

MEDICIONES DE TRANS RESVERATROL EN VINOS Y UVAS DEL VALLE CENTRAL DE TARIJA AFECTADOS POR DOS NIVELES DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOLAR.

TRANS RESVERATROL MEASUREMENTS ON WINES AND GRAPES FROM TARIJA CENTRAL VALLEY UNDER TWO ULTRAVIOLET SOLAR RADIATION LEVELS

Taquichiri Marco Antonio¹, Gutierrez Barea Pastor², Paco Sarzuri Joel², Arteaga María Del Carmen³ y Callizaya Juan Carlos³.

¹Director Departamento de Física. Facultad de Ciencias y Tecnología. UAJMS.

²Docentes Investigadores, Departamento de Física. Facultad de Ciencias y Tecnología. UAJMS

³Investigadores Laboratorio de Compuestos Bioactivos, UAJMS

Dirección para la correspondencia: Marco Antonio Taquichiri. Laboratorio de Compuestos Bioactivos. Campus Universitario. El Tejar, Tarija, Bolivia.

Correo Electrónico: iisoc@hotmail.com

RESUMEN

Se presentan los resultados de mediciones de trans resveratrol en dos cultivares de vitis vinífera: Syrah y Cabernet Sauvignon. Las variedades de vid bajo estudio fueron sometidas a dos ambientes de radiación solar ultravioleta: sin atenuación y 20% de atenuación. Las plantaciones de vid se encuentran en la misma latitud y longitud geográfica y en promedio a una misma elevación sobre el nivel del mar a 1987 msnm. El contenido de resveratrol en uvas y vinos se determinó mediante cromatografía líquida usando técnicas de HPLC. Las muestras bajo nivel de atenuación del 20% mostraron un elevado contenido de resveratrol.

PALABRAS CLAVE: Resveratrol, uvas y vinos de altura, vitis vinífera, radiación ultravioleta

ABSTRACT

The results of measurement of trans-resveratrol in two Vitis vinifera cultivars: Cabernet Sauvignon and Syrah are presented in this report. These vine varieties were subjected to two different solar ultraviolet-B (UV-B) radiation levels: full UV-B and semi attenuated (20% of attenuation) UV-B. These two vineyards are located at 1879 m above sea level (masl) and at the same geographic location. The content of resveratrol in grapes and wines were evaluated using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Samples under 20% of solar UV-B

showed the highest levels of total resveratrol.

KEYWORDS: Resveratrol, high quality wines and grapes, Vitis vinifera, ultraviolet radiation.

INTRODUCCIÓN

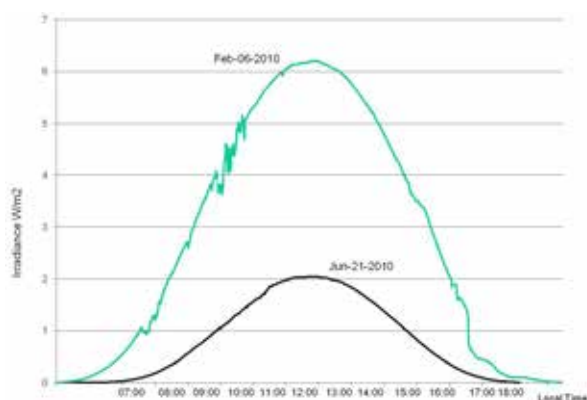
La radiación solar ultravioleta UV representa una pequeña porción de la intensidad de luz que llega del sol. Esta radiación es a su vez dividida en tres categorías en función de su longitud de onda y energía asociada a ésta: UV-A (315 – 400 nanómetros), UV-B (280 a 315 nanómetros) y UV-C (280 – 100 nanómetros) (Madronich, et al. 1988). La radiación UV-B es absorbida por la capa de ozono en la estratósfera y algunos gases de la atmósfera, sin embargo, un porcentaje alrededor del 5% alcanza la superficie terrestre. Esta pequeña porción, es potencialmente dañina para los organismos vivos en virtud del daño que producen altos niveles de fotones UV-B en la estructura celular, aunque niveles moderados de radiación UV-B pueden estimular mecanismos de protección como respuesta a esta agresión (Brosché, et. al. 2003).

Debido a su ubicación geográfica y elevación sobre el nivel del mar, el valle central de Tarija (21°, 64° W, 1887 msnm) tiene muchos días con radiación UV-B elevada en verano y disminuida en invierno (Taquichiri, et. al. 2008). Los cultivares más importantes del Valle Central de Tarija en función de su producción son: Moscatel de Alejandría,

Red Globe, Cardinal, Italia, Syrah, Cabernet Sauvignon, Cariñena, Malbec y otros en menor importancia. Estas variedades sin bien han sido introducidas al clima del Valle Central de Tarija, no han sido estudiadas a detalle en sus características fenológicas y que potencialmente contienen polifenoles beneficiosos a la salud humana (Dipak, et. al. 2010)

En cuanto a la dependencia temporal horaria (Taquichiri, et. al. 2008) de la intensidad de la RUV-B para dos días típicos con cielo despejado: uno en invierno y otro en verano para el hemisferio sur, los datos fueron obtenidos mediante un piranómetro YES UVB-1. Posteriormente fueron comparados con una medición extrapolada del la Agencia Espacial Europea ESA para la latitud y longitud de Tarija, Bolivia. (Figura 1).

Figura 1. Dependencia temporal horaria de la intensidad de la RUV-B en Tarija



El resveratrol (3,5,4'- trihydroxystilbeno) es un miembro de la familia de los polifenoles llamados viniferinos, se encuentran de forma natural en la cáscara de las uvas y se le atribuye diversos beneficios que van desde protección al sistema cardiovascular y protección al sistema inmunológico (Ates et. al, 2007), véase también (Barger et. al, 2008), (Baur, et. al., 2006) y (Dar, et. al. 2006). El resveratrol tiene formula molecular $C_{14}H_{12}O_3$, con peso molecular de 228,25 existiendo en dos formas isoméricas: el trans-resveratrol y el cis-resveratrol, ambos con sus formas glicosiladas. Los compuestos polifenólicos, también se clasifican como compuestos flavonoides y no-flavonoides entre los cuales se encuentran el ácido benzoico, ácido cinámico y los estilbenos como el resveratrol, que aparece en respuesta a ataques fúngicos, y externos y radiación

ultravioleta-B RUV-B (Cantos, et.al. 200), (Pezet, et.al. 2003).

La incidencia de la radiación solar en plantaciones de vid a latitudes semi ecuatoriales podrían activar la síntesis de resveratrol, habiéndose reportado valores de 50-100 mg/g de resveratrol en la piel y semillas de uva de vinificación (Dudely, et. al., 2008). El resveratrol conjuntamente otros polifenoles, son extraídos de la piel de las uvas y pasan al vino durante la vinificación, reportándose valores entre los rangos de 0-15 mg/g de trans-resveratrol mientras que valores de cis-resveratrol varían entre 0-5 mg/g (Kopp, 1998). Debido a que las Siendo que las paredes celulares de la cáscara de la uva son relativamente mas gruesas, la técnica de vinificación en contacto con los hollejos de la uva va a enriquecer la presencia de estos compuestos en el vino (Flanzy, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

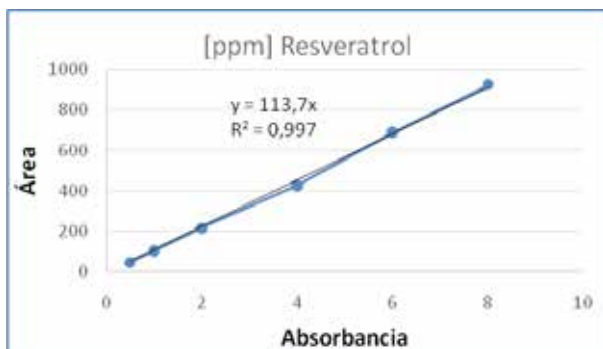
Se seleccionaron 20 plantas de vitis vinífera de cada una de las plantaciones de Viñedos Kohlberg (21°35'29"S; 64°36'42"W, 1861 msnm), cv. Syrah y del Centro Nacional Vitivinícola CENAVIT; (21°41'14"S; 64°39'25"W, 1738 msnm), cv. Cabernet Sauvignon. Se cubrió a 10 plantas con malla antigranizo negra Arrigoni dejándose las otras 10 plantas con irradiación solar natural. Los valores de irradiación y mediciones de atenuación de la malla antigranizo fueron realizados utilizando un piranómetro YES UVB-1 de Yankee Environmental Systems, CA, USA El tratamiento experimental fue instalado una semana después de la fecha del envero (15 de diciembre 2014) hasta la fecha de cosecha (1 de marzo 2015). Se realizó un diseño experimental de bloques elegidos al azar con tres repeticiones; se tomaron 10 plantas al azar para cuatro muestreos entre la fecha del envero hasta la fecha de cosecha durante la temporada agrícola y 10 plantas para micro vinificación en el laboratorio de Compuestos Bioactivos de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho, Tarija Bolivia. La microvinificación de plantas de ambos cultivares fueron realizados utilizando procedimientos estándar de microvinificación con levaduras de la cepa *Saccharomyces Cerevisae bayanus*. Luego de la fermentación maloláctica se dejó reposar el vino resultante por 1 mes a temperatura de 15 grados centígrados.

En cada muestreo de bayas se realizaron colectas de 30 a 40 bayas al azar y guardadas en bolsas de plásticos con autocierre para ser almacenadas a -20° C hasta el momento de análisis. El análisis de Resveratrol en bayas frescas fue realizado luego de obtener un extracto etanólico de las mismas, el cual fue inyectado en un Cromatógrafo Líquido de Alta Performance HPLC Agilent-1200 con arreglo de diodos en fase reversa utilizando el método analítico descrito en Crisea et. al (2003) con una curva de calibración de un estándar externo del 99.99% en el rango de 0,5 ppm a 12 ppm. Se utilizó una columna Kromasil 100 5S-18. Las muestras fueron inyectadas al equipo previa filtración en acrodiscos de PTFE millex hidrofóbico empleando como fase móvil Acetonitrilo (B) y Acido Fórmico 3.4 mM (A). El programa de la bomba inicia con un 80% de B a 0.01 minutos; 69% de B a 3 minutos; 68% de B a los 7 minutos; 20% de B a los 11 minutos; 0% de B a los 12 minutos; 80% de B a los 16 minutos. La identificación del analito se basó en comparación del tiempo de retención TR y el espectro UV.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la determinación de antioxidantes totales se realizó un diseño experimental de bloques elegidos al azar con tres repeticiones y dos tratamientos de radiación solar. Se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) de las medias de las mediciones para discriminación por diferencias mínimas con un valor de significación de $P \leq 0,05$ utilizando el software SPSS versión 20.0.

Figura 2. Curva de calibración, Resveratrol con estándar externo para el HPLC Agilent-1600 del laboratorio de Compuestos Bioactivos de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho, Tarija, Bolivia.



RESULTADOS

Se realizaron cuatro extractos etanólicos de las bayas frescas en cada fecha de muestreo, a partir de una porción de muestra aproximadamente 7 a 9 bayas. Las muestras de uva fueron homogeneizadas en un mortero de ágata habiéndose separado previamente las semillas, con este procedimiento se obtuvieron aproximadamente 5,00 gramos de este homogenizado de pulpa y cascara al cual se añadieron 20 mL de etanol destilado. Esta mezcla fue sometida a un baño de ultrasonido por 20 minutos a 0 °C, centrifugándose a 4 °C y 12000 RCF, después de 30 minutos de centrifugación el sobrenadante obtenido fue refrigerado a -20 °C para su posterior análisis. Los extractos etanólicos fueron inyectados directamente al HPLC Agilent-1600 en la que previamente se hizo una curva de calibración con estándar externo. Se prepararon los estándares de la curva patrón de resveratrol partiendo de una solución madre de 100 ppm de la que se prepararon diluciones de 3, 6, 9, 12, 15 ppm. La lectura de cada uno de los estándares se realiza bajo un programa introducido en el software del equipo OPEN LAB.

Mediciones de Resveratrol en bayas frescas de uvas

En la Tabla 1 muestran los valores obtenidos en muestras colectadas de bayas de uva fresca de las diferentes regiones y los diferentes estados de maduración hasta la cosecha.

Tabla 1: Contenido de resveratrol en bayas de uva fresca expresados en ppm en función de las cuatro colectas previas a la vinificación

Variedad/Código	Fecha de muestreo/análisis ppm			
	1	2	3	4
Sy – Ce00	0,21	ND	ND	0,31
Sy – Ce20	0,21	0,11	ND	0,21
Sy – K00	0,40	ND	ND	0,40
Sy – K20	0,33	ND	0,37	0,42
CS – Ce00	ND	ND	ND	ND
CS – Ce20	ND	ND	ND	ND
CS – K00	0,37	ND	0,23	0,38
CS – K20	ND	0,40	ND	0,42

ND = NO DETECTADO (Sy: Syrah; CS: Cabernet Sauvignon)

El contenido de resveratrol en bayas frescas fue realizado inmediatamente después de la colecta en cada fecha correspondiente. Los valores indicados como no detectados en la Tabla 1 son aquellos que caen por debajo del límite de detección del método utilizado. Los niveles de atenuación de la malla antigranizo es indicado por los índices 20 y el índice 00 indica cero nivel de atenuación o plantas expuestas a pleno sol. En cuanto al contenido

de Comportamiento temporal del contenido de Resveratrol en bayas frescas de Vid de la variedad Syrah en función de la fecha de colecta para análisis utilizando un HPLC Agilent-1600 se muestran en la Figura 3.

Donde se observa un ligero incremento en la fecha de cosecha desde valores mínimos de no detección hasta un valor de 0,4 ppm.

Cuando se analiza el comportamiento temporal de resveratrol para la variedad Cabernet Sauvignon con referencia a los dos lugares de muestreo y los valores de irradiación solar. Se observa un valor muy reducido en cada fecha de muestreo para cada etapa de maduración hasta la fecha de cosecha, con un valor similar al de la variedad Syrah. Un análisis del comportamiento de inicio con valores menores y posterior incremento de antioxidantes totales así como fenoles totales fue descrito en Taquichiri et. al. (2014).

Figura 3. Comportamiento temporal del contenido de Resveratrol en bayas frescas de Vid de la variedad Syrah

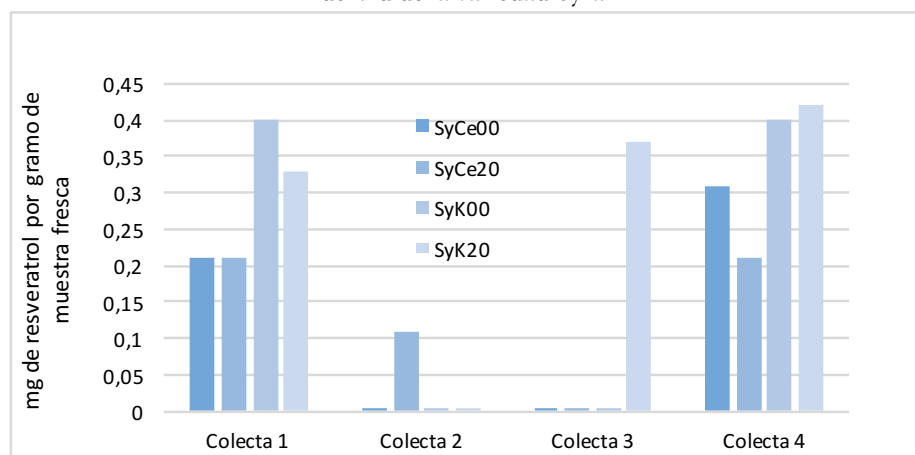
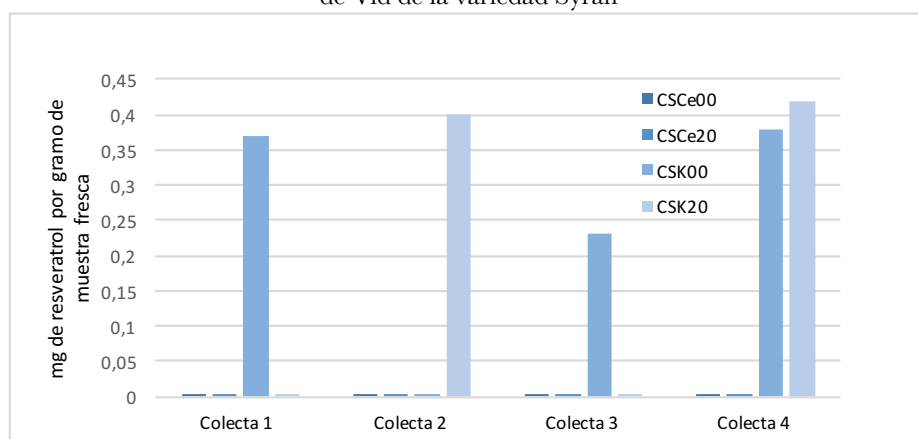


Figura 3. Comportamiento temporal del contenido de Resveratrol en bayas frescas de Vid de la variedad Syrah



Mediciones de Resveratrol en vinos.- En la Tabla 2 se muestra el resumen los resultados finales del contenido de resveratrol en vinos micro vinificados en las instalaciones del laboratorio para las variedades bajo estudio. Los resultados han sido extrapolados de la curva de calibración de la Figura 2. Se incluyeron en el estudio dos muestras de vinos

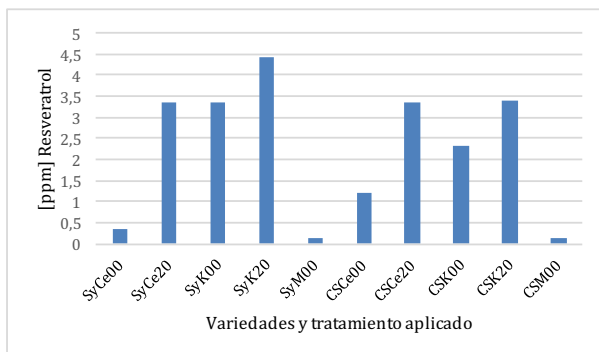
comerciales de Mendoza Argentina, identificados como Sy – M00 y CS – 00, los valores encontrados se encuentran en el mismo tiempo de retención y sus contenidos se expresan en partes por millón

Tabla 2. Mediciones de Resveratrol en las variedades seleccionadas Sy: Syrah; CS: Cabernet Sauvignon.

Variedad/código	Tiempo de retención	Resveratrol (ppm)
Sy – Ce00	9,279	0,34
Sy – Ce20	9,282	3,34
Sy – K00	9,284	3,36
Sy – K20	9,287	4,43
Sy – M00	9,288	0,13
CS – Ce00	9,292	1,22
CS – Ce20	9,287	3,34
CS – K00	9,287	2,34
CS – K20	9,279	3,40
CS – M00	9,291	0,12

Cuando se compara los resultados del contenido de resveratrol en las variedades de vino local (Tarija) de los dos cultivares seleccionados (Syrah y Cabernet Sauvignon) con un valor mínimo de 0,34 y un máximo de 4,43 ppm en vinos microvinificados, se observa una gran diferencia, con relación a los dos vinos comerciales de las mismas variedades adquiridos de Mendoza, que tienen un valor medido entre 0,12 a 0,13 ppm respectivamente.

Figura 5. Comparación del Comportamiento de Resveratrol en vinos microvinificados de las variedades Sy00: cv.Syrah; CS: cv Cabernet Sauvignon.



DISCUSIÓN

El método analítico utilizado permite cuantificar el contenido de trans resveratrol en bayas frescas de uvas como también en vinos. Las mediciones realizadas por cromatografía líquida de alta performance demuestran ser un método confiable en la determinación de este compuesto. Los valores encontrados en vinos de las variedades bajo este estudio indican un valor que se encuentra en algunos casos por encima de los valores medidos en

variedades similares ya que Dudely, et. al., 2008 y Kopp, 1998, indican valores menores a 2 ppm para vinos de distintas denominaciones y como valores máximos 0,3 ppm para uvas frescas.

En todos los casos, se puede observar que el contenido de resveratrol utilizando un análisis de HPLC en cada etapa del proceso de maduración de bayas de uva tiene un bajo contenido de resveratrol, que en la temporada bajo estudio (2014 – 2015) lleva a unos contenidos en vinos terminados con igual nivel de resveratrol, deduciéndose que el contenido de resveratrol tiene un ligero contenido mayor en el cultivar bajo atenuación del 20%. El contenido de resveratrol varía en función de muchos factores externos entre los cuales se encuentra el ambiente y la temporada agrícola así como el método analítico empleado. (Crisea et. al 2003). Se recomienda utilizar adicionales métodos analíticos para el estudio del contenido de esta fitoalexina. Sin embargo, el método analítico empleado ha sido probado con eficiencia además de no necesitar un pre tratamiento de la muestra. Así también, se hace necesario un análisis de todas las variedades de uva de vinificación del Valle Central de Tarija indicadas líneas arriba.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento de investigación Ciencia y Tecnología DICYT, de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho por el apoyo brindado al desarrollo del presente trabajo, el cual fue desarrollado con fondos del Impuesto Directo a los Hidrocarburos IDH. Se agradece a los viñedos del Centro Nacional Vitivinícola CENAVIT y Viñedos Kohlberg La Cabaña por las muestras de uva fresca para análisis y microvinificación

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Ates O, Cayli SR, Yucel N, Altinoz E, Kocak A, Durak MA, Turkoz Y, Yologlu S (2007) "Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. J Clin Neurosci" 14:256–260
- Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, Wang Y, Raederstorff D, Morrow JD, Leeuwenburgh C, Allison DB, Saupe KW, Cartee GD, Weindruch R, Prolla TA (2008) "A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction"

- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006) "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet". *Nature* 16:337–342
- Brosché, M. and Å. Strid. (2003) "Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants," *Physiol. Plant.* vol 117, pp. 1-10
- Cantos, E.; García-Viguera, C.; de Pascual, T.; Tomás-Barberai, F. A. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on Resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J. Agric. Food Chem.* (2000), 48, 4606–4612.
- Cristea, D., Bereau, I. and Vilarem, G. (2003). Identification and quantitative HPLC analysis of the main flavonoids present in weld (*Reseda luteola* L.). *Dyes and Pigments*, 57, 267-272.
- Dipak, K. D., Subhendu, M., Diptarka, R. (2010) "Resveratrol and red wine, healthy heart and longevity", *Heart Fail Rev* vol. 15, pp. 467–477, DOI 10.1007/s10741-010-9163-9
- Dudley J, Das S, Mukherjee S, Das DK (2008) "Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium depending on dose". *J Nutr Biochem* 20:443–452
- Das S, Bertelli AA, Bertelli A (2006) "Antiinflammatory action of resveratrol: a novel mechanism of action". *Arzneimittel Forschung Drug Res* 56:700–706
- Flanzy, C. (2000) "Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos" Ediciones Mundi Prensa, Madrid España, 783 p.
- Kopp P (1998) Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur J Endocrinol* 138:619–620
- Madronich, S., R. L. McKenzie, L. O. Björn and M. M. Caldwell. (1988) "Changes Biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface," *J. Photochem. Photobiol., B. Biology*, vol. 46, pp. 5-19
- Pezet, R.; Perret, C.; Jean-Denis, J. B.; Tabacchi, R.; Gindro, K.; Vireto, O. (2003) R-Viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevines leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5488–5492.
- Taquichiri, M. and Paco, J (2008) "Determinación del índice de la Radiación Ultravioleta en la ciudad de Tarija" *Innovación*, vol. 1, pp. 28-29
- Taquichiri, M. et. al. (2014) "High levels of resveratrol in grapes cultivates at high altitude valleys in Bolivia" *Int. J. of Fruit Sc.* vol 14, pp.311-326