación y/o polimerización de las proantocianidinas. Cabe destacar que el transporte y acumulación de las proantocianidinas en la vacuola y dentro de la célula se realizaría mediante vesículas de transporte y transportadores de membrana, como la H<sup>+</sup> ATPasa AHA10 y TT12 (Baxter et al., 2005; Pourcel et al., 2010; Zhao et al., 2010). El mecanismo propuesto consistiría primeramente en una activación de los genes estructurales (TTs) mediante los factores de transcripción (factores TT) en el núcleo de la célula, luego las proteínas de la vía de síntesis de las proantocianidinas (enzimas de síntesis) se transportarían al citosol del retículo endoplasmático para la síntesis de (-)-epicatequina, ocurriendo posteriormente su glucosilación en el Aparato de Golgi y su transporte dentro de la vacuola mediante el transportador MATE TT12. El posterior transporte desde el retículo endoplasmático hacia la vacuola central, sería mediante un compartimento prevacuolar (transporte por vesículas) o también mediante la unión con TT19 GST, el cual facilitaría el transporte hacia la vacuola o hacia otro compartimento. Una vez dentro de la vacuola, las condiciones ácidas de esta podrían

facilitar la condensación no-enzimática de las unidades de proantocianidinas o estas unidades también pueden condensarse en forma enzimática catalizadas por TT10 con la (-)-epicatequina-3-glucósido como posible unidad de extensión o por proteínas no identificadas aún.



**Figura 10.** Modelo resumido del transporte y polimerización de las proantocianidinas (adaptado de Zhao et al., 2010).

El papel de TT10 sería catalizar la condensación de las unidades de proantocianidinas en oligómeros (como la procianidina B1 y B2), los cuales se transportarían mediante vesículas a la vacuola, en donde se catalizaría la elongación de la cadena de proantocianidinas usando la (-)-epicatequina glucosilada y los oligómeros de proantocianidinas como sustratos. Las proantocianidinas también pueden ser transportadas a través de vesículas de membrana u otros mecanismos al espacio extracelular (apoplasto), donde serían sometidas a una polimerización oxidativa y a una unión con otros componentes de la pared celular, que sería catalizado mediante enzimas polifenol oxidasas como la TT10. En la Figura 10 se

puede apreciar el mecanismo de polimerización de proantocianidinas. Aún con todos estos mecanismos, el principal desafío es descifrar como se produce la polimerización desde un punto de vista de la regulación del mismo, y lo que es aún más importante, dilucidar este mecanismo en forma completa en la uva debido a que presenta una composición distinta de proantocianidinas que otros modelos vegetales como *Arabidopsis thaliana* o *Medicago truncatula* que se usan extensivamente en el estudio de estos mecanismos moleculares (Dixon et al., 2005; Bogs et al., 2007; Terrier et al., 2009a; Zhao et al., 2010).

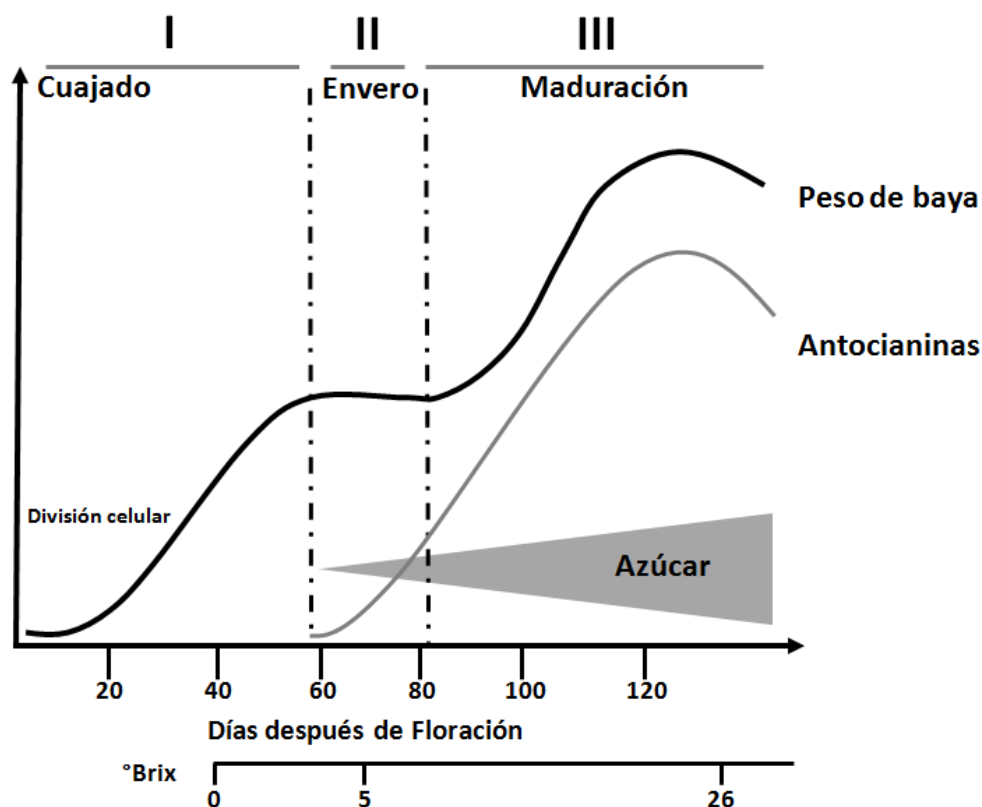
#### **4. Fisiología de la maduración de la baya y evolución de las proantocianidinas**

El crecimiento de la baya de uva durante la maduración consiste en una curva doble sigmoidea con dos fases de crecimiento separadas por una pequeña fase de retardo (Coombe y McCarthy, 2000) (Figura 11). La primera etapa, de formación de la baya, comienza con una división celular en las células del pericarpio, lo cual también va acompañado de un desarrollo de las semillas en cada baya, las cuales se aproximan a su tamaño final. La división celular cambia a un crecimiento de estas células hacia el final de la primera etapa de crecimiento. En esta etapa la baya es de color verde debido a la presencia de clorofila, pero la producción de metabolitos producto de la fotosíntesis no es suficiente para los requerimientos de la baya, ante lo cual debe importar azúcares a través del floema (Giaquinta, 1983). En esta etapa hay acumulación de ácido málico y ácido tartárico y se acumulan algunos compuestos fenólicos, como los flavanoles, principalmente con una síntesis en la primera etapa de crecimiento de la uva cercano a la floración, llegando a un máximo de acumulación en el envero. En los hollejos, el contenido es alto en la floración y su acumulación continúa hasta el envero, en donde su concentración es máxima (Kennedy et al., 2001; Downey et al., 2003; Downey et al., 2006). La fase de retardo en la curva de acumulación se caracteriza principalmente por un desarrollo del embrión y un endurecimiento de la testa de la semilla. En esta etapa, además se producen diversos cambios físicos en el fruto, como la acumulación de pruina sobre la epidermis de los hollejos, disminuye la transpiración de la baya producto de la obturación de los estomas y se produce una ruptura de los vasos xilemáticos (Robinson y Davies, 2000). La maduración de la baya, ocurre en la tercera etapa de desarrollo, produciéndose una expansión de las células existentes, ocurriendo al mismo tiempo numerosos cambios bioquímicos y fisiológicos. El comienzo de la maduración, comienza con el “envero”, en donde se producen una serie de cambios metabólicos, inducidos principalmente por la presencia de ácido abscísico (ABA) (Wheeler et al., 2009) como la acumulación

paulatina de azúcares, el ablandamiento de la baya y un aumento en el tamaño de esta, debido a una expansión celular, la reducción de los niveles de ácidos orgánicos, la síntesis de sustancias odorantes, aminoácidos, entre otros. En la etapa de envero, además, es donde comienza el cambio de color de la baya, que en el caso de las variedades tintas, cambia desde un color verde a rojo, debido a la acumulación de antocianinas en las vacuolas de las células de los hollejos producto del rápido aumento de azúcares (Pirie y Mullins, 1980; Coombe y McCarthy, 2000; Robinson y Davies, 2000; Nunan et al., 2001; Kennedy et al., 2002; Fournand et al., 2006). A partir del envero, el transporte de agua y azúcares hacia la baya se realiza a través del floema (Coombe y McCarthy, 2000).

En cuanto a la evolución de las proantocianidinas en la etapa de maduración, este comportamiento después del envero no es tan claro. El contenido de proantocianidinas puede permanecer constante luego del envero (Fournand et al., 2006) o puede presentar una disminución desde el envero y hasta la etapa de maduración (Downey et al., 2003; Pastor del Rio y Kennedy, 2006; Verriès et al., 2008). Un comportamiento parecido sigue el grado medio de polimerización (mDP) de las proantocianidinas, mostrando un incremento junto con la maduración de la uva (Kennedy et al., 2001; Verriès et al., 2008) o una disminución de este parámetro (Downey et al., 2003). La disminución de concentración que se produce en las semillas a medida que la uva madura se debería a fenómenos de oxidación, produciendo una coloración marrón en las semillas maduras (Kennedy et al., 2000).

Además de los cambios en forma cuantitativa también se producen cambios en forma cualitativa. Diversos estudios han mostrado una disminución en la proporción de (-)-epicatequina-3-galato y un aumento en la concentración de (-)-epicatequina, en cambio la (+)-catequina muestra pequeñas variaciones de concentración durante la maduración de la uva (Kennedy et al., 2002; Pastor del Rio y Kennedy, 2006). La composición de las proantocianidinas es diferente entre los hollejos y las semillas de la uva, ya que las semillas presentan polímeros más pequeños con cantidades similares de subunidades de (+)-catequina y (-)-epicatequina; en cambio en los hollejos, los polímeros son más largos presentando principalmente subunidades de (-)-epicatequina, lo cual hace que el grado medio de polimerización (mDP) de las proantocianidinas del hollejo sea mayor que las provenientes de las semillas. Además, las proantocianidinas de los hollejos, presentan unidades de (-)-epigallocatequina (prodelfinidina) y contienen pequeñas cantidades de (-)-epicatequina-3-O-galato (Kennedy et al., 2000; Kennedy et al., 2001; Downey et al., 2003; Bindon y Kennedy, 2011).



**Figura 11.** Representación esquemática del desarrollo de la baya de vid. El crecimiento del fruto se representa mediante una curva doble sigmoidea que indica el peso de la baya (adaptado de Robinson y Davies, 2000).

#### 4.1. Factores que influyen en la acumulación y síntesis de proantocianidinas durante la maduración de la uva

La biosíntesis de proantocianidinas y su acumulación a través de la maduración puede ser afectada por diferentes factores, los cuales son el genotipo, las condiciones medioambientales y las prácticas culturales.

Los diferentes cultivares de *Vitis vinifera* L. difieren y determinan la síntesis y acumulación de los compuestos fenólicos en la uva y su posterior presencia en el vino, ya que cada variedad de uva presenta diferencias en cuanto a la concentración de proantocianidinas pero también en cuanto a la composición de éstas (Mattivi et al., 2009; Obreque-Slier et al., 2012). En el último tiempo, el uso de clones ha estado dirigido para mejorar el vigor de las plantas, produciendo una modificación en la acumulación de compuestos fenólicos, observando que el uso de clones es casi tan importante como la variedad misma y lo mismo sucede en el uso de patrones que

pueden influir en la composición fenólica a través de una modificación del crecimiento de la canopia y del rendimiento del cultivo (Koundouras et al., 2008; Ezzahouani y Williams, 2007). En este caso el vigor de la vid puede producir un cambio en la composición y concentración de proantocianidinas en los hollejos de la uva, observándose un aumento de (-)-epigallocatequina y un aumento en el tamaño de los polímeros de proantocianidinas cuando la vid presentaba un vigor bajo. Es necesario tener en cuenta que los cambios en el vigor de la vid pueden afectar la arquitectura de la canopia produciendo diferencias de exposición de los racimos y afectando por ende el microclima de este (Cortell et al., 2005).

En cuanto a las condiciones medioambientales, la luz y la temperatura son los factores más importantes que condicionan la acumulación de proantocianidinas en la uva. Según el estudio de Downey et al. (2004) en bayas del cultivar Syrah, no se encontraron diferencias en cuanto a la concentración y composición de proantocianidinas en los hollejos y semillas de las uvas que provenían de racimos con diferentes exposiciones a la luz, aunque si se observaron diferencias entre racimos sombreados y expuestos a la luz durante la etapa de maduración de la uva, mostrando que los racimos expuestos a la luz presentaban una mayor concentración de proantocianidinas que los racimos sombreados. En el estudio de Ristic et al. (2007), en racimos sombreados artificialmente se encontró que los racimos sombreados tuvieron un aumento en las proantocianidinas en semillas y una disminución en las proantocianidinas de los hollejos. Cabe destacar que ambas investigaciones se realizaron con el cultivar Syrah ante lo cual puede ser que otro cultivar se comporte de manera diferente o que la zona geográfica también tenga influencia sobre estos resultados. Durante la maduración de la uva, en la etapa de envero, las altas temperaturas aumentaron la cantidad de proantocianidinas aunque no tuvieron efecto sobre el grado de polimerización de estas. Por el contrario, la disminución de las temperaturas diurnas, disminuyó la cantidad de proantocianidinas (Cohen et al., 2008).

Las características físicas y químicas del suelo (profundidad, estructura, textura y composición nutricional) también pueden afectar la acumulación de compuestos flavonoides en las bayas, debido a su incidencia sobre el crecimiento de la planta, sin embargo, el contenido de agua en el suelo y las condiciones hídricas del cultivo pueden influir en forma notable sobre la composición de compuestos fenólicos y por ende sobre las proantocianidinas. Un mayor contenido de agua puede disminuir el contenido de proantocianidinas (Kennedy et al., 2000), en cambio un déficit de agua no tiene grandes efectos sobre la acumulación de estas (Kennedy et al., 2000;



Kennedy et al., 2002) o permite aumentar el contenido de proantocianidinas en la baya (Castellarin et al., 2007). Cabe destacar que la presencia de agua en el suelo influye directamente sobre el tamaño de la baya, produciendo un cambio en la relación hollejo/pulpa y por ende un cambio en la concentración de proantocianidinas de la uva (Downey et al., 2006), es así que los cambios en la estructura de los hollejos serían los responsables de la acumulación de proantocianidinas, en vez de la incidencia sobre la ruta fenilpropanoide (Roby et al., 2004). La disponibilidad de agua en la planta incide directamente en diversos procesos biológicos tales como, el cierre y apertura de estomas, fotosíntesis, acumulación de fotoasimilados y también el crecimiento vegetativo, además de incidir sobre la ruta de síntesis de compuestos fenólicos, ante lo cual se dificulta interpretar este factor por sí solo (Downey et al., 2006).

La topografía del terreno en cuanto a la latitud y altitud, también puede influir en la composición y concentración de proantocianidinas en la uva. El contenido de flavanoles en los hollejos disminuyó a mayor altitud, en cambio en las semillas hubo un aumento de este contenido, aunque este comportamiento también dependió de la variedad utilizada. Sin embargo, estos resultados también pudieron verse afectados por las distintas condiciones de temperatura que se producen en distintas altitudes (Mateus et al., 2001).

Las labores culturales efectuadas por el hombre en el cultivo de la vid, también pueden influir notablemente sobre el contenido de compuestos fenólicos y de proantocianidinas en la uva. Aún cuando gran parte de las labores agronómicas efectuadas sobre el viñedo pretenden influir y equilibrar la producción de fruta, labores tales como el sistema de conducción, el raleo de racimos y también la fertilización y el riego, además del uso de reguladores de crecimiento, influyen sobre la concentración y composición de proantocianidinas (González-Neves et al., 2002; Peña-Neira et al., 2007; Poni et al., 2009). Además, la aplicación de sistemas de producción orgánicos o biodinámicos también pueden influir sobre la composición de flavonoides en la uva (Vian et al., 2006).

Otros factores tales como la edad del viñedo (Reynolds et al., 2007) o la presencia de enfermedades de origen fúngico (Amati et al., 1996) pueden afectar la composición fenólica y de proantocianidinas en la uva.

## **5. Evolución de las proantocianidinas durante la vinificación y crianza del vino**

Durante el proceso de vinificación es donde se produce la extracción y difusión de los compuestos fenólicos localizados en las diferentes partes de la uva, generando

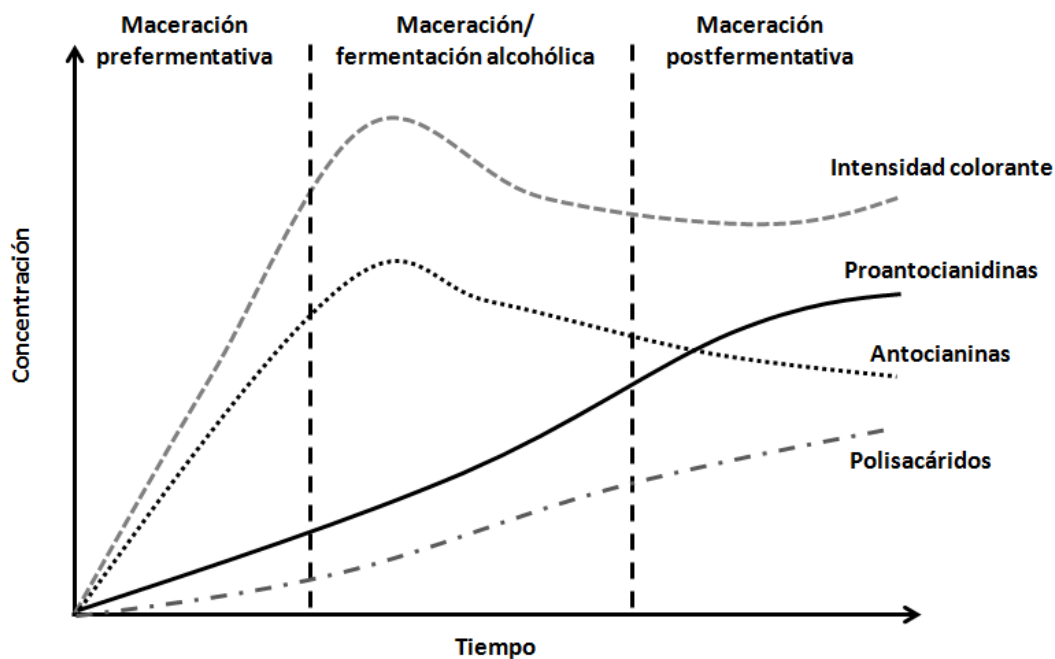
un medio complejo (mosto/vino) y en constante cambio debido a los fenómenos bioquímicos y químicos involucrados, los cuales continúan durante la crianza y almacenamiento del vino (Cheynier et al., 2000). Esta sección estará enfocada principalmente a una vinificación en vinos tintos debido a la presencia de una etapa de maceración en la cual se producen gran parte de las reacciones químicas expuestas a continuación y a la evolución de las proantocianidinas durante la vinificación.

### **5.1. Extracción de proantocianidinas durante la vinificación**

La vinificación es un proceso complejo, que en el caso de una vinificación en tintos, involucra dos etapas que ocurren en forma simultánea: la maceración y la fermentación alcohólica. La ocurrencia en forma simultánea de estas etapas produce la extracción diferencial de los compuestos fenólicos en el vino (Zamora, 2003).

La maceración es un proceso físico-químico en donde se produce la extracción fraccionada de los compuestos que se encuentran en las partes sólidas de la uva, como hollejos y semillas, seguidos de una disolución de estos en la matriz del mosto/vino. La maceración consta de dos procesos que ocurren al mismo tiempo, el primero corresponde a la disolución y extracción de los compuestos desde las partes sólidas de la uva hacia la fase líquida y el segundo implica la difusión de las sustancias extraídas. El proceso de maceración se puede dividir en tres etapas tal como se muestra en la Figura 12.

La primera etapa es la maceración prefermentativa, que corresponde al período anterior a la fermentación alcohólica, que ocurre en un medio acuoso y su duración depende de la temperatura, la concentración de SO<sub>2</sub> y de la fase de latencia de las levaduras nativas presentes. En una vinificación de vinos blancos, esta etapa también se produce aunque en este caso, su duración y puesta en práctica, dependerá de las decisiones enológicas, debido principalmente a que en esta etapa se requieren extraer compuestos que incidirán directamente en el potencial aromático del vino blanco (Lund et al., 2009), aunque también se puede producir una pequeña extracción de flavan-3-oles en el mosto (Ricardo Da Silva et al., 1993).



**Figura 12.** Cinética de extracción de los compuestos fenólicos durante la maceración y fermentación alcohólica (adaptado de Ribéreau-Gayon et al. 2006a).

La segunda etapa ocurre en condiciones de mayor temperatura que la etapa anterior y mayor concentración de etanol a medida que transcurre la fermentación alcohólica y su duración dependerá de diversos factores incluyendo a la temperatura, la concentración inicial de azúcares del mosto, la levadura utilizada, la cantidad de nutrientes en el medio, el contenido de  $O_2$  y la temperatura de fermentación. En una vinificación típica de vinos blancos, solo se produce la fermentación alcohólica y no la maceración debido a la ausencia de partes sólidas en este tipo de vinificaciones. Finalmente en la tercera etapa o maceración postfermentativa, que comienza con el término de la fermentación alcohólica, el medio es en su mayoría hidroalcohólico y la presencia de esta etapa y su duración dependerá exclusivamente de las decisiones enológicas, de acuerdo al tipo de vino elaborado, siendo importante en vinos con un gran potencial de crianza (Zamora, 2003).

Como se puede apreciar en la Figura 12, la cinética de extracción de las antocianinas y proantocianidinas es diferente, observándose que las antocianinas presentan un incremento en las primeras etapas y posteriormente un descenso, en cambio las proantocianidinas presentan una curva con un incremento gradual a medida que transcurre el tiempo de maceración. La temperatura y el contenido de etanol inciden directamente sobre la extractabilidad de los compuestos fenólicos. Altas

temperaturas aumentan la extracción reduciendo el tiempo para alcanzar esta máxima concentración (Sacchi et al., 2005). El aumento de la concentración de etanol facilita la extracción de los compuestos fenólicos debido principalmente a la acción disolvente de este compuesto (Canals et al., 2005).

La extracción de antocianinas durante la maceración y su máxima concentración de las formas monoméricas ocurre principalmente en los primeros cuatro a cinco días de fermentación. Luego se observa un descenso de la concentración asociado a fenómenos de oxidación, precipitación debido a la adsorción por las paredes de levaduras y modificaciones estructurales (Zamora, 2003). La disminución observada se refiere a las formas libres de antocianinas, ya que a medida que transcurre el tiempo, estos compuestos pueden polimerizarse con las proantocianidinas u otros componentes del vino, lo cual disminuye su degradación y aumenta la estabilización del color (Monagas y Bartolomé, 2009).

En el caso de las proantocianidinas, su extracción es más lenta, distinguiendo a las proantocianidinas provenientes de las semillas y de los hollejos debido a que presentan una extracción diferenciada. Las proantocianidinas de los hollejos se extraen al mismo tiempo que las antocianinas pero con una cinética más lenta, lo cual aumenta con un aumento en la concentración de etanol y la temperatura (Canals et al., 2005; Sacchi et al., 2005). En el caso de las proantocianidinas de semilla, se necesita un tiempo de maceración mayor para su extracción, lo cual se ve favorecido por la presencia gradual de etanol en el medio (Canals et al., 2005). En forma general, la extracción de proantocianidinas depende del tiempo de maceración, con una importante presencia de proantocianidinas del hollejo en las primeras etapas de la maceración y una presencia más importante de proantocianidinas de semillas hacia el final de la maceración. Dependiendo de la diferencia en la extracción de los compuestos fenólicos es que las labores enológicas pueden estar orientadas de acuerdo al tipo de vino que se quiere elaborar, ante lo cual debemos adaptar las condiciones de maceración para influir sobre la extracción de estos compuestos (Sacchi et al., 2005). Diversas labores enológicas pueden incidir en una mayor extracción de estos compuestos, como por ejemplo, el tiempo de maceración, la temperatura, el uso de SO<sub>2</sub>, el tiempo, número y tipo de remontaje utilizado y la aplicación de tratamientos físicos sobre la uva como *flash-detente*, crio-maceración, entre otros, lo que contribuirá a obtener diferentes estilos de vino dependiendo de las necesidades del enólogo o de los consumidores (Zamora, 2003; Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

## **5.2. Cambios en la composición de proantocianidinas durante la vinificación y crianza del vino**

La evolución de los compuestos fenólicos y especialmente de las proantocianidinas durante la vinificación se debe principalmente a dos procesos. El primer proceso se debe a reacciones enzimáticas sucediendo mayoritariamente en las primeras etapas de la vinificación, en cambio el segundo proceso, se debe a reacciones químicas que ocurren durante la vinificación y continúan posteriormente durante la crianza del vino (Cheynier et al., 2000). El uso de algunas técnicas enológicas que pueden incidir en la concentración y composición de los compuestos fenólicos y de las proantocianidinas antes de la vinificación, durante esta y posteriormente en el vino terminado y que se relacionan con los procesos expuestos en esta sección, se estudiaron en vinos blancos y tintos en el Capítulo 3 de esta tesis doctoral.

### **5.2.1. Procesos enzimáticos**

Los procesos enzimáticos que conducen a la oxidación y degradación de compuestos fenólicos en los vinos, pueden ser catalizados principalmente por la enzima endógena de la uva, la polifenoloxidasa (PPO) o por otras enzimas exógenas. La oxidación enzimática mediante la PPO comienza inmediatamente desde el momento de la molienda de la uva, en presencia de oxígeno, siendo esta oxidación muy importante en la vinificación de blancos más que en los tintos. Los principales sustratos de la PPO son los ácidos caftarico y cutárico, generando *o*-quinonas altamente reactivas. Generalmente los monómeros de flavanol y las proantocianidinas son sustratos pobres para la acción de la PPO, no oxidándose directamente debido posiblemente a impedimentos estéricos (Cheynier et al., 2000), pero si pueden reaccionar con las *o*-quinonas de los ácidos mencionados a través de una oxidación acoplada y condensación nucleofílica, lo que conlleva a su degradación (Monagas et al., 2005).

En cuanto a las oxidaciones mediante enzimas exógenas, las  $\beta$ -glucosidasas, pueden ser liberadas por algunas cepas de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* o también ser añadidas mediante preparados enzimáticos del tipo pectinasas o glucanasas en la vinificación (Cheynier et al., 2000). La capacidad de estas enzimas, de escindir el enlace glicosídico de algunos flavonoles y antocianinas, libera la correspondiente aglicona la cual es muy inestable (Monagas y Bartolomé, 2009). El hongo *Botrytis cinerea* a través de la enzima laccasa también puede oxidar a un amplio rango de compuestos fenólicos y a las proantocianidinas a través de la

enzima tanasa (tanin acil hidrolasa) que cataliza la hidrólisis de los ésteres galoilados (Ribéreau-Gayon et al., 2006a; Terrier et al., 2009b).

### **5.2.2. Reacciones químicas**

Durante la vinificación y crianza del vino se producen una serie de reacciones químicas, principalmente entre antocianinas y proantocianidinas y también con otros componentes del vino, que presentan una influencia importante sobre el color, la estabilidad del color, el cuerpo y la astringencia de este. A continuación se describen brevemente las principales reacciones poniendo especial énfasis en las involucradas con las proantocianidinas del vino.

#### **5.2.2.1. Copigmentación**

Este fenómeno ocurre en solución en la cual las formas coloreadas de las antocianinas forman una asociación molecular con otros compuestos no coloreados (copigmentos), mediante uniones  $\pi$ - $\pi$  de apilamiento vertical, mantenidos por enlaces lábiles y de baja energía (fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas) que se estabilizan por la disposición de moléculas de azúcar en el exterior del complejo, entre las cuales se establecen uniones por puentes de hidrógeno (Boulton, 2001). Esta asociación brinda protección al ataque nucleofílico del agua y para otras especies tales como peróxidos y dióxido de azufre (Matsufuji et al., 2003). Los copigmentos son generalmente incoloros, pero la asociación con las antocianinas produce un efecto hiperocrómico (aumento de absorbancia) y un cambio batocrómico (desplazamiento hacia longitudes de onda mayores) en el espectro de absorción. Este fenómeno generalmente depende del pH, del contenido de etanol, de la temperatura y de la estructura y concentración de los copigmentos (Boulton, 2001). Entre los compuestos del vino tinto que pueden actuar como copigmentos por su importancia son los compuestos flavonoides y los ácidos hidroxicinámicos, siendo los flavonoles, rutina y quercetina, los que producen la más fuerte copigmentación seguidos de algunos ácidos hidroxicinámicos y finalmente los flavanoles (Gómez-Míguez et al., 2006). Los flavanoles presentan una menor capacidad de interactuar con las antocianinas debido a la ausencia de una estructura planar (Gómez-Míguez et al., 2006), sin embargo debido a que los flavanoles se encuentran en gran concentración en los vinos tintos, su unión con las antocianinas puede contribuir en forma significativa al color de los vinos tintos jóvenes (González-Manzano et al., 2009). Además la presencia de grupos galoil en la estructura de las proantocianidinas aumenta la fuerza de la copigmentación, en este caso la fuerza de copigmentación no se relaciona al grado de

polimerización sino que más bien se debe a la conformación de cada proantocianidina y la habilidad para establecer puentes de hidrógeno, siendo en este caso los dímeros con uniones C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> los que presentaron una asociación más fuerte (Berké y De Freitas, 2005). La copigmentación es un proceso de gran interés en la enología debido a la contribución significativa del color en los vinos tintos jóvenes y como un posible primer paso en la formación de pigmentos más estables durante la crianza del vino (Brouillard y Dangles, 1994).

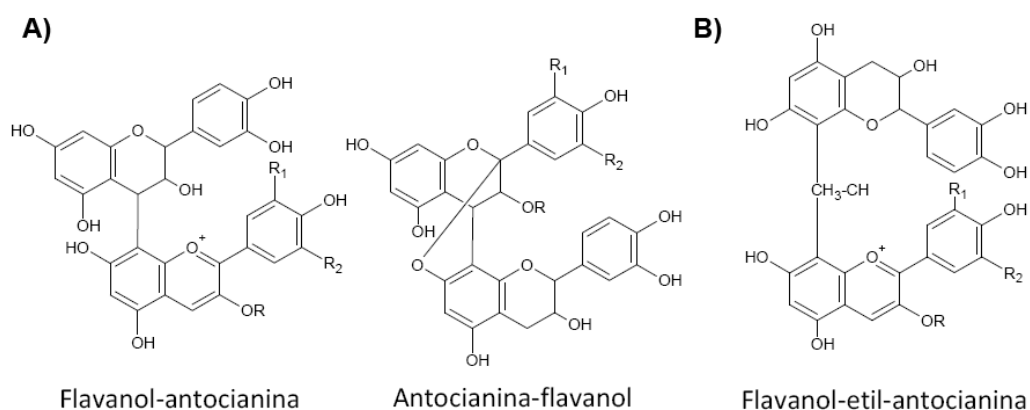
#### **5.2.2.2. Condensación directa antocianina-flavanol y flavanol-flavanol**

Las proantocianidinas pueden reaccionar como nucleófilos a través de la posición de su carbono 8 y carbono 6. La ruptura catalizada en un medio ácido de las uniones interflavánicas de las proantocianidinas puede ocurrir en el vino, dando como resultado un compuesto electrófilo intermediario (carbocación). Se han propuesto dos mecanismos para este tipo de reacciones, la unión antocianina-flavanol (A-F) y la unión flavanol-antocianina (F-A) (Figura 13).

La condensación directa antocianina-flavanol comienza con el ataque nucleofílico de los carbonos 6 y 8 del flavanol al carbono electrofílico en posición 4 de la antocianina, que se encuentra en la forma de catión flavilio, lo cual da lugar a un flaveno, el cual puede oxidarse nuevamente a su forma como catión flavilio y finalmente deshidratarse a pigmentos de color amarillo (forma xantiliium) (Santos-Buelga et al., 1999) o condensarse en forma bicíclica a un producto incoloro (Bishop y Nagel, 1984).

En el caso de la condensación flavanol-antocianina, la ruptura de la unión interflavánica de las proantocianidinas en un medio ácido, genera un carbocación el cual actúa como compuesto electrofílico y reacciona con el carbono nucleofílico 6 u 8 de la antocianina, que se encuentra en la forma hemiacetal hidratada, dando lugar a un dímero incoloro que puede deshidratarse a la forma catión flavilio de color rojo (Haslam, 1980; Terrier et al., 2009b).

Los factores que pueden afectar estas reacciones son el pH del vino, la temperatura y el grado medio de polimerización (mDP) de los flavanoles involucrados (Malién-Aubert et al., 2002; Salas et al., 2003; Dueñas et al., 2006).



**Figura 13.** Estructura química de los compuestos formados por condensación directa entre flavanoles y antocianinas (A) y mediada por acetaldehído (B) (adaptado de Monagas y Bartolomé, 2009).

### 5.2.2.3. Condensación antocianina-flavanol y flavanol-flavanol mediada por aldehídos

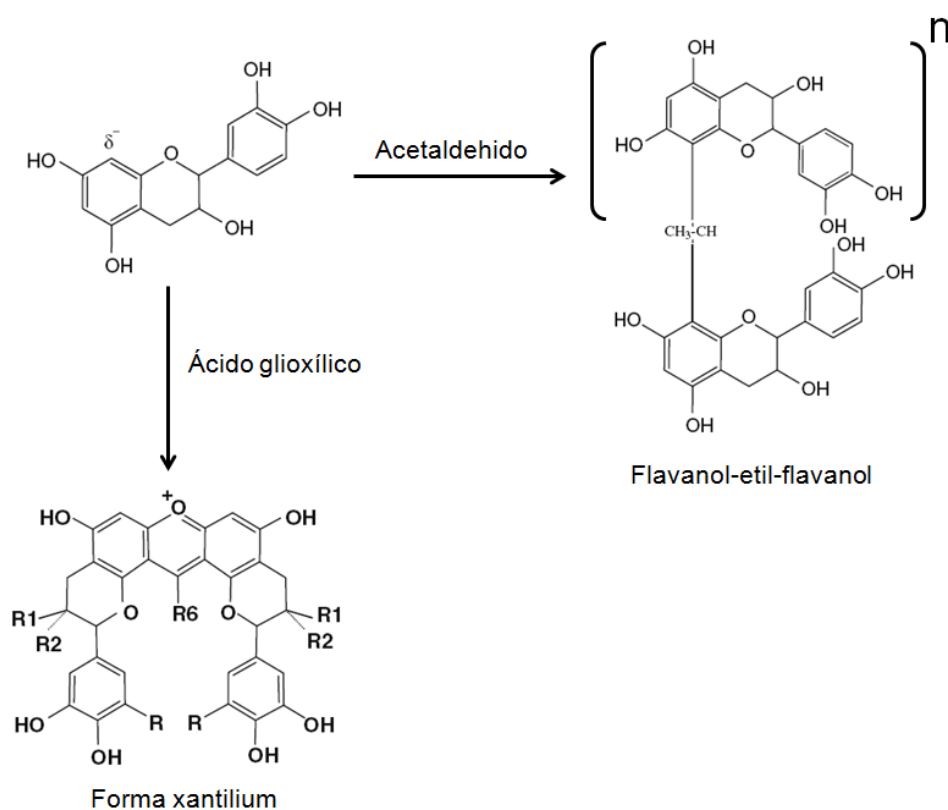
El mecanismo de condensación mediada por aldehídos fue propuesto por primera vez por Timberlake y Bridle (1976). Este consiste en la reacción del aldehído, en la forma de carbocatión, con el flavanol en la posición C<sub>6</sub> o C<sub>8</sub> del anillo A (Figura 13). El compuesto formado luego de su deshidratación da lugar a un nuevo carbocatión que reacciona con las antocianinas. El compuesto resultante forma una base quinoidal de color violeta. La estructura formada se encuentra unida por puentes de etilo (CH<sub>3</sub>-CH) (Monagas y Bartolomé., 2009). Estos pigmentos presentan una mayor resistencia a los cambios de pH y a la decoloración en presencia de bisulfitos (Salas et al., 2003). El acetaldehído es el principal aldehído que participa en estas reacciones, el cual se forma en el metabolismo de las levaduras durante la fermentación alcohólica y también se genera gradualmente por oxidación del etanol (Wildenradt y Singleton, 1974). Además del acetaldehído, otros aldehídos que se encuentran en menor concentración en el vino, pueden ser participes de este mecanismo entre los cuales se pueden encontrar el formaldehído, propionaldehído, isovaleraldehído, benzaldehído e isobutiraldehído; también pueden participar el furfural, el 5-hidroximetilfurfural y la vainillina como resultado del tostado de la madera de roble y el ácido glioxílico generado de la oxidación del ácido tartárico por trazas de hierro o cobre (Es-Safi et al., 2003; Terrier et al., 2009b). Entre los factores que afectan estas reacciones se encuentran la presencia de oxígeno, el pH, la temperatura, el grado de polimerización del flavanol y el tipo de antocianina involucrada en la reacción (Monagas y Bartolomé., 2009).



#### 5.2.2.4. Polimerización de las proantocianidinas

Los flavanoles pueden reaccionar como nucleófilos a través de los carbonos en posición 6 y 8, debido principalmente a una ruptura catalizada en un medio ácido de las uniones interflavánicas de las proantocianidinas dando como resultado un compuesto electrófilo intermediario, llamado carbocatión. Aunque este carbocatión puede reaccionar con otros compuestos flavonoides, tales como los antocianos (Sección 5.2.2.2 y 5.2.2.3), cuando el compuesto que reacciona es otro flavanol, el producto formado es una nueva molécula de proantocianidina, lo cual da como resultado un cambio en el grado de polimerización, aumentando cuando los flavanoles nucleofílicos son polímeros o disminuyendo si la reacción se produce con compuestos de bajo peso molecular (Haslam, 1980; Terrier et al., 2009b). Cuando hay una mayor cantidad de monómeros de flavanol, el carbocatión puede producir reacciones secundarias, produciendo compuestos aún desconocidos, disminuyendo de esta forma, la formación de polímeros y aumentando gradualmente la cantidad de oligómeros de flavanol. Estas reacciones se pueden acelerar con un aumento de la temperatura. La polimerización de las proantocianidinas, en ausencia de oxígeno, se produce entre las posiciones  $C_4-C_8$  o  $C_4-C_6$ , dando lugar a una polimerización homogénea (Vidal et al., 2002).

Cuando hay una fuerte presencia de oxígeno, la oxidación del etanol produce acetaldehído, el cual también puede reaccionar con un flavanol, dando lugar a un carbocatión (Sección 5.2.2.3) que reacciona, en este caso, con otro flavanol, formando un polímero unido mediante puentes de etilo. En este caso estas reacciones producen polímeros heterogéneos con diferentes configuraciones. Además del acetaldehído también se puede producir la polimerización en presencia de otros aldehídos como el ácido glioxílico, el furfural, entre otros (Fulcrand et al., 2006). La reacción en este caso es la misma que la presentada en la sección 5.2.2.3 (Figura 14). Todas estas reacciones dan una idea de la diversidad de polímeros formados en el vino, los cuales dependen de las condiciones de vinificación y crianza con maderas y el efecto que esto puede provocar sobre la calidad del vino (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).



**Figura 14.** Polimerización de proantocianidinas mediada por acetaldehid y ácido glioxílico (adaptado de Terrier et al., 2009b).

### 5.2.2.5. Interacciones entre proantocianidinas y otras macromoléculas del vino

Además de las reacciones descritas anteriormente, las proantocianidinas pueden interactuar con otros componentes del vino tales como las proteínas y los polisacáridos.

En primer lugar la interacción entre las proantocianidinas y las proteínas, produce fenómenos de relativa importancia en los vinos, como la precipitación y formación de turbidez, en la percepción de astringencia, en la clarificación y estabilización del vino y en aspectos nutricionales y antinutricionales, derivados de la inhibición de ciertas enzimas (Terrier et al., 2009b). El mecanismo de asociación entre las proantocianidinas y las proteínas de la saliva, especialmente proteínas ricas en prolina e histatinas, da lugar a la formación de complejos solubles o insolubles. Los factores que afectan la formación de estos complejos insolubles dependen de la estructura y configuración del flavanol, en cuanto al número de anillos fenólicos, del grado de polimerización del flavanol y del porcentaje de galoilación (Ricardo Da Silva et al., 1991). Además factores como las características del solvente, la temperatura, la

presencia de polisacáridos y el pH del medio también pueden afectar esta interacción (Terrier et al., 2009b).

Con respecto a los polisacáridos, los principales polisacáridos del vino, incluyendo a las manoproteínas (originadas de las levaduras) y los arabinogalactanos, arabinanos y ramnogalacturonanos I y II (provenientes de la uva) pueden interactuar con los flavanoles (Riou et al., 2002). Además, otros polisacáridos utilizados en la industria enológica como la goma arábiga y preparados de cortezas de levaduras, pueden actuar como coloides protectores impidiendo o limitando la agregación y precipitación de los complejos tanino-proteína, a través de la formación de un complejo proteína-polisacárido-tanino con enlaces de puentes de hidrógeno y efectos hidrofóbicos. Esta interacción depende del tamaño y conformación estructural de las proantocianidinas y del polisacárido y también de la composición del medio (Terrier et al., 2009b).

### **5.3. Implicancias sensoriales de las proantocianidinas**

La composición fenólica de las uvas y el vino tienen una significativa importancia sobre la calidad de estos. Aún cuando la calidad de un producto es algo subjetivo y depende de las personas, en forma general, la calidad se puede definir de acuerdo a ciertos parámetros, como por ejemplo, el grado de satisfacción que un producto genera en los consumidores. Junto con lo anterior, la calidad de un producto, en su mayoría se evalúa por parte de un panel sensorial y de acuerdo a las características organolépticas de este (Lattey et al., 2010). Por otra parte, también se puede explicar la calidad del vino de acuerdo a su composición química, lo cual ha entregado numerosas investigaciones, relacionando la calidad del vino en cuanto a sus características químicas (Mercurio et al., 2010; Kassara y Kennedy, 2011; Fanzone et al., 2012a) (tema desarrollado en mayor profundidad en el Capítulo 1 y 2 de esta tesis doctoral) o la relación entre los compuestos fenólicos y sus atributos sensoriales (Holt et al., 2008; Chira et al., 2011). Es por esta razón de la importancia de las proantocianidinas en el vino, debido a que estos compuestos, inciden en forma directa en parámetros tan importantes como el cuerpo del vino, asociado a sensaciones de astringencia y amargor, que conforman uno de los atributos sensoriales más importantes para la calidad final de este.

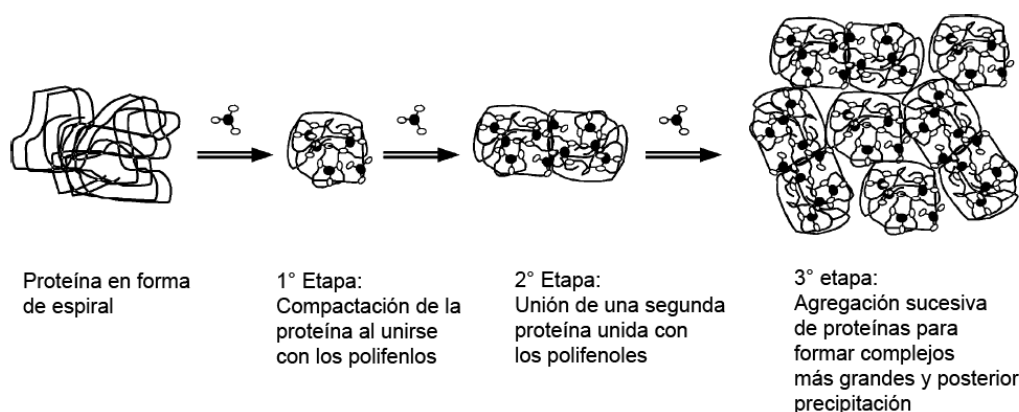
Aún cuando otros compuestos fenólicos pueden inducir sensaciones de astringencia y amargor, las proantocianidinas debido a su mayor concentración en el vino pueden ser las responsables principales de estas dos sensaciones. El amargor es un gusto básico y es principalmente inducido por los flavanoles, especialmente

aquellos de menor tamaño, como monómeros y trímeros (Peleg et al., 1999). La sensación de amargor aumenta con un contenido de etanol alto (Fontoin et al., 2008). Debido al alto número y diversidad de moléculas que inducen el gusto amargo, como moléculas orgánicas, péptidos, iones inorgánicos y sales, diversos mecanismos de transducción están involucrados en la percepción, lo cual puede generar cierta dificultad en las personas en detectar este gusto (Adler et al., 2000; Lesschaeve y Noble, 2005), generando una cierta confusión entre esta sensación y la sensación de astringencia (Lee y Lawless, 1991).

La astringencia, en cambio, es una sensación táctil que se puede describir como un arrugamiento del epitelio bucal y una sensación de sequedad en la boca. Según la “American Society for Testing and Materials” (ASTM), la astringencia es un complejo de sensaciones de sequedad y aspereza en el epitelio bucal por la exposición a sustancias como el alumbre o los taninos (ASTM, 1989). La percepción de astringencia puede ser determinante en la calidad del vino y especialmente en la aceptación de este por parte de los consumidores. Esta sensación va cambiando a medida que el vino se bebe, aumentando con la ingestión repetida de soluciones astringentes como el vino, lo cual puede causar el desgaste de los evaluadores sensoriales, además que esta percepción varía enormemente entre individuos (Fischer y Noble, 1994). Esta sensación no está vinculada a una región particular de la boca, siendo un fenómeno difuso que demora un tiempo en manifestarse y la pérdida gradual se relacionaría al lavado de los complejos tanino-proteína por parte de la saliva fresca (Valentová et al., 2002).

El mecanismo básico de la astringencia aún no se comprende del todo, aunque está bien estudiado que la sensación de sequedad se debería a la precipitación de las proteínas de la saliva, perdiéndose de esta forma, la lubricación de la cavidad bucal (Green, 1993). En este sentido, las proantocianidinas del vino pueden interactuar y precipitar las proteínas salivares. Entre las proteínas salivares que pueden interactuar con las proantocianidinas se encuentran las proteínas ricas en prolina (PRPs) y las histatinas que contienen una alta proporción de residuos de histidina (Terrier et al., 2009b). La interacción entre las proantocianidinas y las proteínas se debería a uniones de Van der Waals y puentes de hidrógeno (Murray et al., 1994). La interacción de las proantocianidinas con las PRPs involucraría dos fenómenos, uno entrópico (asociado al efecto hidrofóbico y cambios conformacionales) y un efecto entálpico (atribuible a los puentes de hidrógeno) (Poncet-Legendre et al., 2007). Este último sería importante en el caso de los monómeros de flavanol y en la formación de polímeros. La agregación de las proantocianidinas con las PRPs de la saliva humana ocurriría en

tres etapas. En la primera etapa se produciría la unión entre las proteínas libres, que se encuentran en forma de espiral, con las proantocianidinas saturando todos los sitios de unión, lo cual conllevaría a un enrollamiento y compactación de la proteína al unirse con las proantocianidinas, provocando una disminución del tamaño físico de la proteína haciéndola más compacta y esférica. En la segunda etapa, con el aumento en la concentración de proantocianidinas, se van formando pequeños agregados homogéneos que se van uniendo entre sí, formando estructuras más grandes, causando su insolubilización. En la tercera etapa, se van produciendo más agrupaciones, con lo cual se produciría la precipitación de estos agregados (Jöbstl et al., 2004; Pascal et al., 2007). El modelo de agregación del complejo flavanol-proteína se puede observar en la Figura 15.



**Figura 15.** Mecanismo de unión y precipitación polifenol-proteína (adaptado de Jöbstl et al. 2004).

La interacción entre el flavanol y la proteína salival puede formar una capa que actuaría como una barrera frente al agua, produciendo la sensación de sequedad en la boca (Charlton et al., 2002). Otra hipótesis sugiere que la unión flavanol-proteína de la saliva, puede modificar las propiedades lubricantes de la saliva, debido a una menor producción de saliva y a un cambio en la composición protéica de esta (Kallithraka et al., 1998). Por otra parte las diversas sensaciones de astringencia que se perciben frente a diferentes tipos de vino, se debería a la naturaleza de la proteína (De Freitas y Mateus, 2001). Es así que las proteínas más pequeñas, son más afines a la agregación debido principalmente a que tienen menos sitios de unión (Charlton et al., 2002). Aparte de esto, la concentración y la estructura química de las proantocianidinas también inciden en la sensación de astringencia. El aumento del grado de polimerización y del peso molecular de la proantocianidina aumenta la astringencia percibida, al igual que el aumento del grado de galoilación (Gawel, 1998;

Peleg et al., 1999; Vidal et al., 2003). El aumento de la afinidad, a medida que la molécula se hace más compleja, se puede explicar debido al gran número de anillos fenólicos que se apilan contra los residuos de prolina, junto al mayor grado de asociaciones libres que se producen cuando hay más grupos de ácido gálico. Aunque hay opiniones diferentes al hecho que la astringencia aumenta a medida que aumenta el grado de polimerización, estudios en soluciones modelo han demostrado que flavanoles con un alto grado de polimerización se perciben como muy astringentes (Vidal et al., 2003).

La crianza del vino generalmente reduce la sensación de astringencia. Las reacciones de condensación entre las proantocianidinas y las antocianinas pueden disminuir la sensación de astringencia (Vidal et al., 2004a). Por otra parte, la ruptura de las uniones interflavánicas debido a la acidez del medio y que se produce en forma natural en el vino, pueden generar proantocianidinas más pequeñas lo cual reduciría la astringencia, aunque podría aumentar el amargor de estos compuestos (Cheyrier et al., 2006).

Además de la concentración y composición de las proantocianidinas, otros factores pueden influir en la percepción de astringencia, como por ejemplo el contenido de etanol (Fontoin et al., 2008; Obreque-Slier et al., 2010b), el pH del medio (Kalithraka et al., 1997; Fontoin et al., 2008), el flujo salival (Peleg et al., 1999), el contenido de azúcares (Smith et al., 1996) y la viscosidad (Nurgel y Pickering, 2005). La presencia de otros compuestos en el vino, como las antocianinas y un incremento en su concentración se han asociado con bajos valores de astringencia, reduciendo la sensación de arrugamiento del epitelio bucal que presentan los vinos jóvenes (Gawel et al., 2007; Sáenz-Navajas et al., 2010). Por otra parte, los polisacáridos también pueden modular la sensación de astringencia (Poncet-Legrand et al., 2007). Los polisacáridos son coloides protectores, que limitan, la agregación y precipitación de ciertos compuestos en el vino. Diversos son los mecanismos de acción propuestos para explicar la modulación de la astringencia, por una parte, los polisacáridos provocarían la encapsulación de las proantocianidinas impidiendo que se unan con las proteínas de la saliva; otra forma sería la unión de los polisacáridos con las proteínas de la saliva, influyendo en la viscosidad de ésta o también se puede producir una asociación polisacárido-flavanol-proteína, que aumentaría la solubilidad de este complejo impidiendo que precipite. En la industria enológica se usan en forma extensiva diversos polisacáridos, pudiendo encontrar la goma arábiga, que es un colide protector contra la precipitación pero que también disminuye la astringencia, así como los preparados a base de manoproteínas (Maury et al., 2001).

## **6. Metodologías de cuantificación de proantocianidinas y su relación con la percepción de astringencia**

La importancia de las proantocianidinas en el vino queda de manifiesto cuando se analizan las secciones anteriores, debido principalmente a los efectos benéficos sobre la salud humana (Zeyuan et al., 1998; Shao et al., 2003; Alén-Ruiz et al., 2009) y a que son compuestos claves en la calidad sensorial del vino, principalmente por las sensaciones de cuerpo, astringencia y amargor (Gawel, 1998) y por reacciones de oxidación en vinos blancos (Monagas et al., 2005). Debido a que la proporción de estos compuestos en la uva y posteriormente en el vino es significativa, y a los efectos que producen, la investigación en esta área es muy importante para la industria vitivinícola. El problema surge debido principalmente a que las proantocianidinas se encuentran disueltas en el vino, en donde se producen diversas reacciones químicas, lo cual representa un verdadero desafío en la cuantificación de estos compuestos, debido principalmente a que las proantocianidinas son moléculas que presentan una gran reactividad, con un gran rango de estructuras y a menudo se encuentran en medios con otros compuestos fenólicos que tienen grupos funcionales similares (Mercurio y Smith, 2008). Aún cuando hay diversos métodos para cuantificar las proantocianidinas, la industria vitivinícola necesita métodos que sean rápidos, reproducibles, que requieran un mínimo de pasos analíticos y equipos y que presenten un menor costo monetario (Sarneckis et al., 2006).

Al igual que los compuestos fenólicos, las proantocianidinas son sensibles al oxígeno, la luz, las condiciones ácidas y alcalinas, además de la acción de la enzima polifenoloxidasas (PPO), lo cual hace disminuir rápidamente su concentración en los tejidos vegetales (Shi et al., 2005). Es por esta razón que la recolección del material vegetal y especialmente su almacenaje antes de la cuantificación, es de suma importancia para que no suceda esta disminución de concentración en estos tejidos. El alto contenido de humedad que se puede observar en los tejidos vegetales colectados puede generar el crecimiento de hongos si no se toman las medidas necesarias. La congelación en seco de las muestras parece ser el mejor método de almacenaje (Matthews et al., 1997), aunque un problema adicional puede ser que las muestras aumentan su naturaleza higroscópica. La aislación de estos compuestos generalmente se realiza mediante una extracción. En este caso, la selección del solvente utilizado debe adecuarse a los compuestos que se quieren extraer. Los solventes orgánicos anhidros extraen principalmente monómeros y compuestos de bajo peso molecular, mientras que la mayoría de las proantocianidinas oligoméricas y poliméricas son parcialmente insolubles en agua. El uso de soluciones ácidas puede causar problemas

debido principalmente a la ruptura de los enlaces interflavánicos, lo cual puede modificar en forma estructural a las proantocianidinas (Hümmer y Schreier, 2008). Es por esto que la extracción es un paso clave en el análisis de estos compuestos, ante lo cual los procedimientos deben ser lo más cuidadosos posibles, con el fin de evitar la disminución de las proantocianidinas en la muestra a cuantificar. La mayoría de las técnicas de análisis de proantocianidinas no son selectivas, lo cual puede ser un problema debido a la poca especificidad de estos métodos. De forma general, los métodos se pueden dividir en tres categorías principales: métodos convencionales, métodos cromatográficos y métodos basados en efectos biológicos (precipitación). El resumen de estas técnicas pondrá relevancia en los métodos analíticos relacionados con la cuantificación de proantocianidinas y su relación con la astringencia percibida.

### **6.1. Métodos convencionales de análisis de proantocianidinas**

Los métodos convencionales son relativamente fáciles de implementar y con costos reducidos, ofreciendo además rapidez en los análisis. El problema de estos es que no presentan tanta especificidad en individualizar compuestos como otras metodologías, ya que gran parte de estos métodos son colorimétricos, ante lo cual no tan solo las proantocianidinas pueden producir un cambio de color sino que también la matriz en donde se encuentran estos compuestos puede influir en la reacción colorimétrica. Entre los métodos convencionales más comúnmente utilizados se encuentran el ensayo con butanol ácido, el método con *p*-dimetilaminocinamaldehído y el ensayo con vainillina.

El método del butanol ácido, se basa en la transformación de las proantocianidinas en antocianidinas en un medio ácido con presencia de calor. Las antocianidinas formadas presentan un color rojo con una absorbancia máxima cercana a los 550 nm. En este caso, las proantocianidinas presentan una ruptura de los enlaces interflavánicos produciendo un carbocatión el cual rápidamente es convertido a una antocianidina por autooxidación (Porter et al., 1986). Este método con ciertas modificaciones se conoce en Chile con el nombre de Reacción de Bate-Smith (Bate-Smith, 1981). El método es sencillo de implementar pero presenta ciertas deficiencias. Uno de los problemas es que la transformación de las proantocianidinas en antocianidinas no es completa, ya que las proantocianidinas con altos valores de mDP producen más antocianidinas que los dímeros debido a la existencia de más unidades de extensión. La estructura de las proantocianidinas también influye en el rendimiento y la cinética de la reacción, por ejemplo las prodelfinidinas presentan un mayor rendimiento que las procianidinas. Además, la unión  $C_4 \rightarrow C_8$  produce una mayor



recuperación de cianidina que la unión  $C_4 \rightarrow C_6$ , debido a diferentes cinéticas de reacción. También las reacciones secundarias que son comunes a este análisis, producen polímeros de coloración rojo-marrón, que absorben a 550 nm lo cual produciría un error por sobrestimación. Todos estos factores hacen bastante limitada la utilización de esta metodología en la cuantificación de flavanoles en vinos (Hümmer y Schreier, 2008).

El método del *p*-dimetilaminocinamaldehído (DMACA), también es una alternativa bastante común de análisis. Su fundamento consiste en la condensación del sitio nucleofílico de la estructura floroglucinol de la proantocianidina (anillo A) con aldehídos, formando una coloración detectable a 640 nm. El compuesto reacciona con las uniones  $C_8$  del anillo A y solo con las unidades terminales. Es una metodología fácil de implementar y la reacción ocurre a temperatura ambiente (Vivas et al., 1994). El problema surge porque la coloración formada por la reacción no es estable (Sun et al., 1998b).

En cuanto al ensayo con vainillina, es un método que presenta una muy buena sensibilidad, especificidad y es simple de ejecutar. Es muy específico para cuantificar un reducido rango de flavanoles (monómeros y polímeros). Es muy parecido al método DMACA, ya que en una solución fuertemente ácida la vainillina protonada en forma de carbocatión reacciona como un electrófilo con el flavanol formando un compuesto coloreado, el cual se mide a 500 nm. Debido a la absorción a 500 nm puede haber interferencia con las antocianidinas debiendo utilizarse un blanco. La estructura de los flavanoles también afecta la reacción al igual que lo que ocurre con el método del butanol ácido (Hagerman y Butler, 1994). En el vino, diversos parámetros pueden afectar la precisión de este método tales como, el tiempo de reacción, la temperatura, el contenido de agua de la muestra, la concentración de vainillina, la acidez del medio y la concentración de proantocianidinas. Sun et al. (1998b), estudiaron estos diferentes factores y concluyeron que debe haber una separación entre (+)-catequinas y proantocianidinas, cuantificándolas en forma separada. La cuantificación en forma separada debe realizarse según la metodología descrita por Sun et al. (1998a) usando cartuchos  $C_{18}$  Sep-Pak, con lo cual se logra la separación de las proantocianidinas en tres fracciones, monómeros, oligómeros y polímeros.

## 6.2. Métodos cromatográficos de análisis de proantocianidinas

La separación y cuantificación de los flavanoles de bajo peso molecular puede ser realizada usando análisis cromatográficos, pero el problema surge al querer analizar los compuestos más polimerizados que son los que se encuentran en mayor

proporción en las uvas y el vino. Las proantocianidinas son compuestos polares y su hidrofobicidad disminuye a medida que aumenta el mDP (Hümmer y Schreier, 2008), aunque los métodos más clásicos de análisis cromatográficos pueden usarse para analizar las proantocianidinas.

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, *size exclusion chromatography*), se usa para separar las proantocianidinas, aunque este método se usa para determinar la masa molecular de estos compuestos. Debido a la polaridad de las proantocianidinas se deben usar compuestos derivados acetilados o éter metílico como fase móvil orgánica (Yanagida et al., 2003). Esta metodología puede usarse como una fase de pre-separación de las proantocianidinas ya que no es un método adecuado para cuantificar estos compuestos (Hümmer y Schreier, 2008).

El uso de cromatografía líquida de fase normal (NP-HPLC, *normal-phase-HPLC*), también se usa para cuantificar las proantocianidinas. La fase móvil en este caso, puede consistir de diversos compuestos, como diclorometano, metanol y ácido fórmico o también se puede usar hexano y acetona. La diferencia con el método SEC se debe a que en NP-HPLC, las proantocianidinas se eluyen en el orden en que aumenta la masa molecular, aumentando la polaridad. Sin embargo, en las proantocianidinas altamente polimerizadas, puede ocurrir una alta adsorción en la columna de sílice que se usa en este tipo de cromatografía y una baja solubilidad en la fase móvil orgánica, no pudiendo detectarse este tipo de compuestos (Rigaud et al., 1993).

La cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC, *reverse phase-HPLC*), es una de las metodologías más comúnmente utilizada para cuantificar compuestos fenólicos y también proantocianidinas, pudiendo separarse en columnas C<sub>18</sub>, aunque la resolución solo se limita a tetrámeros. Las causas para no poder cuantificar las proantocianidinas de alto peso molecular se refieren al mDP de los compuestos, lo cual da como resultado un monte en la línea base que es típica de compuestos altamente polimerizados (Kallithraka et al., 1995). En este caso la elución de los compuestos no se realiza de acuerdo al grado de polimerización. Esta técnica es de gran utilidad para detectar y cuantificar las proantocianidinas en diversas muestras, aunque tiene la limitante de no cuantificar compuestos más polimerizados. Esta técnica se utiliza con detección UV a 280 nm, lo cual puede ser insuficiente, es por esta razón que el uso de fluorescencia puede aumentar la selectividad y reducir las señales de otros compuestos, lo cual puede ser útil para separar, por ejemplo, procianidinas y prodelfinidinas (Hümmer y Schreier, 2008).

El uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), es una técnica que se usa para separar las proantocianidinas de acuerdo a la relación masa/ carga ( $m/z$  ratio). En esta metodología se usan diferentes interfaces para generar los iones, como termospray (TSP), presión atmosférica de ionización química (ACPI) o ionización por electrospray (ESI), siendo esta última técnica la más utilizada (Flamini, 2003; Wu et al., 2005).

El uso de espectrometría de masas asociado a un detector de iones mediante el uso de un láser (MALDI-TOF-MS), es una nueva técnica para el análisis de proantocianidinas. Esta técnica es muy utilizada para el análisis de moléculas orgánicas de gran tamaño. En este caso esta técnica sería la ideal para poder analizar las proantocianidinas de mayor grado de polimerización, ocupándose incluso para cuantificar estos compuestos (Yang y Chien, 2000; Es-Safi et al., 2006).

Como se pudo apreciar las técnicas de HPLC/MS son muy útiles para el análisis de las proantocianidinas, aunque la detección de compuestos altamente polimerizados aún es un desafío. La técnica de MALDI-TOF es una herramienta muy potente para el análisis lográndose analizar proantocianidinas de mayor masa, incluso detectando polímeros sobre un valor de mDP de 25 (Es-Safi et al., 2006), aunque estas metodologías son usadas para el análisis cualitativo de estos compuestos, no siendo tan importantes para cuantificar las proantocianidinas.

Los métodos cromatográficos se pueden usar para analizar en forma intacta las proantocianidinas (Kennedy y Waterhouse, 2000) o para analizar las proantocianidinas luego de una catálisis ácida de sus uniones interflavánicas (Matthews et al., 1997). El análisis de las proantocianidinas luego de una catálisis ácida entrega información acerca de la composición de las subunidades y de la localización de las uniones interflavánicas. El mecanismo consiste en la despolimerización de las proantocianidinas en condiciones ácidas, liberando las subunidades terminales como flavanoles monómeros y las subunidades de extensión como intermediarios electrófilos. El intermediario electrófilo se une a un reactivo nucleofílico lo cual genera un aducto analizable. Los dos reactivos nucleofílicos más utilizados son el bencil mercaptano y el floroglucinol. Entre los dos compuestos hay diferencias notorias, ya que el bencil mercaptano presenta un olor desagradable siendo necesario su uso bajo campanas de extracción de aire, en cambio el floroglucinol no tiene olor y no requiere requerimientos especiales de manipulación, presentando además una mayor selectividad en la formación de los aductos desde las subunidades de extensión (Kennedy y Jones, 2001). La metodología utilizada por estos autores utilizando cromatografía de fase reversa, demostró la alta reproducibilidad del uso de

floroglucinol en el análisis de las proantocianidinas de la uva, entregando información acerca de la composición monomérica, del grado medio de polimerización (mDP) y del peso molecular promedio (aMW) de las proantocianidinas. Según la metodología el rendimiento de conversión de las proantocianidinas a sus subunidades constituyentes fue muy baja y variable, lo cual da cuenta de la heterogeneidad de la unión interflavánica, siendo un indicador que esta metodología no es completamente eficiente, aunque entrega valiosa información siendo una de las más utilizadas en el análisis de las proantocianidinas del vino.

En resumen, estas técnicas son muy útiles para el análisis de las proantocianidinas, desde el punto de vista químico, pero su aplicación requiere del uso de equipamiento con un alto costo monetario y técnicas analíticas más especializadas, limitando su uso en las bodegas productoras de vino, que necesitan técnicas más fáciles de implementar.

### **6.3. Métodos basados en la precipitación de proantocianidinas**

La habilidad de las proantocianidinas de formar complejos con diversas moléculas (Sección 5.2.2.5), también se puede utilizar para cuantificar estos compuestos. El uso de proteínas define funcionalmente a las proantocianidinas, debido a la agregación y precipitación de estos complejos. Sin embargo, este tipo de precipitación depende de diversos factores tales como, el pH, el punto isoeléctrico, la fuerza iónica, el tipo de proteína, la conformación del tanino y la temperatura (De Freitas y Mateus, 2001). Uno de los métodos más usados utiliza seroalbúmina bovina (BSA) como precipitante (Hagerman y Butler, 1981), presentando modificaciones para usarse en el análisis de vinos (Harbertson et al., 2003), en donde el paso de precipitación se complementa con un efecto de blanqueado con bisulfitos. Esta modificación permite cuantificar pigmentos poliméricos de gran tamaño. En la literatura también se le conoce como ensayo Adams-Harbertson (A-H) utilizándose en diversos estudios de proantocianidinas en vinos (Harbertson et al., 2003; Kennedy et al., 2006; Harbertson et al., 2008; Mercurio y Smith, 2008).

Por otra parte, el uso de un polisacárido como la metilcelulosa como agente precipitante es una metodología implementada en forma reciente (Sarneckis et al., 2006), aunque ya habían estudios en vinos y jugos de uva (Montedoro y Fantozzi, 1974). El estudio realizado por Sarneckis et al. (2006), permitió demostrar la selectividad en la determinación de las proantocianidinas y que variables como el pH y la concentración de etanol no influían en forma significativa en el desarrollo del método. Debido a que ambos métodos presentan una etapa de agregación y posterior

precipitación del complejo formado, su naturaleza es similar al mecanismo básico de la astringencia. Es por esta razón que de todos los métodos que existen para cuantificar proantocianidinas, los basados en la precipitación, son los más útiles para acercarse a una cuantificación y a una evaluación analítica de la astringencia sin el uso de un panel sensorial. Diversos estudios demostraron una alta correlación entre la astringencia percibida y la cuantificación con seroalbúmina bovina y metilcelulosa (Kennedy et al., 2006; Mercurio y Smith, 2008). Sin embargo, ambos métodos presentan diferencias en cuanto a la concentración de flavanoles cuantificados, siendo en algunos casos una relación de 3 veces más flavanoles en la metodología basada en metilcelulosa. Mercurio y Smith (2008), mediante el uso de cromatografía de fase reversa, demostraron que la metilcelulosa removía todas las proantocianidinas desde el vino comparado con la seroalbúmina bovina, debido principalmente a la especificidad que mostraba la metilcelulosa, lo cual puede ser la causa de estas diferencias de concentración. Además de estas metodologías relacionadas con la astringencia percibida, se han estudiado otras metodologías que se correlacionan bien con este parámetro. Condelli et al. (2006) y Monteleone et al. (2004) desarrollaron una metodología que utilizaba la proteína mucina. Llaudy et al. (2004), utilizaron ovoalbúmina como agente precipitante y soluciones de ácido tánico como estándares. La relación entre la astringencia percibida y el contenido de proantocianidinas, no depende solamente de la metodología utilizada para este fin, sino que también depende de otros factores como el costo de los reactivos, facilidad de implementación y reproducibilidad y un menor uso de equipos. Claramente las dos metodologías más utilizadas actualmente son la precipitación con seroalbúmina bovina y con metilcelulosa, pero ambas presentan diferencias importantes entre ellas. Tal como se explicó anteriormente, las diferencias de concentración entre ambos métodos es un punto a tener en cuenta. En este caso, la metilcelulosa presentaría una mejor especificidad en la cuantificación de las proantocianidinas (Sarneckis et al., 2006). En el mismo sentido, además de asociar la precipitación de proteínas de diverso origen a la astringencia percibida, la difusión de proteínas salivares en matrices de celulosa puede ser una herramienta útil al momento de conocer qué fracción de proteínas de la saliva sería más reactiva con las distintas fracciones de proantocianidinas que es posible encontrar en un vino, así como con otros componentes de este (polisacáridos, ácidos orgánicos, etanol, entre otros) (Obreque-Slier et al., 2010a; Ramírez et al., 2011).

Debido a que la astringencia, causada por las proantocianidinas, puede afectar la calidad organoléptica del vino (Gawel, 1998), la astringencia puede incidir en la

aceptabilidad de los vinos por parte de los consumidores. Para una mejor comprensión de las diferencias entre estas metodologías, su relación con la sensación de astringencia y la aceptabilidad por parte de los consumidores, en el Capítulo 2 se hace una revisión de los métodos más comunes de análisis de flavanoles en Chile y cuales se pueden correlacionar de mejor forma con la astringencia percibida en forma sensorial.

## **7. La vitivinicultura chilena**

### **7.1. Breve reseña histórica**

La vitivinicultura chilena esta asociada a la llegada de los españoles al continente americano, ya que el cultivo de la vid estaba relacionado con las prácticas de cultivo de los colonos españoles. Bartolomé de Terrazas y Francisco de Carabantes, en 1548, trajeron a Chile, estacas de vides, las cuales fueron llevadas a Santiago, en donde fructificaron gracias al trabajo de Alonso Moreno, quién fue la primera persona en obtener vino en Chile en el año 1550. Esta producción fue adquirida de inmediato por la iglesia, debido al uso de esta en la misa, ya que fue la única fuente segura de vino en aquella época debido principalmente a que las conexiones marítimas con el Virreinato del Perú, desde donde llegaba vino desde España, eran muy inseguras y esporádicas. En el “Acta de la Partida de Nacimiento Oficial del Vino Chileno” fechada en Santiago el 9 de marzo de 1555, se dio a conocer que Rodrigo de Araya fue la primera persona que produjo vino en cantidades importantes. Los antecedentes que existen sobre el comienzo de la producción de vino en Chile indican que el cultivo de la vid se inició en los sectores aledaños a la ciudad de Santiago, en algunas partes del norte de Chile (Copiapó y La Serena) y en menor medida en los suelos de secano en el sur del país, en donde se encuentra en la actualidad la ciudad de Concepción (Hernández, 2006).

En el siglo XVI, se dictaron las primeras normas relacionadas con la comercialización y consumo del vino, especialmente debido a los graves problemas de alcoholismo de los indígenas autóctonos, quienes estaban acostumbrados a sus propios brebajes que no sobrepasaban los 4° de alcohol, en cambio el vino fácilmente alcanzaba los 12°, siendo mucho más atractivo su consumo que las bebidas ancestrales. En el siglo XVII, Chile ya era el principal productor de vinos del Nuevo Mundo y los cronistas de aquella época destacaban la fertilidad de los suelos, el vigor de las plantas y la calidad de los vinos. En esa época la vitivinicultura chilena se sustentaba en cuatro variedades de uva, las cuales eran; Uva de gallo, de granos

negros grandes y alargados; Uva de Italia, que posteriormente pasó a denominarse Moscatel de Alejandría; Uva San Francisco, que se cultivaba principalmente al norte de Santiago y Uva del país, conocida actualmente como País, que fue la variedad que se impuso debido a su gran resistencia a las sequías y enfermedades fungosas (Hernández, 2006).

A fines de los siglos XVII y mediados del XVIII, los vinos chilenos se exportaban a los países vecinos (Perú, Argentina) y se conocían en gran parte de América. En el siglo XIX, Chile se consolidó como país productor de vinos. En 1810 comienza el proceso de independencia de España, consolidándose en 1818. En 1830, Claudio Gay, naturalista francés y profesor de la Universidad de Chile, crea la Quinta Normal de Agricultura, en donde se inician proyectos de desarrollo vitivinícola sobre bases científicas y técnicas recién traídas desde Francia, la cual en el año 1850 contaba con alrededor de 40.000 vides europeas de 70 distintos tipos plantadas en sus terrenos. Silvestre Ochagavía, que se considera como el padre de las viñas chilenas modernas, viajó comisionado a Europa para contratar expertos franceses e importar vides desde Francia e Italia para remplazar la cepa País por cepas europeas. El buen resultado motivó a otros empresarios como Maximiano Errázuriz, José Tomás Urmeneta, Domingo Fernández Concha, Melchor de Concha y Toro, Bonifacio Correa Albano y Luis Cousiño, a importar las principales variedades europeas de vid desde Francia y Alemania, entre ellas Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc, Semillón, Pinot Noir y Riesling, fundando sus propias bodegas e iniciando una exitosa producción que continúa hasta hoy. Estas vides son las que constituirán la base de la producción de vinos de calidad en Chile. Las parras se adaptaron fácilmente al clima chileno y se cree que las actuales cepas cultivadas en Chile, son los únicos clones de uvas anteriores a la epidemia de filoxera que existen en el mundo (Granett, 2004). En 1879, Alberto Valdivieso inició la producción de vinos espumosos, importando desde Champagne, Francia, las cepas Chardonnay y Pinot Noir, así como los elementos técnicos para la producción de este vino (Müller, 2005; Hernández, 2006).

La historia del vino chileno en el siglo XX no fue fácil. En 1902 el vino comenzó a ser tributado con altos impuestos, bajando considerablemente la producción, además la Ley Seca en Estados Unidos contribuyó a la baja en la producción chilena de vinos de exportación. Entre 1940 y 1980, Chile conoció de sucesivas crisis vitícolas. Por una parte se encontraban los impuestos, una ley de alcoholes que prohibía la plantación de nuevos viñedos, la Segunda Guerra Mundial, que cerraba la puerta a las importaciones, incluyendo la maquinaria vitícola y finalmente la abrupta caída interna de los precios de uvas en los años 70 que afectaron fuertemente a la industria. La

recuperación comenzó recién en 1974, con la derogación de la ley que restringía la plantación de nuevos viñedos y continuó durante la década de 1980 con la introducción de nuevas tecnologías, con la apertura económica y la política de exportaciones. En esta etapa cabe destacar el papel fundamental en la industrialización del vino chileno que jugó Miguel Torres, ya que en 1978, compró una pequeña viña cercana a la ciudad de Curicó e importó maquinaria de última generación, barricas de madera de roble, estanques de acero inoxidable y comenzó con el uso de nuevas técnicas de vinificación, produciendo vinos que estuvieran acordes con las pautas internacionales vigentes en aquellos años. Esto produjo primeramente un rechazo en el mercado nacional, pero luego fijo las pautas en la industria chilena la cual comenzó en forma paulatina a la industrialización del vino chileno que continúa hasta hoy, produciendo vino de una calidad alabada en todo el mundo (Müller, 2005).

## **7.2. Antecedentes generales**

La vitivinicultura chilena se extiende desde los 27° de latitud sur (Provincia de Copiapó, III Región) hasta los 38° de latitud sur (Provincia de Malleco, IX Región) desarrollándose en forma importante en la zona central del país (Figura 16). Esta gran amplitud geográfica incide en la gran variedad de condiciones en las cuales se desarrolla el cultivo de la vid. Por otra parte, debido a la forma geográfica de Chile y a los límites geográficos que presenta; el Océano Pacífico por el oeste, la Cordillera de los Andes por el este, la Patagonia y los fiordos por el extremo sur y el Desierto de Atacama por el norte, determinan que Chile presente un clima privilegiado para la agricultura y particularmente para el cultivo de la vid (Müller, 2005; SAG, 2011).

El clima en gran parte de la zona vitícola corresponde a la denominación “templado-cálido con régimen mediterráneo de lluvias” altamente influenciado por la cercanía de la Cordillera de los Andes y por el Anticiclón del Pacífico. Un verano seco cálido, una radiación solar elevada y una gran amplitud térmica son tres características del clima chileno que permiten plantar vides viníferas en gran parte de la zona vitícola chilena. Las precipitaciones en la región vitícola chilena varían entre 250 y 800 mm por año, de norte a sur. En verano, las temperaturas máximas son mayores a 30 °C y la amplitud térmica en verano fluctúa entre 15 a 18 °C. En Chile, la presencia de heladas es sectorizada, pero no hay presencia de granizo como en la zona vitícola de Mendoza (Argentina).

Debido a las condiciones geográficas de Chile y por la presencia de las barreras naturales ya mencionadas, la presencia de enfermedades en la vid es muy



baja, no observándose hasta el momento la presencia de filoxera (*Dactylosphaera vitifoliae*). Las plagas y enfermedades más comunes son la falsa araña roja de la vid (*Brevipalpus chilensis*, Acari, Tenuipalpidae), burrito de la vid (*Naupactus xantographus*, Coleoptera, Curculionidae), algunos nemátodos de los géneros *Meloidogyne sp* y *Xiphinema sp*, algunos enrolladores de las hojas (*Proeulia sp*, Lepidoptera, Tortricidae), el chanchito blanco de la vid (*Pseudococcus viburni*, Hemiptera, Pseudococcidae) y el margarodes de la vid (*Margarodes vitis*, Hemiptera, Margarodidae). El oídio (*Uncinula necator*) y botrytis (*Botrytis cinerea*) son los únicos hongos que se presentan comúnmente en los viñedos chilenos (Müller, 2005). En el último tiempo ha aparecido la polilla del racimo (*Lobesia botrana*, Lepidoptera, Tortricidae), detectándose en el año 2008, ante lo cual el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) emitió la resolución para el control y erradicación de la plaga, a través de diversas medidas de mitigación.

Debido a la presencia de cadenas montañosas, la zona central de Chile, se define como una planicie central delimitada por la Cordillera de los Andes y Cordillera de la Costa. Es en esta zona en donde se desarrolla principalmente la viticultura chilena, con plantaciones que incluso llegan a los 1000 m sobre el nivel del mar, en el piedmont de los Andes (Valle del Maipo, Comuna de Pirque, Región Metropolitana) (Müller, 2005).

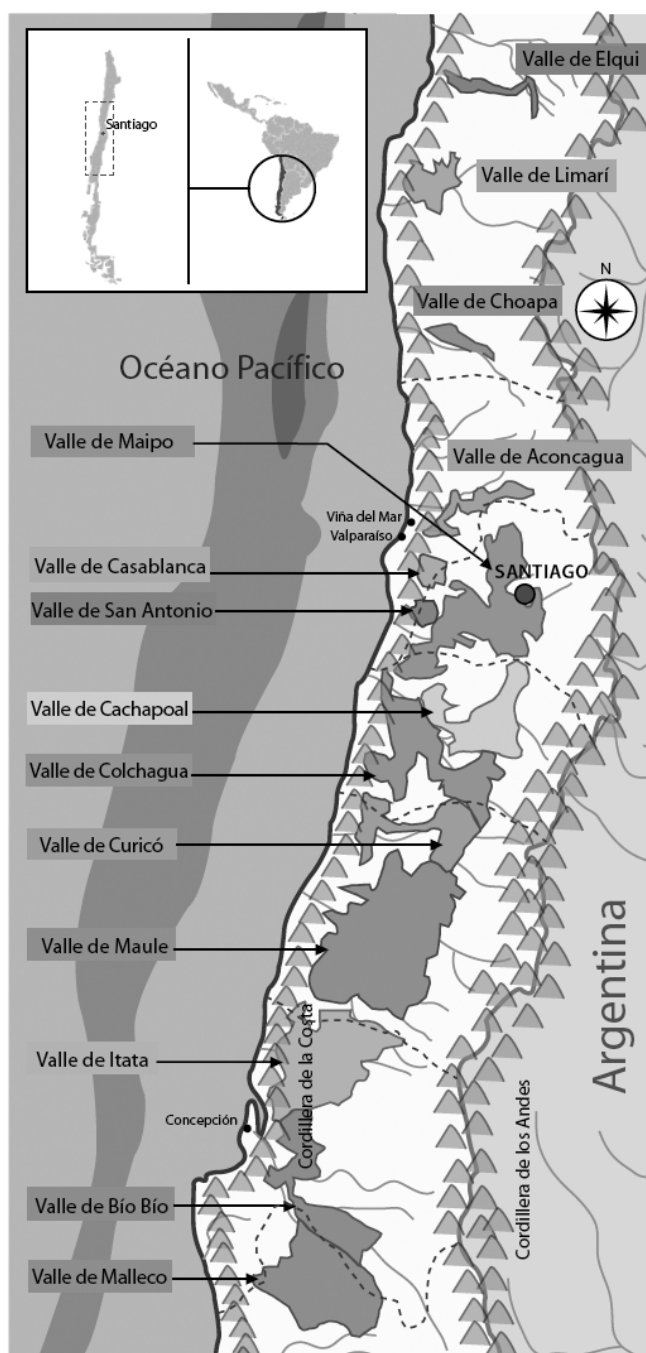


Figura 16. Regiones vitivinícolas de Chile

### 7.3. Situación productiva actual

Durante la década de 1990, la vitivinicultura chilena siguió con el crecimiento y la adopción de maquinaria y técnicas vinícolas, apareciendo nuevas bodegas. En esta etapa las exportaciones de vino chileno se incrementaron, cambiando la producción de vinos desde el mercado nacional al internacional, lo cual conllevó la adopción paulatina de tecnología tendiente a la producción de vinos de calidad. Además, el

aumento de la inversión extranjera y el aumento de las sociedades anónimas, aceleró aún más la modernización del sector vitivinícola. Estos cambios fueron de la mano con nuevas reglamentaciones, como la Ley 18.455 y su respectivo reglamento que fija normas sobre la producción, elaboración y comercialización de alcoholes etílicos, bebidas alcohólicas y vinagres, con el decreto de agricultura n° 78 del 31 de julio de 1986 y el decreto N° 464, promulgado el 14 de diciembre de 1994, el cual establece las bases de la zonificación vitícola y fija las normas para su utilización. Esta zonificación divide al país en cinco grandes regiones vitícolas (Atacama, Coquimbo, Aconcagua, Valle Central y Región del Sur) y 15 subregiones (SAG, 2011).

El viñedo chileno presenta en total una superficie de 116.830 ha plantadas con 32.204 ha para las variedades blancas y 84.626 ha para las variedades tintas. Las zonas geográficas que presentan la mayor cantidad de hectáreas plantadas son la Región del Maule (45.850 ha), Región del Libertador Bernardo O'Higgins (38.517 ha) y la Región Metropolitana (12.432 ha) (SAG, 2010). En la actualidad existen cerca de 339 bodegas de vinos, que se distribuyen principalmente en la zona centro sur de Chile con 133 bodegas (39,2%) en la Región del Maule, 81 bodegas (23,8%) en la Región del Libertador Bernardo O'Higgins y 62 bodegas (18,2%) en la Región Metropolitana (INE, 2012).

Las diez variedades más plantadas de Chile corresponden a Cabernet Sauvignon con 38.425 ha; Sauvignon Blanc con 13.277 ha; Chardonnay con 10.834 ha; Merlot con 10.640 ha; Carménère con 9.501 ha; Syrah con 6.886 ha; Pais con 5.855 ha; variedades tintoreras con 4.526 ha; Pinot Noir con 3.306 ha y Moscatel de Alejandria con 3.117 ha (SAG, 2010). La producción de vinos en el año 2012 alcanzó los 1.255.371.040 L de los cuales 1.015.985.533 L corresponden a vinos con denominación de origen, equivalente al 80,9% de la producción total declarada; 171.686.931 L correspondientes a vinos sin denominación de origen, equivalente al 13,7% del total declarado y 67.698.576 L correspondientes a vinos elaborados con uva de mesa que equivale al 5,4% del total declarado. El aumento en la producción de vino ha sido sostenido ya que en el año 1996 la producción total de vino en el país alcanzaba la cifra de 3.823.693 hL en cambio en el año 2012, la cifra fue de 10.159.855 hL. Cabe destacar que los vinos con denominación de origen con una mayor producción corresponden en el caso de las variedades tintas a Cabernet Sauvignon con 338.735.694 L y en el caso de las variedades blancas a Sauvignon Blanc con 136.956.773 L. La exportación de vinos con denominación de origen en el año 2011 correspondió a un volumen de 396,6 millones de litros y 210,2 millones de litros en el caso de los vinos a granel con un total de exportaciones de 667,7 millones

de litros. Las exportaciones de vinos embotellados significaron retornos por cerca de 1.321,5 millones de US\$, con un retorno total de 1.702,2 millones de US\$ (vino a granel, vino espumoso, entre otros) (SAG, 2012).

Los principales mercados de exportación corresponden al Reino Unido, EE.UU, Japón, Holanda y Brasil (ODEPA, 2012). La exportación de vinos ubica a Chile en el 5° puesto con respecto al volumen total de exportaciones de vino en el mundo. La evolución del precio por litro de vino exportado también ha sido positiva, variando desde cerca de 1 dólar en 1987 a 3,3 dólares en 2011 (ODEPA, 2012). El aumento significativo de las exportaciones de vinos y del precio de este, se debe a las políticas públicas que Chile ha tomado en consideración para aumentar las exportaciones de vino y también su calidad.

La economía chilena es una de las más abiertas del mundo, debido principalmente a que Chile es un socio comercial confiable, con una sólida economía y reglas claras para las inversiones extranjeras, lo que sumado a una baja inflación y una serie de tratados comerciales firmados en los últimos años con los EE.UU, la Unión Europea, Corea del Sur, Canadá, México y otros países de Centro y Sudamérica, hacen que Chile sea un muy buen destino para este tipo de inversiones. Las principales características del modelo exportador chileno han sido su capacidad para adaptarse a las condiciones de cada mercado.

Otras razones serían las excelentes condiciones edafoclimáticas de Chile y la baja presencia de enfermedades de importancia económica. Por otra parte, existe una tradición histórica, cultural y empresarial para el desarrollo de la actividad, debido principalmente al positivo ciclo exportador de las últimas décadas. La inversión extranjera en Chile esta regulada por el Estatuto de Inversión Extranjera (DL 600), que es el principal mecanismo de ingreso de capitales foráneos a la economía chilena. Este decreto regula las condiciones de ingreso de los capitales, presentando un tratamiento no discriminatorio, una estabilidad de las normas y una neutralidad de instrumentos. Estas reglas garantizan que el Estado de Chile a cualquier inversionista extranjero le otorgará el mismo trato que a los nacionales. La estabilidad de las normas ofrece un marco jurídico de certidumbre y los contratos de inversión extranjera tienen el carácter de contrato ley ante lo cual no pueden ser modificados unilateralmente por el Estado (MEFT, 2012).

Esto hace que sean varias bodegas de renombre mundial las que tienen bodegas en Chile o son parte de una asociación con alguna empresa chilena. La mayoría de estos emprendimientos se focalizan en ser comercialmente viables, ya que la mayoría de los inversionistas arriendan instalaciones y compran uvas de calidad con

la finalidad de asegurar el éxito de la inversión. Este es el caso de nombres como Miguel Torres, Michele Laroche, Barón Phillippe de Rothschild, Marnier-Lapostolle, entre otros capitales italianos, australianos, alemanes y norteamericanos.

El éxito del modelo vitivinícola en Chile se debe en gran parte a la presencia de asociaciones que agrupan a las bodegas productoras de vino, de las cuales la más importante es Vinos de Chile A.G. que se constituyó en el año 2007 con el objeto de unificar la que hasta ese entonces eran las asociaciones gremiales Viñas de Chile A.G. y Chilevid A.G. Vinos de Chile A.G. es una entidad gremial sin fines de lucro que como misión principal tiene como objetivo el crecimiento y fortalecimiento de la industria vitivinícola, promoviendo en forma nacional e internacional el vino chileno y también aumentando la investigación y la difusión de nuevas tecnologías y procesos. La investigación se lleva a cabo en las universidades, o en conjunto con las empresas vinícolas a través del concurso de capitales públicos agrupados en instituciones como la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT) dependiente del estado chileno y también a través de los proyectos de investigación llevados a cabo por los Consorcios Tecnológicos Empresariales Vinnova S.A y Tecnovid S.A que agrupan por una parte a las bodegas elaboradoras de vino y a las universidades chilenas, tales como la Universidad de Chile, Universidad Católica de Chile, Universidad de Talca, Universidad de Concepción y Universidad Federico Santa María, con el fin de desarrollar programas de investigación orientados a potenciar la calidad, productividad y producción sustentable, mejorando la competitividad de la industria del vino chileno. Además la promoción internacional del vino chileno en el mundo se lleva a cabo por ProChile, agencia gubernamental dependiente del Ministerio de Relaciones Exteriores y en forma importante por Wines of Chile fundada en el año 2002 e incorporada a Vinos de Chile A.G. en 2007 con el objetivo de posicionar la imagen del vino chileno en el mundo. Está compuesta por 80 viñas, la cuales son responsables de más del 90% del valor total de las exportaciones. El principal objetivo de esta asociación es fortalecer la categoría de vinos chilenos en los mercados internacionales, generando una imagen de calidad de los vinos e incrementando las ventas a partir del segmento sobre los US\$ 12.

Gran parte de la industria vitivinícola chilena se sustenta en dos variedades principales, las cuales son Cabernet Sauvignon y Sauvignon Blanc, que presentan la mayor superficie cultivada y el mayor volumen exportado de vino. Es así que los vinos chilenos de la variedad Cabernet Sauvignon son los que en el último tiempo le han dado el reconocimiento a Chile como un país productor de vinos de calidad. Por su parte la superficie de plantación de la variedad Sauvignon Blanc ha aumentado en los

## **Introducción**

últimos años sobrepasando a la variedad Chardonnay. La variedad Cabernet Sauvignon se cultiva preferentemente en la zona central de Chile, en los Valles de Maipo, Aconcagua, Cachapoal y Colchagua en donde el clima cálido y seco permite la buena maduración de la uva, permitiendo el desarrollo de aromas a frutos rojos, chocolate, té negro y en algunas partes del Alto Maipo se aprecian notas a eucalipto que le aportan frescura a los vinos. Por su parte, la variedad Sauvignon Blanc se cultiva mejor en zonas con un clima más fresco, como los Valles de Casablanca, San Antonio, Aconcagua costa o Limarí, en donde se perciben vinos con notas a frutos cítricos, manzana verde, peras entre otros. Las dos variedades contribuyen a cerca de un 48% de todo el vino declarado en Chile (SAG, 2010) y en términos de dinero aportan un 35% del valor de todos los vinos exportados. Es por las razones anteriores que es necesario el estudio de estas dos variedades debido a que en estos momentos son las variedades principales de la industria vitivinícola chilena. El Plan Estratégico 2020, lanzado por Vinos de Chile A.G. busca posicionar a Chile como el primer productor de vinos Premium y sustentables del Nuevo Mundo. Para que esto ocurra no solo hay que elaborar más vino sino que hay que aumentar la calidad del vino producido. El aumento de la calidad de los vinos pasa por conocer en forma detallada todos los puntos clave en cuanto a su elaboración, conociendo desde la maduración de la uva a todas las labores tendientes a obtener un vino de calidad. Finalmente, tanto para Cabernet Sauvignon como Sauvignon Blanc, resulta necesario conocer algunos aspectos claves en términos enológicos que permitan mejorar las cualidades del producto, contribuyendo de esta forma al aumento de la calidad de los vinos blancos y tintos en Chile.



## **Hipòtesis y** **Objetivos**

## **Hipòtesis y objetivos**

En el último tiempo, Chile se ha caracterizado por elaborar vinos tintos del cv. Cabernet Sauvignon y vinos blancos del cv. Sauvignon Blanc de alta calidad lo cual va asociado con las necesidades actuales del consumidor de vinos. Todas estas características provienen de la materia prima que es la uva y de una buena madurez de ésta, para lograr una buena concentración de aromas y de ciertos metabolitos que inciden en la calidad organoléptica del vino, tales como los compuestos fenólicos. Dentro de este gran grupo de compuestos químicos, los flavanoles o proantocianidinas, son importantes para la calidad sensorial de los vinos, debido principalmente a que estos compuestos inciden en la percepción sensorial de astringencia y amargor, así como en problemas sensoriales de color asociados a pardeamientos, en especial en vinos blancos. Por las razones anteriores es que el presente trabajo de investigación pretende ser una contribución al estudio y conocimiento de la composición química de uvas y vinos de los cultivares Cabernet Sauvignon y Sauvignon Blanc, tomando especial énfasis en la concentración y proporción de las distintas fracciones de proantocianidinas, considerando aspectos tales como las labores enológicas que pueden incidir sobre la concentración y composición de proantocianidinas, los métodos de cuantificación en los vinos y la relación existente entre la astringencia y amargor y la aceptabilidad por parte de los consumidores que son elementos esenciales para mejorar la calidad de este.

Por lo tanto y de acuerdo a las necesidades planteadas, se han propuesto las siguientes hipótesis y objetivo general:

### **Hipòtesis**

- ✓ La composición fenólica de uvas y vinos se encuentra relacionada con la calidad de los mismos, lo cual se ve reflejado por su precio de adquisición.
- ✓ Las distintas fracciones de flavanoles presentes en el vino ejercen influencia directa sobre el nivel de astringencia y amargor.
- ✓ La composición fenólica y las distintas fracciones de flavanoles de vinos blancos y tintos se ve influenciada por los manejos enológicos realizados durante el proceso de elaboración del vino.

### **Objetivo General**

- ✓ Estudiar los flavanoles de uvas y vinos del cv. Cabernet Sauvignon y Sauvignon Blanc y la influencia que presentan algunos factores enológicos sobre sus características químicas y sensoriales.





## **Resultados y** **Discusión**

## **Capítulo I:**

# ***Flavanoles en bayas del cv. Cabernet Sauvignon y su relación con la calidad enológica***

**Subcapítulo I.1:** Composición fenólica de uvas y vinos del cv. Cabernet Sauvignon y su relación con el valor comercial.

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de compuestos químicos de mayor relevancia en la uva y posteriormente en el vino, debido principalmente a su influencia directa sobre las características organolépticas del producto. Durante la maduración de la uva se producen cambios cualitativos y cuantitativos en las diferentes partes de la baya (hollejo y semilla), y por consiguiente en el vino.

Debido a su importancia sobre la calidad del vino es que surge la pregunta si uvas destinadas a diferentes categorías enológicas en cuanto al precio de venta del vino en el mercado, presentan una composición fenólica diferente.

Con el propósito de conocer esta relación en el cv. Cabernet Sauvignon es que en este primer capítulo se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Caracterizar la composición química de hollejos, semillas y vinos del cv. Cabernet Sauvignon proveniente de tres categorías enológicas.
  
- ✓ Caracterizar las fracciones monoméricas, oligoméricas y poliméricas en hollejos y semillas y vinos del cv. Cabernet Sauvignon provenientes de tres categorías enológicas.

Los resultados obtenidos, tendientes al cumplimiento de este objetivo, se describen en el siguiente subcapítulo:

Subcapítulo I.1: Composición fenólica de uvas y vinos del cv. Cabernet Sauvignon y su relación con el valor comercial.

## **Subcapítulo I.1:**

# **Composición fenólica de uvas y vinos del cv. Cabernet Sauvignon y su relación con el valor comercial**

## Phenolic compositions of grapes and wines from cultivar Cabernet Sauvignon produced in Chile and their relationship to commercial value

Alejandro Cáceres<sup>1</sup>, Álvaro Peña-Neira<sup>1</sup>, Andrés Galvez<sup>1</sup>, Elías Obreque-Slier<sup>1</sup>,  
Remigio López-Solís<sup>2</sup> and Joan Miquel Canals<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Department of Agro-Industry and Enology, Faculty of Agronomical Sciences, University of Chile. P.O. Box 1004. Santiago, Chile. <sup>2</sup>Program of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Medicine-ICBM, University of Chile, Independencia 1027, 8380453 Santiago, Chile.

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Oenology, University Rovira I Virgili, Campus de Sescelades, Marce.li Domingo s/n. 43007. Tarragona, Spain.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60 (35), 8694-8702.

### Abstract

The phenolic composition of wine depends on, among other factors, the grapes used to make it. In this sense, knowledge of the chemical composition of grapes and its association with the resulting wines is an important tool to determine if there is a relationship between the phenolic composition of grapes and the price that these wines obtain in the market. For this purpose, grape skins and seeds from the cultivar Cabernet Sauvignon from the central region of Chile, in 2009 and 2010 vintages from two ripening points, were subjected to chemical and phenolic analyses, as were the wines made from these grapes. Grapes and the corresponding wines from three retail price categories, U.S. \$6-8, U.S. \$28-30 and U.S. \$150-160, were evaluated. No differences were found across the price categories in the chemical analysis of grapes. Berry skins and wines from the higher price categories presented a higher concentration only of total tannins, and the differences in their concentrations were only among the different fractions of proanthocyanidins in the skins, seeds, and wines; there were no differences in their proportions. A seasonal effect influenced the concentrations of certain compounds in grapes and led to a decrease in the concentration of total phenols, total tannins, and total anthocyanins between sampling dates as harvesting moved toward the common commercial grape harvest in Chilean viticulture.

**Key words:** Retail price; proanthocyanidins; ripening

## Introduction

The quality of a wine can be defined by several criteria, including its delicacy and complexity, potential for aging, stylistic purity and/or varietal expression; however, these assessments are governed by the criteria of wine experts along with consumer acceptance. Ripening of the grapes is one of the most influential factors in wine quality<sup>1</sup>. The development of the ripening process is a result of complex physiological and biochemical phenomena that are intrinsically linked to environmental conditions (grape variety, soil, climate)<sup>2</sup>. During ripening, a compositional change occurs in the berry that affects the concentration and extraction of oenological compounds, such as sugars, acids, and phenolic compounds.<sup>3</sup> The proanthocyanidins and anthocyanins are the most abundant class of phenolic compounds found in grape berries and wines, and these compounds are important qualitative factors in red wine due their role in astringency, bitterness and color.<sup>4-7</sup> The concentration and composition of phenolic compounds in the berry at harvest time is often considered to be an indicator of the quality of the fruit. Commercial winemakers typically consider the relationship between the chemical composition of grapes, especially in the phenolic composition, and the potential retail price that a red wine bottle can reach. It is important to note that for the production of commercial wines in different price categories, grapes are typically used from vineyards that differ in agronomical managements (e.g. cluster thinning and yield, irrigation). In addition, the viticultural management and winemaking practices and the concentration of compounds at the time of harvest, and their subsequent expression in the wine, lead to different grades or categories of wine, which is then reflected in the price of the final product. There is a lack of studies on Chilean Cabernet Sauvignon that relate the physical and chemical parameters, specifically the composition of proanthocyanidins from grape skins and seeds, with the retail price that these wines reach in the market. To clarify this relationship, the aim of this study was to examine the phenolic composition in Cabernet sauvignon grapes from three commercial vineyards corresponding to three retail price categories from the Aconcagua Valley (Chile).

## Materials and Methods

**Chemical reagents.** Standards of (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-3-O-gallate and 0.45  $\mu\text{m}$  pore size membrane were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A). Vanillin 99%, ethyl acetate, high performance liquid chromatography

(HPLC)-grade acetonitrile, and analytical reagent grade solvents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). A Sep-Pak Plus tC<sub>18</sub> environmental cartridge and a Sep-Pak Plus Short tC<sub>18</sub> cartridge were obtained from Waters (Milford, U.S.A).

**Instrumentation.** The Agilent Technologies 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, U.S.A) consisted of a photodiode array detector (DAD) model G1315B, a quaternary pump model QuatPump G1311A, a degasser model G1379A and an autosampler model G1329A. A reversed phase Nova Pack C<sub>18</sub> column (4 µm, 3.9 mm i.d. x 300 mm; Waters Corp.) was used for the HPLC-DAD analysis of individual compounds. Absorbances were measured using a Shimadzu UV-Vis spectrophotometer model UV/VIS 1700 Pharmaspec (Kyoto, Japan).

**Description of trial site and experimental treatment.** This study was conducted using two vintages: 2008-2009 (2009) and 2009-2010 (2010) from February to April. The sites for this study were three commercial vineyard of cv. Cabernet Sauvignon from the wine company “Viña Errázuriz” located in the Aconcagua Valley, central region of Chile, approximately 100 km north of Santiago. The grapes for this study were harvested in vineyards that belong to the company “Viña Errázuriz” and that are used to the production of three retail price categories of wines: low (U.S. \$6-8 per bottle), medium (U.S. \$28-30 per bottle) and high (U.S. \$150-160 per bottle), commercialized in the domestic and international market. The vineyard average yields were as follows: low category, 9.8 ton/ha; medium category, 8.5 ton/ha; and high category, 7.7 ton/ha. The agroclimatic parameters during the growing season (February to April) for the geographical region where the vineyards are located are presented in Table 1.

| Vintage | mean daily<br>max temp<br>(°C) | mean daily<br>min temp<br>(°C) | day degrees,<br>base 10°C | rainfall<br>(mm) |
|---------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------|
| 2009    | 29.2                           | 10.8                           | 1668                      | 0                |
| 2010    | 25.6                           | 9.7                            | 1551                      | 0                |

<sup>a</sup>Data are from the Agroclimatic system FDF-INIA-DMC in Aconcagua Valley, V Region, Chile.

Diverse productive situations for each vineyard were considered, as the vineyards are specialized in producing commercial wines. The three vineyards maintain

vertically trained vines with drip irrigation, and the vines are spur and cane pruned. The differences between the vineyards are in the type of soil from each site. The low and medium price categories have deep alluvial soils with a loam texture, while the high price category has deep colluvial soil with a loam to sandy-loam texture. The three vineyards have 30-40% stone, which provides good drainage and produces well-balanced plants with moderate vigor. The sampling dates for each commercial vineyard correspond to the first sample harvested 30 days after *veraison* (DAV) and a second sample corresponding to the commercial harvest (CH). The sampling dates for each vineyard in every season are as follows. For the 2009 Season, in the low category, 30 DAV was March 2 and CH was March 27; in the medium category, 30 DAV was March 6 and CH was April 3; in the high category, 30 DAV was March 6 and CH was April 21. For the 2010 Season, in the low category, 30 DAV was March 18 and CH was April 7; in the medium category, 30 DAV was March 17 and CH was April 16; in the high category, 30 DAV was March 20 and CH was April 27. The low temperatures in the 2010 season may have caused a delay in the phenological stages of the grapevines, as *veraison* occurred 6-14 days later in the 2009 season. The 2010 delay set back the dates of the first sample (30 DAV) and the commercial harvest in each commercial vineyard. The commercial harvest date was determined by the company winemakers based on grape parameters, such as total soluble solids, titratable acidity, berry flavor and the mouthfeel characteristics of the whole berries. Three replicates, each from 100 consecutive plants in different rows (300 plants in total), were sampled for every price category.

**Grape sampling and berry chemical analysis.** Three replicates of 200 berries per vineyard were selected from 3-4 clusters per plant from a total of 300 plants on two sampling dates in each commercial vineyard. Berries were randomly collected from different positions in the clusters. Sampled berries were immediately weighed, frozen and stored at -20 °C until processing. The following physical and chemical variables were assessed—weight of 100 berries, skin weight of 100 berries, seed weight of 100 berries and total soluble solids in berry juice—by use of a temperature-compensated refractometer (Atago, ATC-1, Japan).

**Winemaking procedure.** Winemaking was conducted for two seasons, 2009 and 2010. A total of 120 kg of grapes was harvested for each retail price category at the commercial harvest. They were then destemmed and crushed with a semiautomatic crusher machine (Magusa, Eno 3, Spain) and placed in 100 L stainless steel tanks.



Three replicates were used in this experiment. Each replicate consisted of the grapes harvested from 100 plants. In the fermentation tanks, SO<sub>2</sub>, pH, titratable acidity and yeast-assimilable nitrogen (YAN) were checked and adjusted in the juice as necessary. The YAN level was adjusted to a final concentration of approximately 300 mg/L. The pH was adjusted to approximately 3.5. Diammonium phosphate (DAP) additions were made based on the YAN assessment according to company specifications. All tanks were inoculated with a yeast inoculum of 20 g/hL (Uvaferm VRB, Lallemand, France). All the vinifications were controlled daily by measuring the temperature and density of the must. The fermentation process was maintained at a temperature of 25-28 °C with punchdown twice per day. If required, further DAP additions were made during fermentation. After 8-9 days, all wines were dry (< 2 g/L fermentable sugar). The individual replicates were then pressed separately by use of a single basket press (Magusa, PV 50, Spain). Free-run fractions were racked into individual tanks and inoculated with malolactic bacteria (*Oenococcus oeni* VP41, Lallemand, France) according to the manufacturer's instructions. Once the malolactic fermentation was complete (malic acid < 0.2 g/L), the SO<sub>2</sub> levels were adjusted to 30 mg/L, and the wines were racked, cold stabilized and bottled. The free-run wines were used for the chemical analysis described in this work. All chemical analyses were performed after 1 month of storage.

**Extraction of phenolic compounds from berry grapes.** Phenolic compounds were extracted as described in previous works.<sup>8</sup> The skins and seeds were separated by hand from 100 berries, weighed and ground with 30 mL of distilled water. Forty milliliters of hydroalcoholic solution (1:9 v/v ethanol/distilled water) containing 5 g/L of tartaric acid was added to the ground material (skins or grapes), and the weight of the resulting suspension was adjusted to 200 g with the same hydroalcoholic solution. The extracts were macerated for 2 h at 30 °C under mechanical stirring (Barnstead model MaxQ 2000) and were then filtered through a 0.45 μm pore size membrane (Millipore).

**Spectrophotometric characterization.** The total phenol content was determined by UV absorptiometry at 280 nm using gallic acid as a standard.<sup>9</sup> The total tannin content was measured by the method of Ribéreau-Gayon and Stonestreet (1966).<sup>10</sup> The total anthocyanins were measured by diluting the extract with 2% hydrochloric acid in ethanol and comparing spectrophotometric readings of single aliquots treated with either sodium metabisulfite or water.<sup>11</sup> Color intensity (CI), tonality (To), percentage of

yellow (% yellow), percentage of red (% red) and percentage of blue (% blue) were estimated by the method described by Glories.<sup>9</sup>

**Fractionation of Proanthocyanidins by C<sub>18</sub> Sep-Pak Cartridges.** Skin and seed extracts and wines samples were fractionated on Waters tC<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges according to the method described by Sun et al.<sup>12</sup> In brief, 7 mL of skin or seed extract or wine was concentrated to dryness in a rotary evaporator at <30° C. The residue was dissolved in 20 mL of phosphate buffer, pH 7.0. The pH of the resulting solution was adjusted to 7.0 with NaOH or HCl under nitrogen atmosphere. Two tC<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges were assembled (top, Waters Sep-Pak Plus tC<sub>18</sub> environmental cartridge; bottom, Waters Sep-Pak Plus Short tC<sub>18</sub> cartridge) and conditioned sequentially with methanol (10 mL), distilled water (2 x 10 mL), and a phosphate buffer, pH 7.0 (10 mL). Samples were passed through the cartridges at a flow rate no faster than 2 mL/min, and phenolic acids were then eliminated by elution with 10 mL of 67 mM phosphate buffer solution at pH 7.0. The cartridges were dried with nitrogen gas and eluted sequentially with 25 mL of ethyl acetate (fraction FI + FII, containing monomeric and oligomeric flavan-3-ols, respectively) and 15 mL of methanol (fraction FIII, containing polymeric proanthocyanidins). The ethyl acetate eluate was taken to dryness under vacuum, redissolved in 3 mL of 67 mM phosphate buffer, pH 7.0, and reloaded onto the same series of cartridges that had been conditioned again as described previously. The cartridges were dried with nitrogen and eluted sequentially with 25 mL of diethyl ether (fraction FI, containing monomers) and 15 mL of methanol (fraction FII, containing oligomers). Fractions FI, FII, and FIII were evaporated to dryness under vacuum and redissolved in 3 mL of methanol. The total content of flavan-3-ols in each fraction was determined by a vanillin assay.<sup>13</sup>

**Determination of total content of flavan-3-ols.** The vanillin assay was performed as described by Sun et al.<sup>13</sup> A 2.5 mL aliquot of 1:3 (v/v) sulfuric acid/methanol solution and a 2.5 mL aliquot of 1% (w/v) vanillin in methanol were mixed with 1 mL of the sample. The tubes were incubated at 30 °C for either 15 min (FI fraction) or for a period of time long enough to allow maximal reaction (FII and FIII fractions). The absorbance was read at 500 nm. A blank was prepared by substituting the vanillin solution in the reaction mix with methanol. The absorbance of the blank is subtracted from the absorbance of the corresponding vanillin-containing sample. The value obtained is compared to standard curves. Quantification was performed by means of standard

curves prepared from monomers (for FI), oligomers (for FII), and polymers of flavan-3-ol (for FIII) isolated from grape seeds, as previously described.<sup>13</sup>

**HPLC-DAD analysis of flavan-3-ol compounds.** Red wines (50 mL) were extracted with diethyl ether (3 x 20 mL) and ethyl acetate (3 x 20 mL). The resulting extracts were evaporated to dryness at 30 °C, redissolved in 2 mL of 50% (v/v) methanol/water, and membrane-filtered (0.45 µm pore size).<sup>8</sup> Aliquots (25 µL) of the final solution were subjected to reversed-phase chromatographic separation at 20 °C on a Nova Pack C<sub>18</sub> column. A photodiode array detector was set from 210 to 360 nm. Two mobile phases were used as follows: A, water/acetic acid (98:2 v/v), and B, water/acetonitrile/acetic acid (78:20:2 v/v/v). A gradient was applied at a flow rate of 1.0 mL/min from 0 to 55 min and 1.2 mL/min from 55 to 90 min as follows: 100-20% A from 0 to 55 min, 20-10% A from 55 to 57 min, 10-0% A and from 57 to 90 min. Each major peak in the HPLC chromatograms of the extracts was characterized by both the retention time and the absorption spectrum (from 210 to 360 nm). Identification of specific compounds was achieved by comparison of the UV spectra and retention times against those of pure standards. Quantitative determinations were performed by the external standard method and commercial standards. All of the qualitative and quantitative analyses of phenolic composition (including extraction) were performed in triplicate.<sup>8,14</sup>

**Statistical analyses.** The statistical method used for the berry chemical analyses and the phenolic composition of the grape skins and seeds were two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's honestly significant difference (HSD) test, which, after ANOVA was performed on the averages of the treatments examined, was used to establish which categories differed significantly from each other with a significance level of 95% ( $p < 0.05$ ). For the global phenolic content in wines and the proanthocyanidin proportion of the grapes and wines, one-way ANOVA and Tukey's HSD test with a significance level of 95% ( $p < 0.05$ ) were used. All statistical analyses were conducted using Statgraphics Centurion, version 15 (Statpoint Technologies, Inc. 2009).

## Results and Discussion

### Chemical and physical characterization of the berries

Table 2 displays the parameters for the soluble solids (grams/100 g), skin weights (grams), seed weights (grams) and berry weights (grams/100 berries) for the

two seasons. The parameters for the soluble solids from both seasons were within the normal ranges for cv. Cabernet Sauvignon grapes in the central region of Chile.<sup>14</sup> The berry skin weights from the 2009 season were slightly higher, although without great variations across the price categories. The seed weights from both seasons were similar. The berry weights from the 2009 season varied from  $95.0 \pm 1.8$  to  $112.4 \pm 0.8$  g/100 berries. In the 2010 season, the berry weights varied from  $104.8 \pm 1.9$  to  $124.4 \pm 4.9$  g/100 berries. It is interesting to note that, in both seasons, there were no significant differences across the price categories in terms of skin weight, seed weight, or berry weight from the commercial harvest.

**Table 2.** General physical and chemical analyses of Cabernet Sauvignon grape berries from different enological categories<sup>a</sup>

|                                     | low price      |                | medium price   |                | high price     |                |
|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                     | 30DAV          | CH             | 30DAV          | CH             | 30DAV          | CH             |
| <b>Vintage 2009</b>                 |                |                |                |                |                |                |
| <b>Soluble solids (g/100 g)</b>     | 22.4 ± 0.5 aA  | 23.2 ± 0.9 aA  | 23.1 ± 0.6 aAB | 23.1 ± 0.1 aA  | 23.8 ± 0.3 aB  | 24.2 ± 1.1 aA  |
| <b>Skin weight (g)</b>              | 17.5 ± 1.1 aAB | 20.2 ± 1.2 bA  | 16.1 ± 1.9 aA  | 22.7 ± 1.2 bA  | 20.2 ± 1.2 aB  | 20.6 ± 3.0 aA  |
| <b>Seed weight (g)</b>              | 5.0 ± 0.2 bA   | 4.4 ± 0.1 aA   | 4.5 ± 0.3 aA   | 4.4 ± 0.1 aA   | 5.2 ± 0.5 aA   | 4.7 ± 0.3 aA   |
| <b>Berry weight (g/100 berries)</b> | 109.8 ± 2.0 bB | 97.5 ± 1.2 aA  | 102.5 ± 3.0 aA | 97.5 ± 2.1 aA  | 112.4 ± 0.8 bB | 95.0 ± 1.8 aA  |
| <b>Vintage 2010</b>                 |                |                |                |                |                |                |
| <b>Soluble solids (g/100 g)</b>     | 22.2 ± 0.6 aA  | 23.3 ± 0.5 aA  | 25.2 ± 0.7 aB  | 26.0 ± 1.0 aB  | 23.7 ± 0.8 aAB | 24.4 ± 0.3 aAB |
| <b>Skin weight (g)</b>              | 20.3 ± 0.6 bB  | 16.0 ± 0.8 aA  | 18.3 ± 2.4 aB  | 16.8 ± 2.5 aA  | 14.2 ± 0.1 aA  | 17.8 ± 1.7 bA  |
| <b>Seed weight (g)</b>              | 4.9 ± 0.5 aB   | 4.2 ± 0.4 aA   | 4.0 ± 0.2 aA   | 4.9 ± 1.4 aA   | 4.6 ± 0.1 aAB  | 4.7 ± 0.8 aA   |
| <b>Berry weight (g/100 berries)</b> | 109.9 ± 5.7 aA | 104.8 ± 1.9 aA | 107.4 ± 1.1 aA | 110.4 ± 1.8 aA | 124.4 ± 4.9 bB | 107.2 ± 4.2 aA |

<sup>a</sup>All data are expressed as the mean ± standard deviation (n=3). Different lowercase indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the dates sampled for each price categories according to Tukey's HSD test. Different uppercase letters within a row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the price categories for each date sampling according Tukey's HSD test. 30 DAV, 30 days after *veraison*; CH, commercial harvest.

Differences in certain parameters of the chemical and physical compositions of the berries from the 30 DAV sample date tended to decrease with grape ripening and proximity to the commercial harvest date across the enological categories. It is important to consider that because the three harvesting sites are commercial vineyards, they harvested on different dates for technical reasons or due to the phenolic maturity of the grapes. There were no differences in the physical parameters across the three price categories.

### Global phenolic composition of grape berries extracts

#### *Global phenolic composition of the grape skin extracts*

Table 3 displays the results of the analyses of total phenols, total tannins, and total anthocyanins conducted on the berry skin extracts in different categories. Total

phenols from both seasons indicated a decrease in concentration from 30 DAV to the harvest across all categories. At the harvest in the 2009 season, all treatments revealed the same total phenol content, while in the 2010 season, the medium and high categories presented a greater total phenol content. The decrease in total phenols for some enological categories is in agreement with results previously reported by others for Cabernet Sauvignon berry skins.<sup>14,15</sup>

The concentration of total tannins decreased or remained constant between sampling dates in both seasons, which is in agreement with previous studies.<sup>16-18</sup>

**Table 3.** Phenolic composition of Cabernet Sauvignon berry skins from different price categories<sup>a</sup>

| price category      | total phenols<br>(mg of GAE/g of skins) |              | total tannins<br>(mg of CE/g of skins) |               | total anthocyanins<br>(mg of ME/g of skins) |              |
|---------------------|---|--------------|--|---------------|---|--------------|
|                     | 30 DAV                                  | CH           | 30 DAV                                 | CH            | 30 DAV                                      | CH           |
| <b>Vintage 2009</b> |   |              |  |               |   |              |
| <b>low</b>          | 5.4 ± 0.9 bA                            | 3.6 ± 0.3 aA | 11.7 ± 0.6 bA                          | 6.7 ± 0.3 aA  | 4.5 ± 0.3 bB                                | 3.1 ± 0.4 aA |
| <b>medium</b>       | 6.9 ± 0.4 bB                            | 4.3 ± 0.6 aA | 18.1 ± 1.1 bB                          | 10.9 ± 0.8 aB | 4.2 ± 0.5 bAB                               | 2.7 ± 0.3 aA |
| <b>high</b>         | 5.0 ± 0.3 bA                            | 3.9 ± 0.2 aA | 9.6 ± 1.2 aA                           | 9.9 ± 0.4 aB  | 3.5 ± 0.1 bA                                | 3.0 ± 0.1 aA |
| <b>Vintage 2010</b> |   |              |  |               |   |              |
| <b>low</b>          | 4.1 ± 0.8 bB                            | 2.1 ± 0.3 aA | 7.5 ± 0.3 bA                           | 5.6 ± 0.8 bA  | 3.5 ± 0.8 aA                                | 3.5 ± 0.9 aA |
| <b>medium</b>       | 2.5 ± 0.6 aA                            | 2.9 ± 0.9 aB | 7.1 ± 0.8 aA                           | 7.7 ± 1.0 aB  | 4.7 ± 0.2 bB                                | 2.4 ± 0.7 aA |
| <b>high</b>         | 4.4 ± 0.6 bB                            | 3.1 ± 0.0 aB | 7.3 ± 0.3 aA                           | 6.9 ± 0.7 aAB | 3.2 ± 0.7 aA                                | 3.5 ± 0.9 aA |

<sup>a</sup>All data are expressed as the mean ± standard deviation (n=3). Different lowercase letters in a row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the dates sampled according to Tukey's HSD test. Different uppercase letters within a column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the price categories according to Tukey's HSD test. 30 DAV, 30 days after *veraison*; CH, commercial harvest; GAE, gallic acid equivalent; CE, (+)-catechin equivalents; ME, malvidin equivalents.

It is interesting that in both seasons at commercial harvest, the medium and high categories had a higher tannin content than the low category. A higher content is beneficial to the wine made from those grapes because the wines could present a better color stability.<sup>19,20</sup> Skin tasting is used as a criterion of technological maturity by some winemakers; a higher content of extractable total tannins in the grape skins from higher categories may influence certain sensorial characteristics, such as astringency and bitterness, which could influence the time of harvest.<sup>21</sup>

There was a decrease in the total anthocyanin content in the berry skins from 30 DAV to commercial harvest in both seasons. The decrease in anthocyanin content is in agreement with previous studies that indicated a similar decrease found in Cabernet Sauvignon grapes during ripening.<sup>14,15</sup> Interestingly, there were no differences in the concentration of total anthocyanins in the grape skins at commercial harvest across price categories in both seasons. The total phenol and tannin concentrations were higher in the 2009 season than in the 2010 season, while the total

anthocyanin concentrations were similar in both seasons. Because the cultural practices in each of the vineyards were in some ways the same in the two years of study, such as pruning, irrigation, and fertilization, the differences in concentrations between season could be due to differences in humidity and temperature (Table 1) that affected the concentrations of phenolic compounds, particularly tannins in the berry skins.<sup>22,23</sup>

#### *Global phenolic composition of the grape seed extracts*

Table 4 displays the analyses of total phenols and total tannins for the berry seed extracts in the different categories.

| <b>Table 4.</b> Phenolic composition of Cabernet Sauvignon berry seeds from different price categories <sup>a</sup> |                                   |               |                                  |               |
|---|-----------------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|
| price category  | Total Phenols<br>(mg GAE/g seeds) |               | Total Tannins<br>(mg CE/g seeds) |               |
|   | 30 DAV                            | CH            | 30 DAV                           | CH            |
| <b>Vintage 2009</b>   |                                   |               |                                  |               |
| <b>low</b>  | 31.7 ± 2.8 bA                     | 21.9 ± 1.7 aA | 41.8 ± 3.7 aA                    | 40.8 ± 3.4 aA |
| <b>medium</b>   | 37.7 ± 2.1 bB                     | 27.2 ± 1.5 aB | 51.9 ± 5.4 bB                    | 39.2 ± 5.7 aA |
| <b>high</b>   | 29.0 ± 1.7 aA                     | 25.9 ± 1.5 aB | 45.5 ± 1.6 aAB                   | 43.4 ± 3.7 aA |
| <b>Vintage 2010</b>   |                                   |               |                                  |               |
| <b>low</b>  | 17.3 ± 2.8 aA                     | 17.8 ± 3.7 aA | 32.6 ± 3.5 aA                    | 35.8 ± 2.8 aA |
| <b>medium</b>   | 21.1 ± 2.5 aA                     | 18.7 ± 1.8 aA | 37.4 ± 1.9 bA                    | 28.1 ± 4.2 aA |
| <b>high</b>   | 19.9 ± 0.7 aA                     | 18.5 ± 3.6 aA | 32.3 ± 3.5 aA                    | 31.5 ± 4.2 aA |

<sup>a</sup>All data are expressed as the mean ± standard deviation (n=3). Different uppercase letters in a row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the dates sampled according to Tukey's HSD test. Different uppercase letters in a column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the price categories according to Tukey's HSD test. 30 DAV, 30 days after *veraison*; CH, commercial harvest; GAE, gallic acid equivalents; CE, (+) catechin equivalents.

In both seasons, the concentrations of seed phenols decreased or remained constant between the sampling dates. The contents were similar across the categories, although there were differences depending on the season, but the higher price categories demonstrated a trend toward higher phenol contents. The total tannin concentrations decreased in the medium category between the sampling dates, with similar concentrations across the categories at commercial harvest in both seasons. The decrease in seed polyphenols during fruit ripening could be due to oxidation phenomena, although this decrease was only significant in the medium category.<sup>24,25</sup> Compared with the concentration of total tannins in the grape skins, which revealed higher concentrations in the medium and high categories (Table 3), the grape seeds in both seasons did not exhibit significant differences in the tannin contents across the categories (Table 4). According to the polyphenol concentration results for the grape

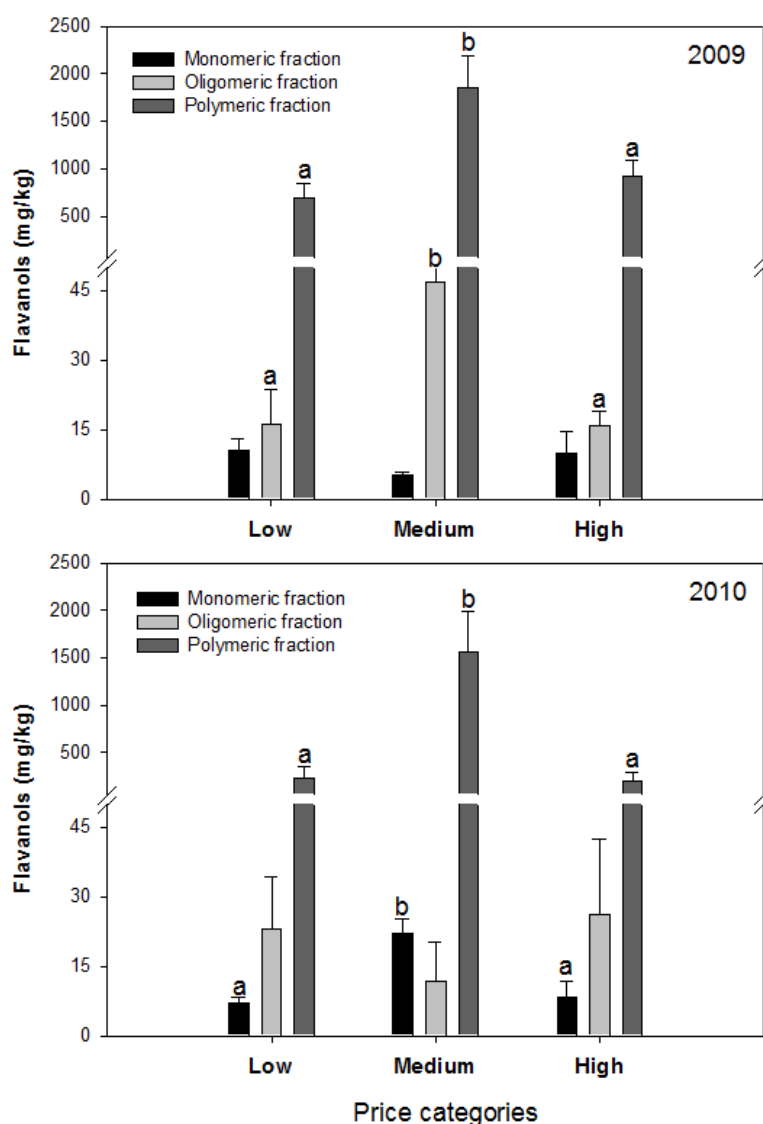
skins and seeds in this study, there were no clear differences across the categories, with the exception of the tannin contents from the skins, which was increased in the highest price categories. It is also important to note that the differences in the concentrations of certain secondary metabolites at the 30 DAV sampling tended to disappear closer to the commercial harvest date. Because the geographical area of study is characterized by no rains during the ripening of the grapes (November to May), red grape varieties for reserve wines are harvested very late to attain the correct phenolic maturity. The significance of this condition is that if red grapes are left on the vine, the longer duration could produce a decrease in the content of certain metabolites such as phenolic compounds, due to overripening and degradation phenomena.<sup>2</sup> An increase in the berry temperature, which occurs in warm growing regions such as the Aconcagua Valley,<sup>26</sup> may have affected the concentrations of tannins and anthocyanins<sup>27</sup> in this study; warming especially affects the berry skins and could explain the concentration differences found between the two date sampling dates.

### **Proanthocyanidins composition according to the polymerization degree in grape berries**

#### *Extractable proanthocyanidins according to the polymerization degree in grape skins*

Figure 1 displays the monomeric, oligomeric, and polymeric fractions in Cabernet Sauvignon berry skins from the commercial harvest. In both seasons, the extractable polymeric fraction (2009, 97.1%; 2010, 95.3%) was far more predominant than the oligomeric (2009, 2.2%; 2010, 2.9%) and monomeric (2009, 0.7%; 2010, 1.8%) fractions in the skins at commercial harvest. It is interesting that in both seasons, the monomeric, oligomeric, and polymeric fractions of flavan-3-ols, did not differ in concentration between the low and high categories. In addition, the medium category had a higher concentration of flavan-3-ol polymers in both seasons (2009, 1855 ± 335 mg/L; 2010, 1563 ± 431 mg/L), compared with the low category (2009, 685 ± 152 mg/L; 2010, 236 ± 113 mg/L) and the high category (2009, 917 ± 169 mg/L; 2010, 205 ± 93 mg/L).

The concentrations of polymeric proanthocyanidins were higher in the 2009 season than the 2010 season, but there was a change only in the concentrations of the different fractions with the proportions remaining the same among the different fractions. The contents of the flavan-3-ol fractions observed in this study are lower than those reported by Sun et al.<sup>28</sup> and higher than those reported by other authors for Cabernet Sauvignon grapes.<sup>14,29</sup>

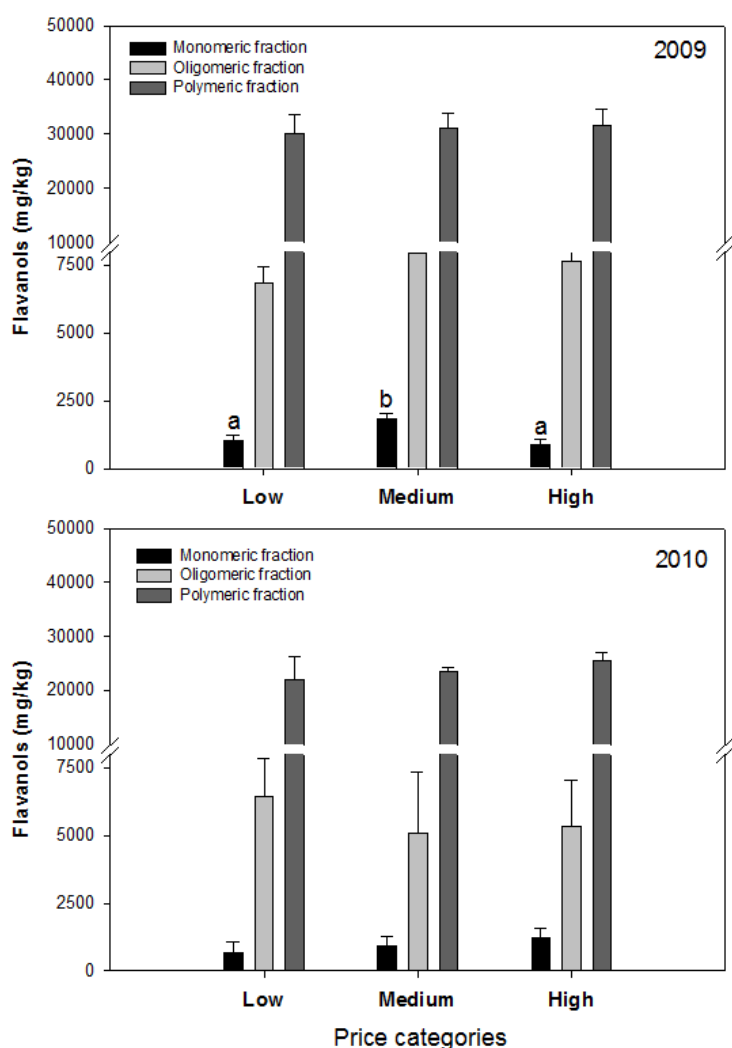


**Figure 1.** Monomeric, oligomeric, and polymeric fractions of proanthocyanidins in berry skins from cv. Cabernet Sauvignon from different price categories. Different letters within the same fraction indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) among the price categories according to Tukey's HSD test.

#### *Extractable proanthocyanidins according to the polymerization degree in grape seeds*

Figure 2 displays the monomeric, oligomeric, and polymeric fractions in Cabernet Sauvignon berry seeds from the commercial harvest. Compared with the grape skins, the seeds revealed higher concentrations of monomers, oligomers and polymers of flavan-3-ol. The monomeric fraction was the least abundant fraction in the seeds (2009, 3.2%; 2010, 3.1%), followed by the oligomeric fraction (2009, 18.9%; 2010, 18.5%), and the polymeric fraction was the most predominant in the seeds at commercial harvest (2009, 78.0%; 2010, 78.4%).





**Figure 2.** Monomeric, oligomeric, and polymeric fractions of proanthocyanidins in berry seeds from cv. Cabernet Sauvignon from different price categories. Different letters within the same fraction indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) among the price categories according to Tukey's HSD test.

Interestingly, the proportion of flavan-3-ol remained unchanged in both seasons and experienced a drastic change only in the concentration of the polymeric fraction, which was higher in the 2009 season. The relative contents of the various fractions were lower than those reported by other authors,<sup>29</sup> however they are higher than those reported by Obreque-Slier et al.<sup>14</sup> When the fractions of flavanols in this study are compared, the grape skins revealed more polymerized flavanols and fewer flavan-3-ol oligomers than the grape seeds.<sup>23,24,30,31</sup> There was a clear seasonal effect on the grape skins and seeds that influenced the concentration of the flavan-3-ol fractions. It is necessary to keep in mind that the vineyards differed in their agricultural management, which may explain the differences in the concentrations across the price categories. The proanthocyanidin fraction concentrations were affected across the price

categories, but their proportions did not change across the categories or between the seasons. Moreover, the proanthocyanidin fraction concentrations in the grape skins demonstrated differences across the price categories; however, the proanthocyanidin concentrations in the seeds did not differ. In general terms, the higher price categories did not present higher concentrations of proanthocyanidin fractions or a different proanthocyanidin proportion than the lower price category. In addition, the polymeric fraction presented the greatest concentration differences across the price categories and between seasons, which may have occurred because this fraction was greatly affected by climatic differences between the seasons and by different agricultural management practices between the price categories.

## **Phenolic composition of the wines**

### *Global phenolic composition of the wines*

The vinification of grapes in commercial wineries that are used for wines with different market prices may reveal differences in the enological tasks involved in the process, such as the numbers of pump-overs, the use of prefermentative and/or postfermentative maceration, and the use of wood in the form of barrels, staves, or chips. These enological practices will cause a differential extraction of compounds from the different quality of grapes, which will impact the concentration and composition of phenolic compounds in the wines made from those grapes. In this study, we employed the same winemaking process to determine if there were differences in the concentrations and compositions of phenolic compounds and if the differences observed in the grapes were also observed in the wines made from these grapes.

Table 5 presents the analyses of total phenols, total tannins, and total anthocyanins in the wines produced from grapes of different enological categories. In both seasons, significant differences in the total phenols were observed across the wine categories; the samples from the low category had the lowest phenol content, which is in agreement with the results reported by other authors.<sup>32-35</sup> The low category presented the lowest total tannin content in both seasons, which is also in agreement with other authors.<sup>35,36</sup>

The overall content of total tannins in the wines studied here were much higher than those published by others.<sup>33,34,36,37</sup> In a normal wine fermentation a greater release of tannins is expected, especially from seeds.<sup>38</sup> Although the content of tannins in the seeds was much greater than in the skins (Tables 3 and 4), the subsequent concentrations in the wine were could due largely to the contributions from the skins

rather than seeds, and observation that held true across all categories. The correlations between the tannin concentrations in the skins and the seeds with those in the wines are as follows: skins 2009,  $r = 0.9509$ ; skins 2010,  $r = 0.7575$ ; seeds 2009,  $r = -0.0156$ ; and seeds 2010,  $r = -0.6642$ ).

**Table 5.** Global phenolic and color composition of Cabernet Sauvignon wines from different price categories<sup>a</sup>

|                              | 2009             |                 |                  | 2010            |                 |                 |
|------------------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                              | low              | medium          | high             | low             | medium          | high            |
| total phenols (mg GAE/L)     | 1421.8 ± 24.9 a  | 1928.8 ± 17.4 b | 1933.0 ± 36.5 b  | 1279.5 ± 44.5 a | 1865.6 ± 93.6 c | 1502.7 ± 74.4 b |
| total tannins (mg CE/L)      | 2274.5 ± 115.1 a | 3947.8 ± 84.8 b | 3880.2 ± 170.2 b | 2366.5 ± 57.0 a | 3460.7 ± 86.5 b | 3501.4 ± 34.3 b |
| total anthocyanins (mg ME/L) | 470.6 ± 19.8 a   | 512.3 ± 5.3 b   | 565.7 ± 15.0 c   | 423.0 ± 22.5 a  | 439.7 ± 35.7 a  | 439.2 ± 19.3 a  |
| CI                           | 12.1 ± 0.1 a     | 13.5 ± 0.0 b    | 14.5 ± 0.0 c     | 11.2 ± 0.1 a    | 13.3 ± 0.2 b    | 14.1 ± 0.1 c    |
| To                           | 0.6 ± 0.0 a      | 0.7 ± 0.0 b     | 0.6 ± 0.0 a      | 0.6 ± 0.0 a     | 0.7 ± 0.0 b     | 0.7 ± 0.0 b     |
| % yellow                     | 33.4 ± 0.3 a     | 36.0 ± 0.7 b    | 33.4 ± 0.2 a     | 33.8 ± 0.3 a    | 35.8 ± 0.2 c    | 34.8 ± 0.3 b    |
| % red                        | 56.3 ± 0.2 c     | 52.4 ± 0.4 a    | 54.5 ± 0.3 b     | 55.5 ± 0.3 b    | 52.9 ± 0.2 a    | 53.4 ± 0.3 a    |
| % blue                       | 10.3 ± 0.1 a     | 11.6 ± 0.3 b    | 12.1 ± 0.2 b     | 10.7 ± 0.1 a    | 11.3 ± 0.4 ab   | 11.8 ± 0.4 b    |

<sup>a</sup>All data are expressed as the mean ± standard deviation (n=3). Different letters within a row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the price categories according to Tukey's HSD test in each vintage. GAE, gallic acid equivalents; CE, (+) catechin equivalents; ME, malvidin equivalents; CI, color intensity; To, tonality.

The higher concentrations of tannins in the skins in the medium and high categories could impact the tannin concentrations in the resulting wines, while the seed tannins did not differ significantly on the harvest date. The strong extraction of tannins from the grape skins could have been due to overripening of the grapes, leading to degradation of the cell walls by active hydrolysis of structural cell wall polysaccharides.<sup>39</sup> Conversely, the price categories presented similar seed tannin contents at harvest, and as discussed above, the skins tannins could produce the differences in content in the resulting wines. An interaction between the tannins and the cell walls and a hardening of the seed coat may have reduced the extraction of tannins from the seeds.<sup>40</sup> The greater tannin content in wines from the medium and high price categories may have been due to the higher concentration of tannins in the grape skins from these categories, which demonstrates a possible relationship between the grape tannin concentration and the projected market bottle price.<sup>36</sup> Furthermore, it is likely that the increased extraction of tannins produced a higher level of extraction of other compounds, such as polysaccharides,<sup>35</sup> which could modify the sensory properties of wines made from these grapes.<sup>41,42</sup>

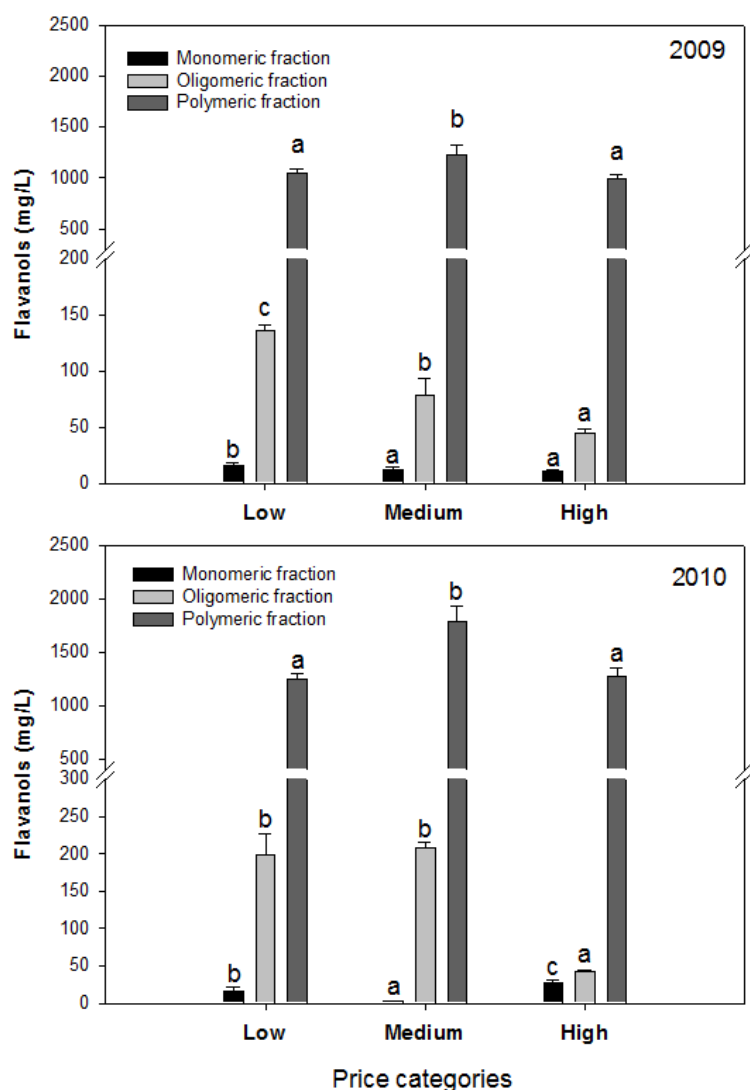
The total anthocyanins differences across price categories were not clear and depended on the season of study, as there were differences across the price categories in 2009, but not in 2010. No significant differences were found in the concentrations of anthocyanins between the wines from the three price categories. The

total anthocyanin contents in this study were comparable to those reported by other authors.<sup>32,43,44</sup> The differences between the seasons and price categories may have been due to differences in the cell wall composition among the different grape categories that affected the extractability of anthocyanins from the berry skins.<sup>45</sup> There was a higher CI in wines from the high category, followed by the medium category. The lowest CI was found in wines from the low Category in both seasons. The wines from the medium and high categories demonstrated a higher To than the low category. The To indicates the development of a color towards orange, combining the yellow fraction with the red fraction. The higher To in the medium and high categories may have been due to the higher content of total tannins contributing to the yellow color development in the wines.<sup>43</sup> Changes in the phenolic composition are well-known to have a strong influence on the color composition and chromaticity of wines. Although significant differences were observed between the color components, these differences were minimal, and there was no clear relationship between the red component (% red) and total anthocyanins in the wines. Instead, there was a weak relationship between the yellow component (% yellow) and the total tannin contents of the wines, with a higher % yellow in the medium and high categories. With regard to the blue component (% blue), there was a higher value in the Medium and High categories. The higher % blue value in these wines was likely due to a strong copigmentation or condensation of the anthocyanins with flavan-3-ols, which stabilize the violet tonalities of the wine.<sup>19</sup> These results are in agreement with those obtained by other authors for wines of the same variety.<sup>32,35,42</sup> The wines produced in the 2009 season revealed higher contents of phenols, tannins, and anthocyanins, which coincides with the results for the phenolic compositions of the grape skins and seeds in the different categories (Tables 3 and 4).

#### *Extractable proanthocyanidins according to the polymerization degree in the wines*

Figure 3 displays the monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol proportions in wines produced from grapes of different enological categories. Sun et al.<sup>12</sup> indicate that the monomeric fraction consists only of (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-3-O-gallate, whereas the oligomeric fraction is formed by dimers, trimers and tetramers of proanthocyanidins, and the polymeric fraction is composed of polymeric proanthocyanidins (more than 4 units). The differences between the price categories in the proportions of the monomeric fractions of flavan-3-ol did not indicate a clear trend in either season. In contrast, the oligomeric and polymeric fractions demonstrated a clear trend in both seasons, with a lower concentration of oligomeric

fraction in the high category and a higher concentration of polymeric fraction in the medium category.



**Figure 3.** Monomeric, oligomeric, and polymeric fractions of proanthocyanidins in wines from cv. Cabernet Sauvignon from different price categories. Different letters within the same fraction indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) among the price categories according to Tukey's HSD test.

The same concentration was observed in the low and high categories. Across both seasons and all wine price categories, the extractable polymeric fraction was far more predominant (2009, 91.6%; 2010, 89.6%) than the oligomeric (2009, 7.3%; 2010, 9.4%) and monomeric (2009, 1.1%; 2010, 1.0%) fractions. There were no differences in the proanthocyanidin proportions across the price categories and between the seasons, although the content of polymeric proanthocyanidins was similar between the low and high categories. These differences in proportions may have influenced the astringency and bitterness of these wines, which should be confirmed in further

studies.<sup>4,5,46</sup> The higher level of the polymeric fraction coincides with that of the polymeric fraction from the berry skins in the medium Category (Figure 1). Even so, it is clear that the proportions and concentrations of proanthocyanidins in the grapes and the resulting wines did not affect the price of the wine in the market, which indicates that more expensive wines do not necessarily contain a higher concentration or different proportion of proanthocyanidins than less expensive wines. An interesting result occurred between the concentrations of proanthocyanidin fractions in grapes and wines, showing an opposite pattern between seasons. Although the winemaking was the same, the extraction could be different due to differences in cell wall composition and difference in binding between proanthocyanidins and polysaccharides.<sup>39,40</sup> Moreover, the study of Bindon and Kennedy,<sup>31</sup> noted that as proanthocyanidin polymerization increased, the affinity of these compounds with the skin cell wall declined. The difference of days in the grape harvest between the seasons could produce a difference in ripening that affected the proanthocyanidins' polymerization and their affinity with cell wall that caused differences in winemaking extraction. Further studies should be done to confirm this behavior.

#### *Flavan-3-ol monomer and dimer contents in the wines*

Table 6 displays the concentrations of monomers and dimers of flavan-3-ol in the three wines price categories; those identified in the wine samples were (+)-catechin, (-)-epicatechin 3-O-gallate, procyanidin B1-B4.

| Table 6. Monomers and dimers of flavan-3-ol quantified in Cabernet Sauvignon wines from different price categories <sup>a</sup> |              |              |              |              |              |              |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|   | 2009         |              |              | 2010         |              |              |
|   | low          | medium       | high         | low          | medium       | high         |
| procyanidin B1, mg/L  | 6.5 ± 0.0 a  | 9.2 ± 0.1 b  | 10.7 ± 0.1 c | 12.3 ± 0.1 a | 14.7 ± 0.1 b | 19.2 ± 0.1 c |
| procyanidin B2, mg/L  | nd           | 16.9 ± 0.1 a | 20.3 ± 0.2 b | nd           | 9.4 ± 0.1 a  | 9.9 ± 0.1 a  |
| procyanidin B3, mg/L  | 2.3 ± 0.1 a  | 8.1 ± 0.2 b  | 10.3 ± 0.1 c | 10.5 ± 0.2 a | 8.8 ± 0.1 b  | 12.6 ± 0.1 c |
| procyanidin B4, mg/L  | 1.8 ± 0.1 a  | 5.1 ± 0.0 b  | 4.4 ± 0.1 c  | 0.6 ± 0.1 a  | 3.2 ± 0.1 b  | 3.4 ± 0.3 b  |
| (+)-catechin, mg/L  | 12.0 ± 0.1 a | 15.2 ± 0.2 b | 13.6 ± 0.1 c | 8.3 ± 0.1 a  | 6.2 ± 0.1 b  | 5.8 ± 0.3 b  |
| epicatechin-3-O-gallate, mg/L   | 2.7 ± 0.1 a  | 6.3 ± 0.2 b  | 6.6 ± 0.0 b  | 1.9 ± 0.1 a  | 6.1 ± 0.1 b  | 7.5 ± 0.3 c  |

<sup>a</sup>All data are expressed as the mean ± standard deviation (n=3). Different letters in a row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the price categories according to Tukey's HSD test in each vintage. nd, not detected.

The flavan-3-ol compound contents in this study were lower than those published by others for Cabernet Sauvignon wines.<sup>35,47</sup> Procyanidin B1-B4 and (-)-epicatechin 3-O-gallate were found in higher concentrations in wines of the higher price categories with significant differences between categories. Procyanidin B2 was not found in the wines from low category in either season. There was no clear trend for the

concentration of (+)-catechin in the different categories studied. There was a clear difference in the concentrations of flavan-3-ol monomers and dimers between the seasons. The higher level of these compounds in the higher price categories may be explained by the higher CI and To observed in the wines in the Medium and High categories due to a copigmentation process (Table 5).<sup>43</sup>

Knowledge of the composition and concentration of phenolic compounds in grapes and their relationship with the retail price of wines in the market is important for determining if higher-priced wines have higher concentrations of phenolic compounds. Furthermore, because higher-quality wines undergo enological procedures that result in a higher level of extraction of these compounds, it is necessary to analyze whether the grapes that produce more expensive wines present different concentrations or compositions of phenolic compounds than grapes that produce less expensive wines or if the enological procedures performed with higher-quality wines are responsible for the higher levels. There was no clear relationship between the higher price categories and a greater content of phenolic compounds in this study; the only such trend was found for the higher concentration of total tannins. Moreover, the only differences between the proanthocyanidin fractions in the skins, seeds and wines were in their concentrations and not in their proportions. Further studies in this area including studies that take into account other compounds that may influence wine composition in conjunction with viticultural management practices, environmental conditions, winemaking procedures and the aging process could provide useful information to improve the quality of the final wine product.

## **Acknowledgements**

We are grateful for the funding from CONICYT (Project Fondecyt N° 1080559; Project Fondecyt N° 1110832) and to wine company “Viña Errázuriz” (Aconcagua Valley) for providing the field facilities. Special thanks are due to Rafael Campos and Ersan Salas for their technical assistance and the members of American Journal Experts for the support in technical translation in this work.

## References

1. Ryan, J.; Revilla, E. Anthocyanin composition of Cabernet sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3372-3378.
2. Haselgrove, L.; Botting, D.; Van Heeswijck, R.; Hoj, P.; Dry, P.; Ford, C.; Iland, P. 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.
3. Coombe, B.; McCarthy, M. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 131-135.
4. Gawel, R.; Iland, P.; Francis, L. Characterizing the astringency of red wine: a case study. *Food Qual. Prefer.* **2001**, *12*, 83-94.
5. Kennedy, J.; Ferrier, J.; Harbertson, J.; Peyrot des Gachons, C. Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 481-485.
6. Brossaud, F.; Cheynier, V.; Noble, A. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2001**, *7*, 33-39.
7. Boss, P.; Davies, C.; Robinson, S. 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.
8. Peña-Neira, A.; Cáceres, A.; Pastenes, C. Low molecular phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of cluster thinning and vineyard yield. *Food Sci. Technol. Int.* **2007**, *13*, 153-158.
9. Glories, Y. La couleur des vins rouges. 2e partie. Mesure, origine et interpretation. *Connaiss. Vigne Vin.* **1984**, *18*, 253-271.
10. Ribéreau-Gayon, P.; Stonestreet, E. Le dosage des tannins du vin rouge et détermination de leur structure. *Anal. Chem.* **1966**, *48*, 188-192.
11. Ribéreau-Gayon, J.; Stonestreet, E. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.* **1965**, *9*, 2649-2652.
12. Sun, B.; Leandro, C.; Ricardo da Silva, J.; Spranger, I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1390-1396.
13. Sun, B.; Ricardo da Silva, J.; Spranger, I. Critical factors of the vanillin assay from catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4267-4274.



14. Obreque-Slier, E.; Peña-Neira, A.; López-Solís, R.; Zamora-Marín, F.; Ricardo da Silva, J.; 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. Matus, J.; Loyola, R.; Vega, A.; Peña-Neira, A.; Bordeau, 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.
16. Harbertson, J.; Kennedy, J.; Adams, D. Tannins in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 54-59.
17. Downey, M.; Harvey, J.; Robinson, S. Analysis of tannins in seed and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2003**, *9*, 15-27.
18. Hanlin, R.; Downey, M. Condensed tannin accumulation and composition in skin and Cabernet Sauvignon grapes during berry development. *Am. J. Enol. Vitic.* **2009**, *60*, 13-23.
19. Rivas-Gonzalo, J.; Bravo-Haro, S.; Santos-Buelga, C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin-3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1444-1449.
20. Pérez-Magariño, S.; Sánchez-Iglesias, M.; Ortega-Heras, M.; González-Huerta, C.; González-Sanjosé, M. Colour stabilization of red wines by microoxygenation treatment before malolactic fermentation. *Food Chem.* **2007**, *101*, 881-893.
21. Peña-Neira, A.; Dueñas, M.; Duarte, A.; Hernández, T.; Estrella, I.; Loyola, E. Effect 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.
22. Jones, G.; Davis, R. Climate influences on grapevine phenology, grape composition, and wine production and quality for Bordeaux, France. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 249-261.
23. Gagné, S.; Saucier, C.; Gény, L. Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9465-9471.
24. Kennedy, J.; Matthews, M.; Waterhouse, A. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry.* **2000**, *55*, 77-85.

25. Pastor del Rio, J.; Kennedy, J. Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 125-132.
26. Montes, C.; Pérez-Quezada, J.; Peña-Neira, A.; Tonietto, J. Climatic potential for viticulture in Central Chile. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2012**, *18*, 20-28.
27. 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.
28. Sun, B.; Ricardo da Silva, J.; Spranger, I. Quantification of catechins and proanthocyanidins in several portuguese grapevine varieties and red wines. *Ciência Téc. Vitiv.* **2001**, *16*, 23-34.
29. Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Ricardo da Silva, J. 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.* **2003**, *51*, 6475-6481.
30. Geny, L.; Saucier, C.; Bracco, S.; Daviaud, F.; Glories, Y. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 8051-8054.
31. Bindon, K.; Kennedy, J. Ripening-induced changes in grape skin proanthocyanidins modify their interaction with cell walls. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2696-2707.
32. Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chem.* **2006**, *95*, 405-412.
33. Ginjom, I.; D'Arcy, B.; Caffin, N.; Gidley, M. Phenolic contents and antioxidant activities of major Australian red wines throughout the winemaking process. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10133-10142.
34. Mercurio, M.; Damberg, R.; Cozzolino, D.; Herderich, M.; Smith, P. Relationship between red wine grades and phenolics. 1. Tannin and total phenolics concentrations. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12313-12319.
35. Fanzone, M.; Peña-Neira, A.; Gil, M.; Jofré, V.; Assof, M.; Zamora, F. Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. *Food Res. Int.* **2012**, *45*, 402-414.
36. Kassara, S.; Kennedy, J. Relationship between red wine grade and phenolics. 2. Tannins composition and size. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8409-8412.
37. Harbertson, J.; Hodgins, R.; Thuston, L.; Schaffer, L.; Reid, M.; Landon, J.; Ross, C.; Adams, D. 2008. Variability of tannin concentration in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2008**, *59*, 210-214.

38. Ristic, R.; Iland, P. 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.* **2005**, *11*, 43-58.
39. Nunan, K.; Davies, C.; Robinson, S.; Fincher, G. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Plant Physiol.* **2001**, *214*, 257-264.
40. Hanlin, R.; Hrmova, M.; Harbertson, J.; Downey, M. Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2010**, *16*, 173-188.
41. Vidal, S.; Courcoux, P.; Francis, L.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Williams, P.; Waters, E.; Cheynier, V. Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Qual. Prefer.* **2004**, *15*, 209-217.
42. Ducasse, M.; Canal-Llauberes, R.; De Lumley, M.; Williams, P.; Souquet, J.; Fulcrand, H.; Doco, T.; Cheynier, V. Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenols and polysaccharide composition of red wines. *Food Chem.* **2010**, *118*, 369-376.
43. Pérez-Magariño, S.; González-San José, M. Polyphenols and color variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chem.* **2006**, *96*, 197-208.
44. Kontoudakis, N.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J.M.; De Freitas, V.; Zamora, F. Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chem.* **2011**, *124*, 767-774.
45. Ortega-Regules, A.; Ros-Garcia, J.; Baustista-Ortin, A.; López-Roca, J.; Gómez-Plaza, E. Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis vinifera* L.): technological implications. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 223-231.
46. Vidal, S.; Francis, L.; Noble, A.; Kwiatkowski, M.; Cheynier, V.; Waters, E. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Anal. Chim. Acta.* **2004**, *513*, 57-65.
47. Granato, D.; Katayama, F.; de Castro, I. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chem.* **2011**, *129*, 366-373.

## **Capítulo 2:**

### ***Flavanoles en vinos: Comparación de métodos analíticos y relación entre composición química y calidad sensorial***

**Subcapítulo II.1:** Cuantificación de proantocianidinas en vinos y su relación con la astringencia percibida.

**Subcapítulo II.2:** Composición química de vinos comerciales y su relación con el precio de venta.

**Subcapítulo II.3:** Proantocianidinas en vinos tintos y su relación con la aceptabilidad de los consumidores.

La importancia de las proantocianidinas se debe principalmente a su influencia directa sobre las características organolépticas del producto, especialmente en el caso de la astringencia y amargor. En el caso de su cuantificación, la gran variedad de metodologías disponibles, y las diferencias en cuanto a su facilidad de implementación, costos asociados y fiabilidad de los resultados hace que la investigación en esta área sea de importancia para los productores de vinos, especialmente debido a las características entregadas por estos compuestos. Además la calidad de un vino también puede estar asociada a la concentración de compuestos fenólicos que junto a las características organolépticas pueden definir un estilo de vino en particular. Sin lugar a dudas, la astringencia, puede influir sobre la calidad sensorial del vino y también sobre la calidad química de este, debido principalmente a que son las proantocianidinas y sus fracciones las que producen este descriptor, lo cual puede condicionar la menor o mayor aceptación de un vino por parte de los consumidores.

Con el propósito de conocer los métodos de cuantificación de proantocianidinas, la relación existente entre la composición química y la calidad del vino, y la aceptación por parte de los consumidores y su relación con la astringencia percibida es que en este segundo capítulo se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Comparar el contenido de proantocianidinas totales en vinos tintos del cv. Cabernet Sauvignon, vinos rosados del cv. Cabernet Sauvignon y blancos del cv. Sauvignon Blanc cuantificados por cuatro métodos analíticos y su correlación con la percepción de astringencia medida mediante un panel sensorial.
- ✓ Estudiar la influencia de la composición fenólica de vinos tintos comerciales chilenos del cv. Cabernet Sauvignon medidos por métodos químicos sobre su precio de adquisición
- ✓ Estudiar la relación existente entre la composición fenólica de los vinos en cuanto a su composición y concentración y su influencia sobre la aceptabilidad de vinos comerciales chilenos de los cv. Cabernet Sauvignon y Merlot.

Los resultados obtenidos, tendientes al cumplimiento de este objetivo, se describen en los siguientes subcapítulos:

Subcapítulo II.1: Cuantificación de proantocianidinas en vinos y su relación con la astringencia percibida.

Subcapítulo II.2: Composición química de vinos comerciales chilenos y su relación con el precio de venta.

Subcapítulo II.3: Proantocianidinas en vinos tintos y su relación con la aceptabilidad de los consumidores.

## **Subcapítulo II.1:**

# **Cuantificación de proantocianidinas en vinos y su relación con la astringencia percibida**

## Comparison of analytical methods for measuring proanthocyanidins in wines and their relationship with perceived astringency

Alejandro Cáceres-Mella<sup>1</sup>, Álvaro Peña-Neira<sup>1</sup>, Jaime Narváez-Bastias<sup>1</sup>, Carla Jara-Campos<sup>1</sup>, Remigio López-Solís<sup>2</sup> and Joan Miquel Canals<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agro-Industria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Casilla 1004. 8820808. Santiago, Chile. <sup>2</sup>Programa de Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, 8380453. Santiago, Chile.

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología, Universidad Rovira I Virgili, Campus de Sescelades, Marce.li Domingo s/n. 43007. Tarragona, Spain.

Enviado a International Journal of Food Science and Technology (Manuscript ID: IJFST-2013-12609)

### Abstract

The concentration of proanthocyanidins from twenty red wines from cv. Cabernet Sauvignon, five *rosé* wines from cv. Cabernet Sauvignon and five white wines from cv. Sauvignon Blanc were quantified using four analytical methodologies and their relationship with the perceived astringency was investigated. Proanthocyanidin concentrations were determined by a methylcellulose precipitation assay, a protein precipitation assay and two colourimetric methods (Bate-Smith and vanillin assay). The four methodologies showed high repeatability but differed widely in proanthocyanidin concentrations. The methylcellulose and protein precipitation assays could not quantify proanthocyanidins in *rosé* and white wines. The protein precipitation assay gave the lowest concentration of proanthocyanidins in all of the red wines. The methylcellulose precipitation assay ( $r = 0.7725$ ;  $r^2 = 0.59$ ) and the protein precipitation assay ( $r = 0.6828$ ;  $r^2 = 0.47$ ) showed a strong correlation with the perceived astringency compared with colourimetric methods. The strong correlation of the methylcellulose precipitation method with the perceived astringency could be a useful tool to estimate red wine astringency.

**Key words:** *Protein precipitation, methylcellulose, proanthocyanidins, astringency, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc*



## Introduction

Proanthocyanidins compounds are important qualitative factors in wine due to their role in astringency, bitterness and colour stability (Boss *et al.*, 1996; Gawel, 1998; Brossaud *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Astringency is one of the most important sensory attributes in red wines (Gawel *et al.*, 2001; Vidal *et al.*, 2004; Payne *et al.*, 2009; Villamor *et al.*, 2009), and is caused by the binding of condensed tannins or proanthocyanidins with salivary proteins, which produces a sensation that is described as dryness and puckering in the oral surface of the mouth (Llaudy *et al.*, 2004). The ability to analyse these compounds is important in various areas of knowledge and especially in the winemaking industry, which needs methods that are reproducible, inexpensive, require minimal analytical skills and equipment and deliver reliable results (Sarneckis *et al.*, 2006). Furthermore, the use of analytical methods that correlate well with perceived astringency is very important for quality control. Although there are several studies on the quantification of proanthocyanidins in wines (Bate-Smith, 1973; Hagerman & Butler, 1978; Saucier *et al.*, 2001; Harbertson *et al.*, 2002; Kennedy *et al.*, 2006; Sarneckis *et al.*, 2006; Mercurio *et al.*, 2007; Seddon & Downey, 2008), there is a lack of studies that quantify proanthocyanidins in red, *rosé* and white wines from Chile while considering methods that are easy to implement in wine cellars and correlate strongly with the perceived astringency. It is important to consider the relationship between the structure of tannins and the astringency perceived. Although sensory analysis is a powerful tool to keep in mind for winemakers, the cost is high and subjectivity is inherently introduced with the use of a sensory panel that is composed of people (Valentová *et al.*, 2002). For this reason the aim of this study was to compare four analytical methods for the quantification of proanthocyanidins in Chilean red, *rosé* and white wines and their correlation with the perceived astringency.

## Materials and methods

**Chemicals reagents and equipment.** Methylcellulose (1500 cP viscosity at 2%), bovine serum albumin (BSA, fraction V, lyophilized powder), sodium dodecyl sulfate (SDS), triethanolamine (TEA, 98%), (+)-catechin and ferric chloride hexahydrate (FeCl<sub>3</sub>, 98%) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A). Ammonium sulphate, potassium bitartrate, sodium chloride (NaCl), vanillin 99%, glacial acetic acid, hydrochloric acid, sodium hydroxide (NaOH), ethanol, methanol, ethyl acetate, diethyl ether and sulphuric acid were purchased from Merck (Darmstadt,

Germany). All reagents were analytical grade or superior. The Sep-Pak Plus tC<sub>18</sub> environmental cartridge (900 mg) and Sep-Pak Plus Short tC<sub>18</sub> cartridge (400 mg) were obtained from Waters (Milford, CA, U.S.A). Ultra-pure water was obtained from a Purelab Ultra MK2 purification system (Helga, Hertfordshire, UK). Phosphate buffer pH 7.0 was acquired from Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, U.S.A). Nitrogen gas was supplied by Indura S.A (Santiago, Chile). The pH was measured with an 8417N pH-meter (Hanna Instrument, Rhode Island, U.S.A). Centrifugation was performed in a Labofuge 400 centrifuge (Heraeus, Hanau, Germany). Heating was performed in a WB/OB 7-45 water bath (Mettler GmbH, Büchenbach, Germany). Absorbances were measured using a Shimadzu UV-Vis spectrophotometer model 1700 Pharmaspec (Kyoto, Japan).

**Wine samples.** Twenty red wines from cv. Cabernet Sauvignon, five rosé wines from cv. Cabernet Sauvignon and five white wines from cv. Sauvignon Blanc from different geographical regions of Chile from the 2009 vintage were purchased in supermarkets and specialty wine stores in Santiago Metropolitan Region.

**Wine chemical analyses.** The analytical methods recommended by O.I.V (2011) were used to determine pH, titratable acidity (g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>) and alcohol content (% v/v). The total phenol content was determined by UV absorptiometry at 280 nm and was expressed as g GAE/L (GAE: gallic acid equivalent) (Glories, 1984). Table 1 presents basic data for the wines used in this study. All analyses were performed in triplicate.

**Determination of proanthocyanidins by methylcellulose precipitation.** The proanthocyanidin level was measured in wines using methylcellulose as a precipitant according to the methylcellulose precipitation method published by Sarneckis *et al.* (2006). The precipitation of proanthocyanidins was performed using a 0.04% methylcellulose solution (w/v, in deionised water). The proanthocyanidin concentration was determined by the difference in absorption at 280 nm between the tube without the addition of methylcellulose and the methylcellulose precipitated. The proanthocyanidin content was quantified against a (+)-catechin standard curve and expressed as g (+)-catechin equivalent (CE) per litre of wine sample.

**Determination of proanthocyanidins by protein precipitation.** The proanthocyanidin concentration was also determined by protein precipitation as previously described (Harbertson *et al.*, 2002). Proanthocyanidins were precipitated from wines using a protein solution prepared by dissolving BSA in a buffer (200 mM

acetic acid, 170 mM NaCl, pH 4.9) to give a final protein concentration of  $1 \text{ g L}^{-1}$ . The samples were then centrifuged, the precipitate was re-suspended in an alkaline TEA/SDS buffer and the absorbance was measured at 510 nm. The proanthocyanidin absorbance was measured after the addition of an  $\text{FeCl}_3$  solution. The quantification was against a (+)-catechin standard curve and was expressed as  $\text{g CE L}^{-1}$ .

**Determination of proanthocyanidins by the Bate-Smith assay.** The proanthocyanidin concentration was also determined using the methodology proposed by Bate-Smith (1981). Each wine sample was diluted at a ratio of 1/50 (v/v) with deionised water. In two separate test tubes, 4 mL of the diluted sample, 2 mL of deionised water and 6 mL of hydrochloric acid were added. One test tube (reaction tube) was placed in a water bath at  $100^\circ\text{C}$  for 30 minutes and the other test tube (blank tube) was left to stand in the dark for the same time. After 30 minutes, 1 mL of ethanol was added to each tube and the tubes were left the dark until the heated reaction tube was cooled. The absorbance of each test tube was measured in a spectrophotometer at 550 nm using deionised water as the blank. The absorbance difference was multiplied by the factor 19.33, and the concentration of proanthocyanidins was expressed in  $\text{g CE L}^{-1}$ .

**Determination of proanthocyanidins by vanillin assay.** The fractionation of proanthocyanidins in wines into monomers (FI), oligomers (FII) and polymers (FIII) of flavan-3-ols was performed by the separation of flavan-3-ol fraction on  $\text{C}_{18}$  Sep-Pak cartridges according to the methodology described by Sun *et al.* (1998a). The quantification of proanthocyanidins in each fraction was carried out by the modified vanillin assay (Sun *et al.*, 1998b). A 2.5 mL aliquot of 1:3 v/v sulfuric acid/methanol solution and a 2.5 mL of 1% (w/v) vanillin in methanol were mixed with 1 mL of the sample previously obtained by fractionation. The tubes were incubated at  $30^\circ\text{C}$  for either 15 min (FI fraction) or for period of time long enough to allow maximal reaction (FII and FIII fractions). The absorbance of each tube was measured at 500 nm. A blank was prepared by substituting the vanillin solution in the reaction mix with methanol. The absorbance of the blank was subtracted from the absorbance of the corresponding vanillin-containing sample and the value was compared to standard curves. Quantification was performed by means of standard curves prepared from monomers (for FI), oligomers (for FII), and polymers of flavan-3-ol (for FIII) isolated from grape seeds, as previously described (Sun *et al.*, 1998b). The proanthocyanidin concentration was calculated as the sum of the three fractions and was expressed as  $\text{g CE L}^{-1}$ .

**Sensory evaluation.** Red wines were evaluated by a panel of 12 people (five females, seven males, aged 23 to 35 years) who were all students and workers from the Department of Agro-industry and Oenology. All judges had previous experience with sensory evaluation. A previous training session was conducted to standardise criteria among the judges. The sensory evaluation was performed in two sessions of 90 minutes for 2 days. In a session, each panellist had to assess two flights consisting of five wines. The wines were evaluated in individual temperature-controlled tasting booths and water and unsalted crackers were provided for palate cleansing. Aliquots of 20 mL of wine was served at 18-19°C, in dark wine tasting glasses (RCristal, Mendoza, Argentina) labelled with a three-digit code using a completely randomised order. The dark glasses were used to prevent the interaction of visual sensations and encourage focus in mouthfeel sensation. The judges were forced to have a 1-min break between each wine. During each break, panellists chewed on a cracker and then rinsed the mouth with deionised water. The astringency intensity was scored on a 15 cm unstructured linescale anchored from “low” to “high”. All judges rated each wine in duplicate during two-day evaluation. The data were collected on a paper ballot.

**Statistical analyses.** Analysis of variance (ANOVA) and Tukey’s honestly significant difference (HSD) test were used to compare the proanthocyanidin concentrations among the analytical methods with a significance level of 95% ( $P < 0.05$ ). Linear regression analysis was used to correlate the sensory analysis with the chemical parameters. All the statistical analyses were performed with the Statgraphics Centurion statistical software (ver. 15.2, Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, U.S.A) and Excel 2007 (ver. 12.0, Microsoft Corp., Redmond, Washington, U.S.A).

## Results

The total phenol content ranged from 1.2 to 2.1 g GAE L<sup>-1</sup> in red wines, from 0.6 to 1.5 g GAE L<sup>-1</sup> in *rosé* wines, and from 1.0 to 1.5 g GAE L<sup>-1</sup> in white wines. In the case of general parameters, in red wines the pH value ranged from 3.3 to 3.8, the titratable acidity ranged from 3.9 to 5.9 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>, and the alcohol content varied from 12.0 to 14.8% (v/v). For *rosé* wines, the values were as follows, pH: 2.9-3.2; titratable acidity: 4.4-5.9 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>, and alcohol content: 12.5-14.0 % v/v. For white wines the ranges were as follows, pH: 2.9-3.4; titratable acidity: 3.8-4.8 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>, and alcohol content: 12.5-14.5 %v/v (Table 1). Table 2 presents the proanthocyanidin concentration in wines samples quantified by the four methodologies. In red wines were as follows: methylcellulose precipitation: 0.40-1.78 g CE L<sup>-1</sup>, with an average of 1.00 g CE L<sup>-1</sup>

(%CV = 7.5); protein precipitation: 0.01-0.28 g CE L<sup>-1</sup>, with an average of 0.17 g CE L<sup>-1</sup> (%CV = 5.6); Bate-Smith assay: 2.70-4.19 g CE L<sup>-1</sup>, with an average of 3.28 g CE L<sup>-1</sup> (%CV = 3.4); and vanillin assay: 0.99-2.18 g CE L<sup>-1</sup>, with an average of 1.45 g CE L<sup>-1</sup> (%CV = 6.5). In this study, only the Bate-Smith and vanillin assay could quantify proanthocyanidin concentration in white and *rosé* wines (Table 2).

**Table 1.** Analytical parameters of wines from different geographical regions of Chile

| Wine samples | Variety | Apellation        | Total phenols<br>(g GAE L <sup>-1</sup> ) | pH        | Titratable acidity<br>(g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> ) | Alcohol<br>(% v/v) |
|--------------|---------|-------------------|---|-----------|---|--------------------|
| R1           | C.S     | Central Valley    | 1.9 ± 0.0                                 | 3.6 ± 0.0 | 3.9 ± 0.0   | 12.6 ± 0.0         |
| R2           | C.S     | Central Valley    | 1.5 ± 0.0                                 | 3.3 ± 0.0 | 4.4 ± 0.0   | 12.5 ± 0.0         |
| R3           | C.S     | Central Valley    | 1.7 ± 0.0                                 | 3.8 ± 0.0 | 4.4 ± 0.0   | 14.0 ± 0.0         |
| R4           | C.S     | Central Valley    | 1.8 ± 0.0                                 | 3.6 ± 0.0 | 4.2 ± 0.3   | 13.5 ± 0.0         |
| R5           | C.S     | Maipo Valley      | 1.3 ± 0.0                                 | 3.4 ± 0.0 | 4.1 ± 0.6   | 14.0 ± 0.0         |
| R6           | C.S     | Central Valley    | 1.6 ± 0.0                                 | 3.7 ± 0.0 | 3.9 ± 0.0   | 12.0 ± 0.0         |
| R7           | C.S     | Rapel Valley      | 1.2 ± 0.0                                 | 3.5 ± 0.0 | 4.7 ± 0.3   | 14.0 ± 0.0         |
| R8           | C.S     | Central Valley    | 1.6 ± 0.0                                 | 3.5 ± 0.0 | 4.1 ± 0.6   | 13.0 ± 0.0         |
| R9           | C.S     | Maipo Valley      | 1.8 ± 0.0                                 | 3.5 ± 0.0 | 4.4 ± 0.0   | 13.5 ± 0.0         |
| R10          | C.S     | Colchagua Valley  | 1.7 ± 0.0                                 | 3.6 ± 0.0 | 4.9 ± 0.0   | 14.5 ± 0.0         |
| R11          | C.S     | Central Valley    | 1.8 ± 0.0                                 | 3.6 ± 0.0 | 4.7 ± 0.0   | 14.0 ± 0.0         |
| R12          | C.S     | Rapel Valley      | 1.9 ± 0.0                                 | 3.6 ± 0.0 | 4.4 ± 0.0   | 14.0 ± 0.0         |
| R13          | C.S     | Cachapoal Valley  | 1.7 ± 0.0                                 | 3.5 ± 0.0 | 4.4 ± 0.0   | 14.5 ± 0.0         |
| R14          | C.S     | Rapel Valley      | 2.0 ± 0.0                                 | 3.6 ± 0.0 | 5.9 ± 0.0   | 14.0 ± 0.0         |
| R15          | C.S     | Maipo Valley      | 1.8 ± 0.0                                 | 3.4 ± 0.0 | 3.9 ± 0.5   | 14.0 ± 0.0         |
| R16          | C.S     | Maipo Valley      | 2.1 ± 0.0                                 | 3.4 ± 0.0 | 5.1 ± 0.3   | 14.5 ± 0.0         |
| R17          | C.S     | Colchagua Valley  | 1.8 ± 0.0                                 | 3.5 ± 0.0 | 5.4 ± 0.0   | 14.5 ± 0.0         |
| R18          | C.S     | Colchagua Valley  | 1.8 ± 0.0                                 | 3.5 ± 0.0 | 5.4 ± 0.0   | 14.5 ± 0.0         |
| R19          | C.S     | Colchagua Valley  | 1.9 ± 0.0                                 | 3.5 ± 0.0 | 4.4 ± 0.0   | 14.5 ± 0.0         |
| R20          | C.S     | Colchagua Valley  | 2.1 ± 0.0                                 | 3.7 ± 0.0 | 5.6 ± 0.0   | 14.8 ± 0.0         |
| RO1          | C.S     | Central Valley    | 0.8 ± 0.0                                 | 2.9 ± 0.0 | 5.4 ± 0.0   | 13.0 ± 0.0         |
| RO2          | C.S     | Central Valley    | 1.1 ± 0.3                                 | 2.9 ± 0.0 | 5.4 ± 0.0   | 12.5 ± 0.0         |
| RO3          | C.S     | Central Valley    | 1.5 ± 0.0                                 | 3.2 ± 0.0 | 4.9 ± 0.0   | 13.0 ± 0.0         |
| RO4          | C.S     | Maipo Valley      | 0.6 ± 0.0                                 | 2.9 ± 0.0 | 5.4 ± 0.0   | 14.0 ± 0.0         |
| RO5          | C.S     | Colchagua Valley  | 0.7 ± 0.0                                 | 2.9 ± 0.0 | 4.4 ± 0.0   | 12.5 ± 0.0         |
| W1           | S.B     | Curico Valley     | 1.0 ± 0.0                                 | 2.9 ± 0.0 | 4.4 ± 0.1   | 12.5 ± 0.0         |
| W2           | S.B     | Central Valley    | 1.1 ± 0.0                                 | 3.0 ± 0.0 | 4.6 ± 0.1   | 13.0 ± 0.0         |
| W3           | S.B     | Casablanca Valley | 1.5 ± 0.0                                 | 3.4 ± 0.0 | 3.8 ± 0.1   | 13.5 ± 0.0         |
| W4           | S.B     | Elqui Valley      | 1.3 ± 0.0                                 | 3.3 ± 0.0 | 4.6 ± 0.0   | 14.0 ± 0.0         |
| W5           | S.B     | Rapel Valley      | 1.5 ± 0.0                                 | 3.3 ± 0.0 | 4.8 ± 0.1   | 14.5 ± 0.0         |

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=3). C.S: Cabernet Sauvignon, S.B: Sauvignon Blanc. GAE: gallic acid equivalent.

The relationship between perceived astringency and proanthocyanidin content was only investigated for red wine samples. Figure 1 shows the relationships among the methods of proanthocyanidins quantification in red wines; there was no significant correlation between the Bate-Smith assay and methylcellulose precipitation ( $r = 0.3404$ ) or protein precipitation methods ( $r = 0.1094$ ), but there was a significant

correlation with the vanillin assay ( $r = 0.5675$ ). The correlation between the proanthocyanidin content by the Bate-Smith assay with both precipitation methods was relatively weak compared with the moderately strong correlation with the vanillin assay. There was also a significant correlation ( $r = 0.5880$ ) between methylcellulose precipitation and protein precipitation (Figure 2).

| <b>Table 2. Proanthocyanidin concentration in wines quantified by four analytical methods</b> |  |  |   |   |
|---|--|--|---|---|
| <b>Wines samples</b>  | <b>Methylcellulose precipitation (g CE L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Protein precipitation (g CE L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Bate-Smith assay (g CE L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Vanillin assay (g CE L<sup>-1</sup>)</b> |
| R1  | 0.52 ± 0.01 c  | 0.03 ± 0.00 d                                      | 2.79 ± 0.03 a                                 | 1.07 ± 0.06 b                               |
| R2  | 0.86 ± 0.08 c  | 0.17 ± 0.01 d                                      | 2.94 ± 0.03 a                                 | 0.99 ± 0.03 b                               |
| R3  | 1.22 ± 0.10 c  | 0.11 ± 0.00 d                                      | 4.01 ± 0.17 a                                 | 2.18 ± 0.18 b                               |
| R4  | 1.13 ± 0.11 c  | 0.27 ± 0.01 d                                      | 3.56 ± 0.04 a                                 | 1.71 ± 0.05 b                               |
| R5  | 1.04 ± 0.07 b  | 0.18 ± 0.01 c                                      | 2.70 ± 0.16 a                                 | 1.04 ± 0.08 b                               |
| R6  | 1.29 ± 0.06 c  | 0.27 ± 0.01 d                                      | 2.82 ± 0.17 a                                 | 1.54 ± 0.11 b                               |
| R7  | 1.12 ± 0.10 c  | 0.27 ± 0.01 d                                      | 3.02 ± 0.03 a                                 | 1.30 ± 0.12 b                               |
| R8  | 0.81 ± 0.07 c  | 0.12 ± 0.01 d                                      | 3.03 ± 0.17 a                                 | 1.16 ± 0.06 b                               |
| R9  | 1.25 ± 0.05 c  | 0.28 ± 0.02 d                                      | 3.74 ± 0.11 a                                 | 1.59 ± 0.14 b                               |
| R10   | 1.19 ± 0.11 c  | 0.24 ± 0.01 d                                      | 3.78 ± 0.07 a                                 | 1.60 ± 0.08 b                               |
| R11   | 1.20 ± 0.11 c  | 0.28 ± 0.01 d                                      | 3.39 ± 0.04 a                                 | 1.87 ± 0.15 b                               |
| R12   | 0.87 ± 0.08 c  | 0.27 ± 0.00 d                                      | 2.98 ± 0.15 a                                 | 1.03 ± 0.09 b                               |
| R13   | 0.93 ± 0.05 c  | 0.18 ± 0.00 d                                      | 3.13 ± 0.04 a                                 | 1.35 ± 0.06 b                               |
| R14   | 1.23 ± 0.12 c  | 0.19 ± 0.01 d                                      | 3.97 ± 0.18 a                                 | 1.67 ± 0.09 b                               |
| R15   | 1.12 ± 0.08 b  | 0.20 ± 0.02 d                                      | 3.56 ± 0.04 a                                 | 1.03 ± 0.06 b                               |
| R16   | 1.78 ± 0.09 b  | 0.13 ± 0.01 d                                      | 3.65 ± 0.20 a                                 | 1.64 ± 0.16 b                               |
| R17   | 0.86 ± 0.08 c  | 0.08 ± 0.00 d                                      | 2.86 ± 0.18 a                                 | 1.74 ± 0.08 b                               |
| R18   | 0.69 ± 0.06 c  | 0.01 ± 0.00 d                                      | 2.80 ± 0.11 a                                 | 1.35 ± 0.00 b                               |
| R19   | 0.47 ± 0.03 c  | 0.10 ± 0.01 d                                      | 2.76 ± 0.11 a                                 | 1.54 ± 0.11 b                               |
| R20   | 0.40 ± 0.04 c  | 0.03 ± 0.00 d                                      | 4.19 ± 0.16 a                                 | 1.62 ± 0.01 b                               |
|   | <b>1.00 ± 0.07 c</b>                                       | <b>0.17 ± 0.01 d</b>                               | <b>3.28 ± 0.11 a</b>                          | <b>1.45 ± 0.09 b</b>                        |
| RO1   | nd   | nd   | 0.74 ± 0.02 a                                 | 0.05 ± 0.00 b                               |
| RO2   | nd   | nd   | 1.13 ± 0.45 a                                 | 0.04 ± 0.02 b                               |
| RO3   | nd   | nd   | 0.74 ± 0.07 a                                 | 0.04 ± 0.00 b                               |
| RO4   | nd   | nd   | 0.36 ± 0.03 a                                 | 0.02 ± 0.00 b                               |
| RO5   | nd   | nd   | 0.61 ± 0.05 a                                 | 0.04 ± 0.00 b                               |
|   | -  | -  | <b>0.72 ± 0.12 a</b>                          | <b>0.04 ± 0.00 b</b>                        |
| W1  | nd   | nd   | 0.10 ± 0.01 a                                 | 0.02 ± 0.00 b                               |
| W2  | nd   | nd   | 0.12 ± 0.00 a                                 | 0.01 ± 0.00 b                               |
| W3  | nd   | nd   | 0.10 ± 0.01 a                                 | 0.02 ± 0.00 b                               |
| W4  | nd   | nd   | 0.11 ± 0.00 a                                 | 0.01 ± 0.00 b                               |
| W5  | nd   | nd   | 0.12 ± 0.01 a                                 | 0.02 ± 0.00 b                               |
|   | -  | -  | <b>0.11 ± 0.01 a</b>                          | <b>0.02 ± 0.00 b</b>                        |

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Different letters in a row denote significant differences among methodologies ( $P < 0.05$ , Tukey's HSD test). R: red wine; RO: rosé wine; W: white wine; CE: (+)-catechin equivalent. nd: not detected.

Figure 3 and 4 show the results of the linear regression analyses between the astringency and the proanthocyanidin concentrations determined by methylcellulose

and protein precipitation, respectively. A significant correlation was found between the perceived astringency and methylcellulose precipitation ( $r = 0.7725$ ;  $r^2 = 0.59$ ) and perceived astringency and protein precipitation ( $r = 0.6828$ ;  $r^2 = 0.47$ ).

Figure 5 shows the results of the linear regression analyses between proanthocyanidin concentrations determined by the Bate-Smith and vanillin assays and the perceived astringency. Both methods showed non-significant relationships with the perceived astringency.

## Discussion

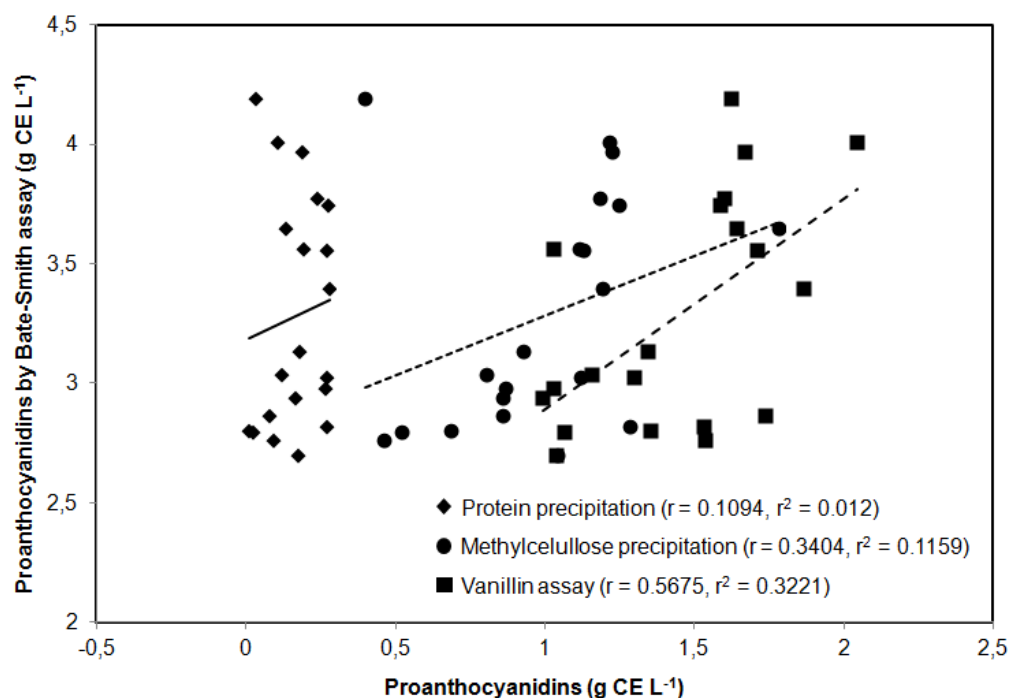
### Comparison among wine proanthocyanidin concentration and analytical methods

A fundamental condition of any proanthocyanidin methodology is that it can be applied to red, *rosé* and white wines. In this study, only the Bate-Smith and vanillin assays could quantify proanthocyanidin concentration in white and *rosé* wines. These results can be explained from the chemical basis of each methodology. The Bate-Smith assay is based on the transformation of proanthocyanidins into anthocyanidins in hot acid solution (Schofield *et al.*, 2001). The vanillin assay is a colourimetric method for the quantification of proanthocyanidins. It is quite specific to a narrow range of flavanols (monomers and polymers) and presents more sensitivity and specificity than other colourimetric methods (Sun *et al.*, 1998b). In contrast, the precipitation-based methods are based on the precipitation of proanthocyanidins with a polysaccharide or protein. Both precipitation methods have a stage of aggregation between the precipitating agent (methylcellulose, bovine serum albumin) and the proanthocyanidins in the wine sample, which leads to the formation of a pellet. Although both colourimetric methods have several factors that may influence the quantification of proanthocyanidins in wine, they could be more sensitive to low concentrations of proanthocyanidins than those methods based on precipitation. This would be the main reason that precipitation-based methods cannot quantify proanthocyanidins in white and *rosé* wines due to the non-formation of the pellet. Moreover, there was a remarkable difference in the proanthocyanidin concentrations in wines among the different methods. The protein precipitation gave the lowest value of proanthocyanidin concentrations in red wines and differs from the values found by Mercurio & Smith (2008) who reported values from 0.16 to 0.59 g L<sup>-1</sup>. The methylcellulose precipitation gave higher concentrations than protein precipitation in red wines, although lower values were reported by other authors (Sarneckis *et al.*, 2006; Mercurio & Smith, 2008;

Mercurio *et al.*, 2010). The differences in concentration were high between the methods, but the four methodologies presented coefficient of variation (%CV) within normal ranges (<10%), representing good repeatability. Because the four methodologies had good repeatability, it is necessary keep in mind that there are other aspects that affect the choice of a methodology such as reagent prices, equipment needs or the steps necessary to measure the concentration of proanthocyanidin in a wine sample.

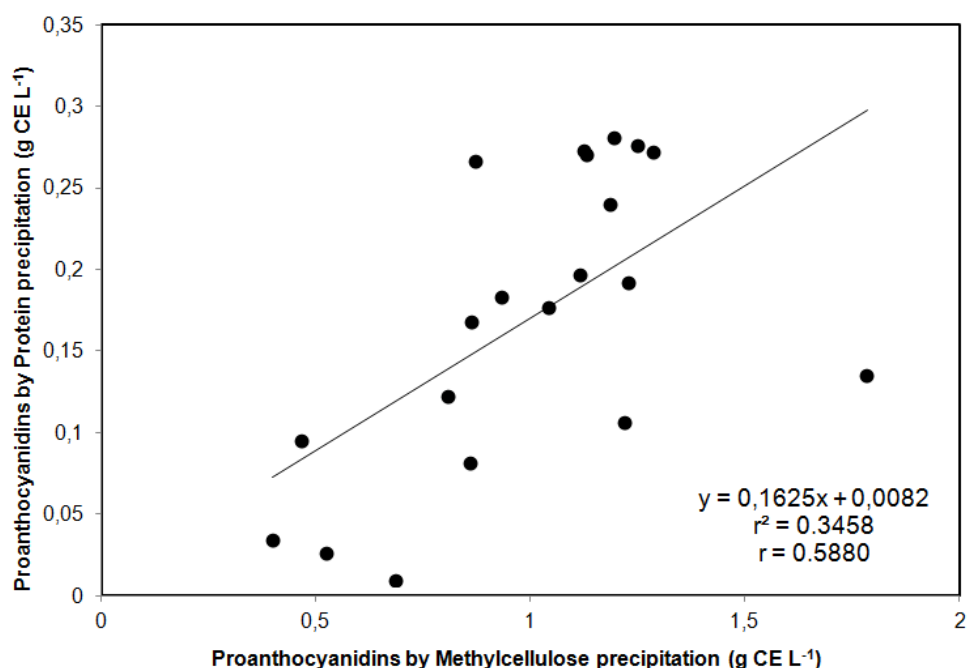
The Bate-Smith assay is the most widely used proanthocyanidin quantification method in Chilean wineries because it is inexpensive and requires minimal reagents and equipment. In this case, the Bate-Smith assay in red wines gave proanthocyanidin concentrations 3 times higher than methylcellulose precipitation, 20 times higher than the protein precipitation method and approximately 2 times higher than the vanillin assay. This methodology could be influenced by several variables that can affect the kinetics of colour formation such as the amount of water in the sample (Waterman & Mole, 1994), the incomplete transformation of proanthocyanidins into anthocyanidins, reaction yields that depend on both the structure and polymerisation degree of the proanthocyanidins and side reactions that are common during the transformation that lead to the formation of red-brown polymers (Schofield *et al.*, 2001). These factors could result in an estimation error by increasing the concentration of proanthocyanidins in the sample because red wines have more proanthocyanidins than white or *rosé* wines (Table 2), which leads to an incorrect concentration value. For these reasons, the application of this method for quantitative analysis of proanthocyanidins is limited in wines. Moreover the great diversity of factors that affect the colourimetric reaction, could explain the low correlation found with the precipitation-based methods.





**Figure 1.** Relationship between the proanthocyanidin concentrations in red wines measured by the Bate-Smith assay and the concentrations determined by methylcellulose precipitation, protein precipitation and vanillin assay against Bate-Smith assay. CE: (+)-catechin equivalent.

Figure 1 shows the relationships among the methods of proanthocyanidin quantification in red wines. There was a significant correlation between methylcellulose and protein precipitation with a moderately strong relationship (Figure 2), although a weaker correlation compared with those found by other authors in red wines (Mercurio & Smith, 2008). The differences in the chemical basis between the Bate-Smith assay and the precipitation-based methods could explain the lack of relationship between them. The precipitation-based methods have the ability to bind proanthocyanidins with a precipitating agent (either a polysaccharide or protein), and it is therefore expected that a strong relationship would exist between them (Kennedy *et al.*, 2006; Sarneckis *et al.*, 2006) (Figure 2).



**Figure 2.** Relationship between the methylcellulose and protein precipitation measurements of the proanthocyanidin concentrations in red wines. CE: (+)-catechin equivalent.

With respect to the vanillin assay, several parameters may affect the accuracy such as reaction time, temperature, water content, vanillin concentration, acid nature and concentration. Sun *et al.* (1998b) studied these critical factors and concluded that the (+)-catechins and proanthocyanidins in the sample must be separated and then quantified separately. C<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges can be used to separate the compounds and obtain the monomers, oligomers and polymers of flavan-3-ol (Sun *et al.*, 1998a). Each fraction can then be quantified by the vanillin assay. Although the vanillin assay is a good methodology for the quantification of proanthocyanidins, the separation into the three fractions of flavan-3-ol, (+)-catechins, oligomers and polymers makes this quantification very difficult due to the large number of steps involved in the separation of flavan-3-ol (Sun *et al.*, 1998a). The increased time required and then quantify the fractions could be a problem in wineries that need to analyse a large number of wine samples in a short period of time.

Hümmer & Schreier (2008) indicated that the problem with the Bate-Smith assay is that proanthocyanidins with high degrees of polymerisation produce more anthocyanidin than the flavan-3-ol dimers due to the existence of more extension units. For this reason, we expected that the samples that had a high polymer contents when separated by C<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges and quantified by the vanillin assay would have a positive correlation with the proanthocyanidin quantified by Bate-Smith assay. Indeed, data collected in this investigation showed a moderately strong correlation ( $r = 0.5732$ )

between the concentration of polymers, i.e., approximately 88% of the total content of proanthocyanidins quantified by the vanillin assay and the concentration of proanthocyanidins in red wines measured by the Bate-smith assay. This could be the reason for the high correlation between the Bate-Smith assay and the vanillin assay in red wines.

With regard to methylcellulose and protein precipitation, both methodologies showed a disparity in proanthocyanidin concentrations in red wines, with significant differences among wine samples for each method. The two methods are divided into two main stages: an “isolation or precipitation stage” in which the precipitating agent interacts with the proanthocyanidins and the “screening stage” in which the proanthocyanidin concentrations are measured. It is therefore important to identify which stage of the process explains the concentration differences found in this study. The differences may relate to the effect of various reagents used in each methodology on the absorbances recorded. The slight differences of pH, acidity and alcohol content among the samples (Table 1) could explain these differences. However, other authors showed that these variables had no significant influence on the development of these methodologies due principally to the fact that the influence of pH is neutralised by using appropriate buffer solutions (Sarneckis *et al.*, 2006).

On the other hand, the choice of a particular standard for establishing the calibration curve could affect the final results. Mercurio & Smith (2008) showed that the choice of monomer (+)-catechin or (-)-epicatechin has a minimal influence on the slope and intercept of the calibration curve, information that is supported in this work and is detailed in Table 3. The differences between the calibration curves were not significant and did not explain the differences.

**Table 3.** Influence of (+)-catechin or (-)-epicatechin monomer utilised in the calibration curve for the methylcellulose and protein precipitation methods.

| Monomer         | Methylcellulose precipitation calibration curve | Protein precipitation calibration curve |
|-----------------|---|---|
| (+)-Catechin    | $y = 0.012x - 0.005$                            | $y = 0.007x + 0.35$                     |
| (-)-Epicatechin | $y = 0.013x - 0.002$                            | $y = 0.007x + 0.31$                     |

y: absorbance; x: concentration (mg L<sup>-1</sup>)

Therefore, the concentration differences between these two methodologies are not caused by the detection step but rather by differences in the isolation and precipitation stage. Methylcellulose and bovine serum albumin have a different binding and precipitating affinities for proanthocyanidins with different structural features and for each flavanol subclass. Other studies demonstrated by reverse-phase HPLC analysis that methylcellulose removes more of the flavanols from the matrix

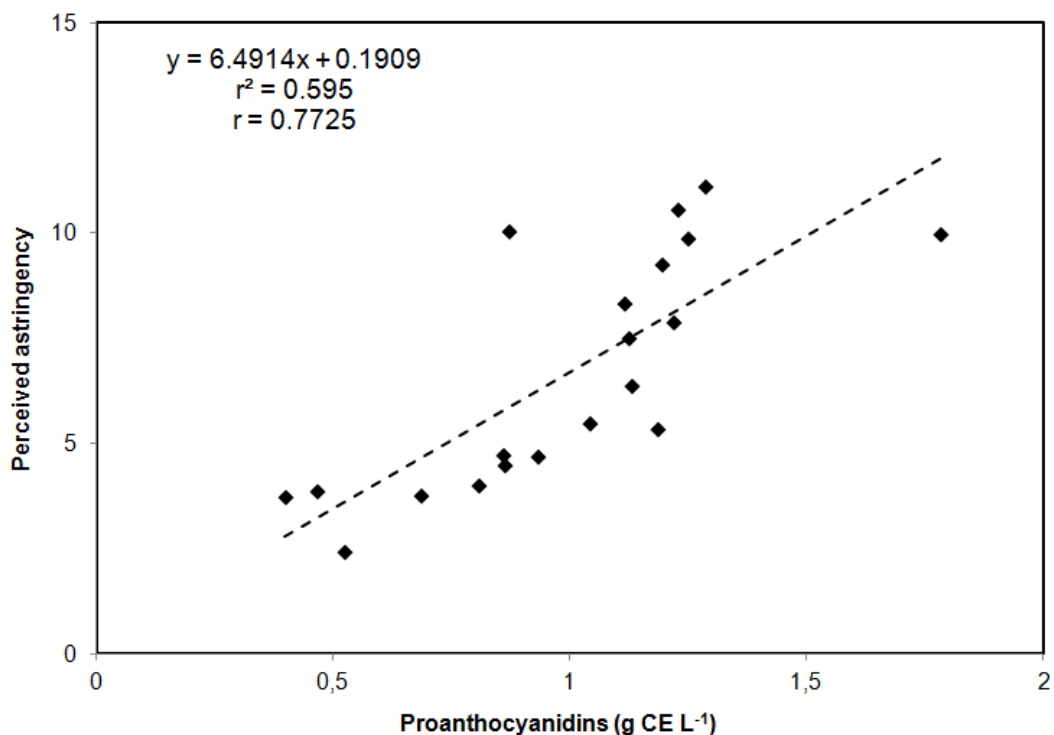
sample compared with the bovine serum albumin. Moreover, both methods have a different ability to bind and precipitate a subclass of the proanthocyanidins, the polymeric pigments (Harbertson *et al.*, 2003; Mercurio & Smith, 2008; Seddon & Downey, 2008). These reasons could explain the differences in concentration found in this work. However, further research is necessary to check the actual effects on the results. Therefore, the specificity in binding and precipitating proanthocyanidins in the precipitation-based methods compared with colourimetric assays could also explain the differences in concentration among the methodologies studied in this investigation in red wines and the lack of precipitation and subsequent detection by the precipitation-based methods in the white and *rosé* wine samples.

### **Correlation of analytical methods with perceived astringency**

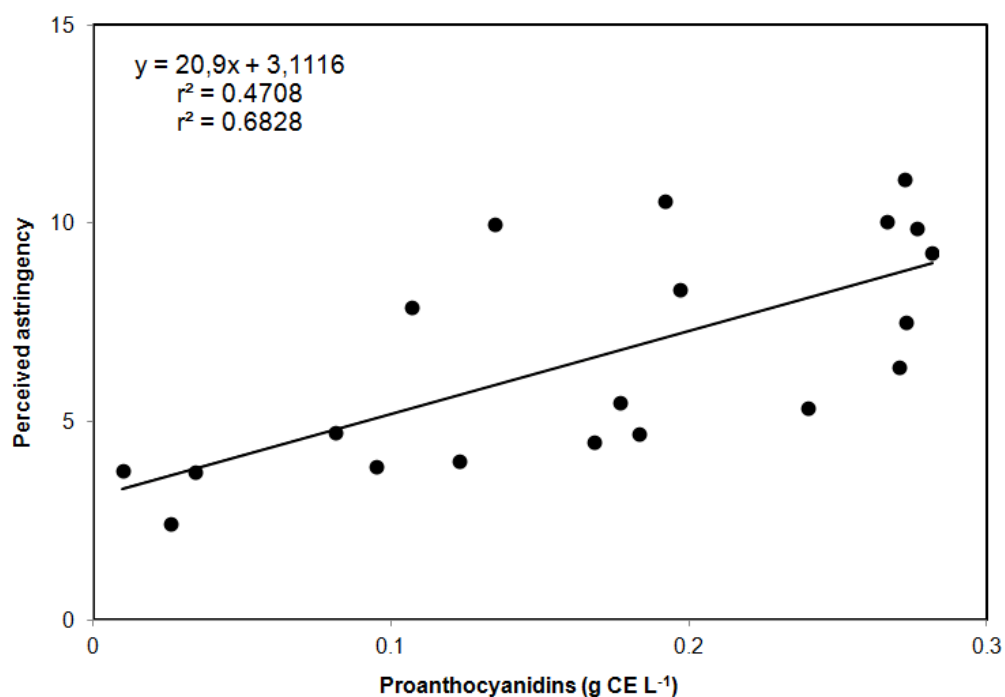
Due to the lack of specificity in the methods based on precipitation with white and *rosé* wine samples, the relationship between perceived astringency and proanthocyanidin content was only made for red wine samples.

Several variables in the wine composition such as pH, acidity, alcohol content and concentration and composition of proanthocyanidins can modulate the sensory perception of astringency (Gawel, 1998). Because the astringency is usually measured in wines by tasting, this requires a sensory panel, which adds some subjectivity to the final result of this analysis (Valentová *et al.*, 2002). Because astringency is one of the most important factors in wine quality, wineries need a method to quantify proanthocyanidins that also represents perceived astringency. Condelli *et al.* (2006) and Monteleone *et al.* (2004) successfully developed predictive models for perceived astringency ( $r^2 = 0.95$ ) by exploring the ability of wine to develop turbidity when mixed with the protein mucin. Llaudy *et al.* (2004) developed a predictive model for perceived astringency using ovalbumin as a precipitation agent and tannic acid solutions as standards ( $r^2 = 0.7737$ ). Kennedy *et al.* (2006) found strong correlations between astringency and protein precipitation ( $r^2 = 0.82$ ), gel permeation chromatography ( $r^2 = 0.74$ ) and phloroglucinolysis ( $r^2 = 0.73$ ). In the same field, Mercurio & Smith (2008) found strong correlations between perceived astringency and the protein precipitation ( $r^2 = 0.90$ ) and methylcellulose precipitation assays ( $r^2 = 0.83$ ).

Figure 3 and Figure 4 shows the results of linear regression analyses between proanthocyanidin concentrations determined by methylcellulose and protein precipitation, respectively.



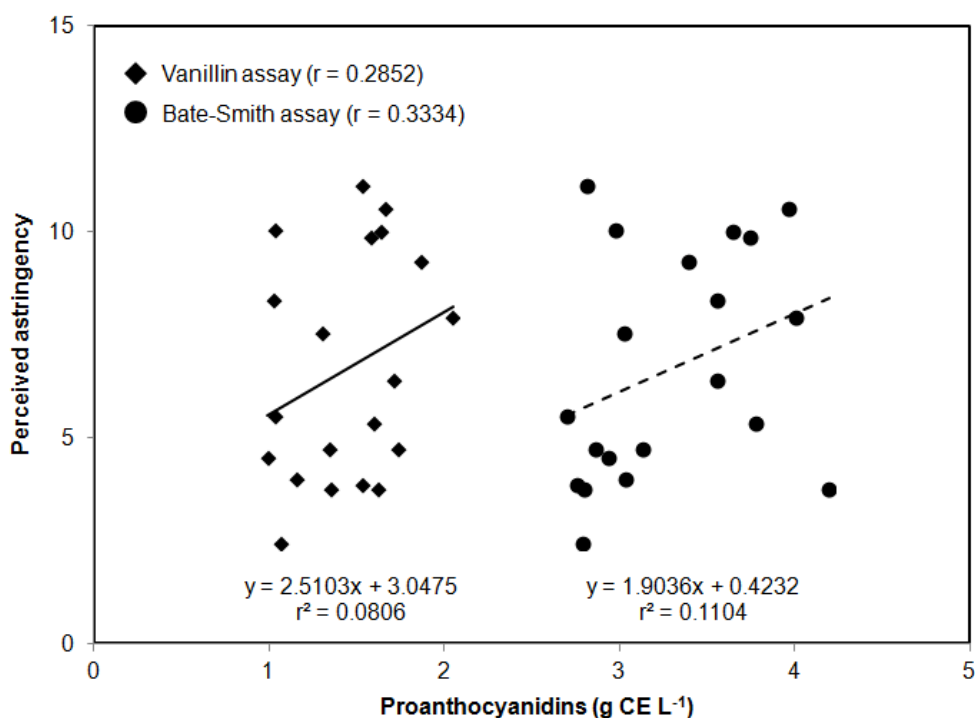
**Figure 3.** Relationship between the perceived astringency and methylcellulose precipitation in red wines.  
CE: (+)-catechin equivalent.



**Figure 4.** Relationship between the perceived astringency and protein precipitation in red wines. CE: (+)-catechin equivalent.

These results are lower than those reported by other authors (Kennedy *et al.*, 2006; Mercurio & Smith, 2008). Despite the differences among the studies, the

correlations measured in this work are still strong. Figure 5 shows the results of the linear regression analyses between the proanthocyanidin concentrations determined by the Bate-Smith and vanillin assay did not have significant relationship with the perceived astringency.



**Figure 5.** Relationship between the perceived astringency measured by the Bate-Smith assay and the vanillin assay in red wines. CE: (+)-catechin equivalent.

This is expected if the analytical principles of the precipitation-based methods, i.e., the interaction and precipitation of tannins based on the the basic mechanism of astringency, are accounted (Llaudy *et al.*, 2004). Although a strong relationship between the analytical and sensory evaluation is paramount when choosing the appropriate methodology to predict perceived astringency, there are also several practical considerations that are important for each method, such as simplicity and efficiency. However, even if a methodology is strongly correlated with perceived astringency, the perceived astringency depends not only on the amount of proanthocyanidins in the wine sample but also on several other factors such as pH, acidity, sugar content, alcohol content and density (Kallithraka *et al.*, 1997; Prinz & Lucas, 2000; Nurgel & Pickering, 2005; Fontoin *et al.*, 2008; Obreque-Slier *et al.*, 2010). Thus, the quantification of the proanthocyanidin concentration of a wine sample cannot be expected to accurately quantify the perceived astringency. Therefore,

analysing the correlation between the proanthocyanidin content of wine samples and the perceived astringency only provides an estimate of the actual value.

## **Conclusions**

Four methodologies for the quantification of the proanthocyanidin concentration in red, *rosé* and white wines were investigated. The proanthocyanidin concentration differed widely among the methodologies. The methylcellulose and protein precipitations could not quantify proanthocyanidins in *rosé* and white wine samples. The strong correlation between the methylcellulose precipitation method with the perceived astringency and the simplicity of this methodology suggest that it could be used in wine production to reliably estimate red wine astringency.

## **Acknowledgements**

This study was supported by Conicyt-Chile (Grants Fondecyt N° 1080559, N° 1110832).

## References

- Bate-Smith, E. (1973). Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry*, **12**, 907-912.
- Bate-Smith, E. (1981). Astringent tannins of the leaves of *Geranium* species. *Phytochemistry*, **20**, 211-216.
- Boss, P., Davies, C. & Robinson, S. (1996). Analysis of the expression of anthocyanins pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology*, **111**, 1059-1066.
- Brossaud, F., Cheynier, V. & Noble, A. (2001). Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **7**, 33-39.
- Condelli, N., Dinnella, C., Cerone, A., Monteleone, E. & Bertuccioli, M. (2006). Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Quality and Preference*, **17**, 96-107.
- Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P. & Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model solution. *Food Quality and Preference*, **19**, 286-291.
- Gawel, R. (1998). Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **4**, 74-96.
- Gawel, R., Iland, P. & Francis, L. (2001). Characterizing the astringency of red wine: a case study. *Food Quality and Preference*, **12**, 83-94.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges, 2eme partie. Mesure, origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **46**, 155-158.
- Hagerman, A. & Butler, L. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **26**, 809-812.
- Harbertson, J., Kennedy, J. & Adams, D. (2002). Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot Noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, **53**, 54-59.
- Harbertson, J., Picciotto, E. & Adams, D. (2003). Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfate bleaching. *American Journal of Enology and Viticulture*, **54**, 301-306.
- Hümmer, W. & Schreier, P. (2008). Analysis of proanthocyanidins. *Molecular Nutrition and Food Research*, **52**, 1381-1398.
- Kallithraka, S., Bakker, J. & Clifford, M. (1997). Effect of pH on astringency in model solutions and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 2211-2216.



- Kennedy, J., Ferrier, J., Harbertson, J. & 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.
- Lluduy, M., Canals, R., Canals, J.M., Rozés, N., Arola, L. & Zamora, F. (2004). New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 742-746.
- Mercurio, M., Damberg, R., Herderich, M. & Smith, P. (2007). High throughput analysis of red wine and grape phenolics adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 4651-4657.
- Mercurio, M., Damberg, R., Cozzolino, D., Herderich, M. & Smith, P. (2010). Relationship between red wine grades and phenolics. 1. Tannin and total phenolics concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 12313-12319.
- Mercurio, M. & Smith, P. (2008). Tannin quantification in red grapes and wine: comparison of polysaccharide- and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 5528-5537.
- Monteleone, E., Condelli, N., Dinnella, C. & Bertuccioli, M. (2004). Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference*, **15**, 761-769.
- Nurgel, C. & Pickering, G. (2005). Contribution of glycerol, ethanol and sugar to the perception of viscosity and density elicited by model white wines. *Journal of Texture Studies*, **36**, 303-323.
- Obreque-Slier, E., Peña-Neira, A. & López-Solís, R. (2010). Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 3729-3735.
- O.I.V. (2011). Compendium of international methods of wine and must analysis. (Vols I-II), Sect. 3. Paris: OIV.
- Payne, C., Bowyer, P., Herderich, M. & Bastian, S. (2009). Interaction of astringent grape seed procyanidins with oral epithelial cells. *Food Chemistry*, **115**, 551-557.
- Prinz, J. & Lucas, P. (2000). Saliva tannin interactions. *Journal of Oral Rehabilitation*, **27**, 991-994.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology. Vol 2. The chemistry of wine. Stabilization and treatments*. 2<sup>nd</sup> edition. Pp. 141-203. Chichester, U.K: John Wiley & Sons, Ltd.
- Sarneckis, C., Damberg, R., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. & Smith, P. (2006). Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development

- and validation of an optimized tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **12**, 39-49.
- Saucier, C., Mirabel, M., Daviaud, F., Longieras, A. & Glories, Y. (2001). Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 5732-5735.
- Schofield, P., Mbugua, D. & Pell, A. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, **91**, 21-40.
- Seddon, T. & Downey, M. (2008). Comparison of analytical methods for the determination of condensed tannins in grape skin. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **14**, 54-61.
- Sun, B., Conceição, L., Ricardo Da Silva, J. M. & Spranger, I. (1998<sup>a</sup>). Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1390-1396.
- Sun, B., Ricardo da Silva, J. & Spranger, I. (1998<sup>b</sup>). Critical factors of the vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4267-4274.
- Valentová, H., Skrovánková, S., Panovská, Z. & Pokorný, J. (2002). Time-intensity studies of astringent taste. *Food Chemistry*, **78**, 29-37.
- Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V. & Waters, E. (2004). The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry*, **85**, 519-525.
- Villamor, R., Harbertson, J. & Ross, C. (2009). Influence of tannin concentration, storage temperature, and time on chemical and sensory properties of Cabernet Sauvignon and Merlot wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **60**, 442-449.
- Waterman, P. & Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic: Plant metabolites*. Pp. 256. Oxford, U.K: Blackwell Scientific.

## **Subcapítulo II.2:**

### **Composición química de vinos comerciales y su relación con el precio de venta**

## **1. Consideraciones Generales**

El vino es un alimento complejo formado por diversos compuestos que le entregan características especiales y que juntos conforman la calidad de éste (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). La mayoría de estos compuestos provienen de la uva y es en el proceso fermentativo en donde se producen reacciones que provocan un aumento o disminución de estos compuestos según las labores enológicas que se realicen en las bodegas (Kliewer y Dokoozlian, 2005; Ribéreau-Gayon et al., 2006a). La calidad del vino, depende de diversas moléculas, pero son los compuestos fenólicos, los que mayormente inciden en esta, y en especial las proantocianidinas, ya que participan en forma directa en parámetros tan importantes como la astringencia, amargor y sensaciones bucales que conformarán la calidad organoléptica del vino (Gawel, 1998; Harbertson y Spayd, 2006; Kennedy et al., 2006). Aun cuando existen diversos estudios que estudian los componentes de calidad en los vinos y especialmente los relacionados a las sensaciones gustativas de este, generalmente se piensa que una variación en la composición fenólica de los vinos y especialmente en la concentración de proantocianidinas, tendrá un impacto sobre la calidad sensorial de este (Holt et al., 2008; Chira et al., 2011; Granato et al., 2011). En este sentido no tan solo puede influir la concentración de proantocianidinas en la muestra, sino que también puede tener un impacto la composición de proantocianidinas del vino, ya que cada fracción puede aportar distintas sensaciones de astringencia y amargor (Fanzone et al., 2012a; Kassara y Kennedy, 2011). Aunque mediante un análisis sensorial se puede calificar la calidad del vino (Holt et al., 2008), es necesario tener otras herramientas analíticas que sean de fácil implementación en las bodegas y que permitan clasificar ciertos tipos de vinos en cuanto a la calidad que éstos presenten. Además la alta variación en los distintos tipos de vinos que se pueden encontrar en el mercado y la falta de estudios en vinos comerciales chilenos sobre la calidad de éstos, el precio que estos vinos alcanzan en el comercio y su relación con la concentración de las distintas fracciones de proantocianidinas del vino, es que el objetivo del presente trabajo fue estudiar la composición química y sensorial de vinos comerciales chilenos del cv. Cabernet Sauvignon y la relación que tienen con su precio en el comercio.

## **2. Condiciones Experimentales**

Se ocuparon 45 vinos tintos comerciales del cv. Cabernet Sauvignon de varias denominaciones de origen chilenas de la temporada 2008-2009. Estas muestras se obtuvieron de supermercados y tiendas especializadas de venta de vinos.

| <b>Tabla 1. Parámetros químicos en vinos comerciales del cv. Cabernet Sauvignon de distintas categorías de precio</b> |                                   |                               |            |   |           |                             |                        |
|---|-----------------------------------|-------------------------------|------------|---|-----------|-----------------------------|------------------------|
| <b>Categoría de precio</b>  | <b>Precio por botella (\$CHL)</b> | <b>Denominación de origen</b> | <b>Año</b> | <b>Acidez (g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L)</b> | <b>pH</b> | <b>Azúcar (g glucosa/L)</b> | <b>Alcohol (% v/v)</b> |
| Bajo  | \$ 1.000                          | Valle Central                 | 2009       | 3,9 ± 0,1                                       | 3,6 ± 0,0 | 10,4 ± 0,2                  | 12,6 ± 0,3             |
| Bajo  | \$ 1.100                          | Valle Central                 | 2009       | 3,9 ± 0,0                                       | 3,6 ± 0,0 | 10,4 ± 0,1                  | 12,6 ± 0,4             |
| Bajo  | \$ 1.200                          | Valle Central                 | 2008       | 3,9 ± 0,0                                       | 3,6 ± 0,0 | 10,1 ± 0,3                  | 12,6 ± 0,2             |
| Bajo  | \$ 1.300                          | Valle Central                 | 2009       | 4,4 ± 0,0                                       | 3,2 ± 0,1 | 4,7 ± 0,2                   | 12,5 ± 0,1             |
| Bajo  | \$ 1.450                          | Valle del Maipo               | 2009       | 4,4 ± 0,1                                       | 3,3 ± 0,0 | 4,7 ± 0,1                   | 12,6 ± 0,0             |
| Bajo  | \$ 1.600                          | Valle Central                 | 2009       | 4,4 ± 0,1                                       | 3,3 ± 0,2 | 4,7 ± 0,2                   | 12,5 ± 0,3             |
| Bajo  | \$ 1.600                          | Valle Central                 | 2009       | 4,4 ± 0,1                                       | 3,4 ± 0,0 | 2,1 ± 0,1                   | 14,0 ± 0,5             |
| Bajo  | \$ 1.800                          | Valle Central                 | 2009       | 3,4 ± 0,0                                       | 3,4 ± 0,0 | 2,1 ± 0,2                   | 14,0 ± 0,5             |
| Bajo  | \$ 1.900                          | Valle de Colchagua            | 2008       | 4,4 ± 0,0                                       | 3,4 ± 0,1 | 2,1 ± 0,1                   | 14,0 ± 0,8             |
| Bajo  | \$ 2.300                          | Valle del Maipo               | 2008       | 4,9 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,0 | 3,5 ± 0,2                   | 14,0 ± 0,7             |
| Bajo  | \$ 2.300                          | Valle del Maipo               | 2008       | 4,9 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,0 | 3,5 ± 0,1                   | 14,0 ± 0,5             |
| Bajo  | \$ 2.340                          | Valle Central                 | 2008       | 4,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,1 | 3,4 ± 0,3                   | 14,0 ± 0,6             |
| Bajo  | \$ 2.400                          | Valle de Rapel                | 2008       | 4,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,2 | 4,7 ± 0,2                   | 13,0 ± 0,4             |
| Bajo  | \$ 2.500                          | Valle del Maipo               | 2009       | 3,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,1 | 4,1 ± 0,2                   | 13,0 ± 0,5             |
| Bajo  | \$ 3.000                          | Valle de Colchagua            | 2009       | 4,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,0 | 4,7 ± 0,1                   | 13,0 ± 0,2             |
| Medio   | \$ 3.500                          | Valle de Colchagua            | 2008       | 4,4 ± 0,0                                       | 3,6 ± 0,0 | 1,7 ± 0,2                   | 13,5 ± 0,2             |
| Medio   | \$ 3.600                          | Valle de Colchagua            | 2009       | 4,4 ± 0,0                                       | 3,6 ± 0,0 | 1,7 ± 0,3                   | 13,5 ± 0,3             |
| Medio   | \$ 3.700                          | Valle de Cachapoal            | 2009       | 4,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,1 | 1,7 ± 0,4                   | 13,5 ± 0,2             |
| Medio   | \$ 3.800                          | Valle del Maipo               | 2009       | 4,9 ± 0,2                                       | 3,6 ± 0,0 | 2,5 ± 0,2                   | 14,5 ± 0,2             |
| Medio   | \$ 4.200                          | Valle de Colchagua            | 2008       | 4,9 ± 0,1                                       | 3,7 ± 0,0 | 2,5 ± 0,3                   | 14,5 ± 0,3             |
| Medio   | \$ 4.500                          | Valle de Colchagua            | 2008       | 4,9 ± 0,0                                       | 3,6 ± 0,0 | 2,5 ± 0,1                   | 14,5 ± 0,3             |
| Medio   | \$ 5.000                          | Valle del Maipo               | 2009       | 4,7 ± 0,0                                       | 3,6 ± 0,1 | 4,0 ± 0,2                   | 14,0 ± 0,3             |
| Medio   | \$ 5.200                          | Valle de Colchagua            | 2008       | 4,7 ± 0,0                                       | 3,6 ± 0,2 | 4,0 ± 0,1                   | 14,0 ± 0,2             |
| Medio   | \$ 5.300                          | Valle del Maipo               | 2009       | 4,7 ± 0,1                                       | 3,6 ± 0,0 | 4,1 ± 0,2                   | 14,0 ± 0,2             |
| Medio   | \$ 5.400                          | Valle del Maipo               | 2009       | 4,4 ± 0,1                                       | 3,5 ± 0,0 | 1,9 ± 0,1                   | 14,5 ± 0,3             |
| Medio   | \$ 5.600                          | Valle del Maipo               | 2008       | 4,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,1 | 2,1 ± 0,2                   | 14,5 ± 0,2             |
| Medio   | \$ 5.800                          | Valle de Colchagua            | 2009       | 4,4 ± 0,2                                       | 3,5 ± 0,1 | 2,1 ± 0,2                   | 14,5 ± 0,1             |
| Medio   | \$ 6.300                          | Valle del Maipo               | 2009       | 5,9 ± 0,1                                       | 3,6 ± 0,0 | 3,7 ± 0,2                   | 14,0 ± 0,2             |
| Medio   | \$ 7.000                          | Valle del Maipo               | 2009       | 5,9 ± 0,2                                       | 3,6 ± 0,2 | 3,7 ± 0,2                   | 14,0 ± 0,4             |
| Medio   | \$ 7.500                          | Valle de Cachapoal            | 2008       | 5,9 ± 0,0                                       | 3,6 ± 0,0 | 3,6 ± 0,3                   | 14,0 ± 0,3             |
| Alto  | \$ 8.000                          | Valle del Maipo               | 2009       | 4,9 ± 0,0                                       | 3,4 ± 0,0 | 2,6 ± 0,4                   | 14,5 ± 0,2             |
| Alto  | \$ 8.200                          | Valle de Colchagua            | 2009       | 4,9 ± 0,1                                       | 3,4 ± 0,0 | 2,5 ± 0,1                   | 14,5 ± 0,3             |
| Alto  | \$ 8.300                          | Valle de Cachapoal            | 2009       | 5,4 ± 0,2                                       | 3,4 ± 0,1 | 2,4 ± 0,3                   | 14,5 ± 0,2             |
| Alto  | \$ 8.600                          | Valle del Maipo               | 2009       | 5,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,0 | 2,6 ± 0,3                   | 14,5 ± 0,4             |
| Alto  | \$ 9.000                          | Valle del Maipo               | 2008       | 5,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,0 | 2,6 ± 0,2                   | 14,5 ± 0,5             |
| Alto  | \$ 9.300                          | Valle del Maipo               | 2008       | 5,4 ± 0,2                                       | 3,5 ± 0,1 | 2,6 ± 0,2                   | 14,5 ± 0,2             |
| Alto  | \$ 9.500                          | Valle de Colchagua            | 2009       | 5,4 ± 0,1                                       | 3,5 ± 0,1 | 1,9 ± 0,3                   | 14,5 ± 0,3             |
| Alto  | \$ 9.800                          | Valle de Cachapoal            | 2009       | 5,4 ± 0,1                                       | 3,5 ± 0,0 | 2,0 ± 0,2                   | 14,5 ± 0,2             |
| Alto  | \$ 10.200                         | Valle del Maipo               | 2009       | 5,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,2 | 1,9 ± 0,3                   | 14,5 ± 0,2             |
| Alto  | \$ 11.000                         | Valle del Maipo               | 2009       | 4,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,0 | 2,0 ± 0,2                   | 14,5 ± 0,2             |
| Alto  | \$ 11.500                         | Valle del Maipo               | 2008       | 4,4 ± 0,2                                       | 3,5 ± 0,0 | 2,0 ± 0,3                   | 14,5 ± 0,2             |
| Alto  | \$ 12.000                         | Valle del Maipo               | 2008       | 4,4 ± 0,2                                       | 3,5 ± 0,1 | 2,0 ± 0,4                   | 14,5 ± 0,1             |
| Alto  | \$ 13.000                         | Valle de Cachapoal            | 2008       | 5,6 ± 0,0                                       | 3,7 ± 0,1 | 2,6 ± 0,3                   | 14,8 ± 0,2             |
| Alto  | \$ 14.000                         | Valle del Maipo               | 2008       | 5,6 ± 0,1                                       | 3,7 ± 0,1 | 2,6 ± 0,4                   | 14,8 ± 0,4             |
| Alto  | \$ 15.000                         | Valle del Maipo               | 2008       | 5,6 ± 0,2                                       | 3,7 ± 0,1 | 2,6 ± 0,1                   | 14,8 ± 0,3             |

Todos los datos están expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

Los vinos se agruparon en 3 grupos de acuerdo al precio de venta por botella de cada vino en pesos chilenos; Precio Bajo: \$1.000-3.000 (US\$ 2-6), n=15; Precio Medio: \$3.500-7.500 (US\$ 7-15), n=15; Precio Alto: \$8.000-15.000 (US\$ 16-30), n=15. Esta selección de vinos en cuanto a la diferencia en precio y denominación de origen se realizó con el objetivo de tener botellas con diferentes concentraciones de compuestos fenólicos. Los vinos evaluados y su caracterización química se pueden observar en la Tabla 1. Los vinos fueron sometidos a la determinación de los diferentes análisis químicos, polifenólicos y sensoriales, siguiendo la metodología detallada en el Anexo I.

### 3. Resultados y Discusión

El precio de un vino en el mercado está relacionado intrínsecamente con la calidad de la materia prima, es decir la uva, con la cual se elaboró ese vino. En este sentido la composición química de la uva impactará positivamente en la calidad final del vino, solo si la elaboración de este sigue ciertos parámetros que tiendan a extraer de mejor forma gran parte de estos compuestos que inciden directamente en la calidad final del vino. En la Tabla 2 se pueden observar los resultados del análisis químico y fenólico de los vinos analizados.

|  | Precio Bajo      | Precio Medio     | Precio Alto      |
|--|------------------|------------------|------------------|
| Acidez titulable (g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L) | 4,2 ± 0,4 b      | 4,9 ± 0,6 a      | 5,2 ± 0,5 a      |
| pH   | 3,5 ± 0,2 a      | 3,6 ± 0,3 a      | 3,5 ± 0,1 a      |
| Azúcar (g glucosa/L)                                   | 5,0 ± 2,9 a      | 2,8 ± 0,9 b      | 2,3 ± 0,3 b      |
| Alcohol (% v/v)  | 13,2 ± 0,7 c     | 14,1 ± 0,4 b     | 14,6 ± 0,1 a     |
| FT (mg EAG/L)  | 1512,0 ± 241,1 c | 1797,3 ± 117,5 b | 1963,3 ± 126,3 a |
| PT (mg (+)-catequina/L)                                | 758,7 ± 153,5 b  | 1158,0 ± 143,0 a | 1314,0 ± 363,7 a |
| AT (mg malvidina/L)                                    | 408,7 ± 87,8 a   | 325,2 ± 56,1 b   | 290,7 ± 64,7 b   |

Todos los datos están expresados como promedio ± desviación estándar (n=15). Letras distintas en una misma fila indican diferencia estadísticamente significativa entre categorías de precio según el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ). FT: Fenoles totales; PT: Proantocianidinas totales; AT: Antocianos totales; EAG: equivalente ácido gálico.

#### 3.1. Caracterización química

En cuanto a los análisis generales como acidez titulable, pH, azúcar y contenido de alcohol se observa que para la acidez titulable, los valores más altos se encontraron en los vinos de categorías de precio más altas, con una mayor concentración en los vinos de la categoría Precio Alto (5,2 ± 0,5 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L) y Precio Medio (4,9 ± 0,6 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L). La acidez está directamente relacionada con el pH del

vino, aunque en esta investigación entre las tres categorías de precio no hubo diferencias significativas en cuanto a este parámetro. La acidez es un elemento importante, siendo uno de los gustos que se perciben con mayor intensidad y que tiene relación con la percepción sensorial de astringencia y amargor en los vinos. Además, niveles bajos de acidez contribuyen a percibir los vinos como desequilibrados e insípidos, mientras que niveles excesivamente altos contribuyen a acentuar la astringencia del vino afectando la aceptación de los consumidores (Fontoin et al., 2008). El parámetro de acidez mostró una correlación moderadamente fuerte con respecto al precio de venta del vino ( $r = 0,6501$ ,  $p < 0,05$ ; Tabla 3), lo cual no ocurrió en el caso del pH (Tabla 3). Lo anterior se puede deber a que los vinos de un mayor valor comercial se destinan a una etapa de crianza y deben tener un nivel suficiente de acidez para asegurar un adecuado envejecimiento sin perder características importantes como el color (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

En el caso del análisis de azúcares, se observó que las categorías de precio más altas presentaron un menor contenido de azúcares residuales, lo cual se sustenta al correlacionar el contenido de azúcar residual con el precio de la botella de vino en el mercado, mostrando una correlación negativa ( $r = -0,4684$ ,  $p < 0,05$ ; Tabla 3). Según la legislación vitivinícola chilena, los vinos terminados deben poseer como máximo una concentración de 2 g/L de azúcar residual (SAG, 2011); en este caso, solo las categorías más altas de precio estuvieron cercanas a este valor de azúcar residual. Los vinos de categorías de precio más bajas, son en su mayoría vinos varietales de rápido consumo, que por una estrategia de mercado, están orientados a un público objetivo que no está acostumbrado a sensaciones de amargor y astringencia propios de vinos con un mayor valor comercial, ante lo cual la presencia de azúcar puede ayudar a disminuir estas sensaciones haciendo más agradable su consumo (Gawel, 1998). En este sentido un público conocedor y consumidor habitual de vinos entiende que valores demasiado altos de azúcar en los vinos son indeseables afectando la aceptación de este producto (Johnson y Bastian, 2007).

Para el parámetro de contenido de alcohol, los vinos de la categoría Precio Alto presentaron el mayor contenido de alcohol seguidos de los vinos de la categoría Precio Medio y posteriormente los vinos de la categoría Precio Bajo, mostrando una correlación positiva con el precio del vino en el mercado ( $r = 0,7478$ ,  $p < 0,05$ ; Tabla 3). Es bastante común en la vitivinicultura chilena que vinos de mayor calidad se cosechen más tarde en la temporada para obtener una correcta madurez fenólica, pero esto también incide en que las uvas cosechadas, presenten una menor acidez y un alto contenido de sólidos solubles, que implicarán vinos con grados alcohólicos más altos (Obreque-Slier et al., 2010c), lo cual puede explicar el comportamiento en vinos

con un valor comercial más alto. Por otra parte, el contenido de alcohol en los vinos puede influir en las sensaciones de astringencia y amargor de éstos, afectando la aceptación del producto (Demiglio y Pickering, 2008).

### **3.2. Caracterización fenólica global**

En el caso de los fenoles totales, los valores estuvieron comprendidos entre  $1512,0 \pm 241,1$  y  $1963,3 \pm 126,3$  mg EAG/L y los vinos con un mayor valor comercial presentaron una mayor concentración de fenoles totales. Este resultado coincide con los resultados expuestos por Fanzone et al. (2012a), aunque en esta investigación se encontraron menores valores de concentración si se comparan con trabajos reportados por otros autores en vinos del mismo cultivar (Ginjom et al., 2010; Fanzone et al., 2012a). Los vinos de categorías más altas presentan procesos de vinificación en los cuales se privilegian las maceraciones largas con el objetivo de extraer una cantidad suficiente de compuestos fenólicos con la finalidad de garantizar una buena estabilización del color y un aumento en las sensaciones de estructura y cuerpo que son característicos de este tipo de vinos y que de alguna manera puede explicar el mayor contenido de fenoles en vinos con un mayor valor en el comercio (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). En cuanto a la relación que puede existir entre la concentración de fenoles totales y el precio del vino, se observó una correlación positiva relativamente fuerte ( $r = 0,7071$ ,  $p < 0,05$ ; Tabla 3).

El mismo comportamiento se observó en cuanto al contenido de proantocianidinas totales. Los valores variaron entre  $758,7 \pm 153,5$  y  $1314,0 \pm 363,7$  mg (+)-catequina/L y los vinos de categorías más altas de precio presentaron una mayor contenido de proantocianidinas. El mayor contenido de proantocianidinas en vinos de categorías de precio más altas está en concordancia con otros autores (Mercurio et al., 2010; Kassara y Kennedy, 2011; Fanzone et al., 2012a). En cuanto a la relación existente entre el contenido de proantocianidinas y el precio, se corrobora que vinos de mayor precio presentan un mayor contenido de proantocianidinas totales ( $r = 0,5630$ ,  $p < 0,05$ ; Tabla 3). Estos resultados en cuanto a concentración son comparables a aquellos reportados por otros autores (Harbertson et al., 2008; Ginjom et al., 2010; Mercurio et al., 2010; Kassara y Kennedy, 2011). Estas diferencias estarían dadas fundamentalmente y tal como ocurrió con el caso de los fenoles totales a diferencias en los procesos de vinificación de los vinos de más altas categorías con mayores extracciones de este tipo de compuestos desde las bayas, además de una mayor concentración de proantocianidinas en las partes sólidas de uvas que se destinan a vinos de categorías de precio más altas (Cáceres et al., 2012). Harbertson et al. (2008), en un estudio sobre el contenido de proantocianidinas totales en un gran



número de muestras de distintas localidades y variedades encontraron una alta variación en las muestras evaluadas. En esta investigación, hubo variaciones en el contenido de proantocianidinas entre categorías de precios y dentro de una misma categoría siendo la categoría de Precio Alto la que presentó una mayor variación, lo cual pudo deberse a la alta variación en las técnicas enológicas de vinificación utilizadas en cada muestra, que daría cuenta que la vinificación utilizada juega un rol fundamental en la concentración final de proantocianidinas en el vino (Harbertson et al., 2008).

Un caso totalmente distinto se produce en cuanto al contenido de antocianos totales entre las tres categorías en estudio, en donde la categoría de Precio Bajo presentó una mayor concentración de antocianos ( $408,7 \pm 87,8$  mg malvidina/L) seguido de las categorías de Precio Medio ( $325,2 \pm 56,1$  mg malvidina/L) y Precio Alto ( $290,7 \pm 64,7$  mg malvidina/L). El menor contenido de antocianos en los vinos de Precio Alto está en desacuerdo con los resultados expuestos por otros autores (Kassara y Kennedy, 2011; Fanzone et al., 2012a). En este estudio se da una correlación negativa entre el contenido de antocianos en los vinos y el precio de este en el mercado ( $r = -0,5837$ ,  $p < 0,05$ ; Tabla 3), ante lo cual el contenido de antocianos no justificaría el precio de venta del vino. El color de un vino da una idea de aspectos como la edad, concentración tánica, estado de conservación, defectos o del potencial de guarda (Ribéreau-Gayon et al., 2006b; Jaffré et al., 2009). Además, la concentración de antocianos se ve afectada por diversos factores, ya sea por factores climáticos y de la variedad (Arozarena et al., 2002) o bien por factores enológicos, como las técnicas de vinificación utilizadas en cada vino que pueden incidir en el grado de extracción de estos compuestos (Ortega-Regules et al., 2008) y que pudieron ser la causa de las diferencias encontradas en este estudio. Otra causa es que los vinos de categorías distintas de precio, se destinan a una producción diferente, en la cual vinos de un mayor precio por botella, presentan una etapa de guarda antes de salir al mercado, no sucediendo lo mismo en el caso de los vinos más baratos que se destinan a un consumo más rápido. La guarda del vino produce una serie de procesos que pueden ser una degradación de los antocianos (produciendo la pérdida irreversible del color), o una estabilización de este mediante una combinación directa de los antocianos con otros compuestos (por ejemplo flavanoles), o bien por mediación de acetaldehído, produciendo la formación de polímeros pigmentados, que aumentarían la estabilización del color pero al mismo tiempo producirían una disminución de los antocianos libres (Monagas y Bartolomé, 2009; Terrier et al., 2009b). La mayor concentración de flavanoles en las categorías más altas de precio ayudaría a la estabilización del color en estas categorías de vino, con la consiguiente

disminución del contenido de antocianos libres, lo cual puede explicar el menor contenido de antocianos en las categorías más altas de precio (Mateus et al., 2003; Pérez-Magariño y González-San José, 2006). Estos resultados en cuanto a concentración son comparables a aquellos reportados por otros autores en vinos del cv. Cabernet Sauvignon (Ginjom et al., 2010; Fanzone et al., 2012a).

En forma global se aprecia que vinos de categorías de precios más altas, presentaron una mayor concentración de compuestos fenólicos, especialmente en lo que se refiere al grupo de flavanoles. En cambio el contenido de antocianos totales, no tiene relación con el precio que el vino alcanza en el mercado. Aún cuando los vinos de precios más altos presentaron un menor contenido de antocianos, la mayor concentración de flavanoles en esta categoría de vinos, puede ayudar a estabilizar el color de estos (Boulton, 2001). Además, la mayor concentración de proantocianidinas en vinos de precios más altos, puede aumentar las sensaciones de cuerpo del vino, además de otras sensaciones como la astringencia y el amargor (Gawel, 1998; Llaudy et al., 2004; Lesschaeve y Noble, 2005; Lattey et al., 2010).

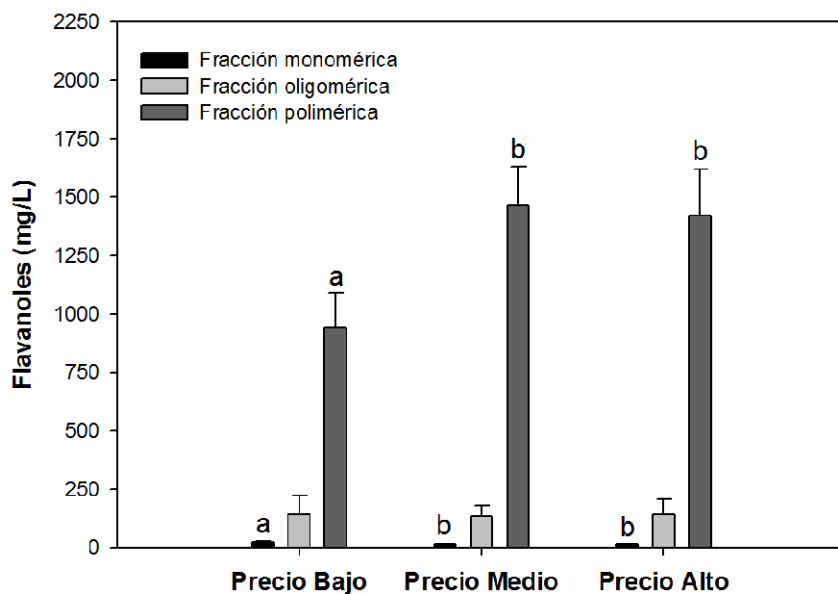
**Tabla 3.** Correlación entre parámetros químicos, sensoriales y el precio de venta de vinos comerciales chilenos del cv. Cabernet Sauvignon

|                                 |                           | r       | r <sup>2</sup> | valor p |
|---------------------------------|---------------------------|---------|----------------|---------|
| Químicos                        | Acidez titulable          | 0,6501  | 0,4226         | 0,0000  |
|                                 | pH                        | 0,2384  | 0,0568         | 0,1147  |
|                                 | Azúcar                    | -0,4684 | 0,2194         | 0,0012  |
|                                 | Alcohol                   | 0,7478  | 0,5592         | 0,0000  |
| Polifenoles                     | Fenoles totales           | 0,7071  | 0,5001         | 0,0000  |
|                                 | Proantocianidinas totales | 0,5630  | 0,3170         | 0,0001  |
|                                 | Antocianos totales        | -0,5837 | 0,3407         | 0,0000  |
| Proporción de proantocianidinas | Monómeros                 | -0,5641 | 0,3182         | 0,0001  |
|                                 | Oligómeros                | -0,1035 | 0,0107         | 0,4984  |
|                                 | Polímeros                 | 0,5895  | 0,3476         | 0,0000  |
| Sensorial                       | Astringencia              | 0,6081  | 0,3697         | 0,0000  |
|                                 | Amargor                   | -0,0981 | 0,0096         | 0,5213  |

### 3.3. Fraccionamiento de proantocianidinas

En la Figura 1 se observa el contenido de monómeros, oligómeros y polímeros de flavanol. En cuanto a la fracción monomérica, los vinos de la categoría Precio Bajo presentaron un mayor contenido de monómeros de flavanol ( $24,7 \pm 5,5$  mg/L) que los vinos de las categorías Precio Medio ( $14,2 \pm 4,2$  mg/L) y Precio Alto ( $14,2 \pm 4,4$  mg/L), que no presentaron diferencias de concentración entre sí. En cuanto a la fracción

oligomérica, no hay diferencias significativas en cuanto a concentración. Para la fracción polimérica, la categoría Precio Bajo presentó la menor concentración de polímeros ( $942,6 \pm 146,3$  mg/L), comparado con los vinos de Precio Medio ( $1463,8 \pm 166,6$  mg/L) y Precio Alto ( $1422,6 \pm 197,2$  mg/L). Claramente vinos de precios más altos presentaron un mayor contenido de polímeros de flavanol, lo cual coincide con los resultados expuestos por otros autores (Fanzone et al., 2012a).



**Figura 1.** Fracciones monoméricas, oligoméricas y poliméricas de proantocianidinas en vinos del cv. Cabernet Sauvignon de diferentes categorías de precio. Letras diferentes en una misma fracción significa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre categorías de precio de acuerdo al Test de Tukey HSD.

En cuanto a la proporción de las distintas fracciones de flavanoles, vinos de Precio Bajo mostraron un porcentaje mayor de monómeros y oligómeros y un porcentaje menor de polímeros (2,22%, 13,01%, 84,77%, respectivamente) que vinos de categorías de Precio Medio (monómeros: 0,88%, oligómeros: 8,49%, polímeros: 90,63%) y Precio Alto (monómeros: 0,90%, oligómeros: 9,06%, polímeros: 90,04%). En este último caso, no hay diferencias en concentración ni en proporción entre las categorías de Precio Medio y Precio Alto. Las diferencias observadas pueden influir en la astringencia y amargor de estos vinos (Gawel, 1998; Kennedy et al., 2006). Aunque existen diferencias de concentración entre las categorías de precio, no se observaron diferencias en cuanto a la proporción de las distintas fracciones de flavanoles, mostrando que la fracción polimérica fue la predominante por sobre la fracción oligomérica y seguida en concentración por la fracción monomérica. El contenido relativo de las tres fracciones de flavanoles expuestas en este trabajo coincide con los

reportado por otros autores en vinos del mismo cultivar (Monagas et al., 2003; Cosme et al., 2009; Fanzone et al., 2012a). En cuanto a la relación existente entre la proporción de proantocianidinas y el precio comercial del vino, y tal como se expuso anteriormente, se encontró una relación negativa entre el precio y el contenido de monómeros ( $r = -0,5641$ ,  $p < 0,05$ ; Tabla 3) y oligómeros ( $r = -0,1035$ ,  $p > 0,05$ ; Tabla 3), en cambio hubo una relación positiva con la concentración de polímeros de flavanol ( $r = 0,5895$ ,  $p < 0,05$ ; Tabla 3).

### 3.4. Evaluación sensorial

En la Tabla 4 se pueden apreciar los parámetros de astringencia y amargor para los vinos comerciales en estudio.

|              | Precio Bajo | Precio Medio | Precio Alto  |
|--------------|-------------|--------------|--------------|
| Astringencia | 8,0 ± 1,4 c | 9,2 ± 0,8 b  | 10,1 ± 0,4 a |
| Amargor      | 3,9 ± 0,4 a | 3,5 ± 0,5 a  | 3,6 ± 0,7 a  |

Todos los datos están expresados como el promedio de la degustación de 12 evaluadores ± desviación estándar (n=15). Letras distintas en una misma fila indican diferencia estadísticamente significativa entre categorías de precio según el Test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

En el caso de la astringencia percibida por el panel sensorial, se observa que es mayor a medida que aumenta el precio del vino, mostrando una relación positiva entre estos ( $r = 0,6081$ ,  $p < 0,05$ ; Tabla 3). Las diferencias encontradas pueden atribuirse a la composición química de estos vinos, en donde se observa que vinos de un mayor valor comercial presentaron una mayor concentración de proantocianidinas totales (Tabla 2) y un mayor contenido de polímeros de flavanol (Figura 1). De acuerdo a Vidal et al. (2003), la astringencia aumenta por la concentración de proantocianidinas en el vino y también por un aumento en el grado de polimerización de estos compuestos, lo cual permitiría justificar el aumento de la astringencia percibida en vinos de un mayor valor comercial. Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Fanzone et al. (2012a) quienes encontraron que vinos de un mayor valor comercial del cv. Cabernet Sauvignon, presentaban una mayor percepción sensorial de astringencia. Junto con lo anterior, la mayor percepción de astringencia en vinos con un mayor precio comercial puede deberse a las características químicas de estos en cuanto a los parámetros de acidez, contenido de azúcares y contenido de alcohol. Estos parámetros pueden modificar la percepción de astringencia percibida (Kallithraka et al., 1997; Brannan et al., 2001), y puede ser por esta razón que vinos con un mayor valor comercial que presentaron una mayor acidez, un menor contenido de azúcar y un

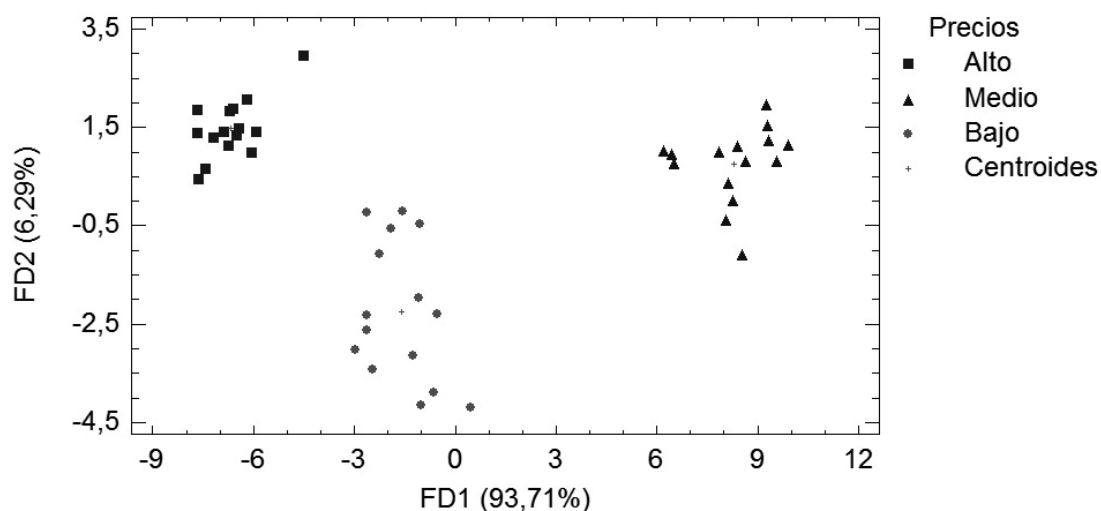
mayor contenido de alcohol (Tabla 2) fueran percibidos como más astringentes (Lesschaeve y Noble, 2005; Fontoin et al., 2008, Obreque-Slier et al., 2010b).

En cuanto al parámetro de amargor no se observaron diferencias entre las tres categorías de precio. El amargor es un gusto y es inducido por diversas moléculas, incluyendo moléculas orgánicas, iones inorgánicos y sales. Debido al alto número y diversidad de moléculas que inducen el gusto amargo, diversos mecanismos de transducción están involucrados en la percepción de este gusto (Adler et al., 2000). Al ser un gusto, su percepción depende de diversos factores, relativos a la composición del alimento degustado y la interacción con otras sustancias (Lesschaeve y Noble, 2005), como también a diferencias entre las personas produciendo un cierta dificultad para detectar este gusto (Lawless y Heymann, 2010). Las tres categorías de precio no presentaron diferencias, y el panel sensorial puntuó por igual la sensación de amargor en los vinos, aunque claramente los vinos analizados presentaban diferencias claras en cuanto a su composición química y fenólica (Tabla 2). En las degustaciones de vinos, es bastante común que exista una confusión entre el gusto amargo y la sensación de astringencia, produciendo que un vino pueda ser calificado como astringente cuando en verdad es amargo y viceversa (Lee y Lawless, 1991). La variabilidad en cuanto a las personas que conformaban el panel y la dificultad para aislar este gusto, puede ser la causa de que el panel sensorial no encontrara diferencias entre las categorías de precio.

### **3.5. Clasificación de los vinos de acuerdo a su valor comercial**

Los vinos provenientes de las tres categorías de precio presentaron diferencias en cuanto a los parámetros químicos y fenólicos evaluados, lo cual da cuenta, de cierta forma, de la variabilidad en cuanto a la composición química de la uva, prácticas en el viñedo y técnicas enológicas que inciden directamente en la calidad comercial del vino. Para apreciar si las variables químicas y fenólicas básicas de análisis, que pueden realizarse en forma rápida en cualquier bodega, pueden agrupar a un cierto grupo de vinos por precio se utilizó un análisis de discriminante canónico (ADC) con el método de selección “hacia atrás” (*backward selection method*) utilizando la información entregada en la Tabla 2 y Figura 1. En total se utilizaron 10 variables químicas las cuales resultaron en 2 funciones discriminantes, que representaron el 100% de la varianza total ( $p < 0,05$ ). La primera función discriminante (FD1) representó un 93,71% de la variabilidad total, mientras que la segunda función discriminante (FD2) representó un 6,29%. Ambas funciones mostraron un valor de *Wilks Lambda* de  $6,24 \times 10^{-3}$  y  $2,6 \times 10^{-1}$ , respectivamente, lo cual indicó una muy buena discriminación entre las variables. Las dos funciones discriminantes permitieron

la clasificación de un 100% de los vinos de acuerdo a su precio comercial (Figura 3). Los vinos de Precio Alto y Precio Medio mostraron una puntuación negativa, mientras que los vinos de Precio Bajo mostraron una puntuación positiva en la FD1. Con respecto a la FD2, los vinos de Precio Alto y Precio Bajo mostraron una puntuación negativa, en cambio los vinos de Precio Medio mostraron una puntuación positiva. Las variables con mayor incidencia en la FD1 fueron el pH en forma positiva y los fenoles totales y el alcohol en forma negativa, mientras que en la FD2, las proantocianidinas totales influyeron en forma positiva y el contenido de monómeros en forma negativa.



**Figura 2.** Gráfico discriminante de composición química y fenólica de vinos comerciales chilenos del cv. Cabernet Sauvignon de acuerdo a su precio comercial (n=45).

El análisis discriminante mostró que variables químicas tales como el pH, contenido de alcohol y variables polifenólicas como el contenido de fenoles totales, contenido de proantocianidinas y concentración de monómeros influyeron en la clasificación de los vinos y permitieron su agrupación de acuerdo al precio comercial de estos. Aún cuando la clasificación de acuerdo al precio comercial en los vinos puede realizarse con otros compuestos químicos del vino, por ejemplo antocianinas y fenoles de bajo peso molecular, hay que considerar otras variables como el tiempo, costo de reactivos y complejidad de las metodologías anteriores que pueden dificultar la clasificación de los vinos.

En este estudio y con los resultados obtenidos se demostró el impacto que presenta la composición fenólica del vino sobre la calidad de éste y sobre el precio de mercado. Se pudo observar que vinos con un mayor valor comercial presentaron una mayor concentración de compuestos fenólicos. Además, en cuanto al análisis sensorial se observó que vinos de un mayor precio presentaron una mayor percepción

de astringencia, la cual se debió, fundamentalmente, al mayor contenido de flavanoles. Por otra parte, solo hubo cambios en la concentración de proantocianidinas pero no en la proporción de las distintas fracciones, aunque vinos de un mayor valor comercial mostraron una mayor concentración de polímeros de flavanol y una menor concentración de monómeros de flavanol.

## **Subcapítulo II.3:**

# **Proantocianidinas en vinos tintos y su relación con la aceptabilidad de los consumidores**



## 1. Consideraciones Generales

La aceptabilidad de un vino depende de diversos factores, ya sea por factores propios de este, como su composición química, nivel de alcohol, acidez, composición aromática; por factores externos al vino como el precio comercial, conocimiento de la marca, premios o por factores sujetos a la individualidad de cada persona y sus preferencias (Frost y Noble, 2002; Lattey et al., 2010). En el último tiempo son los compuestos fenólicos, los que inciden mayormente en la calidad del vino tinto, ya que estos compuestos contribuyen a importantes propiedades organolépticas que de una u otra forma incidirán en la aceptabilidad del vino (Gawel, 1998). Es por esta razón que existe una relación entre la composición química del vino y la evaluación sensorial de este, con el objetivo principal de conocer que compuestos son los que influyen en las características sensoriales de los vinos (Girard et al., 2001). Las proantocianidinas afectan principalmente a parámetros importantes como son la astringencia y el amargor de los vinos (Llaudy et al., 2004, Chira et al., 2011). La astringencia es una sensación táctil y es probablemente uno de los más importantes atributos sensoriales en los vinos tintos (Gawel, 1998; Payne et al., 2009). Esta sensación es causada por la habilidad de las proantocianidinas de unirse a las proteínas salivares, produciendo una sensación de sequedad en la boca (Llaudy et al., 2004). En cambio, el amargor, es un gusto inducido por una amplia gama de moléculas, que incluyen moléculas orgánicas, péptidos, iones inorgánicos y sales (Adler et al., 2000). La composición de las proantocianidinas en el vino puede influir en la percepción sensorial de estos, ya que los flavanoles monoméricos y las proantocianidinas de bajo peso molecular son más amargas que astringentes, en cambio los polímeros de alto peso molecular son generalmente más astringentes que amargos (Peleg et al., 1999; Brossaud et al., 2001). Debido a lo anterior es que se necesita conocer como influye la composición fenólica y especialmente en cuanto a la concentración y proporción de las distintas fracciones de proantocianidinas en el vino y su relación con la aceptabilidad de estos. Cabe destacar que la aceptabilidad de un alimento se realiza con consumidores, que en algunas oportunidades no tienen un conocimiento del vino y su composición, lo cual hace que parámetros tan importantes como la astringencia, cuando se encuentra en exceso produzca un rechazo del vino, afectando su opción de compra. Es por esta razón que el objetivo del presente trabajo fue conocer la relación existente entre la composición fenólica de los vinos y su influencia sobre la aceptabilidad de vinos comerciales chilenos de los cv. Cabernet Sauvignon y Merlot.

## 2. Consideraciones Experimentales

Se ocuparon 18 vinos comerciales del cv. Cabernet Sauvignon y 18 vinos comerciales del cv. Merlot de varias denominaciones de origen chilenas de la temporada 2009. Estas muestras se obtuvieron de supermercados y tiendas especializadas de venta de vinos. Los vinos, en pesos chilenos, presentaban un rango de precios que iba desde los \$4.500 a los \$7.500 (US\$ 9-15). Esta selección de vinos se realizó con el objetivo de tener botellas con diferentes concentraciones de compuestos fenólicos y especialmente en proantocianidinas totales. Los vinos evaluados y su caracterización química se pueden observar en la Tabla 1. Los vinos fueron sometidos a la determinación de los diferentes análisis fenólicos, químicos y sensoriales, siguiendo la metodología detallada en el Anexo I.

| <b>Tabla 1. Parámetros químicos generales en vinos comerciales del cv. Cabernet Sauvignon</b> |                               |            |   |           |                             |                        |
|---|-------------------------------|------------|---|-----------|-----------------------------|------------------------|
| <b>Código</b>   | <b>Denominación de origen</b> | <b>Año</b> | <b>Acidez (g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L)</b> | <b>pH</b> | <b>Azúcar (g glucosa/L)</b> | <b>Alcohol (% v/v)</b> |
| CS1   | Valle del Maipo               | 2009       | 3,4 ± 0,1                                       | 3,7 ± 0,0 | 2,3 ± 0,2                   | 14,5 ± 0,3             |
| CS2   | Valle del Maipo               | 2009       | 3,4 ± 0,0                                       | 3,7 ± 0,0 | 3,3 ± 0,1                   | 14,5 ± 0,4             |
| CS3   | Valle del Maipo               | 2009       | 4,2 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,0 | 1,7 ± 0,3                   | 14,5 ± 0,2             |
| CS4   | Valle del Maipo               | 2009       | 4,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,1 | 2,3 ± 0,2                   | 14,5 ± 0,1             |
| CS5   | Valle del Maipo               | 2009       | 3,4 ± 0,1                                       | 3,7 ± 0,0 | 3,2 ± 0,1                   | 14,5 ± 0,0             |
| CS6   | Valle de Colchagua            | 2009       | 3,9 ± 0,1                                       | 3,3 ± 0,2 | 3,2 ± 0,2                   | 14,5 ± 0,3             |
| CS7   | Valle del Maipo               | 2009       | 3,9 ± 0,1                                       | 3,4 ± 0,0 | 3,4 ± 0,1                   | 14,5 ± 0,5             |
| CS8   | Valle del Maipo               | 2009       | 3,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,0 | 3,2 ± 0,2                   | 14,5 ± 0,5             |
| CS9   | Valle de Colchagua            | 2009       | 3,4 ± 0,0                                       | 3,4 ± 0,1 | 2,3 ± 0,1                   | 14,5 ± 0,8             |
| CS10  | Valle del Maipo               | 2009       | 3,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,0 | 4,1 ± 0,2                   | 14,5 ± 0,7             |
| CS11  | Valle del Maipo               | 2009       | 3,9 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,0 | 3,4 ± 0,1                   | 14,5 ± 0,5             |
| CS12  | Valle del Maipo               | 2009       | 3,4 ± 0,0                                       | 3,7 ± 0,1 | 2,5 ± 0,3                   | 14,5 ± 0,6             |
| CS13  | Valle de Colchagua            | 2009       | 3,9 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,2 | 3,3 ± 0,2                   | 14,8 ± 0,4             |
| CS14  | Valle del Maipo               | 2009       | 3,9 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,1 | 2,7 ± 0,2                   | 14,8 ± 0,5             |
| CS15  | Valle de Colchagua            | 2009       | 3,9 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,0 | 2,9 ± 0,1                   | 14,8 ± 0,2             |
| CS16  | Valle de Colchagua            | 2009       | 4,4 ± 0,0                                       | 3,6 ± 0,0 | 3,4 ± 0,2                   | 13,5 ± 0,2             |
| CS17  | Valle de Colchagua            | 2009       | 3,4 ± 0,0                                       | 3,5 ± 0,0 | 2,4 ± 0,3                   | 13,5 ± 0,3             |
| CS18  | Valle de Colchagua            | 2009       | 3,9 ± 0,0                                       | 3,6 ± 0,1 | 1,5 ± 0,4                   | 13,5 ± 0,2             |

Todos los datos están expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

**Tabla 2. Parámetros químicos generales en vinos comerciales del cv. Merlot**

| Código | Denominación de origen | Año  | Acidez (g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L) | pH        | Azúcar (g glucosa/L) | Alcohol (% v/v) |
|--------|------------------------|------|--|-----------|----------------------|-----------------|
| ME1    | Valle del Maipo        | 2009 | 3,4 ± 0,1                                    | 3,6 ± 0,0 | 2,2 ± 0,2            | 14,5 ± 0,3      |
| ME2    | Valle del Maipo        | 2009 | 3,9 ± 0,0                                    | 3,4 ± 0,0 | 3,9 ± 0,1            | 14,5 ± 0,2      |
| ME3    | Valle de Colchagua     | 2009 | 3,4 ± 0,0                                    | 3,7 ± 0,0 | 2,9 ± 0,3            | 14,5 ± 0,2      |
| ME4    | Valle del Maipo        | 2009 | 4,2 ± 0,0                                    | 3,4 ± 0,1 | 3,4 ± 0,2            | 14,5 ± 0,1      |
| ME5    | Valle de Colchagua     | 2009 | 4,9 ± 0,1                                    | 3,4 ± 0,0 | 3,8 ± 0,1            | 14,5 ± 0,0      |
| ME6    | Valle de Colchagua     | 2009 | 3,9 ± 0,1                                    | 3,7 ± 0,2 | 1,2 ± 0,2            | 14,5 ± 0,2      |
| ME7    | Valle de Colchagua     | 2009 | 4,2 ± 0,1                                    | 3,5 ± 0,0 | 2,2 ± 0,1            | 14,5 ± 0,1      |
| ME8    | Valle de Colchagua     | 2009 | 4,2 ± 0,0                                    | 3,7 ± 0,0 | 3,2 ± 0,2            | 14,8 ± 0,2      |
| ME9    | Valle de Colchagua     | 2009 | 3,9 ± 0,0                                    | 3,6 ± 0,1 | 1,7 ± 0,1            | 12,5 ± 0,5      |
| ME10   | Valle de Cachapoal     | 2009 | 2,9 ± 0,0                                    | 3,8 ± 0,0 | 3,8 ± 0,2            | 12,5 ± 0,7      |
| ME11   | Valle del Maipo        | 2009 | 3,4 ± 0,0                                    | 3,4 ± 0,0 | 2,5 ± 0,1            | 12,5 ± 0,5      |
| ME12   | Valle del Maipo        | 2009 | 3,4 ± 0,0                                    | 3,6 ± 0,1 | 2,9 ± 0,3            | 13,5 ± 0,6      |
| ME13   | Valle de Colchagua     | 2009 | 2,9 ± 0,0                                    | 3,6 ± 0,2 | 2,8 ± 0,2            | 13,5 ± 0,4      |
| ME14   | Valle del Maipo        | 2009 | 2,9 ± 0,0                                    | 3,7 ± 0,1 | 2,9 ± 0,2            | 13,5 ± 0,5      |
| ME15   | Valle de Colchagua     | 2009 | 3,9 ± 0,0                                    | 3,5 ± 0,0 | 1,6 ± 0,1            | 12,5 ± 0,2      |
| ME16   | Valle de Colchagua     | 2009 | 3,7 ± 0,0                                    | 3,6 ± 0,0 | 2,2 ± 0,2            | 12,5 ± 0,2      |
| ME17   | Valle de Colchagua     | 2009 | 3,9 ± 0,0                                    | 3,5 ± 0,0 | 1,8 ± 0,3            | 12,5 ± 0,3      |
| ME18   | Valle de Colchagua     | 2009 | 3,9 ± 0,0                                    | 3,7 ± 0,1 | 3,0 ± 0,4            | 12,5 ± 0,2      |

Todos los datos están expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Caracterización química y fenólica global

En la Tabla 3 se pueden observar los resultados del análisis químico y fenólico de los vinos analizados.

**Tabla 3. Concentración de diversos parámetros químicos en vinos comerciales de los cv. Cabernet Sauvignon y Merlot**

|  | Cabernet Sauvignon | Merlot           |
|--|--------------------|------------------|
| Acidez titulable (g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L) | 3,8 ± 0,3 a        | 3,7 ± 0,5 a      |
| pH   | 3,5 ± 0,1 a        | 3,6 ± 0,1 a      |
| Azúcar (g glucosa/L)                                   | 2,8 ± 0,7 a        | 2,7 ± 0,8 a      |
| Alcohol (% v/v)  | 14,4 ± 0,4 a       | 14,1 ± 0,9 b     |
| Fenoles Totales (mg EAG/L)                             | 1684,0 ± 211,5 a   | 1571,6 ± 148,6 a |
| Proantocianidinas Totales (mg (+)-catequina/L)         | 1540,0 ± 340,1 a   | 1223,2 ± 311,9 b |
| Índice de Gelatina (%)                                 | 55,8 ± 7,0 a       | 50,2 ± 11,5 b    |

Todos los datos están expresados como promedio ± desviación estándar (n=18). Letras distintas en una misma fila indican diferencia estadísticamente significativa según t-Student (p < 0,05).

La composición química de los vinos en cuanto al contenido de alcohol, azúcar y acidez pueden afectar la aceptación del vino, debido principalmente a las características que estos parámetros producen (Fontoin et al., 2008), y además a la

interacción en otras sensaciones que son propias de ciertos alimentos y especialmente del vino tinto, como la astringencia y el amargor. Estas dos sensaciones dependen principalmente de la concentración de proantocianidinas (Gawel, 1998; Vidal et al., 2004a; Mercurio y Smith, 2008), pero también de la interacción con otras moléculas como ácidos, azúcares y alcoholes produciendo cambios en la percepción sensorial de estos parámetros (Fontoin et al., 2008; Obreque-Slier et al., 2010b). En este estudio no se encontraron diferencias claras entre la composición química general de los vinos ante lo cual estos parámetros no incidirían en la percepción de astringencia y amargor y más bien sería la composición y concentración de compuestos fenólicos en los vinos los que pueden afectar la mayor o menor percepción de astringencia y amargor y la aceptabilidad de estos (Vidal et al., 2003). Además no se observó una relación entre la aceptabilidad de los vinos y los diversos parámetros químicos medidos (Tabla 4).

En cuanto al contenido de fenoles totales, no se observaron diferencias de concentración entre los vinos de las dos variedades estudiadas. La concentración de fenoles totales encontradas en este estudio es menor a lo reportado por otros autores (Ginjom et al., 2010; Fanzone et al., 2012a).

**Tabla 4.** Correlación entre parámetros químicos y sensoriales con la aceptabilidad de vinos comerciales de los cv. Cabernet Sauvignon y Merlot

| Parámetros                | Cabernet Sauvignon |                |         | Merlot  |                |         |
|---------------------------|--------------------|----------------|---------|---------|----------------|---------|
|                           | r                  | r <sup>2</sup> | valor p | r       | r <sup>2</sup> | valor p |
| Acidez titulable          | -0,0409            | 0,0167         | 0,8718  | 0,0534  | 0,0286         | 0,8330  |
| pH                        | 0,2430             | 0,0590         | 0,3311  | 0,0149  | 0,0002         | 0,9530  |
| Azúcar                    | -0,1966            | 0,0386         | 0,4342  | -0,3801 | 0,1445         | 0,1197  |
| Alcohol                   | -0,0485            | 0,0235         | 0,8484  | -0,4384 | 0,1922         | 0,0687  |
| Fenoles totales           | -0,6790            | 0,4610         | 0,0019  | -0,6393 | 0,4087         | 0,0043  |
| Proantocianidinas totales | -0,6999            | 0,4899         | 0,0012  | -0,9292 | 0,8634         | 0,0000  |
| Índice de gelatina        | -0,5183            | 0,2687         | 0,0275  | -0,3064 | 0,0939         | 0,2162  |
| Monómeros                 | -0,3421            | 0,1170         | 0,1647  | -0,0472 | 0,0223         | 0,8523  |
| Oligómeros                | -0,2143            | 0,0459         | 0,3929  | 0,0431  | 0,0186         | 0,8649  |
| Polímeros                 | -0,7414            | 0,5497         | 0,0004  | -0,7728 | 0,5972         | 0,0002  |

Los vinos del cv. Cabernet Sauvignon presentan una mayor concentración de proantocianidinas totales, lo que coincide con lo reportado por otros autores (Mercurio y Smith, 2008; Ginjom et al., 2010; Mercurio et al., 2010). Aún cuando la composición fenólica de los vinos depende de diversos factores como la zona de cultivo de la vid, las prácticas culturales del viñedo, la madurez de la uva y las técnicas de vinificación (Monagas et al., 2005), también puede depender de la variedad de uva utilizada para la elaboración del vino. Es por esta razón que el mayor contenido de proantocianidinas

totales encontrado en vinos del cv. Cabernet Sauvignon en comparación con los vinos del cv. Merlot coincide con lo reportado por otros autores (González-Neves et al., 2004; Chira et al., 2011; Lorrain et al., 2011). La mayor concentración de proantocianidinas en vinos del cv. Cabernet Sauvignon puede afectar las características organolépticas de este, especialmente en cuanto a los parámetros de astringencia y amargor (Gawel, 1998; Vidal et al., 2004a). Esto se refleja en el parámetro de índice de gelatina, el cual es levemente mayor en vinos del cv. Cabernet Sauvignon. Este parámetro estima la astringencia percibida del vino, pero presenta ciertas dificultades en la metodología, debido principalmente a que se debe realizar una cuantificación de las proantocianidinas luego de la precipitación de estos mediante una hidrólisis ácida, la cual solo entrega un resultado estimativo (Schofield et al., 2001). Además, la gelatina utilizada es una mezcla heterogénea de proteínas y su composición puede variar dependiendo del producto comercial que se utilice. Esto puede ser una fuente importante de error, que hace que este índice no sea preciso para cuantificar en forma analítica la astringencia percibida del vino (Llaudy et al., 2004). Esto se corrobora al correlacionar la astringencia percibida mediante el panel sensorial y el índice de gelatina; para Cabernet Sauvignon:  $r = 0,4542$ ,  $r^2 = 0,2063$ , valor  $p = 0,0582$ ; para Merlot:  $r = 0,3415$ ,  $r^2 = 0,1166$ , valor  $p = 0,1653$ . En ambos casos se aprecia que son relaciones débiles y no significativas, ante lo cual esta metodología no sería un buen indicador en forma analítica de la astringencia percibida. En el último tiempo se han desarrollado diversas metodologías de cuantificación de proantocianidinas que presentan la interacción de estos compuestos con agentes precipitantes y que se basan en un mecanismo similar a la astringencia, es decir, interacción y posterior precipitación de las proantocianidinas (Llaudy et al., 2004; Kennedy et al., 2006; Sarneckis et al., 2006). Dentro de estas metodologías, la desarrollada por Sarneckis et al. (2006), se basa en el uso de la metilcelulosa como agente precipitante. La fácil implementación de este método y la alta correlación que presenta con la astringencia percibida en forma sensorial (Mercurio et al., 2007; Mercurio y Smith, 2008) hacen de este método uno de los mejores para medir en forma analítica la astringencia percibida en una muestra de vino.

En la presente investigación, se encontraron relaciones relativamente fuertes entre el contenido de proantocianidinas totales y la percepción sensorial de astringencia percibida por el panel sensorial (Cabernet Sauvignon:  $r = 0,69$ ;  $r^2 = 0,4725$ ; Merlot:  $r = 0,94$ ;  $r^2 = 0,8824$ ), lo cual fue especialmente importante en el caso de los vinos del cv. Merlot, que mostraron un muy buen ajuste en la curva. Ambos valores son mayores a los presentados por el índice de gelatina, lo cual demuestra que esta metodología de cuantificación de proantocianidinas es una herramienta útil

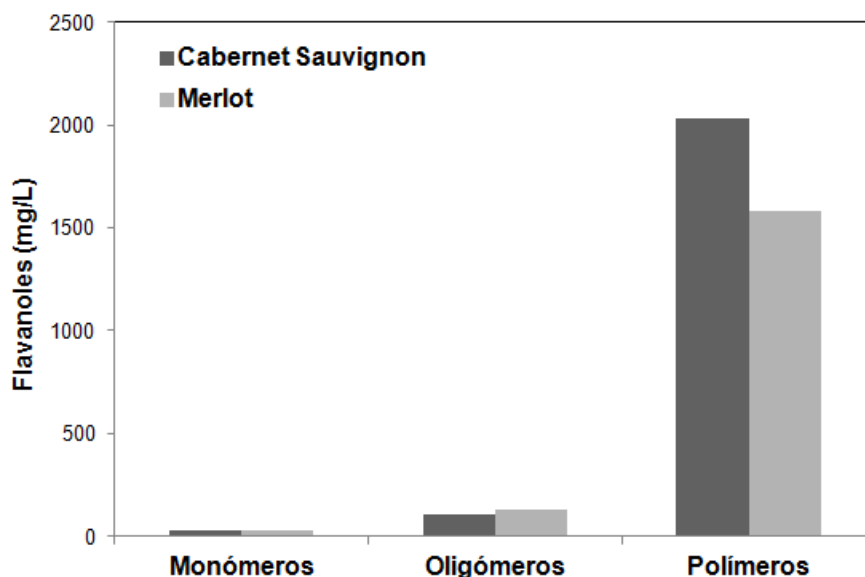
para medir analíticamente la astringencia del vino. La diferencia entre los vinos de los dos cultivares, puede deberse a la diferencia en composición química del vino, como por ejemplo, la diferencia en la concentración de polímeros encontrada entre ambos cultivares, con un mayor contenido de polímeros de flavanol en vinos del cv. Cabernet Sauvignon (Figura 1A, 1B), o también a la presencia de otro tipo de compuestos llamados pigmentos poliméricos, que puede presentar diferencias en concentración entre los dos cultivares y que influyó en la precipitación de las proantocianidinas mediante el método de la metilcelulosa (Harbertson et al., 2003).

### 3.2. Fraccionamiento de proantocianidinas

En la Figura 1, se observa el contenido de monómeros, oligómeros y polímeros de flavanol en vinos de los cv. Cabernet Sauvignon y Merlot.

Sun et al. (1998a) indica que en vinos la fracción monomérica esta compuesta solo de (+)-catequina, (-)-epicatequina y de (-)-epicatequina-3-O-galato, mientras que la fracción oligomérica esta formada mayoritariamente de dímeros, trímeros y tetrameros de procianidinas y finalmente la fracción polimérica esta compuesta de procianidinas poliméricas (sobre las 4 unidades).

Para vinos del cv. Cabernet Sauvignon, las concentraciones de las fracciones monomérica, oligomérica y polimérica fueron de  $26,0 \pm 8,8$  mg/L;  $106,9 \pm 33,8$  mg/L y  $2034,5 \pm 591,0$  mg/L, respectivamente. En los vinos del cv. Merlot, las concentraciones de las tres fracciones fueron de  $25,0 \pm 9,2$  mg/L para monómeros;  $129,3 \pm 39,1$  mg/L para oligómeros y  $1583,7 \pm 426,9$  mg/L para polímeros. En vinos del cv. Cabernet Sauvignon, el porcentaje relativo de las distintas fracciones fue el siguiente: monómeros, 1,20%; oligómeros, 4,93%, polímeros, 93,87%. Para los vinos del cv. Merlot, los porcentajes fueron los siguientes: monómeros, 1,44%; oligómeros, 7,44%, polímeros, 91,12%.



**Figura 1.** Fracciones monoméricas, oligoméricas y poliméricas de proantocianidinas en vinos del cv. Cabernet Sauvignon y Merlot (n=18).

Se observa que la fracción polimérica es la mayoritaria en los dos cultivares, lo cual concuerda con Monagas et al. (2003). Solo se observaron diferencias ( $p < 0,05$ ) en el contenido de polímeros de flavanol, el cual presenta una mayor concentración en vinos del cv. Cabernet Sauvignon. El contenido relativo de las tres fracciones de flavanoles expuestas en este trabajo coincide con lo reportado por otros autores en vinos del mismo cultivar (Monagas et al., 2003; Fanzone et al., 2012a). Las distintas fracciones de flavanoles cuantificadas pueden influir en las propiedades sensoriales de los vinos, especialmente en las sensaciones de astringencia y amargor, ya que flavanoles de tamaño más pequeño se sienten más amargos y flavanoles de tamaños más elevados se perciben como más astringentes (Gawel, 1998; Peleg et al., 1999; Brossaud et al., 2001). De acuerdo a lo anterior el análisis de correlación entre la composición de flavanoles y las sensaciones percibidas de astringencia y amargor se observan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Relaciones entre fracciones de flavanoles y amargor y astringencia en vinos comerciales de los cv. Cabernet Sauvignon y Merlot

| Parámetros           | Cabernet Sauvignon |                |         | Merlot  |                |         |
|----------------------|--------------------|----------------|---------|---------|----------------|---------|
|                      | r                  | r <sup>2</sup> | valor p | r       | r <sup>2</sup> | valor p |
| <b>Amargor</b>       |                    |                |         |         |                |         |
| Fracción monomérica  | 0,0729             | 0,0053         | 0,7737  | 0,0270  | 0,0007         | 0,9122  |
| Fracción oligomérica | 0,4223             | 0,1783         | 0,0808  | -0,1202 | 0,0144         | 0,6345  |
| Fracción polimérica  | 0,5456             | 0,2977         | 0,0192  | 0,2809  | 0,0789         | 0,2588  |
| <b>Astringencia</b>  |                    |                |         |         |                |         |
| Fracción monomérica  | 0,2461             | 0,0605         | 0,3249  | -0,0180 | 0,0003         | 0,9432  |
| Fracción oligomérica | 0,2526             | 0,0638         | 0,3118  | 0,0643  | 0,0441         | 0,7997  |
| Fracción polimérica  | 0,6077             | 0,3693         | 0,0075  | 0,8006  | 0,6410         | 0,0001  |

En este caso se aprecia, que para ambos cultivares, no hay una relación clara entre la fracción monomérica y oligomérica con respecto al amargor de los vinos, aunque para los vinos del cv. Cabernet Sauvignon se observó una relación moderadamente fuerte entre el amargor y la fracción polimérica. En cambio con la astringencia percibida, hay una relación significativa y positiva con respecto a la fracción polimérica concordando con lo expuesto por otros autores (Peleg et al., 1999; Brossaud et al., 2001; Vidal et al., 2003).

Según Adler et al. (2000), debido al alto número y diversidad de moléculas que inducen el gusto amargo, diversos mecanismos de transducción están involucrados en la percepción de este gusto, la cual depende de diversos factores, relativos a la composición del alimento degustado y la interacción con otras sustancias, como también a diferencias entre las personas produciendo un cierta dificultad para detectar este gusto (Lesschaeve y Noble, 2005). Según los resultados, en forma química se pudieron separar las fracciones de flavanoles de menor tamaño en los vinos, pero luego en la degustación no se pudo correlacionar de buena forma la parte analítica con la parte sensorial. Las causas de la baja correlación entre estos parámetros pudo deberse a que se trabaja con vinos, que en su composición química presentan diversas moléculas que pueden interactuar con este gusto y también a la variabilidad en cuanto a las personas que conformaban el panel y la dificultad para aislar este gusto. De acuerdo al análisis de regresión lineal entre los parámetros de aceptabilidad de los vinos y el contenido de las distintas fracciones de flavanoles, en la Tabla 4, se observa en ambos cultivares, que las relaciones entre monómeros y oligómeros de flavanol no fueron significativas con la aceptabilidad de los vinos, en cambio al observar el contenido de polímeros, se produce una relación negativa moderadamente fuerte con la aceptabilidad. El mayor contenido de polímeros de flavanol en vinos de ambos cultivares, puede producir una mayor sensación de astringencia (Vidal et al., 2003), afectando la aceptabilidad del vino (Leeschaeve y Noble, 2005; Lattey et al., 2010), lo cual se corrobora con los resultados observados en este estudio.

### **3.3. Evaluación sensorial**

En la Tabla 6 se puede apreciar los parámetros de aceptabilidad, astringencia y amargor para los vinos comerciales en estudio.

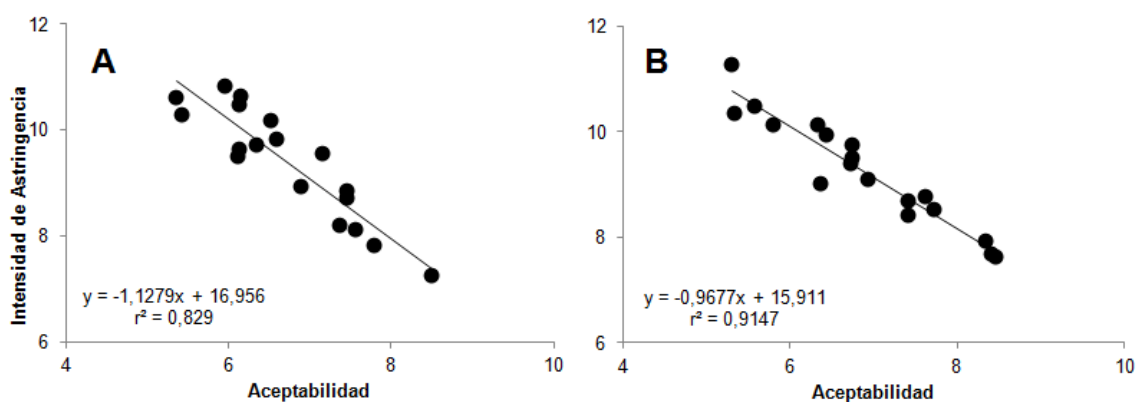
En cuanto a los parámetros sensoriales, no se observaron diferencias entre los vinos de los dos cultivares en estudio. En ambos vinos, la astringencia fue mayor que la percepción de amargor.



| <b>Tabla 6.</b> Parámetros sensoriales en vinos comerciales del cv. Cabernet Sauvignon y Merlot |                           |               |
|---|---------------------------|---------------|
|   | <b>Cabernet Sauvignon</b> | <b>Merlot</b> |
| Aceptabilidad <sup>1</sup>  | 6,7 ± 0,9 a               | 6,9 ± 1,0 a   |
| Astringencia <sup>2</sup>   | 9,4 ± 1,1 a               | 9,3 ± 1,0 a   |
| Amargor <sup>2</sup>  | 3,5 ± 0,6 a               | 4,0 ± 0,8 a   |

<sup>1</sup>Expresada como el promedio de la degustación de 68 evaluadores ± desviación estándar (n=18). <sup>2</sup>Expresado como el promedio de la degustación de 12 evaluadores ± desviación estándar (n=18). Letras distintas en una misma fila indican diferencia estadísticamente significativa según *t*-Student (*p* < 0,05).

De acuerdo a la escala utilizada para la puntuación de los vinos (Anexo I), se observa que la aceptabilidad de los vinos en ambos cultivares fue menor, lo cual pudo deberse a la mayor astringencia percibida por el panel. En cuanto al amargor percibido, este no tuvo relación con la aceptabilidad en los vinos del cv. Cabernet Sauvignon ( $r = -0,2780$ ,  $r^2 = 0,0772$ , valor  $p = 0,2640$ ); en cambio para los vinos del cv. Merlot hubo una relación negativa entre ambos parámetros ( $r = -0,5254$ ,  $r^2 = 0,2760$ , valor  $p = 0,0251$ ). Aún con lo anterior, el amargor no tuvo mayor influencia en la aceptabilidad de los vinos en ambos cultivares. Este comportamiento fue diferente en cuanto a la astringencia percibida que influyó directamente en la aceptabilidad de los vinos (Figura 2A y 2B).



**Figura 2.** Relación entre aceptabilidad e intensidad de astringencia en vinos comerciales del cv. Cabernet Sauvignon (A) y cv. Merlot (B) (n=18).

En la Figura 2, se observa claramente la alta relación existente entre la astringencia percibida mediante un panel sensorial y la aceptabilidad por parte de un panel de consumidores. Aún cuando la sensación de astringencia es importante para las sensaciones de cuerpo del vino, una excesiva astringencia de este, influye negativamente en la aceptación del vino por parte del consumidor (Lattey et al., 2010). Gran parte de las personas entrenadas en degustación de vinos o los enólogos que trabajan en bodega y que degustan una gran cantidad de vinos por día, pueden desarrollar un “paladar de bodega”, debido a que degustan vinos de similares

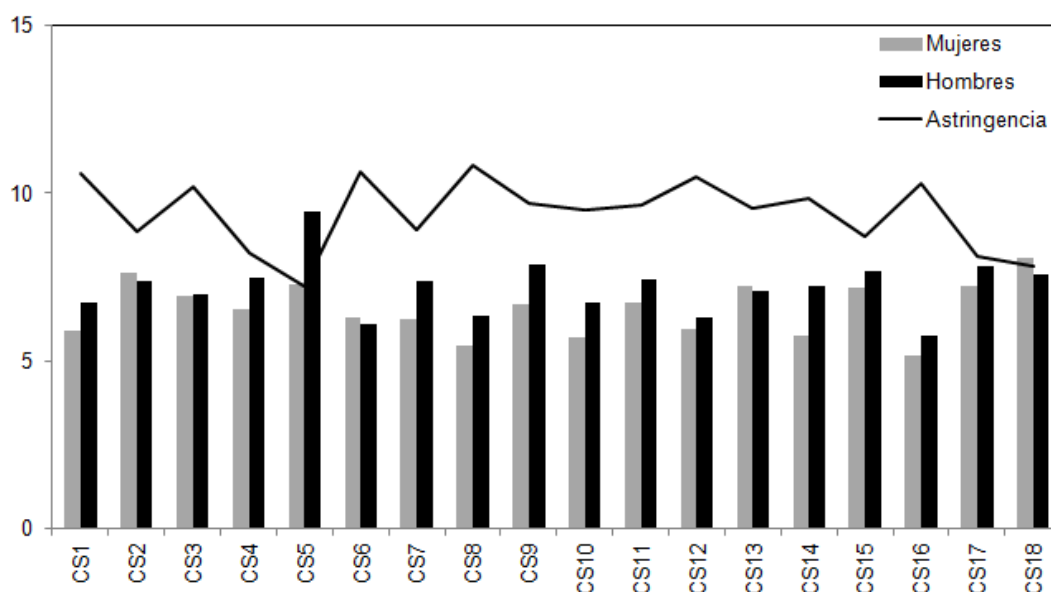
características durante su trabajo y tienden a fijarse en otros puntos que quizás para ellos son importantes, obviando características que quizás para el consumidor influyen en la aceptación final del producto (Lattey et al., 2010). Además es común observar diferencias de puntuación entre enólogos que pertenecen a bodegas diferentes o a zonas geográficas diferentes (Gawel y Godden, 2008), en vinos que quizás presentan similares características y por las preferencias que pueden tener los enólogos por algún tipo especial de vino que puede jugar un rol más importante que el nivel de conocimiento o experiencia sensorial (Frost y Noble, 2002). Por los resultados expuestos en esta investigación, la astringencia es un factor muy importante para el consumidor y la presencia excesiva de esta sensación, puede afectar la aceptación del producto final. Este punto además es importante ya que depende de la sensación que tienen personas entrenadas y con conocimiento del vino frente a personas que solo consumen vino de vez en cuando y que no tienen un conocimiento demasiado profundo del tema (Lesschaeve, 2007). Las razones anteriores además de la propia subjetividad que presenta un análisis sensorial (Valentová et al., 2002), hacen que sean necesarios métodos analíticos de medición de la astringencia que sirvan como una herramienta más a las bodegas para producir un producto que sea de fácil aceptación para el consumidor. Además, y por los resultados obtenidos en forma química, claramente la concentración de proantocianidinas y el contenido de polímeros inciden en la astringencia percibida mediante el panel sensorial y por ende incidirán en la aceptabilidad de los consumidores.

Aún cuando en la aceptación de un vino, inciden diversos factores, que determinan la decisión de compra del consumidor, desde la etiqueta, forma de la botella, color, precio, calidad, protección al medio ambiente, conocimiento de la marca, entre otros (Orth, 2005; Barber y Almanza, 2006), la excesiva astringencia o amargor del vino pueden condicionar una menor aceptabilidad por parte de los consumidores, especialmente en aquellos que no presentan un conocimiento en profundidad del vino y que aprecian mejor vinos más fáciles de beber (Lattey et al., 2010). Es en este punto en donde, se debe conocer como es la aceptación de un producto entre consumidores diferentes, como hombres y mujeres que claramente pueden diferir en sus gustos y preferencias por determinados tipos de vino. En cuanto a la aceptabilidad de hombres y mujeres, se producen diferencias en los vinos evaluados, lo cual se puede apreciar en la Figura 3 y Figura 4.

En la Figura 3, se observa que las mujeres presentan una menor aceptabilidad que los hombres en vinos astringentes, produciéndose diferencias en la mayoría de los vinos evaluados ( $p < 0,05$ ). Un ejemplo claro es en el vino CS5 que presenta una menor percepción de astringencia, pero en este caso fueron los hombres los que

calificaron con una mayor aceptabilidad el vino, en comparación con las mujeres. En forma general se observa que vinos más astringentes son más aceptados por hombres que por mujeres.

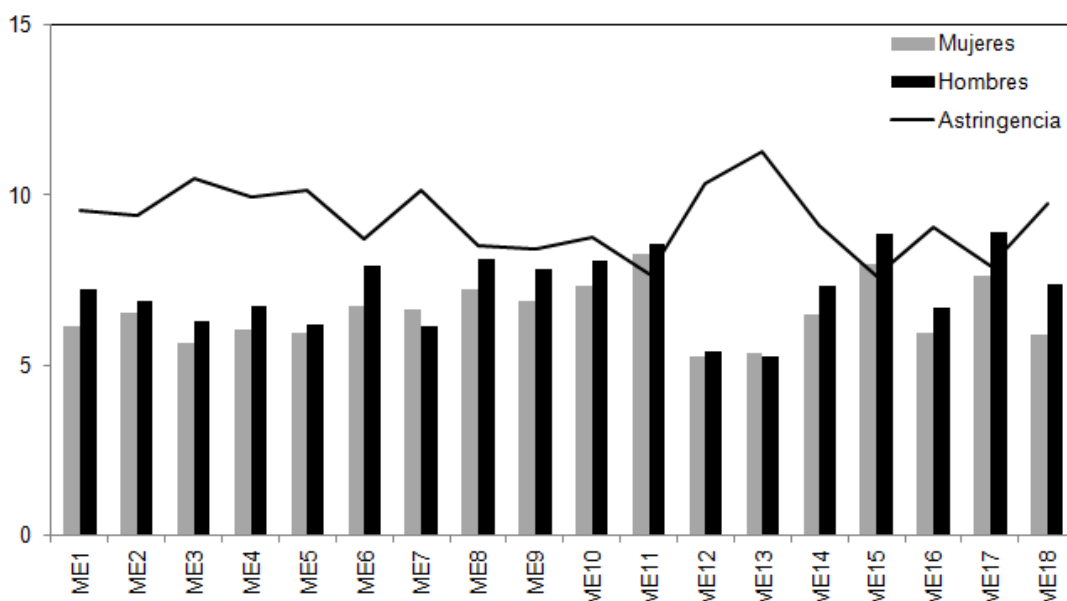
En la Figura 4, se observa un comportamiento parecido a lo sucedido en vinos del cv. Cabernet Sauvignon, en donde las mujeres presentan una menor aceptabilidad que los hombres en vinos astringentes, aunque en este caso, estas diferencias son menores que lo sucedido con los vinos del cv. Cabernet Sauvignon. Como ejemplo se puede observar la puntuación en los vinos del cv. Merlot, M12 y M13, que presentaron una mayor astringencia pero fueron calificados en forma similar en cuanto a su aceptabilidad.



**Figura 3.** Aceptabilidad de hombres (n=39) y mujeres (n=29) *versus* intensidad de astringencia en vinos comerciales del cv. Cabernet Sauvignon.

Esta diferencia de género puede deberse a diversos factores tanto fisiológicos como demográficos. En un estudio llevado a cabo por Johnson y Bastian (2007), en consumidores australianos de vinos y la relación existente entre el nivel de conocimiento y su conducta de compra y consumo de vinos, se produjeron diferencias entre hombres y mujeres, en donde los hombres presentaron un nivel de conocimiento de los vinos mayor que las mujeres.

Claramente, estas diferencias se debieron a que los hombres compran, gastan y consumen más botellas de vino, que las mujeres. Este mayor consumo se puede traducir en que los hombres consumen diferentes tipos de vinos, que pueden presentar diferencias en cuanto a sus características organolépticas. Esta amplia gama de vinos degustados, permite degustar vinos con diferentes tipos de astringencia, ampliando el conocimiento del degustador de vinos.



**Figura 4.** Aceptabilidad de hombres (n=39) y mujeres (n=29) versus intensidad de astringencia en vinos comerciales del cv. Merlot.

Es así que vinos de un valor comercial más alto, presentan un mayor contenido de proantocianidinas, lo cual puede producir una mayor sensación de astringencia (Mercurio et al., 2010; Fanzone et al., 2012a), que en este caso, no es una causa de rechazo sino que más bien se trata de una sensación debida a una mayor presencia de flavanoles, lo cual solo un público conocedor de vinos puede aceptar. En cambio, la mayor sensación de astringencia en un público no conocedor de vinos, influye en una menor aceptabilidad del producto. La menor aceptabilidad a vinos más astringentes, puede deberse también a los hábitos de consumo de las mujeres, que prefieren vinos espumosos, vinos blancos y vinos rosé, que son vinos menos astringentes que los vinos tintos (Johnson y Bastian, 2007). Aún con estas diferencias, claramente se observó que la sensación de astringencia de un vino, es uno de los parámetros sensoriales más importantes, que determina en gran manera la aceptación o rechazo de un producto. En forma general, se correlacionó de buena forma la composición química del vino, en cuanto a la concentración de proantocianidinas totales y el contenido de polímeros de flavanol con la aceptabilidad medida por los consumidores, mostrando que a mayor concentración de proantocianidinas y polímeros de flavanol, la sensación de astringencia era mayor y la aceptabilidad era menor, siendo diferente entre hombres y mujeres. Estos resultados entregan una información valiosa a los productores de vinos, dando nuevas herramientas para aumentar la calidad de los vinos poniendo especial énfasis en vinos de características definidas que sean del gusto general de los consumidores tanto hombres como mujeres.

## **Capítulo 3:**

# **Factores enológicos y su influencia sobre la composición de flavanoles en vinos blancos y tintos**

**Subcapítulo III.1:** Efecto de diferentes tratamientos sobre la composición fenólica de vinos Sauvignon Blanc.

**Subcapítulo III.2:** Mezcla de vinos tintos y su efecto sobre la composición fenólica y características sensoriales.

La importancia de las labores enológicas se debe principalmente al efecto que estas labores tienen sobre los vinos blancos y tintos, en cuanto a la concentración de compuestos fenólicos. Gran parte de las labores efectuadas en vinos blancos, como las maceraciones, prensados, entre otros, son importantes para extraer aromas y sabores propios de la uva, pero estas labores también pueden extraer compuestos fenólicos. Por otra parte, la mezcla de vinos se utiliza para mejorar ciertas cualidades olfativas y gustativas, pero junto con esto también se puede producir un cambio en la composición química de los compuestos fenólicos, produciendo diferencias organolépticas de astringencia y amargor.

Con el propósito de conocer como ciertos tratamientos enológicos en vinos blancos y tintos inciden sobre la composición fenólica de estos, es que en este tercer capítulo se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Determinar el efecto de diversas labores enológicas sobre la composición fenólica de vinos blancos del cv. Sauvignon Blanc.
- ✓ Determinar el efecto de la mezcla de vinos de los cvs. Merlot, Carménère y Cabernet Franc con un vino del cv. Cabernet Sauvignon sobre la composición fenólica y características sensoriales del vino resultante.

Los resultados obtenidos, tendientes al cumplimiento de este objetivo, se describen en los siguientes subcapítulos:

Subcapítulo III.1: Efecto de diferentes tratamientos enológicos sobre la composición fenólica de vinos Sauvignon Blanc.

Subcapítulo III.2: Mezcla de vinos tintos y su efecto sobre la composición fenólica y características sensoriales.

## **Subcapítulo III.1:**

### **Efecto de diferentes tratamientos enológicos sobre la composición fenólica de vinos Sauvignon Blanc**

## Effect of Inert Gas and Prefermentative Treatment with polyvinylpolypyrrolidone on the Phenolic composition of Chilean Sauvignon Blanc wines

Alejandro Cáceres-Mella<sup>1</sup>, Álvaro Peña-Neira<sup>1</sup>, Jenny Parraguez<sup>1</sup>, Remigio López-Solís<sup>2</sup>, V. Felipe Laurie<sup>3</sup> and Joan Miquel Canals<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Casilla 1004, 8820808 Santiago, Chile. <sup>2</sup>Programa de Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, 8380453 Santiago, Chile. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, 2 Norte 685, Talca, Chile. <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología, Universidad Rovira I Virgili, C/ Marce.li Domingo s/n. 43007. Tarragona, Spain.

Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93 (8), 1928-1934

**BACKGROUND:** Sauvignon blanc wines are produced under a wide variety of winemaking conditions, some of which include different fruit-ripening levels, cold soaks and the use of fining agents and inert gases. Anecdotal evidence suggests that sensory variations among these wines may have to do with their phenolic composition and concentration. Therefore the aim of this work was to study the effects of different winemaking conditions typically used in Chile on the phenolic composition and concentration of Sauvignon blanc wines.

**RESULTS:** The use of an inert gas (CO<sub>2</sub>) in winemaking produced differences in the proportion of proanthocyanidin fractions. A higher concentration of flavan-3-ol monomers resulted from winemaking in the presence of inert gas. This condition also produced a higher content of total phenols and low-molecular-weight phenolic compounds. Low doses of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) in the prefermentative treatments produced wines with a higher content of phenolic compounds. Under these conditions a higher content of polymeric proanthocyanidins was observed.

**CONCLUSION:** Different winemaking conditions modified the concentration and proportion of proanthocyanidin fractions and the global phenolic composition of the resulting white wines. This should be taken into account by the wineries producing these wines.

**Key words:** Sauvignon blanc, phenolic compounds, proanthocyanidins, winemaking, PVPP, inert gases.



## INTRODUCTION

Sauvignon blanc is one of the most important white wine varieties grown in Chile, with approximately 13277 ha planted.<sup>1</sup> Some of the characteristics of this variety include its aromatic intensity, freshness, distinctive clarity and brightness.<sup>2</sup> Phenolic compounds contribute to wine sensory characteristics such as color, astringency and bitterness and have been associated with beneficial health effects derived from moderate wine consumption.<sup>3</sup> Many practices that can affect the chemical composition of wines (e.g., harvest time and prefermentative maceration) and winemaking techniques intended to protect against oxygen exposure are often considered essential for achieving a quality product.<sup>4-7</sup> The harvest date of the fruit is important because the accumulation and extractability of some phenolic compounds change as the grapes ripen.<sup>8-12</sup> The absence of maceration before fermentation and practices such as pressing of whole clusters are said to produce white wines with greater freshness, mainly because of the higher acidity and the lower concentration of phenols obtained.<sup>13</sup> Prefermentative maceration of must, especially with skins, is used to increase the aromatic intensity of white wines.<sup>5,6</sup> However, the enrichment of the must in phenolic compounds, particularly flavanols, may lead to an increase in browning and changes in astringency and bitterness.<sup>14-16</sup> Indeed, the sensitivity of white wines to browning is related to their concentration in polyphenols. This phenomenon is perhaps one of the biggest problems in the marketing of these wines, changing them in a few months from a typical pale yellow color and brightness to more brown tones, with alterations in the organoleptic characteristics that lead to consumer rejection.<sup>17,18</sup>

Some examples of techniques to prevent and/or decrease the tendency to brown are softer pressing, must clarification, the use of inert gases and fining with agents that allow removal of phenols (e.g., polyvinylpolypyrrolidone, PVPP).<sup>19</sup> Currently, there is a lack of studies on the effect of treatments that modify the phenolic concentration and composition of wines. Also, anecdotal evidence suggests that sensory variations among these wines may have to do with their phenolic composition and concentration. Therefore the aim of this work was to study the effect of different winemaking treatments on the phenolic composition of Sauvignon blanc wines.

## EXPERIMENTAL

**Materials.** Standards of gallic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, caftaric acid, quercetin, (+)-catechin and (-)-epicatechin were purchased

from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Polyethylene membranes of 0.45 and 0.22  $\mu\text{m}$  pore size were acquired from EMD Millipore (Billerica, MA, USA). Vanillin (99%), ethyl acetate, diethyl ether, sodium hydroxide, acetic acid, sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), ethanol, hydrochloric acid, high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade acetonitrile and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All reagents were analytical grade or higher. Sep-Pak Plus  $\text{tC}_{18}$  environmental cartridges (900 mg) and Sep-Pak Plus Short  $\text{tC}_{18}$  cartridges (400 mg) were obtained from Waters (Milford, CA, USA). Ultrapure water was obtained from a Purelab Ultra MK2 purification system (Helga, St Albans, UK). Phosphate buffer (pH 7) was acquired from Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, USA).  $\text{N}_2$  and  $\text{CO}_2$  gas (inert gas, IG) was supplied by Indura S.A (Santiago, Chile).

**Instrumentation.** pH was measured using an 8417N pH meter (Hanna Instrument, Smithfield, RI, USA). Phenolic analyses were performed with an HPLC 1100 Series system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) consisting of a G1315B photodiode array detector (DAD), a QuatPump G1311A quaternary pump, a G1379A degasser and a G1329A autosampler. A reverse phase Nova-Pack  $\text{C}_{18}$  column (4  $\mu\text{m}$ , 3.9 mm i.d. x 300 mm; Waters) was used for HPLC-DAD analysis of individual phenolic compounds. Absorbances were measured using a UV/VIS 1700 Pharmaspec UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan).

**Grapes and experimental vineyard.** Grapes were harvested in 2009 from a self-rooted *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc vineyard planted in 1999 in the Maipo Valley (central region of Chile). The vines were planted at a spacing of 2 m between the vines and 2 m between rows, equivalent to a vine density of 2500 vines  $\text{ha}^{-1}$ . The row orientation was east-west. The vines were pruned to 10 shoots  $\text{m}^{-1}$  on a bilateral cordon and trained to a vertical shoot-positioning (VSP) system. The cordon wire was 90 cm above ground, with two sets of dual shoot-positioning wires fixed at 135 and 180 cm above ground. A drip system provided supplemental irrigation. All cultural practices were consistent with those for white wine varieties in the Maipo Valley of Chile.

**This work describes two independent assays.**

**Assay 1.** Effect of winemaking with presence (IG [+]) *versus* absence (IG [-]) of inert gas on phenolic composition of Sauvignon blanc wines.

For winemaking in the presence of inert gas (IG [+]), the mechanically harvested grapes were received in the cellar, sulfited with 30 mg L<sup>-1</sup> potassium metabisulfite, de-stemmed, macerated for 8 h in a PF 350 pneumatic press of 35000 L capacity (Della Toffola, Treviso, Italy) and then pressed. From the pneumatic press, the must was drained into an intermediate tank for cold gravity settling and further processing. All steps were performed in an environment where oxygen exposure was reduced by using CO<sub>2</sub> (dry ice or gas) in the tanks, press and pumps. PVPP was added to the must at 80 g hL<sup>-1</sup> in order to reduce the concentration of phenols extracted during maceration. When a turbidity of 60 NTU as measured with a 1100P turbidimeter (Hach, Loveland, CO, USA) was reached, the must was fermented in three stainless steel tanks, each of 1000 L capacity, using a yeast inoculum of 25 g hL<sup>-1</sup> (*Saccharomyces cerevisiae* (var. *bayanus*) EC1118 yeast strain). The fermentation process was kept at a temperature of 11-13 °C for approximately 16-18 days. At the end of the alcoholic fermentation, when fermentable sugars reached less than 2 g L<sup>-1</sup>, the wine was transferred to another stainless steel tanks for stabilization under a protected inert gas environment (CO<sub>2</sub>). Finally, the wine was finely filtered and machined-bottled after adjusting the free SO<sub>2</sub> level to 30 mg L<sup>-1</sup>. The same winemaking procedure, with the exception of the use of inert gas during the whole process, was used for the treatment IG [-].

**Assay 2.** Effect of different prefermentative treatments on phenolic composition of Sauvignon blanc wines.

Because the traditional method of Sauvignon blanc wine production involves the use of inert gas as described in assay 1 (IG [+]), also known as reductive vinification, various modifications in the prefermentation stage of the traditional method were introduced in assay 2. The alternative treatments consisted of early harvest of grapes, direct pressing or the use of a lower dose of fining agent, as follows. The control treatment (T0), corresponding to IG [+], was compared with: T1, grapes harvested 10 days before those of T0; T2, wines elaborated without maceration of de-stemmed grapes in the press (direct pressing); T3, musts treated with a low dose of PVPP (10 g hL<sup>-1</sup>). In all cases, three replicates of 1000 L were used for each treatment.

**Chemical and spectrophotometric characterization of wines.** Titratable acidity was determined by titration with 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH to an end-point pH of 8.2 and expressed as g tartaric acid L<sup>-1</sup>. pH was measured using a pH meter. Total phenolic content was

determined by UV absorbance at 280 nm using gallic acid as a standard and expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) L<sup>-1</sup>.<sup>20</sup> Color intensity was determined by visible absorbance at 420 nm and expressed as absorbance units (a.u.).<sup>20</sup>

**Fractionation of proanthocyanidins by tC<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges.** The white wine samples were fractionated using tC<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges according to the method described by Sun *et al.*<sup>21</sup> Briefly, 50 mL of white wine sample was concentrated to dryness in a rotary evaporator at <30 °C. The residue was dissolved in 20 mL of 67 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7). The resulting solution was adjusted to pH 7 with either NaOH or HCl, as necessary. Two tC<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges were assembled (top, Sep-Pak Plus tC<sub>18</sub> environmental cartridge (900 mg); bottom, Sep-Pak Plus Short tC<sub>18</sub> cartridge (400 mg)) and conditioned sequentially with methanol (10 mL), distilled water (2 x 10 mL) and phosphate buffer (pH 7, 10 mL). The samples were passed through the cartridges at a flow rate no higher than 2 mL min<sup>-1</sup> and the phenolic acids were then eliminated by elution with 10 mL of 67 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer at pH 7. The cartridges were dried with N<sub>2</sub> gas and eluted sequentially with 25 mL of ethyl acetate (fractions FI and FII, containing monomeric and oligomeric flavan-3-ols respectively) and 15 mL of methanol (fraction FIII, containing polymeric proanthocyanidins). The ethyl acetate eluate was evaporated to dryness under vacuum, redissolved in 3 mL of 67 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7), and reloaded onto the same series of cartridges that had been conditioned again as described above. The cartridges were dried with N<sub>2</sub> gas and eluted sequentially with 25 mL of diethyl ether (fraction FI, containing monomers) and 15 mL of methanol (fraction FII, containing oligomers). Fractions FI, FII, and FIII were evaporated to dryness under vacuum, and redissolved in 3 mL of methanol. The total content of flavan-3-ols in each fraction was determined by the vanillin assay described by Sun *et al.*<sup>22</sup>

**Determination of total content of flavan-3-ols.** The vanillin assay was performed as described by Sun *et al.*<sup>22</sup> A 2.5 mL aliquot of 1:3 (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/methanol solution and a 2.5 mL aliquot of 10 g L<sup>-1</sup> vanillin in methanol were mixed with 1 mL of sample. The tubes were incubated at 30 °C for either 15 min (FI fraction) or a period of time long enough to allow maximal reaction (FII and FIII fractions). The absorbance was read at 500 nm. A blank was prepared by replacing the vanillin solution in the reaction mix with methanol. The absorbance of the blank was subtracted from the absorbance of the corresponding-containing sample. Quantification was performed using standard curves

prepared from monomers (for FI), oligomers (for FII), and polymers (for FIII) of flavan-3-ols isolated from grape seeds, as previously described.<sup>22</sup>

**HPLC analysis of low-molecular-weight phenolic compounds.** White wine samples (50 mL) were extracted with diethyl ether (3 x 20 mL) and ethyl acetate (3 x 20 mL). The resulting extracts were evaporated to dryness at 30 °C, dissolved in 2 mL of 1:1 (v:v) methanol/water, and membrane-filtered (0.22 µm pore size).<sup>23</sup> Aliquots (30 µL) of the final solution were subjected to reverse phase chromatographic separation at 20 °C using a Nova-Pack C<sub>18</sub> column. The photodiode array detector was set from 210 to 360 nm. Two mobile phases were used: A, water/acetic acid (98:2 v/v); B, water/acetonitrile/acetic acid (78:20:2 v/v/v). A gradient was applied at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup> from 0 to 55 min and 1.2 mL min<sup>-1</sup> from 55 to 90 min as follows: 100-20% A from 0 to 55 min, 20-10% A from 55 to 57 min, 10-0% A from 57 to 90 min. Each major peak in the HPLC chromatograms was characterized by both the retention time and the absorption spectrum (from 210 to 360 nm). Procyanidin dimers B1 and B3 and quercetin glycosides, for which standards were unavailable, were assigned by retention time and spectral parameters according to Peña-Neira *et al.*<sup>24,25</sup> Quantitative determinations were made using the external standard method with commercial standards. Calibration curves were produced by injecting standard solutions, under the same conditions and range of concentrations as those used in the analysis of samples. Compounds for which no standards were available were quantified by using standard curves for (+)-catechin (procyanidin dimer, procyanidin B1 and procyanidin B3) and quercetin (quercetin-3-galactoside and quercetin-3-glucoside). All the qualitative and quantitative analyses of phenolic composition (including extraction) were performed in triplicate.<sup>23</sup>

**Statistical analysis.** The two assays were evaluated independently. In the first assay, to study the effect of using inert gas in winemaking on the phenolic composition of wines from cv. Sauvignon blanc, the results were analyzed by Student's *t*-test with a significance level of 95% ( $P < 0.05$ ). In the second assay, to analyse the effect of modifying the phenolic potential of the must before fermentation, the different treatments were compared with the control using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's honest significant difference (HSD) test at a significance level of 95%. All data were analyzed using Statgraphics Centurion Version XV (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

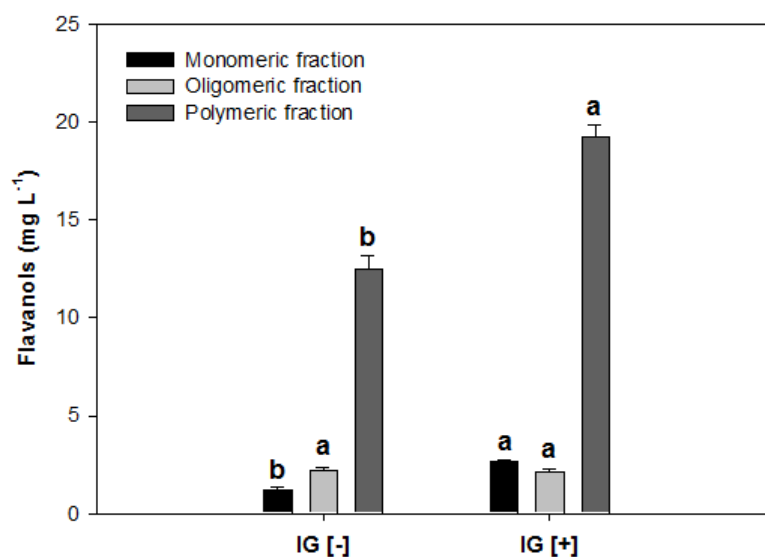
**Assay 1.** Effect of winemaking with presence (IG [+]) *versus* absence (IG [-]) of inert gas on phenolic composition of Sauvignon blanc wine.

Table 1 shows the parameters of titratable acidity, pH and phenolic composition of the wine samples. These parameters were in accordance with data from white wines in previous studies.<sup>5,6,26</sup> There was a slightly higher content of total phenols in the wines produced in the presence of inert gas. For colour, significant differences were observed, with higher values in wines elaborated in the presence of inert gas. With regard to treatment IG [-], the presence of oxygen could cause the loss of phenolic compounds, probably due to enzymes that degrade these compounds before fermentation.<sup>15,16,27,28</sup> This result was corroborated in this study. Although this method is convenient to avoid browning and bitterness in the wine attributable to phenolic compounds, it is important to keep in mind that excessive oxidation in winemaking may also cause a loss of aromatic compounds, which could decrease the positive sensory quality of white wines.<sup>7,26,29</sup>

| Parameter   | IG [-]         | IG [+]         |
|---|----------------|----------------|
| Total phenols (mg GAE L <sup>-1</sup> )               | 198.35 ± 7.66b | 233.51 ± 5.39a |
| Titratable acidity (g tartaric acid L <sup>-1</sup> ) | 6.95 ± 0.09a   | 6.65 ± 0.23a   |
| pH  | 3.41 ± 0.02a   | 3.42 ± 0.02a   |
| Colour (a.u.)   | 0.052 ± 0.00b  | 0.056 ± 0.00a  |

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=3). For each parameter, different letters denote significant difference between samples ( $P < 0.05$ , Student's t-test). GAE: gallic acid equivalent; a.u.: absorbance unit.

Figure 1 shows the monomeric, oligomeric and polymeric proanthocyanidin fractions. Winemaking in presence of inert gas resulted in wines with a twofold higher concentration of the monomeric fraction of flavan-3-ols compared with winemaking in the absence of inert gas (IG [-]: 1.25 ± 0.11, IG [+]: 2.66 ± 0.06 mg L<sup>-1</sup>). Higher concentrations of monomers may increase bitterness, which is undesirable in white wines.<sup>29</sup> On the contrary, wines elaborated in the presence of inert gas had a significantly higher concentration of polymers (IG [-] 12.51 mg L<sup>-1</sup>, IG [+] 19.26 mg L<sup>-1</sup>). Using winemaking conditions in presence of oxygen, one would expect a higher concentration of polymerised flavanols owing to a higher presence of acetaldehyde, which could act as a bridge in flavanol polymerisation reactions.<sup>31</sup>



**Figure 1.** Monomeric, oligomeric and polymeric proanthocyanidin fractions in wines produced in presence (IG [+]) or absence (IG [-]) of inert gas during winemaking. For each fraction, different letters denote significant difference between samples ( $P < 0.05$ , Student's t-test).

However, in this case, oxygen supply resulted in excessive degradation and oxidation of those compounds, thus decreasing their concentrations. In the absence of inert gas, decreases in the monomeric and polymeric fractions were 53 and 35% respectively, with no effect on the oligomeric fraction compared with winemaking in presence of inert gas. As has been reported in red wines<sup>32,33</sup> in the case of wines elaborated in the absence of inert gases, the proportion of oligomers increased with the degree of polymerisation (monomers 7.8%, oligomers 13.9%, polymers: 78.3%). This behaviour differs in wines elaborated in the presence of inert gas (monomers 11.0%, oligomers 9.0%, polymers 80.0%). This analysis showed that different winemaking conditions yields products with different concentrations and proportions of proanthocyanidins. This result is interesting from the organoleptic point of view, because the observed differences in the various fractions of flavan-3-ols of wines elaborated either in the presence or absence of CO<sub>2</sub> could result in differences in mouthfeel properties that should be of interest to wineries.<sup>14,30</sup>

Table 2 shows the content of the major low-molecular-weight phenols in Sauvignon blanc white wines.

**Table 2.** Low molecular weight phenolic compounds in wines produced in presence (IG [+]) or absence (IG [-]) of inert gas during winemaking.

| Compound (mg L <sup>-1</sup> )  | IG [-]       | IG [+]       |
|---------------------------------|--------------|--------------|
| <i>Non-flavonoids phenolics</i> |              |              |
| Hydroxybenzoic acids            |              |              |
| Gallic acid                     | 0.65 ± 0.02b | 0.77 ± 0.06a |
| Protocatechuic acid             | 0.16 ± 0.04b | 0.32 ± 0.03a |
| Hydroxycinnamic acids           |              |              |
| Ferulic acid                    | 0.06 ± 0.02a | 0.09 ± 0.01a |
| Caffeic acid                    | 1.00 ± 0.13b | 1.28 ± 0.11a |
| <i>cis</i> -Cafataric acid      | 2.21 ± 0.23a | 2.59 ± 0.23a |
| <i>trans</i> -Cafataric acid    | 1.63 ± 0.02a | 1.84 ± 0.29a |
| <i>cis-p</i> -Coumaric acid     | 0.40 ± 0.05b | 0.56 ± 0.06a |
| <i>trans-p</i> -Coumaric acid   | 0.10 ± 0.01a | 0.13 ± 0.02a |
| <i>Flavonoids phenolics</i>     |              |              |
| Flavan-3-ols                    |              |              |
| (+)-catechin                    | 1.14 ± 0.15b | 1.53 ± 0.18a |
| (-)-epicatechin                 | 1.85 ± 0.25a | 1.58 ± 0.79a |
| Procyanidin B3                  | 0.31 ± 0.00a | 0.31 ± 0.01a |
| Procyanidin B1                  | 0.44 ± 0.09a | 0.43 ± 0.03a |
| Procyanidin dimer               | 0.23 ± 0.01a | 0.28 ± 0.04a |
| Flavonols                       |              |              |
| Quercetin-3-galactoside         | 0.04 ± 0.01a | 0.03 ± 0.00a |
| Quercetin-3-glucoside           | 0.07 ± 0.01b | 0.12 ± 0.01a |

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=3). For each compound, different letters denote significant difference between samples ( $P < 0.05$ , Student's t-test).

The hydroxybenzoic acids quantified were gallic and protocatechuic acids. The hydroxycinnamic acids quantified were ferulic, caffeic, *cis*-caftaric, *trans*-caftaric, *cis-p*-coumaric and *trans-p*-coumaric acids. The flavanols quantified were (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin B3, procyanidin B1 and procyanidin dimer. The flavonols identified and quantified were quercetin-3-galactoside and quercetin-3-glucoside. All identified compounds were detected in all wines used in this study. Winemaking in the presence of inert gas was associated with slightly higher contents of gallic acid, protocatechuic acid, caffeic acid and *cis-p*-coumaric acid. The content of protocatechuic acid was about twofold that observed in wines produced in the absence of inert gas. Regarding flavanols, winemaking in the presence of inert gas was associated with a slightly higher content of (+)-catechin. Quercetin-3-glucoside presented a slightly higher content in wines produced in presence of inert gas. As previously seen regarding other parameters, pooled data in these wines showed a higher content of the monomeric fraction in wines from treatment IG [+] (Fig. 1) that could be supported by a greater level of monomers determined by HPLC (Table 2). Previous studies have shown a relationship between phenolic compounds, such as flavanols and phenolic acids and the varietal aroma of the grape. Several compounds,



such as (+)-catechin and caffeic acid modify the perception of some varietal aromas in Sauvignon blanc, thus suppressing, accentuating or showing little effect on the perception of the aroma compounds.<sup>34</sup> The higher concentration of polyphenols observed in the treatment IG [+] may cause a change in the perception of aromatic compounds, although these results need to be evaluated for the prevailing conditions in Chile. The lower concentration of phenolic compounds observed in treatment IG [-] has been also reported by other authors.<sup>29,35</sup> Oxidation may be important to reduce the initial content of polyphenols, thus preventing undesirable browning in white wines.<sup>17,18</sup> Winemaking in the presence of inert gases (reductive condition) is used in a large number of wineries in Chile to adequately preserve the varietal aromas of the cultivar by preventing oxidation of those compounds, although the high concentration of easily oxidisable polyphenols could cause browning and loss of varietal aromas.<sup>26</sup> The absence of inert gases in winemaking may produce less aromatic and lower-quality wines, although the product may be more resistant to browning.

**Assay 2.** Effect of different prefermentative treatments on phenolic composition of Sauvignon blanc wines.

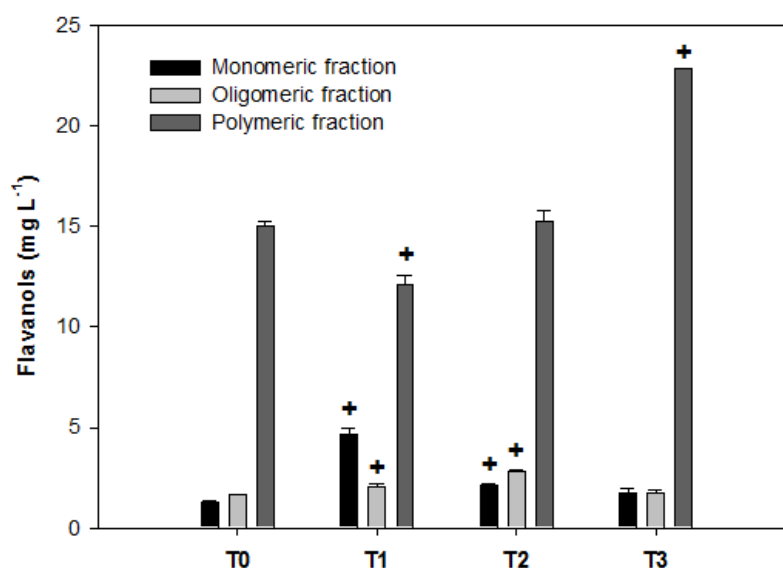
Table 3 shows the parameters of titratable acidity, pH and phenolic composition of the wines produced after using different prefermentative treatments.

| <b>Table 3.</b> General analytical parameters in wines with different prefermentative treatments   |                |                |                |                |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Parameter  | T0             | T1             | T2             | T3             |
| Total phenols (mg GAE L <sup>-1</sup> )  | 152.52 ± 13.03 | 191.13 ± 4.44+ | 141.09 ± 16.90 | 252.39 ± 7.43+ |
| Titratable acidity (g tartaric acid L <sup>-1</sup> )  | 7.20 ± 0.00    | 7.40 ± 0.31    | 7.40 ± 0.17    | 6.05 ± 0.09+   |
| pH   | 3.17 ± 0.01    | 3.22 ± 0.01+   | 3.16 ± 0.01    | 3.38 ± 0.02+   |
| Colour (a.u.)  | 0.045 ± 0.00   | 0.044 ± 0.00+  | 0.042 ± 0.00+  | 0.061 ± 0.00+  |
| Values are expressed as mean ± standard deviation (n=3). For each parameter, plus signs (+) denote significant difference compared with T0 value ( <i>P</i> < 0.05, Tukey's HSD test). T0, control; T1, early harvest of grapes; T2, direct pressing of grapes; T3, low dose of PVPP. GAE, gallic acid equivalent; a.u., absorbance units. |                |                |                |                |

Treatment T3 resulted in wine with a lower acidity than the control (T0), while treatments T1 and T3 resulted in wines with a pH value slightly higher than the control (T0). Although in this study the use of a lower dose of PVPP produced a decrease in acidity and an increase in pH, in previous studies by other authors the use of PVPP in the production of white wines did not result in changes in the chemical properties of the wines.<sup>13,19</sup> The highest contents of total phenols were observed in wines produced after

treatments T1 and T3 compared with the control. Thus it is clear that the group treated with the lower dose of PVPP (T3) displayed the highest content of total phenols. These results also agree with results reported by others.<sup>6,18,19,26</sup> Many authors have reported that the fining agent PVPP adsorbs phenolic compounds, thus causing binding and removal of the phenols.<sup>13,19</sup> This process appears to occur in the control treatment using a higher dose of PVPP (80 g hL<sup>-1</sup>) compared to that of treatment T3 (10 g hL<sup>-1</sup>), because wines resulting from treatment T3 have a higher content of phenols. Regarding this last result, some Chilean commercial wineries using PVPP to reduce wine browning have also observed a reduction in the aromatic intensity of wines, which is a very important parameter for Sauvignon blanc wines. In that case, lower doses of PVPP used to preserve wine aromas, were ineffective in removing phenolic compounds. The curve of the accumulation of tannins in red grapes decreases from veraison to maturity,<sup>36</sup> which could explain the lower content of total phenols in the control condition compared with treatment T1, where harvest took place 10 days earlier than the control. Overripening of grapes and a hot climate could cause degradation of a number of compounds such as acids, sugars or phenolics, which may also explain our results. This finding could be especially relevant in the case of grapes from warmer climatic conditions, such as the Maipo Valley, a warm valley that specialises in producing high-quality red wines.<sup>33,37</sup> With regard to colour, treatment T3 resulted in wines with a slightly higher colour than the control condition. The importance of fining treatments and an appropriate date of grape harvest has been demonstrated by previous results. Fining products such as PVPP and an adequate grape maturity are important for decreasing the phenolic content that may cause problems in white wines, including excessive bitterness and astringency or browning reactions due to aeration.<sup>15,16,19,38</sup>

The proportion of the monomeric, oligomeric and polymeric fractions of proanthocyanidins with respect to the different prefermentative treatments is shown in Fig. 2. The content of monomeric flavan-3-ols shows that the early harvest treatment (T1) resulted in wines with a higher concentration of monomers, approximately four times higher than the control (T1 4.64 ± 0.33 *versus* T0 1.27 ± 0.06 mg L<sup>-1</sup>). Treatment T2 also resulted in wines with a slightly higher content of monomers compared with the control. Wines elaborated from early-harvest grapes contained more monomeric flavan-3-ols, which decreased with ripening.<sup>39</sup> This result was corroborated by measuring the amount of monomeric flavan-3-ols in wines elaborated from grapes harvested approximately 10 days later (control).



**Figure 2.** Monomeric, oligomeric and polymeric proanthocyanidin fractions in wines with different prefermentative treatments: T0, control; T1, early harvest of grapes; T2, direct pressing of grapes; T3, low dose of PVPP. For each fraction, plus signs (+) denote significant difference compared with T0 value ( $P < 0.05$ , Tukey's HSD test).

In this sense, ripening at commercial harvest (T0) was associated with a decrease in the concentration of monomeric flavan-3-ols, which could result in a decrease of bitterness of white wines.<sup>30</sup> In the case of the oligomeric flavan-3-ols, wines produced after treatments T1 and T2 showed slightly higher contents ( $2.01 \pm 0.20 \text{ mg L}^{-1}$  and  $2.80 \pm 0.08 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively) compared with the control ( $1.67 \pm 0.00 \text{ mg L}^{-1}$ ). After treatment T3 the resulting wine contained a higher concentration ( $22.79 \pm 0.05 \text{ mg L}^{-1}$ ) of polymeric flavan-3-ols whereas after treatment T1 the corresponding wine showed a slightly lower content of these flavan-3-ols compared with the control. After treatments T0 and T1, there was an increase in the content of polymeric flavan-3-ols and a decrease in the content of monomeric flavan-3-ols as a result of tannin polymerisation during ripening.<sup>12,40</sup> By comparing the control treatment with the treatment with a lower dose of PVPP (T3), it was interesting to observe that treatment T3 resulted in wines with a higher content of polymeric flavan-3-ols. This result is consistent with the observation that PVPP can bind small phenols, such as monomeric and oligomeric flavan-3-ols.<sup>19,38</sup>

Table 4 shows the contents of the major low-molecular-weight phenols in Sauvignon blanc white wines made using different prefermentative treatments.

**Table 4.** Low-molecular-weight phenolic compounds in wines with different prefermentative treatments

| Compounds (mg L <sup>-1</sup> ) | T0          | T1           | T2           | T3           |
|---------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>Non-flavonoids phenolics</i> |             |              |              |              |
| Hydroxybenzoic acids            |             |              |              |              |
| Gallic acid                     | 0.55 ± 0.01 | 0.94 ± 0.05+ | 1.02 ± 0.02+ | 0.66 ± 0.03+ |
| Protocatechuic acid             | 0.13 ± 0.04 | 0.14 ± 0.01  | 0.10 ± 0.01  | 2.22 ± 0.13+ |
| Hydroxycinnamic acids           |             |              |              |              |
| Ferulic acid                    | 0.03 ± 0.01 | 0.10 ± 0.00+ | 0.10 ± 0.01+ | 0.27 ± 0.01+ |
| Caffeic acid                    | 0.40 ± 0.06 | ND           | ND           | 2.61 ± 0.10  |
| <i>cis</i> -Caftaric acid       | 2.59 ± 0.17 | 5.64 ± 0.18+ | 3.78 ± 0.56+ | 4.83 ± 0.21+ |
| <i>trans</i> -Caftaric acid     | 1.82 ± 0.10 | ND           | ND           | 1.86 ± 0.09  |
| <i>cis-p</i> -Coumaric acid     | 0.18 ± 0.01 | 0.25 ± 0.01  | 0.17 ± 0.00  | 2.34 ± 0.11+ |
| <i>trans-p</i> -Coumaric acid   | 0.07 ± 0.00 | 0.14 ± 0.04  | 0.09 ± 0.00  | ND           |
| <i>Flavonoids phenolics</i>     |             |              |              |              |
| Flavan-3-ols                    |             |              |              |              |
| (+)-catechin                    | 0.47 ± 0.08 | 1.70 ± 0.12+ | 0.24 ± 0.42  | 1.98 ± 0.24+ |
| (-)-epicatechin                 | 0.73 ± 0.12 | 1.36 ± 0.11+ | 0.41 ± 0.04  | 2.09 ± 0.35+ |
| Procyanidin B3                  | 0.33 ± 0.01 | ND           | ND           | 0.32 ± 0.01  |
| Procyanidin B1                  | 0.35 ± 0.04 | ND           | ND           | 0.43 ± 0.01  |
| Procyanidin dimer               | 0.15 ± 0.01 | ND           | ND           | 0.62 ± 0.19  |
| Flavonols                       |             |              |              |              |
| Quercetin-3-galactoside         | 0.04 ± 0.02 | ND           | ND           | 0.17 ± 0.01  |
| Quercetin-3-glucoside           | 0.16 ± 0.01 | ND           | ND           | 0.35 ± 0.01  |

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=3). For each compound, plus signs (+) denote significant difference compared with T0 value ( $P < 0.05$ , Tukey's HSD test). T0, control; T1, early harvest of grapes; T2, direct pressing of grapes; T3, low dose of PVPP; ND, not detected.

From the family of non-flavonoid compounds, two hydroxybenzoic acids and six hydroxycinnamic acids were identified, whereas from the family of flavonoids we identified five flavanols and two flavonols. Only some of these compounds were quantified in all treatments. Thus gallic acid in wines produced by using treatments T1, T2 and T3 displayed higher concentrations than in the control wine. Also, wines from the T3 group showed an approximately 17-fold higher content of protocatechuic acid than the control group. For ferulic acid, treatments T1, T2 and T3 resulted in wines with a slightly higher content than the control, with T3 being the treatment producing wines with the highest concentration (about ninefold higher than the control condition). Also, all the experimental treatments resulted in wines with a higher concentration of *cis*-caftaric acid compared with the control, with treatment T1 being the one resulting in wines with the highest concentration ( $5.64 \pm 0.18 \text{ mg L}^{-1}$ ). For *p*-coumaric acid, treatment T3 resulted in wines with the highest content (about 13-fold higher than the control). With regard to the flavanols, only (+)-catechin and (-)-epicatechin were identified of all experimental treatments, with higher concentrations of both flavanols in treatments T1 and T3. In the case of flavonols, treatment T3 produced wines with

higher concentrations of both compounds compared with those produced after treatment T0. The higher contents of phenolic acids and flavanols found in the early harvest treatment group (T1) may be due to unripe grapes, whose higher content of smaller phenols such as flavanols and phenolic acids would make the wines more bitter.<sup>41,42</sup> On the other hand, the higher content of hydroxycinnamic acids with little or no (+)-catechin present in the group subjected to direct pressing (without maceration) is in agreement with reports by other authors showing both a higher concentration of these compounds in free-run Sauvignon Blanc juice and a minimal concentration of hydroxycinnamic acids when prolonged skin contact and pressure were used, as in the control treatment.<sup>26</sup> In summary, we observed that the treatment with a lower dose of PVPP (T3) resulted in wines with the highest content of low-molecular-weight phenolic compounds. In a study on the browning capacity of white wine, gallic acid, caftaric acid, (+)-catechin and (-)-epicatechin were identified as the main compounds that react with oxygen and cause browning in the wine, thus demonstrating that these compounds were readily oxidised. (-)-Epicatechin was the major browning agent, in addition to caftaric acid. Both polyphenols participated in the production of quinones via the enzymatic activity of polyphenol oxidase in the presence of oxygen.<sup>43,44</sup> In that case, the lower doses of PVPP caused a lower precipitation of phenolic compounds, especially wine flavanols and hydroxycinnamic acids, which could be easily oxidized and adversely affect the final quality of white wine.

## CONCLUSIONS

The use of inert gas and prefermentative treatments were able to modify the concentration and composition of phenolic compounds in wines. Data from two assays on the content of low-molecular-weight phenolic compounds showed differences in concentration among various treatments.

The data derived from the fractionation of proanthocyanidins by C<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges represent a significant chemical analytical finding in white wines made from cv. Sauvignon blanc. Our results show, for the first time to our knowledge, that various specific interventions in the white winemaking process affect the chemical profile of the resulting wines, especially the proanthocyanidin fraction, which should be taken into account by the wineries producing these wines.

Future studies on white wines from different geographical origins and produced by other winemaking practices would be necessary to confirm these observations,

which will help winemakers to maximize juice quality and recovery for premium wine production.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by Conicyt-Chile (Grant Fondecyt 1080559 and 1110832). The authors are also grateful to Marcelo Retamal from De Martino Winery, Isla de Maipo, Chile, for providing us with the fruit and necessary facilities at the vineyard and winery for conducting these studies.

## REFERENCES

- 1 SAG (Servicio Agrícola y Ganadero), *Catastro nacional de vides de vinificación 2010*. <http://www.sag.gob.cl> [11 December 2011].
- 2 Lund C, Thompson M, Benkwitz F, Wohler M, Triggs C, Gardner R, Heymann H and Nicolau L, New Zealand Sauvignon Blanc distinct flavor characteristics: Sensory, chemical, and consumer aspects. *Am J Enol Vitic* **60**: 1-12 (2009).
- 3 De Beer D, Joubert E, Gelderblom W and Manley M, Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. *J Agric Food Chem* **51**: 902-909 (2003).
- 4 Cheynier V, Rigaud J, Souquet J, Duprat F and Moutounet M, Must browning in relation to behaviour of phenolic compounds during oxidation. *Am J Enol Vitic* **41**: 346-349 (1990).
- 5 Darias-Martín J, Rodríguez O, Díaz E and Lamuela-Raventós R, Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chem* **71**: 483-487 (2000).
- 6 Gómez-Míguez MJ, González-Miret M, Hernanz D, Fernández M, Vicario I and Heredia F, Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *J Food Eng* **78**: 238-245 (2007).
- 7 Allen T, Herbst-Johnstone M, Girault M, Butler P, Logan G, Jouanneau S, Nicolau L and Kilmartin P, Influence of grape-harvesting steps on varietal thiol aromas in Sauvignon blanc wines. *J Agric Food Chem* **59**: 10641-10650 (2011).
- 8 Downey M, Harvey J and Robinson S, Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust J Grape Wine Res* **9**: 15-27 (2003).
- 9 Terrier N, Torregrosa L, Ageorges A, Vialet S, Verriès C, Cheynier V and Romieu C, Ectopic expression of VvMybPA2 promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway. *Plant Physiol* **149**: 1028-1041 (2009).
- 10 Fournand D, Vicens A, Sidhoum L, Souquet J, Moutounet M and Cheynier V, Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *J Agric Food Chem* **54**: 7331-7338 (2006).
- 11 Bindon K and Kennedy J, Ripening-induced changes in grape skin proanthocyanidins modify their interaction with cell walls. *J Agric Food Chem* **59**: 2696-2707 (2011).
- 12 Pastor del Rio J and Kennedy J, Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. *Am J Enol Vitic* **57**: 125-132 (2006).
- 13 Patel P, Herbst-Johnstone M, Lee S, Gardner R, Weaver R, Nicolau L and Kilmartin P, Influence of juice pressing conditions on polyphenols, antioxidants, and varietal aroma of Sauvignon Blanc microferments. *J Agric Food Chem* **58**: 7280-7288 (2010).

- 14 Brossaud F, Cheynier V and Noble A, Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Aust J Grape Wine Res* **7**: 33-39 (2001).
- 15 Waterhouse A and Laurie F, Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *Am J Enol Vitic* **57**: 306-313 (2006).
- 16 Li H, Guo A and Wang H, Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem* **108**: 1-13 (2008).
- 17 Skouroumounis G, Kwiatkowski M, Francis I, Oakey H, Capone D, Duncan B, Sefton M and Waters E, The impact of closure type and storage conditions on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay during five years's storage. *Aust J Grape Wine Res* **11**: 369-377 (2005).
- 18 Barón R, Mayén M, Merida J and Medina M, Comparative study of browning and flavan-3-ols during the storage of white sherry wines treated with different fining agents. *J Sci Food Agric* **80**: 226-230 (2000).
- 19 Sims C, Eastridge J and Bates R, Changes in phenols, color and sensory characteristics of Muscadine wines by pre- and post-fermentation additions of PVPP, casein, and gelatine. *Am J Enol Vitic* **46**: 155-158 (1995).
- 20 Glories Y, La couleur des vins rouges, 2eme Partier. Mesure, origine et interpretation. *Connaiss Vigne Vin* **18**: 253-271 (1984).
- 21 Sun B, Conceição L, Ricardo Da Silva JM and Spranger I, Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J Agric Food Chem* **46**: 1390-1396 (1998).
- 22 Sun B, Ricardo da Silva J and Spranger I, Critical factors of the vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* **46**: 4267-4274 (1998).
- 23 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).
- 24 Peña-Neira A, Hernández T, García-Vallejo C, Estrella I and Suarez J, a survey of phenolic compounds in Spanish wines from different geographical origins. *Eur Food Res Technol* **210**: 445-448 (2000).
- 25 Peña-Neira A, Dueñas M, Duarte A, Hernández T, Estrella I and Loyola E, Effects of ripening stages 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 (2004).
- 26 Maggu M, Winz R, Kilmartin P, Trought M and Nicolau L, Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. *J Agric Food Chem* **55**: 10281-10288 (2007).



- 27 Danilewicz JC, Review of reaction mechanism of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of iron and copper. *Am J Enol Vitic* **54**: 73–85 (2003).
- 28 Laurie VF, Zúniga MC, Carrasco-Sánchez V, Santos L, Cañete A, Olea-Azar C, Ugliano M and Agosin E, Reactivity of 3-sulfanyl-1-hexanols and catechol-containing phenolics *in vitro*. *Food Chem* **131**: 1510-1516 (2012).
- 29 Ricardo Da Silva JM, Cheynier V, Samsom A and Bourzeix M, Effect of pomace contact, carbonic maceration, and hyperoxidation on the procyanidin composition of Grenache blanc wines. *Am J Enol Vitic* **44**: 168-172 (1993).
- 30 Lesschaeve I and Noble A, Polyphenols: Factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am J Clin Nutr* **81**: 330-335 (2005).
- 31 Fulcrand H, Dueñas M, Salas E and Cheynier V, Phenolic reactions during winemaking and aging. *Am J Enol Vitic* **57**: 289-297 (2006).
- 32 Monagas M, Gómez-Cordoves C, Bartolome B, Laureano O and Ricardo Da Silva JM, 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).
- 33 Obreque-Slier E, Peña-Neira A, López-Solís R, Zamora-Marín F, Ricardo da Silva J and 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* **58**: 3591-3599 (2010).
- 34 Lund C, Nicolau L, Gardner R and Kilmartin P, Effect of polyphenols on the perception of key aroma compounds from Sauvignon Blanc wine. *Aust J Grape Wine Res* **15**: 18-26 (2009).
- 35 Marais J, Effect of grape temperature, oxidation and skin contact on Sauvignon Blanc juice and wine composition and wine quality. *S Afr Enol Vitic* **19**: 10-16 (1998).
- 36 Harbertson J, Kennedy J and Adams D, Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot Noir berries during ripening. *Am J Enol Vitic* **53**: 54-59 (2002).
- 37 Montes C, Pérez-Quezada J, Peña-Neira A and Tonietto J, Climatic potential for viticulture in Central Chile. *Aust J Grape Wine Res* **18**: 20-28 (2011).
- 38 Marchal R and Jeandet P, Use of Enological Additives for Colloid and Tartrate Salt Stabilization in White Wines and for Improvement of Sparkling Wine Foaming Properties, in *Wine Chemistry and Biochemistry*, ed. By Moreno-Arribas V and Polo C. Springer, New York, pp. 127-158 (2008).

- 39 Adams D, Phenolics and ripening in grape berries. *Am J Enol Vitic* **57**: 249-256 (2006).
- 40 Zhao J, Yongzhen P and Dixon A, The mysteries of proanthocyanidins transport and polymerization. *Plant Physiol* **153**: 437-443 (2010).
- 41 Vidal S, Francis L, Guyot S, Marnet N, Kwiatkowski M, Gawel R, Cheynier V and Waters E, The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine like medium. *J Sci Food Agr* **83**: 564-573 (2003).
- 42 Gawel R, Red wine astringency: A review. *Aust J Grape Wine Res* **4**: 74-96 (1998).
- 43 Sioumis N, Kallithraka S, Makris D and Kefalas P, Kinetics of browning onset in white wines: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food Chem* **94**: 98-104 (2006).
- 44 Roland A, Vialaret J, Razungles A, Rigou P and Schneider R, Evolution of S-Cysteinylylated and S-Glutathionylated Thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon Blanc musts. *J Agric Food Chem* **58**: 4406-4413 (2010).

## **Subcapítulo III.2:**

# **Mezcla de vinos tintos y su efecto sobre la composición fenólica y características sensoriales**

## Phenolic composition and mouth-feel characteristics resulting from blending Chilean red wines

Alejandro Cáceres-Mella<sup>a</sup>, Álvaro Peña-Neira<sup>a</sup>, Pamela Avilés-Gálvez<sup>a</sup>, Marcela Medel-Marabolí<sup>a</sup>, Rubén del Barrio-Galán<sup>a</sup>, Remigio López-Solís<sup>b</sup> and Joan Miquel Canals<sup>c</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Casilla 1004, 8820808 Santiago, Chile. <sup>b</sup>Programa de Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, 8380453 Santiago, Chile. <sup>c</sup>Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología, Universidad Rovira i Virgili, C/ Marce.li Domingo s/n. 43007. Tarragona, Spain.

Enviado a Journal of the Science of Food and Agriculture (Manuscript ID: JSFA-13-0830)

### Abstract

**BACKGROUND:** The blending of wine is a common practice in winemaking to improve certain characteristics that are appreciated by consumers. The use of some cultivars may contribute phenolic compounds that modify certain characteristics in blended wines, particularly those related to mouth-feel characteristics. Therefore, the aim of this work was to study the effect of Carménère, Merlot and Cabernet Franc on the phenolic composition, proanthocyanidins profiles and mouth-feel characteristics of Cabernet Sauvignon blends.

**RESULTS:** Significant differences in chemical composition were observed among the monovarietal wines. Separation using Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges revealed differences in the concentration but not in the proportion of various proanthocyanidins. Blending reduced polyphenol concentration differences among the various monovarietal wines and the sensory panel differences with regard to astringency and bitterness parameters. Although no major overall differences were observed after blending the monovarietal wines, such an oenological practice produced clear differences in mouth-feel characteristics in such a way that the quality of the perceived astringency was different.

**CONCLUSION:** This study showed that blending of wines may be important for enhancing certain positive mouth-feel characteristics in wines, which may be essential for improving the wine quality and the consumer acceptance.

**Key words:** wine blending, proanthocyanidins, astringency, Cabernet Sauvignon, Carménère

## INTRODUCTION

The blending of wine, or *coupage*, is one of the oldest and most common practices in winemaking. Wines are blended to improve certain characteristics that are appreciated by consumers, such as colour, flavour, alcohol content, body and aromatic composition, and to improve product quality.<sup>1-5</sup> Although blending wines of different cultivars can provide different aromatic descriptors, it is also true that some cultivars may contribute phenolic compounds that modify certain characteristics in blended wines, particularly those related to mouth-feel characteristics.<sup>6-8</sup> Previous studies on wine blends have shown that polyphenols and colour are affected by the blending process.<sup>9-11</sup> The different grape cultivars used in blending may result in original wines due to characteristics acquired in the procedure; individually these cultivars contribute to different characteristics of the blended wines, thus producing significant organoleptic changes in the final product. Cabernet Sauvignon is one of the most important cultivar in Chile, with approximately 40800 ha planted. Wines from the Merlot and Cabernet Franc cultivars are widely used in blends throughout the world and in Chile. Cultivar Carménère, which approximately 10000 ha planted,<sup>12</sup> is the emblematic cultivar of Chile, as it was believed extinct in the world after the phylloxera devastation of the European grapevines in the mid-19<sup>th</sup> century and was rediscovery in Chile in 1994.<sup>13-15</sup> Although the blending of wines in different proportions could generate significant sensory changes in wines, there are few studies examining the effect of this practice on the phenolic composition of wine blends and, more specifically on the proportion and concentration of proanthocyanidin fractions and mouth-feel attributes. This study aims to evaluate the effect of Carménère, Merlot and Cabernet Franc wines on the phenolic content, proanthocyanidins proportion and mouth-feel properties of Cabernet Sauvignon blends.

## EXPERIMENTAL

**Chemical reagents.** Methylcellulose (1500 cP, viscosity at 2%) and standards of gallic, caffeic, *p*-coumaric, caftaric acids, (+)-catechin, (-)-epicatechin, quercetin, myricetin, kaempferol and malvidin-3-glucoside were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A). Polyethylene membranes of 0.22 µm pore size were acquired from EMD Millipore (Billerica, MA, U.S.A.). Sodium sulphate (anhydrous), potassium metabisulphite, vanillin (99%), ethyl acetate, diethyl ether, sodium hydroxide, hydrochloric acid, sulphuric acid, high-performance liquid chromatography (HPLC)-

grade acetonitrile, acetic acid, formic acid and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All reagents were analytical grade or higher. Sep-Pak Plus tC<sub>18</sub> environmental cartridges (900 mg) and Sep-Pak Plus Short tC<sub>18</sub> cartridges (400 mg) were obtained from Waters (Milford, CA, U.S.A). Phosphate buffer pH 7.0 was acquired from Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, U.S.A). Nitrogen gas was supplied by Indura S.A (Santiago, Chile).

**Instrumentation.** The pH was measured in a pH meter model 8417N (Hanna Instrument, RI, U.S.A). Phenolic analyses were performed using an HPLC system 1100 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A) consisting of a photodiode array detector (DAD; model G1315B), a quaternary pump (model QuatPump G1311A), a degasser (model G1379A) and an autosampler (model G1329A). A reverse-phase Nova Pack C<sub>18</sub> column (4 µm, 3.9 mm i.d. x 300 mm; Waters, Mildford, U.S.A) was used for the analysis of individual phenolic compounds. The anthocyanins analyses were performed using an HPLC system (model D-7000; Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) consisting of a DAD (model L-7455), a pump (model L-6200) and an autosampler (model L-7200) with a Chromolith C<sub>18</sub> column (2 µm, 4.6 mm i.d. x 100 mm; Merck, Darmstadt, Germany). Absorbances were measured using a Shimadzu UV-Vis spectrophotometer (model UV/VIS 1700 Pharmaspec, Kyoto, Japan).

**Wine samples.** Four monovarietal red wines (all vintage 2010) were used: Cabernet Sauvignon (CS), Carménère (CR), Merlot (ME) and Cabernet Franc (CF). All the monovarietal wines were produced using the same oenological practices at William Fèvre Winery. The grapes varieties were cultivated in the same geographical area, the Maipo Valley, Central Chile. The wines (100 L of each variety) were transported from the private winery to our laboratories in food-grade polyethylene tanks and stored at 10 °C until blending. The wines showed no evidence of malolactic fermentation. All four base wines were dry (residual sugar: CS = 2.8 g glucose L<sup>-1</sup>; CR = 2.2 g glucose L<sup>-1</sup>; ME = 2.5 g glucose L<sup>-1</sup>; CF = 2.7 g glucose L<sup>-1</sup>) and the alcohol content ranged from 13.7 to 14.5 % v/v.

**Wine blending.** The wine blends were prepared in deposit of 25-L capacity. Nitrogen flushing was used at all experimental stages to reduce the chance of oxidation. Because the densities of the four wines were essentially the same (0.989-0.987 g cm<sup>-3</sup>), the wines were blended volumetrically. The wine blending was performed 10 days after arrival in our laboratory according to the criteria used by the wine company. A

total of 10 wines were analysed, including four monovarietal base wines and six two-wine blends with Cabernet Sauvignon (CS) as the base wine and Carménère (CR), Merlot (ME) and Cabernet Franc (CF) wines as modifiers in volumetric proportions of 30% (CS-CR (70:30), CS-ME (70:30) and CS-CF (70:30)), and 15% (CS-CR (85:15), CS-ME (85:15) and CS-CF (85:15)). After blending, the wines were adjusted to a free SO<sub>2</sub> levels of 30 mg L<sup>-1</sup> and immediately bottled in dark green 750-mL glass bottles (CristalChile, Santiago, Chile), closed with roll-on tamper-evident screwcaps (Saranex<sup>TM</sup> liner) (Amcor, Hawthorn, Australia) and stored at 10 °C until further use.

**Wine chemical analyses.** The analytical methods recommended by OIV<sup>16</sup> were used to determine the pH, sugar content (g glucose L<sup>-1</sup>), titratable acidity (g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>) and ethanol content (% v/v). The total phenol content was determined by UV absorptiometry at 280 nm<sup>17</sup> and is expressed as mg GAE L<sup>-1</sup> (GAE: gallic acid equivalents). The total tannin content was measured using methylcellulose as a precipitant agent<sup>18</sup> and is expressed as mg CE L<sup>-1</sup> (CE: (+)-catechin equivalent). The total anthocyanins were measured using the methodology described by Ribéreau-Gayon and Stonestreet<sup>19</sup> and are expressed as mg ME L<sup>-1</sup> (ME: malvidin equivalent). The colour intensity (CI) was estimated using the method described by Glories.<sup>17</sup> The color coordinates lightness (L\*), chroma (C\*) and hue (h\*) were determined according Pérez-Magariño and González-Sanjosé.<sup>20</sup>

**Fractionation of Proanthocyanidins using C<sub>18</sub> Sep-Pak Cartridges.** The red wine samples were fractionated using tC<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges according to the method described by Sun et al.<sup>21</sup> Briefly, 7 mL of wine sample was concentrated to dryness in a rotary evaporator at < 30° C, and the residue was dissolved in 20 mL of 67 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 7.0. The pH of the resulting solution was adjusted to 7.0 with either NaOH or HCl, as necessary, under a nitrogen atmosphere. Two tC<sub>18</sub> Sep-Pak cartridges were assembled (top, Sep-Pak Plus tC<sub>18</sub> environmental cartridge (900 mg); bottom, Sep-Pak Plus Short tC<sub>18</sub> cartridge (400 mg)) and conditioned sequentially with methanol (10 mL), distilled water (2 x 10 mL) and phosphate buffer (pH 7.0; 10 mL). The samples were passed through the cartridges at a flow rate no faster than 2 mL min<sup>-1</sup>, and the phenolic acids were then eliminated by elution with 10 mL of 67 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 7.0). The cartridges were dried with nitrogen gas and eluted sequentially with 25 mL of ethyl acetate (fraction FI + FII containing monomeric and oligomeric flavan-3-ols, respectively) and with 15 mL of methanol (fraction FIII containing polymeric proanthocyanidins). The ethyl acetate eluate was dried under

vacuum, redissolved in 3 mL of 67 mmol/L phosphate buffer (pH 7.0), and reloaded onto the same series of cartridges that had been conditioned again as described previously. The cartridges were dried by passing a stream of gas nitrogen and eluted sequentially with 25 mL of diethyl ether (fraction FI-containing monomers) and 15 mL of methanol (fraction FII-containing oligomers). Fractions FI, FII, and FIII were evaporated to dryness under vacuum, and redissolved in 3 mL of methanol. The total content of flavan-3-ols in each fraction was determined by the vanillin assay.<sup>22</sup> A 2.5 mL aliquot of 1:3 (v/v) sulfuric acid/methanol solution and a 2.5 mL aliquot of 1% (w/v) vanillin in methanol were mixed with 1 mL of the sample. The tubes were incubated at 30 °C for either 15 min (FI fraction) or for a period of time sufficient to allow maximal reaction (FII and FIII fractions). The absorbance was measured at 500 nm. A blank was prepared by substituting the vanillin solution in the reaction mix with methanol. The absorbance of the blank was subtracted from the absorbance of the corresponding vanillin-containing sample, and the value obtained was compared to standard curves. Quantification was performed by means of standard curves prepared from monomers (for FI), oligomers (for FII), and polymers of flavan-3-ol (for FIII) isolated from grape seeds, as previously described.<sup>22</sup>

**HPLC-DAD analysis of low molecular weight phenolic compounds.** Red wines samples (50 mL) were extracted with diethyl ether (3 x 20 mL) and ethyl acetate (3 x 20 mL). The resulting extracts were evaporated to dryness at 30° C, dissolved in 2 mL of 50% (v/v) methanol/water, and filtered (0.22-µm pore size membrane). Aliquots (25 µL) of the final solution were subjected to reverse-phase chromatographic separation at 20° C using a Nova Pack C<sub>18</sub> column. A photodiode array detector was set from 210 to 360 nm. Two mobile phases were used as follows: A, water/acetic acid (98:2 v/v), and B, water/acetonitrile/acetic acid (78:20:2 v/v/v). A gradient was applied at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> from 0 to 55 min and 1.2 mL min<sup>-1</sup> from 55 to 90 min as follows: 100-20% A from 0 to 55 min, 20-10% A from 55 to 57 min, 10-0% A from 57 to 90 min. Each major peak in the HPLC chromatograms of the extracts was characterised by both the retention time and absorption spectrum (from 210 to 360 nm) according to Peña-Neira et al.<sup>23</sup> Quantitative determinations were performed using the external standard method and commercial standards. Calibration curves were produced by injecting standard solutions under the same conditions and range of concentrations as those used in the analysis of the samples. Compounds for which no standards were available were quantified using standard curves for (+)-catechin (procyanidin dimer and procyanidin gallate), quercetin (quercetin glycosides), myricetin (myricetin glycosides) and



kaempferol (kaempferol glycosides). All the qualitative and quantitative analyses of phenolic composition (including extraction) were performed in triplicate.<sup>24</sup>

**HPLC-DAD analysis of anthocyanins compounds.** A 2-mL sample of wine was filtered through a 0.22- $\mu\text{m}$  pore size, and 150  $\mu\text{L}$  aliquots of the sample were subjected to reverse-phase chromatographic separation at 20° C using a Chromolith C<sub>18</sub> column. The photodiode array detector was set from 210 to 600 nm. The two mobile phases were used as follows: A, water/formic acid (90:10 v/v), and B, acetonitrile. A gradient 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 and from 0 to 12 min, 85-15% A from 12 to 22 min and 85-70% A from 22 to 35 min. The quantification was performed by peak area measurements at 520 nm. The anthocyanins were quantified and expressed as mg/L of malvidin-3-glucoside. The calibration curves at 520 nm were obtained by injecting different volumes of standard solutions under the same conditions used for the samples.<sup>25</sup>

**Sensory evaluation.** A descriptive analysis was conducted on the wines approximately one month after bottling. The sensory panel consisted of 12 peoples (six females, six males, 24-38 years old) who were all students and workers from the Department of Agro-industry and Enology. All judges had previous experience with descriptive analysis. A previous training session was conducted to standardise the criteria among the judges. Subsequently, two sessions of three hours during 2 days were performed; for each session, each panellist had to assess two flights consisting of five wines. The wines were evaluated in individual temperature-controlled tasting booths, and water and unsalted crackers were provided for palate cleansing. Aliquots of 20 mL of wine was served at 18-19 °C, in dark-wine tasting glasses (RCristal, Mendoza, Argentina) labelled with a three-digit code using a completely randomized order. The use of dark-wine tasting glasses was to prevent the interaction of visual sensations and to focus the attention of the panelists on mouth-feel sensation. To decrease fatigue, there was a 30-s break between each wine. During each break, the panellists chewed on a cracker and then rinsed their mouth with water. Each wine was evaluated with regard to two sensorial attributes, astringency and bitterness, on a 15-cm unstructured linescale anchored from "low" to "high". The judges also made a descriptive analysis of astringency of each wine. The astringency terms appropriate for discriminating among the wine blends are provided in Table 1. The judges chose a series of mouth-feel terms, and the terms with the highest scores were chosen after the

evaluation and expressed as a percentage. These terms were derived from previous studies of mouth-feel properties of red wines.<sup>7,26,27</sup> All judges rated each wine in duplicate during a two-day evaluation. The data were collected on a paper ballot.

| <b>Grouping</b> | <b>Terms</b> | <b>Definition</b>   |
|-----------------|--------------|---|
| Harsh           | Abrasiveness | Excessive astringency of a strongly roughing nature                                   |
|                 | Hardness     | Combined effect of astringency and bitterness   |
| Dynamic         | Adhesiveness | A sensation that mouth surfaces are adhering to one another                           |
| Drying          | Dryness      | Feeling of lack of lubrication in the mouth   |
| Complex         | Mouthcoating | A sensation of a coating film that adheres to mouth surfaces that decreases with time |

**Statistics.** An analysis of variance (ANOVA) and Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) test were used for the mean separation, with a significance level of 95% ( $P < 0.05$ ). The descriptive and chemical results were analysed using a principal component analysis (PCA). All the statistical analyses were conducted using Statgraphics Centurion (ver. 15.2, Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, U.S.A) and Excel 2007 (ver. 12.0, Microsoft Corp., Redmond, Washington, U.S.A).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Wine composition

Table 2 shows the analyses of the global analytical parameters and phenolic analyses of the wine samples. The total phenol content ranged from 794.99 to 1006.78 mg GAE L<sup>-1</sup>, with the highest value for the CF (100) wine and the lowest value for the ME (100) wine. For the analyses of total tannins, the content of the wine blends varied from 1700.66 to 1992.77 mg CE L<sup>-1</sup>; the highest content was observed in CF (100) and in the blends with this monovarietal wine. With regard to the total anthocyanins, ME (100) showed the lowest content, whereas CR (100) showed the highest content; in the case of the wine blends, the anthocyanin content ranged from 426.68 to 533.27 mg ME L<sup>-1</sup>. A comparison of the anthocyanin content among the monovarietal wines showed that CS presented 45% less anthocyanins than CR and 19% and 30% more anthocyanins than ME and CF, respectively. Such differences in the content of tannins and anthocyanins could affect the chromatic characteristics of the wine. There were significant differences among wine samples in terms of colour intensity. The greater colour intensity was found for the CR (100) and CS-CR (70:30) wines, which had the

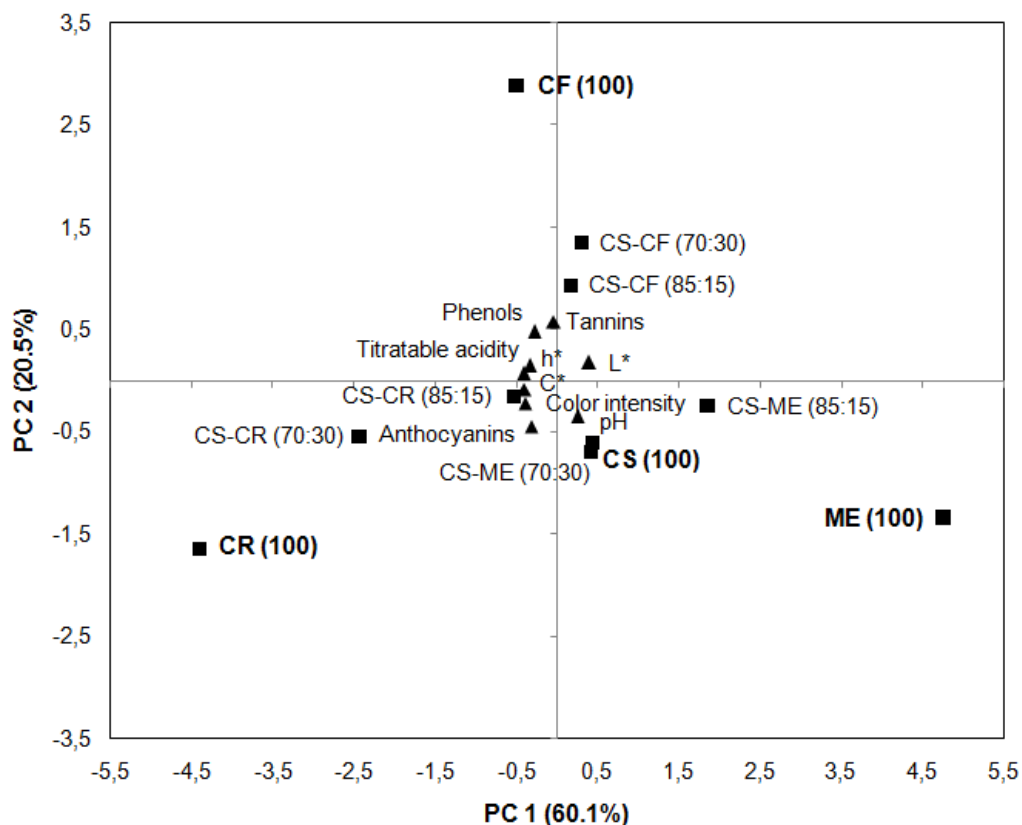
highest anthocyanin content. The same pattern was observed for the colour coordinates L\*, chroma (C\*) and hue (h\*), demonstrating that wine blending produced significant changes in the colour of the wine. In general terms, the higher concentration of total phenols, tannins and anthocyanins in the wines blended with CF and CR were due to the higher content of these compounds in these monovarietal wines (Table 2). The blending of wines produced significant changes in their phenolic composition, corroborating the results showed of other authors.<sup>2,10,11</sup> However, the changes in blended wines depended on the contribution of monovarietal wines added to mixture, therefore the initial amount of each cultivar influenced the wine produced. The relative content of phenolic compounds observed in this study is in agreement with those reported by other authors.<sup>25,28,29,30</sup>

| Table 2. Chemical composition of wine samples |         |  |                                   |                                  |                                       |            |         |         |         |
|---|---------|--|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|------------|---------|---------|---------|
| Wines   | pH      | TA<br>g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> L <sup>-1</sup> | Phenols<br>mg GAE L <sup>-1</sup> | Tannins<br>mg CE L <sup>-1</sup> | Anthocyanins<br>mg ME L <sup>-1</sup> | Cl<br>a.u. | L*      | C*      | h*      |
| CS (100)                                      | 3.53 b  | 3.53 ab  | 893.69 d                          | 1704.12 b                        | 486.04 c                              | 17.17 e    | 37.21 f | 58.06 f | 17.62 e |
| CR (100)                                      | 3.52 bc | 3.59 a   | 922.85 b                          | 1866.05 b                        | 707.80 a                              | 23.88 a    | 28.60 i | 60.29 a | 20.30 a |
| ME (100)                                      | 3.58 a  | 3.27 c   | 794.99 f                          | 1790.84 b                        | 393.03 f                              | 14.79 h    | 41.65 a | 55.69 i | 15.47 f |
| CF (100)                                      | 3.52 bc | 3.50 ab  | 1006.78 a                         | 2254.66 a                        | 342.71 g                              | 17.49 c    | 36.70 g | 58.38 e | 18.66 c |
| CS-CR (70:30)                                 | 3.51 bc | 3.63 a   | 924.54 b                          | 1710.53 b                        | 533.27 b                              | 19.75 b    | 33.61 h | 60.17 b | 19.36 b |
| CS-ME (70:30)                                 | 3.53 b  | 3.46 abc   | 857.87 e                          | 1700.76 b                        | 436.22 e                              | 17.21 e    | 37.60 e | 59.05 c | 18.23 d |
| CS-CF (70:30)                                 | 3.50 c  | 3.53 ab  | 907.91 c                          | 1992.77 ab                       | 429.67 e                              | 16.40 f    | 38.85 d | 57.77 g | 18.16 d |
| CS-CR (85:15)                                 | 3.50 c  | 3.56 ab  | 882.24 d                          | 1722.65 b                        | 494.64 c                              | 17.34 d    | 37.31 f | 58.52 d | 18.81 c |
| CS-ME (85:15)                                 | 3.52 bc | 3.36 bc  | 863.09 e                          | 1735.88 b                        | 447.35 d                              | 15.57 g    | 40.55 b | 57.38 h | 17.53 e |
| CS-CF (85:15)                                 | 3.50 c  | 3.59 a   | 894.99 cd                         | 1860.05 b                        | 426.68 e                              | 16.35 f    | 39.05 c | 57.71 g | 18.61 c |

The values are expressed as the mean (n=3). The different letters in a column denote significant differences among the samples (*P* < 0,05, Tukey's HSD test). CS, Cabernet Sauvignon; CR, Carménère; ME, Merlot, CF, Cabernet Franc; TA, Titratable acidity; GAE, Gallic acid equivalent; CE:,(+)-catechin equivalent; ME, malvidin equivalent; a.u., absorbance unit.

The principal component analysis (PCA) illustrated the relationship between the 10 wines and the compositional analysis (Figure 1). PC1 and PC2 accounted for 80.6% of the total variation (60.1% and 20.5%, respectively). PC1 was characterized by colour attributes, specifically, L\*, colour intensity, chroma (C\*), hue (h\*) and titratable acidity. PC2 was characterized by pH and phenolic compounds, such as total phenols, tannins and anthocyanins. The monovarietal wines CR (100), ME (100) and CF (100) were located outside the central region where the blends, CS (100) and most analytical parameters were located. As expected, all four base wines were significantly different from each other corroborating the results shown in Table 2. The monovarietal wines each had distinct characteristics that distanced them from the blends, though the respective monovarietal wine and corresponding blend were located in the same quadrant. The overall results indicate that the wine blends including CR were

correlated with a high amount of anthocyanins, whereas a blend including CF was correlated with a high amount of tannins.



**Figure 1.** Principal component analysis comparing general analytical parameters for the wine samples.

CS, Cabernet Sauvignon; CR, Carménère; ME, Merlot; CF, Cabernet Franc.

Table 3 displays the concentrations of low molecular weight phenolic compounds quantified in the wine samples. The hydroxybenzoic acid quantified was gallic acid, and the hydroxycinnamic acids quantified were caftaric, caffeic and *p*-coumaric acids. The flavanols quantified were (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin dimer and procyanidin gallate. The flavonols identified and quantified were myricetin-3-glucoside, myricetin-3-galactoside, myricetin-3-rutinoside, quercetin-3-glucoside, quercetin-3-galactoside, kaempferol-3-glucoside, kaempferol-3-galactoside and quercetin. All the identified compounds were detected in all wines used in this study. Flavonoids were the most abundant fraction (from 66.1% to 83.6%) compared to non-flavonoids (from 16.4% to 33.9%), as also reported by other authors.<sup>25,30,31</sup> Flavanols were the major class of flavonoid compounds quantified in all the wines evaluated. These compounds are important qualitative factors in red wine due to their role in

astringency and bitterness, and differences among wines can influence the mouth-feel characteristics of wine blends.<sup>6,8,32,33</sup>

**Table 3. Low molecular weight phenolic compounds quantified in wine samples**

| Compounds (mg L <sup>-1</sup> )         | CS (100) | CR (100) | ME (100)  | CF (100)  | CS-CR (70:30) | CS-ME (70:30) | CS-CF (70:30) | CS-CR (85:15) | CS-ME (85:15) | CS-CF (85:15) |
|---|----------|----------|-----------|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Non-flavonoid phenolics</b>          |          |          |           |           |               |               |               |               |               |               |
| Gallic acid                             | 25.00 de | 22.40 f  | 26.43 d   | 50.73 a   | 23.30 ef      | 26.43 d       | 33.03 b       | 22.83 ef      | 24.03 ef      | 29.47 c       |
| <b>Hydroxybenzoic acids</b>             |          |          |           |           |               |               |               |               |               |               |
| Caftaric acid                           | 3.80 cd  | 3.57 cd  | 3.30 d    | 7.30 a    | 4.00 bc       | 4.00 bc       | 4.53 b        | 3.70 cd       | 3.50 cd       | 4.50 b        |
| Caffeic acid                            | 4.30 e   | 3.80 f   | 3.10 g    | 7.30 a    | 5.43 c        | 4.40 e        | 6.30 b        | 4.87 d        | 4.10 ef       | 4.87 d        |
| <i>p</i> -coumaric acid                 | 1.40 d   | 4.33 a   | 3.40 abc  | 3.10 bc   | 3.67 ab       | 2.50 c        | 2.70 bc       | 3.60 ab       | 2.40 cd       | 2.67 bc       |
| <b>Hydroxycinnamic acids</b>            | 9.50 e   | 11.70 cd | 9.80 e    | 17.70 a   | 13.10 bc      | 10.90 de      | 13.53 b       | 12.17 bcd     | 10.00 e       | 12.03 bcd     |
| <b>Total non-flavonoid phenolics</b>    | 34.50 d  | 34.10 d  | 36.23 d   | 68.43 a   | 36.40 d       | 37.33 d       | 46.57 b       | 35.00 d       | 34.03 d       | 41.50 c       |
| <b>Flavonoid phenolics</b>              |          |          |           |           |               |               |               |               |               |               |
| (+)-Catechin                            | 32.03 b  | 68.83 a  | 19.73 e   | 70.10 a   | 20.20 e       | 24.13 cd      | 20.63 de      | 19.70 e       | 21.60 cde     | 24.67 c       |
| (-)-Epicatechin                         | 34.40 b  | 55.00 a  | 28.00 f   | 32.73 bcd | 33.40 bc      | 29.10 ef      | 31.13 cde     | 31.73 bcde    | 30.73 cdef    | 29.93 def     |
| Procyanidin dimer                       | 10.90 cd | 17.67 b  | 24.20 a   | 11.00 c   | 7.20 e        | 7.47 de       | 6.50 e        | 8.40 cde      | 7.17 e        | 6.87 e        |
| Procyanidin gallate                     | 10.50 a  | 6.27 bc  | 4.57 c    | 10.70 a   | 8.10 ab       | 5.80 bc       | 6.73 bc       | 7.50 b        | 6.00 bc       | 6.90 bc       |
| <b>Flavanols</b>                        |          |          |           |           |               |               |               |               |               |               |
| Myricetin-3-glucoside                   | 12.40 a  | 7.50 d   | 7.70 d    | 8.00 d    | 10.97 bc      | 10.47 c       | 10.33 c       | 11.87 ab      | 10.30 c       | 10.23 c       |
| Myricetin-3-galactoside                 | 3.60 bc  | 3.03 c   | 4.00 b    | 4.93 a    | 3.47 bc       | 3.40 bc       | 3.30 bc       | 3.27 bc       | 3.33 bc       | 3.20 c        |
| Myricetin-3-rutinoside                  | 1.93 abc | 1.67 abc | 1.03 c    | 1.40 bc   | 2.23 ab       | 1.00 c        | 1.63 abc      | 2.40 a        | 1.03 c        | 1.43 bc       |
| Quercetin-3-glucoside                   | 1.90 b   | 2.03 b   | 0.43 e    | 2.03 b    | 1.57 c        | 0.67 e        | 1.83 bc       | 2.40 a        | 1.00 d        | 1.73 bc       |
| Quercetin-3-galactoside                 | 0.37 d   | 3.90 a   | 0.43 cd   | 1.60 b    | 1.93 b        | 1.63 b        | 1.33 bc       | 1.63 b        | 1.70 b        | 1.87 b        |
| Kaempferol-3-glucoside                  | 1.33 a   | 1.03 ab  | 1.07 ab   | 1.53 a    | 1.30 ab       | 1.13 ab       | 1.33 a        | 0.77 b        | 1.17 ab       | 1.30 ab       |
| Kaempferol-3-galactoside                | 1.33 ab  | 0.47 d   | 1.03 bc   | 1.70 a    | 1.07 bc       | 1.30 b        | 0.90 c        | 1.13 bc       | 1.20 bc       | 1.00 bc       |
| Quercetin                               | 4.77 bc  | 6.50 a   | 4.97 bc   | 6.67 a    | 5.40 b        | 4.67 bc       | 5.00 bc       | 4.37 c        | 4.30 c        | 4.73 bc       |
| <b>Flavanols</b>                        | 27.63 a  | 26.13 a  | 20.67 b   | 27.87 a   | 27.93 a       | 24.27 ab      | 25.67 a       | 27.83 a       | 24.03 ab      | 25.50 ab      |
| <b>Total flavonoid phenolics</b>        | 115.47 c | 173.90 a | 97.17 d   | 152.40 b  | 96.83 d       | 90.77 d       | 90.67 d       | 95.17 d       | 89.53 d       | 93.87 d       |
| <b>Total non-anthocyanins phenolics</b> | 149.97 b | 208.00 a | 133.40 bc | 220.83 a  | 133.23 bc     | 128.10 c      | 137.23 bc     | 130.17 c      | 123.57 c      | 135.37 bc     |

The values are expressed as the mean (n=3). The different letters in a row denote significant differences among the samples ( $P < 0,05$ , Tukey's HSD test). CS, Cabernet Sauvignon; CR, Carménère; ME, Merlot, CF, Cabernet Franc.

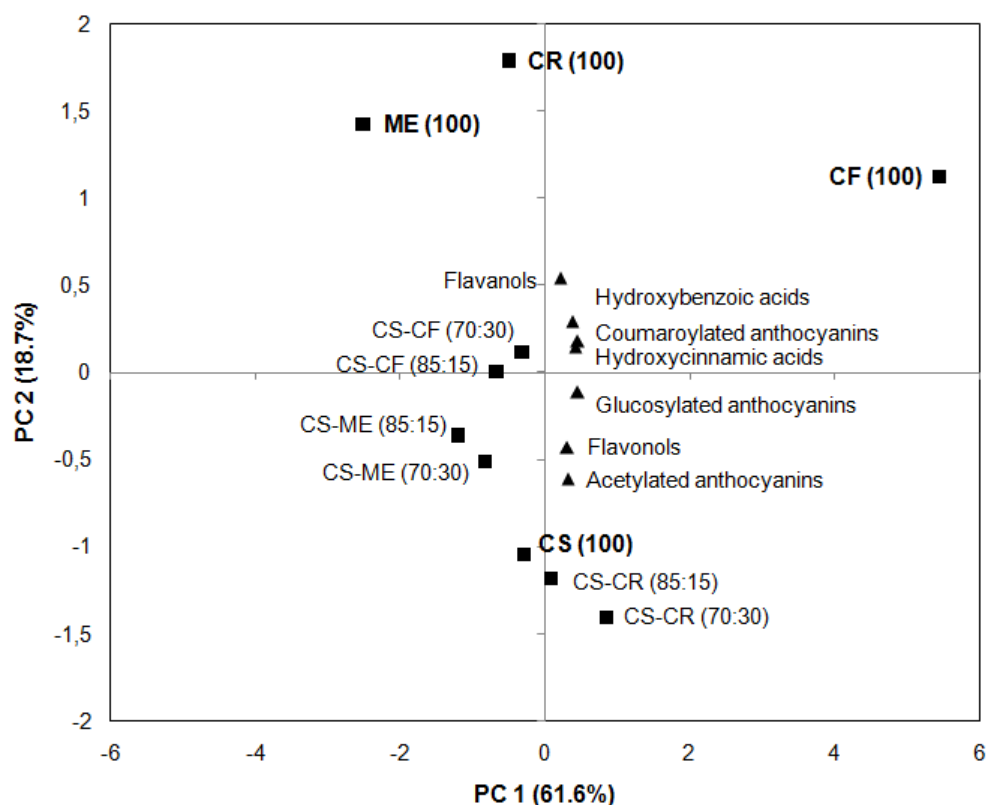
In the case of anthocyanins (Table 4), the glucosylated anthocyanins founded were delphinidin-3-glucoside, cyaniding-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside and malvidin-3-glucoside. Peonidin-3-(6'-acetyl) glucoside and malvidin-3-(6'-acetyl) glucoside were the only acetylated anthocyanins founded in this study. Peonidin-3-(6'-*p*-coumaroyl) glucoside and malvidin-3-(6'-*p*-coumaroyl) glucoside were the only coumaroylated anthocyanins founded in this study. All the identified anthocyanins were detected in all the wines examined. The group of mono-glucosides represented the highest proportion of all anthocyanins, with percentages ranging from 81.2% to 84.3%. with respect to acylated and coumaroylated derivatives, the wine samples presented a similar proportion of both anthocyanins, and malvidin-3-glucoside was the most abundant anthocyanin in the wine blends. The relative content of the anthocyanins quantified in the present study are higher than those published by other authors.<sup>9,25,30</sup>

**Table 4. Anthocyanins quantified in wine samples.**

| Compounds<br>(mg L <sup>-1</sup> )             | CS<br>(100)       | CR<br>(100)      | ME<br>(100)     | CF<br>(100)     | CS-CR<br>(70:30) | CS-ME<br>(70:30)  | CS-CF<br>(70:30) | CS-CR<br>(85:15) | CS-ME<br>(85:15)  | CS-CF<br>(85:15)  |
|--|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Delphinidin-3-glucoside                        | 64.62 b           | 39.32 cd         | 31.48 de        | 75.22 a         | 42.37 c          | 36.80 cd          | 26.36 e          | 37.10 cd         | 39.22 cd          | 33.47 cde         |
| Cyanidin-3-glucoside                           | 11.61 e           | 12.39 de         | 13.32 de        | 19.87 cd        | 3.97 f           | 46.31 a           | 21.54 c          | 7.59 ef          | 14.68 cde         | 29.42 b           |
| Petunidin-3-glucoside                          | 38.58 cd          | 51.55 bc         | 36.42 d         | 82.51 a         | 56.61 b          | 38.37 cd          | 33.93 d          | 59.36 b          | 36.74 d           | 38.88 cd          |
| Peonidin-3-glucoside                           | 27.27 a           | 17.11 bcd        | 9.62 e          | 20.05 b         | 14.03 bcde       | 12.47 de          | 9.03 e           | 19.15 bc         | 12.92 cde         | 10.64 e           |
| Malvidin-3-glucoside                           | 264.32 de         | 224.96 h         | 163.24 i        | 443.76 a        | 316.25 b         | 243.93 fg         | 227.78 gh        | 290.77 c         | 269.09 d          | 248.52 ef         |
| <b>Glucosylated anthocyanins</b>               | <b>406.40 bcd</b> | <b>345.33 ef</b> | <b>254.08 g</b> | <b>641.41 a</b> | <b>433.23 b</b>  | <b>377.88 cde</b> | <b>318.64 f</b>  | <b>413.97 bc</b> | <b>372.65 cde</b> | <b>360.93 def</b> |
| Peonidin-3-(6'-acetyl) glucoside               | 6.05 b            | 7.40 ab          | 6.73 b          | 8.10 ab         | 12.85 a          | 8.66 ab           | 7.99 ab          | 8.06 ab          | 4.12 b            | 5.00 b            |
| Malvidin-3-(6'-acetyl) glucoside               | 60.82 a           | 39.53 c          | 38.82 c         | 63.02 a         | 57.96 ab         | 54.19 ab          | 48.61 bc         | 56.48 ab         | 55.18 ab          | 50.15 b           |
| <b>Acetylated anthocyanins</b>                 | <b>66.87 ab</b>   | <b>46.93 c</b>   | <b>45.55 c</b>  | <b>71.12 a</b>  | <b>70.81 a</b>   | <b>62.85 ab</b>   | <b>56.60 abc</b> | <b>64.54 ab</b>  | <b>59.30 abc</b>  | <b>55.15 bc</b>   |
| Peonidin-3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl) glucoside | 2.76 bc           | 2.65 bc          | 2.02 cd         | 3.86 a          | 4.14 a           | 0.87 ef           | 2.90 b           | 1.31 de          | 1.25 def          | 0.46 f            |
| Malvidin-3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl) glucoside | 10.59 e           | 14.65 cd         | 11.16 de        | 44.37 a         | 19.05 b          | 11.67 de          | 11.38 de         | 16.13 bc         | 13.29 cde         | 12.18 de          |
| <b>Coumaroylated anthocyanins</b>              | <b>13.35 cd</b>   | <b>17.30 c</b>   | <b>13.18 cd</b> | <b>48.23 a</b>  | <b>23.19 b</b>   | <b>12.54 d</b>    | <b>14.28 cd</b>  | <b>17.44 c</b>   | <b>14.54 cd</b>   | <b>12.64 d</b>    |
| <b>Total anthocyanins</b>                      | <b>486.62 bc</b>  | <b>409.56 d</b>  | <b>312.81 e</b> | <b>760.76 a</b> | <b>527.23 b</b>  | <b>453.27 cd</b>  | <b>389.52 d</b>  | <b>495.95 bc</b> | <b>446.49 cd</b>  | <b>428.72 cd</b>  |

The values are expressed as the mean (n=3). The different letters in a row denote significant differences among the samples ( $P < 0,05$ , Tukey's HSD test). CS, Cabernet Sauvignon; CR, Carménère; ME, Merlot, CF, Cabernet Franc.

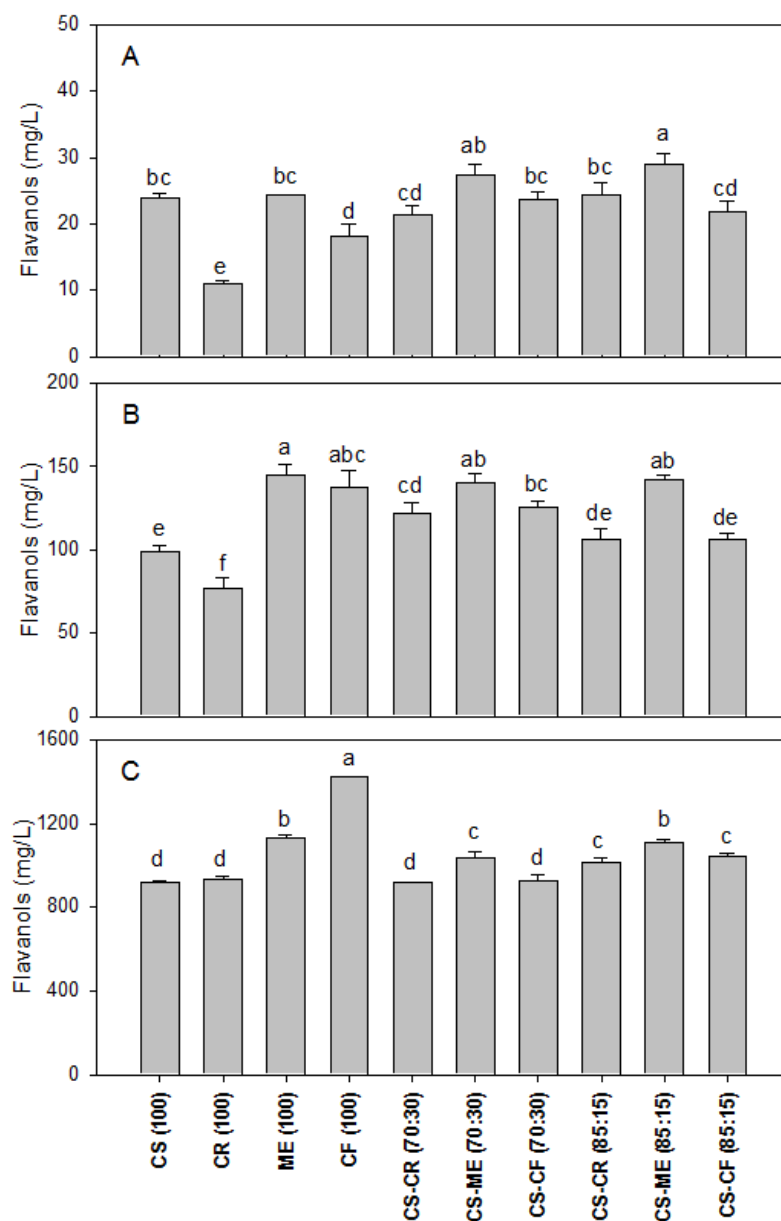
According to the results of the detailed polyphenolic analyses (Table 3 and Table 4), there was a decrease in the differences in concentrations of the wine blends compared to the single base wines. This pattern can be observed in a better way through the principal component analysis, which illustrates the relationship between the 10 wines, and the HPLC analysis of low molecular phenolic compounds and anthocyanins (Figure 2). PC1 and PC2 accounted for 80.3% of the total variation. As expected, all four base wines were significantly different from each other, corroborating the results provided by the analytical parameters (Table 2, Figure 1). Clearly, the oenological practice of blending produced a modification in the proportion and concentration of phenolic compounds while the differences among the monovarietal wines decreased. Although the highest polyphenolic content in previous studies<sup>2,11</sup> was found for wine blends rather than monovarietal wines, the reasons for the differing results in our study are not clear. Only the wine blends with a modifier wine having a high content of polyphenols, such as Cabernet Franc or Carménère, showed additive effects in increasing the polyphenol concentration in the final wine; however, blending, in general, produced a decrease in the concentration of phenolic compounds. This trend suggests that the smaller differences among wine blends with regard to certain parameters are due to a suppression or masking effect, producing blends that were less different from the monovarietal base wine.<sup>11</sup>



**Figure 2.** Principal component analysis comparing HPLC anthocyanin and phenolic compounds from the wine samples. CS, Cabernet Sauvignon; CR, Carménère; ME, Merlot; CF, Cabernet Franc.

Figure 3 displays the monomeric, oligomeric and polymeric flavan-3-ol proportions in the wine samples. Sun et al.<sup>21</sup> indicated that the monomeric fraction consists only of (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-3-O-gallate, whereas the oligomeric fraction is formed by dimers, trimers and tetramers of proanthocyanidins, and the polymeric fraction is composed of polymeric proanthocyanidins (more than 4 units). The relative percentages of the proanthocyanidins fraction in the wine blends were as follows: flavan-3-ol polymers (86.1-91.4%), followed by flavan-3-ol oligomers (8.7-11.7%) and a lower percentage of flavan-3-ol monomers (1.1-2.3%). These results are in agreement with the results reported by other authors for red wines.<sup>25,34,35</sup> The wines blended with ME showed a higher concentration of monomeric and oligomeric flavan-3-ol fractions. This pattern was also observed for the CF wine, which contained a high concentration of oligomers and polymers of flavan-3-ol, though blending with this monovarietal wine produced a decrease in the concentration of the polymeric fraction. Although the four monovarietal wines showed differences for the contents of the three fractions, blending produced a decrease in concentration differences among the wine

varietals, which is particularly important in the case of the polymeric fraction. Moreover, the pooled data showed that blending produced only a change in the concentration but not in the proportions of the different fractions.



**Figure 3.** Monomeric (A), oligomeric (B) and polymeric (C) fractions of proanthocyanidins in the wine samples. The different letters denote significant differences among the wine samples ( $P < 0.05$ , Tukey's HSD test). CS, Cabernet Sauvignon; CR, Carménère; ME, Merlot; CF, Cabernet Franc.

Other interesting results showed that, when blended with such wines as Merlot or Cabernet Franc, with a higher content of oligomers and polymers of flavan-3-ols, the CS base wine produce an additive effect, increasing the concentration of these fractions in the final wine. The various fractions of flavan-3-ols could produce



differences in sensorial properties, such as astringency and bitterness, thus influencing the wine quality,<sup>7,8</sup> a result that suggests that blending would impact on the mouth-feel characteristics of wines by modifying these parameters.

### Sensory and mouth-feel characteristics of wines

A sensory evaluation was conducted to complement the chemical analysis and determine whether the blending of wines produced changes in their organoleptic characteristics. Table 5 shows the parameters evaluated by the judges with their respective scores.

| Table 5. Mouth-feel attributes of wine samples |                   |               |                   |              |                   |             |            |
|--|-------------------|---------------|-------------------|--------------|-------------------|-------------|------------|
| Wines  | Abrasiveness<br>% | Hardness<br>% | Adhesiveness<br>% | Dryness<br>% | Mouthcoating<br>% | Astringency | Bitterness |
| <b>CS (100)</b>                                | 12.40 b           | 18.24 bc      | 24.34 b           | 38.56 b      | 6.46 f            | 10.62 a     | 7.61 a     |
| <b>CR (100)</b>                                | 6.81 c            | 19.71 bc      | 19.82 c           | 40.33 a      | 13.34 e           | 10.81 a     | 7.77 a     |
| <b>ME (100)</b>                                | 6.19 c            | 6.05 e        | 5.87 e            | 40.92 a      | 40.97 a           | 10.69 a     | 7.43 a     |
| <b>CF (100)</b>                                | 5.32 c            | 5.27 e        | 15.74 c           | 31.69 b      | 41.98 a           | 11.98 a     | 8.26 a     |
| <b>CS-CR (70:30)</b>                           | 19.97 a           | 13.44 d       | 13.39 d           | 20.12 d      | 33.06 b           | 11.36 a     | 7.62 a     |
| <b>CS-ME (70:30)</b>                           | 5.99 c            | 17.88 b       | 23.11 b           | 29.39 c      | 23.63 d           | 11.37 a     | 7.98 a     |
| <b>CS-CF (70:30)</b>                           | 9.52 b            | 4.72 e        | 33.34 a           | 19.08 d      | 33.34 b           | 11.11 a     | 7.76 a     |
| <b>CS-CR (85:15)</b>                           | 17.67 a           | 11.77 d       | 17.86 c           | 29.25 c      | 23.44 d           | 11.77 a     | 7.72 a     |
| <b>CS-ME (85:15)</b>                           | 11.32 b           | 22.15 a       | 11.14 d           | 33.42 b      | 21.97 d           | 11.31 a     | 7.31 a     |
| <b>CS-CF (85:15)</b>                           | 10.61 b           | 15.72 c       | 15.64 c           | 26.06 c      | 31.98 c           | 11.55 a     | 7.80 a     |

The values are expressed as the mean scores of 12 judges (n=2). The different letters in a column denote significant differences among the samples ( $P < 0,05$ , Tukey's HSD test). CS, Cabernet Sauvignon, CR, Carménère; ME, Merlot, CF, Cabernet Franc.

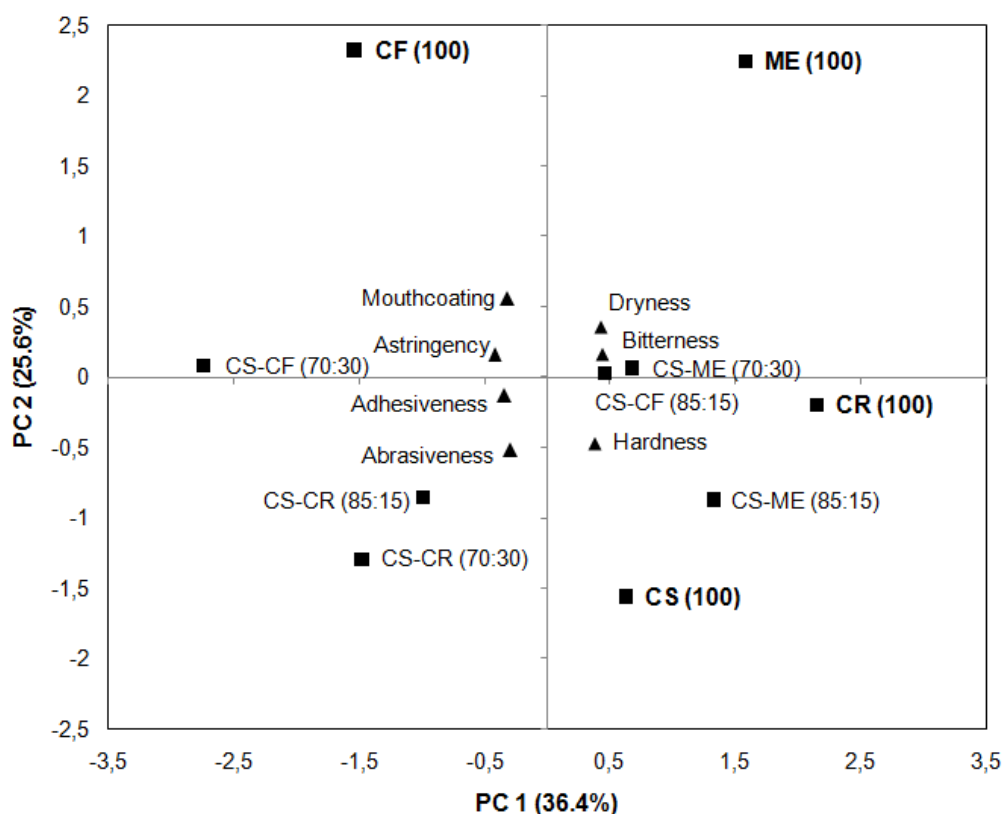
There were no differences in perceived astringency and bitterness. Regarding the chemical results of overall phenolic composition (Table 2), the differences among the blends were lower than the monovarietals, which could be a reason why no significant differences in astringency and bitterness were found. Based on the various flavan-3-ol fractions obtained by separation through Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges (Figure 3), differences were observed among the wine blends, with an increase in the polymeric and oligomeric fractions in some cases, which may cause an increase in such mouth-feel properties as astringency and bitterness. According to Vidal et al.<sup>36</sup> astringency is augmented when proanthocyanidin polymerisation increases. In this case, the increase in the concentration of flavan-3-ol polymers must have caused an increase in the sensory perception of astringency; the same should occur with the case of oligomers, which should be more bitter than astringent,<sup>8,36</sup> but the sensory panel did not perceive

these changes. Wine tasting depends on other factors, such as alcohol level, acidity, aromatic intensity and others parameters, which can influence these sensations.<sup>37,38</sup> However, these chemical parameters were similar for all the wines studied (Table 2), which shows that wine blending did not produce changes in astringency and bitterness, and even the perceived difference in the amount of wine modifier would not impact these characteristics. Although no differences were observed in bitterness and astringency, a different result was observed when analysing the mouth-feel descriptors. For the term “abrasiveness”, the CS (100) wine presented a higher value than the ME (100) and CR (100), with CF (100) presenting the lowest value. Blending with CF and CR produced an additive effect with regard to increasing this sensation in the wine blends. For the term “dryness”, all the monovarietal wines presented high values, and blending produced a decrease in this sensation. No clear relation was observed for “adhesiveness”.

In general terms, the monovarietal wines presented differences in the values of the mouth-feel properties, with the Cabernet Sauvignon wines showed higher values of “hardness”, “dryness” and “adhesiveness” and lower values of “mouthcoating”. Carménère was less abrasive and more dry; in contrast, Merlot and Cabernet Franc were less abrasive, less harsh, more dry and had more mouthcoating sensation. This attribute is associated with the sensation of a coating film that adheres to the mouth surfaces,<sup>26</sup> and the results clearly indicate that blending produced an increase in this sensation in the wine blends.

A principal component analysis (PCA) was performed to examine the interrelationships between the mouth-feel variables (Figure 4). The first two principal components (PCs), with eigenvalues > 1, explained 62.0% of the total variation: the first (PC1) and second (PC2) principal component explained 36.4% and 25.6%, respectively. The third and fourth PCs explained another 13.9% and 10.8% of the variation, respectively (data not shown). PC1 was most heavily loaded in the positive direction with “dryness” and “bitterness” and in the negative direction with “adhesiveness” and “astringency”. PC2 was positively loaded with “mouthcoating”, and in the negative direction with “abrasiveness” and “hardness”. Predictably, all four base wines were significantly different from each other and were located outside of the central region. The distribution of wines on the PCA illustrates that CS (100) and CR (100) were located in the right and lower part of the plot, which was dominated by the descriptor “hardness”. The wines blended with ME and CS-CF (85:15) were located near the descriptors “hardness”, “dryness” and “bitterness”. The wines blended with CR presented a higher relationship with the descriptors “adhesiveness” and

“abrasiveness”. Lastly, the wine blended with CF in a proportion of 30% and the monovarietal wine CF (100) wine were located in the left and upper part of the plot, which was dominated with the descriptors “mouthcoating” and “astringency”, particularly the CS-CF (70:30) wine. The high relationship between astringency and the CF (100) and CS-CF (70:30) wines could be due to the higher concentration of polymeric proanthocyanidins and total tannins in these wines (Table 2, Figure 3).



**Figure 4.** Principal component analysis showing descriptive analysis scores for the wine samples (n = 12 judges x 2 replicates). CS, Cabernet Sauvignon; CR, Carménère; ME, Merlot; CF, Cabernet Franc.

Although there were no differences in general astringency and bitterness (Table 5), these data confirm that the blending of wine produces changes in astringency quality descriptors, which, in some cases, depends of the amount of wine modifier used in the blend. Clearly, the wine blended with ME and CR showed descriptors grouped in harsh and drying terms, which are negative hedonic groups that suggest aspects of excessive unbalanced astringency, excessive roughness and/or bitterness and associated green flavour notes (Table 1). In contrast, the wines blended with CF showed descriptors grouped in complex terms that are a positive hedonic group

consisting of a pleasing astringent sensation, flavour and balanced acidity.<sup>26</sup> Astringency is one of the most important sensory characteristic of red wine,<sup>39,40</sup> thus understanding its presence is important. Indeed, balanced astringency is related to high-quality wines; therefore, if the astringency is too low, the wine could be considered flat and dull.<sup>6</sup> All the evaluated wines were astringent, but the differentiation in the type of perceived astringency may be important for wine consumers and the acceptance of these types of wines.

## **CONCLUSIONS**

The blending of wines leads to changes in chemical composition and mouth-feel sensations. Clearly, the monovarietal wines showed differences in their chemical composition, which impacted these same characteristics in the wine blends, though these differences were not dependent on the proportion of modifier wine used in some cases. The data for the analysis of the different fractions of proanthocyanidins after their separation by Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridges showed differences in the concentration but not in the proportion of fractions. In general terms, blending produced a decrease in the differences in concentration among the various wines blended. Although there was no differences in perceived astringency and bitterness, wine blending produced changes in mouth-feel descriptors that caused more positive characteristics with regard to astringency. This result of the oenological practice of blending may be important for enhancing certain mouth-feel characteristics in wines, which may be essential for improving wine quality and consumer acceptance.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by Conicyt-Chile (Grants Fondecyt 1080559 and 1110832). The authors are also grateful to Mr. Felipe Uribe from William Fèvre Winery (Maipo Valley, Chile) for providing the wines used in these studies.

## REFERENCES

- 1 Iacono F, Nicolini G and Alonzo E, Wine blending techniques and examples of qualitative result definition (sensory properties). *Vignevini* **26**: 81-86 (1999).
- 2 Monagas M, Bartolomé B and Gómez-Cordovés C, Effect of the modifier (Graciano vs. Cabernet Sauvignon) on blends of Tempranillo wine during ageing in the bottle. I. Anthocyanins, pyranoanthocyanins and non-anthocyanin phenolics. *LWT Food Sci Technol* **39**: 1133-1142 (2006).
- 3 Monagas M, Martín-Álvarez P, Gómez-Cordovés C and Bartolomé B, Effect of the modifier (Graciano vs. Cabernet Sauvignon) on blends of Tempranillo wine during ageing in the bottle. II. Colour and overall appreciation. *LWT Food Sci Technol* **40**: 107-115 (2007).
- 4 Dooley L, Threlfall R and Meullenet J, Optimization of blended wine quality through maximization of consumer liking. *Food Qual Prefer* **24**: 40-47 (2011).
- 5 Ferrier J and Block D, Neural-network-assisted optimization of wine blending based on sensory analysis. *Am J Enol Vitic* **52**: 386-395 (2001).
- 6 Gawel R, Red wine astringency: a review. *Aust J Grape Wine Res* **4**: 74-95 (1998).
- 7 Gawel R, Iland P and Francis, Characterizing the astringency of red wine: a case study. *Food Qual Prefer* **12**: 83-94 (2001).
- 8 Brossaud F, Cheynier V and Noble A, Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Aust J Grape Wine Res* **7**: 33-39 (2001).
- 9 Escudero-Gilete M, Gonzalez-Miret M and Heredia F, Implications of blending wines on the relationships between the color and the anthocyanic composition. *Food Res Int* **43**: 745-752 (2010).
- 10 Dooley L, Threlfall R, Meullenet J and Howard L, Compositional and sensory impacts from blending red wine varieties. *Am J Enol Vitic* **63**: 241-250 (2012).
- 11 Hopfer H, Ebeler S and Heymann H, How blending affects the sensory and chemical properties of red wine. *Am J Enol Vitic* **63**: 312-324 (2012).
- 12 SAG (Servicio Agrícola y Ganadero), *Catastro nacional de vides de vinificación 2013*. <http://www.sag.gob.cl> [11 mar 2013].
- 13 Granett J, Rooting out the wine plague. *Nature* **428**: 20 (2004).
- 14 Mattivi F, Vrhovsek U, Masuero D and Trainotti D, Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Aust J Grape Wine Res* **15**: 27-35 (2009).
- 15 Obreque-Slier E, Peña-Neira A, López-Solís R, Zamora-Marín F, Ricardo-Da Silva J and Laureano O, Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins

- from Carmènère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *J Agric Food Chem* **58**: 3591-3599 (2010).
- 16 OIV, *Compendium of international methods of wine and must analysis. Vol I-II, Sect 3*. Ed. OIV. Paris (2012).
- 17 Glories Y, 1984. La couleur des vins rouges, 2eme Partier. Mesure, origine et interpretation. *Conaiss Vigne Vin* **18**: 253-271 (1984).
- 18 Sarneckis C, Dambergs R, Jones P, Mercurio M, Herderich M and Smith, P. Quantification of condensed tannins by precipitation with methylcellulose: development and validation of an optimized tool for grape and wine analysis. *Aust J Grape Wine Res* **12**: 39-49 (2006).
- 19 Ribéreau-Gayon J and Stonestreet E, Le dosage des anthocyanies dans le vin rouge. *Bull Soc Chim* **9**: 2649-2652 (1965).
- 20 Pérez-Magariño S and González-Sanjosé M, Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. *Food Chem* **81**: 301-306 (2003).
- 21 Sun B, Leandro C, Ricardo da Silva J and Spranger I, Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J Agric Food Chem* **46**: 1390-1396 (1998).
- 22 Sun B, Ricardo da Silva J and Spranger I, Critical factors of the vanillin assay from catechins and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* **46**: 4267-4274 (1998).
- 23 Peña-Neira A, Hernández T, García-Vallejo C, Estrella I and Suarez J, A survey of phenolic compounds in Spanish wines from different geographical origins. *Eur Food Res Technol* **210**: 445-448 (2000).
- 24 Peña-Neira A, Cáceres A and Pastenes C, Low molecular weight phenolic and anthocyanins composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of cluster thinning and vineyard yield. *Food Sci Technol Int* **13**: 153-158 (2007).
- 25 Fanzone M, Peña-Neira A, Gil M, Jofré V, Assof M and Zamora F, Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. *Food Res Int* **45**: 402-414 (2012).
- 26 Gawel R, Oberholster A and Francis L, A "mouth-feel wheel": terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine. *Aust J Grape Wine Res* **6**: 203-207 (2000).
- 27 Vidal S, Francis L, Noble A, Kwiatkowski M, Cheynier V and Waters E, Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Anal Chim Acta* **513**: 57-65 (2004).

- 28 Ginjom I, D'Arcy B, Caffin N and Gidley M, Phenolic contents and antioxidants activities of major Australian red wines throughout the winemaking process. *J Agric Food Chem* **58**: 10133-10142 (2010).
- 29 Rezaei J and Reynolds A, Characterization of Niagara peninsula Cabernet Franc wines by sensory analysis. *Am J Enol Vitic* **61**: 1-14 (2010).
- 30 Di Profio F, Reynolds A and Kasimos A, Canopy management and enzyme impacts on Merlot, Cabernet Franc, and Cabernet Sauvignon. II. Wine composition and quality. *Am J Enol Vitic* **62**: 152-168 (2011).
- 31 Granato D, Katayama F and de Castro, Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chem* **129**: 366-373 (2011).
- 32 Kennedy J, Ferrier J, Harbertson J and Peyrot des Gachons C, Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *Am J Enol Vitic* **57**: 481-485 (2006).
- 33 Landon J, Weller K, Harbertson J and Ross C, Chemical and Sensory evaluation of astringency in Washington state red wines. *Am J Enol Vitic* **59**: 153-158 (2008).
- 34 Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B, Laureano O and Ricardo da Silva J, 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).
- 35 Cosme F, Ricardo-Da-Silva J and Laureano O, Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chem* **112**: 197-204 (2009).
- 36 Vidal S, Francis L, Guyot S, Marnet N, Kwiatkowski M, Gawel R, Cheynier V and Waters E, The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J Sci Food Agric* **83**: 564-573 (2003).
- 37 Fontoin H, Saucier C, Teissedre P and Glories Y, Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Qual Prefer* **19**: 286-291 (2008).
- 38 Obreque-Slier E, Peña-Neira A and López-Solís R, Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *J Agric Food Chem* **58**: 3729-3735 (2010).
- 39 Llaudy M, Canals R, Canals JM, Rozés N, Arola L and Zamora F, New method for evaluating astringency in red wine. *J Agric Food Chem* **52**: 742-746 (2004).

### **Capítulo III**

40 Lesschaeve I and Noble A, Polyphenols: Factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am J Clin Nutr* **81**: 330S-335S (2005).





## **Discusi3n** **general**

Las proantocianidinas son una de las clases de compuestos fenólicos más abundantes en la uva siendo factores importantes en la calidad del vino, debido a su rol en la astringencia y el amargor de estos (Brossaud et al., 2001; Kennedy et al., 2006). La composición y concentración de las proantocianidinas y de otros compuestos fenólicos dependerá de la materia prima, en este caso la uva y de las labores culturales y factores edafoclimáticos que la afecten (Haselgrove et al., 2000; Spayd et al., 2002; Downey et al., 2006). La madurez de la uva es uno de los factores que más influye sobre la calidad final del vino. La maduración y su correcto desarrollo es el resultado de fenómenos fisiológicos y bioquímicos que están ligados especialmente a las condiciones ambientales en donde se desarrolle la uva. Diversos cambios composicionales ocurren durante esta etapa afectando posteriormente a diversos compuestos químicos en la uva y especialmente a los compuestos fenólicos (Coombe y McCarthy, 2000; Kennedy et al., 2000; Gagné et al., 2006; Pastor del Rio y Kennedy, 2006).

En la primera parte de esta tesis, se estudió la composición fenólica y especialmente la concentración y proporción de las fracciones de proantocianidinas en los hollejos y semillas de las uvas del cv. Cabernet Sauvignon en dos fechas de muestreo. Para esto se utilizaron tres campos que producían uvas destinadas a tres vinos que diferían ampliamente en el precio que este alcanzaba en el mercado, localizados en el Valle de Aconcagua, zona central de Chile. Debido a que vinos que presentan un mayor valor en el mercado, pueden presentar una mayor concentración de compuestos fenólicos (Mercurio et al., 2010; Kassara y Kennedy, 2011; Fanzone et al., 2012a), se estudio si desde la uva se presentaba una composición diferente de metabolitos secundarios, entre categorías distintas de precio, que luego pudieran afectar la concentración y composición de compuestos fenólicos en los vinos elaborados de estas uvas. Es por esta razón que además se realizaron microvinificaciones de estas tres categorías de precio en las dos temporadas de estudio. En este caso las microvinificaciones contaron con tres repeticiones para que los resultados fueran válidos estadísticamente y se realizaron las mismas labores enológicas en las tres categorías de precio. De acuerdo a los resultados obtenidos no se encontraron grandes diferencias entre distintas categorías de precio, en cuanto a los análisis generales de la uva. En cuanto a los análisis fenólicos, solo se encontró una tendencia a que los hollejos de las uvas pertenecientes a una categoría de precio más alto presentarán una mayor concentración de proantocianidinas. Claramente estos resultados difieren al pensamiento generalizado de los enólogos que consideran que hay una relación positiva entre la composición química de la uva, especialmente en cuanto a su composición fenólica y el precio potencial del vino en el mercado, elaborado a partir de esas uvas. En este caso y

por los resultados de las dos temporadas de estudio esta relación no es tan clara. Además de lo anterior, no se encontraron diferencias en la proporción de las fracciones de proantocianidinas entre las tres categorías enológicas tanto en la uva como en los vinos. Antes de este estudio se pensaba que las diferentes categorías de precio diferían en cuanto a la composición de proantocianidinas, las cuales pueden entregar distintas sensaciones de astringencia y amargor (Gawel et al., 2001; Vidal et al., 2004a), pero por los resultados observados solo se diferencian en cuanto a la concentración de estas fracciones. Un resultado interesante se produce al observar lo que sucede en cuanto a la composición química de los hollejos y de las semillas en las dos temporadas. Claramente fueron los hollejos de las uvas, los que presentaron las mayores diferencias entre categorías de precio, las cuales se replicaron posteriormente en el vino. Esto puede deberse a la diferencia de extractabilidad que presentan estas dos estructuras, reduciendo la extracción de compuestos desde las semillas debido a una posible interacción con la pared celular y a un endurecimiento de la cubierta externa de esta (Hanlin et al., 2010). En este caso y por lo observado entre la composición química de los hollejos y el vino se puede demostrar una posible relación entre la concentración de proantocianidinas en los hollejos y el precio proyectado del vino (Kassara y Kennedy, 2011). Finalmente y como un resultado anexo a la finalidad de esta primera parte del estudio, se demostró que en climas cálidos como el que presenta la zona central de Chile (Montes et al., 2012), las diferencias que se pueden encontrar en concentración de compuestos fenólicos entre las distintas fechas de muestreo tienden a disminuir a medida que nos acercamos a la fecha de cosecha. Debido a las condiciones climáticas de la zona central de Chile que se caracteriza por la ausencia de precipitaciones durante la maduración de la uva, gran parte de las bodegas vitícolas, cosechan en forma tardía esperando una correcta “maduración fenólica”. Uvas más maduras pueden presentar una mejor extractabilidad de compuestos, tales como antocianos y proantocianidinas produciendo vinos más ricos en este tipo de compuestos, debido a las diferencias de la pared celular de la uva en polisacáridos, el contenido de celulosa y el grado de metilación de las pectinas que regularían esta extracción (Ortega-Regules et al., 2008). Claramente en nuestros resultados, hubo una disminución de los antocianos en los hollejos de la uva afectando posteriormente su concentración en el vino y en cuanto al nivel de proantocianidinas en los vinos, éste se vio mucho más afectado por la concentración proveniente desde los hollejos en vez de las semillas. Este resultado pone de manifiesto un gran problema al cosechar en forma tan tardía como se hace actualmente en el viñedo chileno, debido a un concepto errado por parte de los productores o a la inexperiencia en el uso de métodos para determinar la maduración fenólica de las uvas (Kontoudakis et

al., 2011), produciendo una disminución de ciertos compuestos en la uva, debido a fenómenos de degradación por sobre-maduración (Haselgrove et al., 2010) y una acumulación excesiva de azúcares con los consiguientes problemas en la fermentación de la uva y el alto grado alcohólico obtenido en el vino. Claramente estos problemas pueden afectar a los viñedos pertenecientes a distintas categorías de precio que pueden diferir en la época en que se cosechan privilegiando la “madurez fenólica” de ciertos campos por sobre otros, logrando con estos una pérdida de ciertos compuestos que inciden directamente en la calidad del vino tinto. En general las diferencias encontradas entre categorías de uvas no fueron referentes a la distinta composición de compuestos fenólicos o proporción de las distintas fracciones de flavanoles sino que más bien, las diferencias se deben a una distinta concentración de compuestos fenólicos, especialmente proantocianidinas y sus diferentes fracciones.

La segunda parte de esta tesis se enfocó en el estudio de metodologías de cuantificación de proantocianidinas en vinos blancos, vinos rosados y tintos, así como también en el impacto que presentan estos compuestos sobre las características de astringencia y amargor y sobre la aceptabilidad de los vinos. Es bien sabido que las proantocianidinas inciden directamente sobre la astringencia de los vinos (Gawel, 1998; Vidal et al., 2003). Debido a esto es que se compararon cuatro metodologías de cuantificación de proantocianidinas en vinos blancos, vinos rosados y en vinos tintos comerciales chilenos. Las cuatro metodologías fueron, la reacción de Bate-Smith (Bate-Smith, 1981), la precipitación mediante metilcelulosa (Sarneckis et al., 2006), la precipitación mediante el uso de seroalbúmina bovina (Harbertson et al., 2002) y la reacción mediante vainillina (Sun et al., 1998b). Por los resultados obtenidos, se observó que las cuatro metodologías presentaban amplias diferencias en cuanto a la concentración de proantocianidinas en un mismo vino evaluado, encontrándose diferencias de concentración de hasta 20 veces entre una metodología y otra. Esta diferencia de concentración puede ser un problema si se escoge una u otra metodología para cuantificar proantocianidinas. Además de la diferencia de concentración que presentó cada método también debemos tener en consideración los costos de los reactivos y la facilidad de implementación de la técnica, así como también la fiabilidad y repetitividad de esta. En la actualidad las bodegas de vinos demandan metodologías de fácil implementación, menor costo y que entreguen resultados rápidos y fiables (Sarneckis et al., 2006). Además, una misma metodología debiera servir para todo tipo de vino, sea este blanco o tinto. La experiencia demostró que solo el método de Bate-Smith y el de vainillina fueron capaces de cuantificar proantocianidinas en vinos blancos y vinos

rosados, siendo las metodologías basadas en precipitación (metilcelulosa y seroalbúmina) incapaces de cuantificar proantocianidinas en este tipo de vino.

Debido a que las proantocianidinas se perciben como astringentes en el vino, una buena metodología de cuantificación debiera ser capaz de ofrecer una buena correlación con la astringencia percibida mediante un panel sensorial. Debido al alto costo y a la subjetividad que puede presentar un análisis sensorial de astringencia (Valentová et al., 2002) es que se necesitan encontrar metodologías analíticas que se correlacionen de buen forma con la astringencia percibida y que sirva a las bodegas de vino como una nueva herramienta para cuantificar este importante parámetro en vinos tintos. Diversos estudios se han realizado para predecir la astringencia percibida (Hagerman and Butler, 1978; Harbertson et al., 2002; Llaudy et al., 2004; Monteleone et al., 2004; Condelli et al., 2006; Kennedy et al., 2006) pero el desarrollado por Sarneckis et al. (2006) usando metilcelulosa como agente precipitante fue el mejor debido a que mostró una mejor correlación con la astringencia percibida, concordando con lo expuestos por otros autores (Mercurio et al., 2007; Mercurio y Smith, 2008; Seddon y Downey, 2008), lo cual fue especialmente importante ya que se pudo estudiar lo que sucedía con este método usado ampliamente en el mundo con las características químicas de los vinos chilenos, que pueden diferir con vinos provenientes de otras partes del mundo. Es así que por la facilidad de uso y por los buenos resultados mostrados, el método de la metilcelulosa debiera ser el indicado para cuantificar proantocianidinas en vinos tintos.

En la segunda parte de este capítulo, se estudió la composición química de vinos comerciales chilenos del cv. Cabernet Sauvignon provenientes de distintas denominaciones de origen con el objetivo de comprobar si existía una relación entre el precio de venta y la composición química del vino. Los resultados mostraron que vinos con un mayor valor comercial presentaban una mayor concentración de compuestos fenólicos, especialmente en cuanto al contenido de fenoles totales y proantocianidinas totales. Claramente este resultado concuerda con lo observado por otros autores (Mercurio et al., 2010; Kassara y Kennedy, 2011; Fanzone et al., 2012a). Otro resultado interesante se presentó al cuantificar las distintas fracciones de proantocianidinas en los vinos comerciales. En este caso no se encontraron diferencias en cuanto a la proporción de estas fracciones pero si hubo diferencias claras en la concentración, mostrando que vinos con un mayor valor comercial presentaron una mayor concentración de polímeros de flavanol, esto además hizo que estos vinos se percibieran como más astringentes, debido principalmente a que el aumento en el grado de polimerización de las proantocianidinas hace que estos se perciban como más astringentes (Vidal et al., 2003). Aún cuando para el análisis de la composición química de los vinos se usaron análisis

químicos y fenólicos que pueden ser rutinarios para las bodegas de vino, el uso de técnicas multivariante con los resultados anteriores perfectamente pudo clasificar los vinos de acuerdo a su valor comercial. Además, el análisis de fraccionamiento de proantocianidinas mostró que la mayor fracción cuantificada en los vinos fue la fracción polimérica y que en todos los vinos estudiados, la fracción monomérica tuvo la menor concentración, sin diferencias de proporción entre fracciones en todos los vinos analizados.

De acuerdo a lo anterior y por los resultados observados en esta investigación, una mayor concentración de proantocianidinas en los vinos y de la fracción polimérica de flavanoles, produce vinos más astringentes, lo cual causó un menor nivel de aceptabilidad de estos vinos mediante un panel de consumidores. El resultado anterior además demostró que los consumidores prefieren vinos menos astringentes y que esto también difiere si los consumidores son hombres o mujeres. En este estudio se usaron vinos comerciales de los cv. Cabernet Sauvignon y Merlot los cuales diferían en su composición química, mostrando que los vinos del cv. Cabernet Sauvignon presentaban una mayor concentración de proantocianidinas totales y polímeros de flavanol, aunque la percepción sensorial de astringencia fue similar para ambos vinos. En este caso no solo debemos enfocarnos en la concentración y proporción de proantocianidinas sino que también en las características propias del vino, que pueden afectar en su conjunto la aceptabilidad del vino. El resultado anterior es importante desde el punto de vista de la calidad final de este. Claramente un vino sin astringencia se sentirá como falta de cuerpo, afectando su aceptabilidad, al igual que un vino excesivamente astringente (Lattey et al., 2010).

Una mayor o menor aceptación de un vino dependerá de las personas que conforman el panel, en este caso consumidores que quizás tienen poco conocimiento de las características gustativas de los vinos. Es bastante común que personas entrenadas en la degustación de vinos, como son los enólogos presenten diferencias de puntuación en vinos que provienen de bodegas o zonas geográficas diferentes (Gawel y Godden, 2008), sumado al hecho de las propias preferencias que pueda tener un enólogo por algún tipo especial de vino que puede jugar un rol más importante que el mero nivel de conocimiento o experiencia de este (Frost y Noble, 2002). Según los resultados exhibidos en este estudio, claramente la opinión que puede tener una persona entrenada y con conocimientos del vino (panel de expertos) difiere de los consumidores que solo degustan los vinos sin conocimientos demasiado profundos del tema (Lesschaeve, 2007). En este caso las metodologías analíticas que exhiban fuertes correlaciones entre el contenido de proantocianidinas y la aceptabilidad de los vinos son importantes para los productores de

vino, dándoles más herramientas para la toma de decisiones en la bodega, especialmente importantes para la comercialización del vino. Por otra parte, no existió una relación clara entre las fracciones monoméricas y oligoméricas con la sensación de amargor percibido por el panel sensorial, ni con el grado de aceptabilidad de los vinos. Esta baja relación pudo deberse a que al trabajar con vinos, diversas moléculas pueden producir la sensación de amargor y también a la variabilidad en cuanto a las personas que conformaban el panel, debido a la dificultad que presentan las personas en aislar este gusto, algo que es muy común en los consumidores chilenos. El proceso de compra de un vino dependerá de diversos factores, como la forma de la botella, precio, conocimiento de la marca, calidad del vino (Orth, 2005), pero claramente la sensación de astringencia y en menor medida el amargor, condiciona una menor aceptabilidad de los consumidores afectando la compra de este producto.

Como se pudo apreciar anteriormente, las proantocianidinas son muy importantes para las características gustativas de los vinos, es por esta razón que en la tercera y última parte de esta tesis, se estudió la composición fenólica y especialmente la proporción y concentración de proantocianidinas en vinos blancos del cv. Sauvignon Blanc, los cuales presentaban diferentes tratamientos tendientes a disminuir la concentración de compuestos fenólicos en estos vinos. Por otra parte se estudió la composición y concentración de compuestos fenólicos y fracciones de flavanoles en mezclas de vinos y como esta importante labor puede modificar las características químicas de estos.

En cuanto a los vinos blancos analizados, se estudiaron dos tipos de vinificación, una con presencia de gas inerte ( $\text{CO}_2$ ) y la otra en ausencia de gas inerte durante el proceso productivo. En este caso los vinos elaborados en presencia de gas inerte presentaron una mayor concentración de fenoles totales, lo cual pudo deberse a que la menor presencia de oxígeno en la vinificación causó una menor degradación de estos compuestos (Li et al., 2008). Por otra parte la vinificación con una u otra condición produjo diferencias en concentración y en proporción de las distintas fracciones de proantocianidinas, con una mayor concentración de monómeros de flavanol en vinos elaborados en presencia de gases inertes durante la vinificación. La vinificación en presencia de gases inertes, conocida como vinificación reductiva se usa extensamente en el mundo y también en Chile para la elaboración de vinos blancos con características distintivas de aromas y sabores propios de las variedades blancas. En este caso la presencia de gases inertes nos permite disminuir la oxidación que puede afectar a los aromas del vino, aumentando con esto la calidad organoléptica de este. El problema surge ya que debido a la ausencia de un agente oxidante todas las labores que extraen

compuestos fenólicos, tales como las maceraciones prefermentativas que se usan en la vinificación de vinos blancos, pueden producir una mayor acumulación de estos compuestos en el vino. En el último tiempo, los vinos blancos chilenos embotellados, luego de algunos meses se vuelven amargos, mostrando además una mayor coloración amarilla, producto principalmente de oxidaciones que disminuyen la calidad organoléptica del vino (Sioumis et al., 2006). La razón podría deberse a que el uso extensivo de gases inertes produce condiciones reductivas en la cuales los compuestos fenólicos no pueden degradarse pasando posteriormente a la botella, lo cual pudo corroborarse al observar la mayor concentración de compuestos fenólicos en los vinos elaborados en presencia de gases inertes. Además la diferencia de proporción en las distintas fracciones de proantocianidinas podría explicar el comportamiento anterior, debido a que la mayor concentración de la fracción monomérica en vinos elaborados en condiciones con presencia de gas inerte, sensorialmente pueden percibirse como más amargos (Peleg et al., 1999; Brossaud et al., 2001). En este caso el uso de condiciones oxidativas en la elaboración de vinos blancos puede ayudar a disminuir los compuestos fenólicos que son los sustratos oxidables para reacciones de pardeamiento, aunque esta práctica debiera realizarse con sumo cuidado para no afectar los aromas u otras características deseables de este tipo de vinos.

Por otra parte también se estudió el uso de diversas técnicas prefermentativas con el fin de modificar la composición fenólica de los vinos blancos. Los resultados mostraron que los vinos elaborados con uvas cosechadas tempranamente y que presentaban una menor dosis de polivinilpolipirrolidona (PVPP), tuvieron la mayor concentración de compuestos fenólicos. En este caso se demostró la necesidad de cosechar en la fecha correcta la uva, debido a la disminución que se produce en la concentración de proantocianidinas desde envero hasta la maduración de la uva (Harbertson et al., 2002), al igual que utilizar las dosis correctas de agentes clarificantes. Debido a que el agente PVPP en dosis altas, produce una disminución de compuestos fenólicos pero también de sustancias aromáticas con la consiguiente disminución de la calidad organoléptica del vino, se optó por utilizar una menor dosis. Esto puede ser favorable con el objeto de preservar el aroma del vino pero el mayor sustrato oxidable que permanece en el vino puede producir problemas posteriores causando una degradación de los aromas (Lund et al., 2009) afectando en forma negativa la calidad del vino. En cuanto a las características químicas de las proantocianidinas, los tratamientos prefermentativos produjeron diferencias en cuanto a la concentración de flavanoles, observándose que vinos elaborados con una menor dosis de PVPP, presentaron una mayor concentración de polímeros de flavanol. Debido a las implicaciones sensoriales que provocan las



## **Discusión general**

proantocianidinas en los vinos, estos tratamientos pueden afectar la astringencia y el amargor percibido del vino blanco, lo cual debiera ser corroborado con una evaluación sensorial de estos vinos.

Finalmente y en cuanto a los ensayos con las mezclas de vinos se utilizó como base el vino del cv. Cabernet Sauvignon y como complementos vinos de los cv. Carménère, Merlot y Cabernet Franc provenientes de una misma zona geográfica correspondiente a la zona central de Chile. En este caso se utilizaron proporciones de mezcla de un 30% y de un 15%. Los resultados obtenidos mostraron que los vinos monovarietales y las mezclas presentaron diferencias químicas en cuanto a la concentración de compuestos fenólicos, aunque éstas fueron independientes en algunos casos, con la proporción de los vinos usados en la mezcla. En cuanto a los resultados de las distintas fracciones de proantocianidinas, solo se encontraron diferencias en concentración pero no en proporción, mostrando una tendencia a un aumento de la fracción polimérica de proantocianidinas. Mediante análisis de componentes principales, se pudo corroborar que la labor de mezcla de vinos produjo una disminución de las diferencias de concentración en los vinos mezclados. La disminución provocó que sensorialmente no se encontraran diferencias en cuanto a la astringencia y amargor percibidos. La mezcla de vinos no provocó un aumento de la astringencia percibida pero si hubo una diferencia de percepción en el tipo de astringencia. Los resultados demuestran que la mezcla produce cambios en los descriptores bucales de astringencia produciendo características más positivas en este importante parámetro, lo cual puede ser importante para producir un aumento en las sensaciones bucales positivas en este tipo de vinos. Esto es importante desde el punto de vista de la mejora en la calidad organoléptica del vino mezclado (Monagas et al., 2006; Monagas et al., 2007; Hopfer et al., 2012), especialmente en cuanto a las características bucales de astringencia en los vinos, lo cual aporta nueva información sobre esta labor que es de suma importancia para aumentar la calidad y la aceptación por parte de los consumidores del vino tinto chileno.



## **Conclusiones y** **Perspectivas**

## Conclusiones generales

De acuerdo a lo planteado en las hipótesis y objetivos de la presente Tesis Doctoral, se ha realizado la caracterización de las distintas fracciones de flavanoles en uvas y vinos de los cv. Cabernet Sauvignon y Sauvignon Blanc y se ha demostrado la influencia que presentan estas fracciones sobre la astringencia y aceptabilidad de los vinos así como también que diversos manejos enológicos en vinos blancos y tintos pueden influir sobre la proporción y concentración de las distintas fracciones de flavanoles presentes estos. Asimismo se ha evaluado que la concentración y no la proporción de las distintas fracciones de flavanoles se pueden asociar al valor comercial de los vinos en el mercado.

La investigación efectuada en esta tesis pretende contribuir con nuevo conocimiento sobre los factores que pueden afectar a las proantocianidinas en dos de las variedades de mayor valor comercial en la vitivinicultura chilena como son Cabernet Sauvignon y Sauvignon Blanc.

A continuación se exponen las principales conclusiones derivadas de la misma.

**Capítulo 1.** Flavanoles en bayas del cv. Cabernet Sauvignon y su relación con la calidad enológica.

- ✓ El contenido de compuestos fenólicos en la uva no se relaciona en forma directa con el precio del vino producido con esta, ya que solo se aprecia que vinos de un mayor valor comercial provienen de uvas con una mayor concentración de proantocianidinas totales.
- ✓ Las uvas destinadas a vinos de un mayor valor comercial no difieren en cuanto a la proporción de las distintas fracciones de flavanoles, produciéndose solo una diferencia de concentración entre ellas.
- ✓ La maduración de la uva en las condiciones vitícolas chilenas produce una disminución en la concentración de compuestos fenólicos y se aprecia que la temporada de estudio incide en forma directa sobre la concentración de compuestos fenólicos evaluados..
- ✓ Las diferencias encontradas en la composición y concentración de compuestos fenólicos fueron más evidentes en los hollejos que en las semillas de las uvas.

## **Capítulo 2.** Flavanoles en vinos: comparación de métodos analíticos y su relación entre composición química y calidad sensorial.

- ✓ Las metodologías de cuantificación de proantocianidinas en vinos blancos, rosados y tintos difieren ampliamente en cuanto a la concentración de proantocianidinas medidas en los vinos.
- ✓ La composición química y fenólica de los vinos se encuentra en directa relación con el precio de adquisición de estos.
- ✓ Las distintas fracciones de flavanoles y especialmente la fracción polimérica, así como también la concentración de proantocianidinas, ejerce una influencia directa sobre la astringencia de los vinos, afectando la percepción sensorial de este parámetro, así como también la aceptabilidad de los vinos.

## **Capítulo 3.** Factores enológicos y su influencia sobre la composición de flavanoles en vinos blancos y tintos.

- ✓ La presencia de gas inerte en la vinificación de vinos blancos produjo cambios en la proporción y concentración de las fracciones de flavanoles, presentando además una relación directa sobre la concentración de compuestos fenólicos.
- ✓ Los diferentes tratamientos prefermentativos produjeron diferencias en la concentración de compuestos fenólicos y sobre la concentración y proporción de las distintas fracciones de flavanoles.
- ✓ La mezcla de vinos produjo que las diferencias encontradas en composición fenólica entre los vinos monovarietales disminuyeran al realizar la labor de mezcla.
- ✓ La mezcla de vinos no produjo cambios en la proporción de flavanoles pero si afectó la concentración de estos.
- ✓ La mezcla de vinos produjo cambios en los descriptores bucales de astringencia.

## **Perspectivas futuras**

En esta sección se mencionan algunos puntos importantes que pueden ser objeto de estudio de futuras investigaciones como complemento a los temas abordados en la presente Tesis Doctoral.

- Se sugiere continuar con la investigación desarrollada referente a la composición química de la uva aunque en otras zonas geográficas que presenten condiciones diferentes a este estudio con el fin de recabar más antecedentes sobre la relación existente entre la composición química de la uva y el precio de venta del vino elaborado con estas.
- Se sugiere investigar sobre los métodos de madurez fenólica con el fin de contar con un método simple y adecuado para estimar este importante parámetro, con el fin de predecir en forma correcta la fecha de cosecha de las uvas. Debido al fenómeno planteado en el Capítulo 1 de la presente tesis doctoral respecto a la degradación de los compuestos fenólicos debido al atraso en la cosecha de la uva, hay que tomar en consideración el creciente interés sobre las consecuencias que puede tener el calentamiento global sobre la viticultura chilena, especialmente referente a la excesiva acumulación de azúcares y aumento del pH en las zonas más cálidas de Chile. En este sentido la investigación también debiera estar asociada no solo a las variables vitícolas involucradas sino que también a los manejos enológicos en la bodega que permitan disminuir estos problemas, por medio del uso de técnicas que permitan variar el nivel de pH y contenido de alcohol de los vinos.
- Se sugiere investigar sobre el uso de otras técnicas de vinificación de vinos blancos o en otras variedades para ver el comportamiento sobre la proporción y concentración de las distintas fracciones de flavanoles y sobre la composición fenólica general de los vinos. También el uso de mezclas con vinos provenientes de diversas zonas geográficas o vinificados con otras técnicas de elaboración para apreciar el efecto sobre los parámetros evaluados en la presente investigación, así como también el efecto que tiene la guarda del vino sobre la composición y concentración de compuestos fenólicos.

## **Conclusiones y perspectivas**

- Continuar las investigaciones sobre la astringencia de los vinos, enfocándose principalmente en la percepción de este parámetro y como cambios en las condiciones de vinificación pueden influir en la mayor o menor percepción de este parámetro. Además y debido a que por los resultados del presente trabajo, se apreció que las diferencias encontradas en cuanto a astringencia, relación con el precio de mercado y factores enológicos se refieren a la concentración de proantocianidinas en vez de la diferencia de proporción entre sus distintas fracciones, es que se hace necesario investigar sobre otros parámetros que aparte de las proantocianidinas puedan afectar la calidad del vino. En este sentido la investigación sobre los polisacáridos del vino, los antocianos o una combinación de ambos, junto con las proantocianidinas, puede ayudar a comprender de mejor forma como la interacción de estos compuestos puede influir sobre la astringencia de los vinos y sobre la aceptabilidad de estos por parte de los consumidores.



**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 químicos**

### **3.1. Estándares químicos**

### **3.2. Solventes y otros reactivos**

## **4. Análisis de uvas**

### **4.1. Determinación de parámetros analíticos generales**

### **4.2. Preparación de extractos de hollejos y semillas**

### **4.3. Determinación de parámetros fenólicos generales**

### **4.4. Análisis de flavanoles**

#### **4.4.1. Fraccionamiento de flavanoles**

## **5. Análisis de vinos**

### **5.1. Determinación de parámetros analíticos generales**

### **5.2. Determinación de parámetros fenólicos generales**

### **5.3. Determinación de antocianinas individuales**

### **5.4. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular**

### **5.5. Análisis de flavanoles**

#### **5.5.1. Fraccionamiento de flavanoles**

### **5.6. Evaluación sensorial**

#### **5.6.1. Análisis descriptivo de astringencia y amargor**

#### **5.6.2. Aceptabilidad**

## **6. Análisis estadístico**



## 1. Lugar de trabajo

- El desarrollo experimental del presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Enología y Laboratorio de Cromatografía del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.
- El análisis sensorial de los vinos se realizó en el Laboratorio de Análisis Sensorial de Alimentos perteneciente al Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

## 2. Materiales

### 2.1. Instrumental analítico

- Cromatógrafo de fase líquida de alta resolución (HPLC-DAD) Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estados Unidos) equipado con un detector de diodos alineados (DAD) modelo G1315B, una bomba cuaternaria modelo Quatpump G1311A, un desgasificador modelo G1379A y un automuestreador modelo G1329A. La columna utilizada fue una Nova Pack C<sub>18</sub> de fase reversa (4 μm, 3,9 mm x 300 mm, Waters, Milford, MA, Estados Unidos). Este sistema cromatográfico se utilizó para el análisis de fenoles de bajo peso molecular.
- Cromatógrafo de fase líquida de alta resolución Merck-Hitachi modelo D-7000 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Alemania) equipado con un detector de diodos alineados modelo L-7455, una bomba modelo L-6200 y un automuestreador modelo L-7200. La columna utilizada fue una Chromolith C<sub>18</sub> (2 μm, 4,6 mm x 100 mm, Merck, Darmstadt, Alemania). Este sistema cromatográfico se utilizó para el análisis de antocianinas.
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 Pharmaspec (Shimadzu, Kyoto, Japón).
- Baño ultrasónico 2510 (Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, Estados Unidos).
- Agitador magnético Fisatom 754A (Fisatom, Sao Paulo, Brasil).
- Agitador mecánico MaxQ 2000 (Barnstead International Inc, Dubuque, IA, Estados Unidos)
- Balanza analítica Radwag AS 220/C/2 (Radwag, Radom, Polonia).
- Balanza Denver Instrument XL-3100 (Denver Instrument, Bohemia, NY, Estados Unidos).

- Mezclador Minipimer 3 (Braun GmbH, Kronberg, Alemania). Este equipo fue utilizado para la molienda de hollejos y semillas.
- Sistema de ultrapurificación de agua Helga Purelab Ultra MK2 (Veolia Water Solutions, Hertfordshire, Reino Unido).
- Centrífuga Heraeus Labofuge 400 (Heraeus, Hanau, Alemania).
- Baño María WB/OB 7-45 (Mettler GmbH, Büchenbach, Alemania).
- Vortex Bio Vortex UV1 (Biosan, Riga, Letonia).
- PHmetro Hanna Instrument B417 (Hanna Instrument, Woonsocket, RI, Estados Unidos).
- Rotovapor Büchi R-210 y baño Büchi B-491 (Büchi AG, Flawil, Suiza).
- Bomba vacío Boeco R-300 (Boeco, Hamburg, Alemania).
- Refractómetro Atago ATC-1 (Atago, Tokyo, Japón).
- Despalilladora y moledora semiautomática Eno 3 (Magusa, Vilafranca del Penedès, España)
- Prensa vertical de canastillo PV 50 (Magusa, Vilafranca del Penedès, España)
- Tanques de acero inoxidable para vinificación de 150 L con cierre hermético.
- Bidones de plástico de uso alimentario de 25 L (Plásticos Haddad, Santiago, Chile).
- Sistema de filtración por placas usando placas Filtrox AF-70 (Filtrox AG, St. Gallen, Suiza).
- Botellas de 750 mL modelo Burdeos (CristalChile S.A, Santiago, Chile).

## **2.2. Material volumétrico de vidrio y material auxiliar**

- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y de vidrio de 1 cm y 1 mm de paso óptico Starna Cells 1-Q-10 (Starna Cells Inc., Atascadero, CA, Estados Unidos).
- Matraces Erlenmeyer de 25, 50 y 250 mL (Schott Duran, Wertheim, Alemania).
- Matraces aforados de 20, 25, 50, 100, 200 y 500 mL (Schott Duran, Wertheim, Alemania).
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 250 mL (Schott Duran, Wertheim, Alemania).
- Matraz kitasato de 50 mL (Schott Duran, Wertheim, Alemania).
- Pipetas aforadas de 1, 2, 5 y 10 mL Precicolor (HBG, Giessen-Lützellinden, Alemania).
- Pipetas graduadas de 2, 5, 10, 20 y 25 mL Precicolor (HBG, Giessen-Lützellinden, Alemania).
- Embudos de decantación de 100 mL (Schott Duran, Wertheim, Alemania).

- Matraces corazón de 100 mL (Schott Duran, Wertheim, Alemania).
- Tubos plásticos de 15 mL con tapa (Miniplast Ein-Shemer, Ein Shemer, Israel).
- Tubos de vidrio de 10 mL con tapa rosca (Corning, Tewksbury, MA, Estados Unidos).
- Viales de vidrio con tapa rosca 100/PK (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estados Unidos).
- Densímetros de inmersión de vidrio (Boeco, Hamburg, Alemania)
- Termómetro de vidrio de alcohol rojo (Sato Keiryoki MFG, Tokyo, Japón)
- Jeringas plásticas descartables de 15 mL (Terumo, Elkton, MD, Estados Unidos).
- Cartuchos Sep-Pak Plus short tC<sub>18</sub> (400 mg) y Sep-Pak Plus environmental tC<sub>18</sub> (900 mg) (Waters, Milford, MA, Estados Unidos).
- Membranas PTFE de 0,22 µm de tamaño de poro (EMD Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos).
- Membranas PTFE de 0,45 µm de tamaño de poro (EMD Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos).
- Parafilm M (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, Estados Unidos).
- Gas nitrógeno (Indura S.A, Santiago, Chile).
- Portafiltro Swinnex 10/PK (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).
- Sistema de filtración (Advantec MFS Inc, Dublin, CA, Estados Unidos).
- Copas de degustación técnicas de color negro (Rcristal, Mendoza, Argentina).
- Copas de degustación técnicas Viticole D1476 (Arcoroc, Arques, Francia)

### 3. Reactivos químicos

#### 3.1. Estándares químicos

La (+)-catequina, (-)-epicatequina, ácido gálico, ácido caftarico, ácido cutárico, ácido *p*-cumárico, ácido protocatéuico, ácido caféico, ácido ferúlico, quercetina, miricetina, kaempferol y malvidina-3-glucósido fueron adquiridos en Sigma Chemical (St. Louis, MO, Estados Unidos).

#### 3.2. Solventes y otros reactivos

La metilcelulosa (1500 cP, viscosidad al 2%), seroalbúmina bovina (fracción V, polvo liofilizado), dodecilsulfato de sodio, trietanolamina y cloruro férrico hexahidratado se adquirieron en Sigma Chemical (St. Louis, MO, Estados Unidos). El sulfato de amonio, metabisulfito de sodio, sulfato de sodio anhidro, ácido ascórbico, bitartrato de

potasio, vainillina, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, etanol, metanol, acetato de etilo, éter dietílico, ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético, acetonitrilo, acetona, ácido acético, ácido fórmico, D (+)-glucosa, ácido L(+)-tartárico y carbón activado fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania). El buffer fosfato (67 mM, pH 7,0) se adquirió en Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, Estados Unidos). La gelatina Gelarom se adquirió en Partner S.A (Santiago, Chile). Todos los reactivos fueron de grado analítico. El agua desionizada usada en todas las soluciones preparadas se obtuvo a través de un sistema de ultrapurificación Helga Purelab Ultra MK2 (Veolia Water Solutions, Hertfordshire, Reino Unido). Levadura Uvaferm VRB (Lallemand, Montreal, Canada). Fosfato diamónico. Bacterias lácticas VP-41 (Lallemand, Montreal, Canada).

#### **4. Análisis de uvas**

##### **4.1. Determinación de parámetros analíticos generales**

Se seleccionaron en forma aleatoria 100 bayas y posteriormente se colocaron en una bolsa plástica y se presionaron en forma manual para obtener mosto. Este mosto se filtró a través de una malla plástica para eliminar los residuos sólidos y el mosto obtenido se utilizó para medir sólidos solubles (°Brix) siguiendo los procedimientos descritos por la Oficina Internacional de la Vid y el Vino (OIV, 2011). Los análisis fueron realizados por triplicado.

##### **4.2. Preparación de extractos de hollejos y semillas**

Con el objetivo de analizar los compuestos fenólicos presentes en las uvas, se procedió a la extracción de estos desde los hollejos y las semillas de las uvas. Se utilizó la metodología descrita por Venencie et al. (1997). Se seleccionaron 100 bayas por cada repetición, las cuales se pesaron y se procedió a la separación manual de hollejos y semillas. Posteriormente se procedió a efectuar la extracción de los compuestos fenólicos para cada fracción por separado según el siguiente procedimiento: se realizó la molienda de cada fracción con 30 mL de agua y 40 mL de solución hidroalcohólica (1:9 v/v etanol/agua; 5 g/L de ácido tartárico), esta solución se colocó en un matraz erlenmeyer de 250 mL y se ajustó el peso de la misma con la misma solución hidroalcohólica a 200 g, ajustando el pH a 3,6 con NaOH o HCl. Los extractos fueron macerados durante 2 horas a 25 °C, en un agitador mecánico. Las partes sólidas se separaron del líquido y este se centrifugó durante 20 min a 3500 rpm. Finalmente, la solución se filtró a través de una membrana de celulosa de 0,45 µm y

se colocó en frascos de color ámbar conservándose refrigerado a 5 °C hasta el momento del análisis.

#### 4.3. Determinación de parámetros fenólicos generales

La determinación de los parámetros fenólicos generales fue realizada por espectrofotometría utilizando 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 1:20) con agua y se midió la absorbancia a 280 nm, utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Glories, 1984). La concentración de fenoles totales en la muestra fue calculada a partir de una curva de calibración elaborada con ácido gálico empleando soluciones patrones (por triplicado) en el rango comprendido entre 5 y 50 mg/L ( $r^2=0,99$ ). Los resultados fueron expresados en miligramos de equivalente de ácido gálico por gramo de muestra (EAG, mg/g).
- **Antocianos totales:** se realizó una dilución de la muestra con una solución de HCl al 2% en etanol, la cual se dividió en dos tubos, al tubo A se le adicionó una solución de metabisulfito de sodio al 15% (p/v, en agua desionizada), en cambio al tubo B se le adicionó agua. Después de 20 min de reacción, se efectuó la medición de la absorbancia de ambos tubos (A y B) a 520 nm en cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1965). La concentración de antocianos se calculó a través de la diferencias entre ambos tubos, a partir de una curva de calibración realizada con malvidina-3-glucósido empleando soluciones patrones (por triplicado) en el rango comprendido entre 0 y 1500 mg/L ( $r^2=0,99$ ). Los resultados se expresaron en miligramos de malvidina por g de muestra (malvidina, mg/g).
- **Proantocianidinas totales:** se aplicó la metodología descrita por Ribéreau-Gayon y Stonestreet, (1966) y Bate-Smith (1981). Se realizó una dilución de la muestra 1:50 con agua desionizada y se tomaron dos alícuotas en tubos de ensayo (A y B) y a cada uno se adicionó 4 mL de la muestra diluida, 2 mL de agua y 6 mL de ácido clorhídrico. El tubo A se colocó en baño maría a 100 °C por 30 min y el tubo B (control) se dejó reposar en oscuridad por el mismo tiempo. Luego que el tubo A se enfriara, a ambos tubos se les adicionó 1 mL de etanol. Posteriormente se efectuó la medición de absorbancia de ambas alícuotas (A y B) a 550 nm en una cubeta de 1 cm de paso óptico. La concentración de proantocianidinas se calculó como la diferencia de ambos tubos multiplicado por el factor 19,33 y la

concentración de proantocianidinas se expresó como miligramos de equivalente de (+)-catequina por gramo de muestra (CE, mg/g).

#### **4.4. Análisis de flavanoles**

##### **4.4.1. Fraccionamiento de flavanoles**

Las muestras de extractos de hollejos y semillas fueron sometidas al método de fraccionamiento de flavanoles mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE), siguiendo la metodología propuesta por Sun et al. (1998a). El procedimiento resumido fue el siguiente: se tomaron 7 mL de extracto de hollejos o semillas (M) y se concentraron a sequedad en un evaporador al vacío a menos de 30°C. El extracto obtenido se disolvió en 20 mL de buffer fosfato (67 mM, pH 7,0). El pH de esta solución se ajustó a un pH 7,0 con adición de NaOH o HCl, bajo una atmósfera protegida con nitrógeno. En forma paralela, se preparó el sistema de SPE constituido por dos cartuchos Sep-Pak tC<sub>18</sub> ensamblados en serie (Environmental tC<sub>18</sub> (900 mg) en la parte superior y Short tC<sub>18</sub> (400 mg) en la parte inferior), los cuales se acondicionaron en forma secuencial con metanol (10 mL), agua desionizada (2x10 mL), y buffer fosfato (10 mL). Las muestras se pasaron a través de los cartuchos a un flujo no mayor a 2 mL/min, y los ácidos fenólicos se eliminaron mediante el paso de 10 mL de buffer fosfato. Una vez efectuado este paso los cartuchos se secaron con nitrógeno gaseoso durante 2 h. 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 eluido se evaporó a sequedad bajo vacío, se redisolvió con 5 mL de buffer fosfato y se recargó en la misma serie de cartuchos que se acondicionaron previamente tal como se describió anteriormente. Los cartuchos nuevamente se secaron con nitrógeno y se realizó la elución secuencial de la FI y la FII con 25 mL de éter dietílico y 15 mL de metanol, respectivamente. Las tres fracciones (FI, FII y FIII) se evaporaron hasta la sequedad bajo vacío y se redisolviéron finalmente en 3 mL de metanol (DI, DII y DIII) para su análisis.

La cuantificación del contenido total de flavanoles en cada fracción se llevó a cabo mediante el ensayo con vainillina (Sun et al., 1998b). El procedimiento resumido fue el siguiente: se tomaron dos tubos de vidrio y se adicionaron, a cada uno, 1 mL de muestra (DI, DII o DIII) y 2,5 mL de solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/metanol (25/75, v/v). A uno de ellos se le agregó 2,5 mL de una solución al 1% de vainillina en metanol (p/v) y al restante 2,5 mL de metanol (control). Los tubos se mantuvieron a una temperatura de

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 la absorbancia a 500 nm. Los análisis se hicieron por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo a través de curvas de calibración preparadas partir de (+)-catequina y proantocianidinas oligoméricas y poliméricas purificadas de semillas de uva, tal como se describió previamente (Sun et al., 1998b). Los resultados de cada fracción fueron expresados en mg/kg, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{Monómeros (mg/kg)} = (A_{500\text{nm}} \times \text{DI} \times 200) / (0,0081 \times \text{M} \times \text{P} \times 1000)$$

$$\text{Oligómeros (mg/kg)} = (A_{500\text{nm}} \times \text{DII} \times 200) / (0,0046 \times \text{M} \times \text{P} \times 1000)$$

$$\text{Polímeros (mg/kg)} = (A_{500\text{nm}} \times \text{DIII} \times 200) / (0,0037 \times \text{M} \times \text{P} \times 1000)$$

Donde  $A_{500\text{nm}}$ , es la diferencia entre la absorbancia de la muestra y el control. P es el peso de la muestra en gramos.

## 5. Análisis de vinos

### 5.1. Determinación de parámetros analíticos generales

El análisis de acidez titulable (ácido sulfúrico, g/L), pH, contenido de azúcares (glucosa, g/L) y contenido de alcohol (% v/v) fue realizado siguiendo los procedimientos analíticos descritos por la Oficina Internacional de la Vid y el Vino (OIV, 2011). Los análisis fueron realizados por triplicado.

### 5.2. Determinación de parámetros fenólicos generales

La determinación de los parámetros fenólicos generales fue realizada por espectrofotometría utilizando el instrumental descrito en el ítem 2.1. Las muestras previamente se filtraron mediante membranas PTFE de 0,45 µm de tamaño de poro. Todos los análisis fueron realizados por triplicado. Para la determinación de fenoles totales (mg/L), antocianos totales (mg/L) y proantocianidinas totales (mg/L), se siguieron los procedimientos detallados en el ítem 4.3. Los análisis complementarios realizados a los vinos fueron:

- **Proantocianidinas totales por MCP:** se aplicó la metodología descrita por Sarneckis et al. (2006) con algunas modificaciones. Este método se basa en el uso de metilcelulosa como agente precipitante, produciendo una agregación entre la metilcelulosa y las proantocianidinas presentes en la muestra provocando su precipitación. En un tubo de centrifugado de 10 mL (A) se adicionan 0,25 mL de

vino y 3 mL de una solución al 0,04% de metilcelulosa (p/v, en agua desionizada). El tubo se cierra, se agita y se deja reposar por 2-3 min. Al mismo tubo se le adicionan 2 mL de una solución saturada de sulfato de amonio (43,47% p/v, en agua desionizada), adicionando agua hasta completar un volumen de 10 mL, agitando nuevamente y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Para el tubo control (B) se aplicó la misma metodología exceptuando la adición de la solución de metilcelulosa. Posteriormente, se efectuó la medición de la absorbancia de ambos tubos (A y B) a 280 nm, en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La concentración de proantocianidinas totales se calculó a través de la diferencia de ambos tubos, mediante una curva de calibración elaborada con (+)-catequina y soluciones hidroalcohólicas (10% etanol y pH 3,5) en un rango de concentración de 5 a 50 mg/L ( $r^2=0,99$ ) (por triplicado). Los resultados finales se expresaron en miligramos de (+)-catequina por litro de muestra ((+)-catequina, mg/L).

- **Proantocianidinas totales por BSA:** se utilizó la metodología propuesta por Harbertson et al. (2002) usando seroalbúmina bovina (BSA) como agente precipitante. Se preparó una solución de proteína con una concentración de 1 mg/mL en una solución buffer (200 mM de ácido acético, 170 mM de cloruro de sodio, pH 4,9). 1 mL de vino se diluyó en una proporción 1:1 con un solución de vino modelo (12:88 v/v etanol/agua, 5 g/L de bitartrato de potasio, pH 3,3). En un tubo de centrifuga se agregaron 1 mL de la solución de proteína, y 500  $\mu$ L de la solución de vino diluido, agitando suavemente y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, la muestra se centrifugó por 15 min a 3500 rpm, observándose posteriormente la formación de un pellet tanino-proteína. La solución sobrenadante se retiró cuidadosamente del tubo y en seguida se adicionaron 250  $\mu$ L de la misma solución buffer usada para disolver la proteína. El tubo se centrifugó por 4 min a 3500 rpm. Luego de esto la solución sobrenadante se eliminó y se adicionaron 875  $\mu$ L de una solución buffer (A) que contenía 5% de trietanolamina (v/v) y 10% de dodecil sulfato de sodio (v/v), dejando el tubo reposar por 10 min. Posteriormente el tubo se agitó en un vortex hasta disolver por completo el pellet tanino-proteína. Luego de disolver el pellet, la muestra se dejó reposar por 10 min y luego se leyó su absorbancia a 510 nm usando el buffer A como blanco en una cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico. Después de la lectura, al tubo se adicionaron 125  $\mu$ L de un solución de reactivo de cloruro férrico hexahidratado (B) (0,676 g cloruro férrico, 250 mL agua, 250  $\mu$ L HCl), se agitó, se dejó reposar por 10 min y nuevamente se leyó su absorbancia a



510 nm utilizando como blanco una solución compuesta por 26 µL de solución A y 38 µL de solución B. La concentración de proantocianidinas totales se calculó a través de la diferencia de ambos tubos, a partir de una curva de calibración elaborada con (+)-catequina y soluciones hidroalcohólicas (10% etanol y pH 3,5) en un rango de concentración de 50 a 300 mg/L ( $r^2=0,99$ ) (por triplicado). Los resultados finales se expresaron en gramos de (+)-catequina por litro de muestra ((+)-catequina, g/L).

- **Intensidad colorante y tonalidad:** 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 (1984), calculándose los siguientes índices:

$$\text{Intensidad colorante (IC)} = (A_{420\text{nm}} + A_{520\text{nm}} + A_{620\text{nm}}) \times 10$$

$$\text{Tonalidad (matiz)} = (A_{420\text{nm}} / A_{520\text{nm}}) \times 100$$

- **Índices colorimétricos:** a partir de las mediciones directas de la absorbancia de la muestra a 420, 520 y 620 nm en una cubeta de vidrio de 1 mm de paso óptico, se calcularon los siguientes índices (Glories, 1984):

$$\% \text{ de color amarillo} = (A_{420\text{nm}} / \text{IC}) \times 1000$$

$$\% \text{ de color rojo} = (A_{520\text{nm}} / \text{IC}) \times 1000$$

$$\% \text{ de color azul} = (A_{620\text{nm}} / \text{IC}) \times 1000$$

- **Parámetros de color según método CIELab:** las coordenadas  $L^*$  (luminosidad),  $C^*$  (saturación) y  $h^*$  (tonalidad) fueron determinadas de acuerdo a Pérez-Magariño y González-San José (2003).

### 5.3. Determinación de antocianinas individuales

La caracterización y cuantificación de antocianinas individuales se realizó por HPLC-DAD utilizando el instrumental descrito en el ítem 2.1. Para la separación se utilizaron dos fases móviles: A, agua/ácido fórmico (90:10 v/v) y B, acetonitrilo con un flujo de 1,1 mL/min desde los 0 a 22 min y 1,5 mL/min desde los 22 a 35 min según el siguiente gradiente: 96-85% A desde los 0 a 12 min, 85-15% A desde los 12 a 22 min y 85-70% A desde los 22 a 35 min. Se inyectaron 150 µL de la muestra previamente filtrada mediante membranas PTFE de 0,22 µm. El detector de diodos se ajustó desde los 210 a 600 nm y la cuantificación se determinó mediante la medición de los picos a

520 nm. La cuantificación de las antocianinas se calculó a partir de una curva de calibración elaborada con malvidina-3-glucósido como estándar en soluciones patrones bajo las mismas condiciones de las muestras analizadas y se expresó como mg/L de vino. Todos los análisis se realizaron por triplicado (Peña-Neira et al., 2007).

#### **5.4. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular**

La caracterización y cuantificación de fenoles de bajo peso molecular se realizó por HPLC-DAD utilizando el instrumental descrito en el ítem 2.1. Previamente a la separación cromatográfica, la muestra debe purificarse y concentrarse mediante la técnica de extracción líquido-líquido (Peña-Neira et al., 2007) como se resume a continuación: En un embudo de decantación se colocaron 50 mL de muestra 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 matraz erlenmeyer de 250 mL, luego se adicionaron 4 g de sulfato de sodio anhidro para eliminar cualquier resto de agua y se dejó reposar por 30 min. Posteriormente el extracto se filtró mediante una membrana de celulosa y se evaporó al vacío hasta sequedad en un rotovapor a una temperatura no mayor a 30 °C. Finalmente el extracto se redisolvió en 2 mL de metanol/agua (1:1), se filtró a través de una membrana PTFE de 0,22 µm y se inyectaron 25 µL al sistema cromatográfico. Para la separación se utilizaron dos fases móviles: A, agua/ácido acético (98:2, v/v) y B, agua/acetonitrilo/ácido acético (78:20:2, v/v/v) con un flujo de 1,0 mL/min desde los 0 a 55 min y 1,2 mL/min desde los 55 a 90 min según el siguiente gradiente: 100-20% A desde los 0 a 55 min, 20-10% A desde los 55 a 57 min, 10-0% A desde los 57 a 90 min, seguido de un lavado con un 100% de metanol y posterior restablecimiento de las condiciones iniciales hasta equilibrar el sistema. La detección fue realizada en todo el espectro comprendido entre 210 y 360 nm. Cada pico en los cromatogramas se caracterizó mediante su tiempo de retención y su espectro de absorción. La identificación de los compuestos específicos se realizó mediante la comparación de su espectro y el tiempo de retención comparándolos con los 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, bajo las mismas condiciones que las muestras analizadas. La concentración de cada compuesto se expresó como mg/L de vino. Todos los análisis, incluyendo las extracciones líquido-líquido, fueron realizados por triplicado.

## 5.5. Análisis de flavanoles

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

Las muestras de vinos fueron sometidas al método de fraccionamiento de flavanoles mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE), siguiendo el mismo procedimiento indicado en el ítem 4.4.1. Los resultados de cada fracción fueron expresados en mg/L, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{Monómeros (mg/L)} = (A_{500\text{nm}} \times \text{DI}) / (0,0081 \times \text{M})$$

$$\text{Oligómeros (mg/L)} = (A_{500\text{nm}} \times \text{DII}) / (0,0046 \times \text{M})$$

$$\text{Polímeros (mg/L)} = (A_{500\text{nm}} \times \text{DIII}) / (0,0037 \times \text{M})$$

Donde  $A_{500\text{nm}}$ , es la diferencia entre la absorbancia de la muestra y el control.

## 5.6. Evaluación sensorial

### 5.6.1. Análisis descriptivo

Esta herramienta se utilizó con el objetivo de cuantificar las características sensoriales de los vinos en cuanto a ciertos parámetros evaluados. En este caso se usaron copas de degustación de color negro con el fin de evitar cualquier interferencia de color del vino con la percepción en boca de los parámetros evaluados. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, esta metodología se aplicó para el estudio de vinos del cv. Cabernet Sauvignon (Subcapítulo II.1 y Subcapítulo II.2), la comparación de los cv. Cabernet Sauvignon y Merlot (Subcapítulo II.3) y la evaluación de los vinos mezclados del Cv. Cabernet Sauvignon con los cv. Merlot, Cabernet Franc y Carménère (Subcapítulo III.2).

Todos los vinos se evaluaron por un panel de degustadores conformado por 12 panelistas pertenecientes al Departamento de Agroindustria y Enología de la Universidad de Chile. Estos degustadores forman parte de un panel de análisis sensorial que participa regularmente en la evaluación de vinos tintos y blancos de diferentes cultivares. Antes de cada evaluación, se realizó una sesión de prueba para estandarizar los criterios dentro del mismo panel. Las sesiones de degustación fueron diferentes dependiendo del ensayo evaluado.

El análisis sensorial se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Sensorial de Alimentos perteneciente al Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad

de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, el cual cuenta con casetas individuales de evaluación. En todas las evaluaciones se sirvieron aproximadamente 20 mL de vino el cual fue servido en un orden completamente aleatorizado, a una temperatura de 18-19°C, en copas de color negro (RCristal, Mendoza, Argentina) etiquetadas con códigos de tres dígitos. En cada evaluación se forzó a los panelistas a tener un descanso de 30 segundos o 1 minuto entre la degustación de cada muestra y además del agua desionizada de enjuague se utilizaron galletas sin sal. Para las evaluaciones del Subcapítulo II.1 se utilizó el descriptor astringencia y para las evaluaciones del Subcapítulo II.2 y II.3, se utilizaron los descriptores astringencia y amargor. En cuanto a las evaluaciones del Subcapítulo III.2 se evaluaron los descriptores astringencia y amargor. Además se realizó un análisis descriptivo de la astringencia percibida mediante 5 parámetros utilizados en estudios previos en vinos tintos (Gawel et al., 2000). Todas las evaluaciones sensoriales se hicieron en duplicado. La intensidad de los atributos se determinó mediante una escala de 15 centímetros, en donde el valor 0 corresponde a ausencia de sensación y el valor 15 corresponde a la intensidad máxima del atributo. Los datos sensoriales se recopilaron mediante una pauta en papel.

### **5.6.2. Aceptabilidad**

Esta herramienta se utilizó con el objetivo de cuantificar la aceptabilidad de los vinos mediante el uso de un panel de consumidores. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, esta metodología se aplicó para el estudio de vinos de los cv. Cabernet Sauvignon y Merlot (Subcapítulo II.3). Todos los vinos se evaluaron mediante un panel de consumidores conformado por 68 personas (39 hombres y 29 mujeres) con un rango de edad entre los 24 a 55 años. La selección de los consumidores se realizó en las dependencias del Campus Antumapu perteneciente a la Universidad de Chile, con estudiantes y trabajadores de estas dependencias. Se realizó un pequeño cuestionario en donde se preguntó la edad y el consumo de vino de las personas. Finalmente se utilizaron personas que consumieran al menos vino 3 veces a la semana. Se realizaron 3 sesiones de 180 min de duración durante 3 días consecutivos. En cada día, se evaluaron 1 grupo de vinos del cv. Cabernet Sauvignon, (6 vinos por grupo) y 1 grupo de vinos del cv. Merlot (6 vinos por grupo). En cada sesión, a cada evaluador se le sirvieron 12 vinos, con un descanso de 15 min cada 6 vinos evaluados. Se utilizó como enjuague agua desionizada. Se sirvieron aproximadamente 20 mL de vino en copas técnicas transparentes (Arcoroc, Arques, Francia) codificadas con números de 3 dígitos a una temperatura aproximada de 18-19°C. La presentación de los vinos en las

bandejas se hizo de forma completamente aleatorizada. La aceptabilidad de los vinos se puntuó mediante una escala de 15 puntos. Los datos sensoriales se recopilaron mediante una pauta en papel.

## **6. Análisis estadístico**

Los resultados de cada parámetro fueron expresados como el promedio de las tres repeticiones con la correspondiente desviación estándar. Antes de efectuar los análisis estadísticos, se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks  $W$  y se evaluó la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Cochran. Entre los análisis estadísticos realizados en la Tesis Doctoral se pueden nombrar: Análisis de varianza unifactorial o multifactorial (ANOVA) y comparación múltiple de medias mediante el test de Tukey HSD (*honestly significant difference*), utilizado en los análisis químicos y sensoriales y comparación de medias mediante el test  $t$ -Student. Se realizó además análisis de correlación de Pearson, especialmente para relacionar las variables químicas con las variables sensoriales, verificando que los residuos del modelo fueran independientes, mediante el test de Durbin-Watson. Todos los estudios estadísticos se realizaron con un nivel de significancia del 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

Con el objetivo de identificar relaciones entre las muestras analizadas, se aplicaron herramientas de análisis multivariante. Se utilizó el análisis canónico discriminante (ACD) como método de clasificación acoplado a un análisis exploratorio de datos de “selección hacia atrás” (*backward selection method*). Esta última técnica consiste en partir con todas las variables del estudio y probar su significancia estadística, eliminando las no significativas, permitiendo reducir el conjunto de datos y preservando la máxima cantidad de información.

Además se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de los atributos que eran significativamente diferentes de acuerdo al análisis de varianza. Este análisis se hizo para relacionar las variables del análisis químico y sensorial (Subcapítulo III.2).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Statgraphics Centurion versión 15.2 (Statpoint Technologies Inc. Warrenton, VA, Estados Unidos) y Microsoft Excel 2007 versión 12.0 (Microsoft Corp, Redmond, Washington, Estados Unidos).



## **Bibliografía**

- Adams, D. 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 57. 249-256.
- Adler, E.; Hoon, M.; Mueller, K.; Chandrashekar, J.; Ryba, N. and Zuker, C. 2000. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell.* 6. 693-702.
- Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M.; Santos-Buelga, C. and Rivas-Gonzalo, J. 2006. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. *Anal. Chim. Acta.* 563. 238-254.
- Alén-Ruiz, F.; García-Falcón, M.; Pérez-Lamela, M.; Martínez-Carballo, E. and Simal-Gándara, J. 2009. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chem.* 113 (1). 53-60.
- Amati, A.; Piva, A.; Castellari, M. and Arfelli, G. 1996. Preliminary studies on the effect of *Oidium tuckeri* on the phenolic composition of grapes and wine. *Vitis.* 35. 149-150.
- Arozarena, I.; Ayestarán, B.; Cantalejo, M.; Navarro, M.; Vera, M.; Abril, I. and Casp, A. 2002. Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyard over two years. *Eur. Food Res. Technol.* 214. 303-309.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 1989. Standard definitions of terms relating to sensory evaluation of materials and products. Annual Book of ASTM. USA
- Barber, N. and Almanza, B. 2006. Influence of wine packaging on consumers' decision to purchase. *J. Foodservice Buss Res.* 9 (4). 83-98.
- Bate-Smith, E. 1981. Astringent tannins of the leaves of *Geranium* species. *Phytochemistry.* 20. 211-216.
- Baumes, R.; Wirth, J.; Bureau, S.; Gunata, Y. and 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.
- Baxter, I.; Young, J.; Armstrong, G.; Foster, N.; Bogenschutz, N.; Cordova, T.; Peer, W.; Hazen, S.; Murphy, A. and Harper, J. 2005. A plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is required for the formation of proanthocyanidins in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102. 2649-2654.
- Berké, B. and De Freitas, V. 2005. Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin. *Food Chem.* 90. 453-460.
- Bindon, K. and Kennedy, J. 2011. Ripening-induced changes in grape skin proanthocyanidins modify their interaction with cell walls. *J. Agric. Food Chem.* 59. 2696-2707.
- Bishop, P. and Nagel, C. 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. and 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.; Laffé, F.; Takos, A.; Walker, A. and Robinson, S. 2007. The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiol.* 143. 1347-1361.
- Boulton, R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (2). 67-87.
- Brannan, G.; Setser, C. and Kemp, K. 2001. Interaction of astringency and taste characteristics. *J. Sensory Stud.* 2. 179-197.
- Brossaud, F.; Cheynier, V. and Noble, A. 2001. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7. 33-39.
- Brouillard, R. and Dangles, O. 1994. Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chem.* 51. 365-371.
- Burns, J.; Mullen, W.; Landrault, N.; Teissedre, P.; Lean, M. and Crozier, A. 2002. Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *J. Agric. Food Chem.* 50 (14). 4096-4102.
- Cáceres, A.; Peña-Neira, A.; Galvez, A.; Obreque-Slier, E.; López-Solís, R. and Canals, J.M. 2012. Phenolic compositions of grapes and wines from cultivar Cabernet Sauvignon produced in Chile and their relationship to commercial value. *J. Agric. Food Chem.* 60 (35). 8694-8702.
- Cadot, Y.; Miñana-Castelló, M. and Chevalier, M. 2006. Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Franc during fruit development. *J. Agric. Food Chem.* 54 (24). 9206-9215.
- Canals, R.; Llaudy, M.; Valls, J.; Canals, J. and 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.
- Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M.; Páez-Hernández, M.; Rodríguez, J. and Galán-Vidal, C. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 113. 859-871.
- Castellarin, S.; Pfeiffer, A.; Sivilotti, P.; Degan, M.; Peterlunger, E. and Di Gaspero, G. 2007. 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.; Gómez, M.; Velders, A. and 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.
- Charlton, A.; Baxter, N.; Khan, L.; Moir, A.; Haslam, E.; Davies, A. and Williamson, M. 2002. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J. Agric. Food Chem.* 50. 1593-1601.
- Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J. and Pons, M. 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60. 165-178.
- Cheynier, V.; Dueñas-Paton, M.; Salas, E.; Maury, C.; Souquet, J.; Sarni-Manchado, P. and Fulcrand, H. 2006. Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* 57. 298-305.
- Cheynier, V.; Moutounet, M. and Sarni-Manchado, P. 2000. Los compuestos fenólicos. *In Enología. Fundamentos científicos y tecnológicos*. Flanzy, C. (Ed). AMV Ediciones. España. 114-136.
- Cheynier, V. and Rigaud, J. 1986. HPLC separation and identification of flavonols in the skin of *Vitis vinifera* var. *Cinsault*. *Am J. Enol. Vitic.* 37. 248-252.
- Chira, K.; Pacella, N.; Jourdes, M. and Teissedre, P. 2011. Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chem.* 126. 1971-1977.
- Cohen, S.; Tarara, J. and Kennedy, J. 2008. Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism. *Anal. Chim. Acta.* 621. 57-67.
- Conde, C.; Silva, P.; Fontes, N.; Dias, A.; Tavares, R.; Sousa, M.; Agasse, A.; Delrot, S. and Gerós, H. 2007. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food.* 1. 1-22.
- Condelli, N.; Dinnella, C.; Cerone, A.; Monteleone, E. and Bertuccioli, M. 2006. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Qual. Prefer.* 17. 96-107.
- Coombe, B. and McCarthy, M. 2000. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6. 131-135.
- Cooper-Driver, G. 2001. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry.* 56 (3). 229-236.
- Cortell, F.; Halbleib, M.; Gallagher, A.; Righetti, T. and Kennedy, J. 2005. Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir) and wine proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 53. 5798-5808.
- Cosme, F.; Ricardo da Silva, J. and 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.

- Darias-Martín, J.; Martín-Luis, B.; Carrillo-López, M.; Lamuela-Raventós, R.; Díaz-Romero, C. and Boulton, R. 2002. Effect of caffeic acid on the color of red wine. *J. Agric. Food Chem.* 50. 2062-2067.
- De Freitas, V. and Mateus, N. 2001. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* 49. 940-945.
- Deluc, L.; Bogs, J.; Walker, A.; Ferrier, T.; Decendit, A.; Merillon, J.; Robinson, S. and Barrier, F. 2008. The transcription factor VvMYBB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiol.* 147. 2041-2053.
- Demiglio, P. and Pickering, G. 2008. The influence of ethanol and pH on the taste and mouthfeel sensations elicited by red wine. *J. Food Agric. Environ.* 6. 143-150.
- Di Stefano, R. 1999. Advances in the study of secondary metabolites occurring in grapes and wines. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25. 53-56.
- Dixon, R.; Xie, D. and Sharma, S. 2005. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 165. 9-28.
- Downey, M.; Harvey, J. and Robinson, S. 2003. Analysis of tannins in seed and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.* 9. 15-27.
- Downey, M.; Harvey, J. and Robinson, S. 2004. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10. 55-73.
- Downey, M.; Dokoozlian, N. and Krstic, M. 2006. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *Am J. Enol. Vitic.* 57 (3). 257-268.
- Dueñas, M.; Fulcrand, H. and Cheynier, V. 2006. Formation of anthocyanin-flavanol adducts in model solutions. *Anal. Chim. Acta.* 563. 15-25.
- Es-Safi, N.; Cheynier, V. and Moutounet, M. 2003. Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *J. Food Comp. Anal.* 16. 535-553.
- Es-Safi, N.; Guyot, S. and Ducrot, P. 2006. NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS analysis of pear juice polymeric proanthocyanidins with potent free radical scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.* 54. 6969-6977.
- Ezzahouani, A. and Williams, L. 2007. Effect of irrigation amount and preharvest irrigation cutoff date on vine water status and productivity of Danlas grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 58 (3). 333-340.
- Fanzone, M.; Peña-Neira, A.; Gil, M.; Jofré, V.; Assof, M. and Zamora, F. 2012a. Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. *Food Res. Int.* 45 (1). 402-414.

- Fanzone, M.; Zamora, F.; Jofré, V.; Assof, M.; Gómez-Cordovés, C. and Peña-Neira, A. 2012b. Phenolic characterization of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). *J. Sci. Food Agric.* 92. 704-718.
- Fischer, U. and Noble, A. 1994. The effect of ethanol, catechin concentration, and pH on sourness and astringency of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45. 6-10.
- Flamini, R. 2003. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spectrom. Rev.* 22. 218-250.
- Flint, S.; Jorda, P. and Caldwell, M. 1985. Plant protective response to enhanced UV-B radiation under field conditions: Leaf optical properties of photosynthesis. *Photochem Photobiol.* 41. 95-99.
- Fontoin, H.; Saucier, C.; Teissedre, P. and Glories, Y. 2008. Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Qual. Prefer.* 19. 286-291.
- Fournand, D.; Vicens, A.; Sidhoum, L.; Souquet, J.; Moutounet, M. and 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.; Sefton, M. and Williams, P. 1992. Sensory descriptive analysis of hydrolysed precursor fractions from Semillon, Chardonnay and Sauvignon Blanc grape juices. *J. Sci. Food Agric.* 59. 511-520.
- Frost, M. and Noble, A. 2002. Preliminary study of the effect of knowledge and sensory expertise on liking for red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 53 (4). 275-284.
- Fulcrand, H.; Dueñas, M.; Salas, E. and Cheynier, V. 2006. Phenolic reactions during winemaking and aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (3). 289-297.
- Gagné, S.; Saucier, C. and Gény, L. 2006. Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *J. Agric. Food Chem.* 54. 9465-9471.
- Gambutì, A.; Strollo, D.; Ugliano, M.; Lecce, L. and Moio, L. 2004. *trans*-Resveratrol, quercetin, (+)-catechin, and (-)-epicatechin content in south Italian monovarietal wines: Relationships with maceration time and marc pressing during winemaking. *J. Agric. Food Chem.* 52. 5747-5751.
- Gawel, R. 1998. Red wine astringency: a review. *Aust. J. Grape Wine Res.* 4. 74-95.
- Gawel, R.; Francis, L. and Waters, E. 2007. Statistical correlations between the in-mouth textural characteristics and the chemical composition of Shiraz wines. *J. Agric. Food Chem.* 55. 2683-2687.
- Gawel, R. and Godden, P. 2008. Evaluation of the consistency of wine quality assessments from expert wine tasters. *Aust. J. Grape Wine Res.* 14. 1-8.

- Gawel, R.; Iland, P. and Francis, L. 2001. Characterizing the astringency of red wine: a case study. *Food Qual. Prefer.* 12. 83-94.
- Gawel, R.; Oberholster, A. and Francis, L. 2000. A "mouth-feel wheel": terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6. 203-207.
- Giaquinta, R. 1983. Phloem loading of sucrose. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34. 347-387.
- Ginjom, I.; D'Arcy, B.; Caffin, N. and Gidley, M. 2010. Phenolic contents and antioxidant activities of major Australian red wines throughout the winemaking process. *J. Agric. Food Chem.* 58. 10133-10142.
- Girard, B.; Yuksel, D.; Cliff, M.; Delaquis, P. and Reynolds, A. 2001. Vinification effects on the sensory, colour and GC profiles of Pinot noir wines from British Columbia. *Food Res. Int.* 34. 483-499.
- Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges. 2e partie. Mesure, origine et interpretation. *Connaiss Vigne Vin.* 18. 253-271.
- Gómez, E.; Martínez, A. and 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-Míguez, M.; González-Manzano, S.; Escribano-Bailón, M.; Heredia, F. and Santos-Buelga, C. 2006. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin-3-glucoside. *J. Agric. Food Chem.* 54. 5422-5429.
- González-Manzano, S.; Dueñas, M.; Rivas-Gonzalo, J.; Escribano-Bailón, M. and 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-Neves, G.; Charamelo, D.; Balado, J., Barreiro, L.; Bochicchio, R.; Gatto, G.; Gil, G.; Tessore, A.; Carbonneau, A. and 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.; Gil, G. and 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. and Castro, I. 2011. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chem.* 129. 366-373.
- Granett, J. 2004. Rooting out the wine plague. *Nature.* 428. 20.
- Green, B. 1993. Oral astringency: A tactile component of flavor. *Acta Psychol.* 84 (1). 119-125.

- Hagerman, A. and Butler, L. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.* 26. 809-812.
- Hagerman, A. and Butler, L. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 256. 4494-4497.
- Hagerman, A. and Butler, L. 1994. Assay of condensed tannins or flavonoid oligomers and related flavonoids in plants. *Methods Enzymol.* 234. 429-437.
- Han, Y.; Zheng, W.; Bastianetto, S.; Chabot, J. and Quirion, R. 2004. Neuroprotective effects of resveratrol against  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *Br. J. Pharmacol.* 141 (6). 997-1005.
- Hanlin, R.; Hrmova, M.; Harbertson, J. and Downey, M. 2010. Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16. 173-188.
- Harbertson, J.; Hodgins, R.; Thuston, L.; Schaffer, L.; Reid, M.; Landon, J.; Ross, C. and Adams, D. 2008. Variability of tannin concentration in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 59 (2). 210-214.
- Harbertson, J.; Kennedy, J. and Adams, D. 2002. Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot Noir berries during ripening. *Am. J. Enol Vitic.* 53 (1). 54-59.
- Harbertson, J. and Spayd, S. 2006. Measuring phenolics in the winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (3). 280-288.
- Harbertson, J.; Picciotto, E. and Adams, D. 2003. Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfate bleaching. *Am. J. Enol. Vitic.* 54 (4). 301-306.
- Haselgrove, L.; Botting, D.; Van Heeswijck, R.; Hoj, P.; Dry, P.; Ford, C. and Iland, P. 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.
- Hernández, A. 2006. Chile vitivinícola. Un país andino con vista al mar. Vitivinícola Los Reyes. Chile. 156 p.
- Holt, H.; Francis, I.; Field, J.; Herderich, M. and Iland, P. 2008. Relationships between wine phenolic composition and wine sensory properties for Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* 14. 162-176.
- Hopfer, H.; Ebeler, S. and Heymann, H. 2012. How blending affects the sensory and chemical properties of red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 63 (3). 312-324.

- Hufnagel, J. and Hoffman, T. 2008. Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *J. Agric. Food Chem.* 56 (4). 1376-1386.
- Hümmer, W. and Schreier, P. 2008. Analysis of proanthocyanidins. *Mol. Nutr. Food Res.* 52. 1381-1398.
- INE (Instituto Nacional de Estadísticas). 2012. Bodegas de vino. Encuesta nacional 2011. Descargado desde <http://www.ine.gob.cl>
- Jaffré, J.; Valentin, D.; Dacremont, C. and Peyron, D. 2009. Burgundy red wines: Representation of potential for aging. *Food Qual. Prefer.* 20 (7). 505-513.
- Jeandet, P.; Bessis, R.; Sbaghi, M. and Meunier, P. 1994. Occurrence of resveratrol  $\beta$ -D-glucoside in wine: preliminary studies. *Vitis.* 33. 183-184.
- Jöbstl, E.; O'Connell, J.; Fairclough, P. and Williamson, M. 2004. Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules.* 5. 942-949.
- Johnson, T. and Bastian, S. 2007. A preliminary study of the relationship between Australian wine consumer's wine expertise and their wine purchasing and consumption behavior. *Aust. J. Grape Wine Res.* 13. 186-197.
- Kallithraka, S.; Bakker, J. and Clifford, M. 1997. Effect of pH on astringency in model solutions and wines. *J. Agric. Food Chem.* 45. 2211-2216.
- Kallithraka, S.; Bakker, J. and Clifford, M. 1998. Evidence that salivary proteins are involved in astringency. *J. Sens Stud.* 13. 29-43.
- Kallithraka, S.; Garcia-Viguera, C.; Bridle, P. and Bakker, J. 1995. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochem. Anal.* 6. 265-267.
- Kassara, S. and Kennedy, J. 2011. Relationship between red wine grade and phenolics. 2. Tannins composition and size. *J. Agric. Food Chem.* 59. 8409-8412.
- Keller, M. 2010. *The Science of Grapevines. Anatomy and Physiology.* Elsevier Academic Press. USA. 400p.
- Keller, M.; Smith, J. and Bondada, B. 2006. Ripening grape berries remain hydraulically connected to the shoot. *J. Exp. Bot.* 57. 2577-2587.
- Kennedy, J.; Ferrier, J.; Harbertson, J. and Peyrot des Gachons, C. 2006. Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (4). 481-485.
- Kennedy, J.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E. and Jones, G. 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.* 49. 5348-5355.

- Kennedy, J. and Jones, G. 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* 49. 1740-1746.
- Kennedy, J.; Matthews, M. and Waterhouse, A. 2000. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry.* 55. 77-85.
- Kennedy, J.; Matthews, M. and Waterhouse, A. 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.* 53. 268-274.
- Kennedy, J. and Waterhouse, A. 2000. Analysis of pigmented high-molecular-mass grape phenolics using ion-pair, normal-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 866 (1). 25-34.
- Kliwer, W. and Dokoozlian, N. 2005. Leaf area/crop weight ratios of grapevines: influence on fruit composition and wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.* 56. 170-181.
- Kong, J.; Chia, L.; Goh, N.; Chia, T. and Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry.* 64. 923-933.
- Kontoudakis, N.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J.M.; De Freitas, V. and Zamora, F. 2011. Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chem.* 124. 767-774.
- Koundouras, S.; Tsialtas, I.; Zioziou, E. and Nikolau, N. 2008. Rootstock effects on the adaptative strategies of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon) under contrasting water status: Leaf physiological and structural responses. *Agr. Ecosyst. Environ.* 128. 86-96.
- Lattanzio, V.; Kroon, P.; Quideau, S. and Trautner, D. 2008. Plant phenolics-Secondary metabolites with diverse functions. *In Recent Advances in Polyphenol Research.* Daayf, F. and Lattanzio, V. (Eds). Blackwell Publishing Ltd. UK. 1-35.
- Lattey, K.; Bramley, B. and Francis, I. 2010. Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16. 189-202.
- Lawless, H. and Heymann, H. 2010. Sensory evaluation of food. Principles and practices. Springer. 2<sup>o</sup> edition. USA. 850 p.
- Lee, C. and Lawless, H. 1991. Time-course of astringent sensations. *Chem. Senses.* 16 (3). 225-238.
- Lesschaeve, I. 2007. Sensory evaluation of wine and commercial realities: Review of current practices and perspectives. *Am. J. Enol. Vitic.* 58 (2). 252-258.
- Lesschaeve, I. and Noble, A. 2005. Polyphenols: Factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (1). 330S-335S.

- Li, H.; Guo, A. and Wang, H. 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem.* 108. 1-13.
- Llaudy, M.; Canals, R.; Canals, J.M.; Rozés, N.; Arola, L. and Zamora, F. 2004. New method for evaluating astringency in red wine. *J. Agric. Food Chem.* 52. 742-746.
- Lorrain, B.; Chira, K. and 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.
- Lu, Y. and Foo, Y. 1999. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem.* 65 (1). 1-8.
- Lund, C.; Nicolau, L.; Gardner, R. and Kilmartin, P. 2009. Effect of polyphenols on the perception of key aroma compounds from Sauvignon Blanc wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15. 18-26.
- Malien-Aubert, C.; Dangles, O. and Amito, M. 2002. Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions. *J. Agric. Food Chem.* 50. 3299-3305.
- Mateus, N.; Marques, S.; Goncalves, A.; Machado, J. and De Freitas, V. 2001. 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.; Silva, A. and Rivas-Gonzalo, J. 2003. A new class of blue anthocyanins-derived pigments isolated from red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51. 1919-1923.
- Matsufuji, H.; Otsuki, T.; Takeda, T.; Chino, M. and Takeda, M. 2003. Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. *J. Agric. Food Chem.* 51 (10). 3157-3161.
- Matthews, S.; Mila, I.; Scalbert, A.; Pollet, B.; Lapierre, C.; Hervé du Penhoat, C.; Rolando, C. and Donnelly, D. 1997. Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *J. Agric. Food Chem.* 45. 1195-1201.
- Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Masuero, D. and Trainotti, D. 2009. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15. 27-35.
- Maury, C.; Sarni-Manchado, P.; Lefebvre, S.; Cheynier, V. and Moutounet, M. 2001. Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidins composition and perception of wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (2). 140-145.
- McDonald, M.; Hughes, M.; Burns, J.; Lean, M.; Matthews, D. and 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.



- MEFT (Ministerio de Economía, Fomento y Turismo). 2012. Decreto Ley 600. Estatuto de la Inversión Extranjera. Descargado desde [http:// www.economia.gob.cl](http://www.economia.gob.cl)
- Mercurio, M.; Damberg, R.; Cozzolino, D.; Herderich, M. and Smith, P. 2010. Relationship between red wine grades and phenolics. 1. Tannin and total phenolics concentrations. *J. Agric. Food Chem.* 58. 12313-12319.
- Mercurio, M.; Damberg, R.; Herderich, M. and Smith, P. 2007. High throughput analysis of red wine and grape phenolics adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified somers color assay to a rapid 96 well plate format. *J. Agric. Food Chem.* 55. 4651-4657.
- Mercurio, M. and Smith, P. 2008. Tannin quantification in red grapes and wine: comparison of polysaccharide- and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency. *J. Agric Food Chem.* 56. 5528-5537.
- Monagas, M. and Bartolomé, B. 2009. Anthocyanins and anthocyanin-derived compounds. *In Wine Chemistry and Biochemistry*. Moreno-Arribas, M. and Polo, M. (Eds). Springer. USA. 439-456.
- Monagas, M.; Bartolomé, B. and Gómez-Cordovés, C. 2005. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45. 85-118.
- Monagas, M.; Bartolomé, B. and Gómez-Cordovés, C. 2006. Effect of the modifier (Graciano vs. Cabernet Sauvignon) on blends of Tempranillo wine during ageing in the bottle. I. Anthocyanins, pyranoanthocyanins and non-anthocyanin phenolics. *LWT-Food Sci. Technol.* 39. 1133-1142.
- Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O. and Ricardo da Silva, J. 2003. 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.; Martín-Álvarez, P.; Gómez-Cordovés, C. and Bartolomé, B. 2007. Effect of the modifier (Graciano vs. Cabernet Sauvignon) on blends of Tempranillo wine during ageing in the bottle. II. Colour and overall appreciation. *LWT-Food Sci. Technol.* 40. 107-115.
- Montedoro, G. and Fantozzi, P. 1974. Determination of the tannin phenolics in musts and wines by methyl cellulose (MC) and evaluation of other phenolic fractions. *Lebensm. Wiss. Tech.* 7. 155-161.
- Monteleone, E.; Condelli, N.; Dinnella, C. and Bertuccioli, M. 2004. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Qual. Prefer.* 15. 761-769.
- Montes, C.; Pérez-Quezada, J.; Peña-Neira, A. and Tonietto, J. 2012. Climatic potential for viticulture in Central Chile. *Aust. J. Grape Wine Res.* 18. 20-28.

- Müller, K. 2005. Chile vitivinícola en pocas palabras. Descargado desde <http://www.gie.uchile.cl>
- Murray, N.; Williamson, M.; Lilley, T. and Haslam, E. 1994. Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by <sup>1</sup>H-MNR spectroscopy. *Eur J. Biochem.* 219. 923-935.
- Nunan, K.; Davies, C.; Robinson, S. and Fincher, G. 2001. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Plant Physiol.* 214. 257-264.
- Nurgel, C. and Pickering, G. 2005. Contribution of glycerol, ethanol and sugar to the perception of viscosity and density elicited by model white wines. *J. Texture Stud.* 36. 303-323.
- Obreque-Slier, E.; López-Solís, R.; Castro-Ulloa, L.; Romero-Díaz, C. and Peña-Neira, A. 2012. Phenolic composition and physicochemical parameters of Carménère, Cabernet Sauvignon, Merlot and Cabernet Franc grape seeds (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *LWT-Food Sci. Technol.* 48 (1). 134-141.
- Obreque-Slier, E.; López-Solís, R.; Peña-Neira, A. and Zamora-Marín, F. 2010a. Tannin-protein interaction is more closely associated with astringency than tannin-protein precipitation: experience with two oenological tannins and a gelatin. *Int. J. Food Sci. Tech.* 45. 2629-2636.
- Obreque-Slier, E.; Peña-Neira, A. and López-Solís, R. 2010b. Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *J. Agric. Food Chem.* 58. 3729-3735.
- Obreque-Slier, E.; Peña-Neira, A.; López-Solís, R.; Zamora-Marín, F.; Ricardo da Silva, J. and Laureano, O. 2010c. 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.
- ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). 2012. Boletín de vinos y pisco: producción, precios y comercio exterior. Descargado desde <http://www.odepa.gob.cl>
- OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin). 2011. Compendium of international methods of wine and must analysis. Vol I-II, Sect. 3. Ed. OIV, Paris.
- Ortega-Regules, A.; Ros-García, J.; Baustista-Ortín, A.; López-Roca, J. and Gómez-Plaza, E. 2008. Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis vinifera* L.): technological implications. *Eur. Food Res. Technol.* 227. 223-231.
- Orth, U. 2005. Dimensions of wine region equity and their impact on consumer preferences. *J. Prod. Brand Manag.* 14 (2). 88-97.

- Pascal, C.; Poncet-Legrand, C.; Imbert, A.; Gautier, C.; Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V. and Vernhet, A. 2007. Interactions between a non glycosylated human proline-rich protein and flavan-3-ols are affected by protein concentration and polyphenol/protein ratio. *J. Agric. Food Chem.* 55. 4895-4901.
- Pastor del Rio, J. and Kennedy, J. 2006. Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 57. 125-132.
- Payne, C.; Bowyer, P.; Herderich, M. and Bastian, S. 2009. Interaction of astringent grape seed procyanidins with oral epithelial cells. *Food Chem.* 115 (2). 551-557.
- Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P. and Noble, A. 1999. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agric.* 79. 1123-1128.
- Peña-Neira, A.; Cáceres, A. and Pastenes, C. 2007. Low molecular phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of cluster thinning and vineyard yield. *Food Sci. Technol. Int.* 13. 153-158.
- Pereira, G.; Gaudillere, J.; Pieri, P.; Hilbert, G.; Maucourt, M.; Deborde, C.; Moing, A. and Rolin, D. 2006. Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *J. Agric. Food Chem.* 54. 6765-6775.
- Pérez-Magariño, S. and González-San José, M. 2006. Polyphenols and color variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chem.* 96. 197-208.
- Perrone, G.; Nicoletti, I.; Pascale, M.; De Rossi, A.; De Girolamo, A. and Visconti. 2007. Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol-related compounds in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 55. 6807-6812.
- Pirie, A. and Mullins, M. 1980. Concentration of phenolics in the skin of grape berries during fruit development and ripening. *Am J. Enol. Vitic.* 31. 34-36.
- Poncet-Legrand, C.; Gautier, C.; Cheynier, V. and Imbert, A. 2007. Interactions between flavan-3-ols and poly (L-proline) studied by isothermal titration calorimetry: Effect of the tannin structure. *J. Agric. Food Chem.* 55. 9235-9240.
- Poni, S.; Bernizzoni, F.; Civardi, S. and 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.; Hritsch, L. and Chan, B. 1986. The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry.* 25. 223-230.
- Pourcel, L.; Irani, N.; Lu, Y.; Riedl, K.; Schwartz, S. and Grotewold, E. 2010. The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments. *Mol. Plant.* 3. 78-90.

- Poustka, F.; Irani, N.; Feller, A.; Lu, Y.; Pourcel, L.; Frame, K. and 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.; Hernández, M.; Martín-Alvarez, P. and Polo, M. 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.
- Price, S.; Breen, P.; Valladao, M. and Watson, B. 1995. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot Noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46 (2). 187-194.
- Ramírez, M.; Toledo, H.; Obreque-Slier, E.; Peña-Neira, A. and López-Solís, R. 2011. Aversive effect of tannic acid on drinking behavior in mice of an inbred strain: Potential animal model for assessing astringency. *J. Agric. Food Chem.* 59. 11744-11751.
- Rentzsch, M.; Wilkens, A. and Winterhalter, P. 2009. Non-flavonoid phenolic compounds. *In Wine Chemistry and Biochemistry*. Moreno-Arribas, M. and Polo, M. (Eds). Springer. USA. 509-527.
- Reynolds, A.; Pearson, E.; Da Savigny, C.; Coventry, J. and 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.; Dubourdieu, D.; Donèche, B. and Lonvaud, A. 2006a. Handbook of Enology. Vol 1. The microbiology of wine and vinifications. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons, Ltd. England. 497 p.
- Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A. and Dubourdieu, D. 2006b. Handbook of Enology. Vol 2. The chemistry of wine. Stabilization and treatments. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons, Ltd. England. 451 p.
- Ribéreau-Gayon, J. and Stonestreet, E. 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.* 9. 2649-2652.
- Ribéreau-Gayon, P. and Stonestreet, E. 1966. Le dosage des tannins du vin rouge et détermination de leur structure. *Anal. Chem.* 48. 188-192.
- Ricardo Da Silva, J.; Cheynier, V.; Samsom, A. and Bourzeix, M. 1993. Effect of pomace contact, carbonic maceration, and hyperoxidation on the procyanidin composition of Grenache blanc wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 44. 168-172.
- Ricardo Da Silva, J.; Cheynier, V.; Souquet, J.; Moutounet, M.; Cabanis, J. and Bourzeix, M. 1991. Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *J. Sci. Food Agric.* 57. 111-125.

- Rigaud, J.; Escribano-Bailon, M.; Prieur, C.; Souquet, J. and Cheynier, V. 1993. Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cocoa beans and grape seeds. *J. Chromatogr. A.* 654. 255-260.
- Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T. and Moutounet, M. 2002. Aggregation of grape seed tannins in model-effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocoll.* 16. 17-23.
- Ristic, R.; Downey, M.; Iland, P.; Bindon, K.; Leigh Francis, I.; Herderich, M. and Robinson, S. 2007. Exclusion of sunlight from Shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Aust. J. Grape Wine Res.* 13. 53-65.
- Robinson, S. and Davies, C. 2000. Molecular biology of grape berry ripening. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6 (2). 175-187.
- Roby, G.; Harbertson, J.; Adams, D. and Matthews, M. 2004. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: anthocyanins and tannins. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10. 100-107.
- Rogiers, S.; Greer, D.; Hatfield, J.; Orchard, B. and Keller, M. 2006. Mineral sinks within ripening grape berries (*Vitis vinifera* L.). *Vitis.* 45. 115-123.
- Sacchi, K.; Bisson, L. and Adams, D. 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.; Tao, Y.; Dizy, M.; Ferreira, V. and Fernández-Zurbano, P. 2010. 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.
- SAG (Servicio Agrícola y Ganadero). 2010. Catastro nacional de vides de vinificación 2010. Descargado desde <http://www.sag.gob.cl>
- SAG (Servicio Agrícola y Ganadero). 2011. Ley 18.455. Reglamento y Zonificación vitícola. Descargado desde <http://www.sag.gob.cl>
- SAG (Servicio Agrícola y Ganadero). 2012. Informe ejecutivo Producción de vinos 2012. Descargado desde <http://www.sag.gob.cl>
- Salas, E.; Fulcrand, H.; Meude, E. and Cheynier, V. 2003. Reaction of anthocyanin and tannins in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* 51. 7951-7961.
- Santos-Buelga, C. and De Freitas, V. 2009. Influence of phenolics on wine organoleptic properties. In *Wine Chemistry and Biochemistry*. Moreno-Arribas, M. and Polo, M. (Eds). Springer. USA. 529-560.
- Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E.; De Pascual-Teresa, S. and Rivas-Gonzalo, J. 1999. Contribution to the identification of the pigments responsible for the browning of anthocyanin-flavanol solutions. *Eur. Food Res. Technol.* 209. 411-415.

- Sarneckis, C.; Damberg, R.; Jones, P.; Mercurio, M.; Herderich, M. and Smith, P. 2006. Quantification of condensed tannins by precipitation with methylcellulose: development and validation of an optimized tool for grape and wine analysis. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12. 39-49.
- Savaskan, E.; Olivieri, G.; Meier, F.; Seifritz, E.; Wirz-Justice, A. and Müller-Spahn, F. 2003. Red wine ingredient resveratrol protects from  $\beta$ -amyloid neurotoxicity. *Gerontology.* 49 (6). 380-383.
- Schofield, P.; Mbugua, D. and Pell, A. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 91. 21-40.
- Seddon, T. and Downey, M. 2008. Comparison of analytical methods for the determination of condensed tannins in grape skin. *Aust. J. Grape Wine Res.* 14. 54-61.
- Shao, Z.; Becker, L.; Vanden Hoek, T.; Schumacker, P.; Li, C.; Zhao, D.; Wojcik, K.; Anderson, T.; Qin, Y.; Dey, L. and Yuan, C. 2003. Grape seed proanthocyanidin extract attenuates oxidant injury in cardiomyocytes. *Pharmacol Res.* 47. 463-469.
- Shi, J.; Nawaz, H.; Pohorly, J. and Mittal, G. 2005. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods. Engineering and technology. *Food Rev Int.* 21. 139-166.
- Sioumis, N.; Kallithraka, S.; Makris, D. and Kefalas, P. 2006. Kinetics of browning onset in white wines: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food Chem.* 94. 98-104.
- Smith, A.; June, H. and Noble, A. 1996. Effects of viscosity on the bitterness and astringency of grape seed tannin. *Food Qual. Prefer.* 7. 161-166.
- Soleas, G.; Grass, L.; David, P.; Goldberg, D. and Diamandis, E. 2002. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin. Biochem.* 35 (2). 119-124.
- Somers, T.; Vérette, E. and Pocock, K. 1987. Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.* 40. 67-78.
- Souquet, J.; Cheynier, V.; Brossaud, F. and Moutounet, M. 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry.* 43. 509-512.
- Spayd, S.; Tarara, J.; Mee, D. and Ferguson, J. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 53 (3). 171-182.
- Su, C. and Singleton, V. 1969. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry.* 8. 1553-1558.

- Sun, B.; Leandro, C.; Ricardo da Silva, J. and Spranger, I. 1998a. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.* 46. 1390-1396.
- Sun, B.; Ricardo da Silva, J. and Spranger, I. 1998b. Critical factors of the vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46. 4267-4274.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. 3<sup>rd</sup> edition. Sinauer Associates. USA. 690 p.
- Terrier, N.; Ollé, D.; Verriès, C. and Cheynier, V. 2009a. Biochemical & molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development. *In Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Roubelakis-Angelakis, K. (Ed). 2<sup>nd</sup> edition. Springer. USA. 365-388.
- Terrier, N.; Poncet-Legrand, C. and Cheynier, V. 2009b. Flavanols, flavonols and dihydroflavonols. *In Wine Chemistry and Biochemistry*. Moreno-Arribas, M. and Polo, M. (Eds). Springer. USA. 463-507.
- Timberlake, C. and Bridle, P. 1976. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am J. Enol. Vitic.* 27. 97-105.
- Trousdale, E. and Singleton, V. 1983. Astilbin and engeletin in grapes and wine. *Phytochemistry*. 22. 619-620.
- Valentová, H.; Skrovánková, S.; Panovská, Z. and Pokorný, J. 2002. Time-intensity studies of astringent taste. *Food Chem.* 78 (1). 29-37.
- Venencie, C.; Uveira, M. and Guet, S. 1997. Maturité polyphénolique du raisin. Mise en place d'une méthode d'analyse de routine. *Rev. Franc. Oenol.* 167. 36-41.
- Vermerris, W. and Nicholson, R. 2006. *Phenolic compounds biochemistry*. Springer. Netherlands. 276 p.
- Verriès, C.; Guiraud, J. L.; Souquet, J. M.; Violet, S.; Terrier, N. and Ollé, D. 2008. Validation of an extraction method on whole pericarp of grape berry (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz) to study biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development. *J. Agric. Food Chem.* 56. 5896-5904.
- Vian, M.; Tomao, V.; Coulomb, P.; Lacombe, J. and 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.; Damien, C.; Souquet, J.; Fulcrand, H. and 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. and Waters, E. 2003. 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. and 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. and Hayasaka, Y. 2004b. Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *J. Agric. Food Chem.* 52. 7144-7151.
- Vidal, S.; Williams, P.; O'Neill, M. and 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.
- Vitrac, X.; Castagnino, C.; Waffo-Téguo, P.; Delaunay, J.; Vercauteren, J.; Monti, J.; Deffieux, G. and Mérillon, J. 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.; Vercauteren, J.; Deffieux, G. and Mérillon, J. 2002. Direct liquid chromatography analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta.* 458. 103-110.
- Vivas, N.; Glories, Y.; Lagune, L.; Saucier, C. and Augustin, M. 1994. Estimation du degré de polymerization des procyanidins du raisin et du vin par la méthode au *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 28. 319-336.
- Waterhouse, A.; Ignelzi, S. and Shirley, J. 2000. A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. *Am. J. Enol. Vitic.* 51. 383-389.
- Waterhouse, A. and Laurie, F. 2006. Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.* 57. 306-313.
- Wheeler, S.; Loveys, B.; Ford, C. and Davies, C. 2009. The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Aust J. Grape Wine Res.* 15. 195-204.
- Wildenradt, H. and Singleton, V. 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.
- Wrolstad, R.; Durst, R. and Lee, J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanins products. *Trends Food Sci. Technol.* 16 (9). 423-428.
- Wu, Q.; Wang, M. and Simon, J. 2005. Determination of proanthocyanidins in fresh grapes and grape products using liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Rapid commun. Mass Spectrom.* 19. 2062-2068.



## **Bibliografía**

- Xie, D.; Sharma, S.; Paiva, N.; Ferreira, D. and Dixon, R. 2003. Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. *Science*. 299. 396-399.
- Yanagida, A.; Shoji, T. and Shibusawa, Y. 2003. Separation of proanthocyanidins by degree of polymerization by means of size-exclusion chromatography and related techniques. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 56. 311-322.
- Yang, Y. and Chien, M. 2000. Characterization of grape procyanidins using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 48. 3990-3996.
- Zamora, F. 2003. Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. AMV Ediciones. España. 225 p.
- Zeyuan, D.; Bingyin, T.; Xiaolin, L.; Jinming, H. and Yifeng, C. 1998. Effect of green tea and black tea on the blood glucose, the blood triglycerides, and antioxidation in aged rats. *J. Agric. Food Chem.* 46 (10). 3875-3878.
- Zhao, J.; Yongzhen, P. and Dixon, A. 2010. The mysteries of proanthocyanidins transport and polymerization. *Plant Physiol.* 153. 437-443.
- Zou, H.; Kilmartin, P.; Inglis, M. and Frost, A. 2002. Extraction of phenolic compounds during vinification of Pinot Noir examined by HPLC and cyclic voltammetry. *Aust. J. Grape Wine Res.* 8. 164-174.