



MEMORIA DE LAS ACCIONES DESARROLLADAS  
PROYECTOS DE MEJORA DE LA CALIDAD DOCENTE  
VICERRECTORADO DE PLANIFICACIÓN Y CALIDAD  
IX CONVOCATORIA (2008-2009)



❖ **DATOS IDENTIFICATIVOS:**

**Título del Proyecto**

**Seguimiento de la pasificación de uvas Merlot y Pedro Ximénez mediante ensayos de madurez química y fenólica, como herramienta de aprendizaje interdisciplinar en el modelo del EEES para los estudiantes de Química y Bioquímica Enológica de la licenciatura en Enología.**

**Resumen del desarrollo del Proyecto**

El proyecto se desarrolló acorde con los objetivos propuestos en la solicitud como eran el desarrollo de competencias propias de cada asignatura, a la vez que se consolidaba el grupo docente. Los alumnos expusieron y comentaron los resultados obtenidos en una sesión conjunta y en la que se mantuvo un discurso razonado sobre los mismos. La actividad fue evaluada por los alumnos siendo considerada como positiva, al igual que el año pasado, ya que sirve para consolidar los conocimientos adquiridos en ambas asignaturas.

**Nombre y apellidos**

**Código del Grupo Docente**

**Coordinador/a:**

Rafael Andrés Peinado Amores	026
Jose Peinado Peinado	026

**Otros participantes:**

Maria de las Nieves López de Lerma Extremera	026
Juan Jose Moreno Vigara	026
Manuel Tena Aldave	026

**Asignaturas afectadas**

**Nombre de la asignatura**

**Área de Conocimiento**

**Titulación/es**

QUÍMICA ENOLOGICA

Edafología y Química Agrícola

Lcdo. Enología

BIOQUIMICA ENOLOGICA

Bioquímica y Biología Molecular

Lcdo. Enología

# MEMORIA DE LA ACCIÓN

## 1. Introducción.

Las condiciones climáticas que se registran en la DO Montilla-Moriles a finales de Agosto permite una pasificación rápida y progresiva de las uvas. De los 39 millones de kilos de uva blanca que se esperan vendimiar en 2010, aproximadamente 3 millones de kilos se destinarán a su pasificación, lo que representa un 8%. Mucho menor es la proporción de uva tinta destinada a su pasificación, ya que la mayoría de 6 millones de kilos estimados sólo se espera pasificar una mínima parte, debido a los excedentes en bodega.

Actualmente se elabora vino tinto dulce a partir de uvas tintas Merlot y empleando el mismo procedimiento que para la uva blanca Pedro Ximenez. Una vez conseguido el grado de pasificación adecuado las uvas se prensan para obtener el mosto y el resto de la uva o pasta, piel y semilla, se emplea como subproducto.

Este es el tercer año que se trabaja en la licenciatura de Enología con uvas pasificadas Pedro Ximenez, y la segunda que se hace con las uvas tintas pasificadas. Para su mejor caracterización química y bioquímica, los Departamentos de Química Agrícola y Bioquímica y Biología Molecular han continuado con la coordinación del material de estudio y de las sesiones prácticas. Las asignaturas que se coordinan son de 1º de Enología y en este año se ha ampliado el número de muestras a analizar y se han incorporado nuevos ensayos para obtener una un conocimiento más global al alumno, gracias al grupo de docencia en Enología formado para que las actividades prácticas y teóricas estén integradas para dar una visión más completa y por tanto, una formación más acorde a las directrices del Espacio Europeo.

Los protocolos de prácticas de las asignaturas de Química Enológica y Bioquímica Enológica se han revisado este año para que estén adaptadas al tipo de muestra de modo que los distintos métodos y técnicas de análisis empleadas para al estudio de la pasificación en uvas blancas Pedro Ximénez y tintas Merlot.

## 2. Objetivos.

- Continuar con el estudio de la pasificación en uva blanca Pedro Ximénez y abordar por primera vez el estudio de la pasificación de la uva tinta Merlot en la licenciatura de Enología.
- Establecer un protocolo común para el análisis y seguimiento de la pasificación a partir de la experiencia del año pasado y coordinando las prácticas de las asignaturas Química y Bioquímica Enológica.
- Al igual que el año pasado, se decidió como experimento comprobar las posibilidades de los extractos etanólicos de la pasta prensa de ambos tipos de uvas y que los alumnos evaluaran las posibilidades de estos extractos etanólicos.
- Formar y consolidar un grupo docente con los profesores de las asignaturas de Química y Bioquímica Enológica.

## 3. Descripción de la experiencia.

Se hicieron dos muestreos a comienzos de Septiembre para recoger uvas de las variedades Pedro Ximénez y Merlot de la Cooperativa San Acacio (Montemayor, Córdoba) que habían sido dispuestas en el suelo sobre mallas para su mejor exposición al sol. Las muestras correspondían al día 0 y 7 días de exposición de las uvas al sol.

Se analizaron una completa serie de parámetros para seguir la pasificación, abarcando desde el punto de vista químico y bioquímico.

- *Realizados en los laboratorios de Química Enológica:* grado brix, pH, acidez titulable, capacidad tampón, acidez volátil.
- *Realizados en los laboratorios de Bioquímica Enológica:* análisis de fenólicos mediante dos ensayos y comparación de resultados, capacidad antioxidante y separación de compuestos fenólicos de mostos de uva tinta mediante separación en fase sólida con cartuchos C18.

Además se trató la posible utilización de los macerados con etanol vínico, y también metanol, de los hollejos y pepitas sobrantes como parte de la mejora de la elaboración de Pedro Ximénez y Merlot.

#### **4. Materiales y métodos.**

##### Material para las prácticas de Bioquímica Enológica y Química Enológica

Espectrofotómetros UV-V, cubetas de cuarzo para medida UV, micropipetas, centrífuga así como los reactivos necesarios para la realización de las determinaciones descritas a continuación.

##### Preparación de la muestra

Las uvas tintas de las variedades Merlot y las uvas blancas Pedro Ximénez se expusieron al sol en paseras y se tomaron muestras al azar 5 kilos de uva entre los días 0 y 7 días. Se prensaron las uvas en una prensa manual de laboratorio y se recogió por un lado el mosto o zumo y se congelaron a -20°C hasta su uso. El resto de la uva, consistente en hollejos, pepitas y escobajos, y que se conoce como orujos. Para la maceración de los orujos con etanol o metanol se desecharon los escobajos o partes leñosas del racimo de uvas. La maceración consistió en mezclar el orujo, el disolvente y arena de mar, en la siguiente proporción en peso, 1:2:0,5, y agitar la mezcla durante 15 minutos en un agitador magnético.

##### Determinaciones

- *Determinaciones enológicas*: pH, acidez titulable, acidez volátil, <sup>9</sup>Be y capacidad tampón realizadas según los métodos de la UE (CEE, 1990).

- *Determinación de compuestos fenólicos*: Se analizó el contenido en compuestos fenólicos mediante 1) lectura directa en el espectrofotómetro a 280 nm, y conocido como Índice de Polifenoles Totales (IPT) y,

2) por un ensayo enzimático y detección colorimétrica, que consistió en:

- Tampón de ensayo: en un matraz aforado de 50 mL poner unos 30 mL de tampón fosfato 0,1 M pH 8,0, 220,6 µL de peroxidasa (HRP type IV, de Sigma) de concentración 3 mg/mL, 10,7 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pura al 30% y se completa hasta 50 mL con tampón. Reservar de la luz.

- En tubos de ensayo poner 2,8 mL del tampón de ensayo, 0,1 mL de aminoantipirina 90 mM y hasta 0,1 mL de muestra, completando con tampón fosfato si la muestra fuera menos de 0,1 mL.

- Agitar los tubos inmediatamente y esperar durante 6 minutos, para medir a continuación la absorbancia a 500 nm.

Se ensayaron las muestras con distintos volúmenes, 0,1, 0,05 y 0,025 mL, lo que ha permitido un cálculo estadístico. Los datos de absorbancia obtenidos se extrapolaron en una recta de calibrado en la que se ensayaron distintos volúmenes de catequina 2 mg/mL en etanol al 50%.

Se elaboraron rectas de calibrado para ambos métodos empleando catequina como patrón, y los valores se expresaron en mg/L de catequina mediante la extrapolación de la absorbancia en dichas rectas de calibrado.

- *Ensayo de la actividad antioxidante*: empleando el método que mide la inhibición de la decoloración del radical libre ABTS. Este radical coloreado, absorbancia 734 nm, se genera por incubación del ABTS con peroxidisulfato durante al menos 14 horas. Se diluye hasta absorbancia 0,700 y cualquier sustancia con capacidad antioxidante reacciona con el radical disminuyendo la absorbancia que es proporcional a la concentración de antioxidante. Como patrón antioxidante se empleó el Trolox, la forma soluble sintética del tocoferol. Se ensayó la actividad antioxidante de las muestras empleando 20 µl de muestra diluida 5 veces en agua.

- *Separación de compuestos fenólicos mediante cartuchos C18*. Se describe en la sección de Resultados.

#### **MEMORIA DE LA ACCIÓN**

#### **5. Resultados obtenidos y disponibilidad de uso.**

La pasificación de las uvas supone la pérdida parcial de agua y por tanto, los compuestos presentes se concentran. La concentración en compuestos fenólicos se incrementa durante la

pasificación. Una de las principales características de estos compuestos, que están presentes en todo el reino vegetal, es su capacidad antioxidante y que justifica los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea. En los mostos de uvas pasificadas la capacidad antioxidante aumenta en consonancia con los compuestos fenólicos.

### 5.1. Determinaciones enológicas

Se realizaron la determinación del pH, acidez titulable (A.T. en gramos litros de ácido tartárico), capacidad tampón ( $\pi$ ), contenido en azúcar (gramos por litro) y acidez volátil (A.V: en gramos litros de ácido acético) mediante los métodos oficiales de la comunidad europea. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Variedad	Días	Azúcar (g/L)	pH	A.T.	A.V.	$\pi$
Pedro Ximénez	0	230	3.51	4.1	<0.1	37.9
	7	480	4.15	4.6	0.6	41.3
Merlot	0	230	3.87	4.3	<0.1	34.1
	7	510	4.11	6.1	0.71	38.7

El contenido en azúcar obtenido a los 0 días de pasificación para la variedad Pedro Ximénez es ligeramente inferior al esperado ya que la maduración óptima para esta variedad supone que tenga un contenido en azúcar de unos 255 g/L. No obstante si es óptimo dicho contenido para una variedad tinta como la Merlot. En relación con los valores de acidez titulable se observa un aumento considerable a lo largo de la pasificación en la variedad Merlot. Por último destacar el incremento de la acidez volátil en ambas variedades. Dado que la uva se encontraba en perfecto estado sanitario dicho aumento se debe a los fenómenos anaerobios y de deshidratación propios de la pasificación. El comportamiento de ambas variedades durante la pasificación es a todas luces diferente, de modo que no se debe tomar como referencia los valores tradicionalmente usados para la pasificación de variedades blancas como la Pedro Ximénez en la optimización de la pasificación de variedades tintas, de nueva implantación el la zona.

### 5.2. Medida del contenido en fenoles

Se ha determinado la concentración de compuestos fenólicos mediante dos métodos: i) por lectura directa de la absorbancia a 280 nm y ii) empleando un ensayo enzimático, que consiste en la oxidación de la aminoantipirina por el peróxido de hidrógeno y catalizada por peroxidasa; en presencia de un compuesto fenólico, se da la formación de un compuesto coloreado.

#### 5.2.1 Lectura directa de la absorbancia de las muestras

##### - Muestras de uvas blancas PX

Las muestras se diluyeron convenientemente con agua destilada y se leyó la absorbancia a 280, 420 y 520 nm en cubetas de 10 ó 1 mm de paso óptico. Los resultados de la tabla ya están corregidos.

La concentración de catequina se calculó por extrapolación de los valores de absorbancia a 280 nm en una recta de calibrado de catequina de 2 mg/mL al 10% en etanol.

Muestra PX	280 nm	conc.catequina mg/L		420 nm	520 nm
Mosto día 0	2,42	254		0,55	0,23
Mosto día 2	7,16	496		3,03	1,64
Mosto día 4	7,70	572		3,54	2,08
Mosto día 7	14,93	961		7,65	4,7

A medida que la uva Pedro Ximenez se deshidrata aumenta la concentración de azúcares y también de compuestos fenólicos.

##### - Muestras de uvas tintas Merlot

Las muestras se diluyeron convenientemente con 0,25 mL de etanol y 4,5 mL de HCl al 2%, y siendo 5 mL el volumen final. Se ensayaron 0,25 y 0,1 mL de muestra. Los valores de absorbancia a 280 nm sirvieron para calcular la concentración equivalente en catequina y que se calculó por extrapolación de dichos valores en una recta de calibrado preparada con catequina de concentración 2 mg/mL y medida en las mismas condiciones que las anteriores.

<u>Merlot</u>	<u>Abs 280</u>	<u>conc.catequina</u> <u>mg/L</u>	<u>Abs 520</u>
Mosto día 0	3,73	297	0,54
Mosto día 7	6,25	448	0,91

<i>Extracto Etanol 0</i>	26,4	1.388	4,00
<i>Extracto Etanol 7</i>	18,5	974	1,15

<i>Extracto Metanol 0</i>	14,8	779	1,97
<i>Extracto Metanol 7</i>	8,67	456	0,43

La pasificación de la uva tinta, al igual que sucede con la uva blanca Pedro Ximenez, conlleva una mayor concentración de la uva y de sus componentes y entre los que se encuentran los compuestos fenólicos. Este hecho se da en los mostos, en los que se observa mayor concentración de compuestos fenólicos a lo largo de la pasificación.

Pero en los hollejos, no sucede así. El efecto de secado al sol debe provocar modificaciones en los hollejos que dificulten su extracción, ya que las muestras de hollejos de uvas pasificadas tras 7 días de exposición al sol contenían menos compuestos fenólicos que las de partida, siendo muy clara la disminución de antocianos (valores de absorbancia a 520 nm). Este resultado se dio empleando tanto etanol como metanol como agentes extractantes.

### 5.2.2. Determinación del contenido en fenólicos totales por el método enzimático

Se trata de un método sencillo y robusto que permite una medida más específica de los fenólicos totales. Se emplea tanto para el análisis de muestras de vinos como de mostos, y ésta es su principal ventaja frente al otro método colorimétrico (método de Folin-Ciocalteu) ya que no interfiere una alta concentración de azúcares, como es el caso de las uvas pasificadas que se analizan en estas prácticas.

#### - Muestras de uvas blancas PX

Muestra	Conc. Catequina (mg/mL)
Mosto día 0	169,6
Mosto día 2	220,3
Mosto día 4	245,4
Mosto día 7	377,2

#### - Muestras de uvas tintas Merlot

Muestra	Conc. Catequina (mg/mL)	Muestra	Conc. Catequina (mg/mL)
Mosto día 0	232,5	Mosto día 7	363,3
Extracto Etanol 0	1.272,0	Extracto Etanol 7	801,4
Extracto Metanol 0	942,5	Extracto Metanol 7	490,0

### **5.3. Comparación entre ambos métodos**

Los resultados se resumen en la siguiente tabla y muestran ser bastante similares. El método colorimétrico, de lectura directa, presentó una gran variación en los valores de concentración

equivalente en catequina, hecho que a priori no debe ocurrir a menos que fuera un problema en el manejo de las muestras.

Muestra	Concentración equiv. Catequina (mg/L)	
	Método colorimétrico	Método enzimático
<b>Uvas blancas PX</b>		
Mosto día 0	254	169,6
Mosto día 2	496	220,3
Mosto día 4	572	245,4
Mosto día 7	961	377,2
<b>Uvas tintas Merlot</b>		
Mosto día 0	297	233
Mosto día 7	448	363
Extracto Etanol 0	1.388	1.272,0
Extracto Etanol 7	974	801,4
Extracto Metanol 0	779	942,6
Extracto Metanol 7	456	490,0

#### 5.4. Determinación de la capacidad antioxidante de las muestras.

El ensayo se basa en formar un radical libre estable, coloreado, a partir de la reacción del ABTS con el oxidante persulfato potásico. Los compuestos con capacidad antioxidante serán aquellos que puedan reducir el ABTS<sup>•+</sup>, observándose la inhibición del color del radical libre. A mayor inhibición le corresponde mayor capacidad antioxidante.

Los valores de inhibición obtenidos para las muestras se extrapolaron en una recta de calibrado en la que como antioxidante se usó el Trolox, análogo sintético hidrosoluble del tocoferol o vitamina E, y la concentración se expresa en concentración equivalente en mmoles/L de Trolox.

Muestras	Capacidad antioxidante equiv. Trolox (mmoles/L)	Muestras	Capacidad antioxidante equiv. Trolox (mmoles/L)
Uva blanca PX		Uva tinta Merlot	
Mosto día 0	1,74	Mosto día 0	3,69
Mosto día 2	3,08	Mosto día 7	13,92
Mosto día 4	3,38	Extracto Etanol 1	27,02
Mosto día 7	6,8	Extracto Etanol 5	13,61
		Extracto Metanol 1	26,16
		Extracto Metanol 5	11,86

Lo más notorio es la alta capacidad antioxidante que presenta el zumo de uva pasificada, y en particular en los mostos de uva pasificada tras 7 días de exposición solar. Los hollejos contienen una alta concentración de compuestos fenólicos, más extraíbles cuando la uva es fresca pero menos extraíbles tras la pasificación. Los valores de capacidad antioxidante de los hollejos y los zumos de las uvas pasificadas eran similares.

#### 5.5. Fraccionamiento de compuestos fenólicos

Se emplearon cartuchos SepPack C18 de Waters de 500 mg y se fraccionó la muestra de zumo de uva tinta 5. Tras activar el cartucho con metanol y equilibrar con agua a pH 7 se aplicó 1 ml de mosto ajustado a pH con NaOH 1 M. Se lavó el cartucho con 2,5 mL de los siguientes eluyentes (compuestos eluidos): agua a pH 7 (ácidos fenólicos); agua a pH 2; acetonitrilo al 16% en agua (catequinas); y por último metanol (antocianos).

Se midió la absorbancia de las muestras a 280, 320, 360 y 520 nm convenientemente diluidas en etanol y HCl al 2%.

Eluyentes	Abs 280	Abs 320	Abs 360	Abs 520
Agua pH 7	1,47	0,12	0,02	0,06
Agua pH 2	0,73	0,001	0	0
Acetonitrilo 16%	1,27	0	0	0
Metanol	2,5	0,034	0,013	0,42

Se comprobó que los ácidos fenólicos, catequinas y antocianos componían la mayor parte de los compuestos fenólicos de uva tinta.

## 6. Utilidad

El proyecto de este año es continuación del solicitado el año anterior, en el que se utilizan dos variedades de uva una blanca y una tinta y se comparan los efectos de la pasificación en ambas variedades. De este modo los alumnos no sólo pueden ver el efecto de dicha practica sobre la composición y las características de los mostos, sino también establecer semejanzas y diferencias entre dos variedades de uva.

Al igual que el año anterior se ha hecho hincapié en la repercusión que tiene la pasificación de la uva en la zona Montilla-Moriles. Igualmente se ha abordado la utilidad de aprovechar la pasta procedente del prensado como fuente de antioxidantes naturales así como utilizar los extractos etanólicos de dicha pasta para la elaboración de vinos dulces según el método tradicional.

Los alumnos también han elaborado una memoria de prácticas y han podido dar una explicación global de la pasificación mediante los distintos ensayos y técnicas empleadas. El nivel de implicación del alumnado ha sido óptimo.

Por último, este proyecto ha servido para revisar protocolos de prácticas y comparar entre dos métodos de ensayo de compuestos fenólicos totales, se ha ampliado a los ensayos colorimétricos para uvas tintas, y ambos han debido ajustarse a las características de las uvas pasificadas.

## 7. Autoevaluación de la experiencia.

Como en años anteriores se planteó una encuesta según el siguiente modelo

### **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CONJUNTA ENTRE LAS ASIGNATURAS DE QUÍMICA Y BIOQUÍMICA ENOLÓGICA.**

1. Destaque 3 puntos fuertes de la actividad.
  2. Destaque 3 puntos débiles de la actividad
  3. Escriba 3 propuestas para mejorar los puntos débiles
  4. Cite 3 competencias del enólogo que crea haber tratado en esta actividad.
  - 5 ¿Considera que esta experiencia le ha servido para consolidar los conocimientos que ha adquirido durante el desarrollo de ambas asignaturas?
- SI                      NO                      No sabe/ No contesta

1. En cuanto a los puntos fuertes los alumnos destacan:
  - Toma de contacto de cómo influye ciertos tratamientos prefermentativos con la evolución de distintos parámetros enológicos.
2. De los puntos débiles destacan:
  - Sesiones de prácticas en algunos casos cortas que no permiten terminar algunas determinaciones en una sesión.
3. Mayor flexibilidad en el horario de sesiones de prácticas.

4. Los alumnos tiene una noción cada vez mayor de las competencias del enólogo, aunque no saben enumerar las mismas. No obstante, se abordaron la totalidad de las competencias inicialmente planteadas.
5. Todos los alumnos consideran que dicha experiencia sirve para consolidar conocimientos abordados de forma teórica en ambas asignaturas.

Córdoba a 20 de Septiembre de 2010