

## Métodos analíticos para determinación de componentes polifenólicos del vino



Eduardo Boido  
2009

## Determinación de polifenoles en los vinos

- Vino contiene numerosas moléculas fenólicas en cantidad variable.
- Difícil separar diferentes estructuras y dosificarlas por separado.
- Se calculan INDICES, proveen evaluación global del contenido fenólico del vino.
- Permite clasificación de vinos por su riqueza fenólica.

## Indice de Folin-Ciocalteu (IFC)

- Reacción óxido-reducción entre el reactivo de Folin-Ciocalteu (se reduce) y los polifenoles del vino (se oxidan).
- Reactivo Folin-Ciocalteu es una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico (obtenido a partir de  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- Se reduce a una mezcla compleja de compuestos azules (de +6 a mezcla de estados +6/+5).
- Se mide absorbancia a 700 nm del color azul formado (máximo en torno a esa longitud de onda)

## Indice de Polifenoles Totales (IPT)

### Fundamento del método

Toma en cuenta la absorción a 280 nm característica de los ciclos bencénicos de la mayoría de los fenoles.

### Procedimiento

- Centrifugar muestra a analizar
- Diluir el vino (100 veces tintos, 10 veces blancos) con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- Ajustar cero contra agua destilada.
- Registrar la medida de absorbancia a 280 nm de la muestra previamente diluida.

### Cálculos

$$\text{IPT} = A_{280} \times F$$

F = factor de dilución

## Determinación de antocianos

$$At = Al + Ac = Al + TA + TAT$$

At = antocianos totales

Al = antocianos libres

Ac = derivados de antocianinas (tanino-antociano directo o mediada por acetaldehído, tipo visitina y otros)

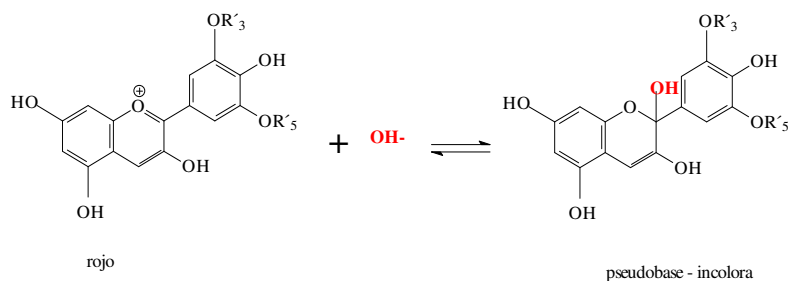
Ac = (TA + TAT)

TA = fracción decolorable con SO<sub>2</sub>

TAT = fracción no decolorable

## Método de Di Stefano

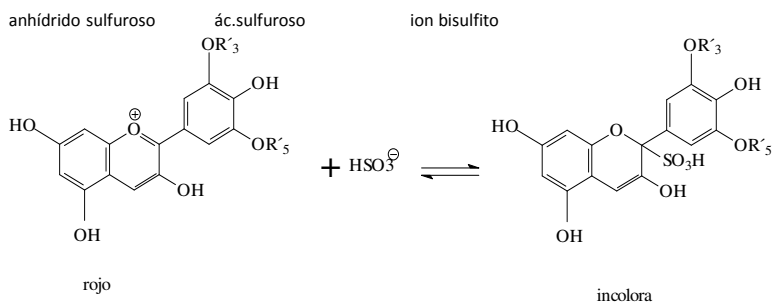
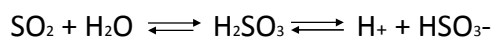
- Método químico basado en una propiedad característica de los antocianos: variación del color en función del pH.



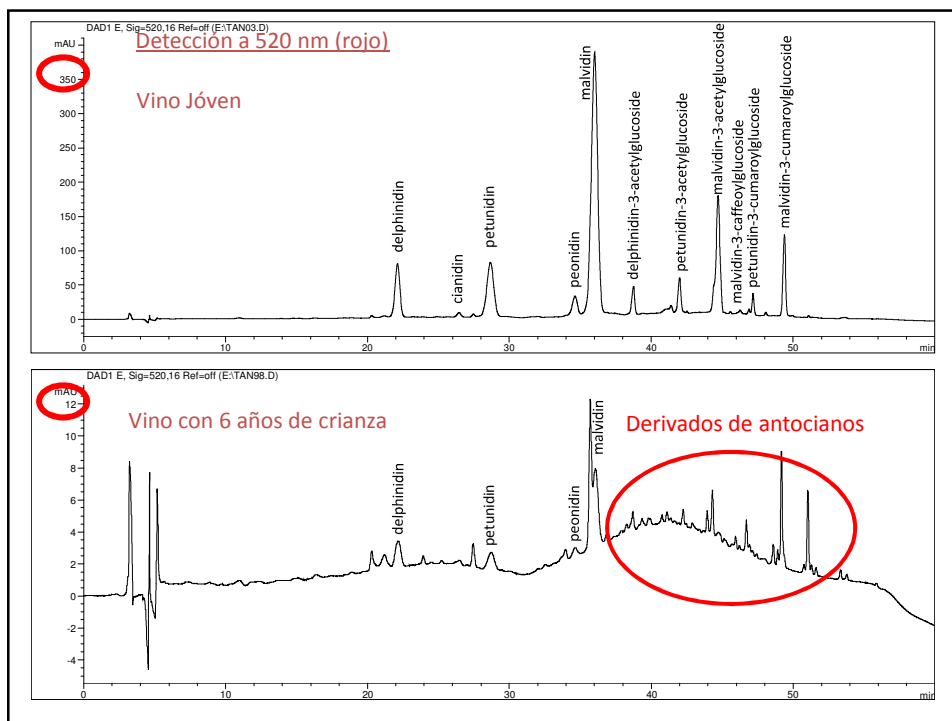
## Método de Decoloración con SO<sub>2</sub>

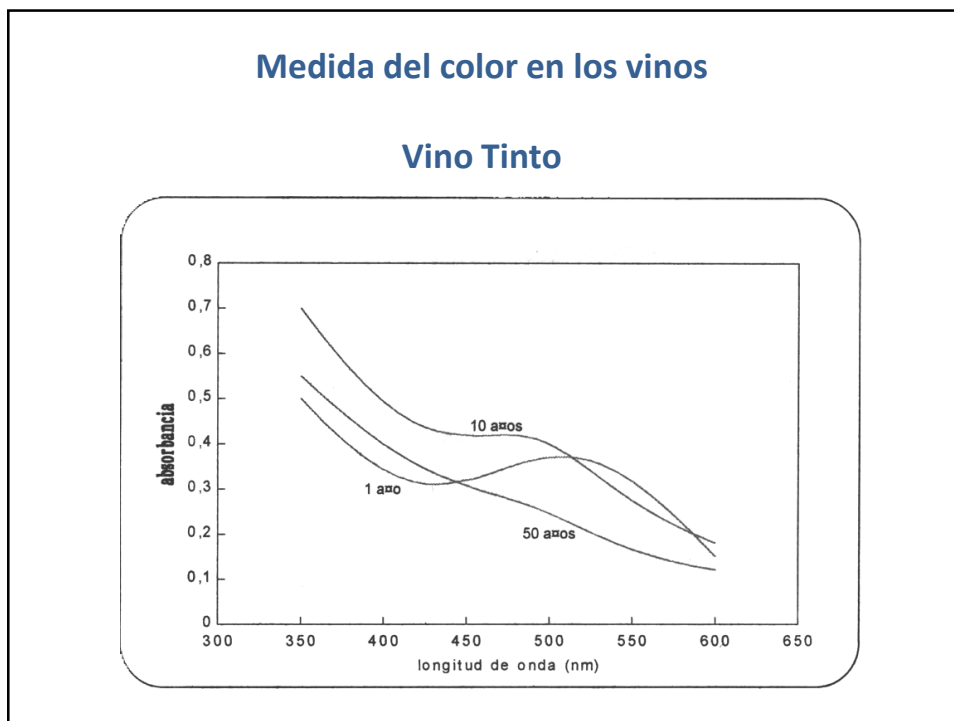
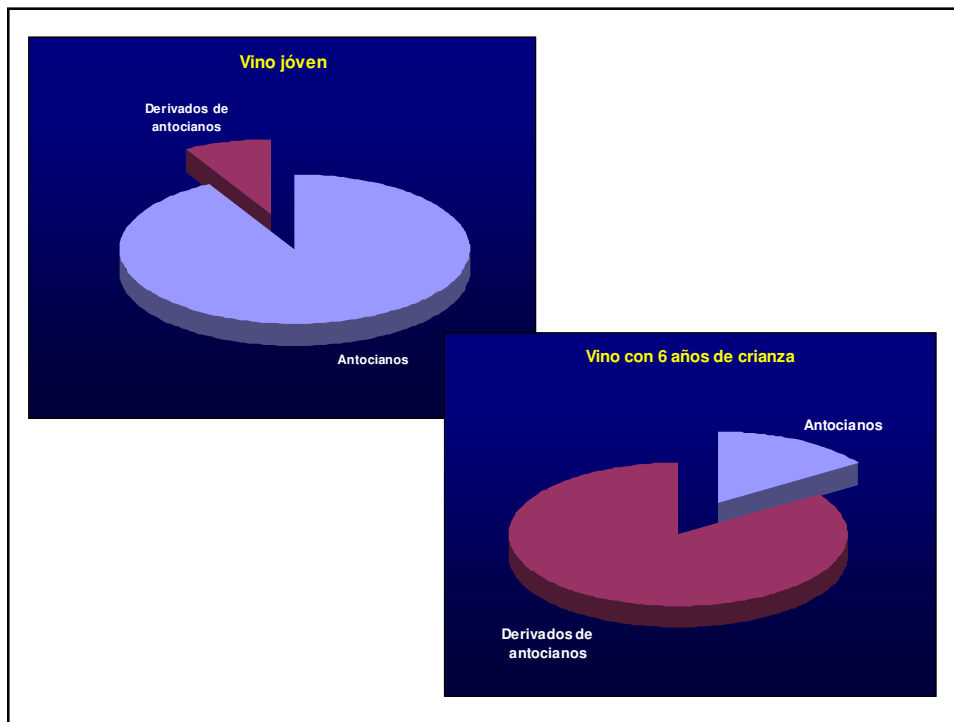
(cuantifica antocianos libres + derivados de antocianos decolorables)

- Utiliza propiedad de los antocianos de combinarse en forma incolora con el **ion bisulfito**.



- Rojo polímero se determina por los pigmentos no decolorables con SO<sub>2</sub>



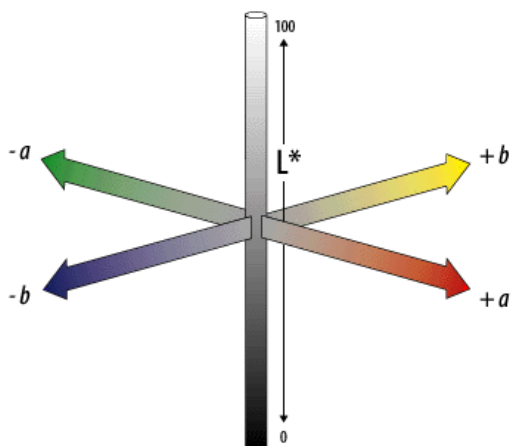


## Medida de color en el vino

- Medir absorbancias a 420, 520 y 620 nm (elegir la celda de paso óptico adecuada, no se puede realizar dilución)

- 1) Intensidad Colorante (IC) =  $(A_{420} + A_{520} + A_{620}) \times F$
- 2) Matiz (T) =  $A_{420} / A_{520}$

## Espacio CIElab



L\* = luminosidad del color

a\* = valores (-) indican verde y (+) rojo

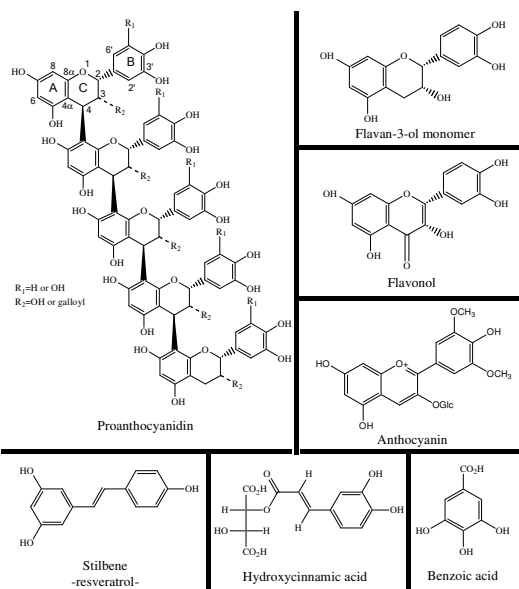
b\* = valores (-) indican azul y (+) amarillo

Expresados en coordenadas polares:

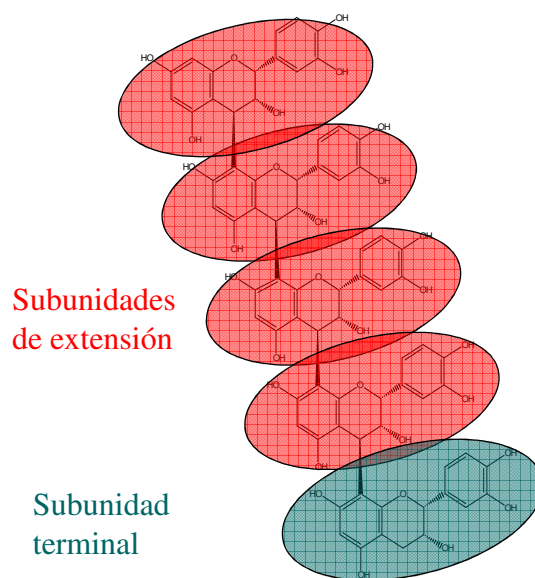
H\* = matiz

C\* = cromaticidad

## Polifenoles en uvas



## Taninos en uvas y vinos



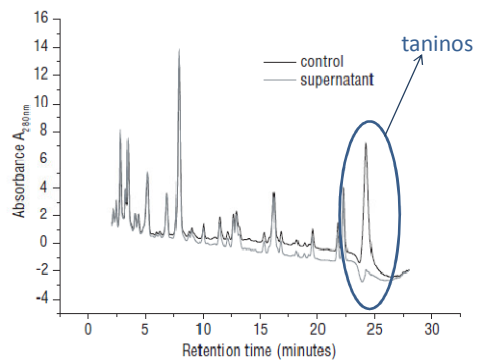
## Determinación de taninos

Precipitación de taninos y cuantificación

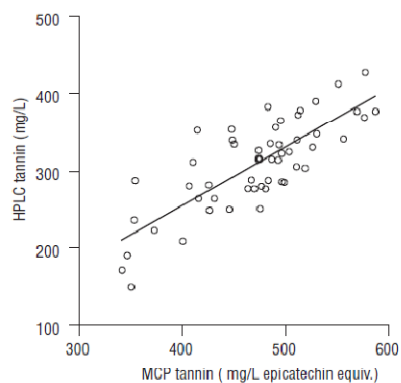
Dos técnicas usando diferentes reactivos:

1- BSA, suero de albumina bovina

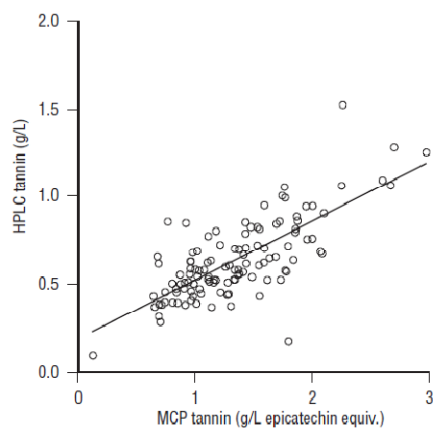
2- metilcelulosa



## Determinación de taninos por precipitación con metilcelulosa

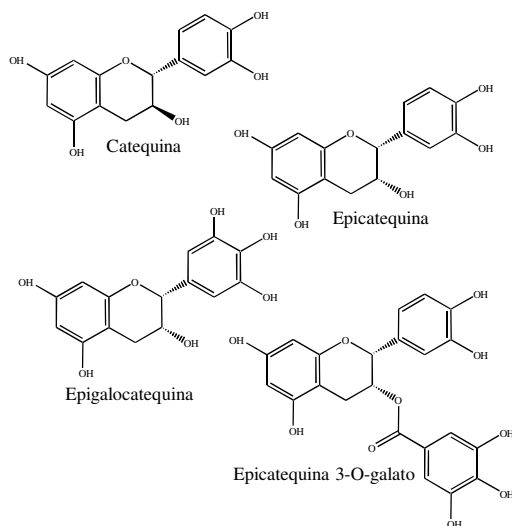


**Figure 3.** Correlation ( $r = 0.79$ ) between tannin (mg/L epicatechin equivalents) as determined by HPLC versus MCP-based tannin assay, in 54 grape extracts.



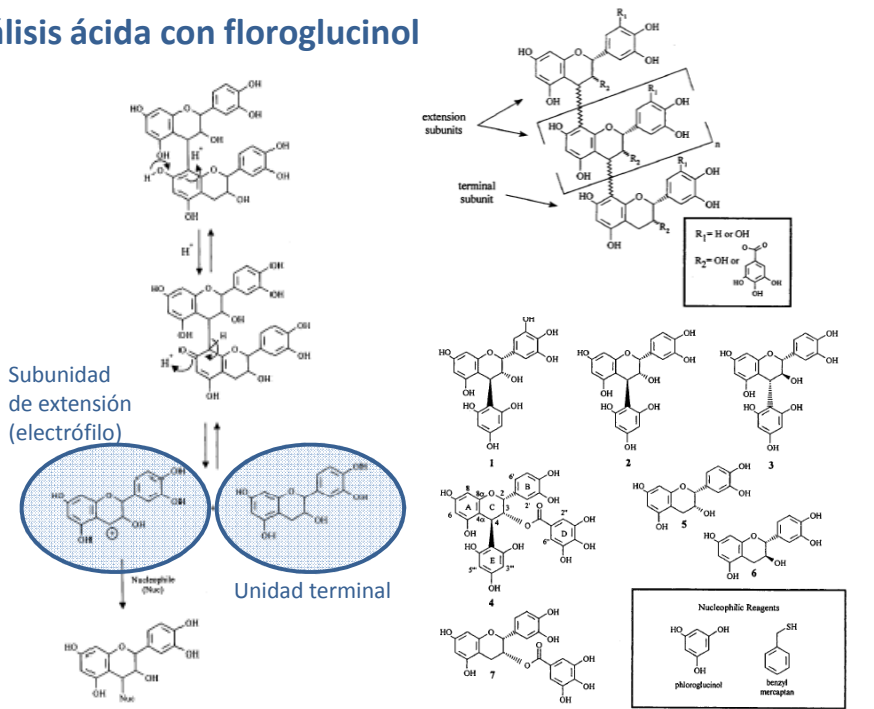
**Figure 4.** Correlation ( $r = 0.74$ ) of red wine tannin (g/L epicatechin equivalent) as determined by HPLC versus MCP-based tannin assay.

## Subunidades de los taninos

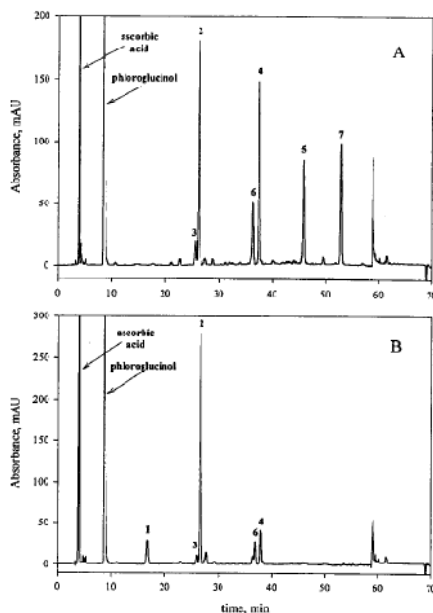


### Catálisis ácida con floroglucinol

Kennedy and Jones, 2001



Kennedy and Jones, 2001

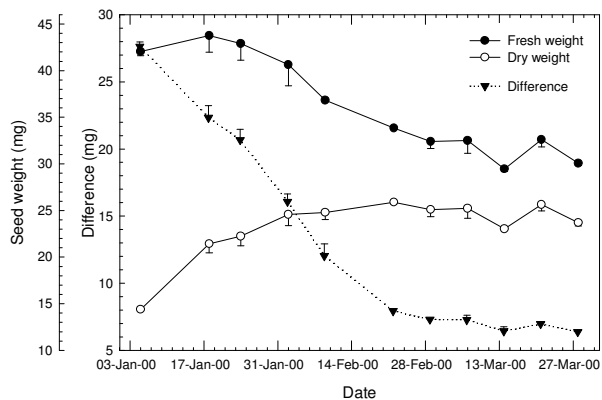


**Figure 3.** HPLC chromatogram of proanthocyanidin cleavage products from (A) Chardonnay grape seed and (B) Chardonnay grape skin following acid-catalysis in the presence of phloroglucinol.

## Taninos de semilla

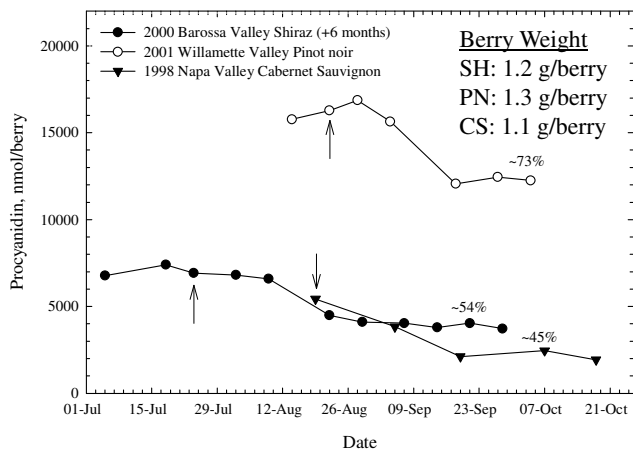
- Gran impacto en la calidad del vino
- La calidad de estos taninos se origina en el viñedo

## Peso de semillas



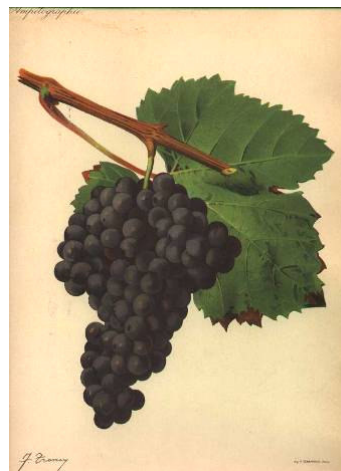
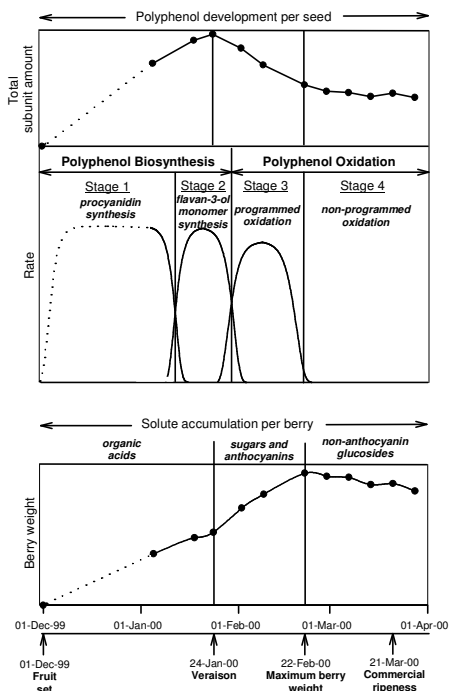
Kennedy et al.  
Aust. J. Grape Wine Res., 6:244-254 (2000)

## Evolución de los taninos de semilla



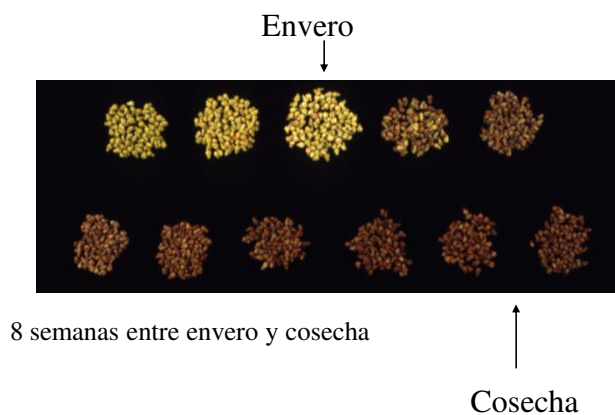
Kennedy et al., 2002

## Evolución de los taninos de semilla

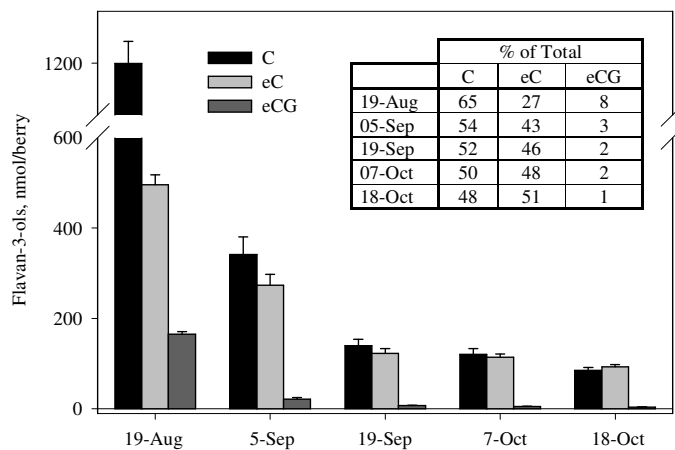


Kennedy et al.  
 Aust. J. Grape Wine Res., 6:244-254 (2000)

## Desarrollo de las semillas



## 3-Flavanoles

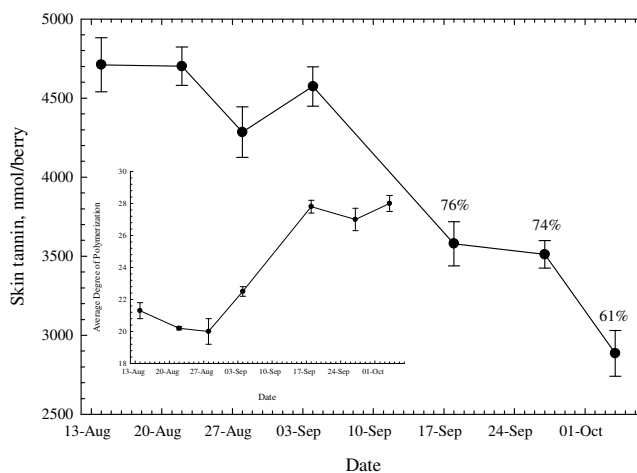


Kennedy et al.  
Phytochemistry, 55:77-85 (2000)

## Taninos de cáscara

- Se hacen evidentes por la incorporación de antocianos
- Variabilidad en la cantidad de extraíbles durante la madurez
- Variabilidad en la distribución por tamaño

## Taninos en cáscara



Kennedy et al., 2002

## En resumen

- Taninos de semilla
  - Aumenta la oxidación
    - Reducción del porcentaje de bajo peso molecular
  - Disminuye la extractibilidad
  - Cambios paralelos a los cambios de color
- Taninos de cáscara
  - Variable grado de polimerización media
  - Incorporación de pigmentos
  - Incorporación de pectina
  - Extracción variable
- Aumento en la proporción de taninos de cáscara respecto a los de semilla

## Ácidos cinámicos en vinos y sus correspondientes esteres tartáricos en uvas

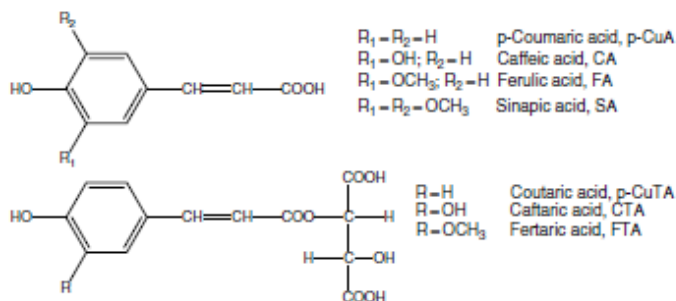
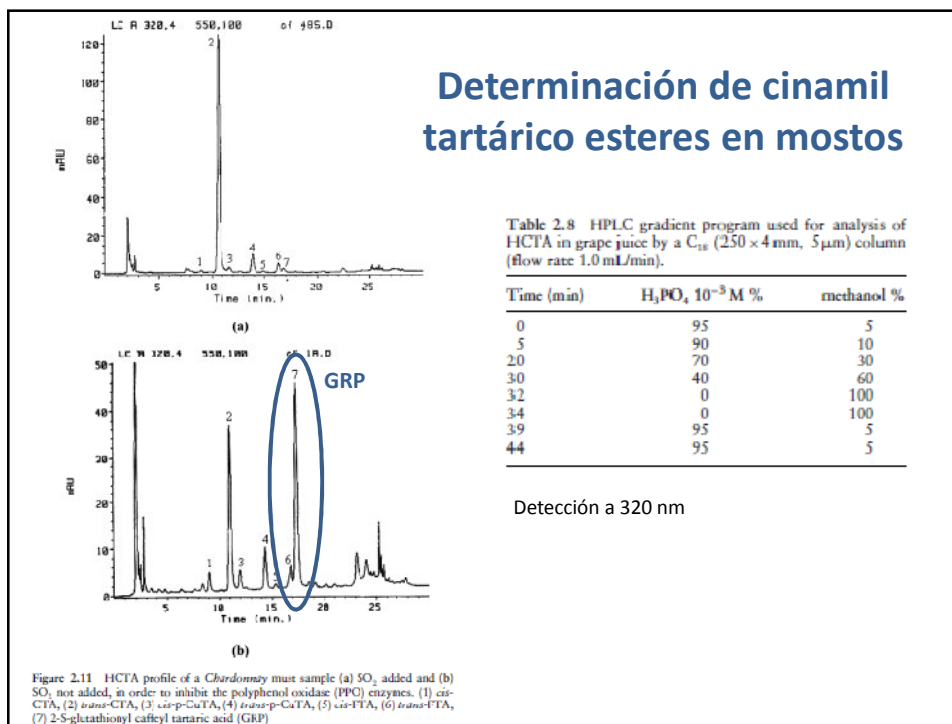
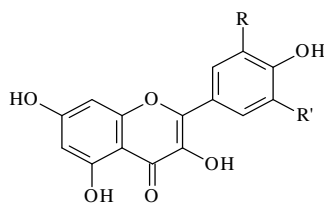


Figure 2.2 Hydroxycinnamoyl tartaric acid (CTA, p-CuTA, FTA) esters in grape and the correspondent hydroxycinnamic acids (HCA) found in wine



## Flavonoles en uvas y vinos



kaemferol  
quercetina  
miricetina

## Determinación de flavonoles

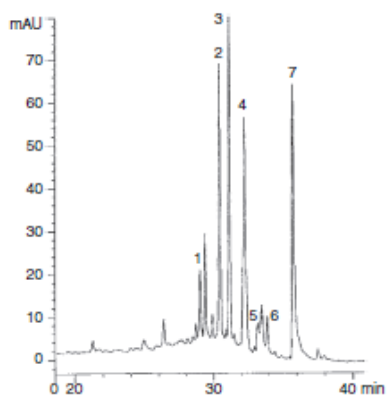
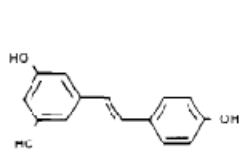
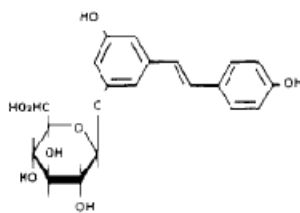


Figure 2.18 HPLC profile of flavonols of a *Brunello di Montalcino* wine recorded at wavelength 360 nm. (1) myricetin glucuronide, (2) myricetin glucoside, (3) quercetin glucuronide, (4) quercetin glucoside + quercetin rutinoside, (5) kaempferol glucuronide, (6) kaempferol glucoside, (7) quercetin aglycone

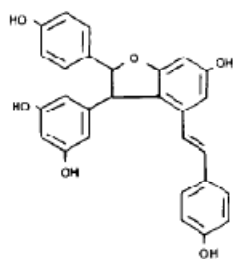
## Stilbenos en uvas y vinos



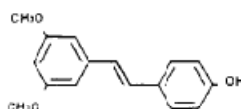
*trans*-resveratrol



*trans* - resveratrol glucoside



ε-viniferin



*trans*-pterostilbene

## Determinación de stilbenos

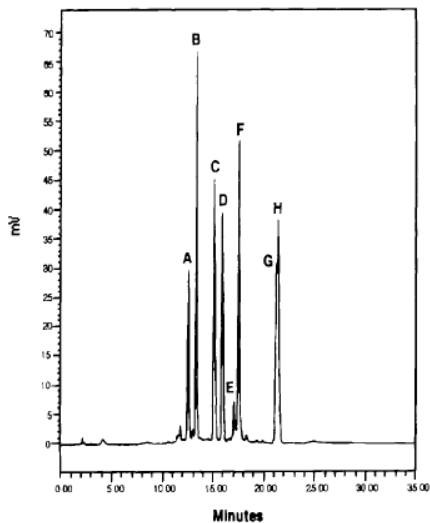


Fig. 2. HPLC chromatogram of the standards used (detection by fluorimetry). Peak A, *trans*-piceid; peak B, *cis*-piceid; peak C, *trans*-resveratrol; peak D, *cis*-resveratrol; peak E, *trans*-resveratrol dehydromer; peak F, *cis*-resveratrol dehydromer; peak G, *trans*-pterostilbene; peak H, *cis*-pterostilbene.

Columna: RP C18  
 Solvente A: Acetonitrilo  
 Solvente B: Agua  
 Detección: tiempo de retención  
 y espectro UV

Adrian et al, Am. J. Enol. Vitic., 2000

## Determinación de stilbenos

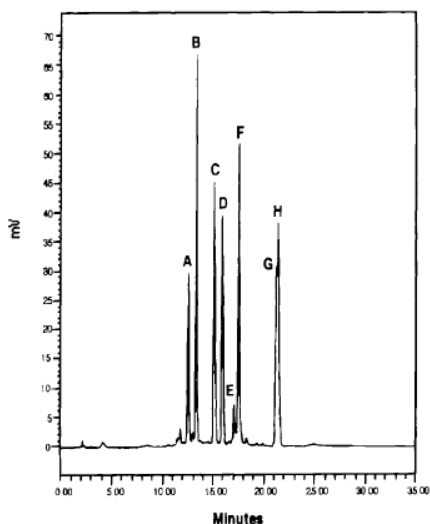


Fig. 2. HPLC chromatogram of the standards used (detection by fluorimetry). Peak A, *trans*-piceid; peak B, *cis*-piceid; peak C, *trans*-resveratrol; peak D, *cis*-resveratrol; peak E, *trans*-resveratrol dehydromer; peak F, *cis*-resveratrol dehydromer; peak G, *trans*-pterostilbene; peak H, *cis*-pterostilbene.

Columna: RP C18  
 Solvente A: Acetonitrilo  
 Solvente B: Agua  
 Detección: tiempo de retención  
 y espectro UV

Adrian et al, Am. J. Enol. Vitic., 2000

## Determinación de procianidinas (HPLC/MS)

-Separar cáscara y semillas

- Semillas

Homogenizar y extraer con metanol (HCl 1%)

Rotaevaporar metanol

Recoger con agua y liofilizar

Reconstituir e inyectar

- Cáscara

Homogenizar y extraer con metanol/agua (75:25)

Rotoevaporar metanol

Recoger con agua y liofilizar

Purificar e inyectar HPLC-MS<sup>n</sup>

Columna C18 de fase reversa 150 x 4,6 mm

Solventes:

A, ácido acético 2,5%

B, ácido acético 2,5%-acetonitrilo (90:10, v:v)

C: acetonitrilo

Gradiente de elución: desde 0 a 100% de B durante 5 min, desde 0 a 15% de C durante 25 min, desde 15 a 50% durante 5 min, e isocrático 50% de C durante 5 min, con un flujo de 0,5 mL/min.

La detección se llevó a cabo a 280 nm (flavanoles)

## Correlación de fenoles totales con la capacidad antioxidante total de ruptura de cadena (reactivo linoleato de metilo)

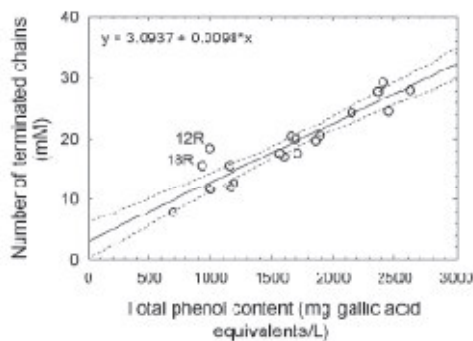


Figure 4 Relationship of antioxidant activity with total phenol content measured using the Folin-Ciocalteu assay.

De Beer et al, Am. J. Enol. Vitic. (2004)