

(S8-P42)

EFFECTO DEL SOMBREADO DE RACIMOS SOBRE EL COLOR Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN UVAS DE MESA (*Vitis vinifera* L.)

GRACIELA DEL VALLE LEGUIZAMÓN-M.^(1,2), ALBERTO GONZÁLEZ-LEÓN⁽²⁾, ROGERIO R. SOTELO-MUNDO⁽²⁾, MARÍA A. ISLAS-OSUNA⁽²⁾, JESÚS M. GARCÍA-ROBLES⁽²⁾, KARINA GARCÍA-OROZCO⁽²⁾, TANIA CARVALLO⁽²⁾ y REGINALDO BÁEZ-SAÑUDO⁽²⁾

⁽¹⁾Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero
Avenida Belgrano Sur 1912. CP 4200. Santiago del Estero. Argentina

⁽²⁾Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, A. C.) Carretera a la Victoria Km. 0.6. CP 83000. Hermosillo, Sonora, México. E-mail: rbaez@cascabel.ciad.mx. Tel (662)289 2400. Ext. 226

Palabras clave: antocianinas - 'Flame Seedless' - fenoles totales - actividad de peroxidasas

RESUMEN

El color es el principal atributo externo de calidad en las uvas rojas (*Vitis vinifera* L.). Es conferido por las antocianinas, compuestos fenólicos que además presentan actividad antioxidante. Ambas propiedades son influenciadas por la luminosidad y temperatura que alcanzan los racimos, sin embargo los mecanismos involucrados aun no se conocen. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del sombreado sobre la capacidad antioxidante y la actividad de peroxidasas en relación con el color de bayas de uvas 'Flame Seedless'. Durante las temporadas 2003–2004 y 2004–2005, se sombreado racimos desde el pre-envero a cosecha. Un tratamiento fue cubierto con una red blanca, otro con una red negra, ambas retenían el 50% de la luminosidad; el último con una red negra que retenía el 35% y un testigo sin red. Se encontraron efectos significativos de los tratamientos y una marcada influencia de la estación de crecimiento. El sombreado con la red blanca alcanzó menos color en ambos años: CIRG= 2.68 y 2.60 con 744.1 ± 7.9 y $763.3 \pm 32.9 \mu\text{g g}^{-1}$ de antocianinas respectivamente. Los tratamientos sombreados con las redes negra obtuvieron valores superiores a tres en ambos años, explicado por contenidos de pigmentos que oscilaron entre 779.3 ± 36.3 y $1034.5 \pm 8.3 \mu\text{g g}^{-1}$ ($r = 0.83$). En cuanto a fenoles totales, el testigo obtuvo valores significativamente superiores a los otros tratamientos. La capacidad antioxidante se relacionó con el color ($r = -0.62$), sin embargo, la actividad de peroxidasas no se relacionó. De acuerdo a la selección de variables, el color fue explicado por la temperatura mínima que alcanzó el racimo ($R^2 = 0.89$). Esta variable y la intensidad lumínica explicaron la capacidad antioxidante ($R^2 = 0.72$). En conclusión, el sombreado de racimos con la red negra que retuvo el 35% de luminosidad resultó mejor y podría recomendarse como práctica, si bien son necesarios más estudios bioquímicos y moleculares.

EFFECT OF BUNCHES SHADING ON COLOR AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF RED TABLE GRAPES (*Vitis vinifera* L.)

Key words: anthocyanins - 'Flame Seedless' - total phenols - peroxidases activity

ABSTRACT

Color is the main external quality attribute of red grapes (*Vitis vinifera* L.). It is conferred by anthocyanins, phenolic compounds which present antioxidant activity too. Luminosity and temperature are environmental factors that affect both properties; however mechanisms involved are unknown yet. In consequence, the objective of this work was to study the effect of shading on antioxidant capacity and peroxidase activity in relationship to berries color of 'Flame Seedless' grapes. During 2003-2004 and 2004-2005 growing seasons, bunches were shaded from pre-*veraison* to maturity. One treatment was covered with a white net, other with a black net wich both retained 50% of luminosity; the last was covered with a black net that retained only 35% of luminosity, and a control without net. Significant treatment effects and an enhanced growing season influence were found. Bunches covered with white net got minus color in both growing seasons: CIRG= 2.68 and 2.60 and anthocyanins = 744.1 ± 7.9 and $763.3 \pm 32.9 \mu\text{g g}^{-1}$ respectively, while covered with black nets got higher values (CIRG>3), explained by pigments contents which oscillated between 779.3 ± 36.3 and $1034.5 \pm 8.3 \mu\text{g g}^{-1}$ ($r = 0.83$). Antioxidant capacity was negatively correlated with color ($r = -0.62$) however peroxidases activity was not correlation. According to variables selction, color was explained by minimum temperature that bunches get ($R^2 = 0.89$), meanwhile, antioxidant capacity was explained by the last variable and maximum luminosity ($R^2 = 0.72$). In conclusion, the black net that retained 35% of luminosity was the best and could be recommended as an agronomic practice to improve color; however more biochemical and molecular studies that explain coloration mechanisms are necessary.

INTRODUCCIÓN

El color de cubrimiento óptimo es una exigencia básica de calidad en cultivares con frutos coloreados, como 'Flame Seedless', destinados a la exportación. La condición climática de temperatura alta (Bergqvist *et al.*, 2001) asociada a una luminosidad alta parece ser una de las causales de la falta de color en uvas. Los problemas asociados a estas variables no son constantes en su expresión e intensidad, por lo que de un año a otro pueden variar, dificultando su estudio (Spayd *et al.*, 2002). Los pigmentos responsables del color rojo en estas uvas son las antocianinas, que además presentan alto poder reductor (Kuskoski *et al.*, 2004), siendo un componente importante de la capacidad antioxidante de esta fruta, junto con los fenoles totales (Kalt *et al.*, 2003). Las enzimas como peroxidases (POD), son también responsables del complejo antioxidante, ya que pueden detoxificar peróxido de hidrógeno bajo condiciones de estrés severo por altas temperaturas y también se ubican en las vacuolas de las células hipodermales (Ros-Barceló *et al.*, 2003). El hecho de que compartan su ubicación y que los fenoles son utilizados por las peroxidases como sustrato, hace suponer que tienen relación en la disminución del color (Zhang *et al.*, 2005) y la capacidad antioxidante (Kuskoski *et al.*, 2004). El contenido de compuestos fenólicos antioxidantes y de enzimas es altamente influenciado por las condiciones ambientales (Jeong *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2006), el cultivar (Arozarena *et al.*, 2002; Muñoz-Espada *et al.*, 2004) y el estado de madurez (Ryan y Revilla, 2003). Los estudios reportan hasta ahora resultados contradictorios y variables (Tomás-Barberán y Espín, 2001), aunque coinciden en

que la luminosidad incidente en el racimo es uno de los principales factores a considerar (Downey *et al.*, 2004). En general, existe consenso acerca de que la luminosidad baja reduce el contenido de flavonoides (Bergqvist *et al.* 2001), aunque algunos autores comunicaron que no existen cambios con diferentes tratamientos de luz (Dokoozlian y Kliewer, 1996). En cultivares de uva destinados al consumo en fresco no existen estudios específicos que relacionen el color con las variables antes mencionadas. En consecuencia, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del sombreado de racimos sobre la capacidad antioxidante y la actividad de peroxidasas en relación con el color de bayas de uvas (*Vitis vinifera* L.) destinadas al consumo en fresco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El estudio se realizó en un viñedo ubicado en la localidad de Pesqueira, Sonora (México), (LN 29°18'29" N, LO 110°55'30" O) con uvas (*Vitis vinifera* L.) cv 'Flame Seedless' durante las temporadas 2003-2004 y 2004- 2005. El sistema de conducción del cultivo fue tipo pérgola y el mismo se manipuló bajo los lineamientos de las buenas prácticas agrícolas y sin restricciones de agua. No se realizaron las dos últimas aplicaciones de ethephon (Ethrel[®], Bayer), comúnmente utilizado en esta región para incrementar el color. Durante la primera temporada (2003-2004), los frutos amarraron el 15 de febrero, el cambio de color se inició el 4 de mayo y la cosecha se realizó el 20 del mismo mes; mientras que en la segunda temporada (2004-2005) estos eventos fenológicos se dieron el 20 de febrero, 7 y 24 de mayo respectivamente.

Con el fin de evaluar el efecto del sombreado, una semana antes del envero, los racimos fueron cubiertos individualmente con una red color blanco (T1), una red color negro (T2). Ambas retenían el 50% de la luminosidad según especificación del fabricante (Tenax). Para el tratamiento T3 se cubrieron con una red negra que retenía el 35% de la luminosidad que llegaba al racimo. Como control se etiquetaron racimos sin cubrir (T0). Los tratamientos se distribuyeron al azar en cinco hileras de cincuenta plantas cada una. La luminosidad incidente (Lux) y la temperatura (°C) sobre los racimos se registraron mediante sensores digitales Data Logger HOBO (Onset). Los mismos se colocaron en la parte interna de las redes y en la superficie expuesta a la luz.

Cuatro racimos por tratamiento se muestrearon cada semana y cada tres o cuatro días a partir del envero. La colecta de muestras se realizó a las 11 AM, fueron almacenadas en hielo y transportadas al Laboratorio de Calidad de Frutas y Hortalizas del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), para realizar las determinaciones analíticas de color. Submuestras de los racimos fueron congeladas a -40°C para el análisis de contenido de antocianinas, fenoles totales, actividad de peroxidasas y capacidad antioxidante total.

Color de las bayas (CIRG)

El color de las bayas se midió por triestímulo (L^* , $chroma^*$ y Hue^*), usando el sistema CIElab mediante un colorímetro Minolta CR-300*. Se calculó un índice específico para bayas de color rojo (CIRG) a partir de los valores de colorimetría utilizando la fórmula $CIRG = 180 - Hue^* / (L^* + Chroma^*)$ (Carreño *et al.*, 1995), donde valores cercanos a cero indicaron bayas de color verde y los cercanos a tres correspondieron a las bayas más rojas.

Contenido de antocianinas

La cuantificación de antocianinas se realizó a partir de cuatro gramos de epicarpio que fueron extraídos y homogeneizados en 8 mL de metanol puro (99%) (Sigma). El homogeneizado se mezcló a 375 rpm durante una hora en un agitador orbital (Environment

Shaker) y posteriormente se centrifugó durante 15 min a $3,743 \times g$ (Beckman Coulter, Allegra 64R), manteniendo la temperatura a 4°C . El sobrenadante se recuperó y evaporó a sequedad a 30°C y se reconstituyó en 2 mL de solución de ácido acético 2% (v/v) en agua grado HPLC, conteniendo 8% de metanol y se filtró con membrana de 0.2μ , (Millipore) justo antes de realizar la separación cromatográfica.

Para la detección de las antocianinas, se utilizó cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC) (Varian ProStar, modelo 410), y detección mediante arreglo de poliodos (PDA Varian ProStar 330). Para la separación se utilizó una columna para fase reversa C_{18} de 25 mm x 4.6 mm de diámetro con tamaño de partícula de 5μ con guarda columna (Pickering Lab.). Como fase móvil A se utilizó una solución de 5% v/v de ácido acético (Sigma) en agua grado HPLC con el pH ajustado a 2.3; como fase móvil B se utilizó metanol/acetonitrilo/agua en proporción (60:33:7) (J.T. Baker). Se inyectaron 40 μL de cada extracto, con un flujo de 1 mL por minuto y se registró la absorbancia a 520 nm. El contenido de antocianinas se expresó en equivalentes de malvidina 3-*O* glucósido (Extrasynthese, Genay, Francia), utilizado como estándar externo.

Fenoles totales (FT)

Se realizó una extracción metanólica, para lo que se homogeneizaron en 5 mL de metanol puro (Fluka), 1 g de epicarpio de uvas previamente molido en nitrógeno líquido. El homogeneizado se dejó reposar 30 minutos en oscuridad. Luego se centrifugó durante 15 minutos a $3745 \times g$ (Beckman Coulter, Allegra 64R). El sobrenadante se centrifugó nuevamente en las condiciones antes mencionadas y se almacenó a -40°C hasta su análisis, que se realizó utilizando el método Folin- Ciocalteau (Singleton y Rossi, 1965). Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco.

Actividad de peroxidasas (POD)

Para la determinación de la actividad de la enzima peroxidasa, se utilizaron de 2 g de epicarpio de uva, finamente molido en nitrógeno líquido. La extracción se realizó utilizando 2 mL de buffer Tris-HCl pH 7, al que se le agregó 0.2 g de polivinil pirridona (PVP) (Sigma). La mezcla fue homogeneizada durante 1 minuto a 21,500 rpm (Ultra Turrax T25 Basic S1), realizándose todo el procedimiento en hielo. Posteriormente se centrifugó dos veces por períodos de 15 minutos a $19,000 \times g$ (Beckman Coulter, Allegra 64R), manteniendo la temperatura a 4°C . El sobrenadante se analizó de manera inmediata.

Para la detección se utilizó una solución de guayacol (Sigma) al 5% en buffer acetato de sodio 10 mM, pH 5.3 (Sigma). Para la reacción, se mezclaron 2.15 mL de la solución antes mencionada con 100 μL de muestra, diluida en caso de ser necesario con el buffer de extracción. Estos se mezclaron y la reacción se inició añadiendo 250 μL de una solución de H_2O_2 al 1% (Sigma). El incremento de absorbancia se midió a 470 nm durante 2 minutos en un espectrofotómetro (Varian, Cary 50). Todo el procedimiento se realizó en oscuridad.

Los resultados se expresaron en unidades por mg de proteína. Para la cuantificación del contenido de proteínas se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976), en un lector de microplacas Bio-Rad modelo 550 (Bio-Rad).

Capacidad antioxidante total (TEAC)

El extracto se preparó de la misma forma que para fenoles totales. La solución de radicales libres se preparó como sigue, para la determinación de la capacidad antioxidante total, expresada en equivalentes Trolox (TEAC) se siguieron las metodologías de Pellegrini *et al.* (1999) y Re *et al.* (1999).

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, con arreglo factorial: tratamiento (T) por temporada de cultivo (Te). La unidad experimental fue un racimo y con 4 repeticiones por tratamiento. Las determinaciones de contenido de antocianinas se realizaron por triplicado para cada fecha de muestreo. Los muestreos se analizaron de manera independiente y el análisis de varianza se realizó utilizando el modelo general lineal (GLM) y en caso de presentar diferencias, se utilizó la prueba de Diferencias Mínimas Significativas (LSD), con un grado de significancia del 5%. Además se realizaron análisis de correlación (Pearson), análisis de regresión y selección de variables por el método “*Step-wise*”. Para ello, se utilizó el paquete estadístico Number Cruncher Statistical System (NCSS) versión 2001.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Color de las bayas

La variable CIRG fue altamente influenciada por la temporada de cultivo (Figura 1) ($p \leq 0.01$). T2 aceleró el cambio de color en ambos años (Figura 1D), sin embargo esta diferencia no se reflejó a la cosecha. En el segundo año, los tratamientos T2 y T3 (CIRG= 3.18 y 3.36) fueron diferentes comparados con T0 y T2 (3.10 y 2.60) (Figura 1 A, B, C y D), es decir fueron más rojos al finalizar los tratamientos. El efecto de estos fue altamente influenciado por la temporada de cultivo. Durante la segunda temporada, se presentaron temperaturas más bajas durante el pre-verano, comparadas con las registradas en la misma etapa de la primera (datos no mostrados), lo que pudo ser una casual del incremento de color.

Los racimos de T2, registraron en promedio temperaturas nocturnas mínimas inferiores a 15°C durante el pre-verano y verano, a diferencia de T0 y T1 que soportaron temperaturas mínimas superiores a 15°C durante la noche. Esto confirma el efecto positivo de las temperaturas nocturnas bajas. Por otra parte, la selección de variables por el método “*step wise*” indicó que esta variable explicaba la variabilidad del color ($R^2 = 0.89$).

Mori *et al.* (2005) confirmaron que en uvas ‘Kyoho’ las temperaturas nocturnas de 30°C disminuyeron la coloración de las bayas y lo atribuyeron a una disminución de la actividad de la enzima UDP flavonoide 3-*O* glucosil transferasa (UFGT). Con temperaturas relativamente bajas (entre 15 a 20°C), se ha observado una mayor síntesis de pigmentos que con altas temperaturas (25 a 30°C). Kliewer y Torres (1972) mencionaron que en regiones cálidas, se producía una reducción en la intensidad del color de las bayas, sobre todo cuando las diferencias entre el día y la noche no son marcadas, situación diferente a la que se presentó en este ensayo.

Contenido de Antocianinas

En este trabajo, la presencia de antocianinas se detectó a partir del verano (4 y 7 de mayo en la primera y segunda estación) coincidiendo con lo reportado por Mori *et al.*, (2005). Los valores significativamente diferentes fueron: 15.5 ± 0.7 (a); 8.8 ± 0.5 (c); 13.9 ± 2.2 (b) y 3.7 ± 0.3 (d) para T0, T1, T2 y T3 respectivamente. El incremento de las antocianinas coincidió con aumento en los valores del índice CIRG mostrados en la Figura 1 A, B, C, D. Se evidenció una fuerte influencia de la temporada de cultivo a partir del muestreo del 14 de mayo, lo que confirma que este evento es difícil de estudiar en condiciones de campo, coincidiendo con Ryan y Revilla (2003). La cantidad de antocianinas que los frutos presentaron fue altamente dependiente de la estación de cultivo (Arozarena *et al.*, 2002; Ryan y Revilla 2003) y en este caso los mayores contenidos se alcanzaron en la segunda temporada de cultivo, con diferencias altamente significativas (datos no mostrados)

El tratamiento T3 alcanzó el mayor contenido de antocianinas ($1034 \mu\text{g g}^{-1}$) a la cosecha de la segunda temporada (2004-2005) comparados con los otros tratamientos. Sin embargo esto no se tradujo en una diferencia significativa con el color de T2 (Figura 1B y D)

cuyo contenido de antocianinas fue $779.3 \pm 36.3 \mu\text{g g}^{-1}$. En cuanto a T0 resultó con el menor contenido de antocianinas en ambas temporadas 744.1 ± 7.9 y $763.3 \pm 32.9 \mu\text{g g}^{-1}$ y lo que se relacionó con el menor índice de color alcanzado. Esto se diferenció de los resultados de Jeong *et al.* (2004) quienes obtuvieron contenidos de antocianinas más altos para los testigos comparados con los sombreados en uvas 'Kyoho'. Una de las posibles razones para esta discrepancia puede radicar en el momento en que los racimos se sombreadon y en el cultivar. En contrapartida, Downey *et al.* (2004), no encontraron diferencias en el contenido de antocianinas en racimos sombreados del cultivar 'Shiraz' comparados con los testigo en dos de los tres años que duró el ensayo, similar a lo reportado por Spayd *et al.* (2002) para el cultivar 'Merlot'.

Finalmente, las temperaturas nocturnas altas influyeron más que la falta de luz en la disminución de la cantidad total de antocianinas de las bayas aunque el mecanismo exacto por el que se produce permanece sin dilucidar y podría involucrar, bien una degradación (Zhang *et al.*, 2005) o una inhibición de la síntesis de estos compuestos a altas temperaturas (Bergqvist *et al.*, 2001).

Fenoles totales (FT)

Los resultados de la variable fenoles totales (FT) se muestran en la Figura 2 A, B, C y D. En el presente estudio, el comportamiento de la misma siguió la tendencia esperada: el contenido fue alto en el pre-verano y disminuyó hacia la madurez coincidiendo con Kalt *et al.* (2003).

Al inicio del estudio, los fenoles totales fueron más altos en la segunda temporada de cultivo (Figura 2 A, B, C y D). Se notaron marcadas diferencias en el contenido de FT en T0 del primer año (Figura 2 A). Durante el cambio de color, resultaron significativos los efectos de los tratamientos, el año y la interacción de estos ($p \leq 0.001$). En cuanto a los tratamientos se presentaron diferencias significativas entre T0 ($1.01 \text{mg EAG g}^{-1}$) comparados con los otros tres (0.84 , 0.80 y 0.94EAG g^{-1} para T1, T2 y T3 respectivamente). En un estudio realizado por Cantos *et al.* (2002), el contenido de FT fue de 361mg kg^{-1} para el cultivar 'Flame Seedless' mientras que en este trabajo se obtuvieron valores mayores (Figura 2 A, B, C y D).

La exposición a la luz directa modula la expresión de los perfiles fenólicos en las bayas (Haselgrove *et al.*, 2000). En T0, a pesar de haber obtenido un bajo de contenido de antocianinas, los flavonoles podrían compensar esta ausencia y esto puede justificar que estos frutos alcanzaron la mayor cantidad de FT. Según Downey *et al.* (2004) el sombreado de racimos afectaría más a los flavonoides que a las antocianinas. Esto explicó la causa por la que en la segunda temporada de cultivo, los dos tratamientos sombreados con las redes que retenían el 50% de la luminosidad alcanzaron los menores valores, comparados con T0 y T3 (LSD= 0.044). Por otra parte, se confirma lo expresado por Downey *et al.* (2004) en lo referente a la alta sensibilidad estacional evidenciada también en este trabajo.

Actividad de Peroxidasas

La Figura 3 A, B, C y D muestran el comportamiento de la actividad de peroxidasas. El mismo fue similar al reportado para níspero (*Mespilus germanica*) (Aydin y Kadioglu 2001). Según estos autores, los valores altos en el verano podrían relacionarse con la degradación de clorofilas, y el nuevo aumento al final del proceso de maduración podría vincularse con las oxidaciones del proceso de senescencia de las frutas. Las POD pueden presentar actividad clorofilasa (Amir-Shapira *et al.*, 1987). Sin embargo para que esto suceda, la clorofila es degradada por el peróxido de hidrógeno en presencia de sustratos fenólicos (Yamauchi *et al.*, 2004), constituyendo un ejemplo típico de oxidación biológica (Yamasaki *et al.*, 1997). Para reforzar este concepto, Huff (1982) indicó que tanto las peroxidasas como los fenoles, elementos necesarios para esta reacción, se encuentran en los cloroplastos, pero esta

también puede realizarse en las vacuolas (Yamauchi *et al.*, 2004), lo que explicaría la alta actividad en el pre-envero.

En el presente estudio, los valores de actividad de peroxidasas fueron muy superiores en la segunda temporada de cultivo. Esta diferencia fue en magnitud, ya que el patrón de comportamiento fue similar entre los tratamientos presentando el máximo de actividad durante el cambio de color (Figura 3 B, C y D). El único caso que presentó un comportamiento diferente fue T0 en el 2004-2005 (Figura 3 A). Puesto que la calidad de la cosecha varía año tras año, la temporada de cultivo es considerado importante para la composición de las bayas de uva, de tal modo que influye sobre el contenido de azúcar, acidez, nitrógeno y fenoles (Pereyra *et al.*, 2006), por lo que no sería anormal que incidiese sobre la actividad de la enzima en respuesta al complejo de factores ambientales. Tomás-Barberán y Espín (2001) y Ros-Barceló *et al.* (2003) habían anticipado que la relación entre esta variable con factores climáticos no tiene resultados fáciles de interpretar y a menudo obtienen resultados contradictorios. Por otra parte, el aumento de actividad no necesariamente debe estar relacionada con el color de las bayas, ya que las peroxidasas son enzimas multifuncionales (Ros-Barceló *et al.*, 2003) y tienen baja afinidad con las antocianinas (Zhang *et al.*, 2005), de esa manera, el aumento de actividad puede estar ligado a otras funciones.

En este caso no se pudo encontrar una relación entre la actividad de peroxidasas con el color al considerar las dos temporadas de cultivo. Zhang *et al.* (2005) indicaron que la relación entre el color y la actividad de esta enzima era de carácter indirecto, ya que necesitaba una deglucosilación previa de las antocianinas para utilizarlas como sustrato.

Capacidad Antioxidante Total

La capacidad antioxidante (Figura 4 A, B, C y D) disminuyó a medida que avanzó el proceso de maduración. Esto coincidió con lo reportado por Alonso-Borbalán *et al.* (2003), quienes trabajaron con siete cultivares de uvas tanto rojas como verdes. Los valores de la segunda temporada de cultivo fueron significativamente mayores en el inicio del ensayo (Figura 3 A, B, C y D).

La evolución durante la maduración fue similar a la obtenida para FT, detectándose una correlación ($r=0.69$) de TEAC con dicha variable. Alonso-Borbalán *et al.* (2003) encontraron una buena correlación entre los FT y el TEAC ($r=0.89$), aunque no pudieron establecer una relación directa con un componente específico de los FT. El patrón de metoxilación del anillo B de los flavonoides influiría sobre la capacidad antioxidante de estos componentes, que pueden interconvertirse en compuestos con menor capacidad antioxidante, por ejemplo, las cianidinas pueden deglucosilarse y servir como sustrato a peroxidasas, de este modo puede explicarse una correlación baja en condiciones de altas temperaturas.

Para el muestreo del 14 de mayo, que marcó el inicio de la madurez, el efecto de la temporada de cultivo no fue significativo a diferencia del efecto de los tratamientos y la interacción $T_e \times T$ que resultaron significativos ($p \leq 0.001$). El tratamiento T4, fue el que obtuvo el menor valor con $LSD=10.573$. Durante la maduración, los valores TEAC del tratamiento T2 aumentaron más rápido que en los otros tratamientos. La dramática disminución a la madurez puede justificarse por una degradación de los compuestos fenólicos responsables del mismo, sensibles a la baja luminosidad. El tratamiento testigo (T0) obtuvo durante el primer año los valores más altos de capacidad antioxidante a la cosecha. Esto puede explicarse por que su menor contenido de antocianinas se compensó con un contenido alto de fenoles totales que contribuyen a la capacidad antioxidante sin ser necesariamente coloreados (Downey *et al.* 2004).

En la época de cosecha (20 de mayo), resultaron significativos los efectos de la temporada de cultivo y los tratamientos, al igual que las interacciones de ambos. Por el contrario, los valores más altos de CIRG no obtuvieron necesariamente un alto valor de

TEAC. Los valores obtenidos en ambas temporadas de cultivo son similares a los obtenidos por Lee y Talcott (2004) en uvas rojas, destinadas a la producción de vinos y menores que los reportados para el cultivar 'Norton' (Muñoz-Espada *et al.*, 2004). Al analizar a través del modelo de regresión por *Step Wise*, la capacidad antioxidante resultó explicada con $R^2 = 0.72$ por la temperatura mínima (T_{min}) que reciben los racimos y por la luminosidad incidente máxima. Para ello T_{min} explicó el 54% de la variabilidad y la luminosidad contribuyó con el 21% ($p \leq 0.01$).

CONCLUSIONES

El sombreado de racimos influyó sobre las variables en estudio. El color resultó mejor en los tratamientos sombreados con las redes negras, en primer lugar la de 35 % y luego la de 50% de retención lumínica. Sin embargo el efecto de la temporada de cultivo fue notable.

Los fenoles totales resultaron mas altos en los tratamientos testigo y esto se tradujo en una mayor capacidad antioxidante, que disminuyó a la cosecha en el tratamiento sombreado con la red negra que retenía el 50% de la luminosidad.

La capacidad antioxidante presentó una correlación negativa con el índice de color, por lo que se deduce que además de las antocianinas hay compuestos no coloreados que contribuyen al TEAC.

Tanto el color como la capacidad antioxidante son explicados en mayor medida por las temperaturas mínimas que se registran en el racimo aunque para esta última incide levemente la luminosidad incidente.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso Borbalán, A. M.; L. Zorro; D. A. Guillén; C. García Barroso. 2003. Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography–mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography A* 1012:31-38.
- Amir-Shapira, D.; E. E. Goldschmidt; A. Altman. 1987. Chlorophyll catabolism in senescing plant tissue: In vivo breakdown intermediates suggest different degradative pathways for citrus fruit and parsley leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:1901-1905.
- Arozarena, I.; B. Ayestarán; M. J. Cantalejo; M. Navarro; M. Vera; I. Abril; A. Casp 2002. Anthocyanin composition of Tempranillo; Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyards over two years. *European Food Research and Technology* 214:303-309.
- Aydin, N.; A. Kadioglu. 2001. Changes in the chemical composition; polyphenol oxidase and peroxidase activities during development and ripening of medlar fruits (*Mespilus germanica* L.). *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 27: 85–92
- Bergqvist, J.; N. Dokoozlian; N. Ebisuda. 2001. Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture* 52:1-7.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cantos, E.; J. C. Espín; F. Tomás-Barberán. 2002. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:5691-5696.

- Carreño, J.; A. Martínez; L. Almela; J. A. Fernández-López. 1995. Proposal of an index for the objective evaluation of the color of red table grapes. *Food Research International* 28:373-381.
- Dokoozlian N. K.; W. M. Kliewer. 1996. Influence of light on grape berry growth and composition varies during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121:869-874.
- Downey, M. O.; J. S. Harvey; S. P. Robinson. 2004. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10:55-73.
- Haselgrove, L.; D. Botting; R. van Heeswijck; P. B. Høj; P. R. Dry; C. Ford; P. Iland. 2000. Canopy microclimate and berry composition: The effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6:141-149.
- Huff, A. 1982. Peroxidase-catalysed oxidation of chlorophyll by hydrogen peroxide. *Phytochemistry* 21:261-265.
- Jeong, S. T.; N. Goto-Yamamoto; S. Kobayashi; M. Esaka. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* 167:247-252.
- Kalt, K.; C. Lawand; D. A. J. Ryan; J. E. McDonald; H. Donner; C. F. Forney. 2003. Oxygen radical absorbing capacity; anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128:917-923.
- Kliewer W. M.; R. E. Torres. 1972. Effect of controlled day and night temperature on grape coloration. *American Journal of Enology and Viticulture* 23:71-77.
- Kuskoski, M. E.; A. G. Asuero; M. C. García-Parilla; A. M. Troncoso; R. Fett. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciencia e Tecnología de Alimentos; Campinas* 24:691-693.
- Lee, J.-H.; S. T. Talcott. 2004. Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:361-366.
- Mori, K.; S. Sugaya; H. Gemma. 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* 105:319-330.
- Muñoz-Espada, A. C.; K. V. Wood; B. Bordelon; B. A. Watkins. 2004. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord; Norton; and Marechal Foch grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:6779-6786.
- Pellegrini, N.; R. Re; M. Yang; C. A. Rice-Evans. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying the 2,2'-azobis (ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic) acid radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology* 299:379-389.
- Pereira, G. E.; J.-P. Gaudillere; C. van Leeuwen; G. Hilbert; M. el Maucourt; C. Deborde; A. Moing; D. Rolin. 2006. ¹HNMR metabolite fingerprints of grape berry: Comparison of vintage and soil effects in Bordeaux grapevine growing areas. *Analytica Chimica Acta* 563: 346-352.
- Re, R.; N. Pellegrini; A. Proteggente; A. Pannala; M. Yang; M; C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-1237.
- Rice-Evans, C. A.; N. J. Miller; G. Papaganda. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20:933-956.

- Ros-Barceló, A.; A. Pomar; M. López-Serrano; M. Pedreño. 2003. Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. *Functional Plant Biology* 30:577-591.
- Ryan, J. M.; E. Revilla. 2003. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and simultaneous analysis of anthocyanins and stilbenes of *Vitis* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:7246-7251
- Singleton, V. L.; J. A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-158.
- Spayd, S. E.; J. M. Tarara; D. L. Mee; J. C. Ferguson. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 53:171-182.
- Tomás-Barberán, F. A.; J. C. Espín. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:853-876.
- Yamasaki, H.; Y. Sakihama; N. Ikehara. 1997. Flavonoid-Peroxidase Reaction as a Detoxification Mechanism of Plant Cells against H₂O₂. *Plant Physiology* 115: 1405-1412.
- Yamauchi, N.; Y. Funamoto; M. Sigyó. 2004. Peroxidase-mediated chlorophyll degradation in horticultural crops. *Phytochemistry Reviews* 3: 221-228.
- Zhang, Z.; X. Pang; D. Xuwu; Z. J. Y. Jiang. 2005. Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry* 90:47-52.

TABLAS Y FIGURAS

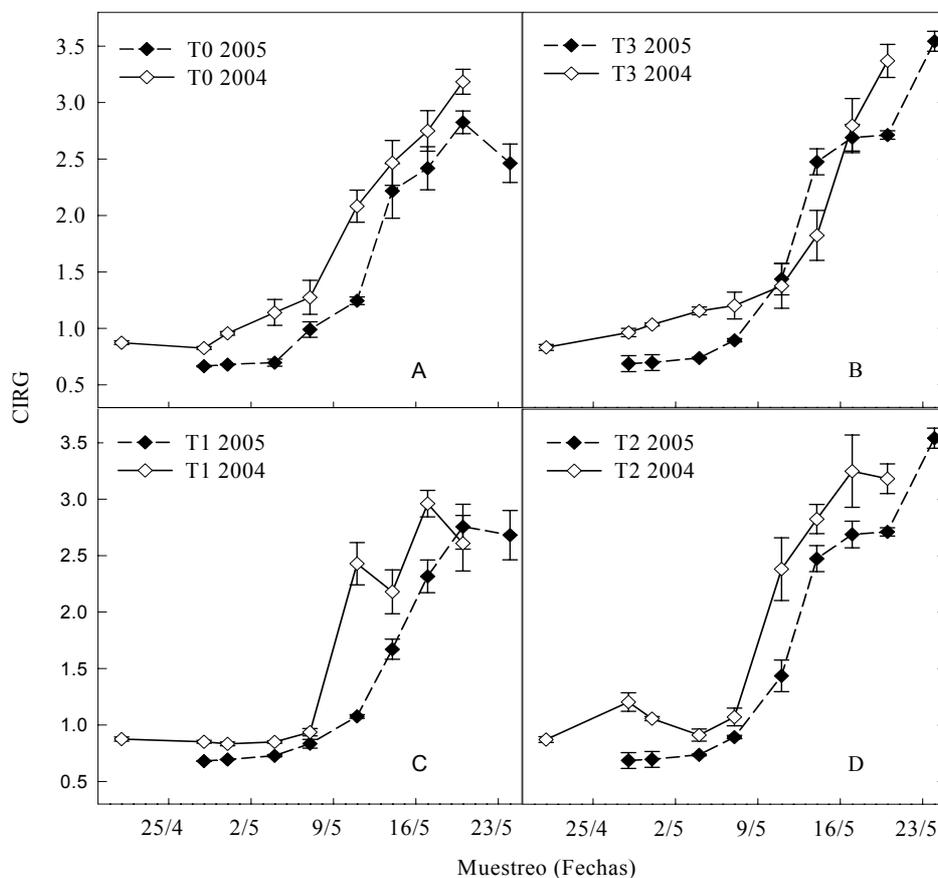


Figura 1- Evolución del parámetro color (CIRG) durante la maduración de uvas cv 'Flame Seedless' para los distintos tratamientos durante las dos temporadas de estudio. Los valores corresponden a las medias \pm error estándar. A, racimos sin cubrir; B racimos cubiertos con red negra (35%); C, cubiertos con red blanca; D cubiertos con red negra, ambas con 50% de retención lumínica.

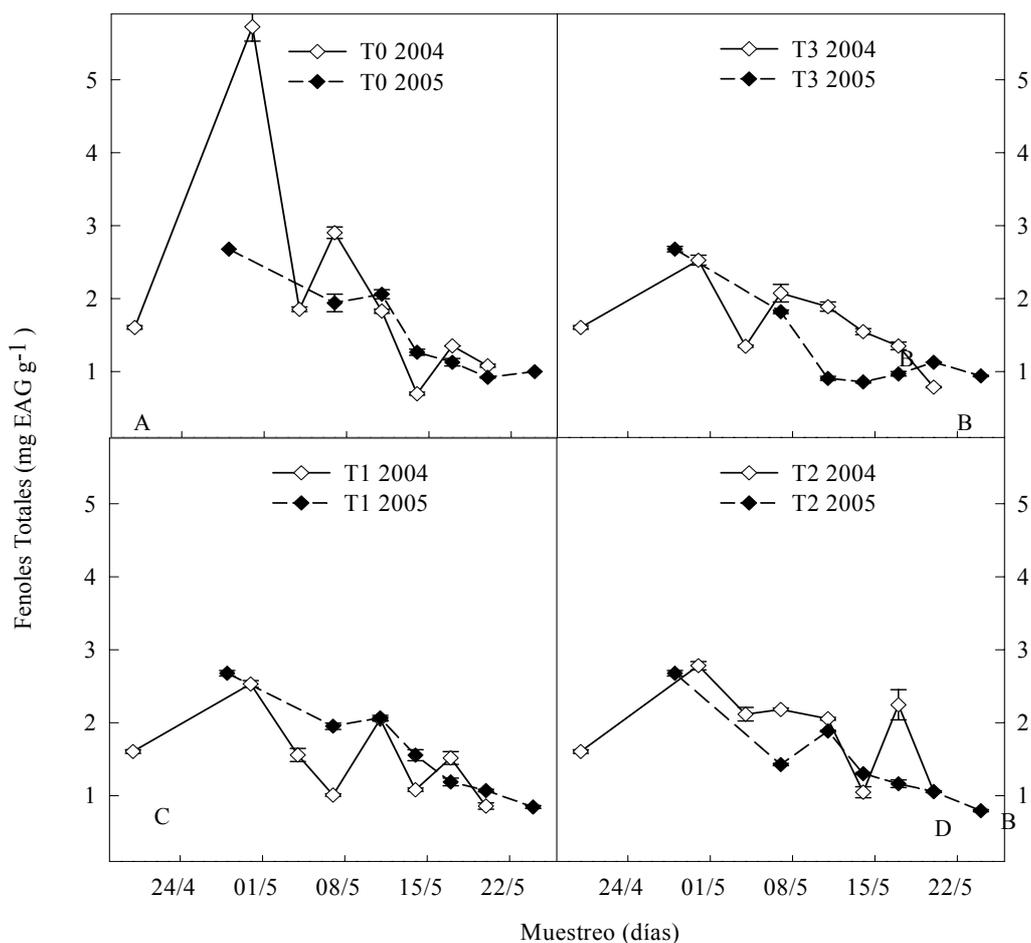


Figura 2- Evolución de fenoles totales, expresados en equivalentes de ácido gálico por gramo de peso fresco, durante la maduración de uvas cv 'Flame Seedless' durante dos temporadas de crecimiento. Los valores representan las medias \pm error estándar para los cuatro tratamientos. A, racimos sin cubrir; B racimos cubiertos con red negra (35%); C, cubiertos con red blanca; D cubiertos con red negra, ambas con 50% de retención lumínica.

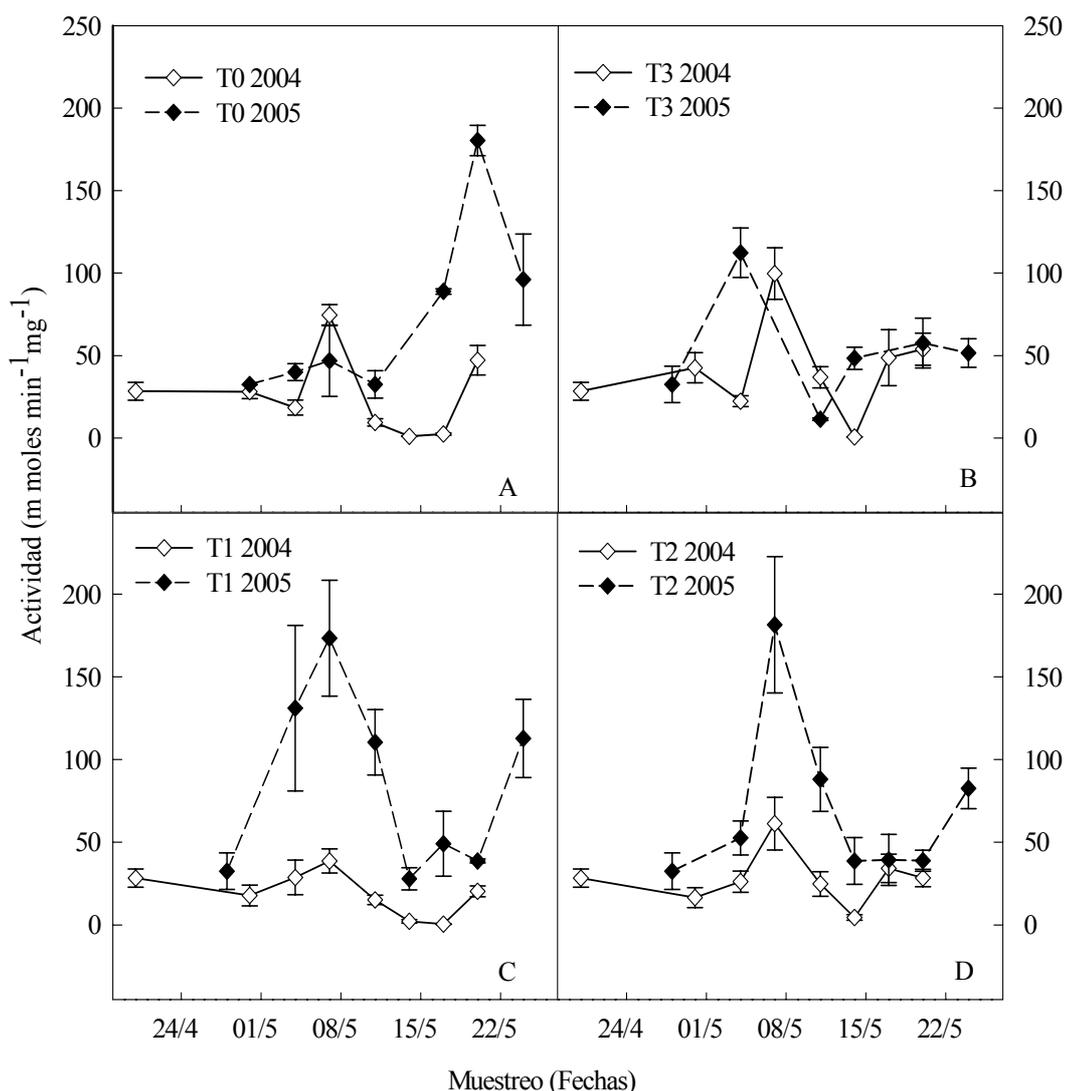


Figura 3- Evolución de la actividad de peroxidasas, durante la maduración de uvas cv 'Flame Seedless' durante dos temporadas de cultivo. Los resultados se expresan en m moles por minuto y por mg de proteína. Los valores representan las medias \pm error estándar para los cuatro tratamientos en estudio. A, racimos sin cubrir; B racimos cubiertos con red negra (35%); C, cubiertos con red blanca; D cubiertos con red negra, ambas con 50% de retención lumínica.

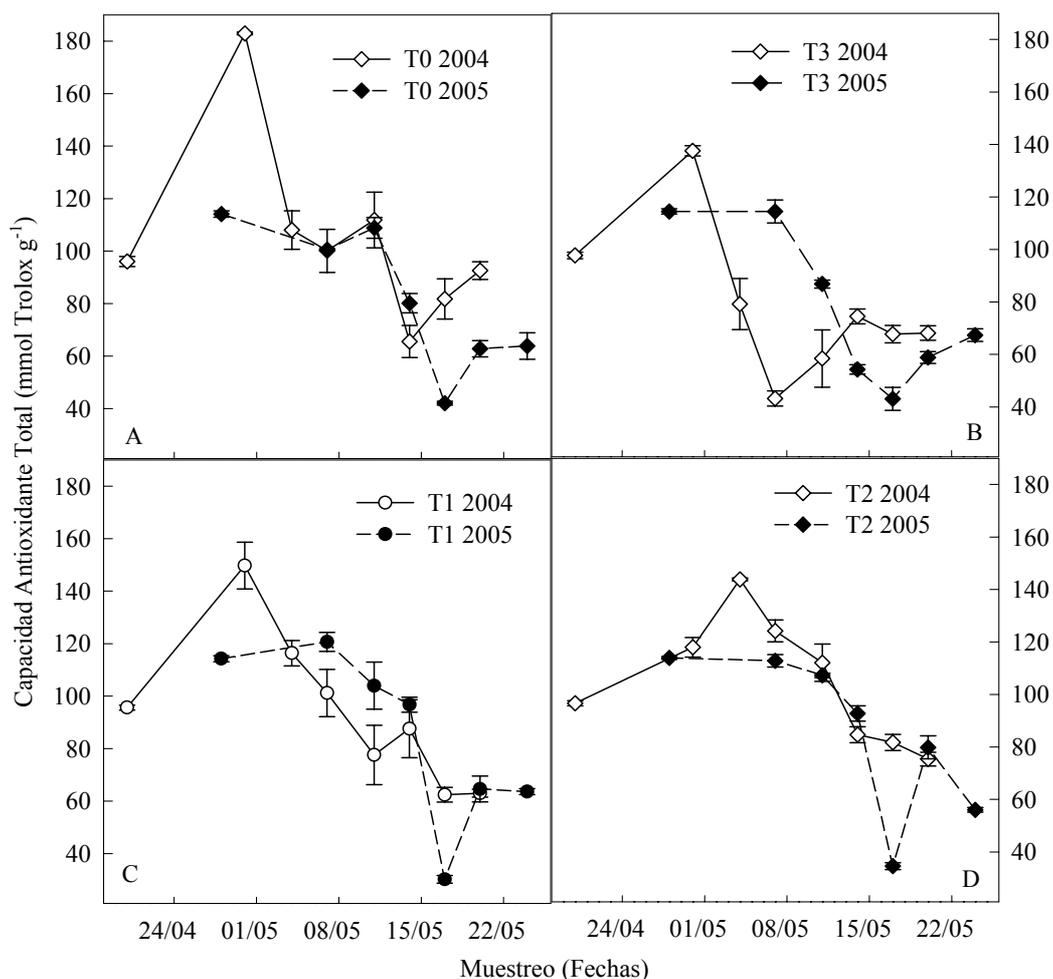


Figura 4. Capacidad antioxidante total expresada en mmoles equivalentes Trolox por gramo de peso fresco, para los distintos tratamientos durante la evolución de la madurez de frutos de *Vitis vinifera* L. Los valores corresponden a medias \pm error estándar. A, racimos sin cubrir; B racimos cubiertos con red negra (35%); C, cubiertos con red blanca; D cubiertos con red negra, ambas con 50% de retención lumínica.