

Extracción y caracterización de antocianos y procianidinas de distintas variedades de uva empleadas en la elaboración del txakoli tinto de Bizkaia

(Extraction and characterisation of anthocians and procyanidines of various varieties of grapes employed in the elaboration of red "txakoli" wine in Bizkaia)

Elejalde Caravaca, Edurne

Univ. del País Vasco.

Fac. de Ciencias

Dpto. de Química Orgánica

Apdo. 644

48080 Bilbao

BIBLID [1137-4411 (1999), 5; 67-82]

En el presente trabajo se ha realizado la extracción y el posterior estudio cromatográfico y espectroscópico de compuestos antocianicos y procianidinas presentes en uvas tintas de variedades autóctonas empleadas en la elaboración del Txakoli de Bizkaia, y en uvas de variedad foránea. La extracción se llevó a cabo tanto sobre el hollejo como sobre las pepitas del fruto, mediante aplicación de diversas técnicas. La posterior determinación se efectuó poniendo a punto un método cromatográfico que permitió el aislamiento de los compuestos antocianicos extraídos. Tanto el análisis como la posterior identificación de los compuestos en base a sus propiedades espectrales se realizó empleando la técnica acoplada HPLC-PDA.

Palabras Clave: Txakoli. Polifenoles. Extracción.

Lan honetan Bizkaiko Txakolina egiterakoan erabilitako hemengo mahats beltzetako barietate batzuetan bai eta kanpoko barietateetan aurkitzen diren konposatu antozianiko eta prozianidinen erauzketa egin dugu, bai eta ondoko azterketa kromatografiko eta espektroskopikoa. Erauzketa bai fruitu horren patsean eta bai hazietan burutu zen, hainbat teknika erabiliz. Ondoko zehaztapena metodo kromatografiko bat prestatuz burutu zen, horren bidez erauzitako konposatu antozianikoak bakartzea lortu zelarik. Hala konposatuen analisisa nola ondoko identifikazioa, espektro-propietateen arabera, HPLC-PDA teknika akoplatua erabiliz burutu ziren.

Giltz-Hitzak: Txakolina. Polifenolak. Erauztea.

On a réalisé, dans ce travail, l'extraction et l'étude chromatographique et spectroscopique postérieure des composés antocianiques et procyanidines présents dans des raisins rouges de variétés autochtones utilisés lors de l'élaboration du Txakoli de Biscaye, et dans des raisins de variétés étrangères. Les échantillons furent extraits aussi bien de la peau que des pépins du fruit, en employant diverses techniques. La détermination postérieure s'effectua en mettant au point une méthode chromatographique qui permit d'isoler les composés antocianiques extraits. L'analyse et la postérieure identification des composants d'après leurs propriétés spectrales furent réalisées en employant la technique accouplée HPLC-PDA.

Mots Clés: Txacoli. Polyphénols. Extractions.

1. INTRODUCCIÓN

En la uva existe un amplio grupo de pigmentos solubles en el agua, a los que se debe el color azul violáceo de las uvas tintas. Este grupo de pigmentos está constituido por compuestos fenólicos, también llamados polifenoles, y en su mayor parte proceden de las partes sólidas de la uva. Según los estudios de Bourzeix (1983), están ubicados principalmente en las pepitas y el hollejo, en menor medida en el raspón y muy escasamente en la pulpa.

Los compuestos fenólicos tienen una gran influencia en las características de los zumos y vinos. Contribuyen al perfil sensorial de los mismos, en especial en relación con el color y en otras características organolépticas del vino tales como la astringencia, y la dureza. También están directamente relacionados en las transformaciones que se producen en el vino durante el almacenamiento, y marcan diferencias fundamentales entre vinos blancos y tintos (Primo Xufé, 1979).

Los compuestos fenólicos encontrados en la uva y el vino pertenecen a especies químicas muy variadas. Esta gran variedad ha dado lugar a numerosas nomenclaturas y a cierta confusión en la terminología empleada. Una posible clasificación está basada en la distinción inicial entre fenoles flavonoideos y fenoles no flavonoideos.

Los fenoles no flavonoideos son fundamentalmente ácidos fenólicos, entre los que podríamos destacar los ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico o gálico. En la Tabla 1.1 se recogen algunos de los fenoles no flavonoideos encontrados en vinos

Tabla 1.1. Algunos fenoles no flavonoideos encontrados en vinos

Tipo general	Nombre común	Peso molecular
Acido benzoico	Acido siríngico	198.19
	Acido gálico	170.12
Acido cinámico	Acido p-cumárico	164.17
	Acido ferúlico	194.19
	Acido caféico	180.17

Los fenoles flavonoideos constituyen el grupo más extenso de los compuestos fenólicos naturales, y en el caso de los vinos tintos suponen el 95% de los polifenoles totales. Son sustancias con estructuras químicas similares, cuyo esqueleto fundamental forma un anillo benzenico unido a un benzodihidropirano (Fig 1.1).

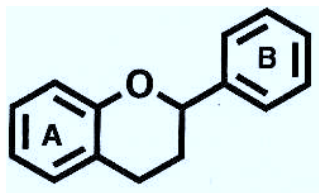


Fig 1.1 Esqueleto fundamental de fenoles flavonoideos

Generalmente el anillo A está dihidroxilado, estando uno de los grupos hidroxilo implicado en la formación del heterociclo, y el anillo B, suele estar mono-, di- o trihidroxilado con diferentes grados de metoxilación, situándose los distintos sustituyentes en posición orto entre sí.

Los fenoles flavonoideos se dividen en tres familias según la estructura del anillo oxigenado y el grado de oxidación del heterociclo: taninos, antocianos y flavonas. (Fig 1.2)

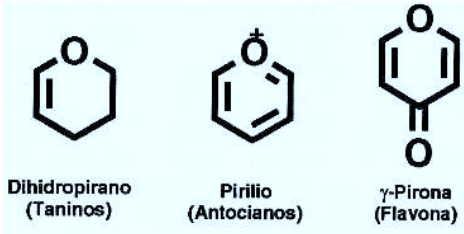


Fig 1.2. Familias de fenoles flavonoideos

La importancia cuantitativa de las tres familias es muy diferente, mientras los taninos suponen casi el 90% de los polifenoles totales en vinos tintos, los antocianos suponen aproximadamente el 10%.

Los antocianos, así como los procianidinas (también llamadas taninos condensados o proantocianidinas), representan algunos de los grupos de compuestos químicos más estudiados de los vinos. Actualmente se está llevando a cabo el estudio de estas sustancias en distintas variedades de uva empleadas en la elaboración de vinos de distintas regiones españolas que han obtenido la Denominación de Origen.

Los antocianos tienen su origen biogenético en las flavanonas y son los principales responsables del típico color rojo violáceo de las uvas tintas así como de los zumos y vinos obtenidos a partir de ellas. Estos compuestos se presentan en el vino y en la uva en forma de aglucones mono o diglicosilados, denominándose entonces antocianinas. Su hidrólisis conduce a las antocianidinas, cuyas metoxilaciones e hidroxilaciones dan lugar a las distintas antocianidinas, que se presentan a continuación:

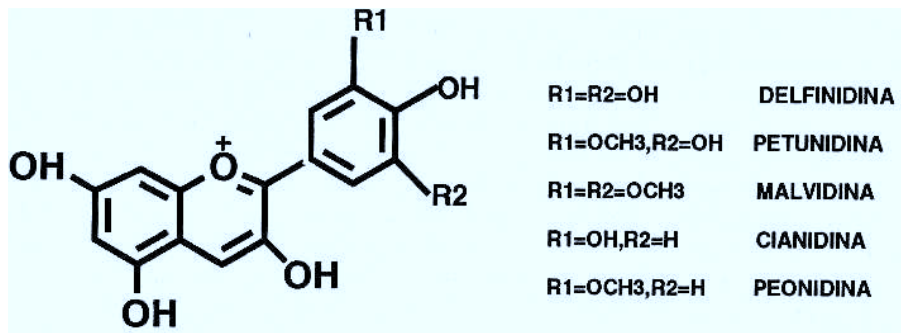


Figura 1.3. Antocianidinas comunes en *Vitis Vinifera*

Los antocianos en las uvas tintas son monoglucósidos de estas cinco antocianidinas: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, siendo la malvidin-3-glucósido el pigmento antocianínico más abundante en la viníferas europeas.

Los azúcares que forman parte de los antocianos suelen ser galactosa o glucosa, y en menor medida ramnosa o arabinosa. En muchas ocasiones estos azúcares se encuentran acilados, sobre el 6-hidroxil del glucósido enlazado en 3, con ácido p-cumárico, acético o caféico.

La presencia de las unidades mono o diglicosiladas depende de las cepas empleadas en la elaboración. En este sentido, según el *Reglamento de la Comunidad Europea*, solo aquellas variedades pertenecientes a la especie *Vitis Vinifera* se consideran aptas para vinificación. La presencia de antocianos diglicosilados, particularmente de la malvidina-3,5-diglucósido indicaría que dicho vino procede de cepas americanas o de híbridos productores directos. En este sentido, mediante el estudio de estos compuestos es posible poner de manifiesto prácticas enológicas fraudulentas.

Los antocianos experimentan transformaciones estructurales en función del pH del medio, tal y como sucede con otros muchos compuestos orgánicos. En medio ácido presentan color rojo, adquieren color violeta al acercarse a pH neutro, decreciendo la intensidad del color a medida que aumenta el pH. Y bajo condiciones de pH muy elevados se destruyen de forma irreversible por escisión del anillo central, este hecho tiene aplicación en la caracterización de pigmentos antocianícos (hidrólisis ácida). Se ha podido demostrar que, en medio ácido, los antocianos se encuentran en equilibrio entre las cuatro estructuras que se presentan en la Figura 1.4. Así, a valores de pH muy ácidos, el catión flavilio predomina sobre el resto de las estructuras orgánicas.

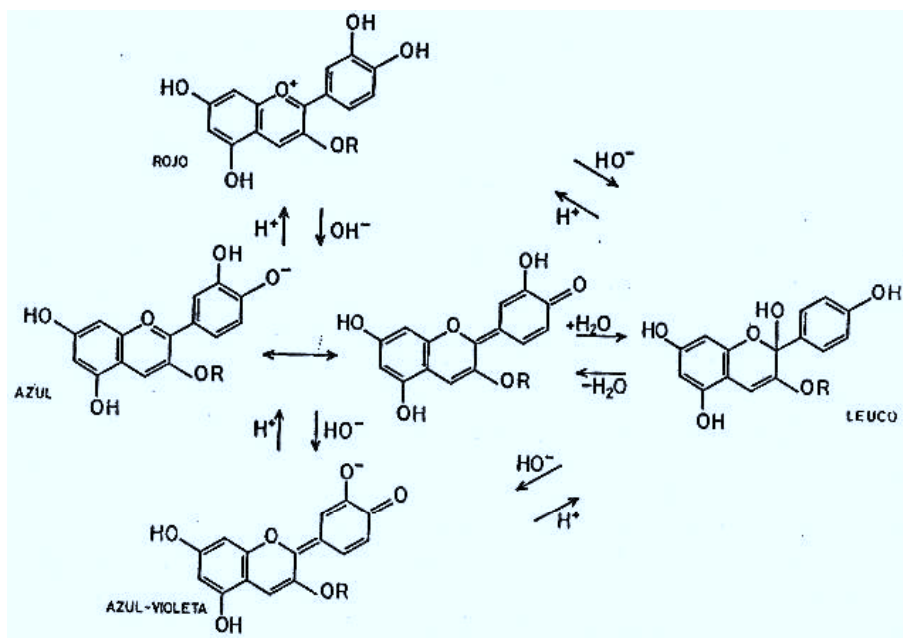


Fig 1.4. Equilibrio formas coloreadas

Realmente, los pigmentos antocianícos son inestables. Dependiendo de las condiciones del medio pueden hidrolizarse, reaccionar con diferentes compuestos presentes en el vino e incluso formar agrupaciones o polímeros que por su gran tamaño adquieren propiedades coloidales, evolucionando hasta la precipitación. Así se explica la pérdida de brillo, de intensidad de color y la aparición de sedimentos de color pardo oscuro en los vinos, como resultado de un prolongado almacenamiento. Con el envejecimiento de los vinos tintos, se produce una desaparición progresiva de antocianos que puede ser prácticamente total al cabo de

cuatro o cinco años, de ahí la importancia de tener un nivel de extracto de flavonoides totales relativamente elevado durante la vinificación del vino tinto.

Desde el punto de vista químico los taninos resultan de la polimerización de moléculas elementales con función fenol, y según la naturaleza de estas moléculas (flavonas) se distinguen los taninos hidrolizables y los condensados. En la uva y el vino se encuentran principalmente taninos condensados o proantocinidinas (Fig 1.5), constituidos por monómeros u oligómeros de flavan-3-oles (catequinas) y de flavan-3,4-dioles (proantocianidinas), estas últimas deben su nombre a que son capaces de liberar antocianidinas por hidrólisis en medio ácido.

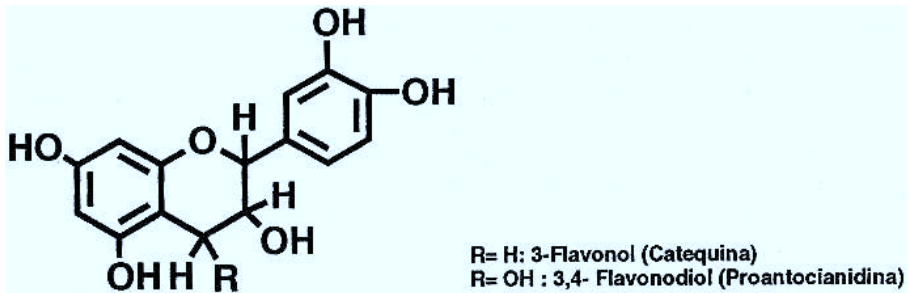


Figura 1.5. Estructura básica de catequinas y procianidinas

Respecto a los flavan-3-oles, entre las unidades monómeras predominan fundamentalmente la (+)-catequina y la (-)-epicatequina, que pueden estar o no estar esterificados con ácido gálico, además de galocatequina y epigalocatequina. Al referirnos al término proantocinidina, ya se hace referencia a algún grado de polimerización. Según el número de unidades flavanol elementales que entren a formar parte de su estructura, las procianidinas se clasifican en dímeras, oligómeras y polímeras (más de cinco unidades de catequina). Aunque las procianidinas suelen definirse como oligómeros de unidades flavan-3-ol, de hecho no se producen como resultado de su condensación, sino a través de la adición secuencial de unidades flavan-3,4-diol en su forma reactiva como carbocatión a unidades flavan-3-ol.

En la uva, las catequinas monómeras y las procianidinas (taninos condensados) se encuentran localizados principalmente en las pepitas, desde donde se extraen durante el proceso de vinificación. También se han aislado de hollejos aunque el contenido en estos compuestos es inferior al que presentan las pepitas, y su análisis más complejo debido a que los flavan-3-oles están acompañados de cantidades significativas de otros compuestos fenólicos. Aunque se han empleado distintos procedimientos para purificar los extractos de hollejos y efectuar el análisis selectivo de este grupo de compuestos, eluyendo a través de cartuchos Sep-pack C18 (Jaworski y Lee, 1987), columnas de poliamida (Da Silva y col., 1991) o Sephadex LH-20 (Escribano-Bailón y col., 1992).

Estos compuestos son responsables directos de algunas de las propiedades de los vinos tintos, como el cuerpo y la astringencia. La astringencia característica de los taninos se debe a la pérdida de las propiedades lubricantes de la saliva al precipitar las proteínas y glicoproteínas que contiene ésta. Así mismo están implicados en la definición del color, especialmente en los cambios que éste experimenta durante el envejecimiento y la conservación (Somers, 1971).

Los taninos presentan un carácter reductor, actuando como antioxidantes, protegiendo a los vinos tintos. Protegen a los antocianos de la oxidación provocada por el oxígeno del aire, impidiendo su precipitación, es por ello que la materia colorante es estable en vinos ricos en taninos. Aunque, a pesar de ello, se va produciendo una desaparición progresiva de antocianos que pueden ser total al cabo de cuatro o cinco años (Ribéreau Gayon y Stonestreet, 1966), y sin embargo los vinos mantienen un color relativamente intenso aunque de tonalidad más parda. En realidad, la coloración de los vinos tintos viejos se atribuye a los taninos en forma de polímeros o copolímeros no bien definidos (Ribéreau-Gayon y col., 1976)

Recientemente las procianidinas han recibido una considerable atención debido a sus efectos farmacológicos, en particular sobre la arterioesclerosis (Masquelier, 1988) y su capacidad de actuar como captadores de radicales libres. Las proantocianidinas esterificadas con ácido gálico, cuyas propiedades antialérgicas y antiinflamatorias parecen ser mejores que las de taninos no acilados, también tiene un interés especial (Boukharta y col., 1988). Las fuentes más importantes de estos compuestos en la dieta, al menos en la mediterránea, son las uvas y el vino.

1.1. Determinación de antocianos

La presencia de compuestos antocianicos en uvas y vinos ha sido demostrada empleando técnicas tales como la cromatografía sobre papel y la cromatografía en capa fina (Albach y col., 1965; Fong y col., 1971). Actualmente, debido a la aparición y el perfeccionamiento desarrollado sobre nuevas técnicas analíticas, el conocimiento acerca de estos pigmentos ha avanzado considerablemente.

Tras el trabajo desarrollado por Williams y col. (1978) y Wulf y Nagel (1978), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se ha convertido en la técnica estandarizada para el análisis de este tipo de compuestos, ya que permite una separación rápida y prácticamente completa de los antocianos presentes en las distintas variedades de uva. Sin embargo, la identificación de este grupo de compuestos requiere un aislamiento previo, generalmente por HPLC preparativa precedida por cromatografía en columna. El desarrollo de la espectroscopía Diode Array, y su acoplamiento a un cromatógrafo de líquidos permite una separación e identificación simultánea de cada uno de los diferentes antocianos, de acuerdo con sus propiedades espectrales sin la necesidad de un aislamiento previo. De modo adicional, esta técnica espectroscópica permite registrar análisis cromatográficos a diferentes longitudes de onda. Esto permite cuantificar cada antociano a la longitud de onda de máxima absorción y por otro lado, identificar mucho más rápidamente algunos de estos compuestos al ser posible registrar sus cromatogramas a las longitudes de onda características de cada uno de ellos.

A pesar de las indudables ventajas que presenta esta técnica, es necesario efectuar ciertos procedimientos de extracción y purificación de los extractos, entre los que se encuentra la cromatografía en columna, como paso previo a su inyección en el cromatógrafo de líquidos. Estos pasos previos de purificación tienen como objeto eliminar sustancias tales como azúcares y sustancias liposolubles que interfieren en el posterior análisis cromatográfico.

1.2. Determinación de procianidinas

La presencia y distribución de procianidinas en pepitas de uva ha sido estudiada por diversos autores (Bourzeix y col., 1986; Da Silva y col., 1991; Da Silva y col., 1992; Romeyer y col., 1986).

La presencia de estos compuestos es mayoritaria en las pepitas de uva, respecto a otras zonas de la uva, tales como hollejos u otras partes sólidas de la misma. Se liberan al medio a través de dos fenómenos: por un lado la disolución de cada compuesto a nivel celular y por otro su difusión en el medio líquido externo (Oszmianski y col., 1986). De este modo, los compuestos caracterizados son aquellos que se encuentran en la fracción soluble, aunque existe una fracción poco estudiada, la de los compuestos ligados a la matriz de polisacáridos que no pueden ser extraídos sin modificar sus características.

Para estudiar este tipo de compuestos, ya sea desde el punto de vista analítico, tecnológico o fisiológico, es necesario disponer de ellos en estado puro, o al menos en mezclas sencillas, ya que hasta el momento no existen patrones comercializados. La variedad de procianidinas, su similitud estructural y sus idénticas propiedades fisicoquímicas y espectrales hace que exista una gran dificultad para obtener buenas separaciones de las mismas. Las técnicas cromatográficas han sido las más utilizadas para el fraccionamiento de extractos complejos, se han empleado la cromatografía sobre papel, la cromatografía en capa fina, y en particular la cromatografía en columna. Como fases estacionarias se han empleado, entre otras, Sephadex LH-20 (Lea y col., 1979, Hagerman y Butler, 1980) y polidextrano Biogel P-2 (Yokotshuka y col., 1980), o polivinilpirrolidona, PVPP (Bourzeix y col., 1982)

2. EXPERIMENTAL

2.1. Muestras

Las muestras sobre las que se efectuó el procedimiento de extracción, tanto de compuestos antociánicos como de procianidinas fueron uvas tintas de variedades *Vitis Vinifera* Bedexa Baltza y Berde Xarie, ambas correspondientes a variedades autóctonas empleadas habitualmente en la elaboración de Txakoli tinto, y uvas de variedad foránea Tempranillo, todas ellas pertenecientes a la cosecha de 1997, y congeladas inmediatamente después de la vendimia.

2.2. Compuestos antociánicos

2.1.a. Extracción de pigmentos antociánicos

Para la extracción de este grupo de compuestos se partió de las uvas congeladas (300 g). En este estado se separaron los hollejos cuidadosamente, desechando la pulpa y reservando las pepitas de cada grano.

Los hollejos se maceraron en 250 ml de metanol al 2% en ácido clorhídrico durante 24 horas en nevera, protegiéndolos de la luz. Transcurrido este tiempo se decantó el líquido y los hollejos se pusieron en contacto con 200 ml más de la disolución de metanol al 2% en ácido clorhídrico, dejándolo macerar de nuevo 24 horas. Tras las maceraciones, los hollejos presentaban un aspecto blanquecino. El proceso se repitió hasta eliminar por completo la coloración de los mismos.

Todos los extractos alcohólicos obtenidos tras las maceraciones se adicionaron en el mismo recipiente llevando la disolución hasta sequedad en rotavapor a 40-45°C. El residuo se disolvió posteriormente en 250 ml de vino sintético (0,5 g tartárico/l, y 10 % etanol, pH 2,4). Esta disolución la denominaremos SOL I.

Se tomaron 50 ml de la SOL I y se concentraron hasta sequedad en rotavapor a 40-45 °C. El residuo se disolvió en 5 ml de vino sintético. Esta nueva disolución se denominará SOL II.

Posteriormente, se tomaron 50 ml de nuevo de la SOL I, y se extrajeron en embudo de decantación tres veces consecutivas con volúmenes de 25 ml de dietiléter. La extracción con dietiléter permitió eliminar los compuestos liposolubles que pudieran haber sido extraídos en el proceso de maceración. El extracto hidroalcohólico se cromatografió en columna, empleando como fase estacionaria una mezcla de PVPP (20%), Kiesegel 60 (70%) y Kiesegel 60G (10%).

Como paso posterior a la adición de muestra se efectuó el lavado de la columna con agua para eliminar los azúcares y ácidos presentes en el extracto que pudieran interferir en el análisis posterior del mismo. La elución de los pigmentos antocianicos se llevó a cabo empleando como disolvente metanol al 0.1% en ácido clorhídrico. De este modo, los monómeros antocianicos, es decir los antocianos monoglucosilados se eluyen de la columna, mientras que las formas poliméricas y los taninos quedan retenidos en la parte superior de la misma.

El eluato obtenido tras la cromatografía en columna se concentró hasta sequedad en rotavapor a 40-45°C. El residuo obtenido se disolvió en 5 ml de vino sintético. Esta disolución la denominaremos SOL III.

Tanto la SOL II como la SOL III se analizarán mediante cromatografía líquida de alta resolución, acoplada a un espectrofotómetro PDA.

2.1.b. Análisis cromatográfico de los extractos

La técnica empleada en el análisis de los extractos fue la cromatografía líquida. Para ello se empleó una columna cromatográfica de fase reversa Hypersil ODS, de medidas 25 cm x 0.46 cm de diámetro interno y 5µm de tamaño de partícula. El relleno cromatográfico como corresponde a este tipo de cromatografía (fase reversa) es de carácter apolar, mientras que la fase móvil será de naturaleza polar.

En este caso la fase móvil estará compuesta por una mezcla de disolventes, por un lado el disolvente A, acetonitrilo y por otro el disolvente B, una mezcla acuosa de ácido fórmico al 10 %, estableciendo un flujo de 2,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 20 µl.

Se llevó a cabo el análisis con elución por gradiente, el cual se muestra a continuación

Tiempo (min)	A%	%B	Curva
-	10	90	6
15	15	85	6
30	20	80	6
45	25	75	6
50	30	70	6
60	10	90	1

Los cromatogramas se registraron a la longitud de onda máxima estimada para este grupo de compuestos, es decir, 525 nm.

2.3. Procianidinas

Este grupo de compuestos se encuentran localizados mayoritariamente en las pepitas de uva, como ya se mencionó en el apartado de introducción. La extracción de este grupo de compuestos se estudió sobre pepitas pertenecientes a uvas de variedad Tempranillo, a fin de establecer las condiciones óptimas de extracción que se aplicaran en estudios posteriores sobre pepitas obtenidas de variedades autóctonas.

2.3.a. Extracción de procianidinas

El proceso de extracción se basó en los estudios realizado por Kallithraka y col. (1995). En este sentido se emplearon distintos disolventes de extracción tales como: acetato de etilo, metanol, etanol 96%, etanol 75% y acetona 70%, sobre pepitas, que previamente habían sido machacadas en mortero. Cada extracción se efectuó sobre una cantidad pesada de pepitas, y con un volumen de disolvente de extracción proporcional.

La extracción se llevó a cabo mediante agitación magnética por un periodo aproximado de una hora. Transcurrido este tiempo, se decantaron los extractos y se filtraron como paso previo a su concentración. La concentración se efectuó en rotavapor a 30 °C hasta prácticamente sequedad. Posteriormente los extractos se redisolvieron en una disolución de ácido clorhídrico al 0.6% en metanol (9.5 : 0.5).

2.3.b. Análisis cromatográfico de los extractos

Al igual que los compuestos antociánicos, los extractos se analizaron empleando la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector PDA. Se utilizó la misma columna cromatográfica que en el caso de los pigmentos antociánicos. En este caso se hizo uso de precolumna Hypersil ODS Guard Column de 1 cm x 4.6 mm de diámetro interno, y 5 µm de tamaño de partícula. La precolumna se empleó a fin de evitar un eventual contaminación de la columna.

La fase móvil empleada fue una mezcla de disolventes, en este caso el disolvente A será agua al 0.6% de ácido clorhídrico y como disolvente B, metanol, y con un flujo de 0.5 ml/min. El volumen de inyección fue de 20 µl.

El gradiente aplicado en el análisis se muestra a continuación:

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	%B	%A	Curva
-	0.1	98.0	20.	-
30	0.4	68.0	32.0	6
50	0.4	50.0	50.0	6
60	0.4	98.0	2.0	1

Los cromatogramas se registraron a la longitud de onda máxima estimada para este grupo de compuestos, 280 nm.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Compuestos antociánicos

Los extractos antociánicos que denominamos SOL II y SOL III se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos después de ser filtrados a través de filtros de 0.45 μm de membrana.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos de estas disoluciones, para cada una de las variedades estudiadas, así como las tablas de resultados:

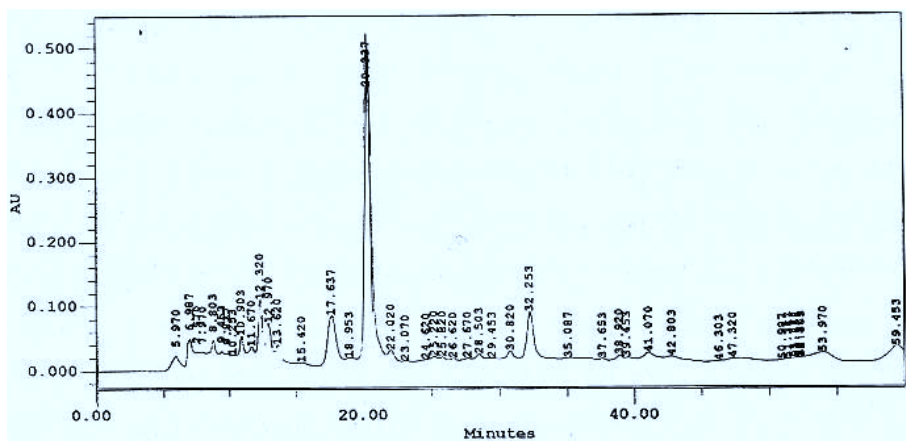


Fig 3.1. Cromatograma correspondiente a la SOL II de variedad Berde Xarie

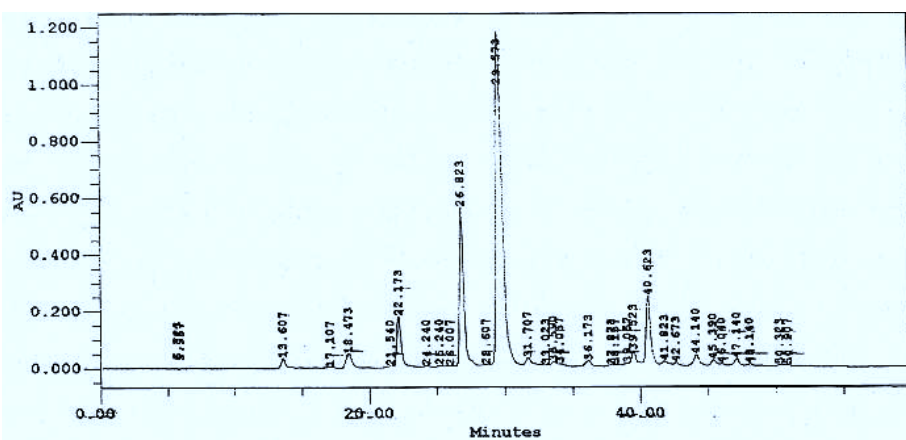


Fig 3.2. Cromatograma correspondiente a la SOL III de variedad Berde Xarie.

Tabla 3.1. Tiempos de retención y distribución de antocianos en la SOL III correspondiente a la variedad Berde Xarie

Tiempo de retención (min)	Compuesto	Area %
13.607	Delfinidin-3-monoglucósido	0.86
18.473	Cianidin-3-monoglucósido	2.03
21.173	Petunidin-3-monoglucósido	5.66
26.823	Peonidin-3-monoglucósido	16.69
29.573	Malvidin-3-monoglucósido	53.37

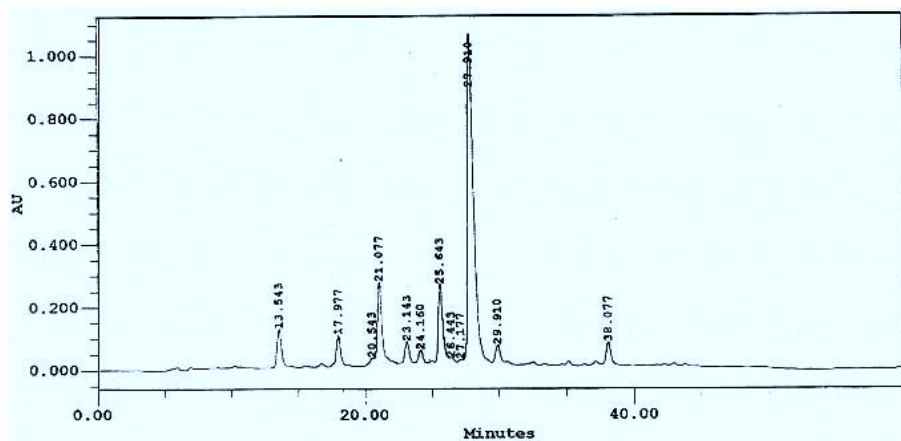


Fig 3.3. Cromatograma correspondiente a la SOL II de variedad Berdexa Baltza

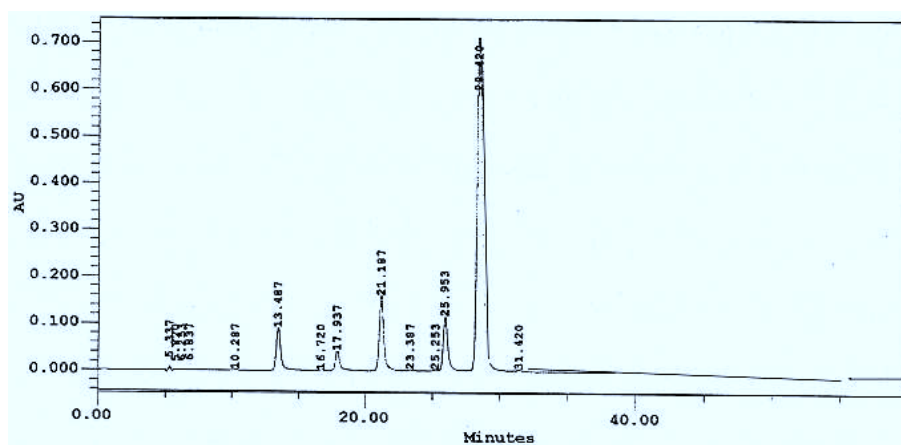


Fig 3.4. Cromatograma correspondiente a la SOL III de variedad Berdexa Baltza

Tabla 3.2. Tiempos de retención y distribución de antocianos en la SOL III correspondiente a la variedad Berdexa Baltza

Tiempo de retención (min)	Compuesto	Area %
13.487	Delfinidin-3-monoglucósido	6.38
17.937	Cianidin-3-monoglucósido	3.03
21.187	Petunidin-3-monoglucósido	12.36
25.953	Peonidin-3-monoglucósido	9.21
28.420	Malvidin-3-monoglucósido	67.41

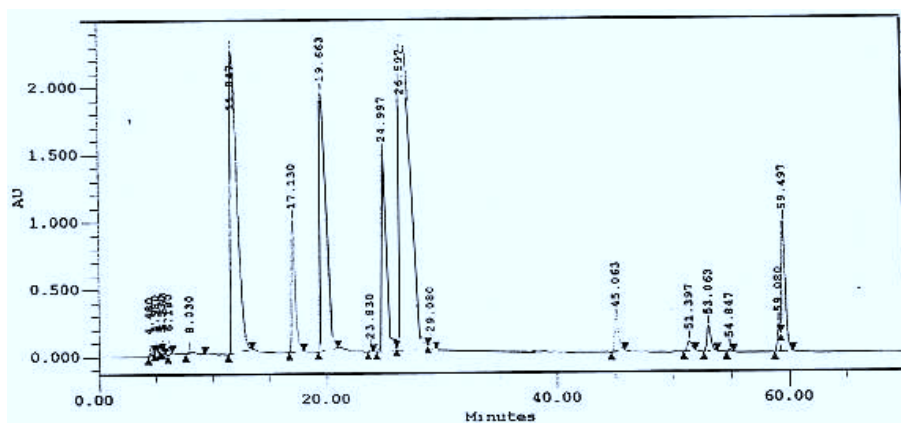


Fig 3.5. Cromatograma correspondiente a la SOL II de variedad Tempranillo

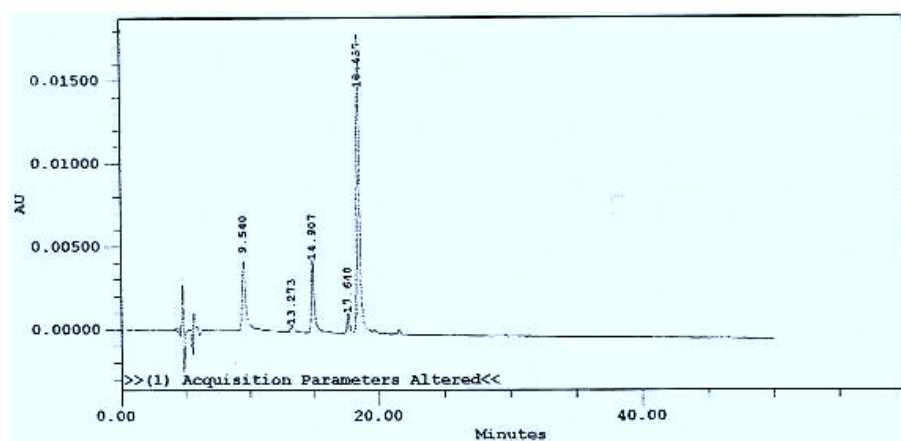


Fig 3.6. Cromatograma correspondiente a la SOL III de variedad Tempranillo

Tabla 3.3. Tiempos de retención y distribución de antocianos en la SOL III correspondiente a la variedad Berde Xarie

Tiempo de retención (min)	Compuesto	Area %
9.540	Delfinidin-3-monoglucósido	20.47
13.273	Cianidin-3-monoglucósido	4.15
14.907	Petunidin-3-monoglucósido	15.27
17.640	Peonidin-3-monoglucósido	8.76
18.440	Malvidin-3-monoglucósido	50.24

La identificación de los antocianos monoglucósidos se efectuó en base a sus tiempos de retención, y principalmente en base a sus propiedades espectrales, por comparación con los obtenidos de patrones puros, aislados en nuestro Laboratorio.

Se sabe que el orden de elución de los antocianos en cromatografía en fase reversa (fase estacionaria no polar - fase móvil polar), está íntimamente relacionado con la polaridad de estos compuestos. Los más polares eluyen primero, seguidos de los menos polares. En este sentido, la delfinidin-3-monoglucósido eluye primero, seguida por orden de los 3-monoglucósidos de cianidina, petunidina, peonidina y malvidina. La acilación de las moléculas antociánicas supone una mayor pérdida de polaridad en el caso de cumaratos y cafeoatos, que en el caso de acetatos. De acuerdo con esto, los pigmentos acilados con ácido acético eluyen después de los 3-monoglucósidos no acilados, seguidos de cumaratos y cafeoatos. Por tanto, como una primera aproximación, el orden de elución como función de la polaridad puede ser empleado para caracterizar los diferentes picos cromatográfico.

En cualquier caso, la acilación disminuye la polaridad de estas sustancias, y en este punto puede mencionarse la presencia de picos cromatográficos adicionales a los correspondientes a los antocianos monoglucósidos que pueden observarse en los cromatogramas de las SOL II de todas la variedades estudiadas. No se efectuó la identificación de cada uno de estos compuestos, aun así es posible confirmar la presencia de compuestos acilados en los extractos en base a su localización en los cromatogramas y sus propiedades espectrales.

Por otro lado, un eluyente con bajo pH es vital para la separación de los antocianos. Los disolventes de elución con un pH de 2.5 producen picos ensanchados y una separación pobre. Por debajo de pH 3.2 los antocianos existen entre dos estructuras que se interconvierten, en catión flavilio rojo y la base carbinol incolora (Timberlake y col., 1967). Los picos son anchos a pH 2.5 porque a este pH coexisten en equilibrio las dos formas, y la columna cromatográfica de fase reversa las distingue, las separa. Sin embargo, en los cromatogramas no aparecen dos picos, ya que la interconversión entre las dos formas es constante. La disolución acuosa de fórmico al 10%, en nuestro caso el disolvente B, tiene un pH de aproximadamente 1.5-2, y a este pH los antocianos se encuentran prácticamente en su totalidad en forma de ion flavilio. En otros trabajos se han empleado otros disolventes para acidificar la fase móvil, tales como ácido perclórico (Preston y Timberlake, 1981), pero siempre con el mismo objetivo.

Respecto a las proporciones en las que aparecen los antocianos en cada una de las variedades, todas coinciden en presentar valores máximos en el contenido de malvidin-3-glucósido, seguido de peonidin-3-glucósido.

Así mismo, el contenido en delfinidin-3-glucósido de las dos variedades autóctonas era muy inferior al que se encontró para la variedad Tempranillo. En el caso de la variedad Berde

Xarie, el contenido en delphinidin-3-glucósido fue significativamente menor al que presentaba la variedad Berdexa Baltza.

Las proporciones de cianidin-3-glucósido resultaron ser similares en las variedades Berdexa Baltza y Berde Xarie, mientras que la variedad Tempranillo presentaba aproximadamente el doble que éstas.

Respecto al porcentaje de peonidin-3-glucósido la variedad Berde Xarie fue la que presentó un valor destacadamente superior respecto a las demás variedades.

3.2. Procianidinas

Los extractos de pepitas obtenidos se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos después de ser filtrados a través de filtros de 0.45 μm de membrana, y haciendo uso de precolumna. A continuación se muestra el cromatograma correspondiente al extracto de acetato de etilo obtenido de pepitas de variedad Tempranillo.

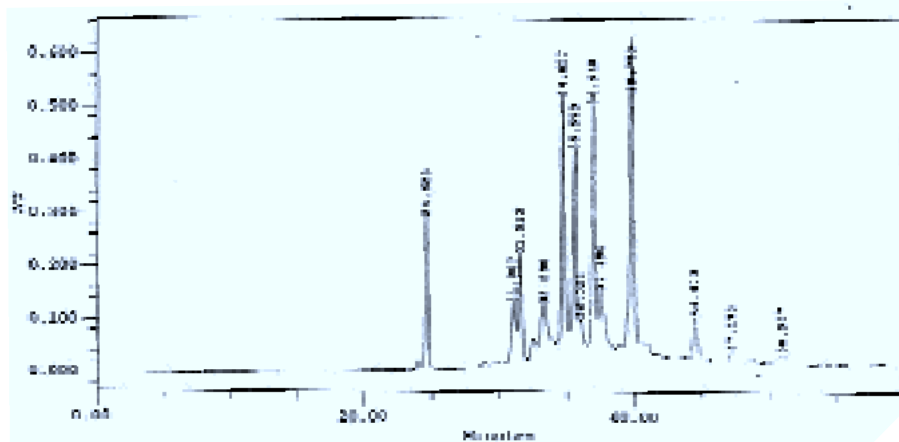


Fig 3.7. Cromatograma correspondiente al extracto de acetato de etilo de pepitas de variedad Tempranillo.

Los cromatogramas correspondientes a los extractos obtenidos con otros disolventes, tales como metanol o acetona al 70%, presentaban una línea base muy irregular, no distinguiéndose picos cromatográficos definidos, por lo que no se muestran en el presente trabajo. Adicionalmente, estos extractos ocasionaron continuas oclusiones en la columna cromatográfica, no mejorando el resultado efectuando una limpieza adicional del extracto por medio de SPE (extracción en fase sólida) como paso previo a su inyección en el cromatógrafo de líquidos.

La identificación de los compuestos presentes en el extracto de acetato de etilo, así como en los demás disolventes no ha sido posible hasta el momento. Por este motivo no pueden ofrecerse resultados definitivos y se continua investigando en este sentido.

4. CONCLUSIONES

El proceso de extracción aplicado sobre las muestras de hollejos de distintas variedades ha permitido aislar los compuestos antociánicos presentes en los mismos, que de otro modo no podrían ser determinados.

La técnica combinada HPLC-PDA ha hecho posible la determinación y la identificación de los distintos antocianos presentes en los extractos.

Atendiendo al contenido en el que se encuentran presentes los compuestos antociánicos en los extractos es posible evidenciar diferencias substanciales entre las diferentes variedades de uva estudiadas. En este sentido, es posible establecer una diferenciación varietal, distinguiendo las variedades autóctonas: Berdexa Baltza y Berde Xarie, en este caso de la variedad foránea Tempranillo.

El proceso de extracción aplicado sobre las muestras de pepitas ha permitido aislar distintas procianidinas a la vista de los cromatogramas obtenidos, a pesar de no haberse podido determinar la naturaleza de las mismas hasta el momento.

5. BIBLIOGRAFIA

- ALBACH R.F., KEPNER R.E. y WEBB A.D., *Food Chem*, 1965, 30, 69-76
- BOUKHARTA M., GIRARDIN M., METCHE M., *J. Chromator.*, 1988, 455, 406
- BOURZEIX M., WEYLAND D., HEREDIA N., *Bull. OIV*, 1986, 59, 1171-1254
- BOURZEIX M., HEREDIA N. y KOVAC V., *Progrés Agric. Viticole*, 1983, 17, 421-7
- BOURZEIX M., HEREDIA N. y ESTRELLA PEDROLA. *Sci. Alim.* 1982, 2, 71-82
- DA SILVA J.M.R., BOURZEIX M., CHEYNIER V. y MOUTOUNET M., *Vitis*, 1991, 30, 245-252
- DA SILVA J.M.R., ROSEC J.P., BOURZEIX M., MOURGUES J., MOUTOUNET M., *Vitis*, 1992, 31, 55-63
- DA SILVA J.M.R., RIGAUD J., CHEYNIER V., CHEMINAT A., MOUTOUNET M., *Phytochem.*, 1991, 30, 1259-1264
- ESCRIBANO-BAILÓN M.T, RIGAUD J., CHEYNIER V., MOUTOUNET M., *Bull. Liaison Gropue polyphénols*, 1992, 16, 79-82
- FONG R.A., KEPNER R.E. y WEBB A.D., *Am. J. Enol. Vitic.*, 1971, 22, 150-155
- HAGERMAN A.E., BUTLER L.G., *J. Agric. food Chem*, 1980, 28, 947
- JAWORSKI A.W., LEE C.Y., *J. agric. Food Chem.*, 1987, 35, 257-259
- KALLITHRAKA S., GARCÍA VIGUERA C., BRIDLE P., BAKKER J., *Phytochemical Analysis*, 1995, 6, , 265-265.
- LEA A.G.H., BRIDLE P., TIMBERLAKE C.F., SINGLETON V.L., 1979, *Am. J. Enol. Vitic.*, 30, 289
- MASQUELIER J., *Bull. O.I.V.*, 1988, 554, 689-690
- OSZMIANSKI J., FRANCOISE M., ROMEYER J.C. y MACHEIX J.J., *Am. J. Enol. Vitic.*, 1986, 37, 7-12
- PRESTON N.W., TIMBERLAKE C.F., *Journal of Chromatography*, 1981, 214, 222-228.
- TIMBERLAKE C.F. y BRIDLE P., *J. Sci. Food Agric.*, 1967, 473-478
- PRIMO YUFÉRA E., *Química agrícola III. Alimentos, Capítulo 5. Las uvas y sus derivados*", Lafuente Ferriols B., Ed. Alhambra, Madrid, 314-337, 1979

RIBEREAU-GAYON P., STONESTREET E., *Chim. Anal.*, 1966, 48, 188

RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., SUDRAUD P., RIBEREAU-GAYON P., *Traité d'Oenologie. Sciences et Techniques du Vin*. Bordas, Paris, 1976

ROMEYER F.M., MACHEIX J. y SAPIS J., *Phytochemistry*, 1986, 25, 219-221

SOMERS T.C., *Phytochem.*, 1971, 10, 2175

WILLIAMS M., HRAZDINA G., WILKINSON M.M., SWEENEY J.G. y IACOBUCCI G.A., *J. Chromatogr.*, 1978, 155, 389-398

WULF L.W. y NAGEL C.W., *Am. J. Enol. Vitic.*, 1978, 29, 42-49

YOKOTSUKA K., SHINKAI S., KUSHIDA T., *J. Ferment. Technol.*, 1980, 58, 2.