

## RESOLUCIÓN OIV-OENO 675A-2022

### MONOGRAFÍAS ESPECÍFICAS SOBRE LAS PROCIANIDINAS/PRODELFINIDINAS

LA ASAMBLEA GENERAL,

VISTO el artículo 2, párrafo 2 iv del Acuerdo del 3 de abril de 2001 por el que se crea la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

CONSIDERANDO los trabajos del Grupo de expertos “Especificación de los Productos Enológicos”,

CONSIDERANDO la resolución OIV-OENO 624-2022, “Actualización de la monografía sobre los taninos enológicos”, que describe una monografía general,

CONSIDERANDO la necesidad de elaborar monografías específicas sobre cada familia de taninos,

DECIDE, a propuesta de la Comisión II “Enología”, añadir la monografía COEI-1-PROCYA al Codex Enológico Internacional:

### TANINOS ENOLÓGICOS

#### Monografía específica sobre los taninos enológicos que contienen procianidinas/prodelfinidinas

Las procianidinas/prodelfinidinas son una subclase) de taninos condensados (o proantocianidínicos). En esta subclase se incluyen los taninos de uvas, hollejos y pepitas de *Vitis vinifera*.

#### 1. Método de determinación de la pertenencia a las subclases

##### 1.1. Caracterización por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

###### 1.1.1. Fundamento

Este método permite comprobar la presencia de componentes característicos de los taninos condensados de la subclase de las procianidinas/prodelfinidinas y determinar su concentración total. Se aplica a preparados de taninos enológicos etiquetados como puros y que, por tanto, no contienen taninos de pequeña masa molecular de

subclases distintas.

### 1.1.2. Reactivos, material y equipo

#### 1.1.2.1. Reactivos

(+)-catequina n.º CAS 154-23-4

Agua ultrafiltrada (resistividad:  $18,3 \mu\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ )

Agua (calidad HPLC)

Metanol (calidad HPLC)

Ácido fórmico (calidad HPLC)

#### 1.1.2.2. Material

Matraz de vidrio borosilicatado de 100 mL

Filtros de celulosa con un tamaño de poro de  $0,45 \mu\text{m}$

Jeringa de plástico de 1 mL

#### 1.1.2.3. Equipo

Balanza técnica con una resolución de 0,01 g

Balanza analítica con una resolución de 0,1 mg

Material volumétrico de vidrio de clase A

Sistema cromatográfico con espectrómetro de masas compuesto por:

- bomba de gradiente binaria o cuaternaria,
- inyector con bucle de  $10 \mu\text{L}$ ,
- detector espectrofotométrico a una longitud de onda fija de 280 nm,
- columna Eclipse Plus C-18 (por ejemplo) de  $2,1 \cdot 100 \text{ mm}$ , con un tamaño de partícula de  $1,8 \mu\text{m}$ ,
- fuente de ionización ESI-SIM (ionización por electronebulización y monitorización selectiva de iones),
- detector de espectrometría de masas: analizador de cuadrupolo y de tiempo de vuelo (Q-TOF).

### 1.1.3. Preparación de las muestras y los patrones

Muestras: pesar aproximadamente 0,5 g de taninos enológicos en la balanza analítica y anotar el peso. Disolver los taninos enológicos en 100 mL de agua ultrafiltrada en un matraz de vidrio borosilicatado de 100 mL y mezclar bien.

Preparación de las soluciones patrón: preparar una solución con 10 mg de (+)-catequina y 50 mL de agua ultrafiltrada, lo que corresponde a una concentración de 200 mg/L. Diluir en agua ultrafiltrada para obtener concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L.

Disolvente A: agua de calidad HPLC con un 0,1 % de ácido fórmico.

Disolvente B: metanol con un 0,1 % de ácido fórmico.

#### 1.1.4. Procedimiento

Filtrar la solución de ensayo y las soluciones patrón con filtros de 0,45 µm (tamaño de poro) y analizar por cromatografía en las siguientes condiciones:

Volumen inyectado: 10 µL de la solución de ensayo o solución patrón de (+)-catequina

Detección a 280 nm

Composición del gradiente de elución (tiempo, % de disolvente A):

0 min, 99,0 %; 0,5 min, 94,0 %; 20 min, 50,0 %; 25 min, 0,0 %; 32 min, 94,0 %; y 10 min para el equilibrio

Flujo: 0,3 mL/min

Detección y cuantificación de los componentes característicos de los taninos condensados del subgrupo (o subclase) de las procianidinas/prodelfinidinas [(+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, epigalocatequina, 3-O-galato de (-)-epicatequina, 3-O-galato de (-)-epigalocatequina, dímeros B1, B2, B3 y B4, B2-3-O-galato, trímeros] mediante análisis ESI-SIM y detección Q-TOF, por ejemplo.

*Tabla 1. Fórmula química y masa de las diferentes procianidinas/prodelfinidinas, a modo de ejemplo*

| Compuesto                      | Fórmula química      | m/z   |
|--------------------------------|----------------------|-------|
| (+)-catequina                  | $C_{15}H_{14}O_6$    | 290,1 |
| (-)-epicatequina               | $C_{15}H_{14}O_6$    | 290,1 |
| 3-O-galato de (-)-epicatequina | $C_{22}H_{18}O_{10}$ | 442,1 |
| Dímero B1                      | $C_{50}H_{26}O_{12}$ | 578,1 |

|               |                      |       |
|---------------|----------------------|-------|
| Dímero B2     | $C_{50}H_{26}O_{12}$ | 578,1 |
| Dímero B3     | $C_{50}H_{26}O_{12}$ | 578,1 |
| Dímero B4     | $C_{50}H_{26}O_{12}$ | 578,1 |
| B2-3-O-galato | $C_{37}H_{30}O_{16}$ | 730,1 |
| Trímeros      | $C_{45}H_{38}O_{18}$ | 866,2 |

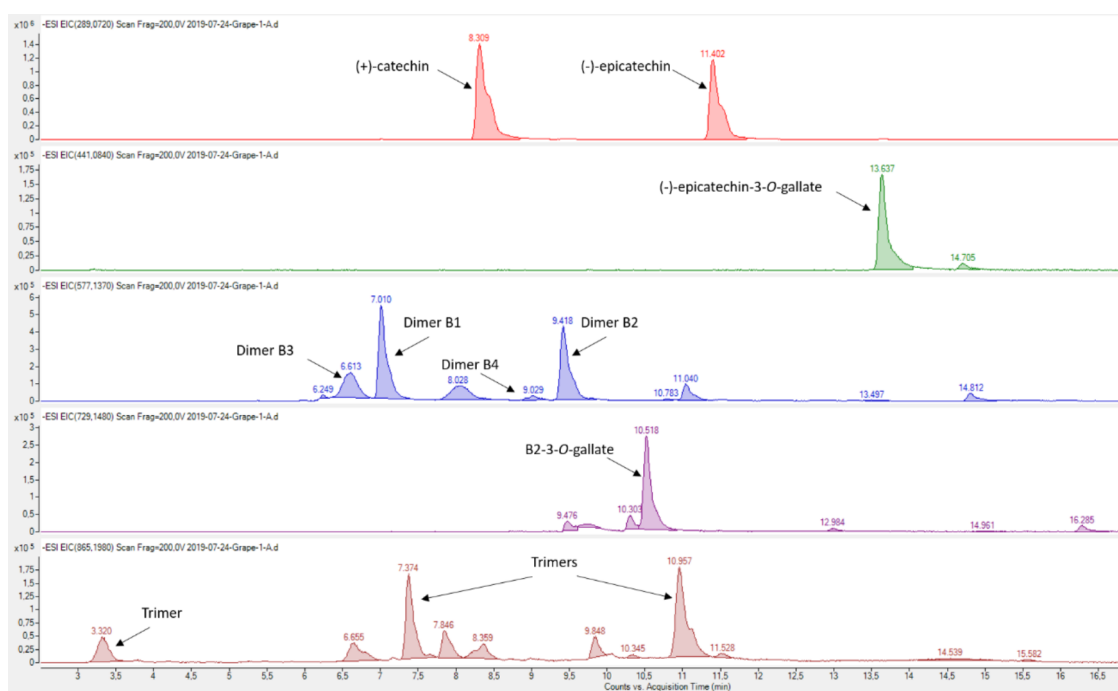


Figura 1. Ejemplo de análisis de procianidinas/prodelfinidinas en los modos ESI y SIM

## 1.2. Conclusión

Un tanino enológico se considera como procianidina/prodelfinidina cuando:

- el contenido de polifenoles totales supera el 65 % (método gravimétrico, anexo 1 de la monografía general OIV-OENO 624-2022),

- el contenido de procianidinas/prodelfinidinas, determinado por HPLC, supera los 120 mg de equivalentes de (+)-catequina por gramo de taninos enológicos.

## 2. Métodos de determinación de las propiedades y funciones

Los siguientes métodos y criterios de conformidad se aplican solo cuando la propiedad/función figura en la etiqueta del preparado de taninos.

### 2.1. Capacidad antioxidante

#### 2.1.1. Fundamento

Determinación de la capacidad de las procianidinas/prodelfinidinas para contribuir a la protección del mosto y del vino frente a la oxidación.

#### 2.1.2. Productos

##### 2.1.2.1. Capacidad antioxidante

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo): PM = 394,32

Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico): PM = 250,29

Metanol al 99,9 % vol.

Lector de microplacas de 96 pocillos (FLUOstar Omega - BMG Labtech, por ejemplo)

##### 2.1.2.2. Consumo directo de oxígeno (OCR)

Etanol al 96 % vol., N.º CAS 64-17-5

Ácido tartárico: PM = 150,09, N.º CAS 87-69-4

Cloruro de hierro(III) hexahidratado: PM = 270,30, N.º CAS 7705-08-0

Sulfato de cobre(II) pentahidratado: PM = 249,68, N.º CAS 7758-98-7

Botellas de vidrio transparentes con sensor, 0,75 mL de capacidad

Oxímetro NomaSens, por ejemplo

#### 2.1.3. Procedimiento

##### 2.1.3.1. Capacidad antioxidante (ensayo de DPPH)

Solución de 0,15 g/L de tanino enológico: disolver 37,5 mg de taninos enológicos en 500 mL de solución de vino modelo (agua destilada, un 12 % vol. de etanol, 4 g/L de

ácido tartárico y pH ajustado a 3,5). Puede ser necesario diluir la solución de tanino enológico si el valor de la absorbancia es superior a 1 (dado el caso, incluir la dilución en el cálculo).

Solución 1 mM de Trolox: disolver 125 mg de Trolox en 500 mL de solución de vino modelo (agua destilada, un 12 % de etanol, 4 g/L de ácido tartárico y pH ajustado a 3,5).

Curva de calibración: disolver 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 y 0,1 mL de la solución 1 mM de Trolox en 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 0,9 mL de solución de vino modelo. Estas cantidades corresponden a concentraciones finales de 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 y 0,1 mM de Trolox, respectivamente.

Solución  $6 \cdot 10^{-5}$  M de DPPH: disolver 2,36 mg de DPPH en 100 mL de metanol. Preparar la solución justo antes de su utilización.

#### 2.1.3.2. Consumo directo de oxígeno (OCR)

Solución de 1 g/L de tanino enológico: disolver 0,75 g de taninos enológicos en 750 mL de solución de vino modelo.

Solución de vino modelo: disolver 4 g de ácido tartárico, 2,25 mg de cloruro de hierro(III) hexahidratado y 0,225 mg de sulfato de cobre(II) pentahidratado en 90 mL de etanol y 660 mL de agua destilada. El pH debe ajustarse a 3,5.

#### 2.1.4. Ensayos

##### 2.1.4.1. Capacidad antioxidante

Medir a 515 nm el blanco de reactivo (RB), que contiene únicamente el reactivo DPPH, introduciendo 190  $\mu$ L de la solución de DPPH (1.3.1) en todos los pocillos de la placa. A continuación, añadir 10  $\mu$ L de la solución de tanino enológico (muestras), agua destilada (blanco) o la solución de Trolox para la curva (patrones) en los pocillos y analizar (MS) a 515 nm pasados 30 min.

Véase la figura 2 para saber cómo llenar la placa.

Para calcular la capacidad antioxidante, se utiliza la siguiente fórmula:

$$1) BR - MS = x$$

$$2) \text{capacidad antioxidante (mg eq. Trolox por g de taninos)} = \frac{250,29 \text{ (mg)}}{0,15 \text{ (g)}} \times \frac{x-b}{a}$$

donde “a” y “b” corresponden, respectivamente, a la pendiente y la constante de la curva de calibración de Trolox: Absorbancia = f ([Trolox])  $\square$  Absorbancia = ax + b

En todos los casos, las procianidinas/prodelfinidinas deben presentar capacidad antioxidante, como mínimo, 500 mg  $\pm$  50 mg de equivalentes de Trolox por gramo de taninos (extracto comercial).

|   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | T 0.1 | T 0.1 | T 0.2 | T 0.2 | T 0.4 | T 0.4 | T 0.6 | T 0.6 | T 0.8 | T 0.8 | T 1   | T 1   |
| B | T 0.1 | T 0.1 | T 0.2 | T 0.2 | T 0.4 | T 0.4 | T 0.6 | T 0.6 | T 0.8 | T 0.8 | T 1   | T 1   |
| C | Blank | OT 1  | OT 2  | OT 3  | OT 4  | OT 5  | OT 6  | OT 7  | OT 8  | OT 9  | OT 10 | OT 11 |
| D | Blank | OT 1  | OT 2  | OT 3  | OT 4  | OT 5  | OT 6  | OT 7  | OT 8  | OT 9  | OT 10 | OT 11 |
| E | Blank | OT 1  | OT 2  | OT 3  | OT 4  | OT 5  | OT 6  | OT 7  | OT 8  | OT 9  | OT 10 | OT 11 |
| F | Blank | OT 1  | OT 2  | OT 3  | OT 4  | OT 5  | OT 6  | OT 7  | OT 8  | OT 9  | OT 10 | OT 11 |
| G | Blank | OT 1  | OT 2  | OT 3  | OT 4  | OT 5  | OT 6  | OT 7  | OT 8  | OT 9  | OT 10 | OT 11 |
| H | Blank | OT 1  | OT 2  | OT 3  | OT 4  | OT 5  | OT 6  | OT 7  | OT 8  | OT 9  | OT 10 | OT 11 |

T = Trolox                      OT = Oenological Tannins

*Figura 2. Ejemplo de placa de 96 pocillos*

#### 2.1.4.2. Consumo directo de oxígeno (OCR)

Saturar la solución de vino modelo con 8 mg/L de oxígeno por burbujeo de aire durante 10 min a 20-25°C. A continuación, añadir el tanino enológico a la solución de vino modelo en las botellas llenas con 0,75 mL. Cerrar las botellas herméticamente y agitarlas para homogeneizar por completo.

1. Determinar el oxígeno consumido cada dos días, comenzando al cabo de 1 hora del llenado de las botellas.
2. Para determinar la tasa de consumo de oxígeno, seguir el procedimiento que se muestra en la figura 2:
  - representar el consumo de oxígeno frente al tiempo,
  - representar la inversa del oxígeno consumido frente a la inversa del tiempo,
  - la tasa de consumo de oxígeno es la inversa del coeficiente de la pendiente: OCR  $t_0$  mg de O<sub>2</sub> por L consumido por día y por g de taninos = 1/A, donde A es el coeficiente de la pendiente

En todos los casos, las procianidinas/prodelfinidinas deben tener capacidad de consumo directo de oxígeno, como mínimo, 0,10 mg  $\pm$  0,05 mg de O<sub>2</sub> por litro, por día y por gramo de taninos (extracto comercial).

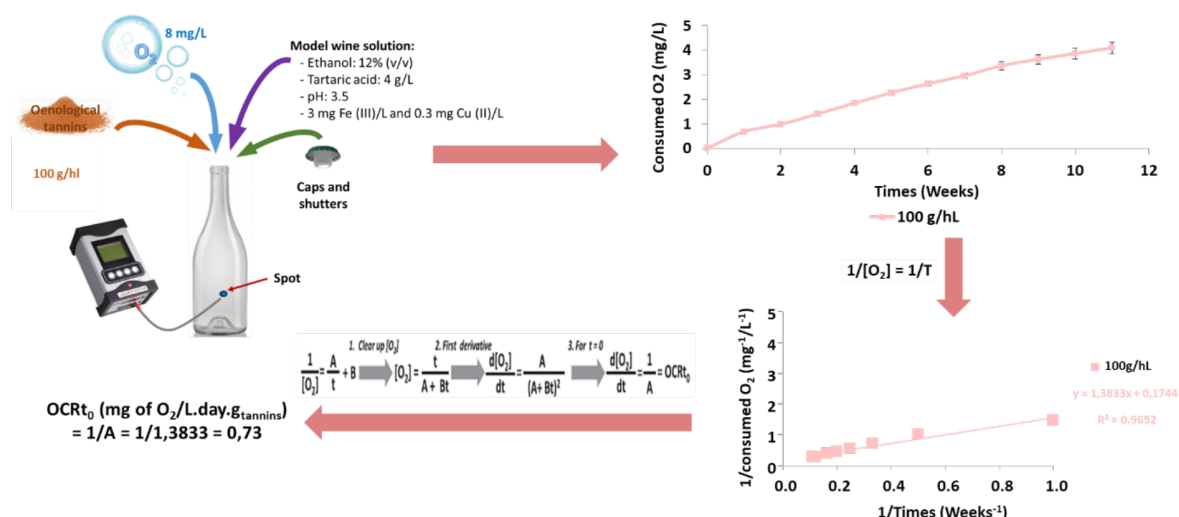


Figura 3. Procedimiento de determinación de la tasa de consumo de oxígeno

### 2.1.4.3. Capacidad antioxidásica

#### 2.1.4.3.1. Fundamento

Determinación de la capacidad antioxidásica de las procianidinas/prodelfinidinas para contribuir a la protección antioxidásica de los compuestos del vino y el mosto frente a la actividad lacasa.

#### 2.1.4.3.2. Productos

Etanol al 96 % vol., N.º CAS 64-17-5

Ácido tartárico: PM = 150,09, N.º CAS 87-69-4

Acetato de sodio: PM = 82,03, N.º CAS 6131-90-4

Siringaldazina (azina del 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído): PM = 360,36, N.º CAS: 14414-32-5 Polivinilpolipirrolidona (PVPP), N.º CAS 25249-54-1

Mosto botritizado con actividad lacasa

Agua destilada (calidad HPLC)

#### 2.1.4.3.3. Procedimiento

Solución de 2 g/L de tanino enológico: disolver 200 mg de taninos enológicos en 100 mL de solución de vino modelo (agua destilada, un 12 % vol. de etanol, 4 g/L de ácido tartárico y pH ajustado a 3,5).

Solución amortiguadora (8,2 g/L): disolver 410 mg de acetato de sodio en 50 mL de agua destilada.

Solución de siringaldazina (0,06 g/L): disolver 30 mg de siringaldazina en 500 mL de etanol.

#### 2.1.4.4. Ensayos

1. Añadir 4 mL de mosto botritizado a 1 mL de solución de tanino enológico en un tubo, que corresponderá a la muestra.
2. Añadir 4 mL de mosto botritizado a 1 mL de solución de vino modelo en un tubo, que corresponderá al testigo.
3. Después de 4 min (exactamente), añadir 0,8 g de PVPP en ambos tubos (muestra y testigo), agitar y centrifugar durante 10 min a 8500 rpm.
4. Tomar 1 mL del sobrenadante (de la muestra y el testigo) y mezclar con 1,4 mL de solución amortiguadora y 0,6 mL de solución de siringaldazina. Introducir la mezcla en una cubeta de plástico para espectrofotometría (de paso óptico de 10 mm).
5. Medir la absorbancia a 530 nm cada minuto durante 5 min (incluido el minuto 0).
6. Determinar la actividad lacasa y la actividad lacasa residual con las siguientes ecuaciones y la figura 3:

$$\text{Actividad lacasa} = 46,15 \times \Delta A \mu\text{mol L}^{-1}\text{min}^{-1} = 46,15 \times \Delta A \text{ UL}$$

$$\% \text{ de actividad residual} = (\text{actividad lacasa}_{\text{muestra}} / \text{actividad lacasa}_{\text{testigo}}) \times 100$$

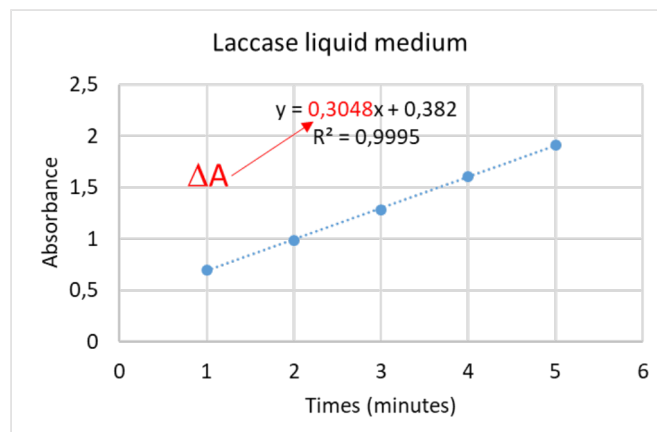


Figura 4. Ejemplo de determinación de  $\Delta A$

En todos los casos, las procianidinas/prodelfinidinas deben tener capacidad antioxidásica y, en concreto, deben poder reducir la actividad lacasa residual en, al menos, un 50 %. Este valor es importante en el caso de los mostos y vinos con un contenido inferior a 5 UL (unidades de lacasa).

## 2.1.5. Estabilización del color

### 2.1.5.1. Fundamento

Determinación de las propiedades estabilizadoras del color de las procianidinas/prodelfinidinas para favorecer la expresión, estabilización y conservación del color en el mosto y el vino tintos.

### 2.1.5.2. Productos

Etanol al 96 % vol., N.º CAS 64-17-5

Ácido tartárico: PM = 150,09, N.º CAS 87-69-4

3-O-glucósido de malvidina: PM = 528,87, N.º CAS 18470-06-9

### 2.1.5.3. Procedimiento

Solución de 0,8 g/L de taninos enológicos: disolver 80 mg de taninos enológicos en 100 mL de solución de vino modelo (agua destilada, un 12 % vol. de etanol, 4 g/L de ácido tartárico y pH ajustado a 3,5).

Solución de 0,1 g/L de 3-O-glucósido de malvidina: disolver 10 mg de 3-O-glucósido

de malvidina en 100 mL de solución de vino modelo (agua destilada un 12 % vol. de etanol, 4 g/L de ácido tartárico y pH ajustado a 3,5).

#### 2.1.5.4. Ensayos

1. Introducir 0,75 mL de solución de tanino enológico y 0,75 mL de solución de vino modelo en un tubo cónico de 2 mL con tapón (en adelante, “tubo”), y conservarlo en la oscuridad a temperatura ambiente. Este tubo se denominará “T0”.
2. Introducir 0,75 mL de solución de 3-O-glucósido de malvidina y 0,75 mL de solución de vino modelo en un tubo, y conservarlo en la oscuridad a temperatura ambiente. Este tubo se denominará “M”.
3. Introducir 0,75 mL de solución de tanino enológico y 0,75 mL de solución de 3-O-glucósido de malvidina en un tubo, y conservarlo en la oscuridad a temperatura ambiente. Este tubo se denominará “TM”.
4. Después de 7 días, medir la absorbancia de los tres tubos (TM, T0 y M) a 450, 520, 570 y 630 nm.
5. Restar la absorbancia de TM a la absorbancia de T0 para obtener la absorbancia en función de la absorbancia de los taninos enológicos empleados.

$$A(T_M - A(T_0)) = A(T)$$

6. Determinar las coordenadas CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) correspondientes a la solución de tanino con 3-O-glucósido de malvidina (T) y la solución de 3-O-glucósido de malvidina (M) con el *software* gratuito MSCV (<https://www.unirioja.es/color/descargas.shtml>) u otro equivalente.

Para determinar el índice de copigmentación, se utilizan las siguientes fórmulas:

$$1) \Delta E_{ab,TS} = \sqrt{(L^*_T - L^*_W)^2 + (a^*_T - a^*_W)^2 + (b^*_T - b^*_W)^2}$$

$$2) \Delta E_{ab,CS} = \sqrt{(L^*_M - L^*_W)^2 + (a^*_M - a^*_W)^2 + (b^*_M - b^*_W)^2}$$

$$3) \text{ Copigmentation Index (\%)} = 100 \times \frac{\Delta E_{ab,TS} - \Delta E_{ab,CS}}{\Delta E_{ab,CS}}$$

$\Delta E_{ab,TS}$ : diferencia de color total entre la solución de 3-*O*-glucósido de malvidina que contiene taninos comerciales (T) y una solución de color blanco puro (W).

$\Delta E_{ab,CS}$ : diferencia de color total entre la solución de 3-*O*-glucósido de malvidina (M) y una solución de color blanco puro (W).

Las coordenadas CIELAB de una solución de color blanco puro son  $L^* = 100,00$ ,  $a^* = 0,00$  y  $b^* = 0,00$ .

En todos los casos, las procianidinas/prodelfinidinas deben presentar capacidad para estabilizar el color. En concreto, deben tener al menos un índice de copigmentación superior al  $7,0 \% \pm 2,0 \%$  después de 7 días.

Nota: En lugar de todos los métodos anteriores, pueden emplearse otros métodos de determinación siempre que hayan sido sometidos a un proceso de validación interna.

### 3. Bibliografía

1. Sarneckis, C. J.; Damberg, R. G.; Jones, P.; Mercurio, M.; Herderich, M. J., y Smith, P. A.: "Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis", *Australian Journal of Grape Wine Research*, 2006, vol. 12, pp. 39-49.
2. Vignault, A.; González-Centeno, M. R.; Pascual, O.; Gombau, J.; Jourdes, M.; Moine, V.; Iturmendi, N.; Canals, J. M.; Zamora, F., y Teissedre, P.-L.: "Chemical characterization, antioxidant properties and oxygen consumption rate of 36 commercial oenological tannins in a model wine solution", *Food Chemistry*, 2018, vol. 268, pp. 210-219.
3. Vignault, A.; Pascual, O.; Jourdes, M.; Moine, V.; Fermaud, M.; Roudet, J.; Canals, J. M.; Teissedre, P.-L., y Zamora, F.: "Impact of enological tannins on laccase activity", *OENO One*, 2019, vol. 53, pp. 27-38.
4. Vignault, A.; Pascual, O.; Gombau, J.; Jourdes, M.; Moine, V.; Canals, J. M.; Teissedre, P.-L., y Zamora, F.: "Recent advances of the OIV working group on oenological tannins in the study of the functionalities of oenological", *BIO Web of Conferences*, 2019, vol. 15, 02015.

5. Vignault, A.; Gombau, J.; Pascual, O.; Jourdes, M.; Moine, V.; Canals, J. M.; Zamora, F., y Teissedre, P.-L.: "Copigmentation of Malvidin-3-O-Monoglucoside by Oenological Tannins: Incidence on Wine Model Color in Function of Botanical Origin, pH and Ethanol Content", *Molecules*, 2019, vol. 24, pp. 1-15.
6. Vignault, A.; Gombau, J.; Jourdes, M.; Moine, V.; Canals, J. M.; Fermaud, M.; Roudet, J.; Zamora, F., y Teissedre, P.-L.: "Oenological tannins to prevent Botrytis cinerea damage in grapes and musts: kinetics and electrophoresis characterization of laccase", *Food Chemistry*, 2020, vol. 316, 126334.
7. Vignault, A.: "Tanins œnologiques: caractéristiques, propriétés et fonctionnalités. Impact sur la qualité des vins", tesis doctoral, Universidad de Burdeos y Universitat Rovira i Virgili, 2019.