

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA



POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Especialización en Biotecnología

PROYECTO

“Estudio de la capacidad antioxidante de vinos de Baja California, compuestos responsables y caracterización”

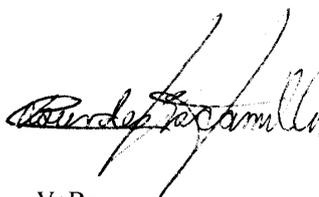
I. A. María del Rosario Delgadillo Díaz

Asesor: Dr. José Ramón Verde Calvo.

Año 2010



Vo. Bo. Asesor  
Dr. José Ramón Verde Calvo  
Depto. De Biotecnología



VoBo  
Dra. María de Lourdes Escamilla Hurtado  
Depto. De Biotecnología

<b>INDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>La vid (Vitis vinífera)</b>	<b>3</b>
<b>Regiones en México</b>	<b>3</b>
<b>Características climáticas y de suelo de la zona de estudio</b>	<b>4</b>
<b>Datos geográficos del valle de Guadalupe</b>	<b>4</b>
<b>Compuestos no flavonoides</b>	<b>6</b>
<b>Flavonoides</b>	<b>6</b>
<b>Los antocianos</b>	<b>7</b>
<b>Los flavano 3-oles (3-flavanoles)</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>8</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>8</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>8</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>11</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>23</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>24</b>

## **INTRODUCCIÓN.**

### **La vid (*Vitis vinifera*)**

La vid europea, *Vitis vinifera*, es una especie de antiguo conocimiento de la humanidad, teniéndose referencias de ella y de su producto (el vino desde hace más de 5000 años en Egipto. Su origen parece haber sido entre los mares Negro y Caspio, donde todavía crece en condiciones silvestres. Esta planta adquirió importancia cuando se extendió a los países del mediterráneo y por todo el Imperio Romano. Una importante viticultura se desarrolló en Francia, España, Italia, Bulgaria, y algo menor en Alemania, Hungría y otros países.

Los conquistadores españoles fueron los encargados de diseminar esta especie por América, consolidándose fuertemente en México, el suroeste de los Estados Unidos de América, Chile y Argentina, y en menor medida en Perú, Brasil y Uruguay. Las variedades de vid para vino que existen en la antigüedad se han relacionado lentamente desde tiempos muy remotos. Por ejemplo, la variedad Moscatel era conocida por los griegos y la variedad Syrah fue llevada por los romanos desde Siracusa a Francia en tiempos del imperio. Con el tiempo en cada localidad donde se producía vino se fueron seleccionando aquellas plantas que presentaban mejor adaptación y calidad en el producto, quedando de esta forma ligadas a ciertos tipos de vino (Mac Kay, 2010).

### **Regiones Vinícolas en México**

Existen tres zonas vinícolas en México: Zona norte, comarca lagunera y zona centro.

Zona norte.

Baja California y Sonora.

En el Estado de Sonora se produce la cantidad más grande de uva en toda la republica Mexicana, y aunque no es considerado el mejor para la producción de vino se obtiene un gran numero de uva de mesa, uva pasa y aguardiente. Hermosillo y Caborca son las dos zonas vitícolas más importantes. Por otro lado, los viñedos de Baja California se encuentran en el área sur de la línea fronteriza que se extiende desde Mexicali hasta Ensenada, en la costa del Pacifico. Las características de esta área en cuanto a clima y tipo de suelo, permiten obtener cosechas de máxima calidad. Las zonas de cultivo más importantes son Valle de Guadalupe, Valle de Calafia, la zona de Tecate, Valle de Santo Tomas, San Vicente, Valle de Mexicali, Tijuana, Ensenada y Santo Domingo (Mac Kay, 2010).

Es esta zona considerada la más importante del país pues cuenta ya con 26 casas productoras de vino, entre las que destacan las siguientes tres por orden de tamaño en su producción: L.A. Cetto, Industrias Pedro Domecq y Bodegas Santo Tomás. Sin embargo, existen otras vinícolas pequeñas que han destacado por la buena calidad de su vino.

L.A. Cetto. Algunas de las cepas que forman sus viñedos son: Zinfandel, Chenin Blanc, Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Nebbiolo, Sauvignon Blanc, Petit Sirah y Merlot.

Casa Pedro Domecq. Esta casa elabora líneas de vino que van desde económicas hasta Premium dentro de las que se encuentran Reyes, varietales XA, Reserva Real, Chateau Domecq y Cava Reservada. Para la elaboración de dichos productos se utilizan uvas como French Colombard, Riesling, Cabernet Sauvignon, Merlot, Chenin Blanc y Sauvignon Blanc.

Bodegas Santo Tomás. Su vino Premium es el Duetto, pero maneja más marcas como Santo Tomás, Único, Misión, Vinos San Emilio y Calviñe (espumosos). Las cepas que se utilizan para la elaboración de estos vinos son, entre otras, Cabernet Sauvignon, Merlot, Chenin Blanc, Sauvignon Blanc, Cardonnay, Barbera y Calviñe.

Monte Xanic. Algunas de las etiquetas que maneja esta vinícola localizada al noreste de Ensenada son Viña kristel, Calixa, Monte Xanic y Gran Ricardo. Los tipos de vinos y cepas que se utilizan son Chenin Blanc, Sauvignon Blanc, Chardonnay, Semillón, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Petit-Verdot, Malbec y Sirah.

Zona Comarca Lagunera.

Esta zona abarca el 4% de la producción vinícola del país y comprende los estados de Coahuila y Durango. Las principales cepas que se encuentran es estos viñedos son Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Merlot, Sauvignon Blanc, Tempranillo y Semillón (Casa Madero 2003).

Casa Madero. Sus vinos se dividen en Casa Grande Reserva, Casa Madero, San Lorenzo, Monte Viña, Carlón Doble y Casa Grande.

Zona Centro

Aguascalientes. Fue reconocido durante mucho tiempo como el estado vitícola más importante del país, tanto por su superficie como por su producción. Pero hoy, a pesar de esta tradición, su potencial enológico está limitado a unos cuantos viñedos aislados. Las principales viníferas cultivadas en los ocho municipios que comprenden esta región son las variedades Salvador, Cariñana, Chenin Blanc, Ugni Blanc o Trebbiano y Palomino.

Querétaro y Zacatecas. Zacatecas es una de las zonas de más reciente incorporación a la viticultura mexicana, las regiones de estos estados son núcleos productores pues ambos satisfacen el gusto de los conocedores. Las diferentes cepas que estos estados cultivan son: Merlot, Ugni Blanc, Sauvignon Blanc, Semillón, Malbec, Gamay, entre otras (Casa Madero 2003).

### **Características climáticas y de suelo de la zona de estudio.**

Valle de Guadalupe: Esta región, se encuentra ubicada entre Ensenada y Tecate, es una franja de la región costera de la península de Baja California, que inicia en la frontera con California (EEUU) extendiéndose hacia el Sur por unos 250 Km., y desde las costas del Pacífico hacia el interior por unos 50-60 Km., es decir hasta el pie de la Sierra de Juárez que corre, de Norte a Sur, dividiendo 2 regiones climáticas: La Costera con su clima templado de tipo mediterráneo y la Continental con su clima caluroso y desértico (Mac Kay, 2010).

### **Datos geográficos del Valle de Guadalupe**

Latitud: 32°5' Norte

Altitud: 350 msnm

Orientación: Este-Oeste

Vientos Dominantes: Oeste/Sur-Oeste

Distancia al Océano: 25 Km.

## CLIMA

Temperatura mínima media: 8°C  
Temperatura máxima media: 21° C  
Temperatura mínima absoluta. -5°C  
Temperatura máxima absoluta. 39°C  
Humedad relativa media: 75%  
Heladas de Primavera: Ausentes  
Época de lluvias: Noviembre-Marzo  
Precipitación media anual: 250 mm  
Precipitación máxima registrada: 550 mm  
Precipitación mínima registrada: 85 mm

## SUELOS

Parte plana del valle: Aluvional, limo-arenoso  
Parte Colinar: Ligero, granito descompuesto

## VITICULTURA

Superficie regional total: 2800 ha  
Irrigación: Sistema de Goteo  
Orientación de los viñedos: Este-oeste o Norte-sur  
Variedades:  
Blancas: Chardonnay, Sauvignon Blanc, Chenin Blanc, French Colombard, Moscatel, Palomino, Riesling, Viognier  
Tintas: Cabernet Sauvignon, Merlot, Malbec, Petite Sirah, Syrah, Grenache, Nebbiolo, Barbera, Zinfandel, Tempranillo, Sangiovese, Petite Verdot  
Época de vendimia: Agosto, septiembre y en algunos años hasta octubre (Mac Kay 2010).

### **Capacidad antioxidante de los vinos.**

En los últimos años han surgido numerosos estudios (Motohasi y Sakagami, 2008; Zhou y Col., 2004) que demuestran que el consumo moderado de vino es benéfico para la salud, principalmente en la prevención de enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo, tales como: aterosclerosis, artritis, demencia y cáncer. El vino tiene propiedades antioxidantes que se deben a sus componentes polifenólicos, el vino libre de polifenoles pierde dicha actividad (Robinson, 2006). Los antioxidantes son esencialmente importantes para el organismo por la capacidad que tienen de proteger a las macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo. Entre los más conocidos figuran los tocoferoles, el ácido ascórbico carotenoides, ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas; estos polifenoles están presentes en plantas que son relativamente abundantes en la dieta de los humanos por ejemplo, en las hortalizas, frutas, y vinos (Oliver y Col., 2000). En los vinos, los principales antioxidantes son los compuestos fenólicos: el ácido caféico, epicatequina, catequina, ácido gálico, cianidina, malvidina-3-glucósido, rutina, miricetina, quercetina y resveratrol.

La composición fenólica de los vinos depende de varios factores como son: la variedad de las uvas, el tipo de suelo, el clima y las prácticas agronómicas (Ávalos Llano y Col., 2003). También el tipo de vinificación utilizado influye en la composición debido a los fenómenos físicos que se dan durante la maceración como la difusión de compuestos desde las partes sólidas hacia el mosto, o la extracción de compuestos de los toneles.

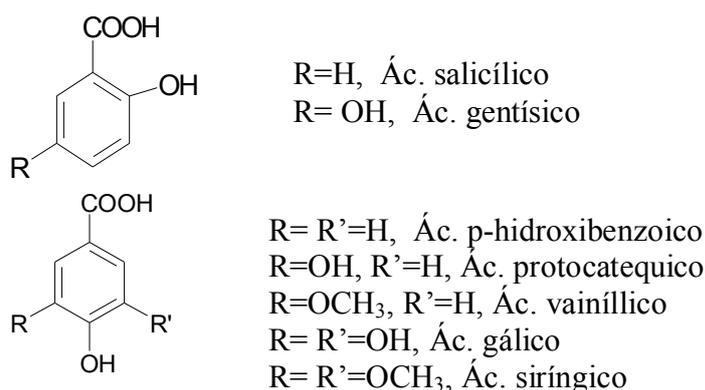
Por otra parte, durante el añejamiento; los polifenoles participan en reacciones de oxidación, degradación y condensación (Flanzy, 2003).

Los compuestos fenólicos son importantes en la bioquímica vegetal, donde tienen funciones diversas como: aportar la coloración de flores y frutos, la impregnación de lignina de las paredes pecto-celulósicas, etc. Desde un punto de vista químico, los compuestos fenólicos constan de un anillo bencénico que contiene uno o diversos grupos hidroxilo. Según su estructura química, estos compuestos se pueden subdividir en flavonoides o no flavonoides (Valls, 2000). Los polifenoles incluyen también a los derivados ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. que resultan de las sustituciones de la estructura de la base (Flanzy, 2003). Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes por su estructura química donadores de H necesarios para el funcionamiento de las células de frutas y verduras, por ejemplo: manzanas y chilacayote y en bebidas como té y vino (Kinsella, 1993).

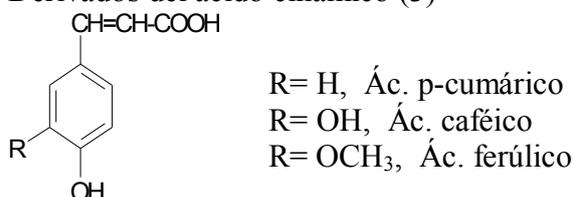
### Compuestos no flavonoides.

Esta denominación abarca a los ácidos fenoles, divididos en ácidos benzoicos ( $C_6-C_1$ ) y ácidos cinámicos, portadores de una cadena lateral insaturada ( $C_6-C_3$ ), pero también a otros derivados fenólicos como los estilbenos. (Flanzy 2003).

Derivados del ácido benzoico (7).



Derivados del ácido cinámico (3)



Es de destacar la presencia en la uva de otros compuestos fenólicos como el resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) bajo forma trans y de su derivado glucosilado.

### Flavonoides

Los flavonoides están caracterizados por un esqueleto base de 15 átomos de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ) del tipo 2-fenil benzopirona. Esta gran familia está dividida en varias subclases que se distinguen por el grado de oxidación de su núcleo pirano. Los flavonoides están basados en la estructura fenil-2-benzopirona, y son los flavonoles de la uva, mientras que los flavonoides comprenden igualmente los antocianos y los flavanos 3-ol (3-flavanoles).

### Los antocianos.

Los antocianos (del griego anthos, flor y Kyanos, azul) representan una parte importante tanto a nivel cualitativo como cuantitativo de los flavonoides de la baya de uva tinta. Localizados en el hollejo y en las 3 ó 4 primeras capas celulares del hipodermo, contribuyen de manera preponderante al color de las especies tintas. Las formas agliconas, que responden a la fórmula general presentada en la figura 1, son denominados antocianidinas.

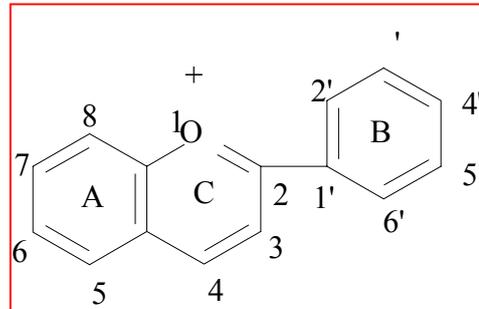
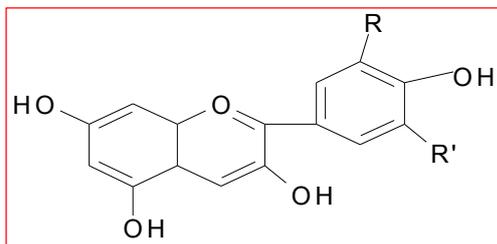


Figura 1 Estructura de las antocianidinas (forma flavylium)

Las antocianidinas del género *Vitis* son la cianidina, la peonidina, la petunidina, la definidina y la malvidina (figura 2), pero el contenido y la composición en la uva varían enormemente en función de la especie y de la variedad (Flanzy, 2003).



R=OH, R'=H, Cianidina (rojo naranja)  
R=OCH<sub>3</sub>, R'=H, Peonidina (rojo)  
R=R'=OH, Definidina (rojo azul)  
R=OCH<sub>3</sub>, R'=OH, Petunidina (purpura)  
R=R'=OCH<sub>3</sub>, Malvidina (guinda)

Figura 2. Antocianinas de la uva y color que aportan.

### Los flavano 3-oles (3-flavanoles)

Los principales flavanoles monoméricos de la uva son la (+)-catequina y su isómero, la (-)-epicatequina. Este último se puede encontrar en forma de éster gálico. Sus formas oligoméricas y poliméricas (Fig. 3), que pueden comprender un número muy elevado de unidades se designan por el término “taninos” o “proantocianidinas”, a causa de su propiedad de liberar antocianinas en medio ácido por ruptura de las uniones inter monoméricas. Hay 2 grupos mayoritarios de taninos en la uva: las procianidinas, derivadas de catequina y epicatequina; y los prodelphinoides, derivados de galocatequina y epigalocatequina (Valls, 2000).

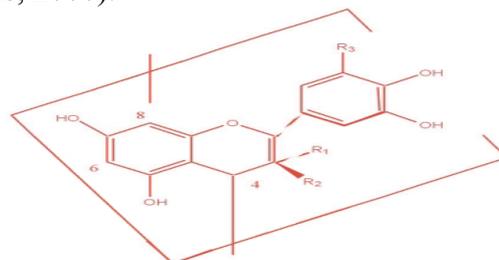


Figura 3. Estructura de los polímeros de los flavanoles

Los flavanoles son responsables en forma importante de aspectos positivos para el vino, como son el cuerpo y la estabilidad colorante en vinos tintos por su unión con las antocianinas, pero además, sus características sensoriales que pueden resultar negativas para la calidad del vino cuando están en exceso, como son la astringencia y el amargor (Valls, 2000).

## **OBJETIVO.**

Identificar qué compuestos son los responsables de la capacidad antioxidante de los vinos producidos en la región vitivinícola de Baja California.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Medir la cantidad de compuestos fenólicos totales en 13 diferentes vinos de la región vitivinícola de Baja California.
2. Cuantificar la capacidad antioxidante de los compuestos principales puros.
3. Cuantificar la capacidad antioxidante de los vinos, con dos métodos (ABTS, DPPH).
4. Ponderar la concentración de antocianinas mono y poliméricas
5. Separar los diferentes compuestos responsables de la capacidad antioxidante por CLAR.
6. Caracterizar los principales compuestos responsables de la capacidad antioxidante.

## **HIPOTESIS**

Si la cantidad de materia colorante y riqueza de taninos son responsables de la actividad antioxidante, entonces la concentración de los compuestos fenólicos deberá ser directamente proporcional con la capacidad antioxidante

## **METODOLOGÍA**

Muestras utilizadas de la región del Valle de Guadalupe, Baja California.

1 (Cabernet Sauvignon 2007 XA) 2 (Cabernet Sauvignon 2006 LA Cetto); 3 (Cabernet Sauvignon 2006 Calixa) 4 (Cabernet Sauvignon 2007 Santo Tomas); 5 (Tempranillo 2006 Santo Tomas); 6 (Zinfandel 2006 LA Cetto ); 7 (Merlot 2006 Santo Tomas); 8 (Petit Sirah 2006 LA Cetto); 9 (Barbera 2004 Santo Tomas); 10 (Reserva Real 2007); 11 (Cabernet Sauvignon 2007 Calixa); 12 (Cabernet Zinfandel 2005 Flor de Guadalupe); 13 (Cabernet Sauvignon 2005 XA)

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar su actividad frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. Alternativamente, diversos compuestos cromógenos, el DPPH (2,2- Difetil-1-picrilhidrazilo), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), y DMPD (dicloridato de *N,N*-Dimetil-*p*-fenilendiamina, son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos para captar los radicales libres generados, operando así contra los efectos de los procesos de oxidación (Kuskoski, 2005).

### **Determinación de fenoles totales Folin Cicalteau (Kuskoski, 2005).**

Se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por litro de vino.

Solución estándar.

En un matraz aforado de 100 ml se disuelven en agua 0.5 g de ácido gálico. Para trazar la curva de calibrado se miden: 0, 1, 2, 3, 5 y 10 ml de solución estándar de ácido gálico, se colocan en 6 matraces aforados de 100 ml y se aforan con agua destilada. La concentración de ácido de estas disoluciones (expresada en equivalentes de ácido gálico) es de 0, 50, 100, 150, 250 y 500 mg/ litro.

De cada solución se toma 1 ml y se vierten en matraces aforados de 100 ml; se añaden 60 ml agua, se agitan, se añade después 5 ml del reactivo de Folin Ciocalteu y se mezclan bien. Después de 30 segundos y antes de 8 minutos se añaden 15 ml de disolución de carbonato de sodio al 20% p/v, se mezcla todo y se diluye con agua hasta enrasar. Se deja esta disolución durante 2 h a 24° C y se determina la absorbancia de cada solución frente un blanco con agua destilada, a 765 nm en cubetas de 10 mm. Se grafica la absorbancia contra la concentración.

### **Cuantificación antocianinas**

Medición de color (Verde-Calvo, 2004).

El color del vino (CV) se obtiene midiendo la absorbancia en una celda de 10 mm a 520 nm, con vino no diluido.

$$CV = E_{520nm}^{10mm}$$

El color de los pigmentos poliméricos (CPP) se mide después de adicionar 20  $\mu$ L de  $K_2S_2O_5$  al 20% (p/v) a 950 $\mu$ L de vino (para dar 2000 ppm), se mezcla y se mide la absorbancia a 520 nm

$$CPP = E_{520nm}^{10mm} (SO_2)$$

Para la medición de color de los pigmentos monoméricos (CPM) se adicionan 20  $\mu$ L de HCl 1 M, a 1 mL de vino en celdas de 10 mm y se registra la absorbancia a 520 nm. La concentración total de antocianinas monoméricas en solución de HCl 1M se expresa como clorhidrato de malvidin 3-glucosa, usando el valor de absortividad molar de 28000 L mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, a 520 nm.

$$CPM = CV - CPP$$

### **Determinación de la capacidad antioxidante**

**Método DPPH** (Kuskoski, 2005)

Se basa en la reducción de la absorbancia medida a 517 nm del radical DPPH•, por antioxidantes. Se mide la absorbancia del radical DPPH, 100  $\mu$ M (3,9 mL) disuelto en metanol al 80%. Se añade 0.1 mL de la muestra o de la solución estándar, la mezcla se homogeniza cuidadosamente y se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos.

Se mide la absorbancia a 517 nm antes de añadir la muestra ( $A_0$ ) y pasados los 30 minutos ( $A_f$ ). La concentración de DPPH• en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresan en TEAC, actividad equivalente a Trolox ( $\mu\text{M/L}$  de vino).

#### **Método ABTS (Kuskoski, 2005)**

El radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  se obtiene por la reacción de ABTS (7 mM) aforado con persulfato de potasio  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (2,45 mM) incubados a temperatura ( $25 \pm 0.5$  °C) y en la oscuridad durante 16 h.

Una vez formado el radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de  $0.70 \pm 0.1$  a 754 nm. El ABTS se diluye con etanol 96% (v/v) hasta que se produce una inhibición del 20-80% (0.5 mL ABTS + 15 mL de etanol (96%)  $A = 2.562$ , se toman de esta solución 2720  $\mu\text{L}$  y se aforan a 10 mL,  $A = 0.781$ ), en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20  $\mu\text{L}$  de la muestra. A 980  $\mu\text{L}$  de dilución del radical  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  así generado.

Se le determina la absorbancia a 30°C, se añade 10  $\mu\text{L}$  de la muestra (0.5 mL de vino aforado a 10 mL con etanol 13% v/v) y se mide de nuevo la Absorbancia a 754nm, pasado 1 minuto.

Es común reportar la actividad del ABTS como equivalentes de Trolox (TEAC actividad antioxidante equivalente a Trolox); se ensaya a una concentración de 0-15  $\mu\text{M}$  (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones.

#### **Caracterización de compuestos fenólicos.**

**Cromatografía en HPLC técnica 1 (Bonertz, 2008).** Se uso un equipo Agilent serie 1100, con Bombas cuaternaria, desgasificador y detector de visible UV.

Las condiciones del equipo fueron: columna (LiChrospher) RP-18. 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$  (Varian, Palo Alto, CA.USA); flujo 1 mL/min, volumen de inyección, 20  $\mu\text{L}$ ; longitud de onda 280 nm; temperatura, 30°C; eluyentes: (A) agua/ ácido fosfórico 99.5:0.5 (v/v) y (B) acetonitrilo/agua/ácido fosfórico, 50.49.5:0.5 (v/v). El gradiente lineal A se mantuvo constante en 100% durante 2 min, de 2-7 min la concentración de B aumentó a 20%, de 7-25 min se incremento a 40% y se mantuvo de 25-31 min. De 31-35 min B aumentó a 80%, y de 35-40 min se incrementó hasta 100%, manteniéndolo 40-42 min. El tiempo de equilibrio a las condiciones originales fue de 15 minutos para una serie completa de 57 min.

**Cromatografía en HPLC técnica 2 (Rodríguez, 2002) para los estándares ferúlico y nuevamente todas las muestras de vino.** Los compuestos fenólicos se eluyeron con un gradiente lineal de tres fases, con metanol-ácido acético-agua, 10:2:88, (v/v) como solvente A. El solvente B fue una mezcla de metanol, ácido acético y agua 90:2:8 (v/v). El gradiente lineal fue de 100-85% de A en 15 min, 85-50% de A durante 10 min y de 50-30% de A durante 9 min.

Se usó una columna (LiChrospher) RP-18. 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$  (Varian, Palo Alto, CA); flujo, 1 mL/min; volumen de inyección, 20  $\mu\text{L}$ ; longitud de onda, 280 nm; temperatura, 30°C. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los estándares, fueron de marca (Sigma Aldrich): Ác. gálico, catequina, Ác. caféico, epicatequina, Ác. p-coumárico, Ác. ferúlico, resveratrol, quercitina, Ác. protocatequico, Ác. p-hidroxibenzoico, Ác. siringico y Ác. sinápico.

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos identificados en los vinos analizados se realizó por la técnica de estándar externo, obteniendo la curva patrón para cada uno de los estándares utilizados.

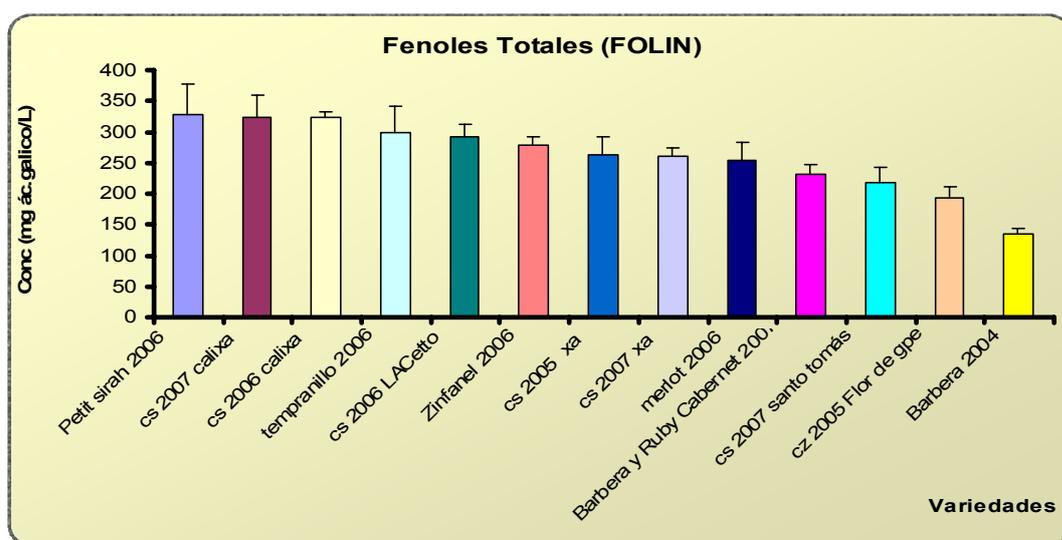
### Tratamientos Estadísticos.

Se realizaron prueba de ANOVA de una sola vía, a cada uno de los parámetros estudiados, cuando se encontró diferencia significativa también se realizó una prueba pareada de Tukey. Se empleó el programa Statgraphics Plus 5.1

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fenoles Totales

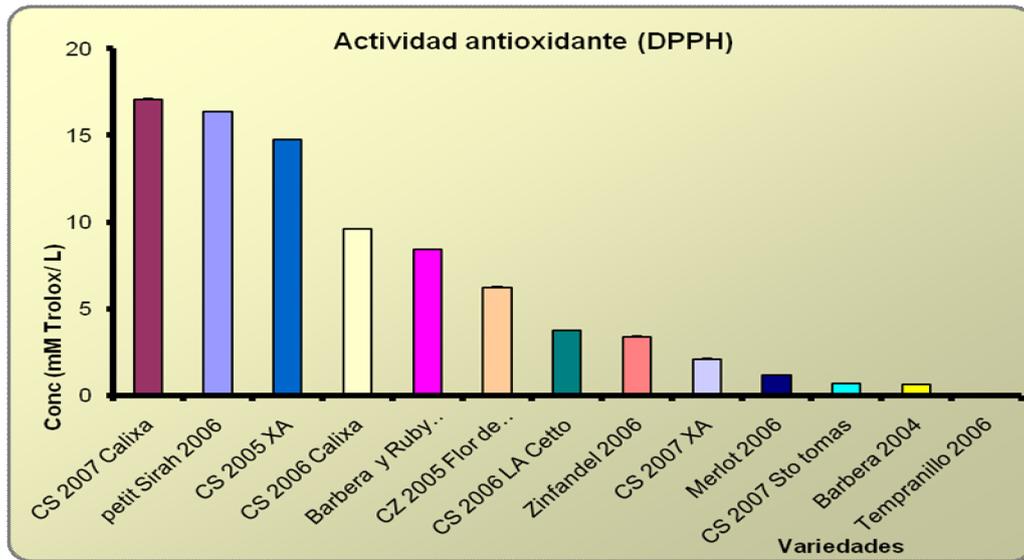
Los 13 vinos de la región de Baja California estudiados se acomodaron en orden decreciente del contenido de fenoles totales (gráfica 1), El contenido de fenoles totales de los vinos no guardaron un orden en función del año de producción, a pesar de ser una región vitivinícola pequeña, en donde se podría pensar que los vinos tendrían similar composición. Este estudio demuestra que los efectos del microclima y de las técnicas de vinificación influyen en el contenido de polifenoles de estos vinos. Considerando la fisiología de la planta, se observó que los años 2006 y 2007 presentaron diferencias en cuanto a las horas luz; el año 2006 tuvo mayor cantidad de horas luz, las que permitieron una mayor producción de compuestos fenólicos. Se realizó un análisis de varianza de una sola vía para cada una de las pruebas realizadas, encontrándose que hubo diferencia significativa en las medias comparadas ( $\alpha = 0.05$ ). Posteriormente se realizó una prueba por pares con el método de Tukey, la Tabla 1 muestra los pares que dieron diferencias significativas. Los vinos Cabernet Sauvignon 2006 Calixa y Cabernet Sauvignon 2007 Santo Tomas se diferenciaron hasta con 4 vinos. Debido a que todos los vinos estudiados presentaron algunos una diferencia significativa, se puede decir que, los vinos tintos producidos en esta región contienen una gran variedad en el contenido de compuestos fenólicos.



Gráfica 1. Fenoles totales

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizaron dos métodos químicos, el método de DPPH y el método de ABTS.

El método del DPPH, puso en evidencia la gran variabilidad de capacidad antioxidante (gráfica 2) que se dio en los vinos analizados, se puede observar El vino CS 2007 de Calixa junto con el Petit Sirah del 2006 presentaron los máximos valores, indicando que poseen un gran número de compuestos con capacidad antioxidante. El vino Calixa del 2006 presentó diferencias significativas con 9 vinos.



Gráfica 2. Actividad antioxidante por el método DPPH

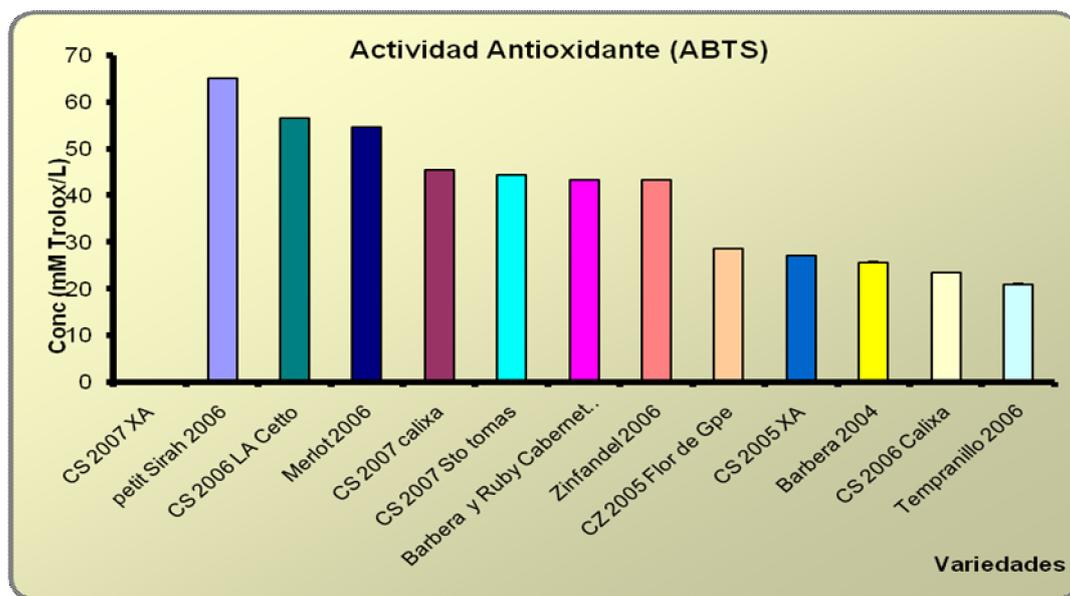
**Tabla 1.** Diferencias significativas para las determinaciones de fenoles totales, capacidad antioxidante (ABTS, DPPH) utilizando la prueba de Tukey con un 95% de confianza.

Vino	2 CS 2006 LA CETTO	3 CS 2006 CALIXA	4 CS 2007 S Tomas	5 Tempranillo 2006	6 Zinfandel 2006	7 Merlot 2006	8 Petit Sirah 2006	9 Barbera 2004	10 Barbera y RC 2007	11 CS 2007 CALIXA	12 C Zinfandel Flor de Gpe 2005	13 CS 2005 XA
1 CS2007 XA		DPPH					DPPH	FT	DPPH	DPPH	DPPH	DPPH
2 CS2006 LA CETTO		ABTS, DPPH		ABTS, DPPH			DPPH	FT, ABTS	DPPH	DPPH	ABTS	ABTS, DPPH
3 CS2006 CALIXA			FT,,DPPH	DPPH, ABTS	DPPH	ABTS, DPPH	ABTS, DPPH	FT, DPPH	FT	ABTS, DPPH	FT, DPPH	DPPH
4 CS2007 STomas				FT, ABTS			FT, ABTS, DPPH	FT	DPPH	FT, DPPH	DPPH	DPPH
5 Tempranillo 2006					ABTS	ABTS	ABTS, DPPH		ABTS, DPPH	ABTS, DPPH	FT, DPPH	DPPH
6 Zinfandel 2006							ABTS, DPPH	FT	DPPH	DPPH	FT	DPPH
7 Merlot 2006							DPPH	FT, ABTS	DPPH	DPPH, DPPH	ABTS, DPPH	ABTS, DPPH
8 Petite Sirah 2006								FT, ABTS, DPPH	ABTS, DPPH	FT	FT, ABTS, DPPH	ABTS
9 Barbera 2004									FT, DPPH	F, DPPH	DPPH	FT, DPPH
10 Barbera y RC 2007										FT, DPPH		DPPH
11 CS 2007 calixa											FT, DPPH	
12 C Zin Flor de Gpe 2005												DPPH
13 CS 2005 XA												

\*Caberbet Sauvignon CS.

1(C, Sauvignon XA) 2(C, Sauvignon 2006 LA Cetto); 3(C, Sauvignon 2006 Calixa) 4(C, Sauvignon STomás); 5(Tempranillo); 6(Zinfandel); 7(Merlot); 8( Petit Sirah); 9 (Barbera); 10(Barbera y Ruby Cabernet); 11(C, Sauvignon 2007 Calixa); 12(C, Zinfandel Flor de Gpe); 13(C, Sauvignon 2005 XA)

En esta **gráfica 3**, los vinos analizados se presentan en orden decreciente de la capacidad antioxidante.



Gráfica 3. Actividad Antioxidante por el método.

Los resultados sobre los valores de ABTS expresados como mM de trolox son mayores que en la técnica con DPPH; esto se debe a la baja selectividad del ión ABTS, que reacciona con cualquier compuesto aromático hidroxilado, independientemente de su potencial antioxidante real (Roginsky y Lissi, 2005). Por otro lado, si la capacidad antioxidante de los vinos se debe a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y otro tipo de polifenoles, como se reporta generalmente en la literatura (Anis y Col.2001; Pellegrini y Col., 2000), se debe tener en cuenta que el DPPH es más selectivo que el ABTS y, a diferencia de este último, no reacciona con los flavonoides carentes de grupos hidroxilo en el anillo B, ni con ácidos aromáticos que contengan un solo grupo hidroxilo (Roginsky y Lissi, 2005). Este hecho explica los valores trolox inferiores en el método DPPH con respecto al ABTS.

La figura 4, muestra los valores de capacidad antioxidante de los vinos que de manera natural se acomodaron en vinos de alto y bajo poder antioxidante, se le adicionaron dos líneas de tendencia (A y B), para ayudar a ver la proporcionalidad entre los vinos, dándose una relación directamente proporcional.

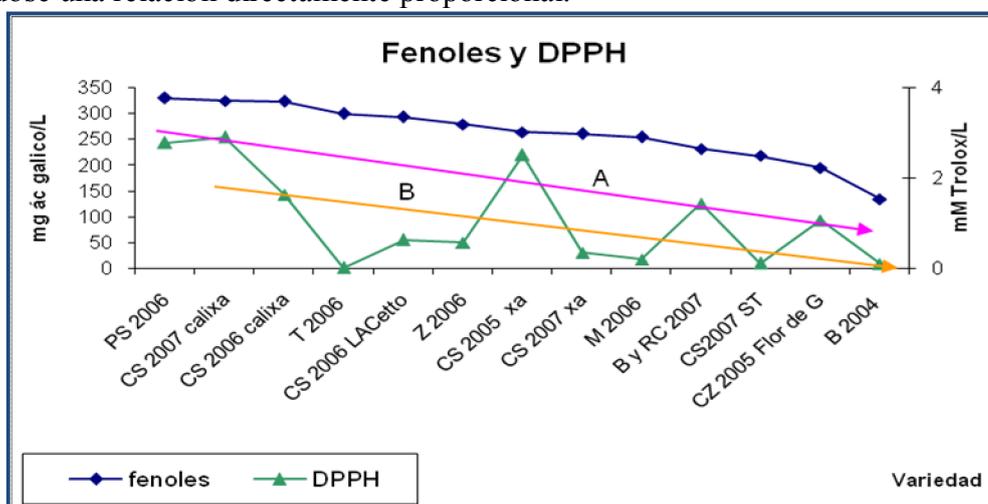


Figura 4. Comparación compuestos fenólicos con su capacidad antioxidante.

En la **figura 5** se observa la capacidad antioxidante de cada compuesto puro, ésta se determinó por el método DPPH, dando como resultado que la epicatequina y la catequina, son dos de los compuestos que tuvieron mayor capacidad antioxidante, presentando valores de 1.24 y 1.10 mM de Trolox respectivamente, además de ser los flavanoles más abundantes en los vinos tintos (Arnous, 2001).



Figura 5. Cuantificación de los estándares por el método de DPPH.

En cuanto a la determinación de las antocianinas mono y poliméricas se encontró que los vinos más jóvenes 2007 y 2006 (figura 6), presentaron valores más altos de concentración de los monómeros, los cuales coincidieron con lo reportado por Verde Calvo (2004) en la variedad Cabernet Sauvignon, en la cual los valores altos de antocianinas monoméricas decrecían conforme aumentaba el tiempo de añejamiento de los vinos, porque las antocianinas se iban polimerizando. En los vinos analizados se esperaba que aumentara el contenido de antocianinas poliméricas conforme el vino fuera más añejo, pero los resultados muestran un comportamiento aleatorio, indicando que el proceso de elaboración, el pH y la variedad influyeron en la concentración de las antocianinas poliméricas.

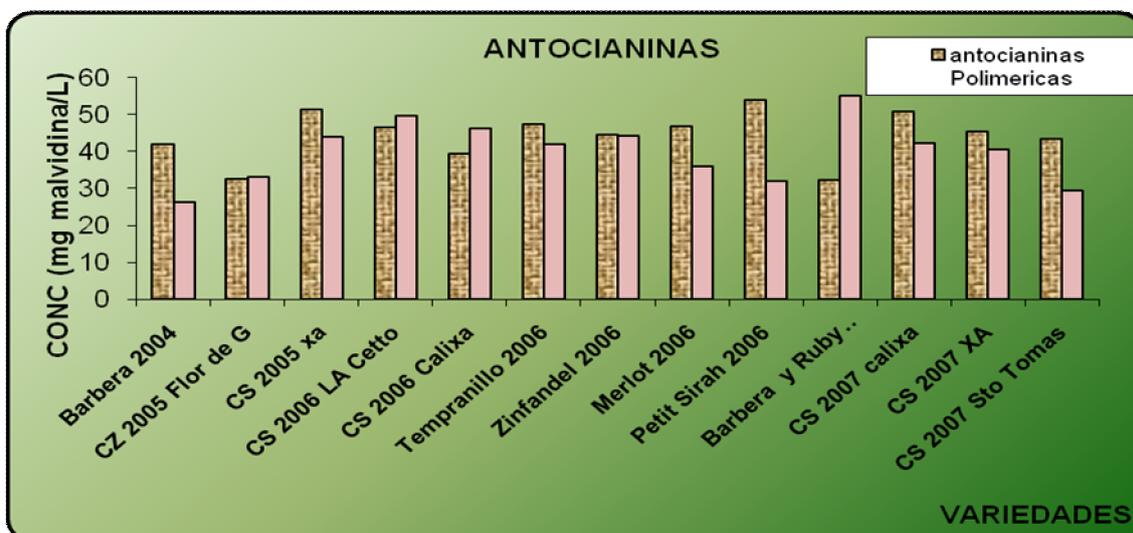


Figura 6. Medición de pigmentos poliméricos y monoméricos.

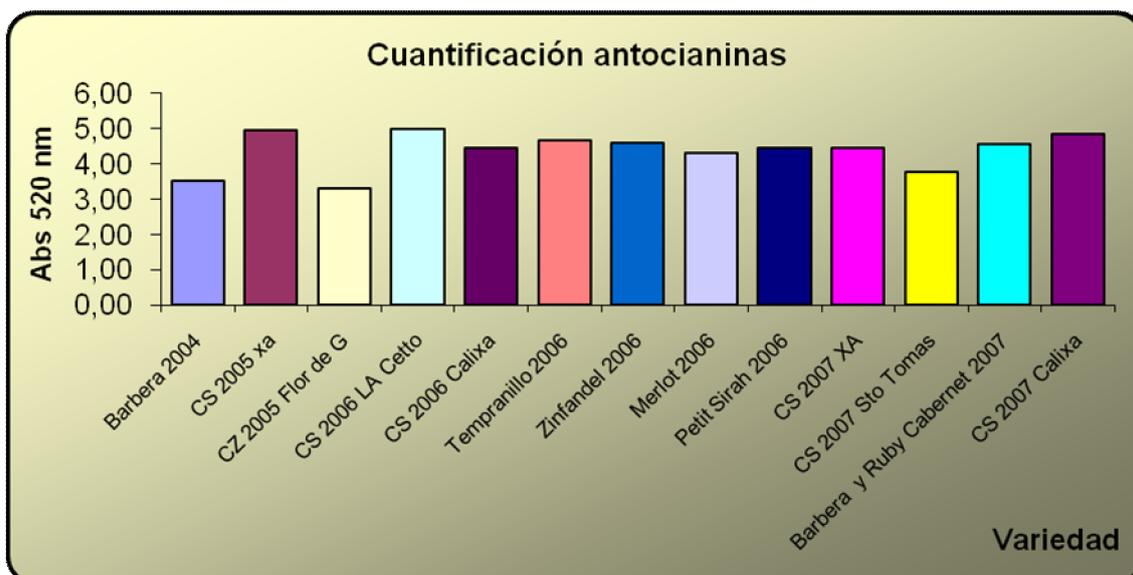


Figura 7. Medición de color

Los compuestos fenólicos se analizaron utilizando HPLC, para su identificación se utilizaron 13 estándares. Su presencia en cada muestra examinada se puede observar en la Tabla 2. Se puede apreciar que estos compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las muestras analizadas, y solamente dos vinos; Cabernet Sauvignon 2007 Calixa y C, Sauvignon 2005 XA presentaron una baja cantidad de estos compuestos.

**Tabla 2.** Presencia de los compuestos fenólicos en las diferentes variedades estudiadas (mg/L)

Estándar	Catequina	Ác. Caféico	Epicatequina	Ác. Gálico	Ác.p-cumarico	Ferúlico	Resveratrol	Quercitina	Ác.p-hidroxibenzoico	Ác. protocatequico	Ác. Siringico	Ác. sinapico
M 1	192.47	7.35	29.15	231.16	5.88	26.39	1.25	147.17	6.49	21.64	417.5	111.58
M 2	67.93	12.41	18.55	57.54	20.85	29.54	3.80	596.14	24.72	10.19	17.51	31.04
M 3	175.83	9.33	44.20	131.43	14.81	16.75	Nd	175.93	8.35	54.47	36.83	13.34
M 4	111.46	13.95	35.54	87.79	14.56	59.25	Nd	457.08	17.16	Nd	29.56	17.55
M 5	118.03	8.44	35.38	66.67	13.34	44.25	Nd	151.48	20.86	26.76	26.74	13.79
M 6	142.76	17.11	23.26	63.31	18.11	21.56	Nd	267.61	4.96	24.65	16.24	9.18
M 7	197.98	20.42	48.32	114.01	15.64	24.43	Nd	231.89	20.31	30.52	25.9	5.64
M 8	79.26	5.17	11.04	105.55	7.91	3.77	Nd	201.67	14.54	4.49	10.75	4.86
M 9	110.42	9.07	43.23	121.13	19.09	22.08	Nd	569.41	8.54	20.48	17	3.43
M 10	61.32	Nd	0.33	13.06	Nd	Nd	Nd	18.76	Nd	Nd	Nd	0.77
M 11	94.35	Nd	Nd	16.59	Nd	Nd	0.57	40.00	85	Nd	Nd	13
M 12	147.85	Nd	Nd	10.03	Nd	Nd	Nd	19	13.46	Nd	359.19	Nd

\*M1 (Zinfandel); M2 (Tempranillo); M3 (C, Sauvignon LA Cetto); M4 ( C, Sauvignon 2006 Calixa); M5 (C, Sauvignon STomas); M6 (Merlot);M7 ( Reserva Real); M8 (Barbera); M9 (Petit Sirah); M10 (Cabernet Sauvignon 2007 Calixa); M11(Cabernet Zinfandel Flor de Guadalupe); M12(C, Sauvignon 2005 XA)

El análisis de HPLC de los principales compuestos fenólicos muestran que la quercetina fue el compuesto de mayor concentración, encontrándose entre 18.76-596.24 mg/L. El ácido gálico fue el siguiente, los niveles de este componente oscilaron entre 10.03-231.16 mg/L. La concentración de catequina, estuvo en tercer lugar, y obtuvo valores de 61.32-197.98 mg/L.

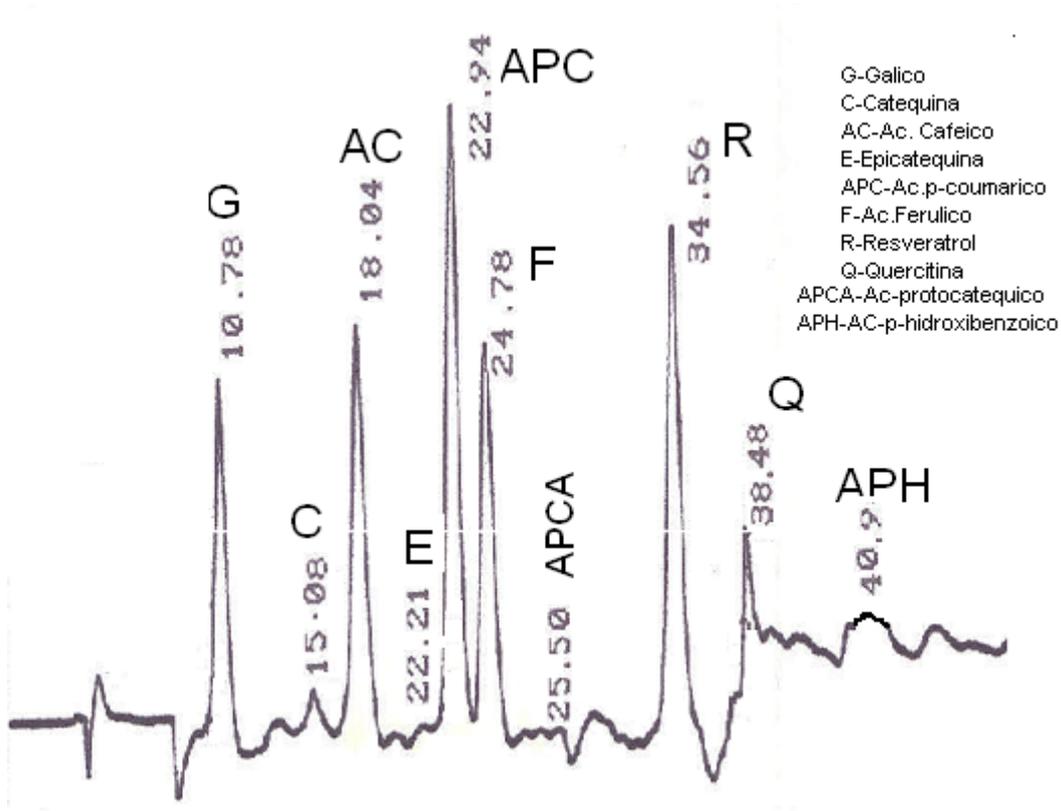


Figura 8. Cromatógrama de los estándares utilizados. Picos registrados a 280 nm. Pico 1, ácido gálico; 2, catequina; 3, ácido caféico; 4, epicatequina; 5, ácido p-cumárico; 6, ácido ferúlico; 7, ácido protocatequico; 8, resveratrol; 9, quercitina; 10, ácido p-hidroxibenzóico.

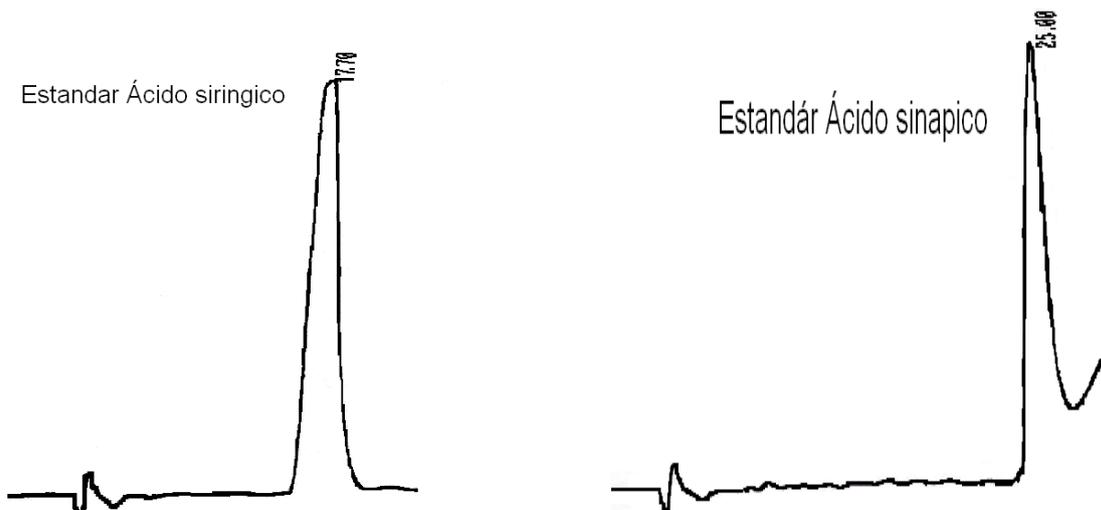


Figura 9. Los cromatogramas de los estándares ácido siríngico y ácido sinápico se obtuvieron mediante la técnica propuesta por Bonerz (2002).

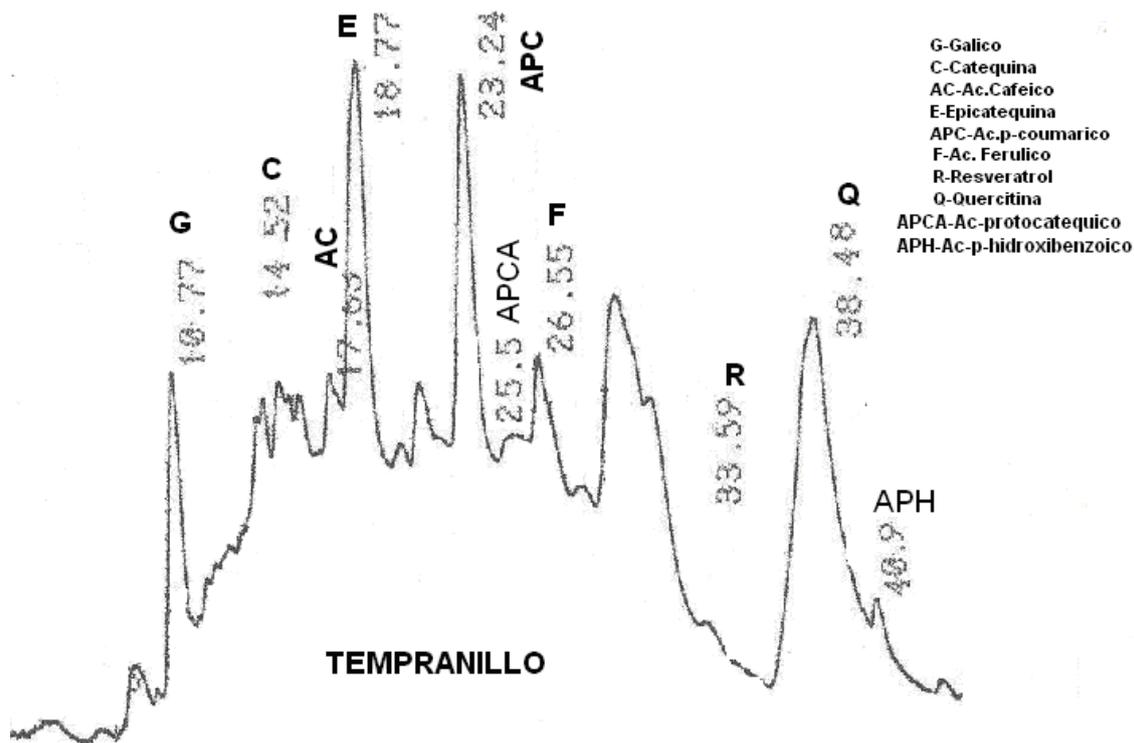


Figura 10. Cromatograma del vino Tempranillo 2006, Santo Tomas. Picos registrados a 280 nm. Pico: 1, ácido gálico; 2, catequina; 3, ácido caféico; 4, epicatequina; 5, ácido p-cumárico; 6, ácido protocatequico; 7, ácido ferúlico; 8. resveratrol; 9, quercitina.10, ácido p-hidroxibenzoico.

Tabla 3 Estándar Externo

Estándar	Conc (mg/ml)	Área
Ác. gálico	0.04	548020
Catequina	0.04	74787
Ác. caféico.	0.04	630092
Epicatequina	0.04	633778
Ác. p-cumárico	0.04	851040
Ác. ferúlico	0.04	545765
Resveratrol	0.04	788349
Quercitina	0.04	259986
Ac. p-hidroxibenzoico	0.04	159453
Ac. protocatequico	0.04	289689
Ac. siríngico*	0.04	616878
Ac. sinápico*	0.04	443526

\* Estos estándares se obtuvieron por HPLC mediante la técnica 2 (Bonnerz, 2002)

## Formula

$$\textit{Concentraci3n de la Muestra} = \frac{AM}{AE * CE}$$

Donde AM = 3rea muestra

AE = 3rea est3andar

CE = concentraci3n est3andar

Las concentraciones de los compuestos fen3licos varían considerablemente en diferentes tipos de vino, dependiendo de la variedad de la uva, los factores ambientales en la viña y las t3cnicas de procesamiento del vino (Tabla 3).

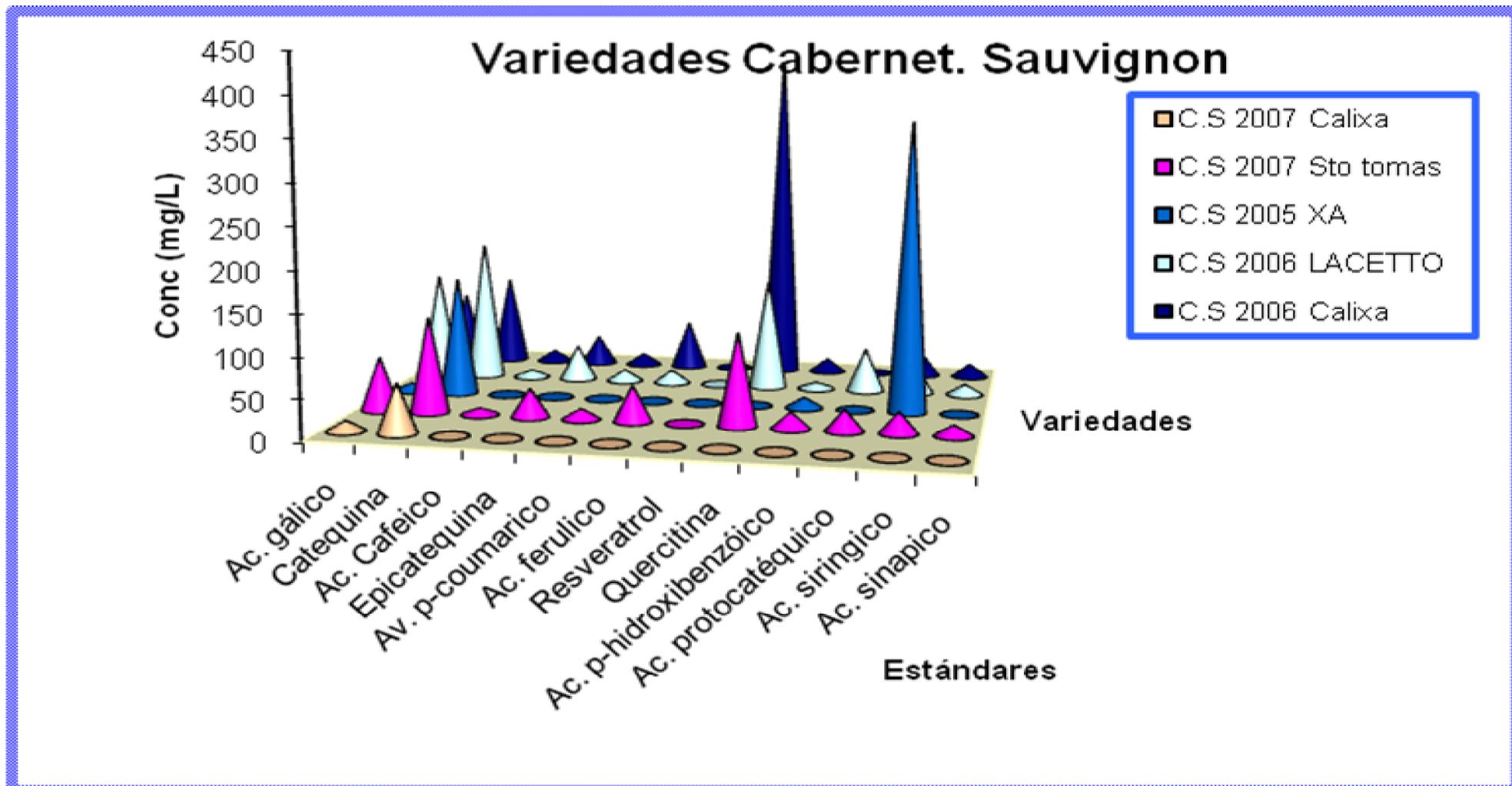


Figura 11. Comparativo de los vinos elaborados con Cabernet Sauvignon

De la variedad Cabernet Sauvignon, Se analizaron 5 muestras. El año de elaboración influyó en la composición de los compuestos fenólicos ya que se pudo apreciar que el vino de la casa Monte Xanic del año 2006 presentó los niveles más altos de quercetina, 419.56 mg/L, mientras que los vinos de las casas Pedro Domecq y Monte Xanic de los años 2005 y 2007 respectivamente, no tuvieron la presencia de este compuesto, lo mismo ocurrió con los demás estándares. Esto se debió a la influencia del clima sobre la composición de estos vinos. Se efectuó una investigación para ver como se dio el clima en esta región en los años mencionados. En la Tabla 4 se observa la influencia de la temperatura del año en que fueron elaborados los vinos, en los meses de junio y julio el grano de la uva se encontraba en su etapa de desarrollo o en esa situación la síntesis de compuestos fenólicos está ligada al metabolismo general de la planta, los sistemas de conducción que aseguran una buena productividad de la vegetación, una buena iluminación y una temperatura moderada a nivel racimo, favorecen la acumulación de compuestos fenólicos (Reynier y De la Iglesia González, 2002), en la Tabla 4 se puede apreciar el efecto de la temperatura en los años 2005 y 2007, en junio se dieron casi 5 grados menos que en el mismo mes del año 2006, por lo que esa situación debió de influir en la cantidad de los compuestos fenólicos sintetizados.

Tabla 4, temperaturas medias en el Valle de Guadalupe, Baja California (SMN)

AÑO	TEMPERATURA MEDIA	
	JUNIO	JULIO
2005	15.6	20
2006	26.1	27.3
2007	15.8	20.7

Tabla 5. Comparación de compuestos fenólicos.

Compuesto	Experimental (mg/L)*	Frankel, 1995 (mg/L)	Daniel, 2008 (mg/L)	Ibern-Gómez, 2002 (mg/L)	Castellari 2002, (mg/L)	Anis 2001, (mg/L)
Ác. gálico	84.86	95	11	15.9	61	288.4
Catequina	124.97	191	50.6	15.7	40	83.3
Ác. caféico	11.47	7.1	5.6	7.3	8.7	17.1
Epicatequina	28.9	82	39.5	69.7	23	62.6
Ác. p-cumárico	14.46	np	2.2	np	3.1	12.7
Ác. ferúlico	27.56	np	4.3	np	4.0	np
Resveratrol	4.39	np	np	np	1.5	np
Quercitina	205.27	7.7	np	7.5	6.2	43.9
Ac. p-hidroxibenzoico	18.67	nr	nr	nr	0.3	7.2
Ac. protocatéquico	16.10		nr	9.6	8.9	4.4
Ac. siríngico	79.77		nr	nr	2.2	38.3
Ac. sinápico	18.70		nr	nr	nr	nr

\*Promedio de los vinos tintos analizados. nr. no se reporta. Los vinos estudiados por los diferentes autores (Frankel mezclas en California). (Castellari variedades Cabernet Sauvignon, Sangiovese, Merlot), (Anis Merlot, Xinomavvro, Liatiko, Sirah), (Daniel kardaka y Lemberger)

Haciendo una comparación con la literatura (Tabla 5), los vinos tintos analizados no presentan gran diferencia con los analizados por otros autores. Algunos compuestos, como la quercitina y el ácido siríngico, se encuentran en concentraciones más altas. El Resveratrol (3,5,4'-trihidroestilbeno) no fue detectado en la mayoría de las variedades, a pesar de encontrarse comúnmente en *Vitis vinifera* y *V. Labrusca*, en el hollejo en concentraciones del orden de 20 µg por g de uva, y puede variar según la cepa. Este compuesto juega cierto papel en la resistencia de ciertas bayas de uva a los ataques fúngicos (Flancy, 2003; Kinsella y Col., 1995).

## CONCLUSIONES.

- ❖ La hipótesis planteada fue aceptada, se observó una correlación directa entre los valores de fenoles totales con los valores de la capacidad antioxidante.
- ❖ Los vinos elaborados con Petit Sirah del 2006 y Cabernet Sauvignon 2007 de Calixa presentaron mayor contenido de compuestos fenólicos y mayor capacidad antioxidante (DPPH).
- ❖ No se presentó una diferencia entre los valores de antocianinas poli y monoméricas en los vinos analizados. Por lo que su aporte en la capacidad antioxidante fue similar para todos los vinos.
- ❖ Doce compuestos fenólicos fueron separados de manera satisfactoria, identificados y cuantificados
- ❖ Por comparación con la literatura los vinos de la región de Baja California analizados tuvieron una concentración mayor de compuestos fenólicos que los vinos de California (USA), Hungría y España.
- ❖ De los doce estándares analizados la catequina, epicatequina, quercitina presentaron los valores mas altos de capacidad antioxidante (< 1.0 mM Trolox/L).
- ❖ Se presentaron diferencias significativas en los parámetros estudiados, por lo que la influencia del microclima, tipo de suelo, método de vinificación y variedad de la uva influyen de manera directa en la composición de los vinos.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Anis, A, Makris Dimiotris P., y Panagiotis, K. (2001). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5736-5742.
- Ávalos Llano K. R.; Sgroppo, S. C. y J. R. Avanza, (2003). Actividad antioxidante y contenido en fenoles totales en vinos de origen nacional. *FACENA*, 19: 11-19.
- Bonerz, D.P.M, Nikfardjam Martin S., and Creasy Glen L. (2008). A new RP-HPLC method for analysis of polyphenols, anthocyanins, and indole-3-acetic acid in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 59(1): 106-107.
- Casa Madero. (2003, noviembre). Premios.  
<http://www.madero.com.mx/español/premios/index.html>
- Flanzy, C. (2003). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. 2ª ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. Págs. 114- 122.
- Zhou,J., Cui,Z., Wan,G., Xu, H., Pang,Y., Duan, C. (2004) Direct analysis of trans-resveratrol in red wine by high performance liquid chromatography with chemiluminescent detection. *Food Chem.* 88: 613–620.
- Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B. y Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.* 85-89.
- Kuskoski, E. M, Asuero, A. G, Troncoso, A. M, Mancini-filho, J, Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, Brazil. 25(4): 726-732.
- Mac Kay Tepper Christian ( 2010) Apuntes Ing. Enólogo.  
[http://enologia.ens.uabc.mx/archivos/apuntes\\_de\\_enologia.pdf](http://enologia.ens.uabc.mx/archivos/apuntes_de_enologia.pdf)
- Motohashi, N y Sakagami, H. (2008). Funcionalidad de anthocyanins as alternative medicine. *Top Heterocycl. Chem.* 15: 1-48.
- Nicoletta Pellegrini, N., Simonetti,P., Gardana, C., Brenna,B., Brighenti, F y Pietta, P. (2000). Content and total antioxidant activity of vini novelli (young red wines). *J. Agric. Food Chem.* 48:732-735.
- Olivier Dangles, O., Fargeix, G. y Dufour, C. (2000). Antioxidant properties of anthocyanins and tannins: a mechanistic investigation with catechin and the 3', 4', 7-trihydroxyflavylum ion. *J. Chem. Soc.* 2:1653–1663.
- Reynier, A. y De la Iglecia-Gonzalez, J.A. *Manual de Viticultura*. 2002. Mundi Prensa Libros. Madrid. España.
- Robinson, J. (2006). *The Oxford companion to wine*, 3ª ed, Oxford Univ. Press. N. Y. U.S.A.
- Rodríguez-Delgado, M.Á., González-Hernández, G., Conde-González, J.E., Pérez-Trujillo, J.P. (2002). Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chem.* 78: 523–532.
- Roginsky, V. Lissi,E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92 (2): 235-254.
- SMN, Sistema Meteorológico Nacional. Estadísticas sobre temperatura años 2005, 2006, 2007
- Valls, J. Lampreave, M. Nadal M.y Arola, L. (2000). Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. Unidad de Enología. Dpto. de Bioquímica y Biotecnología Universidad Rovira i Virgili (Tarragona, Italia). Pág. 120-121.
- Verde Calvo, J.R. (2004). Efecto de la fermentación maloláctica sobre la edad química de un vino tinto mexicano, durante el añejamiento a diferentes concentraciones de sulfuroso, pH y temperatura. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 3: 265-272.