

EVOLUCION TEMPORAL DE ANTIOXIDANTES TOTALES EN VARIEDADES DE VITIS VINIFERA DEL VALLE CENTRAL DE TARIJA

Ayarde Mogro Ruth¹; Gutiérrez Barea Pastor²; Taquichiri Torrez Marco²;
Velasquez Adriana³; Villa Marcelo³; Acosta Nicole³
Peñarrieta J. Mauricio⁴; Cortez Pedro⁴; Quisberth Betty⁴; Alvarado J. Antonio⁴

¹Departamento de Química; ²Departamento de Física; ³Carrera de Ingeniería Química, Universidad Autónoma Juan Misael Saracho Tarija Bolivia

⁴Laboratorio de Química de los Alimentos, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz Bolivia

Dirección para correspondencia: Ruth Ayarde Mogro. Departamento de Química. Universidad Autónoma Juan Misael Saracho. Av. Victor Paz, Zona el Tejar, Campus Universitario, Tarija, Bolivia.
Correo electrónico:

RESUMEN

Se presentan los resultados de la evolución del contenido de antioxidantes totales (TAC) y polifenoles totales (TFC) en cuatro variedades de uva de vinificación vitis vinifera (cv. Cariñena; Moscatel de Alejandría; Syrah y Cabernet Sauvignon) mediante tres métodos analíticos: FRAP (Ferric Reduction Power), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) y DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

El contenido de TFC se realizó por el método de Folin Cicolteau. Las variedades de vid bajo estudio fueron sometidas a tres ambientes de atenuación de radiación solar ultravioleta: 60% de atenuación; 20% de atenuación y cero atenuación, valores que fueron extrapolados de las mediciones del piranómetro YES UV-B a través de las coberturas elegidas como atenuadores de la radiación solar ultravioleta (RUV-B).

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. Se realizaron colectas de bayas frescas en el lapso de cuatro semanas posteriores al envero y una en el momento de la cosecha.

Se realizó un diseño experimental de bloques elegidos al azar con tres repeticiones de 10 plantas para cada nivel de atenuación. Se evidencia una evolución de antioxidantes totales con una ligera disminución de los mismos en dos semanas anteriores a la fecha de cosecha.

Este patrón de comportamiento se puso en evidencia en cada uno de los tres métodos analíticos utilizados.

Palabras Clave: Antioxidantes, uvas de altura, vitis vinifera, radiación ultravioleta

ABSTRACT

The results of the evolution of the total antioxidant content (TAC) and total polyphenols (TFC) in four varieties of vitis vinifera (cv. Carignan, Muscat of Alexandria, Syrah and Cabernet Sauvignon) are presented. Three analytical methods: FRAP (Ferric Power Reduction), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) were used for the TAC.

The content of TFC was performed by the Folin Cicolteau method. Grape cultivars under study were subjected to three contrasting conditions of solar ultraviolet radiation: 60% attenuation, 20% attenuation and no attenuation.

The values of attenuation were extrapolated from measurements of a UV-B YES pyranometer under each the two coverages chosen for ultraviolet-b radiation (UVB). Grape plantations are in the same latitude and longitude, and on average, the same elevation above sea level.

Fresh berries were collected between in four weeks after veraison and the last collect at harvest. A block design with three randomly selected replicates of 10 plants for each level of attenuation was performed.

There is slight dismiss in the TAC content between the two weeks before harvest, such behavior has been observed in the three of the analytical methods used.

Keywords: Antioxidants, High altitude grapes, vitis vinifera, Ultraviolet radiation.

INTRODUCCIÓN

El sol emite radiación en un amplio rango de longitudes de onda dentro del espectro electromagnético, parte de esta radiación solar que llega a la superficie terrestre tiene un rol fundamental en muchos fenómenos biológicos. La radiación solar ultravioleta, especialmente la radiación ultravioleta B (RUV-B) tiene un impacto negativo tanto en el desarrollo y crecimiento de las plantas (1, 2), como en su morfología reproductiva (3). Esta radiación UV se divide en tres rangos en función de la energía asociada: UV-A (315-400 nm); UV-B (280-315 nm) y UV-C (280-100 nm) (4). La radiación UV-B es absorbida por la capa de ozono en la estratosfera y algunos gases de la atmósfera, sin embargo, una porción muy pequeña alcanza la superficie terrestre. Esta pequeña porción, (alrededor del 5% de la radiación total) 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 (5). El adelgazamiento de la capa de ozono y cambios en la meteorología de la estratosfera hacen que se reciban elevados dosis de RUV-B en la superficie terrestre (6) y muchos estudios indican que la radiación UV-B se incrementa con la elevación sobre el nivel del mar (7) haciéndose más notorio en los últimos 20 años. El ozono estratosférico protege a la biosfera de la RUV-B, sin embargo, al degradarse la capa de ozono, aumenta la radiación UV-B, incrementándose de esta manera su intensidad en la superficie terrestre.

Tarija se encuentra ubicada en la parte septentrional de Bolivia (21°, 64° W, 1887 msnm) y una fuente primaria de su economía se encuentra basada en la vitivinicultura dado que el 80% de las plantaciones de vid (*Vitis vinífera*) de Bolivia se encuentran precisamente en el departamento de Tarija. Debido a su ubicación geográfica y elevación sobre el nivel del mar. Tarija tiene muchos días con radiación UV-B elevada en verano y disminuida en invierno (8). Los últimos estudios indican un creciente interés sobre los efectos benéficos a la salud del consumo de frutas y vegetales así como de bebidas hechas a partir de infusiones y vino debido a su contenido de antioxidantes naturales que permiten eliminar los radicales libres y oxidantes en el cuerpo humano (9).

Los efectos de la radiación solar, especialmente de la radiación ultravioleta han sido muy poco estudiados en nuestro ámbito geográfico desconociéndose los mecanismos de defensa de la vid, ya que las variedades del valle central de Tarija, tienen varios años e inclusive décadas de adaptación al entorno natural y a los valores de radiación ultravioleta que reciben. Esta adaptación involucra cambios en la vitalidad de las plantas, cantidad de clorofila y su estado fotosintético

además de la producción de compuestos protectores entre los que se destacan los flavonoides (10).

Aunque la cáscara de la uva no representa más del 10 al 15 % del peso fresco de la baya, las paredes de las células son mucho más gruesas, constituyendo un obstáculo para la liberación de los antocianos, taninos, moléculas aromáticas y sus precursores glicosilados. Esta dificultad hace prever que cualquier técnica que incluya una maceración que incluya los hollejos de la uva va a enriquecer la presencia de estos compuestos en el vino (11).

MATERIALES Y METODOS

Localización y plantaciones de Vid: El estudio se desarrolló en las provincias Cercado y Avilés (21°32' S; 64°43' W, 1887 msnm.) del Departamento de Tarija, Bolivia durante la temporada agrícola 2010-2011 en cuatro viñedos: Centro Nacional Vitivinícola CENAVIT; (21°41' 14" S; 64°39' 25" W, 1738 msnm), cv. Cariñena y Moscatel de Alejandría; viñedos de Campos de Solana (21°32' 28" S; 64°36' 17" W, 1870 msnm) cv. Cabernet Sauvignon; Viñedos Kohlberg (21°35' 29" S; 64°36' 42" W, 1861 msnm), cv. Syrah y viñedos La Concepción (21°41' 54" S; 64°40' 18" W, 1733 msnm), cv. Cabernet Sauvignon.

Tratamiento UV-B: Para simular condiciones de diferentes niveles de atenuación de la radiación solar UV-B se seleccionaron 10 plantas de vid las cuales se cubrieron con malla antigranizo negra Arrigoni; similarmente se cubrieron otras 10 plantas con polietileno comercial de 250 µm y se indicaron otras 10 plantas sin ningún tipo de cubierta. De esta manera se clasificaron tres niveles de radiación UV-B: sin atenuación (A0); 20% de atenuación (A1) y 60% de atenuación (A2).

Los valores de atenuación fueron extrapolados de las mediciones relativas usando el piranómetro YES UB-1 de Yankee Environmental Systems, CA, USA. El tratamiento experimental fue instalado dos semanas después de la fecha del envero (15 de diciembre 2010) hasta la fecha de cosecha (1 de marzo 2011). Las coberturas de las mallas se adhirieron a las plantas y la cobertura con agrofilm tuvo una inclinación de 30° respecto de la vertical y separadas en promedio 30 cm de las hojas de la vid.

Se realizó un diseño experimental de bloques elegidos al azar con tres repeticiones, se tomaron 5 plantas al azar para muestreo durante la temporada y 5 plantas para micro vinificación en el laboratorio de enología del CENAVIT, Tarija.

Muestreo: En cada muestreo se realizaron colectas de 40 a 50 bayas al azar y guardadas en bolsas de plásticos con autocierre para ser almacenadas a -20° C hasta

el momento de análisis del contenido de antioxidantes totales en el Laboratorio de Enología del CENAVIT, en el que nuevamente las bayas fueron divididas en cuatro bloques para realizar las cuatro repeticiones. En contenedores aislados térmicamente, se enviaron otra cantidad similar de bayas al Laboratorio de Química de los alimentos en la Universidad Mayor de San Andrés para el análisis del contenido de resveratrol y observar su evolución en función de la madurez de las bayas.

Análisis de bayas: Para la determinación del contenido de antioxidantes totales en bayas se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS UNICO, United Products & Instruments Inc. NJ, USA en el laboratorio de enología del CENAVIT mediante tres métodos analíticos: FRAP (Ferric Reduction Power); ABTS (2,2-azinobis 3-ethylbenzithializoen-6-sulfonic) y DPPH (depyl-2-pierlhrazy). En los tres métodos se preparó una solución buffer con PH 5 de ácido acético y acetato de sodio 0,2 molar.

En cada caso el reactivo fue disuelto en 5 ml de agua destilada con 0,88 microlitos de permangato de potasio

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la determinación de antioxidantes totales se realizó un diseño experimental de bloques elegidos al azar con tres repeticiones y tres 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

y luego de dejar reposar 16 horas en la oscuridad, la solución fue disuelta con 70 ml de la solución buffer hasta encontrar una absorbancia de 0,70 a 734 nanómetros en el espectrofotómetro. Para la determinación de polifenoles totales se siguió el protocolo estándar de Folin Cicolteau con el reactivo del mismo nombre.

En los cuatro métodos analíticos de determinó una recta estándar de calibración para el cálculo correspondiente de la determinación del contenido de las muestras.

Mediciones de radiación ultravioleta solar RUV: Se realizaron mediciones de radiación solar ultravioleta utilizando dos Sensores de radiación UV-B Skye 240 de Skye Instruments Ltd. Powys, England y un piranómetro YES UV-B1 en la banda de 210 a 320 nanómetros de Yankee Environment Systems, Texas, USA.

El sensor patrón YES estuvo junto a las muestras sin atenuación solar y los dos sensores Skye se ubicaron debajo de la malla antigranizo y el agrofilm. Se realizó una intercomparación de los valores de intensidad de RUV a partir de la fecha de inicio del experimento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de Fenoles Totales (TPC): El método de determinación de fenoles totales indica un relativo elevado valor al inicio de la etapa de madurez de las bayas y al cabo de la maduración se observa una ligera disminución en el valor del mismo, las fechas de cosecha y muestreo para cada análisis se indican en la tabla 1. Se observa un comportamiento elevado del contenido de fenoles totales en el cv sometido al tratamiento de 20% de atenuación.

Variedad	UV trat.	Fecha de muestreo/análisis			
		09-Feb	22-Feb	04-Mar	22-Mar
Ca	A0	1,06±0,02	0,66±0,01	0,67±0,01	1,17±0,01
Ca	A1	1,58±0,10	1,68±0,02	0,72±0,01	1,03±0,02
Ca	A2	0,8±0,02	0,61±0,01	0,7±0,01	1,06±0,01
MA	A0	0,3±0,01	0,26±0,01	0,22±0,01	0,3±0,01
MA	A1	0,21±0,01	0,25±0,02	0,25±0,02	0,3±0,01
MA	A2	0,19±0,01	0,22±0,01	0,23±0,01	0,29±0,01
Sy	A0	0,99±0,03	0,92±0,01	0,76±0,01	0,81±0,01
Sy	A1	1,16±0,04	1,09±0,01	0,67±0,01	1,07±0,01
Sy	A2	0,7±0,01	0,63±0,01	0,58±0,01	0,88±0,02
CS	A0	1,56±0,04	1,13±0,03	0,99±0,01	1,43±0,01
CS	A1	1,59±0,04	1,31±0,02	1,28±0,02	1,36±0,02
CS	A2	1,17±0,09	1,06±0,04	1,14±0,02	1,31±0,01

Tabla 1. Evolución temporal del contenido de TPC para bayas frescas para cuatro variedades viníferas y cuatro colectas. El TPC fue medido de acuerdo al protocolo Folin Cicolteau (Ca: Cariñena; MA: Moscatel; Sy Syrah; CS Cabernet Sauvignon) A0= cero atenuación UV; A1= 20% de atenuación; A2= 60% de atenuación

En la Figura 1 se muestra una comparación del contenido de TPC entre dos cultivares: una tinta (cv. Cabernet Sauvignon y cv. Moscatel de Alejandría). La diferencia

relativa entre los valores de las mediciones en promedio es mayor al 450 % entre ambos cultivares, valor promedio y que se mantiene en todo el proceso de análisis.

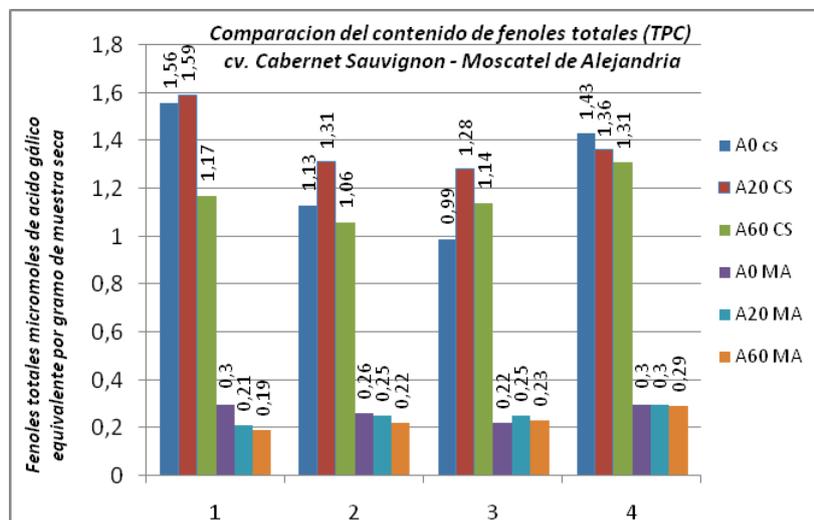


Figura 1: Comparación del TPC entre los cv. Cabernet Sauvignon – Moscatel de Alejandría para cada fecha de muestreo: (1): 9-feb-2011; (2): 22-feb-2011;(3): 4-mar-2011; (4): 22-mar-2011

Análisis de Antioxidantes Totales (TAC): Los tres métodos analíticos de FRAP, ABTS, DPPH muestra un comportamiento del contenido de TAC (similar al comportamiento de TPC) en función de la etapa de maduración: valores

bajos al finalizar la pinta, alcanzando su valor máximo antes de la fecha de la cosecha. Los valores se indican en las tablas 2 a 4.

Variedad	UV trat.	Fecha de muestreo/análisis			
		09-Feb	22-Feb	04-Mar	22-Mar
Ca	A0	8,34±0,30	5,86±0,07	5,28±0,41	8,67±0,02
Ca	A1	9,58±0,17	7,06±0,07	6,30±0,27	8,26±0,07
Ca	A2	6,51±0,23	5,61±0,04	6,27±0,12	8,05±0,04
MA	A0	0,95±0,05	0,68±0,01	0,63±0,03	1,08±0,01
MA	A1	0,82±0,05	0,80±0,01	0,78±0,03	1,16±0,01
MA	A2	0,55±0,02	0,66±0,01	0,92±0,03	1,07±0,01
Sy	A0	6,41±0,28	5,33±0,04	5,25±0,07	7,18±0,05
Sy	A1	4,41±0,46	5,46±0,03	5,41±0,05	7,17±0,03
Sy	A2	4,14±0,11	2,51±0,04	4,39±0,03	6,51±0,04
CS	A0	9,02±0,18	7,01±0,06	6,94±0,12	8,62±0,07
CS	A1	9,43±0,33	7,90±0,04	7,84±0,12	8,35±0,05
CS	A2	8,04±0,34	5,42±0,04	7,28±0,11	9,45±0,11

Tabla 2. Evolución temporal del contenido de Antioxidantes totales TAC método FRAP (Ca: Cariñena; MA: Moscatel; Sy Syrah; CS Cabernet Sauvignon)

Variedad	UV trat.	Fecha de muestreo/análisis			
		09-Feb	22-Feb	04-Mar	22-Mar
Ca	A0	4,40±0,47	8,76±1,00	6,64±0,54	18,11±1,09
Ca	A1	14,48±1,31	13,85±1,43	8,80±0,62	17,37±0,89
Ca	A2	10,26±0,90	8,78±0,39	9,44±0,70	18,34±0,86
MA	A0	1,41±0,17	1,18±0,05	1,12±0,19	2,74±0,22
MA	A1	1,41±0,14	1,49±0,27	1,20±0,13	2,54±0,22
MA	A2	1,09±0,13	1,39±0,08	0,84±0,14	2,67±0,29
Sy	A0	15,54±0,54	11,04±0,78	11,04±0,71	19,02±0,94
Sy	A1	15,48±0,48	8,78±0,85	10,15±1,16	16,60±0,74
Sy	A2	13,04±0,78	11,86±0,80	12,30±0,48	22,80±1,58
CS	A0	15,54±0,91	11,01±0,78	11,04±0,71	19,02±0,94
CS	A1	15,48±5,47	8,78±0,85	10,15±1,16	16,60±0,74
CS	A2	13,04±0,78	11,86±0,80	12,30±0,48	22,80±1,58

Tabla 3. Evolución temporal del contenido de Antioxidantes totales TAC método ABTS (Ca: Cariñena; MA: Moscatel; Sy Syrah; CS Cabernet Sauvignon)

Variedad	UV trat.	Fecha de muestreo/análisis			
		09-Feb	22-Feb	04-Mar	22-Mar
Ca	A0	2,44±0,42	4,31±0,81	6,54±0,11	11,84±0,85
Ca	A1	8,07±0,70	9,82±1,81	8,62±0,33	10,04±0,98
Ca	A2	5,36±0,05	6,14±0,73	8,35±0,42	11,54±0,66
MA	A0	0,96±0,07	0,91±0,01	2,55±0,24	2,10±0,39
MA	A1	0,77±0,05	1,28±0,48	2,72±0,22	1,84±0,22
MA	A2	0,69±0,06	1,31±0,46	2,13±0,31	2,25±0,08
Sy	A0	4,86±0,60	6,45±1,33	7,26±0,51	11,09±0,69
Sy	A1	7,40±0,70	5,63±1,32	7,36±0,38	8,66±0,91
Sy	A2	4,59±0,74	4,97±0,40	6,46±0,25	8,89±0,71
CS	A0	7,51±0,59	6,98±1,98	9,46±0,41	10,33±0,74
CS	A1	8,49±0,62	2,81±1,37	11,83±1,14	9,67±0,74
CS	A2	6,91±0,42	5,20±2,06	9,76±0,69	14,06±1,22

Tabla 4. Evolución temporal del contenido de Antioxidantes totales TAC método DPPH (Ca: Cariñena; MA: Moscatel; Sy Syrah; CS Cabernet Sauvignon)

En las gráficas 2 al 5 se muestran los valores representados de las tablas 2 al 5 para el cv. Cariñena. Se puede observar que en la mayoría de los casos la presencia de la malla tiene un efecto importante en la presencia de antioxidantes totales según los tres métodos.

La tabla 5 muestra una comparación de los tres métodos analíticos para el análisis en función de las fechas de colecta. Se puede observar que los tres métodos analíticos muestran un comportamiento similar en valores del TAC.

Variedad	UV Trat	FRAP				ABTS				DPPH			
		09-Feb	22-Feb	04-Mar	22-Mar	09-Feb	22-Feb	04-Mar	22-Mar	09-Feb	22-Feb	04-Mar	22-Mar
Ca	A0	8,34	5,86	5,28	8,67	4,4	8,8	6,6	18,1	2,44	4,31	6,54	11,84
Ca	A1	9,58	7,06	6,30	8,26	14,5	13,8	8,8	17,4	8,07	9,82	8,62	10,04
Ca	A2	6,51	5,61	6,27	8,05	10,3	8,8	9,4	18,3	5,36	6,14	8,35	11,54
MA	A0	0,95	0,68	0,63	1,08	1,4	1,2	1,1	2,7	0,96	0,91	2,55	2,10
MA	A1	0,82	0,80	0,78	1,16	1,4	1,5	1,2	2,5	0,77	1,28	2,72	1,84
MA	A2	0,55	0,66	0,92	1,07	1,1	1,4	0,8	2,7	0,69	1,31	2,13	2,25
Sy	A0	6,41	5,33	5,25	7,18	10,9	9,9	8,9	16,5	4,86	6,45	7,26	11,09
Sy	A1	8,41	5,46	5,41	7,17	12,5	10,4	8,5	15,6	7,40	5,63	7,36	8,66
Sy	A2	4,14	2,51	4,39	6,51	7,5	8,4	5,8	13,7	4,59	4,97	6,46	8,89
CS	A0	9,52	7,01	6,34	8,62	15,5	11,0	11,0	19,0	7,51	6,98	9,46	10,33
CS	A1	9,93	7,90	7,84	8,35	15,5	8,8	10,1	16,6	8,49	2,81	11,83	9,67
CS	A2	8,02	5,42	7,28	9,45	13,0	11,9	12,3	22,8	6,91	5,20	9,76	14,06

Tabla 5. Evolución temporal del contenido de Antioxidantes totales TAC. Comparación de los tres métodos: FRAP, ABTS y DPPH (Ca: Cariñena; MA: Moscatel; Sy Syrah; CS Cabernet Sauvignon)

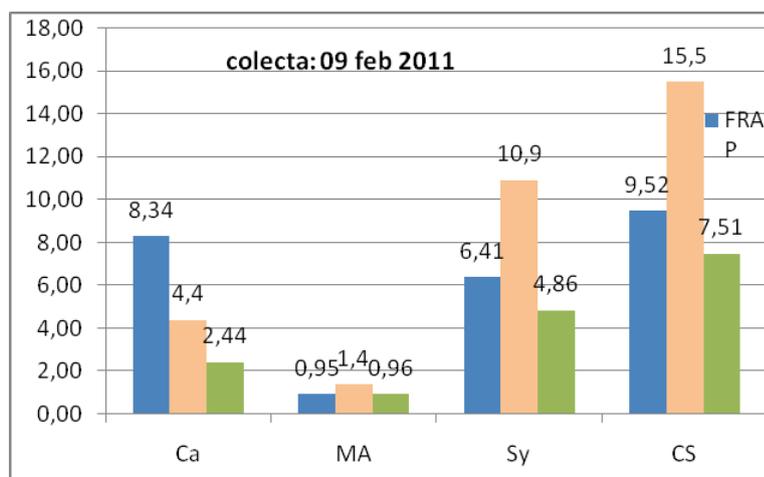


Figura 3: Inter comparación de los tres métodos analíticos fecha de colecta. 9-feb-2011

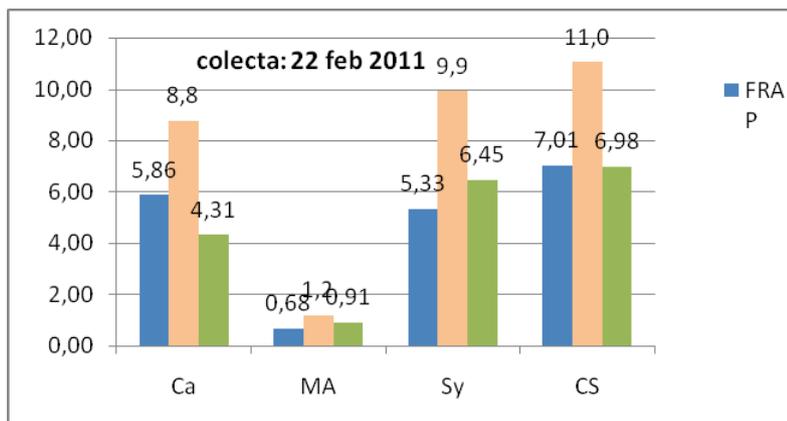


Figura 4: Inter comparación de los tres métodos analíticos fecha de colecta. 22-feb-2011

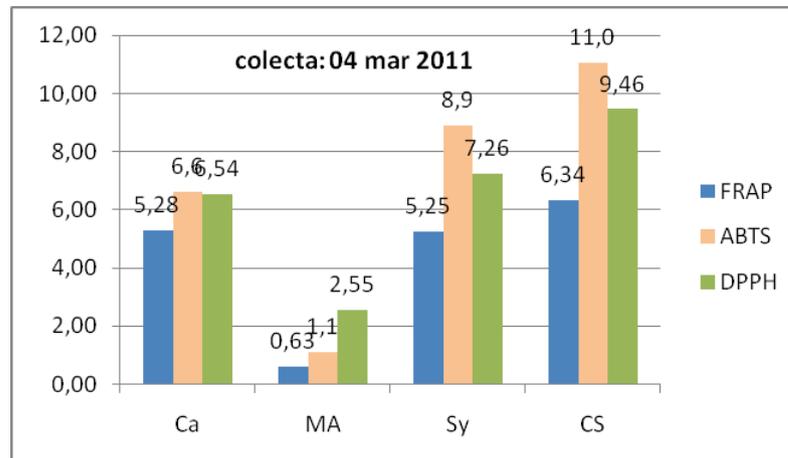


Figura 5: Inter comparación de los tres métodos analíticos fecha de colecta. 04-mar-2011

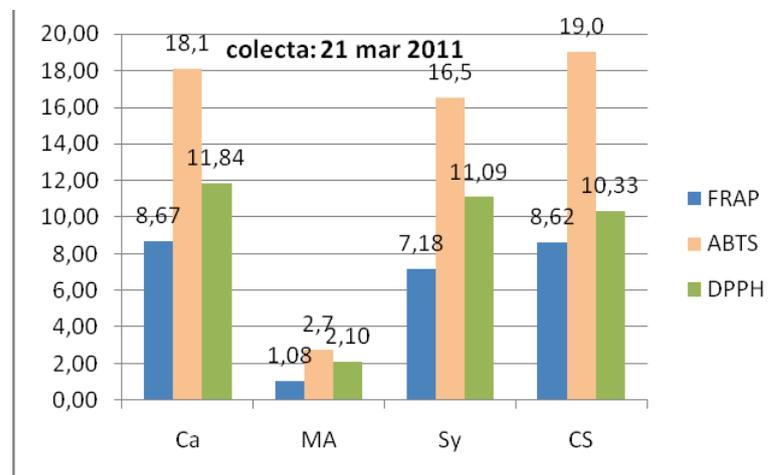


Figura 6: Inter comparación de los tres métodos analíticos fecha de colecta. 21-mar-2011

El efecto evidente de la radiación UV-B se muestra también en la figura 25 en donde se observa un cambio de tonalidad y aparente daño en las bayas sometidas a 0% de atenuación y a 60% de atenuación. Similarmente,

los vinos obtenidos a partir de bayas sometidas a los tres diferentes niveles de radiación UV-B tienen diferente tonalidad según se muestra en la figura 7.



Figura 7: Daño aparente de la RUV-B en Moscatel de Alejandría.

A la izquierda se tienen bayas de Moscatel de Alejandría sin atenuación UV-B y a la derecha bayas con 60% de atenuación UV-B usando malla antigranizo.

CONCLUSIONES

En todos los casos, se puede observar que el contenido de antioxidantes totales en las cuatro etapas del muestreo correspondiente muestra un comportamiento uniforme al terminar la temporada ya que luego de la etapa de maduración, los valores de los tres tratamientos tienden a un valor común. Los resultados de los tres métodos analíticos muestran un incremento del contenido de TAC mayor en el tratamiento bajo malla antigranizo, lo que permite asegurar que el efecto de la malla antigranizo en las plantaciones del Valle Central de Tarija tendría un efecto adicional al incrementar el contenido de antioxidantes totales. Los valores de correlación de los tres métodos indican una confiabilidad entre dos de ellos del 86%: FRAP y DPPH.

BIBLIOGRAFIA

- Caldwell M. M. Teramura A. H., Tevini M. 1989. The Changing Solar Ultraviolet Climate and Ecological Consequences for Higher Plants. *Trends Ecol. Evol.* Vol 4, pp 363-367.
- Parisi, A. V., 2002. Wong, J.C.F., Randall, C. 1998 Simultaneous Assessment of Photosynthetically Active and Ultraviolet Solar Radiation", *Agric. For. Meteorol.* Vol. 92, pp. 97 – 103.
- Jansen, M.A.K., "Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses", *Physiol. Plant.* Vol. 116, pp. 423 - 429,.
- 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.
- Brosché, M. and Å. Strid. 2003. Molecular Events Following Perception of Ultraviolet-B Radiation by Plants *Physiol. Plant.* vol 117, pp. 1-10.
- Krzscin, J. W. 2000. Impact of the Ozone Profile on the Surface UV Radiation: Analyses of the Umkehr and UV measurements at Belsk (52°N,21°E), Poland," *J. Geophys. Res.*, vol 105 pp. 5009-2015, 2000
- Zaratti F., Forno R. N., Garcia Fuentes J. and M. F. Andrade. 2003. Erythemally Weighted UV Variations at Two High-altitude Locations, *J. Geophys. Res.*, vol. 108 (D9), 4263, doi:10.1029/2001JD000918, 2003.
- Taquichiri, M. y Paco J. 2008. Determinación del índice de la Radiación Ultravioleta en la ciudad de Tarija" *Innovación*, vol. 1, pp. 28-29.
- 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
- Wang S-P and Huang K-J., 2004. Determination of Flavonoids by High-performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis" *Journal of Chromatography A* 1032, 273-279.
- Flanzy, C. 2000. *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*" Ediciones Mundi Prensa, Madrid España, 783 p.