

CAPÍTULO 54

Determinación de compuestos
dicarbonílicos en vino.

MÓNICA PALOMINO VASCO

El vino es la bebida que se obtiene de la fermentación alcohólica del zumo de uva fresca. Se trata de una de las bebidas de mayor importancia a lo largo de la historia y posee una gran importancia económica en los países de la cuenca mediterránea. Actualmente, España ocupa el tercer lugar entre los grandes productores de vino, produciendo principalmente vinos tintos de alto grado alcohólico y con muchos pigmentos (Vogt, 1986).

Entre las características más importantes del vino se encuentran el flavor y el color. Se denomina flavor a la combinación de aroma (sustancias volátiles percibidas por la nariz) y sabor (sustancias no volátiles percibidas por la lengua), y procede de la uva empleada y del tratamiento y la fermentación del mosto. Por otro lado, el color del vino viene determinado por la variedad de uva y el proceso de vinificación (Clarke, 2010).

Entre los compuestos que afectan al flavor del vino se encuentran los compuestos dicarbonílicos, de los cuales glioxal y metilglioxal son los representantes más pequeños. Se trata de intermediarios de la reacción de Maillard muy reactivos que se detectan en los alimentos fermentados debido a la actividad microbiana (Barros, Rodrigues, Almeida y Oliva-Teles, 1999). Al reaccionar con diferentes aminoácidos pueden dar lugar a diferentes notas olfativas. Metilglioxal reacciona con cisteína para dar lugar a olores que aumentan la complejidad del vino (palomitas, nueces, tostado y asado), mientras que la reacción con glioxal genera olor a huevos podridos. Glioxal también reacciona con otros aminoácidos dando lugar a notas afrutadas (isoleucina), florales (fenilalanina), amílicas (leucina) u olor a queso (valina) (Pripis-Nicolau, De Revel, Bertrand y Maujean, 2000).

Con la premisa de encontrar una nueva metodología para la detección y cuantificación de estos compuestos en el vino, se realizó una revisión bibliográfica. Se comprobó que la mayoría de los derivatizantes empleados poseían dos grupos aminos contiguos en su molécula. Así se seleccionaron 2,3-diaminopiridina (2,3-DAP) y 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) como posibles derivatizantes.

Se estudiaron sus características fluorescentes, así como su estabilidad y cómo les influía el pH. Después, se comprobó su reactividad con el glioxal, comprobándose que 2,3-DAP producía *quenching* (disminución de la fluorescencia), mientras que 3,4-DAP aumentaba la intensidad de fluorescencia a pH ácidos, por lo que se eligió este último para futuros estudios.

Una vez decidido el derivatizante a emplear, se optimizaron todos los parámetros químicos e instrumentales de la reacción de derivatización. Finalmente, el método que se propuso fue: en matraces de 25 mL se añaden concentraciones de glioxal/metilglioxal y derivatizante en relación 1 a 3 (en unidades de mg/L), así como 2 mL de disolución reguladora de pH 2 (tampón

ácido cloroacético/cloroacetato de sodio de concentración 0,3 M). Estas disoluciones se introducen en un baño a 90°C durante 120 minutos, tras los cuales se para la reacción en baño de hielo. Los matraces son enrasados con agua MilliQ y se mide la intensidad de fluorescencia entre 300 y 500 nm, excitando a 307 nm. El método desarrollado posee una buena linealidad y precisión y un bajo límite de detección.

Tras optimizar la reacción de derivatización se pasaron a optimizar los parámetros de la separación cromatográfica. Se empleó una fase estacionaria C18 para trabajar en fase reversa. La fase móvil elegida fue un tampón ácido acético/acetato de sodio (60 mM, pH 5.5). El caudal elegido fue de 0,65 mL/min. En estas condiciones se obtiene un cromatograma como el que aparece en la Figura 1, en el cual los derivados de los compuestos dicarbonílicos poseen una resolución mayor que 2.

Una vez establecidas las condiciones químicas e instrumentales óptimas, se procedió al establecimiento de las rectas de calibrado, utilizando como señal analítica área y altura de pico. Se ensayaron varias formas de medir la altura y el área de pico: modo automático, a línea base y valle a valle, y se compararon los parámetros de calidad de las rectas obtenidas.

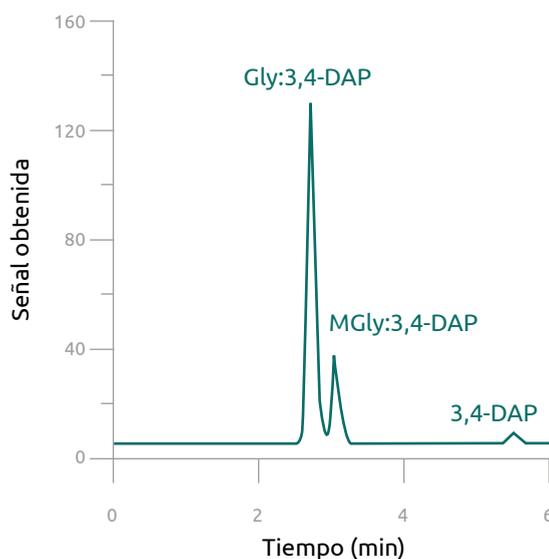


Figura 1. Cromatograma obtenido para los derivados en las condiciones óptimas.

Se observaron mejores características de linealidad y límites de detección en las rectas al medir a línea base. Además, la sensibilidad analítica era mayor cuando se empleaba la altura en vez del área como señal analítica, por lo que se eligió dicho parámetro.

Una vez desarrollado el método, se procedió a aplicarlo a muestras reales, estudiando las concentraciones de glioxal y metilglioxal en 16 vinos monovarietales de la D.O. "Ribera

del Guadiana”, procedentes de distintas uvas y comarcas, y con cosechas entre los años 2006 y 2013, así como dos vinos experimentales cedidos por los alumnos del Grado de Enología de la UEx.

En primer lugar, para comprobar si el análisis era posible sin necesidad de realizar un tratamiento previo a las muestras de vino, se prepararon disoluciones por duplicado que contenían 1 mL de vino y 2 mL de disolución reguladora, así como 1 mg/L de 3,4-DAP en una de las réplicas, para comparar el vino antes y después de derivatizar. Se observó que se derivatizaban muchos compuestos además de los analitos de interés, pero los picos de los dos analitos en estudio no tenían interferencias.

Dado que el vino es una muestra de composición compleja, en la que no se conoce la cantidad existente de cada analito de interés ni se pueden separar del resto de componentes, se decidió emplear el método de adición patrón, que consiste en la adición de cantidades conocidas de disolución patrón a volúmenes iguales de la muestra a analizar. De esta forma se construye una recta de calibrado que, por extrapolación, da el contenido de los analitos en estudio en la muestra.

Para el establecimiento de las rectas de calibrado por adición patrón se procedió a tomar un volumen comprendido entre 0,5 y 1 mL de vino. Se añadieron 2 mL de disolución reguladora, concentraciones variables de patrón comprendidas entre 0,025 y 0,100 mg/L de glioxal y metilglioxal y 1 mg/L de 3,4-DAP. A las disoluciones así preparadas se les aplicó el método optimizado anteriormente y se obtuvieron las rectas de calibrado.

Excluyendo los valores obtenidos para los vinos experimentales, la concentración de glioxal oscila entre 0,1 – 1,0 mg/L en vinos blancos y entre 0,8 – 3 mg/L en tintos. La concentración de metilglioxal, por su parte, oscila entre 0,28 – 1,3 mg/L en blancos y entre 0,5 – 1,8 mg/L en tintos. Las concentraciones de ambos analitos aumentan en vinos tintos, lo cual está de acuerdo con la bibliografía.

Este trabajo ha sido publicado en la revista Food Chemistry (Rodríguez-Cáceres, Palomino-Vasco, Mora-Diez y Acedo-Valenzuela, 2015).

REFERENCIAS

- Barros, A.; Rodrigues, J. A.; Almeida, P. J. y Oliva-Teles, M. T. (1999). Determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in selected beer and wine, by HPLC with UV spectrophotometric detection, after derivatization with o-phenylenediamine. *Journal of Liquid Chromatography and Related Techniques*, 22(13), 2061-2069.
- Clarke, R. J. (2010). Introducción. En R. J. Clarke y J. Bakker (Eds.), *Química del flavor del vino* (pp. 4-6). Zaragoza: Acribia.

- Pripis-Nicolau, L.; De Revel, G.; Bertrand, A. y Maujean, A. (2000). Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3761-3766.
- Rodríguez-Cáceres, M. I.; Palomino-Vasco, M.; Mora-Diez, N. y Acedo-Valenzuela, M. I. (2015). Novel HPLC-Fluorescence methodology for the determination of methylglyoxal and glyoxal. Application to the analysis of monovarietal wines "Ribera del Guadiana". *Food Chemistry*, 187, 159-165.
- Vogt, E. (1986). Vino y viticultura. En E. Vogt, L. Jakob, E. Lemperte y E. Weiss (Eds.), *El vino: obtención, elaboración y análisis* (pp. 1-7). Zaragoza: Acribia.

APUNTES BIOGRÁFICOS

Mónica Palomino Vasco (Mérida, 27 de marzo de 1991) es Graduada en Química por la Universidad de Extremadura, y posee el Máster en Gestión de la Calidad y Trazabilidad de Alimentos de Origen Vegetal por la misma universidad. Reside desde 2009 en Badajoz, y actualmente compagina su contrato como tecnóloga en el Instituto Tecnológico y Agroalimentario de Extremadura (INTAEX-CICYTEX) con sus estudios de doctorado.

Contacto: monicapalominovasco@gmail.com