

## **RESOLUCIÓN OIV-OENO 675D-2022**

### **MONOGRAFÍAS ESPECÍFICAS SOBRE LAS PROFISSETINIDINAS/PROROBITENIDINAS**

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-PROFIS al Codex Enológico Internacional:

### **TANINOS ENOLÓGICOS**

#### **Monografía específica sobre los taninos enológicos que contienen profisetinidinas/prorobitenidinas**

Las profisetinidinas/prorobitenidinas son una subclase de taninos condensados (o proantocianidínicos). A esta subclase pertenecen los taninos que se obtienen del quebracho y *Acacia* spp.

#### **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 del subgrupo de las profisetinidinas/prorobitenidinas 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 familias o subfamilias (o clases) 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 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 equipado con un 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  $2,1 \times 100 \text{ mm}$ , 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 la solución patrón con filtros Whatman de 0,45 µm (tamaño de poro) y analizar por cromatografía en las siguientes condiciones, que figuran a modo de ejemplo:

Volumen inyectado: 10 µL de 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 profisetinidinas/prorobitenidinas mediante análisis ESI-SIM y detección Q-TOF, por ejemplo.

*Tabla 1. Fórmula química y m/z de las diferentes profisetinidinas/prorobitenidinas (de quebracho), 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
Dímeros catequina-fisetinidol	$C_{30}H_{26}O_{11}$	562,1

Trímeros catequina-fisetinidol  $C_{45}H_{38}O_{16}$  834,2

Tetrámeros catequina-fisetinidol  $C_{60}H_{50}O_{21}$  1106,3

*Tabla 2. Fórmula química y m/z de las diferentes profisetinidinas/prorobitenidinas (de acacia), 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	$C_{22}H_{18}O_{10}$	442,4
Dímeros fisetinidol-galocatequina	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578,1
Dímeros robinetinidol-catequina	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578,1
Dímeros calcona-flavano (gambirina)	$C_{30}H_{28}O_{12}$	580,1
Trímeros catequina-fisetinidol-robinetinidol o galocatequina-fisetinidol-fisetinidol	$C_{45}H_{58}O_{17}$	850,2
Trímeros robinetinidol-robinetinidol-catequina o galocatequina-fisetinidol-robinetinidol	$C_{45}H_{38}O_{17}$	866,2

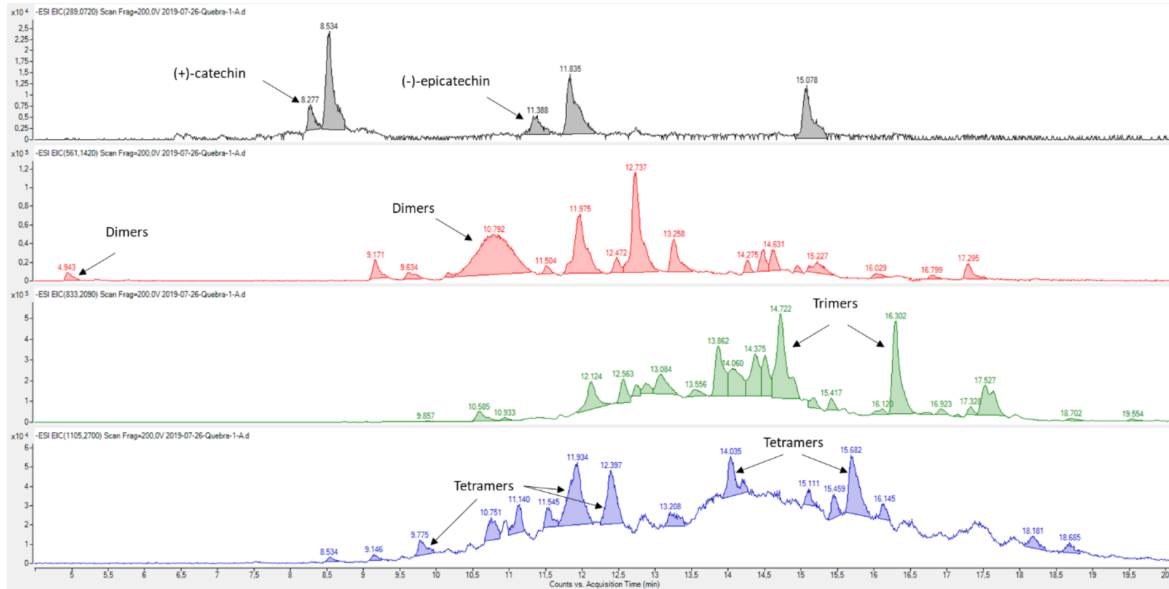


Figura 1. Ejemplo de análisis del quebracho en los modos ESI y SIM

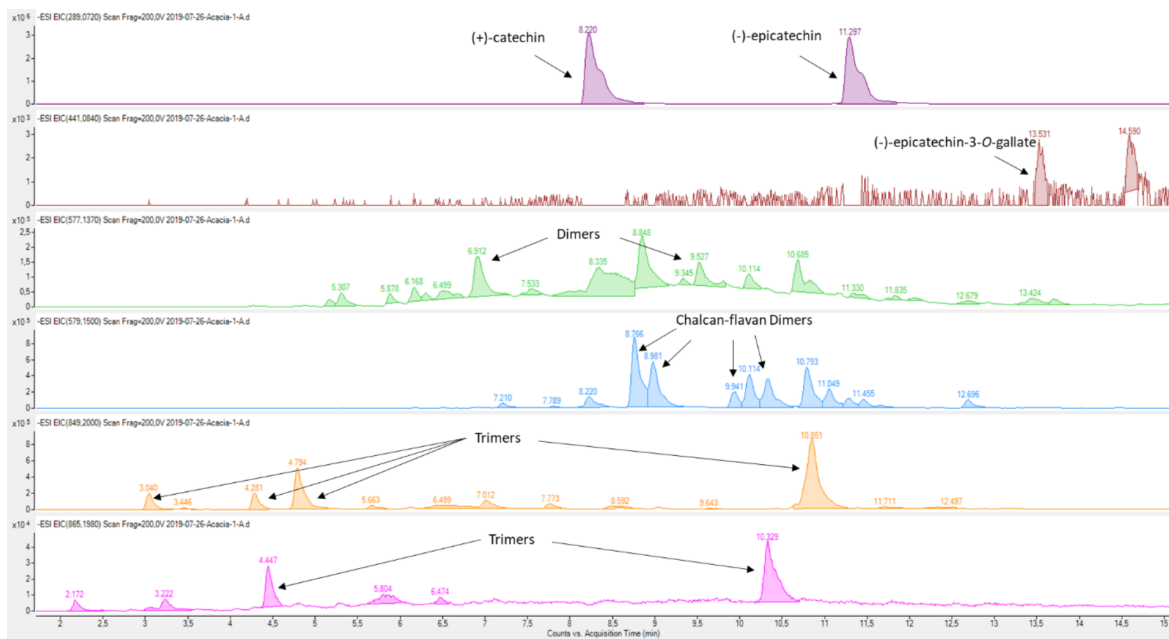


Figura 2. Ejemplo de análisis de la acacia en los modos ESI y SIM

## 1.2. Conclusión

Un tanino enológico se considera como profisetinidina/prorobitenidina cuando:

- el contenido de polifenoles totales supera el 65 % (método gravimétrico, anexo 1 de la monografía general OIV-OENO 624-2022),
- el contenido de profisetinidinas/prorobitenidinas, determinado por HPLC, supera los 20 mg (en los taninos del quebracho) y los 150 mg (en los taninos de la acacia) de equivalentes de (+)-catequina por gramo de taninos enológicos.

## 2. Método 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 antioxidante de las profisetinidinas/prorobitenidinas 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 L 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 % vol. 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:

$$RB - MS = x$$

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

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

En todos los casos, las profisetinidinas/prorobitenidinas deben presentar capacidad antioxidante, como mínimo, 450 mg ± 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 3. 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 L. 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  $O_2$  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 profisetinidinas/prorobitenidinas deben tener capacidad de consumo directo de oxígeno, como mínimo, 0,10 mg  $\pm$  0,05 mg de  $O_2$  por litro, por día y por gramo de taninos (extracto comercial).

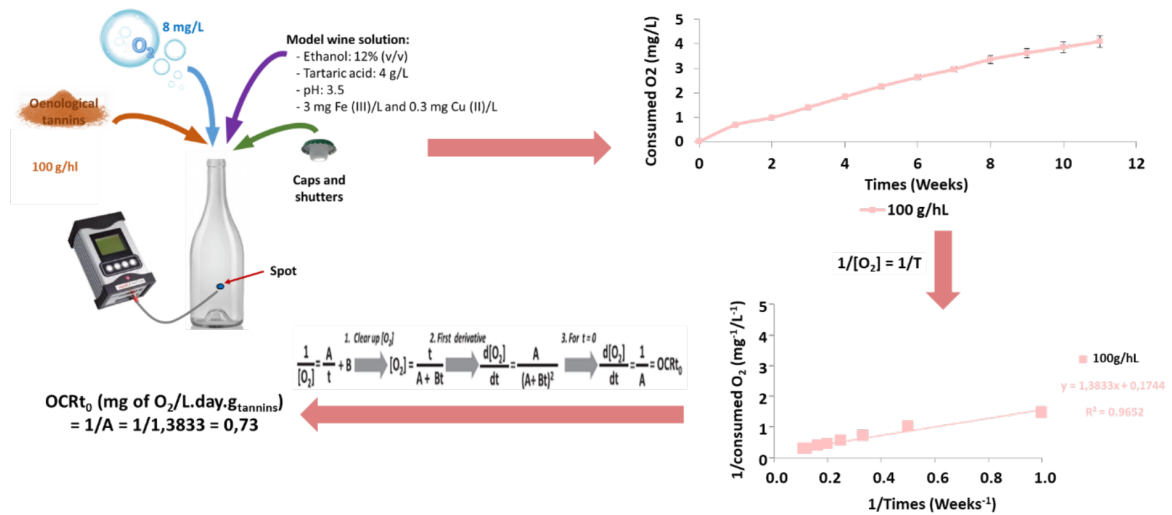


Figura 4. Procedimiento para determinar la tasa de consumo de oxígeno

## 2.2. Capacidad antioxidásica

### 2.2.1. Fundamento

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

### 2.2.2. 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

Polivinilpirrolidona (PVPP), N.º CAS 25249-54-1

Mosto botritizado con actividad lacasa

Agua destilada (calidad HPLC)

### 2.2.3. 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.

### 2.2.4. 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:

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

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

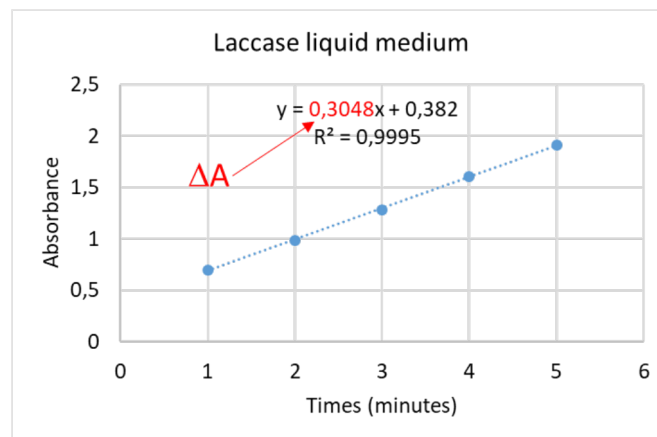


Figura 5. Ejemplo de determinación de  $\Delta A$

En todos los casos, las profisetinidinas/prorobitenidinas deben tener capacidad antioxidásica y, en concreto, deben poder reducir la actividad lacasa residual en, al menos, un 40 %. Este valor es importante en el caso de los mostos y vinos con un contenido inferior a 5 UL (unidades de lacasa).

## 2.3. Estabilización del color

### 2.3.1. Fundamento

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

### 2.3.2. 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

### 2.3.3. Procedimiento

Solución de 0,8 g/L de tanino enológico: 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).

### 2.3.4. Ensayos

1. Introducir 0,75 mL de solución de taninos enológicos 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 “ $T_0$ ”.
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 “ $T_M$ ”.
4. Después de 7 días, medir la absorbancia de los tres tubos ( $T_M$ ,  $T_0$  y M) a 450, 520, 570 y 630 nm.
5. Restar los valores de absorbancia de  $T_0$  a  $T_M$  para obtener la absorbancia y evitar las interferencias debidas al color “natural” del tanino enológico.

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

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 profisetinidinas/prorobitenidinas deben presentar capacidad para estabilizar el color. En concreto, deben tener al menos un índice de copigmentación superior al  $3,0 \% \pm 0,5 \%$  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.