

# Influencia del periodo de maduración en el contenido en procianidinas de las semillas de uva cv Tempranillo

Isabel Estrella\*, Teresa Hernández, Sergio Robredo

*Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición. (C S I C) Juan de la Cierva 3, Madrid 28006. Tfn. 912587502  
e-mail [iestrella@ictan.csic.es](mailto:iestrella@ictan.csic.es)*

## Resumen

Se estudian las procianidinas de las semillas de uva Tempranillo y su evolución durante el período de maduración. Se tomaron muestras de uvas semanalmente, desde cinco semanas antes de la posible fecha de vendimia hasta una semana después. Las pepitas se maceraron con etanol/agua (20:80) y en el macerado se realizaron extracciones sucesivas con éter etílico y acetato de etilo, que se analizaron por HPLC-PAD-MS. En el extracto de éter se encuentran mayoritariamente catequina y epicatequina en alta concentración, y en el extracto de acetato de etilo se identifican procianidinas galoiladas y oligómeros. La mayor parte de estos compuestos muestran un máximo de concentración dos semanas antes de la vendimia y un mínimo en el momento de vendimia. Los dos extractos dan una información complementaria de los compuestos de las semillas de uva y su evolución en el período de maduración, observándose una tendencia similar durante dicho período.

**Palabras clave:** maduración, semillas de uva, procianidinas, compuestos fenólicos, HPLC-PAD-MS

## 1. Introducción

Durante el período de maduración de la baya de uva existe una gran actividad bioquímica que da lugar a diferentes cambios en su composición [1].

Las semillas de uva contienen una gran parte del contenido total de compuesto fenólicos de la uva, siendo los más abundantes las procianidinas [2], en forma de monómeros, oligómeros y polímeros galoilados y no galoilados, fundamentalmente. Las procianidinas juegan un papel importante en la calidad final del vino, porque son componentes esenciales de sus características sensoriales, ya que intervienen en el amargor y la astringencia; concretamente un mayor grado de polimerización y un mayor porcentaje de galoilación producen una mayor sensación de astringencia [3]. En general cuanto mayor es la concentración de procianidinas mayor es la astringencia [4] del vino.

Estos compuestos se sintetizan y acumulan durante el periodo de maduración [4] y su grado de polimerización cambia durante su desarrollo, dependiendo de la variedad y grado de madurez de la uva [5]. Algunos estudios indican un aumento significativo de los compuestos polimerizados en las semillas desde el envero a la madurez, y un aumento del grado medio de su polimerización [6].

El contenido de monómeros de procianidina, (+) catequina y (-) epicatequina, depende de la variedad de uva [7], de factores genéticos y de las condiciones climáticas [8]; en la mayoría de los casos la concentración de los dos compuestos es equivalente en las semillas [9].

Es conocida el gran número de procianidinas en las semillas de uva, por lo que teniendo en cuenta que el factor de respuesta de monómeros y de oligómeros es diferente [10], es importante utilizar un método de extracción que permita una mejor separación entre estos compuestos.

En este trabajo se estudian los compuestos fenólicos de las pepitas de uva de la variedad Tempranillo y su evolución durante el período de maduración.

## 2. Material y Métodos

Las uvas fueron recolectadas semanalmente en la Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA) en 2008, tomando la primera muestra cinco semanas antes de la posible fecha de vendimia (\*), hasta una semana después [15/09 (I), 22/09 (II), 29/09 (III), 06/10 (IV), 13/10 (V\*), 21/10 (VI)].

Las semillas se separaron manualmente y posteriormente se sometieron a maceración con etanol/agua (20:80). En el macerado se realizaron extracciones sucesivas con éter etílico y acetato de etilo, para obtener mejor separación de los compuestos, que favorezca su identificación. Cada una de las fracciones de éter y de acetato concentrados a sequedad y recogidos en metanol/agua se analizaron por HPLC-PAD-MS, según el método de Hernández [11] y col. (2007).

### 3. Resultados y Conclusiones

Los compuestos encontrados en cada uno de los extractos, se han identificado según los espectros en UV-Vis y confirmados por los espectros de masas. En la Tabla 1 se muestran las  $\lambda$  características y los iones moleculares de los compuestos identificados.

Tabla 1.-  $\lambda$  características e iones moleculares de los compuestos identificados

	$\lambda_{max}$	[M-H]-	fragmentos
ácido gálico	271	169	
metil galato	273	183	
(+)-catequina	278	289	
(-)-epicatequina	278	289	
etilgalato	272	197	
dihidroquercetina	288,336h	303	
ácido elágico	253, 365	301	
dihidrofisetina	290,340h	287	
P <sub>2</sub> (dímero de procianidina)	278	577	289
P <sub>3</sub> (trímero de procianidina)	278	865	577, 289
P <sub>2</sub> G <sub>1</sub> (dímero galoilado de procianidina)	278	729	577,289
P <sub>2</sub> G <sub>2</sub> (dímero digaloilado de procianidina)	278	881	729,577,289
P <sub>3</sub> G <sub>1</sub> (trímero galoilado de procianidina)	278	1017	865,729,577,289
P* <sub>3</sub> G <sub>1</sub> (trímero galoilado de procianidina A)	278	1015	863,727,575,441,289
P <sub>3</sub> G <sub>2</sub> (trímero digaloilado de procianidina)	278	1169	1017,865,577, 289

En el extracto de éter etílico se identifican y cuantifican (+) catequina y (-) epicatequina, como compuestos mayoritarios, que alcanzan una concentración máxima de 383.87  $\mu\text{g/g}$  y 260.30 $\mu\text{g/g}$  respectivamente, dos semanas antes de la vendimia (III) y un mínimo en la semana de vendimia (V\*) (Tabla 2).

Tabla 2.-Concentración ( $\mu\text{g/g}$ ) de los compuestos identificados en el extracto de éter etílico

	I	II	III	IV	V*	VI
ácido gálico	5,803	7,592	4,857	4,467	2,445	3,91
metil galato	t	t	2,278	0,878	0,3606	t
(+)-catequina	191,988	266,603	383,866	230,375	133,35	230,119
(-)-epicatequina	144,433	185,968	260,302	171,477	95,134	158,466
etilgalato	29,656	31,436	38,655	46,381	41,655	31,424
dihidroquercetina	13,55	11,77	12,22	12,44	12,88	13,11
ácido elágico	6,28	7,77	0,4	3,45	1,6	5,96
dihidrofisetina	11,3	10,44	9,82	10,89	11,11	5,91

(V\*) vendimia

La relación catequina/epicatequina es similar a lo largo del período de maduración, oscilando entre 1.33 a 1.45, lo que está de acuerdo con los valores citados por diversos autores. En menor concentración se encuentran ácido gálico y ácido elágico, junto con etil galato y metil galato, este último en pequeña concentración. El ácido gálico y etil-galato muestran variaciones pequeñas en este período. En este extracto de éter etílico se han identificado dos dihidroflavonoles, dihidroquercetina y dihidrofisetina en

concentraciones apreciables, de cuya presencia en semillas de uva no hemos encontrado referencias en la bibliografía.

En el extracto de acetato de etilo, obtenido después de la extracción con éter etílico, los compuestos mayoritarios son dímeros y trimeros de procianidinas ( $P_2$  y  $P_3$ ) y procianidinas mono y digaloiladas  $P_2G_1$ ,  $P_2G_2$ ,  $P_3G_1$ ,  $P_3G_2$ , y  $P^*_3G_1$  (\* tipo A), junto con ácido gálico y ácido elágico.

Tabla 4.- Concentración ( $\mu\text{g/g}$ ) de los compuestos identificados en el extracto de acetato de etilo

	I	II	III	IV	V*	VI
ácido gálico	33,43	30,96	42,85	54,85	32,82	29,42
$P_2$	65,82	72,16	94,66	73,05	51,68	50,11
$P_3$	653,62	566,86	663,90	469,13	401,22	452,27
$P_2$	203,72	243,47	370,81	268,41	140,81	198,86
$P_2G_1$	623,93	497,73	566,13	418,51	354,54	376,01
$P_2G_1$	20,96	55,99	68,52	59,22	40,52	51,53
$P_3$	126,63	122,99	161,22	153,65	141,40	92,43
$P_2G_1$	137,59	117,00	139,74	60,11	96,27	86,14
$P_2G_2$	50,75	37,54	37,30	40,19	21,97	30,01
$P_3G_1$	51,72	45,39	55,67	40,54	26,41	21,91
ácido elágico	1,70	3,67	6,41	4,60	7,22	8,08
$P^*_3G_1$	18,96	15,35	20,88	15,65	12,04	11,51
$P_3G_2$	25,14	21,64	27,61	22,63	19,11	6,74
$P_2G_1$	12,55	7,85	10,78	8,36	6,26	4,91
$P_2G_2$	29,19	20,28	22,23	22,21	13,02	16,16

(V\*)vendimia

Los compuestos mayoritarios en este extracto son trimeros y dímeros de procianidina, junto con un dímero galoilado ( $P_2G_1$ ) (Tabla 4). La mayoría de los procianidinas identificadas, galoiladas o no galoiladas, tienen un máximo de concentración dos semanas antes de la vendimia (III), como se había visto en los compuestos identificados en el extracto de éter etílico. Estas máximas concentraciones corresponden a un trímero (663.91  $\mu\text{g/g}$ ), un dímero (370.21  $\mu\text{g/g}$ ) y un dímero galoilado (566.13  $\mu\text{g/g}$ ). Las variaciones observadas en estos compuestos son similares en la mayor parte de ellos, encontrándose un mínimo de concentración en la fecha de vendimia (V\*).

Si consideramos la suma de procianidinas no galoiladas frente a las galoiladas (Figura 1) se observa una mayor concentración de las primeras, con una tendencia similar en los dos tipos de compuestos, máximo en la muestra (III), 1290,6  $\mu\text{g/g}$  y 927,9  $\mu\text{g/g}$  de no galoiladas y galoiladas respectivamente, y mínimo menos acusado, en el momento de vendimia (V\*).

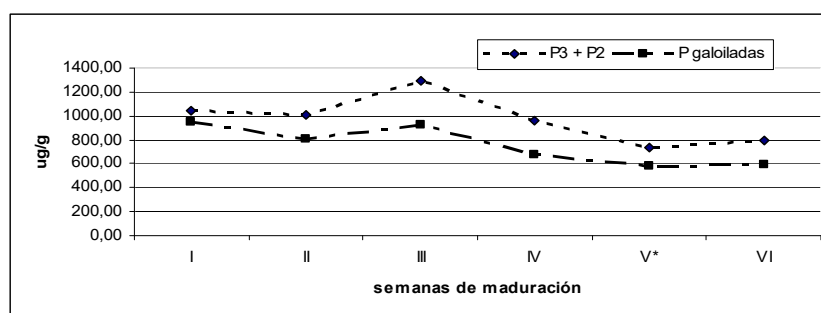


Figura 1.- Evolución de procianidinas oligómeras y procianidinas galoiladas durante el periodo de maduración

El contenido de ácido gálico y de ácido elágico, como suma de las concentraciones encontradas en los dos extractos se muestra en la Figura 2, en la que se puede observar la pequeña variación del ácido elágico, mientras que el ácido gálico, que está en mayor concentración, muestra mayores variaciones.

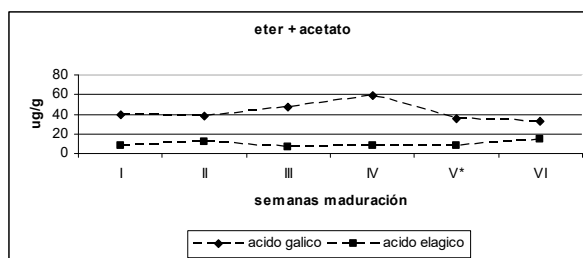


Figura 2.- Evolución del contenido total de ácido gálico y ácido elágico

Se observa una tendencia similar en los compuestos identificados en los dos extractos durante el período de maduración de la uva. En la mayoría de estos compuestos se aprecia un máximo en la semana III de muestreo y un mínimo en el momento de vendimia con una tendencia de aumento de su concentración en la muestra (VI) que corresponde a la semana posterior a la vendimia, y que se puede suponer coincidiría con la sobremaduración de la uva. El mínimo observado en el momento de vendimia corresponderá con una menor astringencia del vino que se obtenga.

De los resultados obtenidos se deduce que mediante extracción de los compuestos fenólicos de la semilla de uva con dos extractantes sucesivos, éter etílico y acetato de etilo, se evitan interferencias en la mayoría de los compuestos, fundamentalmente los monómeros y los más polimerizados, obteniéndose una mejor información de los compuestos de las semillas de uva y su evolución en el período de maduración.

#### 4. Bibliografía

- [1] Coombe, B.G. & McCarthy, M.G. (2000) Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6, 125-130.
- [2] Spranger, I.; Sun, B.; Mateus, A. M.; De Freitas, V. & Ricardo-da-Silva, J. M. (1998) Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chemistry* 108, 519-532.
- [3] Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheyner, V., Waters, E. (2004) Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513, 57-65.
- [4] Llaudy, M. C., Canals, R., Canals, J. M., Zamora, F. (2008) Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. *European Food Research and Technology* 226, 337-344.
- [5] De Freitas, V.A.P.; Glories, Y. & Monique, A. (2000) Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 397-403.
- [6] Jordao, A., Ricardo da Silva, J., Laureano, O. (2001) Evolution of catechins and oligomeric procyanidins during grape maturation of Castelao Frances and Touriga Francesa. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 230-234.
- [7] Yilmaz Y. & Toledo R. T. (2004) Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 255-260.
- [8] Nuñez, V.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Hong, Y. J. & Mitchell, A. E. (2006) Non-galloylated and galloylated proanthocyanidin oligomers in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *J. Sc. Food Agric.* 86, 915-921.
- [9] Flanzky, C. (2000) *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Mundi Prensa Press. Madrid. pp 783-796.
- [10] Sun, B; Belchior, G. P.; Ricardo da Silva, J. M.; Spranger, M. I. (1999) Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds. *Journal of Chromatography A*, 841, 115-121.
- [11] Hernández T, Estrella I, Pérez-Gordo M, G-Alegria E, Tenorio C, Ruíz-Larrea F. & Moreno-Arribas M. V. (2007) Contribution of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the changes in the non-anthocyanin polyphenolic composition of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5260-5266.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen a Julián Suberviola, jefe de la Sección de Enología de la Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA), en Olite (Navarra), su colaboración y su interés en el suministro de las muestras de uvas. También agradecen a Javier Martín Siguero su asistencia técnica.