

CALIDAD ENOLÓGICA DE NUEVOS GENOTIPOS DE UVA IDENTIFICADOS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE VID DE CASTILLA-LA MANCHA

Investigador Responsable: Dr. Isidro Hermosín Gutiérrez. UCLM

Personal investigador: Dr. Esteban García Romero, Juan Luis Chacón Vozmediano, Jesús Martínez Gascuña, Alfonso González Martínez, Dr. Pedro Miguel Izquierdo Cañas, Dra. Noelia Castillo Muñoz, Adela Mena Morales

Entidades participantes: Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, Escuela de Ingeniería Técnica Agrícola de Ciudad Real (UCLM)

Duración, desde: 2011 hasta: 2014

Organismo: Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla-la Mancha

Nº de Proyecto: POIII1-0280-7859

El contenido fenólico de las uvas de las variedades minoritarias estudiadas ha sido caracterizado de forma amplia y en profundidad. Para ello, se ha analizado el contenido en compuestos fenólicos de las tres partes de la uva, hollejo, pulpa y pepitas. En cada una de estas partes de la uva, se estudió de forma detallada, mediante extracción y separación de fracciones, seguido del análisis cromatográfico por HPLC-DAD-ESI-MS/MS, las siguientes familias de compuestos fenólicos:

- a) Hollejos: Antocianos (sólo en el caso de uvas tintas); Flavonoles; Derivados de Ácidos Hidroxicinámicos (DAHC); Estilbenos; Flavan-3-oles monómeros y oligómeros.
- b) Pulpa: DAHC
- c) Pepitas: Flavan-3-oles monómeros y oligómeros.

El estudio del contenido fenólico de estas variedades de uva está fundamentado principalmente por las repercusiones que este tipo de compuestos tiene en ciertas propiedades que definen la calidad de los vinos que con ellas se puedan elaborar:

- Propiedades sensoriales: color en vinos tintos y blancos; amargor y astringencia de vinos tintos; prevención de ciertos defectos sensoriales, como el pardeamiento de vinos blancos.
- Propiedades tecnológicas: idoneidad de los vinos para someterlos a una crianza en bodega de roble o a microoxigenación en depósito.
- Propiedades funcionales: también se puede considerar el aprovechamiento de los residuos de vinificación (orujos frescos en el caso de vinos blancos; orujos fermentados en el caso de vinos tintos) para la recuperación de compuestos fenólicos con posible actividad biológica.

Ya que todas las variedades de uva estudiadas fueron obtenidas del campo experimental del Banco de Germoplasma de Vid del IVICAM, cultivadas en iguales condiciones vitícolas y climáticas, el tratamiento estadístico de los datos obtenidos de composición fenólica permitirá revelar diferencias que en principio sólo pueden atribuirse a la variedad de uva. En este sentido, cabe destacar que la autenticidad varietal de las muestras analizadas está garantizada, ya que el Banco de Germoplasma de Vid del IVICAM está constituido por variedades de vid identificadas genéticamente.

1. ANTOCIANOS DE LAS VARIEDADES MINORITARIAS DE UVAS TINTAS

Los antocianos sólo se encontraron presentes en las variedades minoritarias de uvas tintas, exclusivamente en el hollejo, no encontrándose que ninguna de éstas fuera una variedad de las

denominadas tintoreras (con antocianos también en la pulpa, como la Garnacha Tintorera). Todos los antocianos identificados fueron los habitualmente descritos para variedades de *V. vinífera*, es decir, 3-monoglucósidos de antocianidinas. La identificación se realizó en base a los espectros UV-vis y MS/MS obtenidos, que fueron concordantes con los descritos en la bibliografía (Nixdorf y Hermosín-Gutiérrez, 2010; Lago-Vanzela et al., 2011a). Las antocianidinas encontradas fueron las disustituídas cianidina y peonidina (cy y pn, respectivamente), junto con las trisustituídas delphinidina, petunidina y malvidina (dp, pt y mv, respectivamente), no encontrándose la monosustituída pelargonidina, como es habitual en variedades de *V. vinífera*. El resto de glucosa se encontró tal cual (antocianos no acilados; 3glc) o con un sustituyente acilo unido en la posición 6 de la glucosa (antocianos acilados): fundamentalmente un sustituyente acetilo (3acglc) o p-cumaroilo (3cmglc; a veces también en la forma cis, cuando habitualmente sólo se encuentra la forma trans), y en menor medida también cafeoilo (3cfglc; no en todos los casos, al menos con el derivado de malvidina). En la Figura 1 se indican cuáles fueron los antocianos identificados en cada una de las variedades minoritarias tintas estudiadas.

En la Tabla 1 se presenta un resumen del tipo de antocianos encontrados, agrupándolos por el grado de sustitución en el anillo B flavonoideo (antocianos di- y trisustituídos), la acilación o no de la molécula de glucosa (antocianos acilados y no-acilados) y el tipo de ácido acilante de la glucosa (antocianos acetilados, cumaroilados y cafeoilados), además del contenido total en antocianos. Este último dato se ha presentado como mg de equivalentes del antociano mayoritario (mv-3-glc) por kg de uva (muchos datos de la literatura así lo expresan), pero también como mg por kg de hollejo (este dato es prácticamente independiente del tamaño que pueda adquirir una uva bajo distintas condiciones de crecimiento, ya que la superficie de la uva crece proporcionalmente mucho menos que su volumen, y también es interesante desde el punto de vista del posible aprovechamiento de orujos de uvas tintas). Algunas de las variedades de uva consideradas tenían un hollejo muy débilmente pigmentado de rojo (casos de Coloraillo Arranacepas y de Garnacha Gris) y su contenido en antocianos (como mg de equivalentes de malvidina-3-glucósido, mv3glc, por kg de uva) fue consecuentemente muy bajo, con un valor medio de unos 8.0-8.7 mg/kg, por lo que a partir de estas variedades apenas podría obtenerse un vino rosado con color poco intenso e incluso un vino blanco, quedando descartadas para elaborar vino tinto. El resto de variedades estudiadas, con la excepción de Tinto Fragoso, presentaron contenidos medios en antocianos en el rango de los 123-365 mg/kg, siendo todos estos algo inferiores a los que habitualmente se encuentran en uvas tintas. Ejemplos de datos disponibles en la literatura son (Fragoso et al., 2011): Cabernet Sauvignon (rango, 686-883 mg/kg; valor medio, 784 ± 58 mg/kg); Merlot (rango, 843-1296 mg/kg; valor medio, 1021 ± 139 mg/kg); Syrah (rango, 826-1316 mg/kg; valor medio, 1024 ± 142 mg/kg); Tempranillo (rango, 651-1002 mg/kg; valor medio, 782 ± 103 mg/kg); Garnacha (rango, 348-482 mg/kg; valor medio, 411 ± 41 mg/kg); y Cariñena (rango, 485-759 mg/kg; valor medio, 639 ± 70 mg/kg). No obstante, los contenidos en antocianos correspondientes a la variedad Tinto Fragoso (1125 mg/kg) fueron superiores a la mayoría de los anteriormente descritos, y en particular en relación a los valores reportados para la uva tinta emblemática de la región, Cencibel (690 ± 30 mg/kg, para un rango de 210-1500 mg/kg; Verdejo Fernández et al., 2007), lo que las convierte en una candidatas con muchas posibilidades para elaborar vinos de alta intensidad colorante. La variedad Tinto Fragoso podría proponerse como una variedad útil para compensar la falta de color de otras tintas, como viene haciéndose con, por ejemplo, la Garnacha Tintorera.

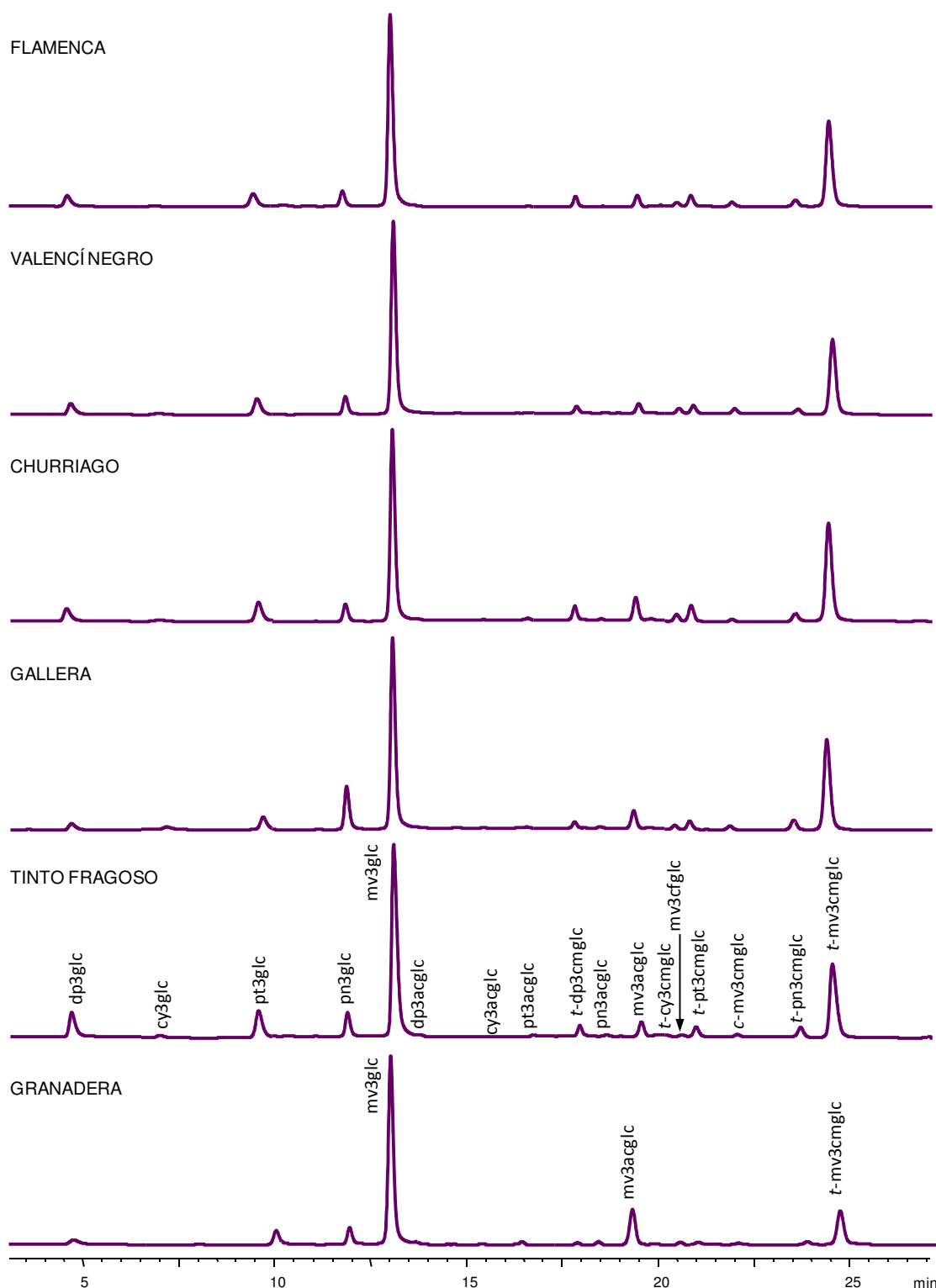


Figura 1. Perfil de antocianos (cromatogramas obtenidos a 520 nm) de variedades minoritarias de uva tinta. Abreviaturas: dp, delphinidina; cy, cianidina; pt, petunidina; pn, peonidina; mv, malvidina; glc, 3glc, 3-glucósido; 3acglc, 3-(6''-acetil)-glucósido; 3cmglc, 3-(6''-p-cumaroil)-glucósido; 3cfglc, 3-(6''-cafeoil)-glucósido; t, trans; c, cis.

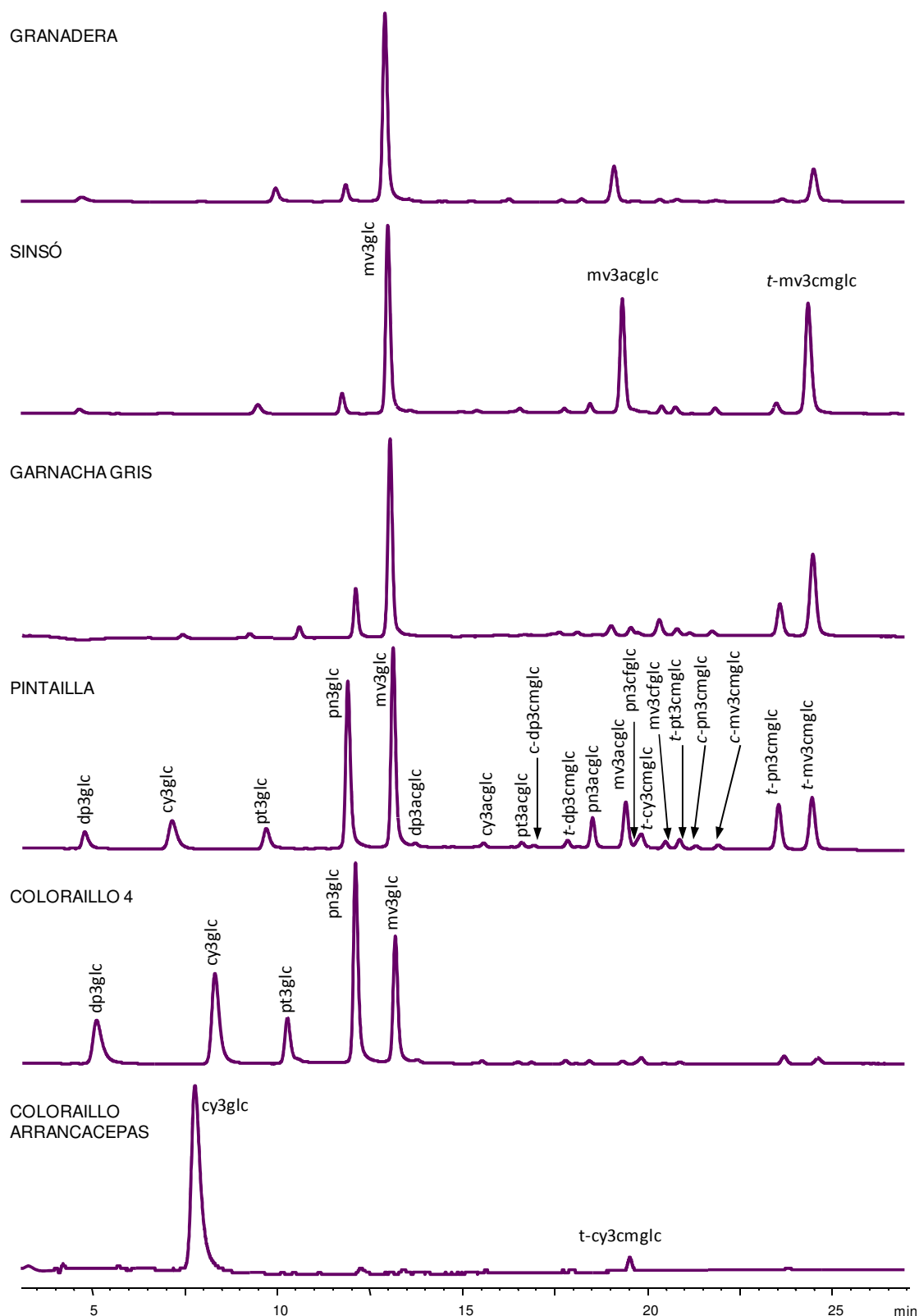


Figura 1 (continuación). Perfil de antocianos (cromatogramas obtenidos a 520 nm) de variedades minoritarias de uva tinta. Abreviaturas: dp, delphinidina; cy, cianidina; pt, petunidina; pn, peonidina; mv, malvidina; glc, 3glc, 3-glucósido; 3acglc, 3-(6''-acetil)-glucósido; 3cmglc, 3-(6''-p-cumaroil)-glucósido; 3cfglc, 3-(6''-cafeoil)-glucósido; t, trans; c, cis.

Tabla 1. Contenido total en antocianos (equivalentes de mv3glc; HPLC) y perfiles de antocianos con características estructurales comunes, de las variedades minoritarias de uvas tintas. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas entre variedades (test de Student-Newman-Keuls, $\alpha = 0.05$).

Variedad	total (mg/kg uva)			total (mg/kg hollejo)			% Disustituidos		% Trisustituidos	
	VM	DE		VM	DE		VM	DE	VM	DE
Churriago	259.0 ±	85.5	cd	3257 ±	527	cd	7.04 ± 0.75	a	92.96 ± 0.75	f
Coloraillo Arrancacepas	8.0 ±	1.6	a	81 ±	14	a	97.23 ± 0.66	f	2.77 ± 0.66	a
Coloraillo-4	124.3 ±	39.9	b	1266 ±	206	b	61.30 ± 4.75	e	38.70 ± 4.75	b
Flamenca	208.8 ±	40.0	c	2110 ±	578	bc	6.44 ± 0.26	a	93.55 ± 0.26	f
Gallera Negra	364.6 ±	3.2	e	3595 ±	706	d	14.45 ± 0.44	b	85.53 ± 0.44	e
Garnacha Gris	8.7 ±	3.4	a	85 ±	44	a	23.00 ± 1.13	c	77.00 ± 1.13	d
Granadera	234.1 ±	23.4	c	2218 ±	401	bc	6.86 ± 0.43	a	93.14 ± 0.43	f
Pintailla	185.4 ±	12.7	bc	2107 ±	511	bc	48.05 ± 2.43	d	51.95 ± 2.43	c
Sinsó	317.3 ±	10.4	de	4194 ±	691	d	9.34 ± 1.09	a	90.66 ± 1.09	f
Tinto Fragoso	1125.4 ±	56.5	f	12357 ±	1115	e	9.25 ± 0.63	a	90.75 ± 0.63	f
Valencí Negro	122.5 ±	14.4	b	1820 ±	244	b	7.79 ± 0.65	a	92.21 ± 0.65	f

Variedad	% No acilados			% Acetilados			% Cumaroilados		% Cafeilados	
	VM	DE		VM	DE		VM	DE	VM	DE
Churriago	52.82 ± 2.10	b		7.66 ± 0.80	f		37.28 ± 0.59	f	2.25 ± 0.72	a
Coloraillo Arrancacepas	95.15 ± 0.12	e		0.67 ± 0.07	a		4.18 ± 0.17	a	ND	
Coloraillo-4	93.83 ± 0.56	e		1.76 ± 0.36	b		4.34 ± 0.27	a	0.06 ± 0.06	a
Flamenca	60.71 ± 1.16	c		3.02 ± 0.05	c		35.08 ± 1.21	ef	1.19 ± 0.14	a
Gallera Negra	58.94 ± 0.54	c		5.98 ± 0.20	e		34.00 ± 0.83	d	1.09 ± 0.25	a
Garnacha Gris	52.93 ± 3.96	b		3.68 ± 0.79	cd		35.66 ± 3.56	ef	7.74 ± 2.52	b
Granadera	67.45 ± 1.39	d		14.87 ± 0.76	h		16.86 ± 0.58	b	0.82 ± 0.17	a
Pintailla	65.56 ± 0.98	d		11.93 ± 0.47	g		21.81 ± 0.30	c	0.71 ± 0.20	a
Sinsó	43.23 ± 1.42	a		25.27 ± 0.34	i		30.12 ± 2.00	d	1.38 ± 0.53	a
Tinto Fragoso	64.61 ± 0.42	d		4.43 ± 0.03	d		30.22 ± 0.17	d	0.73 ± 0.29	a
Valencí Negro	64.38 ± 0.23	d		2.84 ± 0.17	c		31.65 ± 0.19	d	1.13 ± 0.28	a

Si bien el contenido fenólico en general, y el de antocianos en particular, de las uvas puede verse ampliamente influenciado por diferencias en el estado de madurez de la uva, en las condiciones de cultivo (tipo de poda, carga, riego de apoyo, etc.), en las condiciones climatológicas y por el área de producción (Mazza y Miniati, 1993), todas estas variedades fueron cultivadas en el mismo terreno en condiciones iguales y fueron vendimiadas en un estado de madurez similar, por lo que las tendencias en contenido de antocianos anteriormente reveladas pueden considerarse una característica varietal. En este sentido, se considera que la distribución porcentual molar en que cada compuesto individual se encuentra dentro de una familia de polifenoles (el llamado perfil de compuestos fenólicos), es una característica varietal que, al contrario que lo dicho para el contenido total, muestra una escasa variabilidad y se puede usar como criterio de identificación y diferenciación varietal (Hermosín-Gutiérrez y García-Romero, 2004). Dicho de otra forma, es de esperar que distintas variedades de uvas tintas muestren perfiles de antocianos que puedan diferenciarse, y en nuestro estudio estas diferencias ya se pudieron apreciar visualmente en los perfiles cromatográficos de antocianos mostrados en la Figura 5.1. Así, las variedades Flamenca, Valencí Negro, Churriago, Gallera Negra y Tinto Fragoso mostraron un perfil de antocianos dominado por los antocianos no acilados, entre los que destacan los derivados de malvidina (mv3glc), pero con una contribución destacable de los derivados cumaroilados (t-mv3cmglc). Para las variedades Granadera y Sinsó, la proporción de antocianos acetilados comienza a ser del mismo orden que las de los cumaroilados, con una predominancia de derivados de malvidina y en el caso de la variedad Sinsó, se observa una contribución superior del conjunto de antocianos acilados (suma de mv3acglc y de t-mv3cmglc,

frente a mv3glc). En las variedades Garnacha Gris, Pintailla y Coloraillo-4 se observa un aumento de la contribución de los antocianos disustituídos, sobre todo del tipo peonidina, con diferencias en el grado y tipo de acilación del resto de glucosa, con una casi total ausencia de antocianos acilados en el caso de Coloraillo-4 a la vez que un predominio de antocianos disustituídos. El caso de la variedad Coloraillo Arrancacepas es único, pues prácticamente sólo contiene un antociano, cy3glc, que es disustituído y no acilado.

2. FLAVONOLES DE LAS VARIEDADES MINORITARIAS DE UVAS

Los flavonoles constituyen una familia de compuestos fenólicos flavonoideos que son pigmentos de color amarillo y se encuentran en la uva fundamentalmente en los hollejos, como ocurre con los antocianos. Su papel como pigmentos en los vinos blancos puede ser relevante, si bien la forma habitual de elaboración de este tipo de vinos (extracción rápida del mosto evitando un contacto prolongado con los hollejos, salvo en los casos del uso de la técnica de maceración prefermentativa en frío para incrementar los aromas varietales) conlleva que su contenido en los vinos (mg/L, como equivalentes de Q-3-glc) sea bajo (de Pablos Muñoz, 2010: flavonoles totales en vinos blancos, rango de 0.06-33.0 mg/L, con valor medio de 3.56 ± 5.08 mg/L; Hermosín-Gutiérrez et al., 2011: flavonoles totales en vinos tintos, rango de 18-220 mg/L). En el caso de los vinos tintos (elaborados con maceración de hollejos), su papel como pigmentos se ve eclipsado por el de los antocianos, ya que estos últimos son bastante más abundantes. No obstante, los flavonoles son los mejores copigmentos con los que los antocianos pueden formar complejos de copigmentación, por lo que ayudan a extraer mayor proporción de antocianos durante la vinificación, incrementan la intensidad colorante y la tonalidad púrpura del color rojo de los vinos jóvenes, y otorgan estabilidad a los antocianos durante el almacenamiento y envejecimiento de los vinos tintos (Schwarz et al., 2005; Hermosín-Gutiérrez, 2007).

En principio, en las variedades minoritarias de uvas estudiadas se pudieron identificar los mismos flavonoles (como 3-glicósidos) descritos para variedades tanto de *V. vinífera* (Castillo-Muñoz et al., 2007, 2009a y 2010; Hermosín-Gutiérrez et al., 2011) como no viníferas (Lago-Vanzela et al., 2011a y 2011b). No obstante, el empleo de columnas cromatográficas de mayor capacidad de resolución permitió que en algunas de las muestras se detectaran nuevos flavonoles nunca antes descritos para uvas de *V. vinífera*. Como se explicará más adelante, se trata de nuevos glicósidos de las agliconas quercetina y kaempferol. Por la mayor simplicidad de los perfiles de flavonoles de las uvas blancas, la detección de estos nuevos glicósidos pudo realizarse con mayor facilidad en las muestras de uvas blancas correspondientes a variedades en las que estos nuevos derivados se encontraron en mayor proporción.

2.1. Nuevos flavonoles identificados en las variedades minoritarias de uvas

Los perfiles de flavonoles de uvas blancas sólo contienen derivados de las estructuras kaempferol (K), quercetina (Q) e isoramnetina (I), es decir, de las estructuras flavonoideas con uno (kaempferol) o dos sustituyentes (quercetina e isoramnetina) en el anillo B, estando ausentes los derivados trisustituídos (miricetina, laricitrina y siringetina) (Castillo-Muñoz et al., 2010). En particular, se trata de los derivados 3-galactósido (3-gal), 3-glucósido (3-glc) y 3-glucurónido (3-glcU) de las tres agliconas (kaempferol, quercetina e isoramnetina), junto con el minoritario derivado 3-rutinósido (3-(6''-ramnosil)-glucósido, o 3-rha(1-6)glc) de quercetina, también conocido como rutina. Los derivados de quercetina suelen ser los mayoritarios, seguidos de los de kaempferol. En cambio, los derivados de isoramnetina siempre son bastante minoritarios, y algunos de ellos (sobre todo el 3-glucurónido y, en menor medida, a veces también el 3-galactósido) no se consiguen detectar en algunas variedades de uva blanca.

El uso de columnas cromatográficas de mayor capacidad de resolución (por tener menor tamaño de partícula y menor diámetro interno, a pesar de tener menor longitud) permitió que la rutina pudiera separarse del pico correspondiente a Q-3-glc con el que coelúa usando anteriores

condiciones cromatográficas (Castillo-Muñoz et al., 2010), y para todas las variedades pudieron identificarse los siguientes flavonoles (Figura 3.A): Q-3-gal, Q-3-glcU, Q-3-glc, Q-3-rha(1-6)glc (rutina), K-3-gal, K-3-glcU, K-3-glc, I-3-gal e I-3-glc. No obstante, en los cromatogramas de algunas variedades blancas en las que el pico de Q-3-rut era algo más intenso también pudieron detectarse nuevos picos cromatográficos con características de flavonoles glicosidos, en algunos casos sólo derivados de quercetina (Figura 3.B) y en otros también de kaempferol (Figura 3.C).

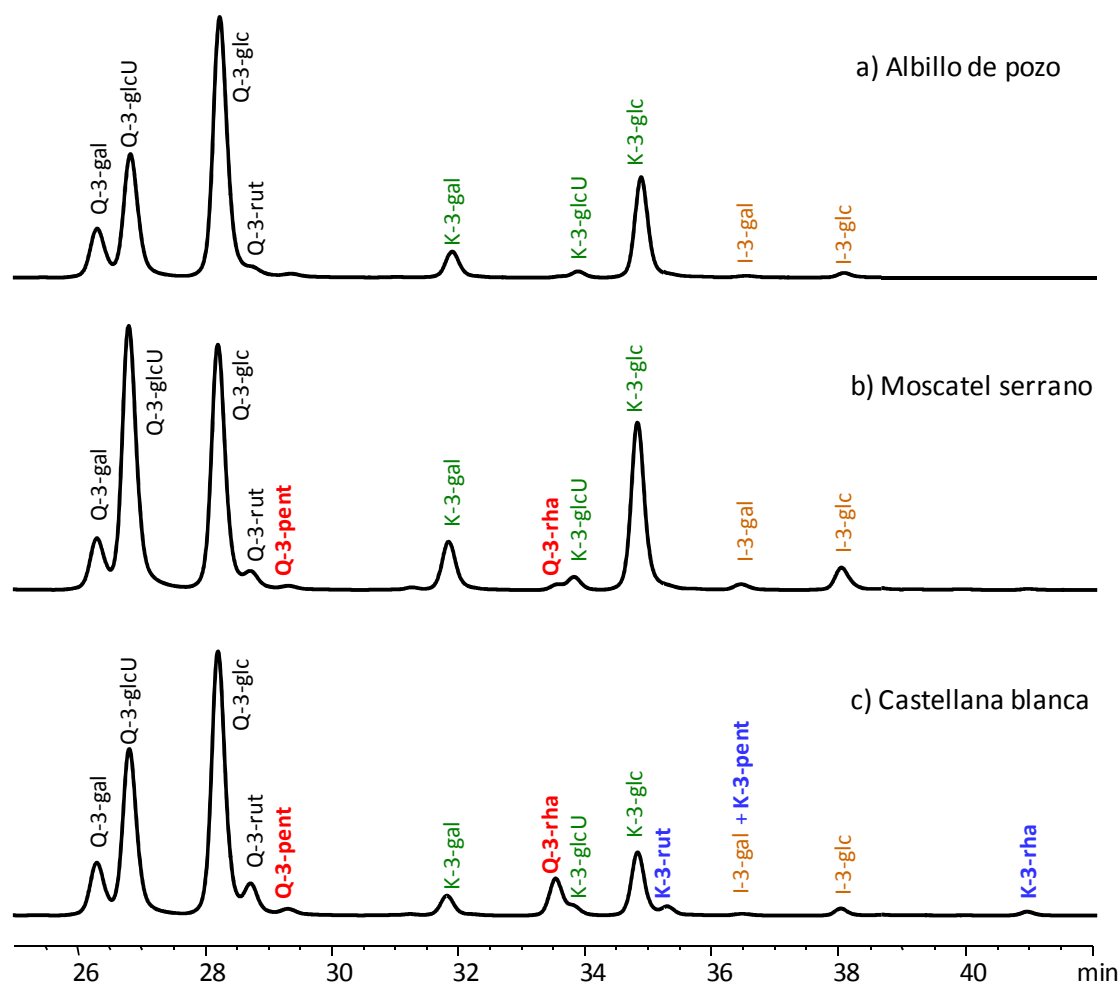


Figura 3. Distintos perfiles de flavonoles (cromatogramas obtenidos a 360 nm) de variedades minoritarias de uva blanca, con los nuevos derivados glicosidos identificados de quercetina (pentósido y ramnósido) y de kaempferol (rutinósido, pentósido y ramnósido). Abreviaturas: Q, quercetina; K, kaempferol; I, isoramnetina; gal, galactósido; glcU, glucurónido; glc, glucósido; rut, rutinósido (6''-ramnosil-glucósido); pent, pentósido; rha, ramnósido.

La primera prueba a favor de que estos nuevos picos cromatográficos correspondían a flavonoles glicosidos la aportaron los espectros UV-vis obtenidos en línea en el detector DAD (Figura 4): como puede verse, dos de los nuevos derivados de flavonoles (picos eluyendo a 29.307 y 33.519 min) mostraron espectros muy similares a los de otros 3-glicosidos de quercetina; los otros tres nuevos picos detectados (los que eluyen a 35.265, 36.427 y 40.903 min) presentaron espectros UV-vis muy similares a los de otros 3-glicosidos de kaempferol, si bien en el caso del pico a 36.427 min el espectro UV-vis tendió a parecerse más al correspondiente a I-3-gal con el cual coelúa.

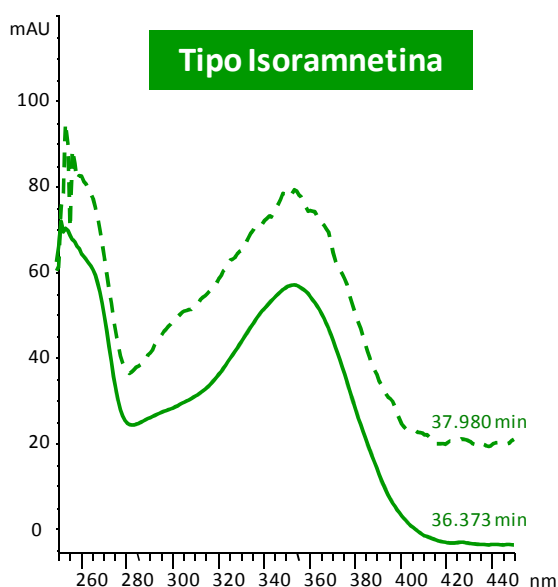
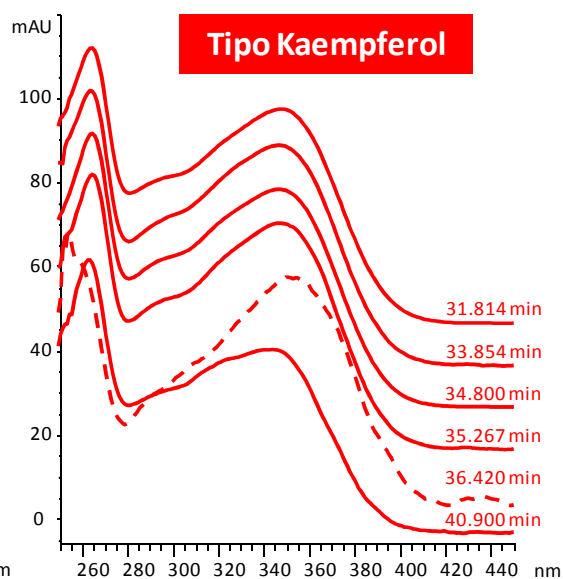
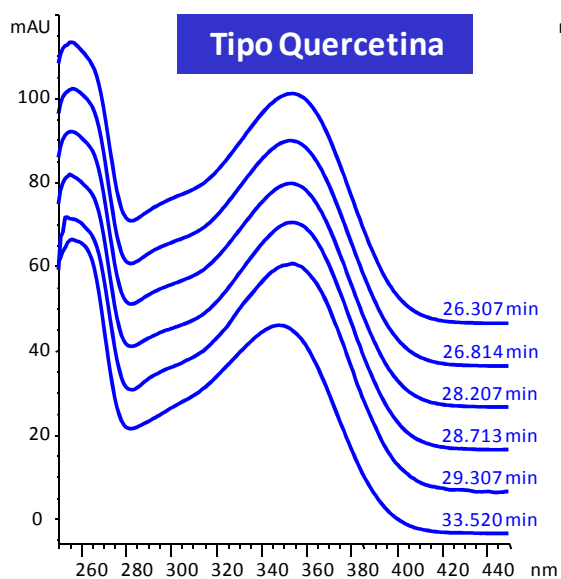
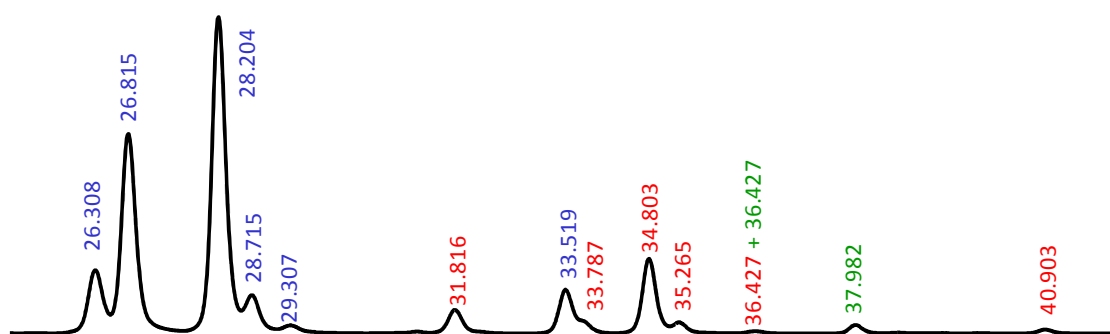


Figura 4. Espectros UV-vis (obtenidos on-line en el detector de array de diodos, DAD, del equipo de cromatografía HPLC) correspondientes a los flavonoles identificados en la muestra de uva Castellana Blanca. Se han agrupado los espectros de todos los flavonoles que derivan de la misma aglicona (quercetina, kaempferol e isoramnetina).

El análisis en profundidad de los espectros de masas (sobre todo los de MS2, en los que aparecen los iones producidos tras la fragmentación de los iones pseudomoleculares correspondientes)

aportó una prueba más sólida para la asignación de los nuevos flavonoles. Los espectros MS (iones pseudomoleculares) y MS2 (iones producto de la fragmentación de los iones pseudomoleculares) correspondientes a los derivados 3-gal, 3-glcU y 3-glc (Figura 5) coincidieron con los previamente descritos para estos flavonoles (Castillo-Muñoz et al., 2007, 2009a y 2010), así como también los correspondientes a Q-3-rha(1-6)glc (Figura 6). En todos estos casos, en los espectros MS puede verse, además de la señal del ion pseudomolecular, señales poco intensas de algunos de los iones producto de su fragmentación, como la señal a $m/z = 301$ de la aglicona quercetina o la de $m/z = 463$ correspondiente a la fragmentación del enlace glicosídico 1-6 entre las unidades de ramnosa y glucosa de la rutina. Los espectros MS2 confirmaron la naturaleza del resto glicosídico (gal/glc, glcU o rha(1-6)glc) unido a la aglicona quercetina, ya que en todos los casos se produjo la ruptura del enlace glicosídico entre la quercetina y el azúcar, perdiéndose este último como un resto neutro (pérdidas de 162, 146 y 308 uma, respectivamente).

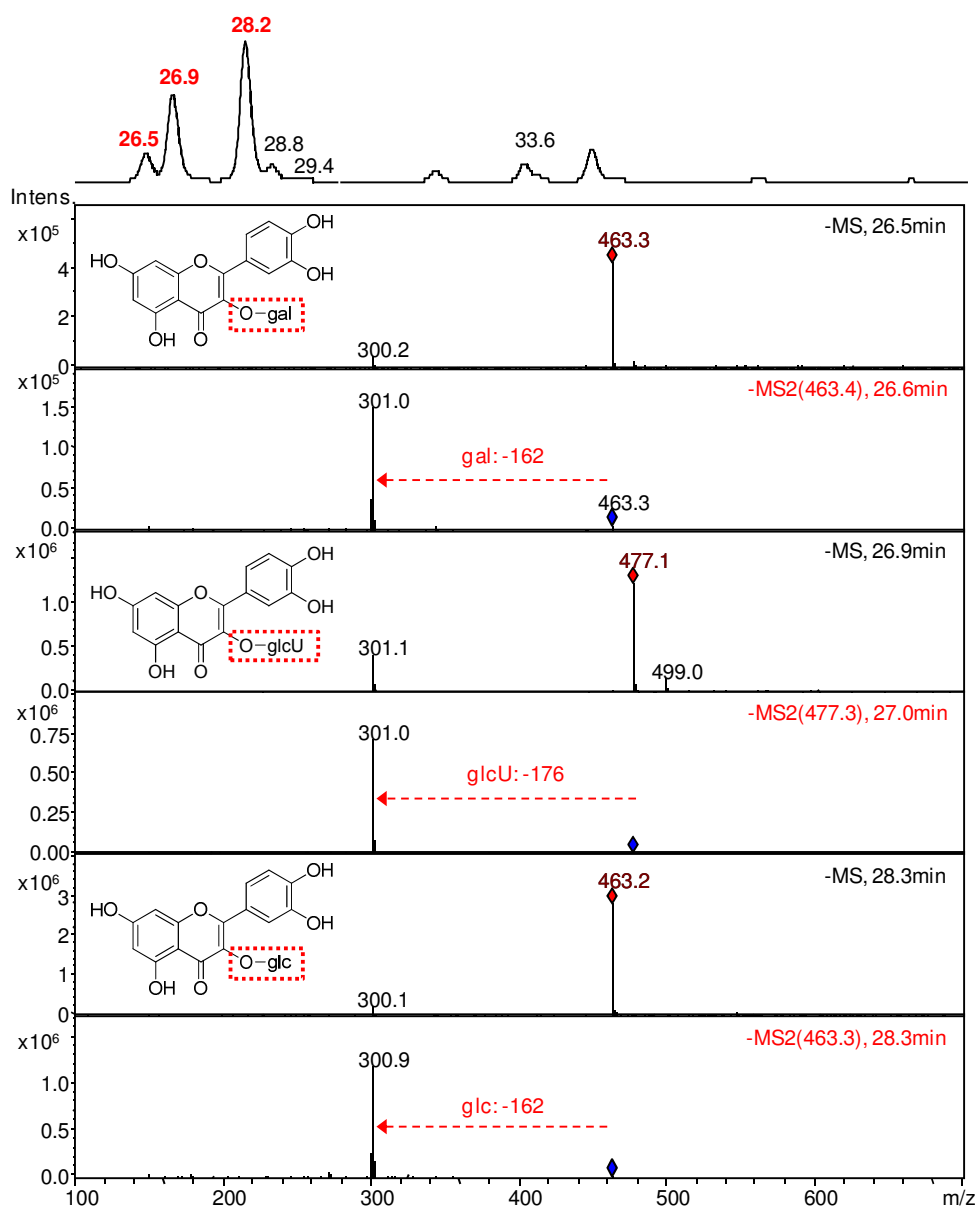


Figura 5. Espectros MS y MS/MS (MS2) de los derivados 3-galactósido (gal), 3-glucurónido (glcU) y 3-glucósido (glc) de quercetina. En todos los casos se observa la pérdida, en el espectro MS2, del resto de glicosido unido a la posición 3 de la quercetina

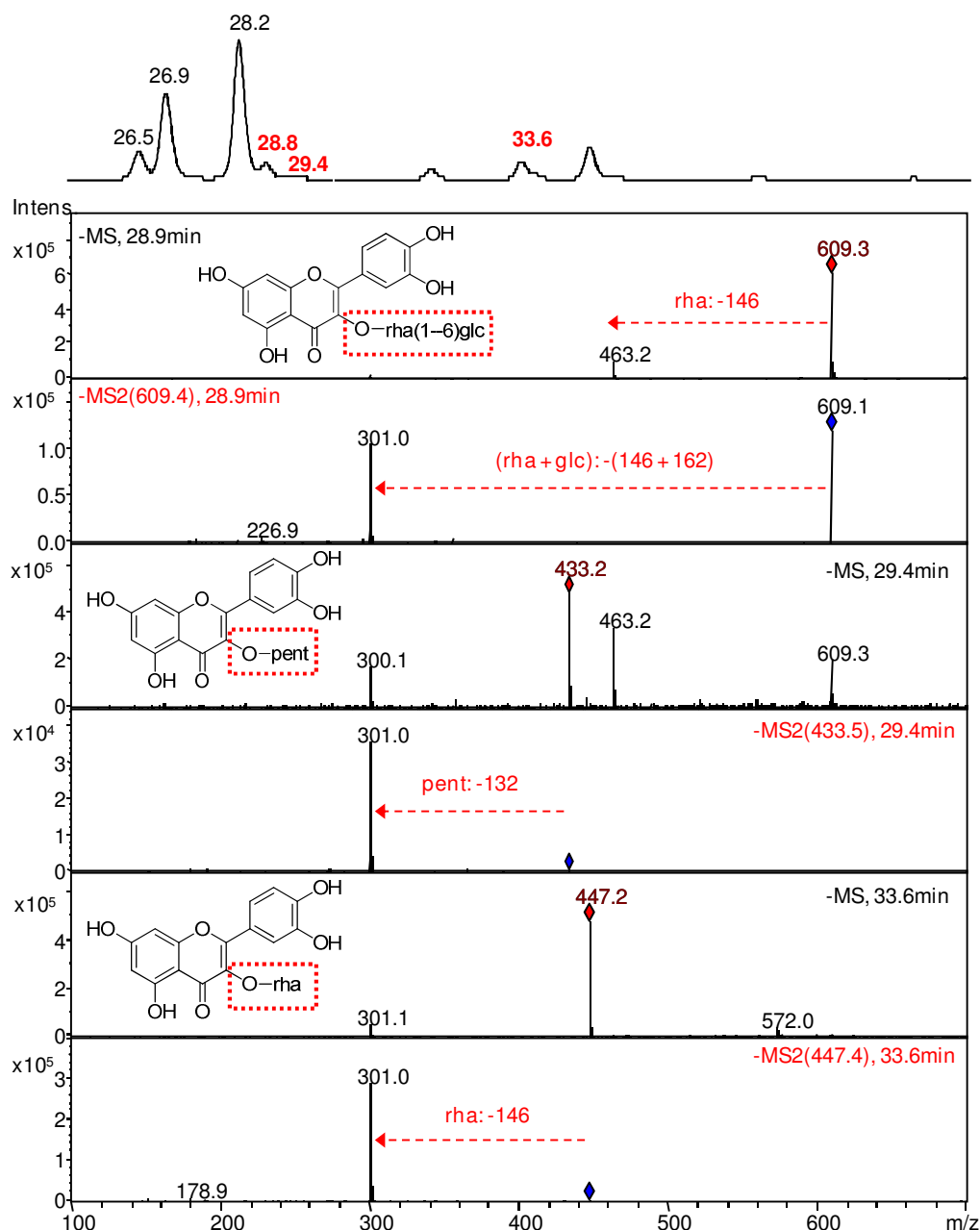


Figura 6. Espectros MS y MS/MS (MS2) de los derivados 3-(6''-ramnosil)-glucósido (rha-(1-6)-glc; también conocido como 3-rutinósido, rut), 3-pentósido (pent) y 3-ramnósido (rha) de quercetina. En los casos de los 3-monoglicósidos (Q-3-pent y Q-3-rha) se observa la pérdida, en el espectro MS2, del resto de glicósido unido a la posición 3 de la quercetina. Para el caso del 3-diglicósido (Q-rut), en el espectro MS se observa una débil señal correspondiente a la fragmentación poco probable del enlace glicosídico entre ramnosa y glucosa, mientras que en el espectro MS2 la única señal de fragmentación que se observa es la correspondiente a la pérdida total del diglicósido unido en posición 3

En la Figura 6 se muestran los espectros de masas correspondientes a los dos nuevos 3-glicósidos de quercetina. Puesto que las pérdidas observadas en el espectro MS2 corresponden a restos de pentosa (pérdida de 132 uma) y de ramnosa (pérdida de 146 uma) y en ambos casos el ion producto resultante tuvo el valor de m/z correspondiente a la quercetina (301), los nuevos compuestos fueron asignados como Q-3-pent (no es posible determinar la naturaleza del resto de pentosa, pent) y Q-3-rha, respectivamente. La asignación de la posición de glicosilación (C-3 de la quercetina) fue por analogía con los otros derivados 3-glicósidos de la quercetina conocidos

(para los cuáles se disponía de patrón comercial): en todos ellos se cumplió que el ion producto correspondiente a la ruptura heterolítica del glicósido ($Y0^-$, $m/z = 301$) daba una señal más intensa (es por tanto una ruptura más probable) que el ion producto correspondiente a la ruptura homolítica ($[Y0-H]^-$, $m/z = 300$).

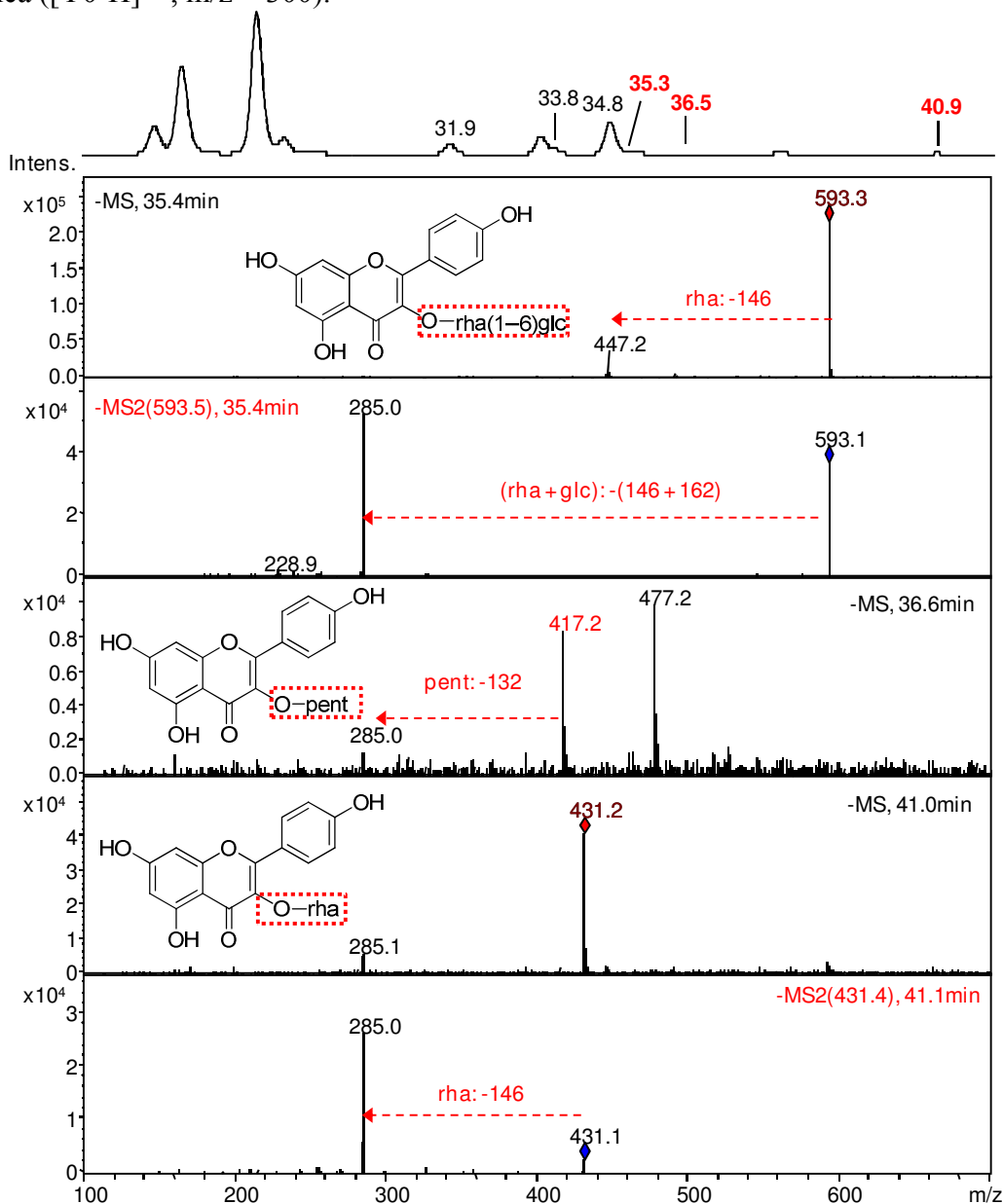


Figura 7. Espectros MS y MS/MS (MS2) de los derivados 3-(6''-ramnosil)-glucósido (rha-(1-6)-glc; también conocido como 3-rutinósido, rut), 3-pentósido (pent) y 3-ramnósido (rha) de kaempferol (K). En los casos de los 3-monoglicósidos (K-3-pent y K-3-rha) se observa la pérdida, en el espectro MS2, del resto de glicósido unido a la posición 3 del kaempferol. Para el caso del 3-diglicósido (K-rut), en el espectro MS se observa una débil señal correspondiente a la fragmentación poco probable del enlace glicosídico entre ramnosa y glucosa, mientras que en el espectro MS2 la única señal de fragmentación que se observa es la correspondiente a la pérdida total del diglicósido unido en posición 3

La asignación de los nuevos derivados de kaempferol en base a los espectros de masas (Figura 7) fue similar a la anteriormente descrita para los nuevos derivados de quercetina. La única diferencia es que no pudo obtenerse el espectro MS2 del derivado K-3-pent, ya que coelúa con I-3-gal siendo además minoritario respecto a éste, como puede apreciarse en el espectro MS

obtenido a los 36.6 min, en el que la señal a m/z 317 (atribuible al ion pseudomolecular de K-3-pent) aparece junto al de m/z 477 (atribuible al ion pseudomolecular de I-3-gal) pero con menor intensidad, por lo que no pudo aislarse para luego ser fragmentado y así obtener el espectro MS²; no obstante, en el espectro MS puede observarse que aparece una débil señal a m/z 285 que correspondería a la aglicona kaempferol, de forma similar a como también se observó para los otros derivados de kaempferol (por ejemplo, en el espectro MS del K-3-rha que eluye a los 41.0 min).

2.2. Perfiles de flavonoles de uvas blancas

Como puede apreciarse en la Figura 3, los perfiles cromatográficos de flavonoles (proporción en que cada flavonol individual aparece en el cromatograma registrado a 360 nm) mostraron diferencias apreciables según la variedad de uva analizada. Es sabido que el perfil de flavonoles (calculado como % molar en que cada flavonol individual contribuye al contenido total de flavonoles) es una característica varietal que puede utilizarse como criterio de autenticidad y diferenciación varietal (Hermosín-Gutiérrez et al., 2011). En cambio, el contenido total de flavonoles está sujeto a factores más relacionados con las condiciones particulares que concurren durante la maduración del racimo, en especial el grado de exposición a la luz de las uvas (Price et al., 1995; Haselgrove et al., 2000; Downey et al., 2004).

Cuando se calcularon los perfiles molares de flavonoles de las muestras analizadas de uva blanca (Tabla 5.3) se encontraron bastantes diferencias significativas (ANOVA; test de Student-Newman-Keuls, $\alpha = 0.05$) entre las muestras de distintas variedades. Los derivados de quercetina fueron predominantes (69.23-86.40%), seguidos de los de kaempferol (11.37-27.31%), siendo minoritarios los de isoramnetina (0.47-3.46%). Entre los derivados de kaempferol y de isoramnetina, los 3-glucósidos fueron mayoritarios, seguidos de los 3-galactósidos; el derivado 3-glucurónido del kaempferol fue muy minoritario, mientras que el derivado homólogo de isoramnetina no se detectó en ninguno de los casos estudiados. En el caso de los derivados de quercetina, el 3-glucurónido se encontró en proporciones similares (21.53-39.55%) a las del 3-glucósido (29.84-46.96), aunque usualmente inferiores salvo en los casos de las variedades Moscatel Serrano y Gordera Manchega en que predominó ligeramente el derivado 3-glucurónido (30.13 vs. 29.84% y 39.55 vs. 37.03%, respectivamente); los siguientes derivados en importancia fueron el 3-galactósido y el 3-rutinósido. Los nuevos derivados 3-glicósidos de quercetina (Q-3-pent y Q-3-rha) y de kaempferol (K-3-rut, K-3-pent y K-rha) fueron bastante minoritarios y raramente superaron el 1%.

Si bien el contenido total en flavonoles no se considera inicialmente una característica varietal, ya que otros factores no genéticos influyen considerablemente en él, los resultados obtenidos en este estudio muestran una cierta tendencia ligada a la variedad en cuanto al potencial de este tipo de compuestos flavonoideos, puesto que todas las muestras analizadas fueron cultivadas en las mismas condiciones edafoclimáticas y vitícolas. Pueden considerarse tres grupos de variedades ordenadas en sentido decreciente de contenido total en flavonoles (mg/kg de uva o de hollejo, como equivalentes de Q-3-glc):

- Albillo de Pozo y Marfileña: 91-124 mg/kg de uva; 751-1080 mg/kg de hollejo.
- Albillo Mayor, Alcañón, Castellana Blanca, Gordera Manchega y Moscatel Serrano: 61-75 mg/kg de uva; 488-873 mg/kg de hollejo.
- Garnacha Blanca, Jarrosuelto, Pintada y Planta Fina: 30-56 mg/kg de uva; 300-481 mg/kg de hollejo.

Los valores de referencia encontrados en la literatura (Makris et al., 2006; Mattivi et al., 2006; Rodríguez Montealegre et al., 2006; Ledda et al., 2010; Castillo-Muñoz et al., 2010) muestran valores de flavonoles totales del mismo orden de magnitud, en el rango de 2.1-170 mg/kg de uva

(como equivalentes de Q-3-glc). Estos resultados permitirían destacar a las variedades Albillo de Pozo y Marfileña como las mejores candidatas a la hora de considerar la posibilidad aprovechamiento de los orujos frescos generados durante las primeras fases de elaboración de vinos blancos, por recuperación de los flavonoles que contienen, ya que estos compuestos poseen interesantes propiedades biológicas.

2.3. Perfiles de flavonoles de uvas tintas

Como era de esperar, los perfiles de flavonoles de las uvas tintas minoritarias analizadas mostraron la presencia de derivados de las estructuras flavonoideas con 3 sustituyentes en el anillo B (miricetina, 3 x OH; laricitrina, 2 x OH y 1 x OCH₃, siringetina, 1 x OH y 2 x OCH₃), además de los derivados de estructuras disustituidas (quercetina e isoramnetina) y monosustituida (kaempferol) que sólo se encuentran en las uvas blancas (Hermosín-Gutiérrez et al., 2011). Los derivados glicosilados de kaempferol, quercetina e isoramnetina fueron los mismos que los identificados en las variedades blancas, encontrándose los mismos nuevos derivados descritos en el apartado 2.1. Los perfiles de flavonoles mostraron diferencias visualmente apreciables entre las distintas variedades de uva (Figura 10), y el test ANOVA (Student-Newman-Keuls, $\alpha = 0.05$) reveló las diferencias significativas atribuibles al origen varietal de las uvas tintas minoritarias analizadas.

Así, en algunas nuestras pudo observarse la presencia de pequeñas cantidades de quercetina libre, que se considera como un artefacto surgido durante la preparación de las muestras. Para algunas variedades de uva tinta poco coloreadas (Coloraillo Arrancacepas y, en menor medida, Garnacha Gris, Coloraillo-4 y Pintailla) el perfil de flavonoles fue muy similar al de uvas blancas, con cantidades muy poco apreciables (inferior al 10%, incluso indetectable para Coloraillo Arrancacepas) de derivados trisustituidos (miricetina, laricitrina y siringetina) y una predominancia de los derivados disustituidos (79-92%), fundamentalmente derivados de quercetina, sobre todo del 3-glucósido (38-47%). En el otro extremo, algunas variedades (Churriago, Sinsó y Tinto Fragoso) mostraron un predominio de flavonoles trisustituidos (50-54%) con una contribución bastante similar de las tres estructuras posibles, fundamentalmente como derivados 3-glucósidos (M-3-glc, 17-26%; L-3-glc, 10-16%; S-3-glc, 10-19%); en estos casos también predominó el derivado Q-3-glc (18-20%) entre los flavonoles disustituidos (39-45%). El resto de variedades tintas estudiadas (Flamenca, Valencí Negro, Granadera y Gallera Negra) mostraron perfiles de flavonoles intermedios entre los dos extremos anteriormente citados, con proporciones de derivados trisustituidos en el rango 23-38% y porcentajes similares de los derivados 3-glucósidos de miricetina (11-15%), laricitrina (5-10%) y siringetina (4-11%); así mismo, para estas variedades las proporciones de flavonoles disustituidos estuvieron en el rango 57-67%, con porcentajes similares de Q-3-glc y Q-3-glcU (Gallera Negra, 23% vs. 23%; Granadera, 19% vs. 23%; Valencí Negro, 29% vs. 26%) salvo en el caso de la variedad Flamenca en que claramente predominó el derivado Q-3-glcU (39% frente a 17% para Q-3-glc). En todos los casos, la contribución de flavonoles monosustituidos (fundamentalmente del derivado K-3-glc) fue menor del 10%, con la salvedad de la variedad Coloraillo-4 (15%).

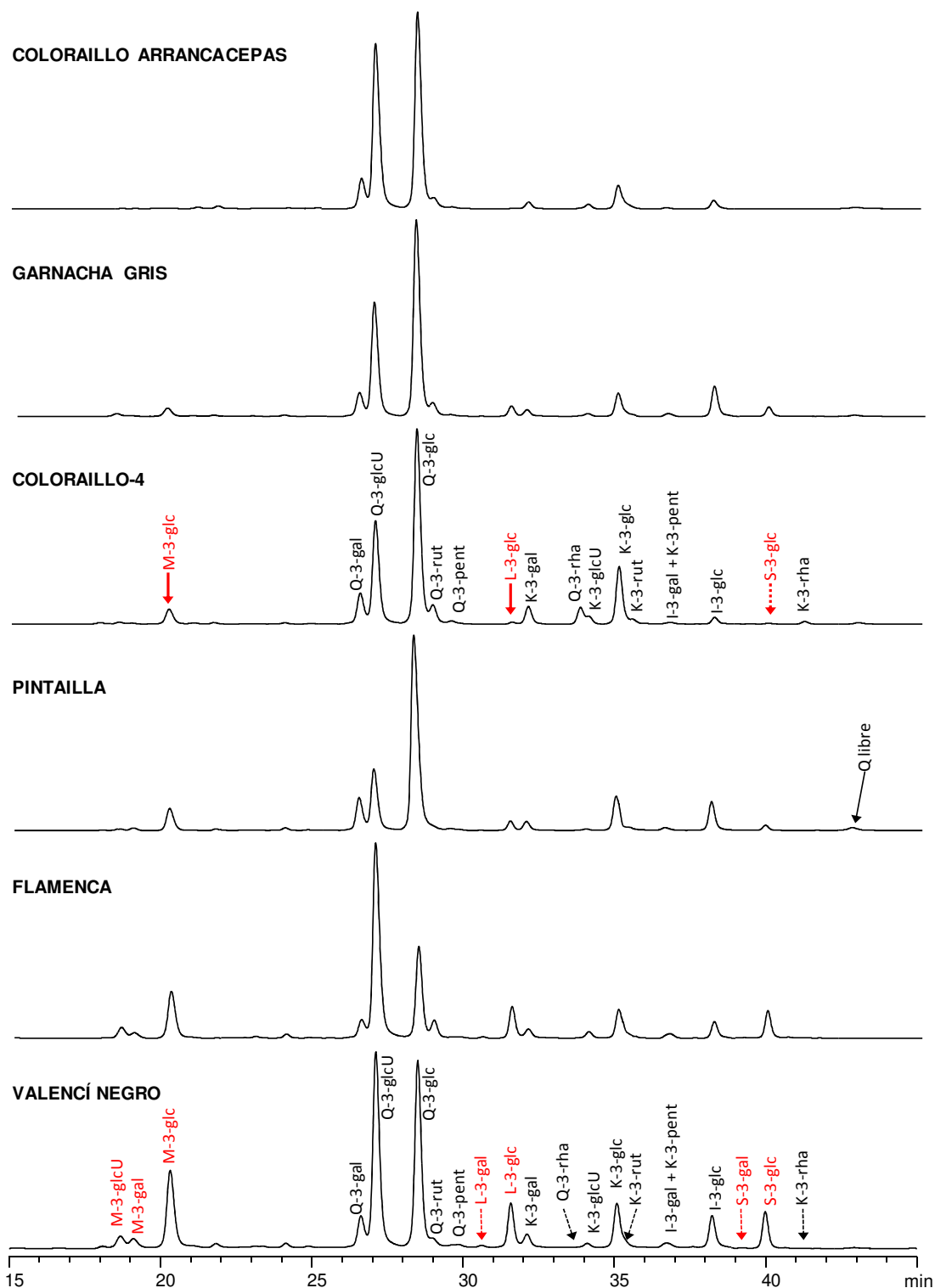


Figura 10. Perfil de flavonoles (cromatogramas obtenidos a 360 nm) de variedades minoritarias de uva tinta. Abreviaturas: K, kaempferol; Q, quercetina; I, isoramnetina; M, miricetina; L, laricitrina; S, siringetina; gal, galactósido; glc, glucósido; glcU, glucurónido; rut, rutinósido (6''-ramnosil-glucósido); pent, pentósido; rha, ramnósido. En rojo se señalan los nuevos flavonoles que se detectan en uvas tintas pero que no aparecen en uvas blancas. Flechas discontinuas: flavonoles que aparecen en cantidades de traza

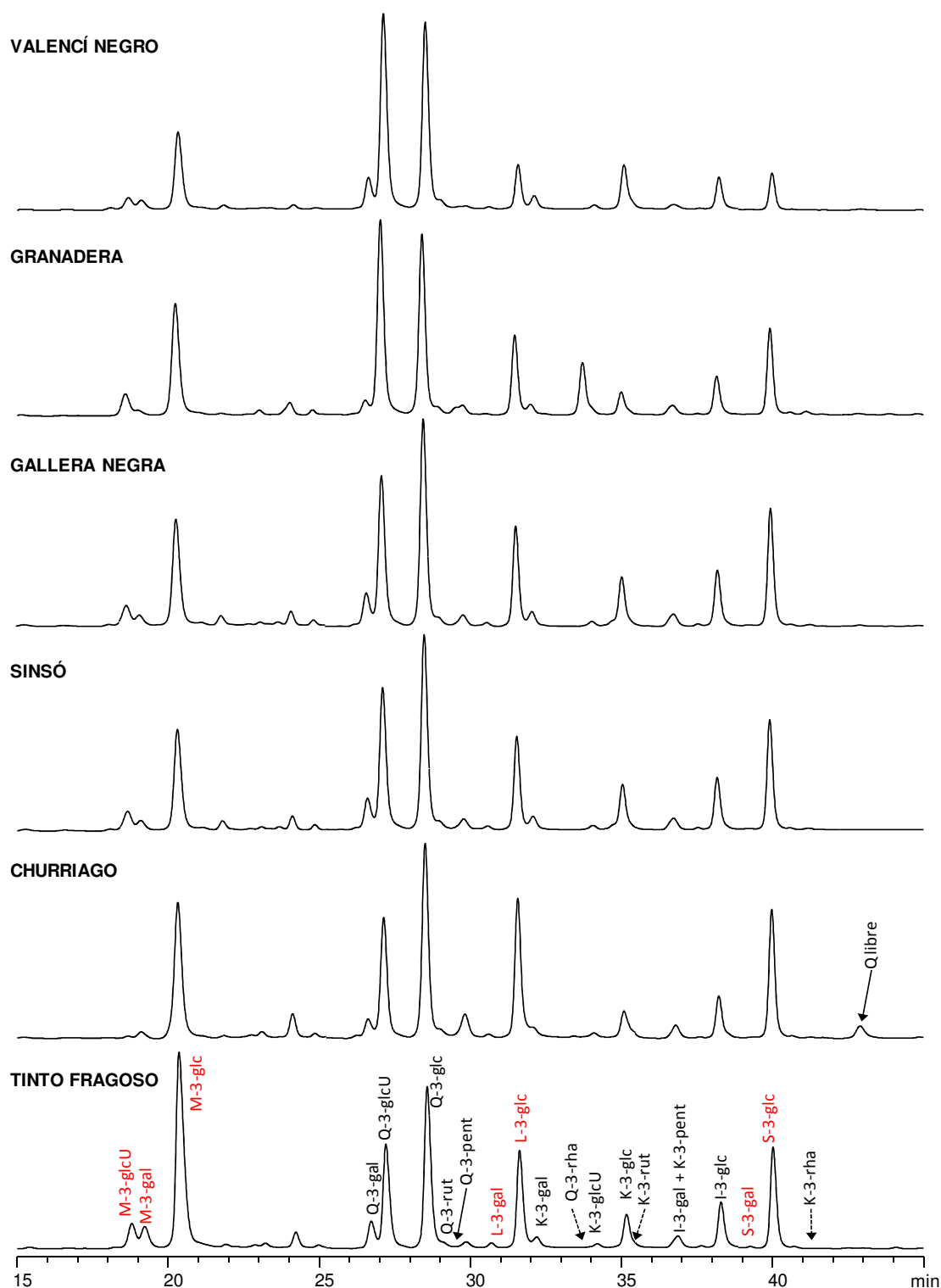


Figura 10 (continuación). Perfil de flavonoles (cromatogramas obtenidos a 360 nm) de variedades minoritarias de uva tinta. Abreviaturas: K, kaempferol; Q, quercetina; I, isoramnetina; M, miricetina; L, laricitrina; S, siringetina; gal, galactósido; glc, glucósido; glcU, glucurónido; rut, rutinósido (6''-ramnosil-glucósido); pent, pentósido; rha, ramnósido. En rojo se señalan los nuevos flavonoles que se detectan en uvas tintas pero que no aparecen en uvas blancas. Flechas discontinuas: flavonoles que aparecen en cantidades de traza.

El contenido total en flavonoles (mg/kg de uva, como equivalentes de Q-3-glc) de las variedades de uva tinta minoritarias estudiadas (17.3-179.9 mg/kg de uva), coincidió con el rango de valores encontrados en la bibliografía para uva tinta, que es de 5.8-160.9 mg/kg de uva (Makris et al., 2006; Mattivi et al., 2006; Castillo-Muñoz et al., 2007), un rango bastante parecido al reportado para uva blanca (ver apartado 5.2.2). El contenido en flavonoles de la variedad Tinto Fragoso fue el mayor de todos, incluso algo superior a los valores de referencia encontrados, y coincidió con que esta variedad fue también la de mayor contenido en antocianos (Tabla 5.2). Para el resto de las variedades tintas, no obstante, no se encontró correlación entre el contenido total en flavonoles y en antocianos, un resultado esperable ya que, aunque la ruta de biosíntesis de antocianos y flavonoles comparten un tronco común (ruta biosintética de los flavonoides; Castillo-Muñoz et al., 2009b), los factores que influyen en la biosíntesis de ambos tipos de compuestos no son necesariamente los mismos (Price et al., 1995; Haselgrove et al., 2000; Downey et al., 2004).

Al contrario que lo encontrado para los perfiles de flavonoles de las variedades blancas, en el caso de las variedades tintas los derivados glicosilados minoritarios para cada tipo de aglicona, entre los que se encuentran el nuevo derivado 3-rutinósido de kaempferol y los 3-pentósidos y 3-ramnósidos de quercetina y kaempferol, no jugaron un papel relevante en la diferenciación varietal. Lo más probable es que la importancia relativa de todos estos derivados minoritarios se haya visto dispersada y disminuida por la presencia, a veces de manera relevante, de los flavonoles trisustituidos (miricetina, laricitrina y siringetina), fundamentalmente como derivados 3-glucósidos.

Finalmente, cabe destacar que los perfiles de flavonoles permitieron diferenciar los integrantes de la pareja de variedades de uva tinta que presentaron los perfiles de antocianos poco diferenciables, Churriago y Gallera Negra. Por tanto, la combinación de ambos perfiles de compuestos fenólicos (de antocianos y de flavonoles) permitió la total diferenciación de las 11 variedades de uvas tintas estudiadas.

3. DERIVADOS DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS (DAHC) DE LAS VARIEDADES MINORITARIAS DE UVAS

Los principales derivados de ácidos hidroxycinámicos (DAHC) presentes en la uva no son los ácidos hidroxycinámicos libres (ácidos cafeico, p-cumárico y ferúlico), sino sus ésteres con el ácido tartárico (ácidos hidroxicinamoil-tartáricos: ácidos caftárico, cutárico y fertárico, respectivamente). Durante el tratamiento de las uvas para la elaboración de vinos, e igualmente durante su procesado para el análisis (pelado manual; congelación y descongelación para su análisis; trituración con disolvente de extracción), es fácil que estos compuestos se oxiden (la polifenoloxidasas de la uva es muy activa y se libera durante la descongelación de las muestras). En la uva existe un tripéptido con un grupo tiol, el glutatión, que es capaz de reaccionar con el ácido caftárico oxidado, para dar el ácido 2-S-glutationil-trans-caftárico (también denominado Grape Reaction Product, GRP). Este producto de oxidación se encuentra tanto en los vinos como en las muestras de uva procesadas tras descongelación. Por último, en el vino los ácidos hidroxicinamoil-tartáricos se van hidrolizando lentamente, por lo que en éstos también se observan ácidos hidroxycinámicos libres junto a sus precursores y el GRP. Debido al doble enlace presente en todos los DAHC, es posible observar isómeros trans y cis de cada uno de los DAHC anteriormente citados.

El contenido en DAHC de la uva tiene una relevancia importante en la calidad del futuro vino por diversas razones. En primer lugar, la facilidad de oxidación, sobre todo de los derivados del ácido cafeico, es la principal causa del pardeamiento de los vinos blancos que merma su calidad. Los ácidos hidroxycinámicos son el origen de la formación de los 4-etilfenoles responsables del

defecto aromático denominado “brett”, que se caracteriza por un olor desagradable de tipo animal (bestia sudada; olor de ratón). En contraste, los ácidos hidroxicinámicos libres pueden reaccionar directamente, o tras su descarboxilación a 4-vinil-fenoles, con los antocianos, generando una nueva gama de pigmentos estables, los hidroxicinamóil-piranoantocianos, que son considerados los pigmentos rojos de los vinos tintos envejecidos. Por tanto, el estudio de la composición cualitativa y cuantitativa de los DAHC resulta de gran interés a la hora de caracterizar el potencial enológico de cualquier variedad de uva.

3.1. Contenido y distribución de los DAHC en las distintas partes de las uvas

Los derivados de los ácidos hidroxicinámicos (DAHC) eluyeron muy pronto en las condiciones cromatográficas empleadas y fueron identificados en base a sus característicos espectros UV y de masas. Como era de esperar para uvas de *V. vinifera*, se identificaron los ácidos caftarico (fundamentalmente sólo su isómero trans), cutárico (ambos isómeros trans y cis) y fertárico (ambos isómeros trans y cis). La presencia del derivado GRP también fue observada, ya que durante el procesado de las muestras es inevitable cierto grado de oxidación del ácido caftarico. También se detectó un derivado del ácido p-cumárico, que podría tratarse del éster de este ácido con la glucosa, tal como se ha descrito en vinos de *V. vinifera* y en uvas de variedades híbridas (Lago-Vanzela et al., 2011b); dado que la certeza en la identificación de este último compuesto no es total, no se cuantificó y no se usó en el posterior tratamiento estadístico de los datos.

Tabla 5. Contenido (mg/kg de uva entera) en derivados de ácidos hidroxicinámicos (DAHC), como equivalentes de ácido *t*-caftarico (ácido *trans*-cafeoiltartárico) de las variedades minoritarias de uvas blancas y tintas, en las distintas partes de la uva (uva entera, hollejo y pulpa). Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas entre variedades (test de Student-Newman-Keuls, $\alpha = 0.05$).

Variedad	uva entera			hollejo			pulpa			% en pulpa		
	VM	DE		VM	DE		VM	DE		VM	DE	
Albillo de Pozo	53.42	± 3.60	b	2.32	± 0.98	a	51.10	± 2.80	c	95.71	± 1.62	a
Albillo Mayor	35.68	± 8.52	ab	7.06	± 2.79	a	28.63	± 9.82	abc	79.22	± 9.96	a
Alcañón	18.06	± 2.34	a	1.81	± 0.76	a	16.25	± 2.11	a	90.02	± 3.53	a
Castellana Blanca	48.45	± 5.81	b	2.01	± 1.04	a	46.43	± 5.22	bc	95.91	± 1.78	a
Garnacha Blanca	83.88	± 31.37	c	14.88	± 12.78	b	69.00	± 23.38	d	84.22	± 12.02	a
Gordera Manchega	36.43	± 10.86	ab	3.73	± 2.49	a	32.70	± 11.86	abc	88.74	± 9.58	a
Jarrosuelto	41.23	± 2.07	ab	4.72	± 5.09	a	36.51	± 6.59	abc	88.28	± 12.92	a
Marfileña	13.58	± 2.39	a	1.48	± 0.29	a	12.10	± 2.36	a	88.90	± 2.39	a
Moscatel Serrano	27.86	± 2.25	ab	2.91	± 0.41	a	24.95	± 2.43	ab	89.49	± 1.87	a
Pintada	16.09	± 1.64	a	0.97	± 0.56	a	15.12	± 1.87	a	93.84	± 3.93	a
Planta Fina	35.82	± 10.00	ab	1.49	± 0.26	a	34.33	± 9.76	abc	95.74	± 0.58	a

Variedad	uva entera			hollejo			pulpa			% en pulpa		
	VM	DE		VM	DE		VM	DE		VM	DE	
Churriago	43.91	± 3.85	ab	0.75	± 0.06	a	43.16	± 3.82	abc	98.28	± 0.16	b
Coloraillo Arrancacepas	34.32	± 10.91	ab	3.78	± 2.38	a	30.53	± 8.56	ab	89.62	± 3.11	ab
Coloraillo-4	18.69	± 4.33	a	2.82	± 2.00	a	15.86	± 3.57	a	85.38	± 8.30	a
Flamenca	90.62	± 33.47	c	3.90	± 1.20	a	86.72	± 33.44	e	95.33	± 2.31	ab
Gallera Negra	79.71	± 11.39	c	2.67	± 1.44	a	77.03	± 10.64	cde	96.70	± 1.53	ab
Garnacha Gris	82.81	± 5.35	c	2.64	± 0.67	a	80.17	± 4.87	de	96.83	± 0.68	ab
Granadera	46.46	± 15.15	ab	3.23	± 2.67	a	43.23	± 17.76	abc	90.82	± 10.50	ab
Pintailla	50.17	± 6.29	ab	1.70	± 0.85	a	48.47	± 6.96	abcd	96.47	± 2.08	ab
Sinsó	32.42	± 7.11	ab	1.56	± 0.20	a	30.85	± 6.92	ab	95.10	± 0.51	ab
Tinto Fragoso	91.06	± 6.00	c	3.45	± 0.85	a	87.61	± 5.46	e	96.22	± 0.78	ab
Valenci Negro	65.02	± 18.92	bc	0.81	± 0.69	a	64.21	± 19.49	bcde	98.52	± 1.31	b

Para conocer el contenido en DAHC de la pulpa, se procedió a una cuantificación por diferencia, que evita tener que realizar una excesiva manipulación de las muestras que puede conducir a resultados erróneos debido a la fácil oxidación de este tipo de compuestos fenólicos (sobre todo del normalmente mayoritario ácido caftárico): una parte de las muestras de uvas fueron analizadas enteras, y la otra parte se le quitaron los hollejos, que fueron analizados por separado; la diferencia entre ambas medidas se consideró correspondiente al contenido de la pulpa (Tabla 5). En todas las variedades de uvas analizadas, los DAHC se encontraron mayoritariamente en la pulpa, en una proporción media del 79-96% en las variedades blancas y del 85-99% en las tintas, confirmando la idea generalmente aceptada de que estos compuestos fenólicos se encuentran típicamente en la pulpa y, por tanto, pasan siempre a los vinos durante su elaboración, se trate bien de vinos blancos (elaboración sin maceración) como de tintos (elaboración con maceración). Entre las variedades blancas, la Garnacha Blanca destacó por presentar el mayor contenido medio en DAHC (en equivalentes de ácido caftárico), tanto de forma global (83.88 mg/kg de uva entera) como parcialmente (69.00 mg/kg de uva, en la pulpa; 14.88 mg/kg de uva, en el hollejo), seguida de la variedad Albillo de Pozo (53.42 mg/kg de uva entera); en el extremo opuesto, las variedades de menor contenido en DAHC fueron Alcañón, Marfileña y Pintada (13.58-18.06 mg/kg de uva entera). En las variedades tintas el contenido total en DAHC fue generalmente superior al encontrado en las variedades blancas anteriores, destacando por su mayor contenido las variedades Flamenca, Gallera Negra, Garnacha Gris y Tinto Fragoso (79.71-91.06 mg/kg de uva entera), mientras que Coloraillo-4 destacó por su menor contenido (18.69 mg/kg de uva entera).

En el caso de las variedades tintas, un alto contenido en derivados hidroxicinámicos (DAHC) puede contribuir a aumentar la extractabilidad de los antocianos durante la vinificación, con el consiguiente aumento de la intensidad colorante del vino (Schwarz et al., 2005). Adicionalmente, los ácidos hidroxicinámicos que se vayan liberando en el vino a partir de los DAHC pueden formar pigmentos del tipo hidroxifenil-piranoantocianos, más estables que los antocianos originales de la uva (Rentzsch et al., 2010). En cambio, los DAHC, especialmente los derivados del ácido cafeico, están implicados en los procesos de pardeamiento de los vinos blancos, que deterioran la calidad sensorial de éstos, por lo que un alto contenido en DAHC no es deseable para una variedad de uva blanca. Teniendo en cuenta las razones anteriores, las mejores variedades tintas, desde la perspectiva de su mayor contenido en DAHC, serían Flamenca, Gallera Negra y Tinto Fragoso, y no se consideraría a la Garnacha Gris por su bajísimo contenido en antocianos que no la haría apta más que para elaborar vinos rosados o blancos. En cambio, la variedad Garnacha Blanca podría considerarse una variedad problemática respecto al desarrollo de pardeamiento en los vinos blancos que con ella se hicieran, ya que es la que contiene la mayor cantidad de DAHC.

4. ESTILBENOS DE LAS VARIEDADES MINORITARIAS DE UVAS

Los estilbenos, en particular los derivados del resveratrol, son considerados unos compuestos fenólicos a los que se atribuyen bastantes efectos positivos sobre la salud, y son muchos los estudios que se han realizado para conocer cuál es el contenido en resveratrol de muchos tipos de alimentos, destacando entre ellos las uvas y los vinos (Galán Gómez, 2008 y 2012). Estos compuestos fenólicos se encuentran principalmente en el hollejo de las uvas, fundamentalmente como resveratrol 3-glicósido, pero este glicósido puede hidrolizarse, liberando resveratrol, sobre todo en los vinos; además, la molécula de resveratrol tiene posibilidad de isomería cis-trans. Por tanto, en este estudio se evaluó el contenido total en resveratrol, sobre todo en la forma de 3-glicósido, así como la distribución de isómeros cis/trans, en las variedades de uva consideradas.

Tabla 6. Perfiles de estilbenos (% molar de cada estilbenol individual cuantificado por HPLC) y cantidad total (expresada como μmoles por kg de uva o kg de hollejo) en los hollejos de las variedades minoritarias de uvas blancas y tintas. Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas entre variedades (test de Student-Newman-Keuls, $\alpha = 0.05$).

Abreviaturas: R, resveratrol; glc, glucósido; *t*, *trans*; *c*, *cis*.

Variedad	<i>t</i> -R-glc			<i>c</i> -R-glc			Total ($\mu\text{moles/kg}$ uva)			Total ($\mu\text{moles/kg}$ hollejo)		
	VM	DE		VM	DE		VM	DE		VM	DE	
Albillo de Pozo	49.71	$\pm$ 7.46	a	50.28	$\pm$ 7.46	a	0.18	$\pm$ 0.05	a	1.47	$\pm$ 0.40	ab
Albillo Mayor	63.09	$\pm$ 4.24	a	36.90	$\pm$ 4.24	a	0.09	$\pm$ 0.04	a	0.71	$\pm$ 0.31	ab
Alcañón	39.67	$\pm$ 4.59	a	60.33	$\pm$ 4.59	a	0.35	$\pm$ 0.21	b	2.30	$\pm$ 1.03	b
Castellana Blanca	61.15	$\pm$ 9.51	a	38.84	$\pm$ 9.51	a	0.06	$\pm$ 0.05	a	0.45	$\pm$ 0.26	a
Garnacha Blanca	54.68	$\pm$ 10.83	a	45.31	$\pm$ 10.83	a	0.11	$\pm$ 0.09	a	0.56	$\pm$ 0.31	ab
Gordera Manchega	47.58	$\pm$ 14.34	a	52.41	$\pm$ 14.34	a	0.15	$\pm$ 0.05	a	1.18	$\pm$ 0.32	ab
Jarosuelto	54.53	$\pm$ 9.09	a	45.66	$\pm$ 9.09	a	0.04	$\pm$ 0.03	a	0.30	$\pm$ 0.15	a
Marfileña	52.83	$\pm$ 3.32	a	47.17	$\pm$ 3.32	a	0.08	$\pm$ 0.02	a	0.64	$\pm$ 0.20	ab
Moscatel Serrano	55.50	$\pm$ 4.59	a	44.49	$\pm$ 4.59	a	0.06	$\pm$ 0.02	a	0.88	$\pm$ 0.23	ab
Pintada	63.68	$\pm$ 4.66	a	36.31	$\pm$ 4.66	a	0.05	$\pm$ 0.01	a	0.52	$\pm$ 0.05	a
Planta Fina	51.63	$\pm$ 0.77	a	48.36	$\pm$ 0.77	a	0.04	$\pm$ 0.01	a	0.42	$\pm$ 0.11	a

Variedad	<i>t</i> -R-glc			<i>c</i> -R-glc			Total ($\mu\text{moles/kg}$ uva)			Total ($\mu\text{moles/kg}$ hollejo)		
	VM	DE		VM	DE		VM	DE		VM	DE	
Churriago	67.23	$\pm$ 11.76	ab	32.77	$\pm$ 11.77	ab	0.14	$\pm$ 0.04	a	1.60	$\pm$ 0.90	a
Coloraillo Arrancacepas	51.16	$\pm$ 6.29	ab	48.84	$\pm$ 6.29	ab	0.43	$\pm$ 0.21	a	3.40	$\pm$ 1.50	a
Coloraillo-4	60.60	$\pm$ 1.90	ab	39.40	$\pm$ 1.90	ab	1.15	$\pm$ 0.81	ab	8.83	$\pm$ 4.61	a
Flamenca	71.83	$\pm$ 7.02	ab	28.17	$\pm$ 7.02	ab	0.11	$\pm$ 0.05	a	0.85	$\pm$ 0.40	a
Gallera Negra	62.16	$\pm$ 4.42	ab	37.84	$\pm$ 4.42	ab	2.91	$\pm$ 1.13	b	22.07	$\pm$ 6.28	b
Garnacha Gris	69.53	$\pm$ 9.06	ab	30.47	$\pm$ 9.06	ab	0.05	$\pm$ 0.03	a	0.32	$\pm$ 0.15	a
Granadera	72.87	$\pm$ 3.06	ab	27.13	$\pm$ 3.06	ab	0.48	$\pm$ 0.30	a	3.33	$\pm$ 1.57	a
Pintailla	58.13	$\pm$ 7.82	ab	41.87	$\pm$ 7.82	ab	2.70	$\pm$ 2.16	b	21.45	$\pm$ 12.42	b
Sinsó	47.72	$\pm$ 23.51	a	52.28	$\pm$ 23.51	b	0.46	$\pm$ 0.13	a	5.04	$\pm$ 0.96	a
Tinto Fragoso	70.96	$\pm$ 4.03	ab	29.04	$\pm$ 4.03	ab	0.90	$\pm$ 0.29	a	8.14	$\pm$ 2.86	a
Valenci Negro	73.70	$\pm$ 3.51	b	26.30	$\pm$ 3.51	a	0.30	$\pm$ 0.09	a	3.36	$\pm$ 0.40	a

En todas las muestras de uvas analizadas, tanto de variedades blancas como tintas, sólo se encontró la forma 3-glucosilada del resveratrol (Tabla 6). Los contenidos medios totales oscilaron en los siguientes rangos:

- Variedades blancas: 0.04-0.35 $\mu\text{moles/kg}$ de uva o 0.30-2.30 $\mu\text{moles/kg}$ de hollejo. En términos de equivalentes de resveratrol, para poder comparar con la bibliografía, suponen 9-79 $\mu\text{g/kg}$ de uva o 68-522 $\mu\text{g/kg}$ de hollejo. De forma significativa, la variedad Alcañón fue la que presentó un mayor contenido en resveratrol 3-glucósido, del orden del doble o más de las del resto de variedades blancas.
- Variedades tintas: 0.05-2.91 $\mu\text{moles/kg}$ de uva o 0.32-22.07 $\mu\text{moles/kg}$ de hollejo. En términos de equivalentes de resveratrol, para poder comparar con la bibliografía, suponen 11-661 $\mu\text{g/kg}$ de uva o 73-5010 $\mu\text{g/kg}$ de hollejo. Las variedades Gallera Negra y Pintailla mostraron contenidos en resveratrol 3-glucósido similares entre sí y significativamente mayores (al menos por un factor de 3 veces, y hasta de 60 veces más) que los del resto de variedades tintas.

Como puede verse, el contenido mínimo de resveratrol 3-glucósido fue similar en ambos tipos de variedades, pero en el caso de algunas variedades tintas, se llegaron a alcanzar contenidos hasta casi 10 veces superiores (Gallera Negra y Pintailla, con resveratrol equivalente de 661 y 613

□g/kg de uva, respectivamente) en comparación al mayor contenido encontrado entre las variedades blancas (Alcañón, con resveratrol equivalente de 79 □g/kg de uva). En todo caso, el contenido en estilbenos de las variedades estudiadas fue relativamente bajo, como cabría esperar para unas uvas cultivadas en un clima cálido y seco que propicia un buen estado sanitario de éstas, que suele ser uno de los factores de estrés que más propician la síntesis de este tipo de polifenoles, considerados un mecanismo de defensa de la planta (de ahí que se denominen fitoalexinas). Según los valores medios encontrados en la bibliografía (Gatto et al., 2008) las distintas variedades de uvas pueden clasificarse según su potencial productor de resveratrol:

- Variedades con alto potencial: trans-resveratrol = 2.37 mg/kg; cis-resveratrol 3-glucósido = 4.19 mg/kg; trans-resveratrol 3-glucósido = 4.18 mg/kg; y resveratrol total = 10.74 mg/kg.
- Variedades con bajo potencial (1 orden de magnitud inferior a las de alto potencial): trans-resveratrol = 0.53 mg/kg; cis-resveratrol 3-glucósido = 0.29 mg/kg; trans-resveratrol 3-glucósido = 0.48 mg/kg; y resveratrol total = 1.30 mg/kg. En nuestro estudio, todas las variedades consideradas pueden considerarse de bajo potencial productor de resveratrol, ya que los valores totales de resveratrol más altos encontrados fueron los de las variedades tintas Gallera Negra y Pintailla, de hasta 0.661 mg/kg.

En relación a los isómeros del resveratrol 3-glucósido, normalmente predominó el trans: 40-63% entre las variedades blancas, con sólo dos variedades por debajo del 50% (Alcañón y Albillo de Pozo); 48-74% entre las variedades tintas, con sólo una variedad por debajo del 50% (Sinsó). No obstante, entre las variedades blancas no se encontraron diferencias significativas sobre el porcentaje de predominancia del isómero trans del resveratrol 3-glucósido. En cambio, entre las variedades tintas, las variedades Sinsó y Valencí Negro sí se diferenciaron significativamente por su menor (48%) y mayor (74%) contenido en este isómero, respectivamente, encontrándose el resto de variedades dentro del intervalo 51-73%, aunque mostrando escasa diferenciación significativa con los dos extremos anteriormente citados.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha estudiado el perfil de compuestos fenólicos presentes en el hollejo y en la pulpa de diversas variedades de uvas blancas y tintas que son minoritarias en Castilla-La Mancha (su cultivo se reduce a un ámbito tan sólo local o comarcal), con idea de explorar el potencial enológico de estas variedades autóctonas.
2. Los compuestos fenólicos estudiados pertenecen a las familias de: antocianos (sólo en los hollejos de uvas tintas), flavonoles (sólo en los hollejos), derivados de ácidos hidroxicinámicos (en hollejos y en pulpa) y estilbenos (sólo en hollejos). Estos compuestos tienen una gran repercusión en importantes propiedades sensoriales y tecnológicas de los vinos, y están relacionados con los beneficios asociados al consumo moderado de vino.
3. Gracias al empleo de columnas cromatográficas de HPLC de mayor poder de resolución (columnas de menor tamaño de partícula, 3.5 mm vs. 5 mm, y de menor diámetro, 2.1 mm vs. 4.6 mm, frente a las convencionales) y al uso de detección combinada por DAD y ESI-MS/MS, ha sido posible la identificación de 5 nuevos flavonoles glicosilados no descritos con anterioridad para uvas de V. vinífera: 3-pentósido y 3-rmanósido de quercetina; 3-rutinósido, 3-pentósido y 3-ramnósido de kaempferol.
4. Desde un punto de vista quimiotaxonómico, los perfiles molares de las diversas familias de compuestos fenólicos han permitido la diferenciación de las distintas variedades de uva. Para las uvas tintas, tanto el perfil de antocianos como el de flavonoles resultaron muy útiles, mientras

que en el caso de las variedades blancas lo fue el perfil de flavonoles. Los perfiles de derivados de ácidos hidroxycinámicos ofrecieron menos posibilidades de diferenciación varietal, mientras que los perfiles de estilbenos no permitieron diferenciar.

5. En los perfiles de flavonoles de las variedades blancas no se encontraron derivados de estructuras trisustituidas (miricetina, laricitrina y siringetina), mientras que sí lo fueron en los de las variedades tintas. Los derivados del tipo 3-glucósido fueron mayoritarios en todos los casos, seguidos de los 3-galactósidos, los 3-glucurónidos, y de los nuevos derivados en los casos de quercetina y kaempferol. No obstante, el derivado 3-glucurónido de quercetina fue una excepción, llegando a encontrarse en proporciones similares a las del 3-glucósido de quercetina, y en algunos casos superando a este último.

6. Las variedades tintas Coloraillo Arrancacepas, Coloraillo-4, Garnacha Gris y Pintailla compartieron algunas características comunes, que normalmente no se encuentran en variedades tintas más extendidas: un contenido bajo o muy bajo (sobre todo Coloraillo Arrancacepas y Garnacha Gris) de antocianos; perfiles de antocianos en los que los derivados disustituidos (cianidina y peonidina) tienden a adquirir mayor relevancia que los trisustituidos (delfinidina, petunidina y, sobre todo, malvidina); perfiles de flavonoles similares a los de uvas blancas (casi total ausencia de estructuras trisustituidas).

7. Las variedades tintas anteriormente citadas no serían muy recomendables para elaborar vinos tintos, y su potencial enológico estaría más dirigido a la posible elaboración de vinos rosados e incluso blancos.

8. La variedad Tinto Fragoso mostró unas características fenólicas muy interesantes: fue la variedad con mayor contenido en antocianos, superior al valor medio descrito para la variedad emblemática castellano-manchega (Cencibel), así como en flavonoles y en derivados de ácidos hidroxycinámicos. Paralelamente fue una de las variedades con mayor proporción de antocianos cumarilados y de flavonoles trisustituidos. Todas estas características la convierten en una variedad con un alto potencial para producir vinos tintos con un color más intenso y estable.

9. El contenido en derivados de ácidos hidroxycinámicos fue cualitativamente muy similar en las variedades blancas y tintas, localizándose fundamentalmente en la pulpa y siendo el ácido trans-caftárico el compuesto predominante. Desde un punto de vista cuantitativo las variedades tintas tuvieron un contenido total en DAHC ligeramente mayor, destacando las variedades tintas Flamenca, Gallera Negra, Garnacha Gris, Tinto Fragoso, y la blanca Garnacha Blanca con un contenido mayor aunque similar entre ellas.

10. El estilbeno denominado resveratrol se encontró en los hollejos de las variedades de uva estudiadas como 3-glucósido, con proporciones ligeramente superiores del isómero trans, independientemente de que se tratara de variedades tintas o blancas. En todos los casos, el contenido total fue bajo, considerándose todas estas variedades como de bajo potencial productor de resveratrol.