
MEMORIA PRESENTADA POR LA LICENCIADA
ZULEMA PIÑEIRO MÉNDEZ
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Fdo. Zulema Piñeiro Méndez

DR. D. CARMELO GARCÍA BARROSO y DR. D. MIGUEL PALMA LOVILLO,
Profesores del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “*Desarrollo de nuevos métodos de extracción para el análisis de compuestos de interés enológico*”, ha sido realizado bajo su dirección por D^a Zulema Piñeiro Méndez para optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Y para que conste, expiden y firman la presente certificación
En Puerto Real, a 13 de Junio de 2005

Fdo.: Dr. D. Carmelo García Barroso

Fdo.: Dr. D. Miguel Palma Lovillo

DR. D. **JOSE LUIS HIDALGO HIDALGO DE CISNEROS**, Profesor de Química Analítica y Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado “*Desarrollo de nuevos métodos de extracción para el análisis de compuestos de interés enológico*”, constituye la memoria que presenta D^a Zulema Piñeiro Méndez para optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas, habiéndose realizado la investigación en el Departamento de Química Analítica de esta Universidad bajo la dirección de los profesores Dr. D. Carmelo García Barroso y Dr. D. Miguel Palma Lovillo.

Y para que conste, expido y firmo la presente certificación
En Puerto Real, a 13 de Junio de 2005

Fdo.: Dr. D. Jose Luis Hidalgo Hidalgo de Cisneros

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado en cualquier forma durante la realización de todo el trabajo que culmina con la escritura de esta memoria.

A Patricia, por saber compartir todos los interminables días en el laboratorio....., por animarme mientras cortaba y preparaba mis interminables muestras de uva..., por la alegría que transmite cuando habla,... por compartir conmigo muchos intereses (quién te convencería para estudiar Enología????)....., por nuestras charlas de “ponerse al día”....., por su amistad..., hace falta que siga????

A Angie, por todos sus ánimos, por su conversación,... se te echa de menos!! A Cristina, por preguntar siempre como lo llevo, por estar siempre dispuesta a repetirme una y mil veces alguna duda sobre el electroquímico.... por ser mi única compañera en el CAIV durante una gran temporada...

A Mauricio, por estar siempre ahí, tan pendiente de todos... por las copitas del mediodía, por cederme, algunas veces, su número en la cola para ser atendido por el jefe, por su alegría...y también extendiendo mi agradecimiento a Tania, no me olvido!..

A Gerardo, por ser mi compañero en el CAIV, cuando no estaba ni Cristina..., por interesarse siempre por como va la cosa, por no mantenerme ocupado mucho tiempo al jefe...

A Machú, por las charlas que tenemos a media tarde, por estar siempre dispuesta a ayudarte, por sus ánimos, ... por saludarme siempre cuando pasa por los pasillos del CAIV....

A Skike, por compartir las confidencias y gustos cinematográficos, por animar el laboratorio con su arrolladora verborrea, por esa alegría que irradia, por renovar los aires del laboratorio.... por “pelotearme” diciendo que siempre llego la primera y siempre me voy la última....

A Manolo Padilla, por dejarme muchas veces el turno en el cromatógrafo, por preguntar siempre como me va, por sus amenas charlas viajeras, por su punto de vista en muchos aspectos....

A Ana, por ayudarme pacientemente a “pelar” mis uvas, por su alegría..., y también a nuestras últimas incorporaciones, Maitee, Alí, Raquel y Pepa, por su constante interés y apoyo.

A mis compañer@s de Química (M^a José, Nara, Rosario) y de Enología (Isa, Auxi, OC, Manolo...), por preguntarme siempre, por interesarse, por darme ánimos...

Y aunque he empezado por, como dicen por aquí, las nuevas generaciones, no quiere eso decir que me olvide de todos los demás compañeros de “fatigas”:

A Ramón, por su interés constante, por su activa participación en los “debates”, por compartir con todos su alegría y confianza, por participar cada lunes en el debate cinematográfico, por ayudarme siempre...

A Reme, por estar siempre dispuesta a resolverme dudas, por “recordarme” como funciona el cromatógrafo, por aportar siempre el toque realista de las cosas, por animarme...

A Valme, por resolverme mis dudas informáticas, por las tardes de animadas charlas que hacían más llevadero el trabajo, por llevarme en su coche cuando no estaba “automovilizada”....

A Domi, por demostrar que pase lo que pase, lo mejor es tomárselo con muuuucha tranquilidad, por ayudarme siempre que ha podido, por ser mi codirector de beca (mi salvación!)....

A M^a Carmen, por ayudarme siempre que se lo he pedido, por animarme con esa risa que contagia, por “compartir” conmigo su despacho,...

Y ya le toca el turno a los “jefes”:

A Carmelo, por convencerme para hacer el doctorado mientras estudiaba Enología, por confiar en mí, por prestarme su apoyo cuando ha hecho falta, por todas las firmas....

A Miguel, qué te puedo decir?, por todo... por estar siempre ahí, pacientemente, mientras iba tropecientas veces a preguntarte algo... por animarme siempre, por enseñarme, o recordarme, una y mil veces como funciona el cromatógrafo, el Millenium, el gases, el extractor, etc..., por las interminables correcciones, por animarme a ir a EEUU (gracias!), por tantas charlas y risas....

No podía olvidarme tampoco de quienes tengo más cerca:

A mi gran familia, a todos mis hermanos, por preguntar siempre “pero cuando vas a acabar...?”, por animarme, por entender que nunca esté en casa, por confiar en mí, por “aguantar mis malos humores”,... A mi madre, por la paciencia que tiene conmigo, por “aguantarme” (en muchos aspectos) y por estar siempre ahí. A Mara, mi otra mitad, por estar siempre presente aunque sea en la lejanía (que tendrá Francia!), por sus e-mail de ánimo, por intentar entender que son los dichosos polifenoles..., por aconsejarme.... por completarme....

A Manolo, por animarme, por su interés (si hasta entiende casi todo lo que hago!), por estar siempre ahí...

Y a todos los demás que no he nombrado y que me han ayudado de alguna forma, gracias.

Por último, también quisiera agradecer su apoyo a:

La Junta de Andalucía, por haberme concedido la beca que me ha permitido desarrollar una de mis pasiones... la investigación, gracias, gracias, gracias!

Y al CIFA “Rancho de la Merced” por proporcionarme todas las muestras de uva y de vino analizadas, y todos los datos que he necesitado. En especial, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a D. Alberto García de Luján y a Dña. Belén Puertas. También a Elías por estar siempre dispuesto a ayudarme y a guardarme las muestras cuando yo no podía ir personalmente. Gracias!!!.

INDICE

I. INTRODUCCION

I.1 JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	1
I.2 COMPUESTOS FENÓLICOS	5
I.2.1 Introducción	5
I.2.2 Clasificación.....	7
I.2.2.1 Fenoles y ácidos hidroxibenzoicos	8
I.2.2.2 Ac. Hidroxicinamicos.....	9
I.2.2.3 Estilbenos	10
I.2.2.4 Flavonoides.....	11
I.2.2.4.1 Antocianidinas	12
I.2.2.4.2 Flavonoles	14
I.2.2.4.3 Flavanoles (flavan-3-oles).....	14
I.2.2.4.4 Flavonas e isoflavonoides	15
I.2.2.5 Taninos.....	16
I.2.3 Propiedades de los compuestos fenólicos.....	17
I.2.4 Distribución de compuestos fenólicos en uvas y vinos	22
I.2.5 Interés del análisis de compuestos fenólicos	25
I.3 DETERMINACION DE COMPUESTOS FENÓLICOS	26
I.3.1 Técnicas de preparación de muestras	27
I.3.1.1 Muestras líquidas	28
I.3.1.1.1 ELL	28
I.3.1.1.2 EFS.....	30
I.3.1.2 Muestras sólidas	34
I.3.1.2.1 EAU	35
I.3.1.2.2 EAM.....	35
I.3.1.2.3 EFSC.....	37
I.3.1.2.4 EFP.....	39
I.3.2 Separación, identificación y cuantificación.....	48
I.4 COMPUESTOS RELACIONADOS CON EL AROMA PRESENTES EN UVAS Y VINOS	53
I.4.1 Introducción. Tipos de Aromas	53
I.4.2 El Aroma en la uva.....	54
I.4.2.1 Aromas varietales libres	55
I.4.2.1.1 Compuestos terpénicos	56
I.4.2.1.2 Pirazinas.....	60
I.4.2.1.3 C13-norisoprenoides	61
I.4.2.2 Precursores del aroma.....	64
I.4.2.2.1 Monoterpenoles, dioles y polioles terpénicos	64
I.4.2.2.2 Carotenoides	68
I.4.2.2.3Otros precursores (alcoholes, compuestos fenólicos, tioles volátiles)	70
I.4.3 Aroma prefermentativo	71
I.4.4 Aroma fermentativo	71
I.4.5 Influencia de las prácticas vitícolas y tecnológicas en la componente aromática	72
I.4.5.1 Influencia de las prácticas vitícolas	72
I.4.5.2 Influencia de las prácticas tecnológicas.....	74

I.5 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS RELACIONADOS CON EL AROMA.....	75
I.5.1 Técnicas de preparación de muestras	77
I.5.1.1 Técnicas basadas en la destilación.....	78
I.5.1.1.1 Por destilación con vapor	78
I.5.1.1.2 Destilación-extracción simultánea	80
I.5.1.1.3 Otros métodos de destilación	81
I.5.1.2 ELL.....	81
I.5.1.3 EFS	85
I.5.1.4 Técnicas basadas en el estudio del espacio de cabeza	90
I.5.1.5 EAU	95
I.5.1.6 EAM	96
I.5.1.7 EFSC.....	97
I.5.2 Procedimiento cromatográfico	99
Bibliografía Introducción	105
II PARTE EXPERIMENTAL	131
II.1 Reactivos, disolventes y sustancias patrones.....	131
II.2 Aparatos e instrumentos	135
II.3 Técnicas experimentales.....	141
II.3.1 Procedimientos de extracción	141
II.3.1.1 para la determinación de compuestos fenólicos	141
II.3.1.1.1 para la EFP sobre muestras (orujos)	141
II.3.1.1.2 para el acoplamiento EFP-EFS sobre muestras (uvas)	141
II.3.1.1.3 EFP, extracción asistida por ultrasonidos y agitación magnética (pepitas) ..	142
II.3.1.2 Determinación de compuestos relacionados con el aroma	143
II.3.1.2.1 Determinación de precursores: EFS sobre muestras (mostos).....	143
II.3.1.2.2 Determinación de aromas libres: EFS sobre muestras (vinos).....	143
II.3.2 Procedimientos cromatográficos.....	144
II.3.2.1 para la determinación de compuestos fenólicos en general	144
II.3.2.2 para la determinación de <i>trans</i> -resveratrol	145
II.3.2.3 para la determinación de catequinas.....	145
II.3.2.4 para la determinación de compuestos relacionados con el aroma	146
II.3.3 Procedimiento de hidrólisis y medida espectrofotométrica para la determinación de los precursores aromáticos	147
II.3.3.1 Procedimiento de hidrólisis	147
II.3.3.2 Procedimiento de medida espectrofotométrica.....	147
II.4 Muestreo	149
II.5 Preparación de las muestras y cámaras de extracción.....	155
II.5.1 muestras de orujo	155
II.5.2 muestras de uva y pepitas.....	155
II.5.3 preparación de la cámara para la EFP (orujos, pepitas)	155
II.5.4 preparación de la cámara para la EFP-EFS (uvas).....	156
III RESULTADOS Y DISCUSION	159

III.1 Extracción de compuestos fenólicos en orujos con disolventes a alta temperatura (EFP) ...	159
III.1.1 Introducción	159
III.1.2 Estudio de la estabilidad de los compuestos fenólicos	160
III.1.3 Propiedades analíticas del método	164
III.1.4 Aplicación de la EFP a muestras reales (orujos)	165
III.2 Muestras sólidas: EFP y EAU	171
III.2.1 Introducción	171
III.2.2 Determinación de catequinas mediante EFP, estudio comparativo con AM y EAU	172
III.2.2.1 Optimización de método de CLAE	172
III.2.2.2 Comparación de los métodos de extracción	174
III.2.2.3 Optimización de la EFP y aplicación a pepitas	176
III.2.3 Evaluación de las catequinas potencialmente extraíbles de pepitas de uva mediante EAU	179
III.2.4 Estudio de la influencia de la liofilización en la extractabilidad de catequinas	186
III.3 Extracción con fluidos presurizados acoplada con extracción en fase sólida	189
III.3.1 Introducción	189
III.3.2 Desarrollo del método para la determinación de compuestos fenólicos	190
III.3.3 Diseño del método EFP-EFS	203
III.3.4 Metodología	206
III.3.5 Características del método	207
III.3.6 Aplicación a muestras reales (uvas liofilizadas)	208
III.3.6.1 para la determinación de compuestos fenólicos	208
III.3.6.2 seguimiento de la maduración de uvas	214
III.3.6.3 para la determinación de <i>trans</i> -resveratrol	223
III.4 Aplicación de la EFS en uvas y vinos	231
III.4.1 Aplicación de la EFS para la determinación de glucósidos en uvas durante la maduración	231
III.4.1.1 Introducción	232
III.4.1.2 Preparación de las muestras (mostos)	232
III.4.1.3 Determinación de la glucosa glucosídica total (GGT)	233
III.4.2 Aplicación de la EFS a la determinación de terpenos y otros volátiles en vinos	247
III.4.2.1 Introducción	247
III.4.2.2 Determinación de terpenos mediante EFS y CG	248
III.4.2.2.1 Selección de fase sólida y eluyentes	249
III.4.2.2.2 Optimización de las variables de extracción	252
III.4.2.2.3 Propiedades analíticas del método	255
III.4.2.2.4 Aplicación a muestras reales (vinos)	256
III.4.2.3 Aplicación del método desarrollado a la determinación de la fracción volátil de vinos jóvenes monovarietales	260
Bibliografía Experimental	275
IV. CONCLUSIONES	281

ANEXO I

ANEXO II

I. INTRODUCCIÓN

I. Introducción

I.1 Justificación y objetivos

El sector vitivinícola en España está desarrollando una intensa modificación en sus condiciones y sistemas de producción. Estas modificaciones se deben en primer lugar al cambio en los hábitos de consumo de los españoles y en segundo lugar a la competencia, tanto a nivel nacional como internacional, de bodegas originarias de países que hasta hace pocos años tenían poca relevancia en el mercado del vino.

Entre los cambios más importantes se encuentra la introducción en el mercado de nuevos vinos, bien sea por la reorientación de las producciones de las viñas explotadas anteriormente, bien por la puesta en producción de nuevos viñedos, con nuevos sistemas de cultivo o con variedades no utilizadas anteriormente.

Todo esto lleva al personal técnico de la bodega a enfrentarse con nuevas problemáticas que tiene que resolver, a veces, con una información limitada sobre diversos parámetros de interés.

En la memoria que se presenta se ha pretendido dotar de nuevos sistemas para generar información de interés para el sector vitivinícola, tanto en la maduración de la uva, como en la posterior etapa de vinificación. Estos nuevos sistemas son métodos de análisis, basados en unos casos en tecnologías desarrolladas recientemente y, en otros, en nuevas aplicaciones a soluciones tecnológicas ya empleadas anteriormente, cuyos parámetros han sido compuestos con una relación con las propiedades organolépticas y de estabilidad de los vinos; como son los compuestos fenólicos, y los compuestos aromáticos y sus precursores.

Concretamente, entre las nuevas tecnologías que se han aplicado en la presente memoria, destaca la extracción con fluidos presurizados, técnica ésta de amplia aplicación en análisis ambiental y que se está introduciendo en los últimos años en el análisis de alimentos.

Con esta técnica se ha pretendido afrontar el desarrollo de métodos de análisis que permitieran determinar la composición fenólica en uvas enteras. Este es, precisamente, uno de los aspectos más interesantes que se planteó abordar en la tesis, específicamente el desarrollo de métodos que permitan tratar la uva como tal y no el mosto.

Hasta el momento, para estudiar la maduración de la uva, se recurre al análisis de la composición del mosto resultante, es decir, no se analiza la uva, sino el producto de su prensado. Este cambio en la muestra sometida al análisis viene impuesto, en primer lugar, por la ventaja que supone el tratamiento de una muestra líquida o semi-líquida, como es el mosto, frente a una muestra semi-sólida como es la uva. En segundo lugar, no hay que olvidar que a la hora de la vinificación, el interés se centra no tanto en la composición de la uva, sino en la composición del mosto que se va a vinificar y, por ello, en la preparación de la muestra a nivel de laboratorio se ha pretendido reproducir, lo más cercano posible, el procesado de la “muestra” a nivel industrial.

El análisis de la uva entera puede permitir evaluar la composición global de la misma en cuanto a los compuestos de interés en la obtención del mosto, como son algunos compuestos fenólicos, y así una vez sometida a los procesos de prensada, el análisis del mosto logrado, así como de los residuos de la vinificación, pueden ser indicadores de la etapa de obtención del mosto.

Es por ello que al inicio de este estudio se planteó la necesidad de abordar la determinación de parámetros de interés enológico en uvas y en residuos sólidos de la vinificación. Con esta información, desde la responsabilidad técnica de la bodega, se podrían plantear modificaciones en el proceso de obtención del mosto con el fin de variar su composición durante su obtención, extrayendo de la uva aquellos compuestos de interés y controlando la presencia de otros menos interesantes. Estas actuaciones serían mucho más difíciles de plantear sin el conocimiento previo de la composición de la uva.

En relación a los residuos sólidos de la vinificación, podría, llegado el momento, plantearse como una fuente para la recuperación de determinados compuestos de interés económico, y como una forma, por tanto, de incrementar la rentabilidad de las bodegas. Debido a ello, durante el desarrollo de los métodos analíticos que se plantearon al inicio de este estudio, se decidió prestar una especial atención a estas muestras y determinar, dentro de lo posible a nivel analítico, las mejores condiciones de recuperación de diversos compuestos de interés a partir de las mismas.

Respecto a la utilización de la técnica de extracción con fluidos presurizados con vistas a facilitar el uso de la misma, se decidió intentar desarrollar métodos lo más rápidos y selectivos posibles, de forma que, llegado el caso, un laboratorio centralizado pudiera realizar un gran número de análisis en un corto periodo de tiempo y facilitar, de este modo, la información al mayor número de bodegas posible. Para ello, buscando una mayor selectividad, se planteó la utilización de técnicas acopladas de forma directa, reduciendo al mínimo la manipulación de las muestras. Y buscando una mayor rapidez de las determinaciones se pensó en la utilización de sistemas cromatográficos más rápidos (introducción de nuevas columnas de separación) y selectivos (modificación de los sistemas de detección).

El otro gran grupo de compuestos planteados como objetivo al principio de esta memoria fueron los compuestos de tipo terpénico y sus precursores glucosilados, compuestos estos de especial interés en la elaboración de vinos jóvenes.

Para abordar el estudio de estos compuestos se han seleccionado las técnicas basadas en la extracción en fase sólida, puesto que se trata de técnicas simples, abordables por personal con una preparación básica, y de coste no excesivamente alto.

Respecto a la determinación del nivel de precursores glucosilados, el método de la glucosa glucosídica se presentaba como el más apropiado para la determinación rápida de este parámetro, por lo que se decidió evaluar su aplicabilidad a las uvas cultivadas en la zona de Jerez, dónde los niveles de glucosa son superiores a los obtenidos en zonas donde se había aplicado hasta el momento el método citado.

Por otro lado, el estudio de la composición terpénica se ha abordado aplicando la técnica de extracción en fase sólida como alternativa a los métodos existentes hasta el momento para el análisis de la composición aromática de vinos. Debido al avance que la técnica de extracción en fase sólida ha tenido en los últimos años, se ha planteado el estudio sistemático del uso de nuevas fases sólidas para la determinación de la fracción terpénica, realizando un estudio comparativo de las mismas.

La utilidad de los resultados inicialmente se buscó tanto en la información de la caracterización de la composición terpénica, como en la referente a precursores aromáticos de diferentes variedades de uva. Se pensó que esto podría ser de especial utilidad para bodegas que deban plantear la introducción de nuevas variedades en sus sistemas de producción, para la realización de mezclas de vinos para la obtención de nuevos productos, y a la hora de tomar la decisión sobre la mejor fecha para la vendimia.

Se estimó en cualquier caso, que la determinación de la composición aromática y de los precursores no es actualmente una medida que se realice de forma habitual en las bodegas y por ello, se planteó que sería interesante determinar la posibilidad de la estimación de sus valores, particularmente el valor de los niveles de precursores, a partir de los datos que se obtienen de forma habitual durante el proceso de maduración, por lo que se decidió dedicar una atención especial a este punto, empleando para ellos técnicas de tratamiento de datos.

Por todo ello, y con el objetivo fundamental de dotar al sector vitivinícola de métodos analíticos que permitan la obtención de información de interés para el desarrollo y mejora de sus productos, se planteó el trabajo recogido en la presente memoria, con los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Evaluar la posibilidad del uso de la extracción con fluidos presurizados en la determinación de la composición fenólica de uvas y de residuos de vinificación

- 2.- Desarrollar métodos rápidos para la determinación de polifenoles de interés, concretamente ésteres, catequinas y resveratrol, en uvas y residuos de vinificación.

- 3.- Incrementar la selectividad de los métodos desarrollados mediante acoplamiento directo entre técnicas de extracción.

- 4.- Evaluar las diferentes fases sólidas disponibles comercialmente para el desarrollo de un método de determinación de compuestos terpénicos en vinos.

- 5.- Evaluar la utilización del método de la glucosa glucosídica total en la determinación de precursores aromáticos en uvas cultivadas en climas cálidos y estudiar la posible correlación con los parámetros habitualmente controlados durante la maduración de esas uvas.

I.2 Compuestos fenólicos

I.2.1 Introducción

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un grupo considerable de compuestos que pueden definirse, de una forma concisa y desde el punto de vista químico como compuestos orgánicos presentes en la naturaleza que poseen, al menos, un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo unidos a él (esos grupos funcionales pueden ser sustituidos por ésteres, metil-éster, glicósidos, etc...), aunque una definición más precisa se basa en su origen metabólico como aquellas sustancias derivadas del metabolismo de la ruta del shikímico y de los fenilpropanoides.¹

Los compuestos polifenólicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, principalmente en forma de subproductos generados por el metabolismo, apareciendo como metabolitos secundarios en todas las plantas.²

Estos compuestos pueden acumularse como productos finales de dos rutas bioquímicas distintas (tal como se refleja en el esquema mostrado en la siguiente página): la ruta del shikímico, que genera los fenilpropanoides y cumarinas, o la ruta del acetato, que proporciona las fenonas más simples y varias quinonas. Además pueden generarse a través de una ruta metabólica intermedia que genera flavonoides, siendo éste el grupo más importante y numeroso de los compuestos polifenólicos.

La naturaleza química de los compuestos polifenólicos es muy heterogénea y engloba un amplio surtido de disposiciones estructurales de familias de polifenoles que pueden englobar desde estructuras libres a conjugadas (estructuras polifenólicas unidas a otras sustancias de distinta naturaleza).³ Esto implica, con bastante frecuencia, la participación de azúcares naturales, unidos químicamente en virtud de su tamaño molecular a uno o más grupos funcionales polifenólicos. De esa forma se unen monosacáridos como la glucosa, galactosa, arabinosa, rhamnosa, xilosa, manosa y glucurónico, así como ácidos galacturónicos. Así, los flavonoides son compuestos polifenólicos que reflejan un gran número de estos diseños estructurales. Los ácidos hidroxicinámicos también constituyen un ejemplo representativo de estructuras que están asociadas con otras sustancias, no necesariamente polifenoles, en la naturaleza.

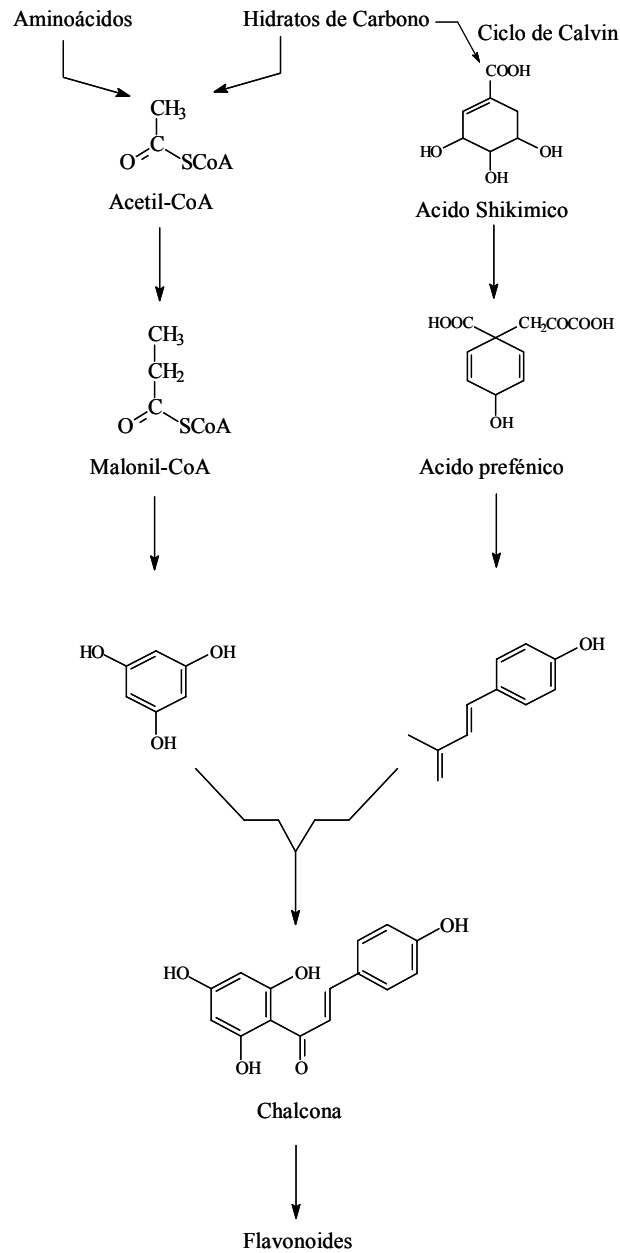


Figura 1 Esquema de las rutas biosintéticas de los compuestos fenólicos

I.2.2 Clasificación de los compuestos fenólicos

Según Harborne (1989) podemos clasificar los compuestos fenólicos basándonos en su estructura. Los grupos serían los siguientes:

Estructura	Clase fenólica
C_6	Fenoles
C_6-C_1	Ácidos hidroxibenzoicos
C_6-C_2	Acetofenonas y ácidos fenilacéticos
C_6-C_3	Ácidos cinámicos, cumarinas, Isocumarinas y cromonas
C_6-C_4	Naftoquinonas
$C_6-C_1-C_6$	Benzofenonas, xantonas
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos, antraquinonas
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides: flavanonas, flavonoles, ^I Antocianidinas, chalconas, flavanoles ^I Auronas, flavonas e isoflavonas ^{II}
$(C_6-C_3)_2$	Lignanós
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Bioflavonoides, biflavanos
$(C_6-C_3)_n$	Ligninas
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Proantocianidinas ^{III}

I: principalmente estructuras flavan-3-oles

II: isoflavonoides

III: taninos condensados

Existe una clasificación alternativa propuesta por el mismo autor en función de su situación y distribución en el reino vegetal. Por lo que se sabe sobre estos compuestos, podemos hacer una distinción clara entre aquellos que están ampliamente distribuidos y aquellos cuya presencia es casi esporádica. Así, por ejemplo, puede comprobarse que los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, así como los flavonoides, están universalmente distribuidos en alimentos de origen vegetal. Por el contrario los isoflavonoides constituyen un grupo discreto cuya presencia queda confinada a la familia de las plantas leguminosas.

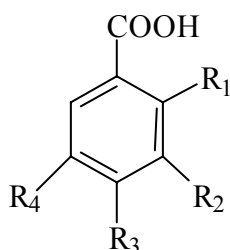
Si tenemos en cuenta la heterogeneidad y extensa distribución de los compuestos polifenólicos en el reino vegetal, puede deducirse fácilmente que este tipo de sustancias forman parte integral de nuestra dieta diaria a través de la ingestión de alimentos preparados a partir de vegetales.

I.2.2.1 Fenoles y ácidos hidroxibenzoicos

Son las estructuras más simples dentro del conjunto de compuestos fenólicos, que incluyen las estructuras C6 y C6-C2 respectivamente. A pesar de su simplicidad estructural, los analitos resultantes se han citado en muchas ocasiones en estudios centrados en la taxonomía de plantas, reflejando estrechamente el grado y la naturaleza de las estructuras presentes con propiedades dadas de la planta.

Las estructuras de hidroquinonas son los fenoles más representativos en términos de variedad y frecuencia de aparición. Con respecto a las estructuras ácidas, es necesario enfatizar la importancia de los ácidos vainillínico y gálico, como las estructuras polifenólicas más representativas y ampliamente distribuidas.

Figura 2 Ácidos hidroxibenzoicos



$R_1=R_2=R_4=H$, $R_3=OH$ ac. phidroxibenzoico

$R_1=OH$, $R_2=R_3=R_4=H$ ac. salicílico

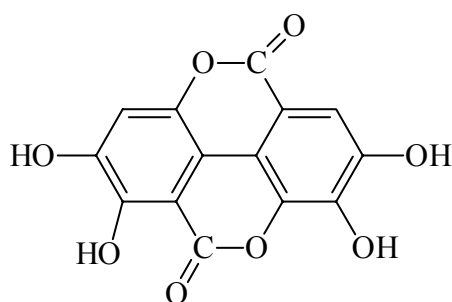
$R_1=R_4=H$, $R_2=OCH_3$, $R_3=OH$ ac. vainillínico

$R_1=R_4=H$, $R_2=R_3=OH$ ac. protocatéquico

$R_1=H$, $R_2=R_3=R_4=OH$ ac. gálico

A pesar de la pronunciada complejidad estructural el ácido elágico puede considerarse como otro miembro representativo de esta familia polifenólica que, con el ácido gálico, constituye la base monomérica relacionada con los taninos hidrolizables. Este tipo de compuesto es responsable de una función biológica determinada siendo necesario para actividades vitales de la planta como la germinación de las semillas y el propio crecimiento de la misma.

Figura 3 Ácido elágico



I.2.2.2 Ácidos hidroxicinámicos

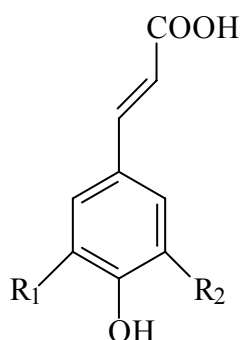
Constituyen el grupo más ampliamente distribuido de los compuestos también conocidos como fenilpropanoides. Entre ellos hay cuatro estructuras básicas que existen en su estado natural libre y se corresponden con los ácidos cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico.

Al igual que otros compuestos polifenólicos, la mayoría de estas estructuras se encuentran en el reino vegetal químicamente asociados a otros tipos de compuestos. Un ejemplo claro de importancia universal lo constituye la esterificación del ácido cafeico con el ácido quínico para formar una estructura ampliamente distribuida en comestibles, el ácido clorogénico.

Muchas funciones biológicas están íntimamente relacionadas con la presencia de estos compuestos en las plantas y comprenden propiedades antibióticas y relacionadas con la inhibición del crecimiento y germinación.

Existen isómeros *cis* y *trans* de estos ácidos, aunque en la naturaleza la más frecuente es la *trans*.

Figura 4 Ácidos hidroxicinámicos



$R_1=R_2=H$ ac. pcumárico

$R_1=OH, R_2=H$ ac. cafeico

$R_1=OCH_3, R_2=H$ ac. ferúlico

$R_1=R_2=OCH_3$ ac. sinápico

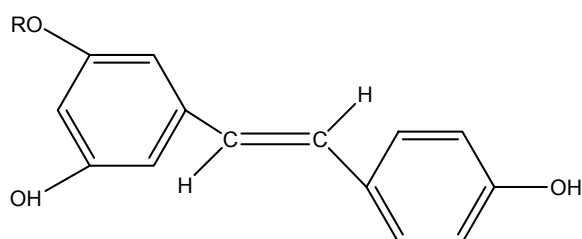
I.2.2.3 Estilbenos

Familia de compuestos constituida por dos ciclos benceno, generalmente enlazados por una cadena etano o etileno ($C_6-C_2-C_6$). Entre los isómeros *trans* de estos compuestos, destaca el resveratrol, o 3,5,4'-trihidroxiestilbeno, por sus propiedades beneficiosas para la salud, y que parece generarse en la uva como respuesta a una infección fúngica,⁴ o a situaciones de estrés.

Este compuesto se localiza en los hollejos, y se extrae fundamentalmente durante la fermentación de vinos tintos, aunque también se encuentra, en niveles más bajos, en vinos blancos. Sus concentraciones son del orden de 1-3 mg/l, aunque varían según las variedades, siendo al parecer la Pinot Noir especialmente rica.

Además del resveratrol, se han identificado distintos oligómeros del mismo en viñas, así, Waterhouse,⁵ Lamuela-Raventós⁶ o Domínguez y col.⁷ detectan la presencia de un glucósido del resveratrol denominado piceido.

Figura 5 Estilbenos



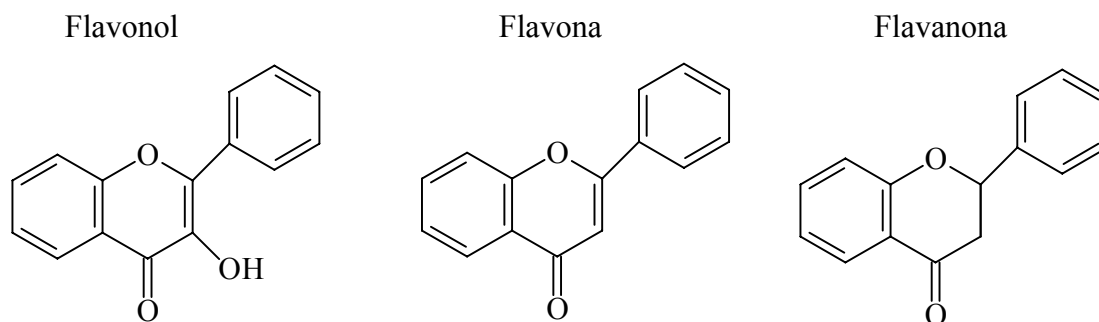
R = H Trans-resveratrol
 R = Glucosa Piceido

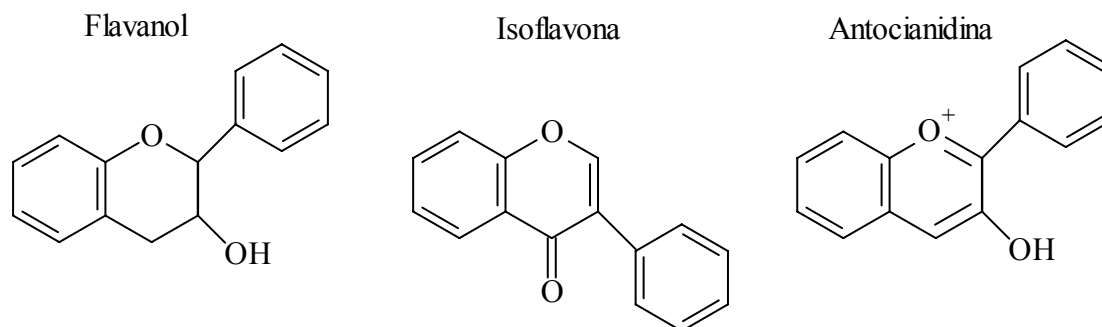
I.2.2.4 Flavonoides

Las principales estructuras de este grupo que podemos encontrar distribuidas en alimentos son antocianinas, flavanoles, flavanonas, flavonoles, flavonas, isoflavonoides y chalconas.

El término “aglicona” representa un flavonoide no unido a ninguna otra sustancia química, independientemente del tipo de flavonoide que se considere. El término “glicósido”, o más generalmente “estructura glicosilada” se emplea para indicar estructuras resultantes de la unión a cualquier tipo de azúcar

Figura 6 Estructuras mayoritarias de flavonoides





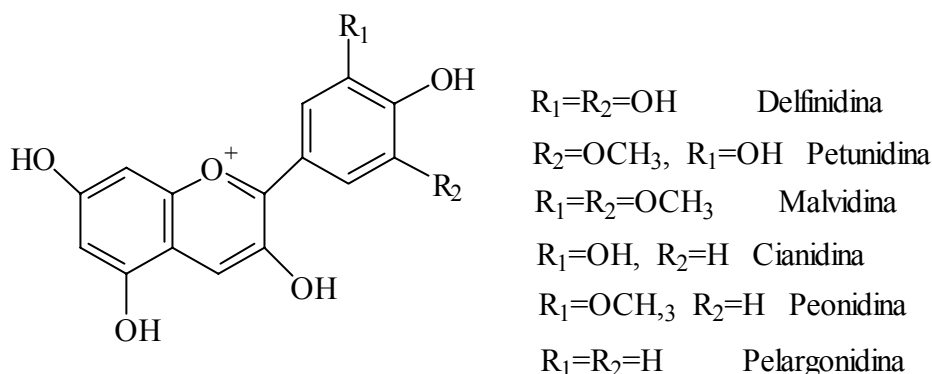
I.2.2.4.1 Antocianidinas

Son pigmentos que confieren colores a los frutos^{8,9} a pesar del hecho de que en algunos de esos frutos (naranja y tomate) el mencionado color es debido a los carotenoides. Las antocianidinas no glicosiladas (agliconas) puede encontrarse como cationes en medio ácido en forma de diferentes isómeros. Las propiedades de pigmentación de las antocianidinas han sido explotadas por la industria alimentaria como aditivos en zumos y mermeladas¹⁰.

La estabilidad de las antocianidinas depende en gran medida del pH, debido a sus propiedades ácido-base.

Con respecto a las estructuras de antocianidinas más ampliamente distribuidas en el reino vegetal, los seis compuestos que se citan a continuación son los responsables de la mayoría de la pigmentación en los frutos: cianidina, normalmente encontrada en su estado molecular libre (no glicosilado), es quizás la más común,¹¹ seguida por la delfinidina, peonidina, pelargonidina, petunidina y malvidina. Las antocianidinas generalmente aparecen como glicósidos de las agliconas previamente citadas.

Figura 7 Antocianidinas



Es posible detectar diferencias cuantitativas en su distribución, basadas en el grado de maduración del fruto así como en las condiciones climáticas bajo las cuales crece, con la intensidad de la luz y la temperatura ambiental como los factores más decisivos.

Una de las principales características exhibidas por las antocianidinas deriva del hecho de que, en la inmensa mayoría de casos, estos compuestos tienden a estar monoglicosilados. La glicosilación de las antocianidinas siempre se lleva a cabo en la posición 3 a través de un puente de oxígeno (enlace O-glicosídico) con glucosa, arabinosa o galactosa.

La cianidina glicosilada con glucosa como azúcar participante, es la estructura más abundante en frutos, aunque pueden encontrarse también otras estructuras glicosiladas en la composición total antocianidínica de este tipo de muestras.

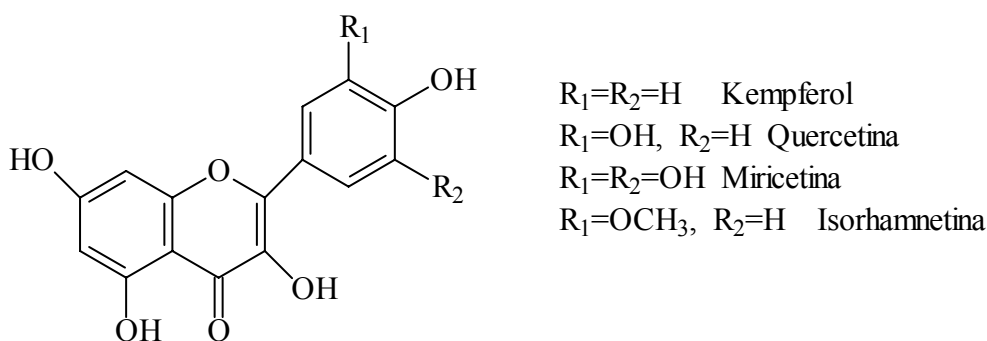
Por otro lado, las antocianidinas acetiladas (químicamente unidas a un ácido) están distribuidas ampliamente en frutos, especialmente en uvas, donde la composición de estas sustancias es bastante compleja debido a la presencia de estructuras monoglicosiladas originarias de las 6 agliconas diferentes. Al mismo tiempo pueden aparecer acetiladas con ácido acético o cumárico.¹²

I.2.2.4.2 Flavonoles

Este tipo de estructuras flavonoideas está ampliamente distribuido en el reino vegetal, formando parte integral de nuestra dieta diaria. Por este motivo, y porque recientemente se han descrito propiedades beneficiosas para la salud, son numerosos los estudios llevados a cabo sobre su presencia en frutos.^{13,14}

Basándonos en la información bibliográfica, puede establecerse que las estructuras glicosiladas de quercetina y kempferol son las más abundantes en el reino vegetal. Rutina, quercetina-3-rutinósido, y kempferol-3-rutinósido constituyen las estructuras más representativas de este tipo de compuestos.

Figura 8 Flavonoles

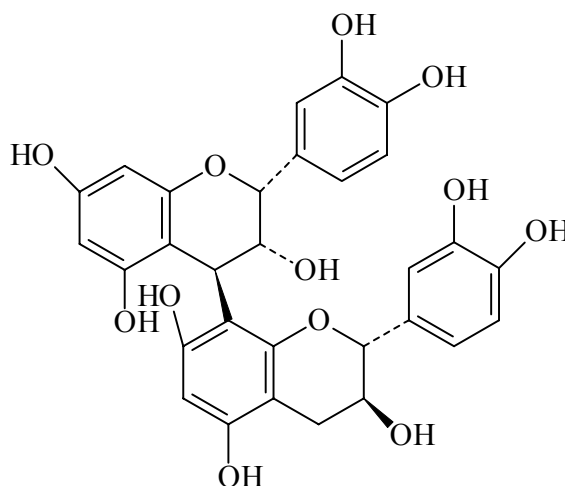


I.2.2.4.3 Flavanoles (flavan-3-oles)

Constituyen uno de las familias flavonoideas más comúnmente distribuidas en la naturaleza.^{15,16} Dentro de su marco estructural es conveniente distinguir entre las unidades monoméricas correspondientes a las estructuras (+) catequina y (-) epicatequina y estructuras oligoméricas de las mismas, conocidas como procianidinas.

Las estructuras más relevantes corresponden a las denominadas B1, B2, B3 y B4 procianidinas constituidas por asociaciones diméricas de (+) catequina y (-) epicatequina. La estructura polimérica previamente mencionada también constituye la base de los taninos denominados condensados.

Figura 9 Procianidina B1



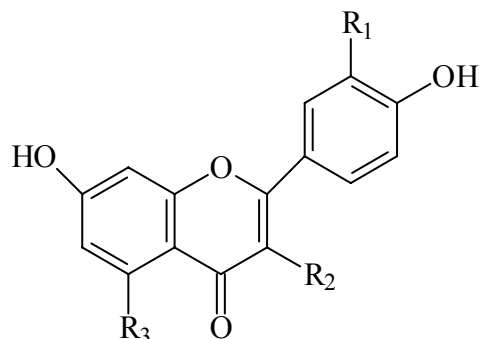
Una de las características más destacadas de los flavanoles es que generalmente están distribuidos en las plantas como agliconas.

I.2.2.4.4 Flavonas e isoflavonoides

Constituyen el grupo polifenólico menos representativo en alimentos. Las agliconas más ampliamente distribuidas son la apigenina y la luteolina. Como los flavonoides, las flavonas pueden aparecer como estructuras glicosiladas. Con respecto a los isoflavonoides, es necesario indicar que constituyen un grupo polifenólico minoritario en alimentos en términos similares a las flavanonas y flavonas.

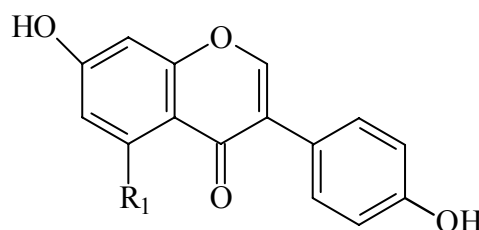
Los isoflavonoides son característicos de las plantas leguminosas y se encuentran ampliamente distribuidos en alimentos derivados.^{17,18} Como la inmensa mayoría de este tipo de compuestos polifenólicos, estas estructuras isoflavonoideas también aparecen glicosiladas, habiéndose descrito, asimismo, su presencia en forma de acetyl y malonil derivados.

Figuras 10 y 11 Flavonas



R₁=H , R₂=H, R₃=OH Apigenina

R₁=OH , R₂=H, R₃= OH Luteolina



R₁=H Daidzeina

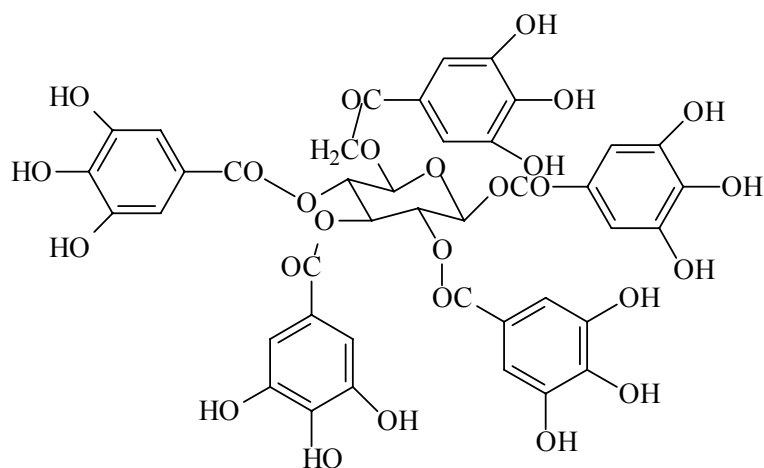
R₁=OH Genisteina

I.2.2.5 Taninos

En general, el término tanino se refiere a una fracción de compuestos polifenólicos especialmente astringentes, cuya característica fundamental es su alto peso molecular. Estas estructuras poseen una alta capacidad de asociación con otros polímeros biológicos esenciales como las proteínas y los hidratos de carbono.

En el reino vegetal los taninos se encuentran usualmente en dos amplias modalidades metabólicas: los taninos hidrolizables y los taninos condensados. Los taninos hidrolizables son estructuras más simples constituidas por unidades de ácido gálico libre o esterificado, también conocidos como galotaninos.

Los taninos condensados, comúnmente denominados proantocianidinas, son polímeros naturales compuestos de unidades de flavan-3-oles. La más común de estas estructuras son las proantocianidinas que están basadas en (+) catequina y (-) epicatequina, que forman unidades estructurales.

Figura 12 Ejemplo de estructura representativa de taninos hidrolizables

I.2.3 Propiedades de los compuestos fenólicos

Existe un alto interés en los compuestos fenólicos en relación a su potencial actividad fisiológica que depende de su actividad antioxidante, su habilidad para atrapar especies de oxígeno activo y electrófilos, de quelatar iones metálicos, su potencial para la autooxidación y su capacidad para modular ciertas actividades enzimáticas celulares.^{19,20,21,22}

A estos compuestos se les han asignado diversas propiedades biológicas²³ como antioxidantes, anti-inflamatorios, antialérgicos, y actividad anticarcinogénica,²⁴ además se han empleado como marcadores en estudios taxonómicos, y también se relacionan con la calidad alimentaria. Asimismo, recientemente se ha comenzado a evaluar la capacidad que presentan dichos compuestos para inhibir la actividad bacteriana.^{25,26}

Con respecto a su papel como metabolitos de plantas, es necesario mencionar que los compuestos polifenólicos participan en el metabolismo de las plantas, siendo responsables de su crecimiento y exhibiendo determinadas interacciones con otros organismos vivos.

Entre otras funciones podemos citar la protección de la planta contra infecciones y agresiones por otros microorganismos. Existen evidencias que sugieren que estos compuestos son muy importantes para los ciclos vitales de las plantas, así los compuestos polifenólicos puede servir como pantallas contra la radiación UV, una función crucial cuando las plantas están sometidas a altas dosis de radiación.^{27,28}

Por otro lado estos compuestos son potentes antioxidantes, interceptan los radicales libres, son agentes quelatantes de metales e inhiben la peroxidación de lípidos. Consecuencia de estas propiedades son los efectos que estos compuestos exhiben en la prevención de la oxidación, inflamación, alergias y cáncer.^{29,30} Yilmaz y Toledo²⁶ realizan una revisión sobre los aspectos relacionados con la salud de distintos compuestos fenólicos (flavonoides) encontrados en uvas, considerando que existe una estrecha asociación entre su actividad antioxidante y su actividad contra varios tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y varios desórdenes dérmicos.

Respecto a sus propiedades anticarcinogénicas, los flavonoles parecen ser sustancias potencialmente anticarcinogénicas y antimutagénicas. Entre los fenoles de la uva y del vino, destaca especialmente el *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno). Este compuesto inhibe procesos celulares relacionados con la iniciación, promoción y progresión tumoral, además de ejercer un efecto cardioprotector.³¹ Asimismo, tanto este compuesto como sus derivados (glucurónidos) parecen presentar una potente actividad inhibitoria contra la infección por el virus de la inmunodeficiencia (HIV).³²

El campo de estudio de las propiedades beneficiosas de los compuesto fenólicos presentes en la uva ha comenzado a ampliarse más allá de la conocida como “paradoja francesa,” relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares, de forma que se han desarrollado estudios acerca de la capacidad que presentan los polifenoles de uva en la protección frente a otro tipo de enfermedades, tales como enfermedades dérmicas²⁴ o procesos neurodegenerativos,³³ o de su actividad antibacteriana.²⁷

Por otro lado la presencia de grupos hidroxilos permite a los polifenoles asociarse con proteínas y con hidratos de carbono, reduciendo la disponibilidad de los macronutrientes. La solubilidad de estos compuestos va a predeterminar sus efectos

fisiológicos. Los polifenoles solubles son absorbidos, mientras que los insolubles son simplemente expelidos con las heces.³⁴

En cuanto a sus propiedades de interés en enología, éstas son diversas en función del tipo de compuesto fenólico en concreto.

Los ácidos fenólicos, sin características organolépticas particulares en cuanto a olor y sabor, son precursores de los fenoles volátiles, compuestos producidos por la acción de ciertos microorganismos (levaduras del género *Brettanomyces* y bacterias) y presentes tanto en vinos blancos como en tintos, con incidencia considerable en las características aromáticas de los vinos obtenidos.

También los ácidos hidroxicinámicos, concretamente los ácidos p-cumárico y cafeico, están muy implicados en la acilación de los antocianos, al esterificarse con la molécula de azúcar de los glucósidos de las antocianidinas. Esta esterificación conduce a una estabilización de los antocianos y de su capacidad colorante, debido al establecimiento de interacciones hidrófobas intramoleculares (copigmentación molecular).

Estos ácidos, que son los principales componentes fenólicos de la pulpa, son los compuestos mayoritarios de los vinos blancos. Durante las operaciones prefermentativas y la vinificación se pueden desarrollar procesos de oxidación que conllevan la formación de pigmentos pardos (pardeamiento), y una merma consecuente de la calidad organoléptica del vino obtenido. Los principales causantes de estos fenómenos son las enzimas denominadas polifenoloxidasas (PPO).

Estas PPO tienen especial actividad sobre los derivados de ácidos hidroxicinámicos, especialmente de sus ésteres tartáricos (ácidos cutárico, caftárico...), dando lugar a la formación de *o*-quinonas. Estas quinonas, a su vez, son muy reactivas, participando en reacciones posteriores de pardeamiento, puesto que oxidan otros compuestos fenólicos que no son sustratos de la PPO, es lo que se denomina oxidación acoplada. Además estas quinonas, primarias (producidas por la PPO) o secundarias (oxidación acoplada), son capaces de reaccionar, a su vez, con otros polifenoles presentes en el mosto. De esta forma, la mayor parte de los polifenoles, sean o no sustratos de la PPO pueden encontrarse implicados en los fenómenos de pardeamiento enzimático. Por tanto, los ácidos cinámicos son especialmente determinantes para la calidad de vinos blancos.

Entre los flavan-3-oles se encuentran fundamentalmente monómeros de catequina y epicatequina, así como formas más o menos poliméricas que constituyen los taninos catéquicos (proantocianidinas) a través de la ruptura de las uniones intermonoméricas. La PPO oxida a las formas monoméricas (catequina y epicatequina), pero no a las poliméricas.

Además la *o*-quinona del ácido caftárico reacciona con el glutatión (tripéptido abundante en la uva), formando el ácido 2-S-glutationil-cafeoiltartárico o GRP (grape reaction product). Este compuesto puede ser oxidado por las quinonas del caftárico en exceso, una vez agotado el glutatión, con el resultado de un pardeamiento intenso.³⁵ Así pues, la sensibilidad de los mostos de uva ante el pardeamiento oxidativo depende de su riqueza relativa en glutatión y en ácidos hidroxicinámicos.

Estas reacciones se pueden resumir en el esquema de la figura 13.

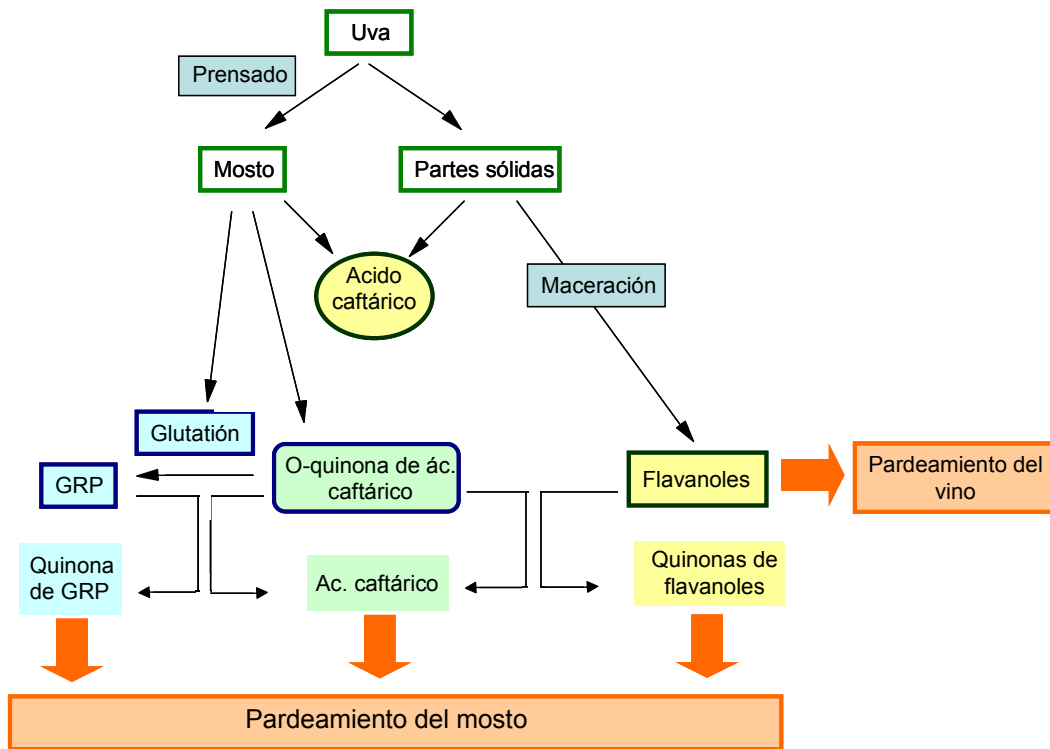


Figura 13 Esquema de los mecanismos de pardeamiento oxidativo en mostos y vinos blancos.

En el caso de vinos tintos, el impacto de la oxidación enzimática es limitado, mientras que la oxidación química contribuye de forma importante al proceso de maduración de los vinos. Los productos resultantes de la oxidación de otros componentes (etanol, ácido tartárico) tienen un papel importante en los procesos de transformación de los polifenoles durante el envejecimiento de los vinos. Intervienen sobre todo en la polimerización de los taninos y en la formación de combinaciones taninos-antocianos, que producen a su vez una disminución de la astringencia y una evolución del color de los vinos.

El color, la astringencia y el amargor de los vinos son esencialmente debidos a las sustancias fenólicas y a los productos de sus reacciones. Así pues, los compuestos fenólicos juegan un papel primordial en las características organolépticas de los vinos, tanto positivo (cuerpo, estructura, complejidad, redondez), como negativo (dureza, aspereza, astringencia), estando basada la impresión organoléptica final por el balance armonioso entre estos dos tipos de sensaciones, y directamente relacionada con el tipo y concentración de varios compuestos, como los antocianos, y los taninos.

En los vinos tintos el color evoluciona constantemente durante la maduración y el envejecimiento, pasando progresivamente de un color violáceo a un color teja. Estas modificaciones visuales, que se acompañan de una pérdida de astringencia, se relacionan con fenómenos de adición, que transforman los antocianos y flavanoles en otras especies moleculares.

Entre las distintas reacciones entre antocianos y taninos, se encuentran aquellas en las que el antociano juega el papel de electrófilo y el tanino de nucleófilo, que conduce a un desplazamiento del equilibrio hacia la forma coloreada, dando mayor estabilidad al pigmento obtenido.

En otras ocasiones se producen adiciones tanino-antociano, o tanino-tanino, en la que el electrófilo es un carbocatión liberado por la ruptura de las uniones poliméricas de los taninos, que reacciona con el antociano o con otra molécula de flavanol (generando nuevas moléculas de proantocianidinas).

El etanal presente en el medio, formado durante la fermentación por oxidación del etanol o descarboxilación del ácido pirúvico, también interviene favoreciendo estas reacciones de adición entre antocianos y flavanoles.

El color de las combinaciones antociano-taninos es rojo-anaranjado, más intenso que el de los antocianos libres, y no son sensibles al efecto del pH y del SO₂. En cambio, el color de los productos generados por reacción de los antocianos con los flavanoles en presencia de etanal es rojo-violeta. Este fenómeno ha sido interpretado como un efecto de copigmentación intermolecular.³⁶

En general, las interacciones de los cationes flavilio con otros compuestos fenólicos contribuyen a la intensidad y estabilidad del color de los vinos tintos por un proceso de copigmentación. Parece ser que la epicatequina es el mejor copigmento flavonoide del vino, en lo que respecta a intensidad del color, pero los flavanoles y ácidos fenólicos establecen una unión más fuerte con los cationes flavilio.

Por otra parte, la interacción de los taninos con las proteínas es el origen de la sensación de astringencia característica de estas moléculas y puede participar en el desarrollo de turbios y precipitados negativos para la calidad del vino. Esta propiedad de los taninos de reaccionar con las glicoproteínas de la saliva (mucina) y las proteínas en la boca, provocando una modificación de su condición y de sus propiedades lubricantes. En función del tipo, peso molecular y concentración de los taninos, puede producirse una impresión suave y equilibrada, o, por el contrario, cierta agresividad que es perceptible como cierto amargor al final del paladar o como astringencia en el post-gusto.

1.2.4 Distribución de los compuestos fenólicos en uvas y vinos

Las principales familias de estructuras polifenólicas encontradas en uvas, así como en vinos, están constituidas por ácidos fenólicos y sus correspondientes ésteres,^{37,38} flavanoles, catequinas, proantocianidinas,³⁹ además de flavonoles y sus estructuras glicosiladas.^{40,42} Además en el caso de los vinos tintos también encontramos antocianos.

Las estructuras representativas principales son los ácidos gálico y vainillínico.^{41,41} La familia de los ácidos hidroxicinámicos está representada por los ácidos cafeico, cumárico, caftárico y cutárico,⁴⁵ caracterizándose estos dos últimos por ser ésteres con el ácido tartárico.

Dentro del grupo de los flavan-3-oles, (-) epicatequina,⁴⁵ y especialmente (+) catequina, así como sus correspondientes B1, B2, B3 procianidinas, son las estructuras más ampliamente encontradas.

En la uva, destacan los ácidos hidroxicinámicos que se encuentran en las vacuolas de las células del hollejo y de la pulpa bajo forma de ésteres tartáricos, siendo los ácidos cafeico y cumárico, esterificados con ácido tartárico, los más característicos del zumo. La forma natural es las *trans* pero los isómeros *cis* también existen aunque en forma minoritaria. Estos mismos ácidos están además implicados en la acilación de los antocianos. La presencia de los ésteres tartáricos y la ausencia de los ésteres quínicos (ácido clorogénico por ejemplo) son una de las especificidades del género *Vitis* si se compara con la mayor parte de las demás frutas. En general, las concentraciones de los ésteres hidroxicinámicos son mayores en el hollejo que en la pulpa.

En lo que concierne a los ácidos benzoicos, la uva contiene principalmente ácido gálico, presente bajo forma de éster de flavanoles. Las semillas (pepitas) contienen ácido gálico y estructuras flavan-3-ol, constituyendo la parte más simple de la uva en lo que respecta a la composición polifenólica.⁴⁴

Aunque se han detectado trazas de monómeros y dímeros de flavan-3-oles en la pulpa, en el seno de la baya se localizan principalmente en las semillas.⁴² Este hecho se confirma con los estudios adicionales llevados a cabo en las pepitas donde las estructuras (+) catequina, (-) epicatequina y sus correspondientes proantocianidinas han sido ampliamente descritas.⁴³

El vino contiene una alta diversidad de compuestos polifenólicos. Además dicha composición puede variar notablemente de un vino a otro como consecuencia, en primer lugar, de la influencia de la variedad de uva empleada para su elaboración; y en segundo lugar, del proceso de vinificación, que altera de manera importante la composición polifenólica encontrada en la uva, así como el envejecimiento.

Durante la vinificación y el envejecimiento, los compuestos fenólicos procedentes de la uva participan en diversos tipos de reacciones. Además en los vinos que han permanecido en bodega, se puede notar la presencia de constituyentes extraídos de la madera utilizada durante la crianza. Así pues, la composición fenólica del vino depende a la vez de la materia prima y del tipo de vinificación desarrollada, influyendo tanto sobre fenómenos físicos (como la difusión de compuestos desde las partes sólidas hacia el mosto, o la extracción de compuestos de las barricas) como sobre los fenómenos bioquímicos y químicos en los cuales están implicados los polifenoles (oxidación, degradación, condensación).

Por otro lado, la bibliografía disponible⁴⁵ cita estudios comparativos entre el mosto y las muestras de vino tomadas a partir de distintas variedades de uva. Los resultados correspondientes de este tipo de estudios han revelado que ambas matrices comparten una composición polifenólica similar, excepto para el tirosol, que está presente en vinos pero ausente en los mostos correspondientes, siendo un producto del metabolismo de las levaduras.

En ambas matrices estudiadas los ácidos hidroxicinámicos parecen ser los mayoritarios, seguidos por los flavonoides y los ácidos hidroxibenzoicos, principalmente gálico y protocatéuico. Sin embargo cuantitativamente hablando el proceso de vinificación es responsable de una pérdida considerable de ácidos hidroxicinámicos (20%) y de una ganancia neta de la fracción flavonoidea, mientras que los niveles de ácidos hidroxibenzoicos se mantienen constantes.⁴⁵

Los polifenoles pueden ser indicativos de la variedad de uva, del conjunto de condiciones de crecimiento⁴³ y de los tratamientos de fermentación.⁴⁵ Por ello, la concentración de varios compuestos polifenólicos se ha utilizado en la determinación del tipo de vino, su edad y, últimamente, de la calidad del mismo. Las propiedades previamente comentadas del vino junto con sus conocidos beneficios para la salud, han motivado el creciente interés en el estudio de los polifenoles presentes en este tipo de muestras.

A nivel cuantitativo es posible establecer que el contenido polifenólico en vinos tintos (740-2900 g/l) es mayor que en vinos blancos (260-700 mg/l) o vinos rosados de acuerdo con el estudio llevado a cabo por Sato y col.⁴⁴ en 31 muestras de distintos vinos. En el caso de variedades cultivadas en zonas de clima cálido, como la nuestra, podemos citar, por ejemplo, los niveles encontrados por Morales y col.,⁴⁵ concretamente para algunas variedades tintas cultivadas en Montilla Moriles, de en torno a los 3000 mg/l, si bien hay que indicar que los propios autores afirman que con una maceración más prolongada se conseguirían niveles más elevados.

En general, las moléculas preponderantes, tanto a nivel cuantitativo, como cualitativo en el vino parecen ser los productos condensados derivados de los constituyentes fenólicos del fruto.

I.2.5 Interés del análisis de los compuestos fenólicos

La diversidad estructural de compuestos fenólicos y el efecto en sus propiedades físico-químicas complican su determinación. Además, cierto número de compuestos fenólicos son fácilmente hidrolizables y muchos son, relativamente, fácilmente oxidables, lo que complica más aún el manejo de las muestras.

Tanto los frutos como otras partes de las plantas son una importante fuente de sustancias fenólicas, tanto para la dieta, como para considerarlas a nivel comercial. Es por ello por lo que la preparación de la muestra es una etapa crítica en el análisis, especialmente en muestras de origen vegetal donde la complejidad de la matriz es considerable.

En consecuencia los métodos de extracción de fenoles a partir de frutos dependerán entonces de distintos factores y los procedimientos usuales de cuantificación implican el uso de técnicas de separación. Lo que está claro es que para determinar compuestos fenólicos en muestras vegetales sólidas es necesario el empleo de técnicas de extracción eficientes.

El conocimiento de la extracción de sustancias fenólicas es también de considerable interés por sus importantes aplicaciones prácticas en la industria alimentaria. Por ejemplo, la extracción de compuestos fenólicos durante la prensada de la uva, la extracción de compuestos fenólicos coloreados por maceración de las partes sólidas en uvas tintas, o la extracción de compuestos fenólicos de la madera por el vino durante el envejecimiento en barriles,⁴⁶ tiene consecuencias significativas para la producción de vinos de calidad.

Como micronutrientes, la medida de compuestos fenólicos no se considera importante en el procesado (a pesar del hecho de que muchos casos de deterioro de alimentos están relacionados con reacciones de pardeamiento fenólico). Sin embargo, con la tendencia actual hacia la concienciación del consumidor y la demanda de alimentos con propiedades beneficiosas para la salud podemos ver que se está incrementando el interés por la cuantificación de compuestos fenólicos en alimentos.

La adulteración representa otra área de la industria alimentaria donde la cuantificación de los compuestos fenólicos tiene potencial. Así, recientemente Valentao y col.⁴⁷ han descrito la determinación de flavonoides en el contexto del control de calidad, y De Villiers y col.⁴⁸ evalúan la adición de colorantes artificiales en vinos

tintos. La adulteración de zumos de cítricos es otra área donde la cuantificación fenólica es necesaria; sin embargo, a pesar de su potencial, todavía no es de uso rutinario. Como consecuencia de la demanda de métodos de cuantificación de rutina para compuestos fenólicos, es de esperar que se incrementará el énfasis puesto en la preparación de la muestra.

I.3 Determinación de compuestos fenólicos

El aislamiento de compuestos fenólicos de la matriz de la muestra es generalmente un requisito previo para cualquier proceso de análisis. El objetivo último es la preparación de un extracto de la muestra uniformemente enriquecido en todos los compuestos fenólicos de interés y libre de las formas interferentes de los otros componentes de la matriz. Esto implica una serie de etapas que comprenden desde una extracción exhaustiva con disolventes y procedimientos de preconcentración, que han venido evolucionando en los últimos años desde la simple extracción líquido-líquido o la filtración.

La preparación de las muestras para estudios analíticos que podrían determinar la composición de compuestos polifenólicos en matrices vegetales consiste en varias etapas, básicamente condicionadas por la matriz y la naturaleza polifenólica de la muestra. Este proceso puede ser bastante heterogéneo, implicando gran número de fases, o quedar reducido a lo mínimo.

El análisis de los compuestos fenólicos en uvas es complejo debido a que su composición polifenólica depende de muchas variables y esto dificulta su determinación. Como ya hemos mencionado se hace necesaria una etapa previa de extracción, salvo en casos muy concretos. La extracción debe realizarse con el disolvente adecuado y bajo condiciones analíticas optimizadas de temperatura, pH, etc..

Cuando los compuestos polifenólicos se encuentran en matrices líquidas, como puede ser el caso del vino o los mostos, se suelen emplear las extracciones líquido-líquido o si es necesario, una extracción en fase sólida (EFS). En cualquier caso la etapa de extracción es extremadamente importante, y el proceso dependerá de la liberación de los analitos propios de la matriz vegetal en el medio, que permitirá la mayor o menor determinación cuantitativa en el extracto.

La determinación de la recuperación en muestras sólidas es complicada al constituir el fruto una matriz natural con una alta actividad enzimática, por lo que deben tomarse las precauciones necesarias para asegurar una correcta extracción, desprovista de modificaciones químicas, que ocurren frecuentemente en el proceso.² Un ejemplo es la isomerización fotoquímica del *trans*-resveratrol al isómero *cis*.⁴⁹ Los métodos de protección de estos compuestos frente a esos procesos degradativos incluyen la adición de antioxidantes durante la extracción y el uso de atmósferas inertes. Las condiciones empleadas deberían ser tan suaves como sea posible, para evitar la oxidación, degradación térmica y otros cambios químicos y bioquímicos en la muestra.

El procedimiento preciso dependerá de la naturaleza del analito (fenoles totales, o-difenoles frente a otros fenoles, clases específicas de fenoles como glicósidos de flavanonas o compuestos individuales) y de la muestra (tipo de fruto, porción del mismo, etc..) y particularmente de su estado físico. En el caso de matrices líquidas, a menudo se emplea la extracción líquido-líquido o la extracción en fase sólida. Estos métodos convencionales tienen una aplicación limitada a muestras sólidas o semi-sólidas debido a los largos tiempos de extracción y a las precauciones necesarias para proteger las especies fenólicas altamente reactivas de los procesos de degradación.

Por último hay que indicar que en algunos casos debe llevarse a cabo una etapa de hidrólisis, generalmente en medio ácido, simultánea o posteriormente a la etapa de extracción. Una vez que la mezcla polifenólica es puesta en disolución, puede ocurrir que debido a su complejidad estructural, deban emplearse otras etapas posteriores de fraccionamiento, con el propósito de separar compuestos polifenólicos en distintas fracciones o simplemente para eliminar impurezas o sustancias no interesantes.

I.3.1 Técnicas de preparación de muestras

A continuación se revisan y se comentan diversas aplicaciones de metodologías de preparación de muestras de utilidad en el análisis de la composición fenólica de distintos tipos de muestras vitivinícolas.

I.3.1.1 Muestras líquidas

Las técnicas más comunes empleadas para muestras líquidas incluyen la extracción líquido-líquido (ELL) y la extracción en fase sólida (EFS), analizándose posteriormente los extractos por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).

I.3.1.1.1 Extracción líquido-líquido (ELL)

La distribución de un soluto entre dos fases inmiscibles en un fenómeno de equilibrio que sigue una ley de distribución, donde la constante de equilibrio se define como la relación entre las actividades (o concentraciones) de los solutos entre las dos fases. Por esta razón, para optimizar una nueva técnica de extracción líquido-líquido, deberían considerarse diversas variables que pueden modificar la constante de equilibrio, pero también aquellos que influyen en la cinética de distribución de los solutos entre las dos fases.

En relación al equilibrio, las variables a considerar son la temperatura, la relación de volumen (o volumen de extractante) y la fuerza iónica del medio. En relación con la cinética de la transferencia del material entre las dos fases, en todos los equilibrios de partición debemos asegurarnos que el equilibrio se establece, por lo que la variable a considerar deberá ser el tiempo de extracción.

Este método ha encontrado aplicación en la preparación de muestras biomédicas, farmacéuticas, clínicas y biológicas. Sin embargo, sus mayores desventajas incluyen la formación de emulsiones, las distintas eficiencias de extracción para varios compuestos con varios agentes extractantes y la baja sensibilidad. La sensibilidad puede ser incrementada eliminando el disolvente extractante por calor o con el flujo de un gas inerte. Desafortunadamente, esta etapa puede contribuir a las pérdidas de analitos, y los peligros de seguridad que implica el manejo de disolventes tóxicos e inflamables son considerables.

Por otro lado el procedimiento de ELL es, generalmente, tedioso, implica un elevado consumo de tiempo y es costoso (alto consumo de disolventes).

Para la extracción de compuestos polifenólicos se han empleado distintos métodos de preconcentración y separación, particularmente extracciones con varios disolventes principalmente acetato de etilo y éter dietílico.^{50,51} Así, Baldi y col.⁵² extrajeron

polifenoles por ELL empleando acetato de etilo a dos niveles de pH (2 y 6), Peña-Neira⁵³ analiza la composición fenólica de vinos españoles con distinto origen geográfico mediante la extracción con éter dietílico y con acetato de etilo. Gomes⁵⁴ fraccionó los compuestos fenólicos por medio de una extracción con éter dietílico, acetato de etilo y butanol; Downey y col.⁵⁵ analizan flavan-3-oles y proantocianidinas en pepitas y hollejos de la variedad Syrah tras su extracción con acetona.

Bengoechea y col.⁵⁶ extrajeron polifenoles a partir de mosto y vino por medio de tres extracciones sucesivas con 10 ml de éter dietílico, seguido de otras tres extracciones con 10 ml de acetato de etilo. Le Bon y col.⁵⁷ también usaron acetato de etilo (a pH 2) para extraer flavonoides.

También Rodríguez-Delgado^{58,59} determina catequina, ácido vainílico, ácido siríngico, epicatequina y *trans*-resveratrol mediante CLAE tras la extracción previa con éter dietílico a pH=2.

Incluso aunque las recuperaciones son mejores con acetato de etilo que con éter dietílico,⁶⁰ el acetato de etilo es menos conveniente debido a su mayor punto de ebullición, que implica una mayor posibilidad de degradación de las muestras durante la concentración a mayores temperaturas o con tiempos más prolongados.

Sin embargo, a pesar de que hay numerosos estudios que se centran en la selección del extractante más adecuado para los compuestos fenólicos, existen pocos datos acerca de la cuantitatividad de las extracciones, la influencia de factores como la fuerza iónica del medio o la metodología óptima para llevar a cabo la separación en la práctica y para minimizar la producción de interferencias analíticas durante la separación, como los trabajos de Barroso y col.^{73,61}

Brú y col.⁶² emplean la ELL para determinar compuestos fenólicos de bajo peso molecular en vino, para ello diseñaron un sistema rotatorio y continuo, como alternativa a la extracción convencional en varias etapas y a la extracción diferencial, que permitía la extracción simultánea de varias muestras con buenas recuperaciones y alta sensibilidad, minimizando al mismo tiempo la aparición de interferencias analíticas durante el proceso de extracción. El disolvente empleado fue éter dietílico. Con este método se consiguieron recuperaciones superiores al 70% para todos los patrones estudiados excepto para el ácido gálico con una recuperación del 40%. En cuanto a las desviaciones estándar todas fueron inferiores al 7% para los estándares y algo mayores en las muestras de vino.

Si tenemos en cuenta los inconvenientes anteriormente mencionados es fácil entender porque esta técnica está siendo reemplazada por otras técnicas que son más fáciles de automatizar, consumen menor cantidad de disolventes y requieren menos tiempo, como ocurre con la EFS.

I.3.1.1.2 Extracción en fase sólida (EFS)

El método de EFS puede ser una técnica de aislamiento que no requiera ningún tratamiento de calor, y el tiempo de aislamiento es muy corto en comparación con los métodos tradicionales existentes. Este método elimina la formación de emulsiones y minimiza la exposición del personal a disolventes, o muestras, peligrosos. Lo que es más, los peligros de incendio o toxicidad se reducen considerablemente cuando se utiliza la EFS en comparación con la ELL.

Aunque la ELL ha permanecido durante varios años como la técnica de preparación preferida para muestras líquidas, especialmente en el campo medioambiental, desde comienzos de los años 90, se ha incrementado considerablemente el desarrollo de la EFS, con amplias mejoras en los formatos, automatizaciones e introducción de nuevas fases. Mientras que en la ELL sólo pueden utilizarse disolventes inmiscibles con el agua para aislar los analitos, casi no hay restricciones en la elección de la fase móvil para los procedimientos de EFS.⁶³

Entre los principales objetivos del desarrollo del procedimiento de EFS encontramos la obtención de extractos libres de interferencias con la matriz en pocas etapas (preferiblemente en una cuando sea posible), por tanto, la selectividad es una característica importante a considerar.

Puede considerarse que la tecnología de adsorbentes está específicamente y especialmente desarrollada con vistas a conseguir ampliar el rango de polaridades⁶⁴. Así, podemos citar el desarrollo de:

- Las sílices C18 monofuncionales y las sílices C18 abiertas, con el objetivo de incrementar el número de grupos silanoles no modificados en la superficie de la sílice para proporcionar interacciones polares secundarias con los analitos.

- Adsorbentes con esqueleto base de carbono y copolímeros altamente entrecruzados de poliestireno-divinilbenceno, para conseguir mejorar la extracción de analitos polares. Entre los primeros, los más ampliamente utilizados son carbones negros grafitizados obtenidos por el calentamiento de carbones negros a alta temperatura (2700-3000°C), teniendo la ventaja de presentar varios centros activos cargados positivamente en la superficie, lo que permite su aplicación para el análisis de pesticidas.⁶⁵
- Polímeros hidrofílicos-lipofílicos (tal es el caso del denominado HLB Oasis, que es un copolímero de divinilbenceno y *N*-vinilpirrolidona), que intentan paliar la limitación que presentan los adsorbentes de sílice en fase reversa y de los poliméricos, por la que deben acondicionarse con algún disolvente que los humedezca, y les permita permanecer en tal estado antes de la aplicación de la muestra.
- Adsorbentes de par iónico o intercambio iónico para la extracción de analitos iónicos o ionizables. Entre los de intercambio catiónico se incluyen los débiles con grupos ácido carboxílico y los fuertes, con grupos de ácido sulfónico, aromáticos o no. Los de intercambio aniónico están constituidos de grupos amino primarios o secundarios en el caso de los débiles, mientras que los fuertes son formas de amino cuaternario.
- Adsorbentes con mezcla de mecanismos de retención, permiten la extracción y limpieza de matrices biológicas en la misma secuencia.⁶⁶
- Adsorbentes de EFS en fase normal: incluyen alúmina, Florisil (silicato magnésico sintético) y sílice modificada químicamente por grupos polares como los grupos amino, ciano o diol.
- Adsorbentes de extracción por inmunofinidad: emplean materiales implicados en las interacciones antígeno-anticuerpo, proporcionando métodos de extracción selectivos basados en el reconocimiento molecular. Los anticuerpos están unidos covalentemente en un adsorbente apropiado formando el denominado inmunoadsorbente. Puesto que los anticuerpos son altamente selectivos hacia el analito, suelen iniciar la respuesta inmune con una alta afinidad, permitiendo que el inmunoadsorbente pueda extraer y aislar el analito de matrices complejas en una sola etapa.

- Polímeros “grabados” molecularmente (PGM): implican la preparación de polímeros con sitios de reconocimientos específicos para ciertas moléculas. La síntesis se realiza uniendo monómeros alrededor de una molécula molde, y permitiendo la consiguiente polimerización al usar un entrecruzador y proporcionarle un material rígido. Después, las moléculas molde se eliminan y los polímeros resultantes presentan cavidades que son las “huellas” y que sirven de sitios de reconocimiento permitiendo la unión a la molécula molde. Al igual que los inmunoabsorbentes, el reconocimiento se debe a la “horma o forma” y a una mezcla entre interacciones de hidrógeno, hidrofóbicas y electrónicas. Presentan las ventajas de ser más rápida y fácilmente preparables, usando métodos bien definidos, y de ser estables a altas temperaturas, en un amplio rango de pH y disolventes orgánicos.
- Adsorbentes con carga metálica: empleados para preconcentrar compuestos orgánicos que pueden formar complejos con iones metálicos.

Aunque el método de EFS se ha aplicado frecuentemente para la limpieza, concentración y eliminación de interferencias presentes en las muestras, su aplicación puede extenderse al aislamiento de componentes alimentarios y residuos químicos.

Podemos emplear la EFS de dos formas diferentes para el aislamiento de los compuestos de interés:

- retención y elución: en primer lugar se acondiciona el adsorbente (fase sólida), se carga la muestra, se lavan los interferentes y se eluyen los compuestos de interés.
- eliminación de los interferentes por retención: primero se acondiciona el adsorbente, se carga la muestra reteniéndose los interferentes en el mismo, y se eluyen los compuestos de interés, quedando los interferentes unidos a la fase sólida.

En el análisis de vinos se sigue empleando frecuentemente la EFS para conseguir separar los analitos de interés del resto de componentes de la matriz. Csiktusnádi Kiss y col.⁶⁷ evalúan distintos tipos de adsorbentes (sílice, octadecilsílice, cianopropil, alúmina ácida, alúmina básica, alúmina neutra, diol, aminopropil, florisil, carbón negro) para la extracción de pigmentos en vinos tintos.

Revilla y González-SanJosé⁶⁸ realizan una EFS con Amberlita XAD para estudiar los cambios que experimentan ciertos compuestos fenólicos (fenoles de bajo peso molecular y flavanoles) durante el almacenamiento de vinos tintos sometidos a tratamiento con enzimas pectolíticas.

Asimismo, existen varias publicaciones que coinciden en el uso de C₁₈, para la separación previa al análisis, de distintos analitos encontrados en el vino: polifenoles en general,^{69,70} flavonoides,⁷¹ *trans*-resveratrol,^{65,72,73} u ocratoxina A.^{74,75} En otros casos, en cambio, a pesar de analizarse el mismo tipo de muestras y de compuestos, se emplean otros adsorbentes, tales como:

- copolímeros de estireno-divinilbenceno para el análisis de *trans*-resveratrol (LiChrolut EN),¹³ en la determinación simultánea de polifenoles, ácidos orgánicos y azúcares (SDB-L);⁷⁶ para el análisis de la evolución del contenido en compuestos fenólicos durante la maduración en bodega de vinos tintos (Strata-X);⁷⁷ o para el análisis de distintos compuestos fenólicos en vinos de crianza en bodega (RP-101 y RP-105).⁷⁸
- amina cuaternaria (SAX), o un copolímero de N-vinilpirrolidona y divinilbenceno (Oasis HLB)⁷⁹ para determinar compuestos fenólicos libres y catequinas. También se ha utilizado este último adsorbente en el análisis de ocratoxina A en muestras de mosto, vino y cerveza (además de cartuchos de fenilsilano).⁸⁰

Recientemente han comenzado a aplicarse los denominados PGM (polímeros grabados molecularmente) sobre alimentos y otras matrices complejas. Como ya mencionamos anteriormente, éstos polímeros son adsorbentes selectivos con sitios de reconocimiento molecular diseñados para un analito en particular.

Chapuis y col.⁸¹ emplean estos polímeros para evaluar la extracción de triazinas en muestras de suelos y zumos de uva, para ello desarrollan dos polímeros “grabados” molecularmente preparados en diclorometano con terbutilazina y ametrina como moléculas molde. Esta misma técnica es desarrollada por Weiss y col.⁸² para la extracción de compuestos flavonoides, y por Maier⁸³ para evaluar las ventajas y limitaciones que tendría a la hora de determinar ocratoxina A en vinos tintos.

En la tabla que se presenta a continuación se da una descripción de las dos técnicas de preparación de muestras líquidas anteriormente mencionadas y se indica aproximadamente el tiempo de extracción, el coste, la facilidad de operación y las desventajas de las dos técnicas más empleadas:

	ELL	EFS
Descripción del sistema	Analito repartido entre dos disolventes inmiscibles	a) Analito retenido en un adsorbente sólido; interferencias eliminadas con un lavado del adsorbente. Desorción del analito usando un disolvente orgánico. b) Retención de las interferencias en el adsorbente y elución de los analitos.
Tiempo extracción	Pueden superarse 24 h.	Menos de 1 hora
Coste	Bajo	Bajo/Medio
Facilidad de operación	Fácil	Además de manuales, existen sistemas automáticos y robotizados disponibles para rutina
Desventajas	Requiere concentración de la muestra tras extracción	Requiere el desarrollo de un método, elección de adsorbente y optimización de su selectividad

Tabla 1 Características de ELL y EFS

I.3.1.2 Muestras sólidas

Las muestras sólidas presentan una problemática adicional a las ya comentadas para las muestras líquidas: una etapa previa de extracción.

Las técnicas más comunes empleadas para muestras sólidas incluyen la extracción Soxhlet, extracción asistida por ultrasonidos (EAU), extracción asistida con microondas (EAM), extracción con fluidos supercríticos (EFSC) y la extracción con fluidos presurizados (EFP). Hay que destacar que todas las técnicas anteriores se incluyen en alguno de los métodos oficiales de análisis empleados por la Agencia de Protección Medioambiental estadounidense (EPA).

I.3.1.2.1 Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)

Se basa en el empleo de la energía derivada de los ultrasonidos (ondas de sonido con frecuencias superiores a 16 kHz) para facilitar la extracción, a partir de la muestra sólida, de los analitos por el disolvente orgánico seleccionado en función de la naturaleza de los solutos a extraer. La extracción se ve facilitada y acelerada gracias a esa energía. Los resultados obtenidos son similares a los de una extracción Soxhlet pero la duración no es superior a los 30 minutos en la mayoría de los casos.

Este proceso de extracción es rápido en comparación con los métodos tradicionales, como ya hemos mencionado, debido a que el área de la superficie de contacto entre la fase sólida y la líquida es mucho mayor.⁸⁴

Son muy contadas las aplicaciones de esta técnica en el análisis de compuestos no volátiles en uvas o vinos, habiéndose empleado únicamente en el análisis de ácidos orgánicos.⁸⁵

Por último hay que indicar que en muchos de los estudios antes citados las condiciones óptimas de extracción se han establecido usando técnicas de diseño experimental. Se usan estas técnicas porque deben optimizarse varias variables y dichas técnicas permiten determinar fácilmente las variables más significativas.

I.3.1.2.2 Extracción asistida por microondas (EAM)

Las microondas son ondas de alta frecuencia electromagnética situadas entre las regiones de radio-frecuencia e infrarroja en el espectro electromagnético (con un rango de frecuencias entre 0,3-300 GHz).

A diferencia del calentamiento convencional donde el calor penetra lentamente desde el exterior al interior de un objeto, la energía de microonda es “fría” produciendo calor, el calentamiento aparece justo en el núcleo del objeto que está siendo calentado, y el calor se extiende desde el interior al exterior del cuerpo.

La energía de microondas afecta a las moléculas por conducción iónica y rotación dipolar. En la conducción iónica los iones en solución migrarán cuando se aplique el campo electromagnético. La resistencia de la solución a este flujo de iones producirá la fricción y, por tanto, el calentamiento de la solución. La rotación dipolar supone un realineamiento de los dipolos con el campo aplicado, estos movimientos moleculares forzados producen una “fricción” molecular y un calentamiento.

La selección del disolvente apropiado es la clave para una extracción óptima. Para seleccionar los disolventes se deben considerar las propiedades de absorción de las microondas por el mismo, la interacción del disolvente con la matriz, y la solubilidad del analito en el disolvente. Cuanto mayor sea el momento dipolar del disolvente más rápido se calentará el mismo bajo irradiación de microondas.

Otros factores importantes a tener en cuenta son: la compatibilidad entre el disolvente de extracción y el método analítico usado en el análisis del extracto (los disolventes menos polares parecen preferirse para el análisis por CG, mientras que disolventes más polares son preferibles para análisis por CLAE o técnicas de inmunoensayo) y la selectividad del disolvente. Se ha encontrado poca información sobre la selectividad de la EAM en la bibliografía ya que la técnica es tan eficiente que no puede considerarse una técnica selectiva de extracción. Suele ser necesaria una etapa de limpieza tras la extracción en casi todos los casos.

La muestra y el disolvente son sometidos a la acción de las microondas en recipientes sellados (EAM presurizada) o abiertos (EAM atmosférica). Existen equipos de EAM presurizada que permiten extraer simultáneamente hasta 14 muestras, en cambio la EAM atmosférica sólo es capaz de extraer una muestra por experimento.

Cuando la EAM se lleva a cabo en recipientes cerrados, la temperatura conseguida durante la extracción será mayor que el punto de ebullición de los disolventes. Para la mayoría de los disolventes la temperatura dentro del recipiente es dos o tres veces el punto de ebullición de los mismos. Estas elevadas temperaturas conducen a mejores eficiencias de extracción del analito de la matriz de la muestra.

Su aplicación a la determinación de compuestos fenólicos en alimentos es limitada. Chu y col.⁸⁶ han realizado estudios relacionados al determinar patrones (ácido gálico, ácido gentísico, ácido vainílico, ácido caféico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico) tras su tratamiento con bis(trimetilsilil)acetamida e irradiación con microondas. En el caso de muestras enológicas únicamente se ha encontrado en la bibliografía un artículo sobre la extracción de polifenoles en pepitas de uva.⁸⁷

I.3.1.2.3 Extracción con fluidos supercríticos (EFSC)

Esta técnica ha recibido mucha atención como posible alternativa para la preparación de muestras. La metodología se basa en el principio de que un fluido (gas) por encima de su punto crítico exhibe las propiedades de solvatación de un disolvente líquido. El fluido es supercrítico por encima de su punto crítico. La mayor ventaja de esta técnica sobre los métodos tradicionales de preparación de muestras es el uso de fluidos supercríticos no tóxicos como el dióxido de carbono.

Los fluidos supercríticos tienen propiedades únicas que los sitúan entre los líquidos y los gases. Sus viscosidades son mucho menores que las de los líquidos y sus tensiones superficiales son muy bajas. Por ello pueden penetrar en los poros de los sólidos mucho más fácilmente que los líquidos. Sus densidades, sin embargo, son mucho mayores que las de los gases, por lo que sus capacidades para llevar materiales disueltos son también similares a las de los líquidos.

Las extracciones pueden llevarse a cabo en modo estático, dinámico o con recirculación. En el primer caso la célula se llena con el fluido supercrítico, se presuriza y se permite que alcance el equilibrio. En el modo dinámico, el fluido supercrítico se hace pasar a través de la célula continuamente. En el último caso, el mismo fluido es bombeado repetidamente a través de la muestra, y, después del número requerido de ciclos, se bombea hacia el vial de recolección. Durante la extracción los analitos solubles se reparten desde la matriz de la muestra hacia el fluido supercrítico, el cual se descomprime, sin pérdidas, a través de un restrictor de flujo variable, hacia el vial de recolección.

Aunque se han investigado muchos fluidos supercríticos (compuestos fluorocarbonados, N_2O , SF_6 , NH_3), el más comúnmente usado como fluido supercrítico es el dióxido de carbono (CO_2). Alcanza el estado supercrítico a una presión (72,9 atm) y temperatura (31,3°C) relativamente bajas. Es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, muy inerte químicamente y fácil de conseguir. Es apolar, pero su polaridad puede ajustarse con modificadores como la acetona, metanol o etanol. Su rápido poder de penetración y solvatación proporciona altas recuperaciones para muchos analitos. Hay que indicar además que la polaridad del fluido seleccionado puede ser modificada apropiadamente para optimizar el aislamiento de los compuestos de interés.

Los fluidos supercríticos pueden ser utilizados bajo un amplio rango de condiciones. Tanto por encima del punto crítico como en zonas ligeramente inferiores. La densidad y el poder de solvatación del fluido supercrítico pueden variarse cambiando la presión y temperatura, así como las velocidades de flujo, tiempos de extracción y modificadores. La eficiencia de la extracción con fluidos supercríticos se ve afectada por una multitud de variables, incluyendo el tipo de matriz, tipo de analito, tipo de fluido, geometría del recipiente, orientación del recipiente, tipo de restrictor, y sistema de recolección de los analitos.

El potencial de esta técnica reside en el hecho de que los parámetros físicos instrumentales pueden ser cambiados para modificar las interacciones químicas directamente. El fluido supercrítico tiene una densidad que es suficientemente elevada para proporcionar una buena capacidad disolvente pero suficientemente baja para que exista una alta difusibilidad y una rápida transferencia de masa a través de la matriz de las muestras.

La fase de recolección del soluto tras la extracción tiene lugar, generalmente, de una de las formas siguientes: mediante la deposición en una trampa de fase sólida o en disolvente. Wenclawiak y col.⁸⁸ usan un condensador Dewar para optimizar la recolección en disolventes orgánicos. Eckard y Taylor⁸⁹ comparan la recolección de analitos de distintas polaridades en varias trampas de fase sólida, llegando a la conclusión de que la que proporciona mejores resultados es una mezcla de Porapak Q y bolas de vidrio.

La EFSC ofrece cierto número de ventajas respecto a la recuperación a partir de muestras sólidas y se ha estudiado el comportamiento de extracción de los compuestos fenólicos, usando dióxido de carbono supercrítico, soportados en arena.⁹⁰

La aplicación de la extracción con fluidos supercríticos a muestras de interés alimentario es cada vez más común⁹¹. La popularidad de esta técnica para estas aplicaciones puede atribuirse directamente a la eliminación de disolventes orgánicos, la alta solubilidad de la materia lipofílica en CO₂ supercrítico y a las bajas temperaturas que permiten el análisis del aroma. Valcárcel y Tena⁹² hacen una revisión de varias de estas aplicaciones.

En el caso del análisis de muestras enológicas se centra más bien en muestras líquidas: se ha extraído *trans*-resveratrol y otros compuestos fenólicos⁹³ (ácido gálico, (+) catequina, (-) epicatequina, ácido cafeico, ácido p-cumárico, miricetina, quercetina y ácido salicílico) a partir de un soporte inerte (tierra de diatomeas) al que se han

adicionado dichos compuestos, recogién dose sobre distintas trampas (octadecilsilano, CN y Diol) y eluyéndose con metanol o acetonitrilo. También se ha empleado la EFSC sobre muestras sólidas, así se ha determinado *trans*-resveratrol a partir de hollejos de uva (mediante el empleo de CO₂ supercrítico modificado en un 7,5% con etanol),⁹⁴ y ácidos grasos procedentes del aceite contenido en pepitas de uva.⁹⁵

Palma y col.⁹⁶ han llevado a cabo extracciones fraccionadas de compuestos fenólicos (catequina, epicatequina, ácido gálico) a partir de pepitas de uva mediante el empleo de CO₂ modificado con metanol. Asimismo, Palma y Taylor⁹⁷ han extraído 5-hidroximetil-2-furaldehído a partir de pasas estudiando el efecto de distintos modificadores orgánicos del CO₂ supercrítico. Arce y col.⁹⁸ emplean la EFSC en forma continua para la determinación cuantitativa de polifenoles totales en la pasta de uva resultante de la prensada, para ello concentran los analitos en trampas de PorapakQ y ODS, y los eluyen posteriormente con metanol. De igual forma, Palenzuela y col.⁹⁹ desarrollan un método para la extracción de polifenoles a partir de orujo de uva mediante CO₂ modificado con 5% MeOH, en el que se evalúa la retención de los analitos mediante dos tipos de trampas: sólida (C18) o líquida (tampón salino fosfato).

Berna y col.^{100,101} y Murga^{102,103} realizan diversos ensayos para determinar la solubilidad de distintos sistemas con CO₂ supercrítico en los que se incluyen diversos compuestos presentes en la uva y el vino (resveratrol, epicatequina, ácido protocatequico, protocatequialdehído, ácido p-cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico) con vistas a su posterior aplicación analítica. Asimismo Chafer y col.¹⁰⁴ estudian la solubilidad de quercetina en CO₂ supercrítico modificado con etanol.

También Tena y col.¹⁰⁵ han analizado *trans*-resveratrol y otros compuestos fenólicos mediante CO₂ supercrítico puro o modificado con distintos porcentajes de MeOH.

I.3.1.2.4 Extracción con fluidos presurizados (EFP)

Se basa en la extracción sólido-líquido empleando el líquido por encima de su punto de ebullición y utilizando presiones lo suficientemente altas para mantenerlo en estado líquido. Esta extracción permite obtener extracciones cuantitativas, en algunos casos, en menos de 15 minutos.¹⁰⁶

La elevada temperatura a la que se somete la muestra durante la extracción, cuando la comparamos con la extracción convencional Soxhlet, incrementa la capacidad del disolvente para solubilizar el analito, y la elevada presión incrementa la velocidad de difusión en los poros de la matriz, facilitando la transferencia de masa del analito en el disolvente extractante. Sabemos que al incrementar la temperatura se facilita la ruptura de los enlaces entre el analito y la matriz, y que se disminuye la viscosidad del disolvente (una menor viscosidad significa una mejor penetración en la matriz y por tanto se incrementa el rendimiento de extracción).

Respecto a las consideraciones fisicoquímicas de las extracciones a elevadas presiones y temperaturas, hay dos razones por las que el uso de disolventes líquidos a elevadas temperaturas y presiones proporcionará un mejor rendimiento que las extracciones a temperaturas próximas a la ambiental y a presión atmosférica: los efectos de solubilidad y transferencia de masas y la interrupción del equilibrio de superficie.

1. Efectos de solubilidad y transferencia de masas:

- El uso de altas temperaturas incrementa la capacidad del disolvente de solubilizar analitos. Por ejemplo, basándonos en cálculos de la dependencia de la solubilidad con la temperatura de una disolución ideal, la solubilidad del antraceno se incrementa en casi trece veces cuando se incrementa la temperatura de 50 a 150°C. Sekine y Hasegawa¹⁰⁷ destacan que la solubilidad del agua en disolventes orgánicos se incrementará al incrementar la temperatura. Esto podría ser adecuado en los casos en que los disolventes a bajas temperaturas y presiones queden excluidos de los poros ocluidos con agua que contengan analitos. El aumento de la solubilidad del agua en disolventes orgánicos causado por elevadas temperaturas facilitará la disponibilidad de esos poros ocluidos y los analitos contenidos en su interior.
- Como resultado del incremento de la temperatura de extracción se consiguen velocidades de difusión más rápidas.
- Si se renueva el disolvente empleado durante la etapa de extracción estática (como ocurre con la extracción Soxhlet y en EFSC) se consigue mejorar la transferencia de masa y, por tanto, incrementar las velocidades de extracción. La renovación del disolvente incrementará el gradiente de concentración entre la

solución presente en la cámara o célula de extracción y la superficie de la matriz de la muestra. Según la primera ley de difusión de Fick, cuanto mayor sea el gradiente de concentración, más rápida será la velocidad de transferencia de masa. El mismo efecto se consigue en la EFP realizando la misma en varios ciclos, cada uno de ellos con disolvente nuevo.

2. Interrupción del equilibrio de superficie:

- El uso de altas temperaturas puede interrumpir las fuertes interacciones soluto-matriz causadas por fuerzas de Van der Waals, enlaces por puente de hidrógeno y atracciones dipolares de las moléculas del soluto y los sitios activos de la matriz. La energía térmica puede superar las interacciones cohesivas (soluto-soluto) y adhesivas (soluto-matriz) disminuyendo la energía de activación requerida para el proceso de desorción.
- Las elevadas temperaturas también disminuyen la viscosidad de los disolventes líquidos, permitiendo una mejor penetración en las partículas de la matriz y favoreciendo la extracción.

También se disminuye la tensión superficial del disolvente, los solutos y la matriz, permitiendo que el disolvente “humedezca” la matriz de la muestra. Ambos cambios facilitan el mejor contacto de los analitos con el disolvente y favorecen la extracción. Una disminución en la tensión superficial del disolvente también permitirá que los analitos se disuelvan más rápidamente en el disolvente.

- Si se ejerce suficiente presión en el disolvente durante las extracciones, se pueden utilizar temperaturas por encima del punto de ebullición. El uso de elevadas temperaturas y sus ventajas asociadas sería imposible sin el uso de elevadas presiones para mantener los disolventes en estado líquido.

- El uso de la presión facilitará las extracciones a partir de muestras en las que los analitos se encuentren atrapados en los poros de la matriz. El uso de elevadas presiones (junto con elevadas temperaturas y la reducción de las tensiones superficiales) forzará al disolvente a que entre en contacto con los analitos en los poros.

Aplicaciones de la EFP

Inicialmente se han desarrollado en análisis de contaminantes.^{108,109}

En los últimos años se ha empleado esta técnica para el análisis de alimentos,^{110,111} siendo las aplicaciones más usuales la determinación de pesticidas en alimentos y vegetales,¹¹² de grasas en una amplia variedad de alimentos, y de ácidos grasos en huevos y derivados, pollo y cereales. En algunas de aplicaciones puede inyectarse directamente el extracto resultante.

Sin embargo en los últimos años ha comenzado a ampliarse el empleo de esta técnica para la determinación de otros compuestos en alimentos: así Papagiannopoulos y col.¹¹³ determinan proantocianidinas en malta, para ello, realizan la EFP con acetona-agua (80:20, v/v) a 60°C y durante un ciclo estático de 10 minutos; posteriormente realizan una EFS (con poliamida como adsorbente), en línea, para eliminar interferencias de forma previa al análisis por cromatografía líquida. Este mismo equipo emplea ese mismo método para el análisis de polifenoles (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, glicósidos de quercetina y kempferol) en infusiones,¹¹⁴ con la única diferencia de que realizan una preextracción con pentano antes de la EFS.

También Delgado-Zamarreño y col.¹¹⁵ emplean acetonitrilo, aunque en este caso al 100%, para extraer vitaminas en pepitas de girasol, nueces y avellanas, siendo la temperatura de extracción de 50°C y con la misma duración de la EFP que en el caso anteriormente citado.

Esta técnica, además, se ha aplicado a la determinación de isoflavonas en diversos alimentos derivados de la soja, así Klejdus y col.¹¹⁶ extraen genisteína, daidzeína, sus glucósidos correspondientes (genistina, daidzina), formonnetina y biochamina A, mediante la EFP durante 5 minutos, con metanol acuoso al 90% a 145°C, consiguiendo extractos limpios que se pueden analizar directamente en CLAE (gracias a la colocación

de algodón adsorbente en el interior de la cámara de extracción). Rostagno y col.,¹¹⁷ en cambio, emplean etanol acuoso al 70% durante 3 ciclos estáticos de 7 minutos de duración, y a una temperatura de 100°C, para determinar daidzina, glicitina y genistina, así como sus derivados glucosilados y malonil-glucosilados, en granos de soja. Estos autores ponen de manifiesto que las isoflavonas malonil-glucosiladas comienzan a degradarse a partir de los 100°C, y que a partir de los 150°C, también lo hacen los glucósidos correspondientes.

Alonso-Salces y col.¹¹⁸ determinan perfiles polifenólicos en distintas variedades de sidra usando este método de extracción seguido de una CLAE en fase reversa con detección con diodos alineados. Además, este mismo grupo analiza polifenoles (catequinas, glicósidos de floretina y quercetina, ácidos hidroxicinámicos) presentes en pieles y pulpas de manzanas¹¹⁹ mediante el empleo de la EFP, para ello, extraen dichas muestras con metanol al 100%, a 40°C durante 5 minutos, para posteriormente analizar los extractos obtenidos por CLAE.

También comparan los resultados obtenidos cuando se emplea la EFP y la EAU como etapa previa de preparación de muestra en la determinación de compuestos fenólicos de manzanas.¹³²

González-Rodríguez y col. emplean líquidos sobrecalentados (mezclas de agua-etanol) para la extracción de diversos compuestos fenólicos a partir de residuos de vinificación¹²⁰ o de madera.^{121,122}

De la misma forma, Ju y Howard¹²³ aplican la EFP a la determinación antocianinas en hollejos de uvas tintas, evaluando 6 tipos de disolventes, en extracciones estáticas de 3 ciclos de 5 minutos realizadas a 50°C. Estos autores llegan a la conclusión de que: el metanol acidificado conseguía extraer los niveles mayores de monoglucósidos totales y de antocianinas totales, mientras que con metanol-acetona-agua-HCl (40:40:20:0.1) se consiguen los mayores niveles de compuestos fenólicos totales y antocianinas aciladas totales.

Además comprobaron que cuando se realizan las extracciones con agua acidificada, a temperaturas entre 80-100°C, se obtienen las mejores recuperaciones de monoglucósidos totales, antocianinas totales aciladas, antocianinas totales y polifenoles totales. Como conclusión afirman que el uso de agua acidificada es tan efectivo como el de metanol al 60% a la hora de extraer antocianinas a partir de hollejos de uvas tintas.

Podemos concluir indicando que en el análisis de alimentos esta reciente técnica está comenzando a ser considerada a la hora de preparar muestras sólidas para su análisis, ya que, proporciona extractos relativamente limpios, es rápida, consume pequeños volúmenes de disolventes y puede utilizarse de forma automática.

A pesar de que se ha empleado ampliamente para el análisis de muestras medioambientales, su potencial de aplicación sobre otro tipo de muestras es considerable, por lo que se trata de una buena alternativa a los métodos tradicionales de extracción sólido-líquido.

En la tabla que presentamos a continuación se da una descripción de todas las técnicas de preparación de muestras sólidas anteriormente mencionadas:

Técnica de extracción	Descripción
Soxhlet convencional	La muestra se coloca en un recipiente de extracción y se lixivia con el disolvente caliente en un extractor Soxhlet durante 8-12 horas. La evaporación del disolvente se hace separadamente.
Soxhlet automatizada	La muestra se coloca en un recipiente de extracción y es introducida en el disolvente hirviendo durante 30-60 min., el recipiente es entonces sometido a la extracción Soxhlet con reflujo del disolvente. Es posible hacer una evaporación del disolvente.
Fluidos supercríticos	La muestra se coloca en una cámara a alta presión y es extraída con el fluido supercrítico que puede circular a través de la muestra en circuito cerrado o abierto (p.ej. CO ₂ a presiones mayores de 72 atm. y a temperaturas mayores de 33°C). Después de la despresurización los analitos son recogidos en un pequeño volumen de disolvente orgánico o en una trampa sólida.
Asistida con microondas	La muestra se coloca en un recipiente abierto o cerrado y se introduce en el disolvente, suministrándole energía en forma de microondas para facilitar la extracción
Fluidos presurizados	La muestra se coloca en el recipiente de extracción y se presuriza con el disolvente calentado por encima de su punto de ebullición, el extracto es liberado y transferido a un vial

Tabla 2 Características de técnicas de extracción sobre muestras sólidas

Cada una de estas técnicas presenta una serie de ventajas y una serie de inconvenientes:

Soxhlet: entre sus ventajas se incluye que permite el uso de grandes cantidades de muestra (p.ej. de 10 a 30 g, la técnica no es dependiente de la matriz y que muchos extractores Soxhlet pueden utilizarse sin controlarlos continuamente, de hecho existen algunos sistemas comerciales automáticos.

Entre sus inconvenientes, se puede destacar, largos tiempos de extracción (p.ej. > 24-48 h.), uso de grandes volúmenes de disolvente, y la necesidad de concentración después de la extracción.

Ultrasonidos: entre sus ventajas encontramos que es más rápido que la anterior técnica (30-60 min. por muestra) y permite la extracción de gran cantidad de muestra con un coste relativamente bajo. Sus inconvenientes son que se suelen producir pérdidas de compuestos volátiles. Además se han descrito degradaciones debidas a la generación de radicales libres por los ultrasonidos.

Microondas: es una técnica muy prometedora porque es rápida (p.ej. 20-30 min. en discontinúo), usa pequeñas cantidades de disolventes en comparación con la extracción Soxhlet, permite un control completo de los parámetros de extracción (tiempo, energía, temperatura), permite hacer extracciones a alta temperatura.

Respecto a los inconvenientes que hacen que no sea una técnica de gran aceptación podemos citar que necesita disolventes polares, es necesaria la limpieza de los extractos porque las microondas son muy eficientes extrayendo y la instrumentación necesaria es cara.

Fluidos supercríticos: entre sus ventajas se incluye que utiliza para la extracción dióxido de carbono (como tal o modificado con pequeños volúmenes de disolvente) que no es tóxico ni inflamable y es medioambientalmente aceptable. La selectividad de la extracción puede controlarse variando la presión y temperatura del fluido supercrítico y por la adición de modificadores, el disolvente es de fácil eliminación y desecho y existen sistemas de extracción disponibles comercialmente que permiten la extracción de muestras en modo automático.

Entre sus desventajas podemos señalar que el dióxido de carbono es un disolvente relativamente apolar y, por esto, se necesitan aditivos más polares como el metanol para mejorar las eficiencias de extracción de compuestos polares. Además tiene un alto coste de equipamiento y mantenimiento.

Fluidos presurizados: esta técnica es atractiva porque es rápida (p.ej. el tiempo de extracción es aproximadamente de 15 minutos por muestra), usa volúmenes mínimos de disolvente y la instrumentación permite operar automáticamente. Entre sus inconvenientes destacan la necesidad de comprobar la estabilidad de los analitos a alta temperatura y el coste del equipamiento y mantenimiento.

De forma que podemos esquematizar las características de las técnicas de extracción para la preparación de muestras sólidas mediante la tabla siguiente:

<i>Característica</i>	<i>Soxhlet</i>	<i>EAU</i>	<i>EFSC</i>	<i>EAM</i>	<i>EFP</i>
<i>Rapidez</i>	--	+	+	+	+
<i>Cantidad de muestra</i>	++	+	+	+	+
<i>Consumo de disolventes</i>	++	+	--	-	-
<i>Variedad de disolventes</i>	+	+	-	+	+
<i>Necesidad de filtración</i>	-	+	-	+	-
<i>Necesidad de concentración</i>	+	-	-	-	+
<i>Exposición a disolventes</i>	++	+	-	+	-
<i>Habilidad del operador</i>	-	+/-	+	+/-	+/-
<i>Coste del equipamiento</i>	-	-	+	+	+
<i>Nivel de automatización</i>	-	-	++	++	++

Tabla 3 Comparación de las extracciones Soxhlet, EAU, EFSC, EAM y EFP

La extracción Soxhlet es el método estándar con el que se suelen comparar al resto de las técnicas de extracción de muestras sólidas, sin embargo los largos tiempos de extracción necesarios y los grandes volúmenes de disolventes que emplea (atribuibles a la lenta difusión de los analitos desde la matriz de la muestra hacia el fluido de extracción y/o a la lenta desorción de los componentes desde la matriz) hacen de ella una técnica que actualmente está siendo reemplazada por algunas de las anteriores. La tendencia hacia la que se dirigen los métodos de preparación de muestras actualmente implica: el uso de pequeñas cantidades de disolventes con el consecuente menor volumen de residuos, menor tiempo posible a que se vea sometido el analista expuesto a disolventes peligrosos y menores costes operacionales, es por eso por lo que a continuación nos vamos a concentrar en las cuatro técnicas alternativas a la Soxhlet.

Finalmente conviene señalar que existe también otro método clásico de preparación de muestras sólidas que sigue empleándose en la actualidad: extracción sólido-líquido (ESL) o maceración con disolventes, y que también suele utilizarse como método de estándar de comparación entre distintas técnicas extracción sobre muestras sólidas.

Esta técnica de extracción también se emplea con vistas a desarrollar procedimientos industriales para el aprovechamiento de subproductos u obtención de compuestos de interés. Es el caso de la industria relacionada con los derivados de la industria enológica, por ejemplo Lo Curto y col.¹²⁴ sugieren el empleo del orujo de uva rico en azúcar sobrante de las destilerías para la producción de levaduras al obtener, mediante una extracción con agua caliente, una solución rica en azúcares, la cual a través de su fermentación permite obtener altos niveles de biomasa. Puesto que los subproductos de la uva son una económica fuente de fenoles, Pinelo¹²⁵ propone su extracción continua con agua a 50°C para su empleo como conservantes alimentarios y suplementos dietéticos. Asimismo Mantell y col.¹²⁶ evalúan la extracción de antocianinas con metanol a partir de pasta de uva tinta; González-Manzano¹²⁷ extrae flavan-3-oles a partir de pepitas y hollejos de uva usando etanol.

Por último también podemos indicar que la ESL es también de utilidad en la industria enológica al permitir mejorar los procesos implicados en ella o al proporcionar métodos para análisis de compuestos de interés. Serra y col.¹²⁸ determinan ocratoxina A en uvas tras someter a las mismas a una extracción con una solución de bicarbonato sódico y polietilenglicol. En cuanto a la mejora del proceso de vinificación, en el caso de los vinos tintos se ha empleado la ESL para evaluar el potencial fenólico¹²⁹ o la composición antocianica de los mismos, con etanol¹³⁰ o con agua.¹³¹ Además, Romero-Pérez y col.¹³² extraen *trans*-resveratrol y sus isómeros glucosilados, a partir de hollejos de uva, con etanol-agua (80:20, v/v) a 60°C durante 30 minutos.

I.3.2 Separación, identificación y cuantificación

Las técnicas analíticas más comunes empleadas para determinar compuestos polifenólicos es la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). En los últimos años se ha comenzado a utilizar también la electroforesis capilar (EC), y, en menor medida, la cromatografía micelar electrocinética (CME).¹³³ También se ha llegado a emplear la cromatografía gaseosa (CG), pero, debido a la baja volatilidad de los compuestos polifenólicos, suponía la necesidad de derivatizar, existen, no obstante, algunas aplicaciones, como el análisis de flavonoides y flavononas en frutas cítricas.¹³⁴

La CLAE es, sin duda, la técnica analítica más usual para la caracterización de compuestos polifenólicos, tal como se comprueba en las revisiones realizadas por Markham en 1982¹³⁵ y por Robards y Antolovich en 1997.²¹ En efecto el papel jugado por esta técnica en la identificación así como en la cuantificación de estructuras polifenólicas es destacado, por ejemplo, podemos mencionar que la separación de numerosas estructuras de antocianinas se consigue en 20 minutos bajo régimen isocrático, o que podemos usar la inyección directa para la analizar muestras de vino con la conveniencia de llevar a cabo la separación de los compuestos polifenólicos por medio de un gradiente de elución en la fase móvil.¹³⁶

Las fases estacionarias más comunes se preparan con sílice químicamente modificada conteniendo cadenas de hidrocarburos, donde las constituidas por 8 átomos de carbono (C₈) se usan en menor extensión que las constituidas por 18 átomos de carbono (C₁₈).

Por otro lado, la modalidad de elución, isocrática o por gradiente, depende de la composición polifenólica presente en las muestras. La elución isocrática ha sido empleada en aquellas muestras cuya composición polifenólica esté constituida por el mismo grupo o familia estructural.

Por este método es posible determinar flavonoles (quercetina, miricetina y kempferol) en muestras de vino.⁴⁷

Sin embargo, es necesario indicar que en la mayoría de los estudios cromatográficos publicados se usa la elución en gradiente. Además debemos mencionar que la mayoría de los expertos en cromatografía han empleado gradiente lineal bajo flujo constante, y que cuando es necesaria la temperatura en la separación, en general, nunca debe ser muy alta.

Los estudios publicados proponen como disolventes participantes en la fase móvil al metanol, acetonitrilo y, en menor extensión, tetrahidrofurano, así como la posibilidad de incorporar al medio pequeñas cantidades de ácidos débiles como fórmico, acético, sulfúrico o fosfórico. Bajo las mencionadas condiciones es posible resolver varias mezclas complejas originarias de vinos, frutas cítricas y manzanas. En efecto, un método de elución con gradiente de fase móvil binaria y constituida por un 5% de ácido acético como disolvente de elución de bajo grado en una mezcla constituida por acetonitrilo acuoso, en presencia del mismo modificador ácido permite resolver numerosos picos en muestras de vino.⁴⁰

Con respecto al sistema de detección usado en CLAE adecuado para la determinación de compuestos fenólicos, es necesario enfatizar que la detección UV-Vis es, sin duda, el más común. Los sistemas de fluorescencia y de detección electroquímica se utilizan en menor extensión y para casos específicos, como en la determinación de compuestos cuya absorbancia en el UV-Vis es muy baja.

La CLAE con detección mediante matriz de fotodiodos alineados ha sido, y es, ampliamente utilizada para el análisis de polifenoles en vinos con distintos fines. Así Gómez-Mínguez y Heredia¹³⁷ estudian, mediante esta técnica, el efecto que la maceración (vinificación tradicional o maceración carbónica) tiene en la composición antocianica y el color objetivo de vinos de la variedad Syrah. También analizan la composición polifenólica mediante esta técnica Guillén y col.¹³⁸ en mostos en fermentación, Gálvez y col.¹³⁹ en vinagres, o Barroso y col.¹⁴⁰ en brandies.

Con este tipo de cromatografía también se ha estudiado la influencia que las distintas prácticas enológicas empleadas durante las etapas de vinificación o de envejecimiento^{141,142} tienen en la composición fenólica de los vinos y/o vinagres obtenidos. Así, Danza y col.¹⁴³ estudian la evolución que presentan vinos tintos de la D.O. Cigales durante su envejecimiento en tres sistemas: en barricas, con virutas (chips) de madera, o con duelas de madera. A su vez, se ensayaron distintos tipos de madera de roble: americano, francés y húngaro. Las variables que estudiaron fueron los monoglucósidos de delfinidina, cianidina, peonidina, petunidina y malvidina (como esteres acéticos y p-cumáricos), así como vitisina A, y los parámetros de color.

Aprovechando este ensayo, este mismo grupo de investigadores, evalúan asimismo, el efecto que la adición de virutas de roble tiene sobre los compuestos fenólicos de bajo peso molecular.¹⁴⁴

También de Simón y col.¹⁴⁵ estudian las familias de compuestos fenólicos y los polifenoles de bajo peso molecular presentes en vinos envejecidos en barricas de roble español, francés y americano.

Guillén y col.¹⁴⁶ desarrollan un método de CLAE con detección por fotodiodos alineados, para la medida de diversos compuestos fenólicos en vinos. Para ello evalúan 5 tipos de columna y varias fases móviles. Los mejores resultados los obtienen con la columna LiChrospher C-18 y con un gradiente binario de metanol-agua (con 2% de ácido acético).

Este método de separación y análisis se ha empleado frecuentemente en el análisis de antocianinas y otros compuestos relacionados con el color.^{147,148} Por ejemplo, Revilla y col.¹⁴⁹ estudian el uso del empleo de la CLAE en el análisis de antocianinas para la diferenciación de distintas variedades de uvas tintas y de los vinos elaborados con ellas.

La CLAE es también el método seleccionado mayoritariamente para la determinación de compuestos fenólicos en general.^{150,151,152} Así, Moreno y col.¹⁵³ estudian de esta forma la composición fenólica de bajo peso molecular en vinos de Jerez; Silva y col.¹⁵⁴ analizan los compuestos fenólicos no coloreados presentes en vinos tintos. También Pozo-Bayón y col.¹⁵⁵ utilizan esta técnica para estudiar el efecto que el rendimiento del viñedo tiene en la composición de vinos espumosos de la variedad Parellada; Benítez y col.¹⁵⁶ analizan los cambios que experimenta la composición polifenólica de vinos finos expuestos a radiación UV y Vis durante su almacenamiento; o Alonso y col.¹⁵⁷ analizan de esta forma la composición polifenólica de distintos tipos de vinos y la relacionan con su poder antioxidante.

Kerem y col.¹⁵⁸ desarrollan un método rápido de CLAE con detección UV para el análisis de ácidos orgánicos y polifenoles en vinos y mostos tintos. Un método similar es desarrollado por Revilla y Ryan¹⁵⁹ para el análisis de distintos compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, presentes en extractos de uva y vinos, sin necesidad de una etapa de preparación de muestra previa a la CLAE.

Wang y Huang⁹² utilizan esta técnica para analizar flavonoides, mientras que Monagas y col.¹⁶⁰ la emplean en la determinación de flavan-3-oles.

En el caso particular del análisis de *trans*-resveratrol y derivados en vinos y uvas, son varios los autores que han empleado distintas alternativas de CLAE:^{161,162,13} Ratola y col.¹⁶³ analizan este compuesto en vinos mediante detección UV; Kolouchova-Hanzlikova y col.¹⁶⁴ emplean el mismo tipo de detección, además de la detección

electroquímica; mientras que Vitrac y col.,¹⁶⁵ en cambio, seleccionan la detección fluorimétrica con este mismo fin.

Además recientemente han comenzado a emplearse columnas con soporte monolítico, con las que se consigue separaciones más rápidas, como consecuencia de sus ventajas hidrodinámicas,¹⁶⁶ de hecho se han utilizado para el análisis de compuestos fenólicos en vinos.¹⁶⁷

Finalmente, hay que indicar que la CLAE acoplada con la EM ha permitido la resolución de muchas mezclas complejas de compuestos polifenólicos, ya sea como tal o en tandem (CLAE-EM-EM).

Pérez-Magariño y col.¹⁶⁸ describen varias aplicaciones de CLAE-EM para el análisis de distintos compuestos fenólicos, entre los que se encuentran los flavan-3-oles. También Domínguez y col.¹⁶⁹ analizan de esta forma resveratrol y derivados glicosilados, o Borbalán y col.¹⁶⁹ correlacionan la composición polifenólica con la actividad antioxidante en vinos blancos y tintos. De igual manera: Baderschneider y Winterhalter¹⁷⁰ analizan benzoatos, cinamatos, flavonoides y lignanos en vinos de la variedad Riesling; o Heier y col.,¹⁷¹ García-Beneytez y col.¹⁷² o Revilla y col.¹⁷³ determinan antocianinas en distintos tipos de vino.

La CLAE-EM-EM es empleada por: Stecher y col.¹⁷⁴ en el análisis de flavonoides y estilbenos en vinos tintos; y al igual que Sun y col.¹⁷⁵ en la determinación de procianidinas en vinos; o que Careri y col.¹⁷⁶ al analizar *cis*- y *trans*-resveratrol en vino, orujos y subproductos.

Respecto a la electroforesis capilar conviene resaltar el avance de esta técnica en los últimos años ha permitido su aplicación a la resolución de mezclas complejas de polifenoles.

En el caso del análisis de muestras de interés enológico podemos citar: el empleo de tetrafluoroborato de tetraetilamonio¹⁷⁷ como electrolito en la separación electroforética de compuestos fenólicos en extractos de pepitas de uvas; en la determinación de aldehídos aromáticos en brandies;¹⁷⁸ o al análisis de vinos en general,^{179,180,181} o de tintos en particular.^{182,183}

Arce y col.²⁴⁴ emplean la EC para el análisis de los polifenoles obtenidos mediante la EFSC de orujos de uva. También utilizan esta técnica, Arce y col.¹⁸⁴ al analizar *trans*-resveratrol y otros polifenoles en vinos; Peng y col.¹⁹⁰ en el análisis de

polifenoles en vinos tintos; o Minussi y col.¹⁸⁵ al determinar la composición polifenólica en vinos comerciales.

Otra alternativa habitualmente empleada dentro del EC, es la electroforesis capilar de zona (ECZ), especialmente en el análisis de vinos tintos.^{186,187,188} Así, Sáenz-López y col. emplean esta técnica para el análisis de antocianinas en vinos.^{189,190,191}

Muchos autores mantienen que la electroforesis capilar y la CLAE son técnicas analíticas indispensables, porque en muchos casos se complementan, especialmente cuando se quiere tener información general fiable sobre la presencia de compuestos polifenólicos en ciertos alimentos.^{192,193,194}

Vanhoenacker y col.¹⁹⁵ comparan la CLAE-MS con la EC-MS en el análisis de compuestos fenólicos en extractos, obtenidos con éter dietílico, de vinos tintos. Los resultados obtenidos les permiten concluir que la EC-MS consigue una eficiencia en la separación mucho mayor que la CLAE-MS, sin embargo, esta última proporciona mayor información de la estructura de los constituyentes. De forma que con la EC-EM se identifican sólo 13 compuestos, frente a los 24 identificados con la CLAE-EM.

I.4 Compuestos relacionados con el aroma presentes en uvas y vinos

I.4.1 Introducción. Tipos de Aromas

El aroma del vino es de una gran complejidad, debida, por una parte, a su origen, como consecuencia de un complejo conjunto de interacciones biológicas, bioquímicas y tecnológicas, y, por otra, a la gran variedad de compuestos volátiles que es capaz de contener, y cuyo intervalo de concentración oscila desde los miligramos/litro a los nanogramos/litro.

Los límites de percepción de estos compuestos varían, asimismo, considerablemente. En consecuencia, el impacto olfativo de los compuestos volátiles en el vino dependerá de la concentración y del tipo de compuesto en concreto. Así, ciertos compuestos, presentes en cantidades traza, pueden jugar un papel fundamental en el aroma, mientras que otros, mucho más abundantes, pueden tener únicamente una ligera contribución al mismo. Además, el impacto de cada componente en las características organolépticas del vino dependerá de sus propiedades específicas.

En general, la complejidad del aroma del vino, se debe, como indicamos antes, a la diversidad de mecanismos implicados en su desarrollo:

- el metabolismo de la uva: dependiente de la variedad, suelo, clima, y de las técnicas de manejo de la viña. En la mayor parte de las variedades de vinificación, generalmente poco aromáticas, estos constituyentes son esencialmente precursores: ácidos grasos, glicósidos, carotenoides y compuestos fenólicos.
- los fenómenos bioquímicos (oxidación e hidrólisis) que ocurren antes de la fermentación, producidos en las etapas de extracción del mosto y maceración. Estos constituyentes son esencialmente compuestos de 6 átomos de carbono.
- el metabolismo fermentativo de los microorganismos responsables de las fermentaciones alcohólica y láctica. La levadura tiene el papel esencial de producir etanol a partir del azúcar, y los constituyentes fermentativos del aroma son de hecho los productos secundarios de su metabolismo, implicando nutrientes no específicos del medio que provienen de la uva. Cuantitativamente, éstos son fundamentalmente los más abundantes.

- las reacciones químicas o enzimáticas que se desarrollan tras la fermentación, y durante la conservación (envejecimiento) del vino en depósito, en bodega o en botella. Se trata de sustancias volátiles por sí mismas o de precursores varietales que se transforman en compuestos volátiles, que a su vez pueden evolucionar también. El conjunto de estos procesos se corresponde con transformaciones del aroma del vino durante esta fase.

Pueden distinguirse, por tanto, los siguientes tipos de aromas en el vino:

- ♦ **primario:** constituyentes varietales procedentes, de una u otra manera, de la uva.
- ♦ **secundario:** consecuencia del metabolismo de las levaduras durante la fermentación.
- ♦ **terciario:** desarrollado durante la conservación y envejecimiento del vino.

Por tanto, en la apreciación objetiva del aroma del vino y de su evolución se ha de tener en cuenta tanto el conjunto de los constituyentes volátiles (compuestos libres), como los precursores (compuestos ligados), ya que, conjuntamente, constituyen el potencial aromático del vino. Con todo lo anterior, son muchos los factores que condicionan el aroma de los vinos recién terminados, entre estos están: la variedad, el clon, el año, la zona (*terroir*), las prácticas culturales, las manipulaciones de la uva antes de la fermentación, las fermentaciones o los efectos de la conservación.

I.4.2 El aroma en la uva

Los compuestos odoríferos procedentes de la uva (que reflejan la variedad, el clima y el suelo) juegan un papel más decisivo en la calidad y el carácter regional del vino que otros componentes del aroma, ya que son los responsables de los aromas varietales del vino.

Las denominadas variedades aromáticas, como los Moscateles, producen mostos con aromas similares a los del vino resultante, en cambio, cuando se emplean otras variedades, más “simples” desde el punto de vista aromático, los mostos no presentan prácticamente olor, aún así producen vinos con aromas característicos que son relativamente específicos de la variedad de uva de la que están hechos. Esto se cumple para la mayoría de las variedades más extendidas: Merlot, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Sauvignon Blanc, Semillon, Pinot, Gamay, Chardonnay, Chenin Blanc, etc... Todo esto nos lleva a la conclusión de que el concepto de precursores de aromas varietales, esto es, formas inodoras de las sustancias que producen aromas varietales, es una cuestión muy importante a considerar en la elaboración de vinos.

Sin embargo, también hemos de considerar que el término aroma varietal no implica que cada variedad de uva contenga compuestos volátiles específicos. De hecho, los mismos compuestos odoríferos y sus precursores están presentes en los mostos y vinos de diversas variedades de uva, así como en otras frutas y plantas. Así pues, la personalidad aromática individual de los vinos elaborados con cada variedad de uva, se debe a diversas combinaciones, y concentraciones, de varios compuestos.

En el potencial aromático de la uva pueden distinguirse tres grandes grupos:

- el aroma varietal libre (sustancias olorosas ligadas a la variedad).
- precursores no volátiles e inodoros (glicósidos, ácidos fenólicos, ácidos grasos, etc...).
- compuestos volátiles, olorosos o no, inestables que se transforman en otros compuestos olorosos (terpenoles, C13 norisoprenoides, dioles terpénicos, etc...).

I.4.2.1 Aromas varietales libres

Podemos diferenciar, entre las sustancias volátiles relacionadas con la tipicidad aromática de la cepa, tres familias químicas: los compuestos terpénicos, las pirazinas y los C13-norisoprenoides.

I.4.2.1.1 Compuestos terpénicos

La amplia familia de compuestos terpénicos está muy extendida en el reino vegetal. Dentro de la misma se incluyen los monoterpenos (compuestos con 10 átomos de carbono) y sesquiterpenos (con 15 átomos de carbono), formados por dos y tres unidades de isopreno respectivamente. Los monoterpenos aparecen en forma de hidrocarburos simples (limoneno, mirceno, etc...), aldehídos (linalal, geranial, etc...), alcoholes (linalol, geraniol, etc...), ácidos (ácido linálico, ácido geránico, etc...), e incluso en forma de ésteres (acetato de linalilo, etc...). En la figura 14 se muestran las estructuras de los compuestos terpénicos más frecuentes, los monoterpenoles, y otros terpenos.

Cordonnier, en 1956, confirmó la hipótesis planteada por Austerweil diez años antes, sobre la implicación de los compuestos terpénicos en el aroma del Moscatel, al detectar la presencia de tres alcoholes monoterpénicos (linalol, alfa-terpineol y geraniol) en uvas Moscatel. Desde entonces, se ha investigado ampliamente la presencia de compuestos terpénicos en uvas y vinos.^{196,197}

De hecho, estos son los compuestos odoríferos que han sido estudiados en más detalle en *Vitis vinifera*. Tanto en vinos como en uvas se han identificado las formas libres y los precursores inodoros, principalmente en sus formas glicosiladas. Se pueden citar actualmente alrededor de 70 compuestos terpénicos identificados. En su mayor parte se trata de monoterpenos, algunos sesquiterpenos y de los alcoholes y aldehídos correspondientes.

En la constitución del aroma varietal los compuestos terpénicos y derivados juegan un importante papel, ya que, se forman en la uva y se les encuentra intactos o relativamente poco transformados en el vino.¹⁹⁸ Entre los compuestos encontrados en la bibliografía, se pueden distinguir:

- hidrocarburos terpénicos en C10 de tipo limoneno, alfa-terpineno, p-cimeno, mirceno o sesquiterpenos como el farneseno, o el gamma-cadineno.
- alcoholes monoterpénicos, generalmente más olorosos que los anteriores. Tienen los olores florales característicos, y se ha puesto de manifiesto que sin estos compuestos la nota típica olorosa del moscatel no puede aparecer. Podemos citar los siguientes: linalol, nerol, geraniol, ho-trienol, citronelol, o alfa-terpineol.
- algunos alcoholes terpénicos como el farnesol o el gamma-cadinol.
- numerosos óxidos: óxidos de linalol o el nerol óxido, que generalmente son menos olorosos que los terpenoles precedentes.
- algunos aldehídos: geranial, neral, citronelal... muy olorosos pero olfativamente más agresivos que los alcoholes correspondientes.
- los dioles terpénicos existen con frecuencia y relativamente en gran número.¹⁹⁹ Al presentar las funciones alcohol suplementarias son más solubles, pero también bastante menos olorosas. Estos compuestos también juegan un papel considerable como precursores.²⁰⁰

La biosíntesis de este grupo de compuestos parece estar comprendida por varias etapas que llevan desde la glucosa al ácido mevalónico via acetyl CoA, y después de éste ácido al isopentenil pirofosfato, unidad base isoprenica de 5 átomos de carbono, a partir de la cual van a construirse todos los terpenoides por condensación.

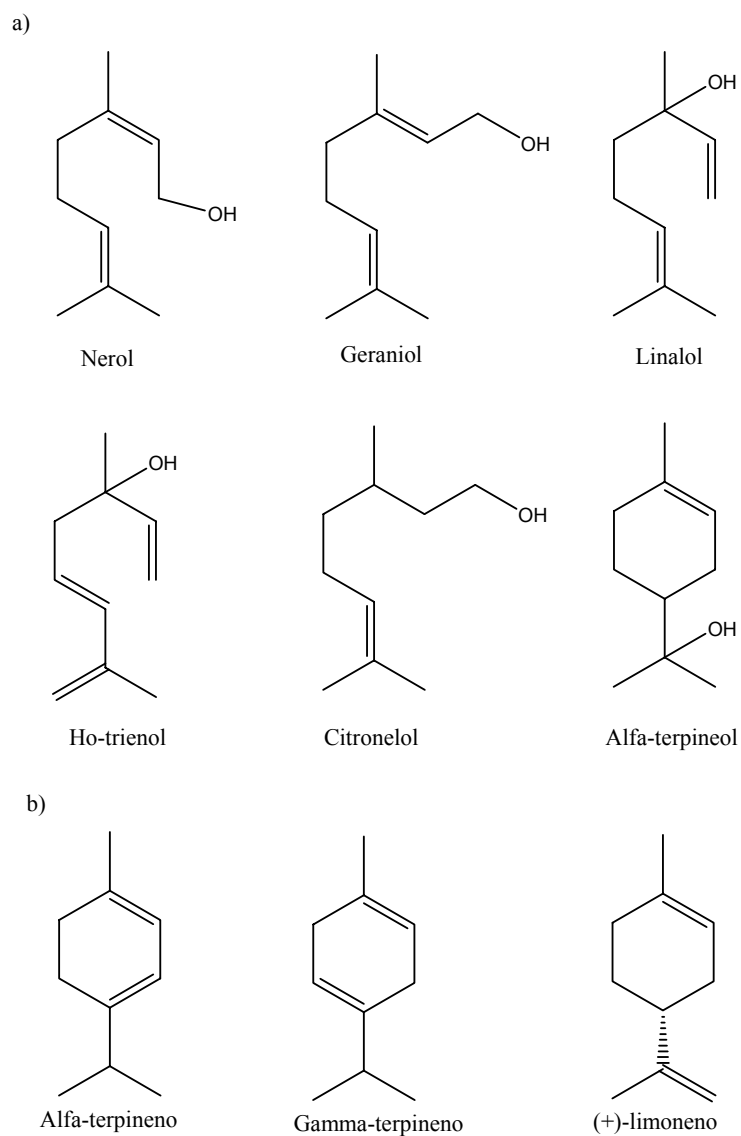


Figura 14 a) Alcoholes terpénicos, b) otros compuestos terpénicos

La localización en la baya de los terpenoles libres parece concentrarse en la parte sólida en más del 50%, así el geraniol y el nerol se encuentran en un 90% en el hollejo, mientras que el linalol se encuentra en un 50% en el zumo. Por ello, teniendo en cuenta los pesos relativos de hollejo y pulpa, todas aquellas operaciones que impliquen un aumento del contacto entre las partes sólidas y el jugo, deben ser tenidas en cuenta por su implicación en las características finales, desde el punto de vista aromático, del vino a obtener.

El contenido en terpenoles parece estar influenciado por el estado sanitario de la uva, puesto que éstos no son insensibles a los ataques de la uva por los parásitos, como la *Botrytis cinerea*. Se ha demostrado que linalol, nerol, geraniol y, en menor medida, alfa-terpineol, disminuyen de forma importante en el mosto procedente de uvas con pudrición, y que esta disminución es tanto más marcada, cuanto mayor incidencia tiene el ataque.²⁰¹ De hecho, en estas condiciones, el linalol, por ejemplo, produce una decena de metabolitos, donde abunda un diol, el E-2,6-dimetil-2,7-octadieno-1,6-diol, siendo este compuesto el único diol oloroso identificado en la uva. Sin embargo, también ha de indicarse, que no existe prueba de que estos metabolitos sean exclusivamente consecuencia de la infección, así, el (Z)-8-hidroxilinalol forma parte los mostos y vinos de la variedad Morio-Muscat, pero puede ser producido también por *Botrytis cinerea* a partir de linalol.²⁰²

Como ya hemos mencionado anteriormente, estos compuestos juegan un papel fundamental en el aroma de uvas y vinos de la familia Moscatel (Moscatel de Frontignan o grano pequeño, Moscatel de Alejandría o de Málaga, Moscatel de Alsacia), al presentar, a menudo, concentraciones por encima de los niveles de percepción. También ejercen ese mismo papel en el aroma de otras variedades de uva alemanas y alsacianas: Gewürtztraminer, Pinot Gris, Riesling, Auxerrois, Muller-Thurgau, etc...; o de las uvas Viognier, Albariño o Muscadelle.

En cambio, aquellos vinos elaborados a partir de variedades consideradas no aromáticas (Sauvignon Blanc, Syrah, Cabernet Sauvignon, Merlot, etc...), presentan concentraciones de monoterpenoles que están generalmente por debajo de los umbrales de percepción. Aún así, existen, algunos clones de Chardonnay con el carácter "Moscatel".

I.4.2.1.2 Pirazinas

Se trata de compuestos con heterociclos nitrogenados producidos por el metabolismo de los aminoácidos. Fueron identificados por primera vez en uvas (Cabernet Sauvignon) en 1975 por Bayonove y col.²⁰³

Las pirazinas están asociadas con los aromas vegetales típicos de las variedades Sauvignon y Cabernet Sauvignon, relacionados con el carácter herbáceo, y únicamente aparecen en concentraciones por encima del umbral de reconocimiento en las uvas y vinos de las variedades Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon y Cabernet Franc, y, en algunas ocasiones, en la Merlot.

Las especies mayoritarias son la 2-metoxi-3-isobutil-pirazina, la 2-metoxi-3-*sec*-butil-pirazina y la 2-metoxi-3-isopropil-pirazina, relacionándose su presencia con notas a pimienta verde, espárragos o notas terrosas.

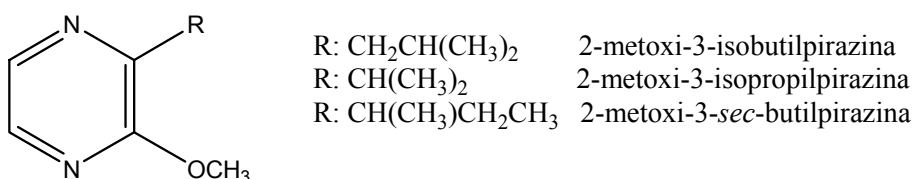


Figura 15 Principales pirazinas encontradas en uvas y vinos.

Allen y col.²⁰⁴ analizan la existencia de los distintos orígenes de pirazinas en uvas y vinos, así parece que la ruta conducente a la formación de 2-etil-3-metoxipirazina es distinta a la de la 2-isobutil-3-metoxipirazina, puesto que el componente etilo no muestra la dependencia que presenta el componente isobutilo con la variedad de uva, grado de maduración y condiciones de desarrollo de la viña.

La concentración en que aparecen estos compuestos va a estar influenciada por distintos factores, siendo el primordial el grado de maduración de la uva. Así, la concentración es inversamente proporcional al grado de madurez, disminuyendo apreciablemente a partir del envero y siendo prácticamente inapreciables en condiciones óptimas de maduración. En consecuencia, cualquier factor que influya en la maduración

de la baya (clima, manejo del viñedo, etc...) influirá a su vez en la presencia de las pirazinas. Se ha comprobado que la concentración de estos compuestos es mayor en las zonas con clima más frío en el caso de las variedades Sauvignon Blanc y Cabernet Sauvignon cultivadas en Australia;²⁰⁵ y que el suelo ejerce un papel decisivo en los niveles de pirazinas, de forma que las viñas cultivadas en suelos calizos y arcillosos presentan mayor contenido de las mismas que los arenosos.

De Boubee y col.²⁰⁶ evalúan el efecto que las condiciones ambientales (suelo y clima) ocasionan en las concentraciones de 2-metoxi-3-isobutilpirazina, y, por tanto, en el impacto organoléptico, en vinos tintos de Burdeos y del Loira. Llegan a la conclusión de que las uvas desarrolladas en suelos cenagosos contienen mayores contenidos de este compuesto que las cultivadas en suelos arenosos. En cuanto al clima, la concentración se duplica en años más soleados y con menos precipitaciones.

Hashizume y Samuta²⁰⁷ asimismo, estudian el efecto que el grado de madurez de la uva y la exposición solar de la baya tiene sobre la concentración de las pirazinas 2-metoxi-3-isopropilpirazina y 2-metoxi-3-isobutilpirazina. Estos mismos autores también determinan compuestos carbonilo alifáticos y pirazinas en raspones y uvas,²⁰⁸ llegando a la conclusión de que existe una relación entre su presencia en el mosto y el incremento del sabor herbáceo que se aprecia cuando no se despalilla la vendimia.

I.4.2.1.3 C13-Norisoprenoides

La degradación oxidativa de carotenoides, terpenos con 40 átomos de carbono (tetraterpenos), da lugar a derivados de 9, 10, 11 o 13 átomos de carbono. Entre estos compuestos, los derivados norisoprenoides de 13 átomos de carbono, presentan interesantes propiedades odoríferas.

Baumes y col.²⁰⁹ realizan una serie de ensayos para comprobar la biogeneración de compuestos C13-norisoprenoides a través de la ruta apo-carotenoidea. Esta ruta implicaría la degradación de carotenoides por oxigenasas regioespecíficas. De acuerdo con esta hipótesis, los carotenoides se sintetizan fundamentalmente desde la primera etapa de formación del fruto hasta el envero, y a partir de entonces se degradan, entre envero y maduración, para producir C13-norisoprenoides y otros compuestos glicosilados.

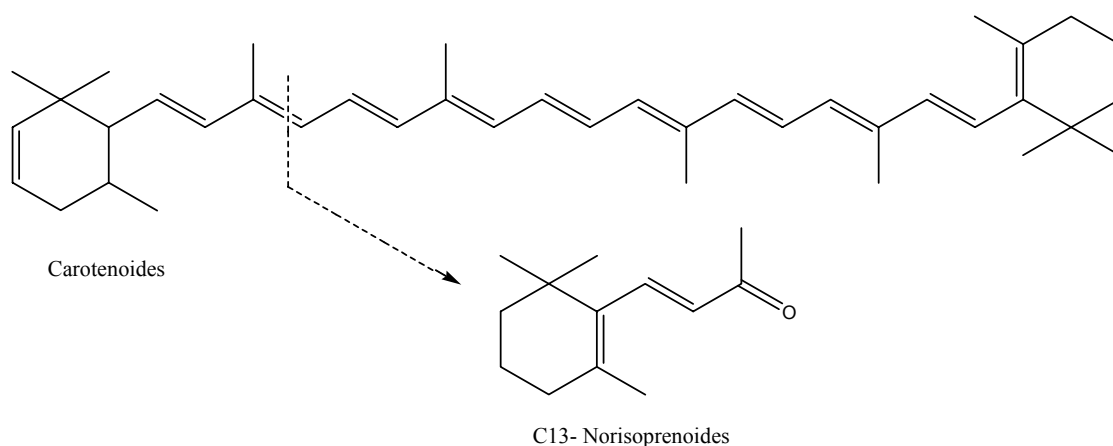


Figura 16 Ruptura de carotenoides conducente a la formación de C13-norisoprenoides en uvas.

Desde el punto de vista químico los derivados norisoprenoides se dividen en dos grupos principales: megastigmanos y no-megastigmanos. El esqueleto megastigmano se caracteriza por un ciclo de 6 átomos de carbono, sustituido en los carbonos 1,5 y 6, y por presentar una cadena alifática de 4 átomos de carbono unida al carbono 6.

Los megastigmanos (figura 17) son C13-norisoprenoides oxigenados en el carbono 7 (serie de las damasconas) o en el carbono 9 (serie de las iononas). Entre estos compuestos, la beta-damasconona, con un aroma complejo de flores y frutas tropicales, presenta un límite de percepción relativamente bajo. Este compuesto fue inicialmente identificado en zumos de uva Riesling y Moscatel, pero está probablemente presente en todas las variedades de uva.²¹⁰ Al igual que éste, la beta-ionona (con aroma característico a violetas) está presente en todas las variedades, y su contribución al aroma de los vinos blancos es innegable.

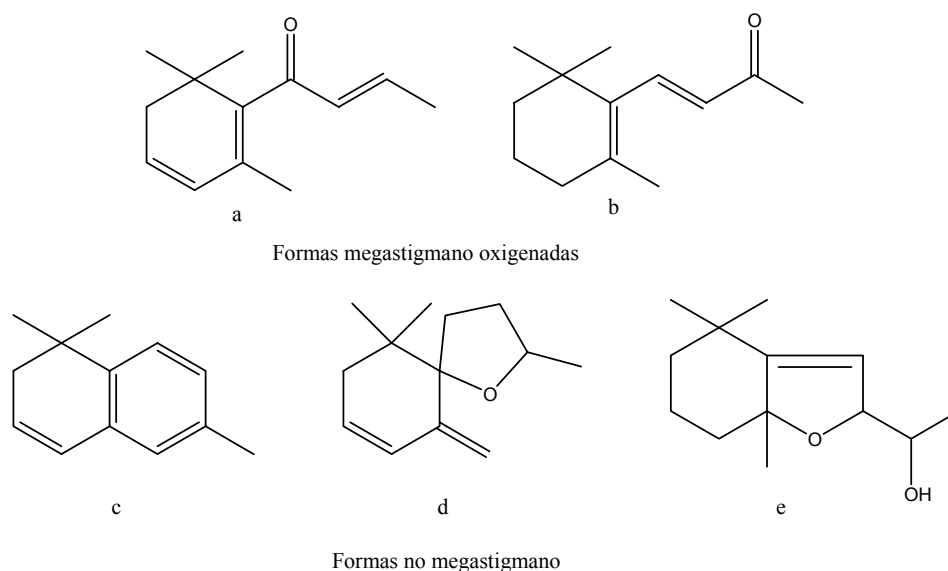


Figura 17 Principales familias de derivados C13-norisoprenoides en uvas. a: beta-damascenona, b: beta-ionona, c: TDN, d: vitispirano, e: actinidol.

Entre los C13-norisoprenoides no megastigmanos (figura 17), el más importante es el 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN), que presenta un olor distintivo a queroseno, jugando un importante papel en el aroma a “petróleo” de los vinos viejos de Riesling. Este compuesto está generalmente ausente en uvas y vinos jóvenes, pero puede aparecer durante el envejecimiento en botella. Otros compuestos pertenecientes a la misma familia son los actinidoles y el vitispirano, que presentan olores reminiscentes del alcáfor.

Winterhalter²¹¹ describe cuales son las rutas mayoritarias que proporcionan compuestos C13-norisoprenoides relacionados con el aroma, como theaspiranos, vitispiranos, edulanos o beta-damascenona. Por ejemplo, se propone que la beta-damascenona procede de un diol acetilénico (megastigm-5-en-7-ino-3,9-diol) glicosilado.

Oliveira y col.²¹² estudian el efecto que algunos parámetros vitícolas (forma de cultivo, estado de madurez, luz solar y exposición a la sombra, altitud y altura vegetativa) presentan sobre el perfil carotenóide de distintas variedades tintas de uva. Así, llegan a las siguientes conclusiones: el contenido carotenóide disminuye a lo largo de la maduración; es mayor en uvas sombreadas frente a las expuestas directamente a la luz solar; es mayor en uvas cultivadas en terrazas elevadas (donde existe menores temperaturas y mayor humedad), y es mayor en uvas cultivadas con elevadas alturas de la vegetación.

I.4.2.2 Precursores del aroma

Como se ha comentado en el apartado anterior, son varias las sustancias que pueden actuar como precursores del aroma: monoterpenos, dioles o polioles, ácidos grasos, carotenoides, compuestos fenólicos o compuestos azufrados. Sin embargo, destacan especialmente los dos primeros tipos de compuestos. Estos precursores varietales aparecen mayoritariamente en forma glicosídica.²¹³

I.4.2.2.1 Monoterpenos, dioles y polioles terpénicos

La existencia de una fracción no volátil e inodora en el aroma terpénico en uvas de Moscatel que se revela química o enzimáticamente, fue demostrada por primera vez por Cordonnier y Bayonove en 1974. Posteriores estudios realizados por diversos grupos de investigación, han puesto de manifiesto que los principales monoterpenos y polioles terpénicos están presentes en uvas en forma de glicósidos (con glucosa, arabinosa, ramnosa o apiosa), tal como se muestra en la siguiente figura:

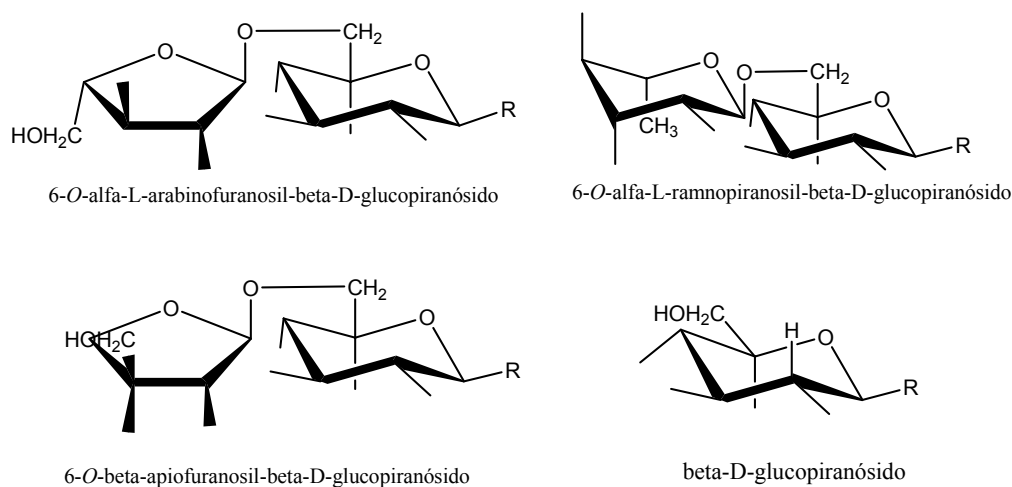


Figura 18 Ejemplos de glicósidos terpénicos (o norisoprenoideos) identificados en uvas. R= terpenol o C13-norisoprenoide.

En general, parece que las formas libres y conjugadas de los terpenoles se acumulan en uvas maduras desde el envero. Sin embargo existen dos posturas respecto a su evolución concreta, así, algunos autores indican que se produce una acumulación continua de monoterpenos incluso en uvas sobremaduras,^{214,215} otros, en cambio, comparten la opinión, más extendida, de que los monoterpenos libres disminuyen antes de que se alcance el máximo nivel de azúcares.

Se han identificado cuatro tipos de glicósidos terpénicos: tres diglicósidos (6-*O*-alfa-L-arabinosil-beta-D-glucopiranosido, 6-*O*-alfa-L-rhamnasil-beta-D-glucopiranosido o rutinósido, y 6-*O*-beta-D-apiosil-beta-D-glucopiranosido) y un monoglucósido (beta-D-glucopiranosido).

Entre las agliconas correspondientes, las más frecuentes son terpenoles (linalol, nerol, geraniol), óxidos de los anteriores, dioles y trioles terpénicos.

Todas las variedades de uva contienen glicósidos similares, pero las variedades de uva con aroma a Moscatel presentan mayores concentraciones. Las formas glicosiladas son frecuentemente más abundantes que las libres. Entre los glicósidos correspondientes a las agliconas más odoríferas, los más extendidos son los apiosilglicósidos y los

arabinosilglucósidos, seguidos de los rutinósidos y de los beta-glucósidos. Los monoglucósidos terpénicos en la viña, a diferencia de otras plantas, aparecen en minoría frente a los diglicósidos.

Los monoterpenos glicosilados aparecen en mayor concentración en los hollejos, más que en la pulpa o el jugo, al igual que sucede con los terpenos libres. Park. y col.²⁹ afirman que, aproximadamente el 90% de los monoterpenos están unidos glicosídicamente, sin embargo, hemos de considerar que la proporción relativa de compuestos libres o unidos dependerá de la variedad de uva. Así, la variedad Moscatel de Alejandría, contiene mayor cantidad de terpenoles unidos en el jugo, mientras que en los hollejos hay una proporción similar entre los libres y los unidos. En el caso de la variedad Moscatel de Frontignan, la proporción entre terpenos libres y conjugados es aproximadamente la misma en el jugo y los hollejos.

Si tenemos en cuenta que los glicósidos son mucho más solubles que las agliconas, es lógico considerarlos como vectores para el transporte y acumulación de monoterpenos en plantas, de ahí que se hayan identificado en primer lugar en hojas de viña.²¹⁶

Hemos de considerar que, aunque la uva contiene beta-glicosidasas capaces de liberar ciertos terpenoles odoríferos de sus glicósidos inodoros, bajo las condiciones habituales de vinificación estas enzimas endógenas tienen un efecto limitado en el desarrollo del aroma del mosto por distintas razones, entre ellas que su pH óptimo actuación sería pH=5. Además, la fermentación alcohólica tiene un efecto relativamente débil sobre el potencial glicosilado de las uvas, de manera que la concentración glicosídica en el vino es similar a la de las uvas.

Es por ello, por lo que se está evaluando el empleo de glicosidasas exógenas para incrementar el potencial aromático. El proceso constaría de dos etapas en las que estarían implicados varios sistemas enzimáticos,²¹⁷ así, en primer lugar, una alfa-L-rhamnosidasa, alfa-L-arabinosidasa o una beta-D-apiosidasa hidrolizaría el diglicósido; y en la segunda etapa actuaría la beta-glucosidasa liberando las agliconas odoríferas correspondientes. Este tipo de preparaciones enzimáticas sólo son efectivas en vinos secos, ya que la glucosa inhibe a las beta-glucosidasas fúngicas. El efecto de estas

enzimas exógenas se centra en la liberación de los aromas de las variedades con “aroma a Moscatel”, no ocurriendo lo mismo en el caso de otras variedades consideradas menos aromáticas por distintas razones (entre ellas, en que no todos los precursores del aroma varietal tienen que estar necesariamente glicosilados y en que no todas las agliconas no terpénicas son odoríferas).

Por otro lado, los monoterpenoles son compuestos más o menos sensibles a las reacciones de hidratación y de oxidación.²¹⁸ Estos fenómenos pueden desarrollarse durante el envejecimiento del vino, así al transcurrir tres meses, pueden obtenerse a partir del linalol los siguientes compuestos: nerol, geraniol, alfa-terpineol y 6-7-dihidroxi-linalol,²¹⁹ tal como se muestra en la siguiente figura:

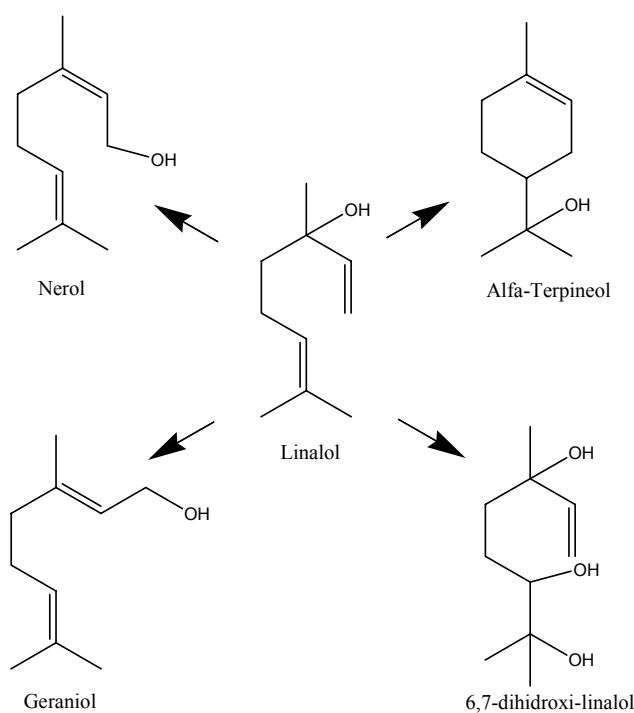


Figura 19 Compuestos derivados del linalol formados durante el envejecimiento

Los dioles o polioles terpénicos se transforman a pH relativamente ácidos, tales como los de los mostos o vinos, en monoterpenoles con grados de oxidación más o menos elevados. Si bien, mientras algunos compuestos pueden contribuir positivamente

al aroma, en otros casos, otros compuestos pueden influir negativamente en las características organolépticas.^{5,14} Con la maduración alcanzan valores más elevados, llegando algunos de estos compuestos a aumentar considerablemente, como el (E)-3,7-dimetil-octa-1,5-dieno-3,7-diol, y llegando a sobrepasar al total de todos los demás terpenoles.

I.4.2.2.2 Carotenoides

Los carotenoides parecen ser los compuestos responsables, al menos en parte, de que a partir de variedades de uva no aromáticas, se obtengan vinos de calidad que se distinguen por unas características particulares, puesto que se les puede considerar como precursores aromáticos propios de la cepa.²²⁰

Estos compuestos tienen el mismo origen que los terpenoles, aunque con un grado de polimerización más elevado. Su contenido en la baya varía de 15 a 2000 mcg/kg según el compuesto, la cepa, la zona de producción, etc...²²¹

Entre los principales carotenoides identificados, los más abundantes son la luteína y el beta-caroteno, seguidos de la neoxantina, la flavoxantina y la violaxantina por ejemplo. Se localizan en los cloroplastos de las células que constituyen las partes sólidas de la baya, pulpa y hollejo, siendo este último el que presenta mayor contenido (entre 1.8-2.8 veces el de la pulpa).¹⁸

Parece que existe una correlación estrecha entre el grado de maduración de la uva y la proporción de derivados carotenoides (damascenona, vitispirano, etc..., es decir, derivados C13-norisoprenoides), al igual que sucede con los compuestos terpénicos. Se ha comprobado que durante la fase de crecimiento de la baya verde se produce un aumento en el contenido de carotenoides, seguido de un fuerte descenso del mismo a partir del envero hasta maduración, aumentando al mismo tiempo las moléculas derivadas de los mismos,²²² principalmente en formas glicosiladas. Estos cambios probablemente requieren la acción de enzimas presentes en la uva, inicialmente en la degradación oxidativa de los carotenoides y posteriormente en los mecanismos de glicosilación.

Asimismo, parece que la exposición de las uvas a la luz solar durante la maduración acelera la degradación de los carotenoides y se acompaña por un incremento del contenido glicosilado de derivados C13-norisoprenoides.²² Así, Razungles y col.²²³ evalúan el efecto que la exposición solar ejerce en los carotenoides y glicósidos de C13-norisoprenoides en uvas de la variedad Syrah; o Steel y Keller²²⁴ estudian la influencia que la luz UV-B tiene en el contenido carotenoides de los tejidos de *Vitis vinifera* (hojas y bayas).

Se ha comprobado que en medio ácido, varios C13-norisoprenoides oxigenados no muy odoríferos sufren modificaciones químicas que pueden llevar a la formación de compuestos odoríferos como la beta-damascenona,²²⁵ tal como se indica en la siguiente figura:

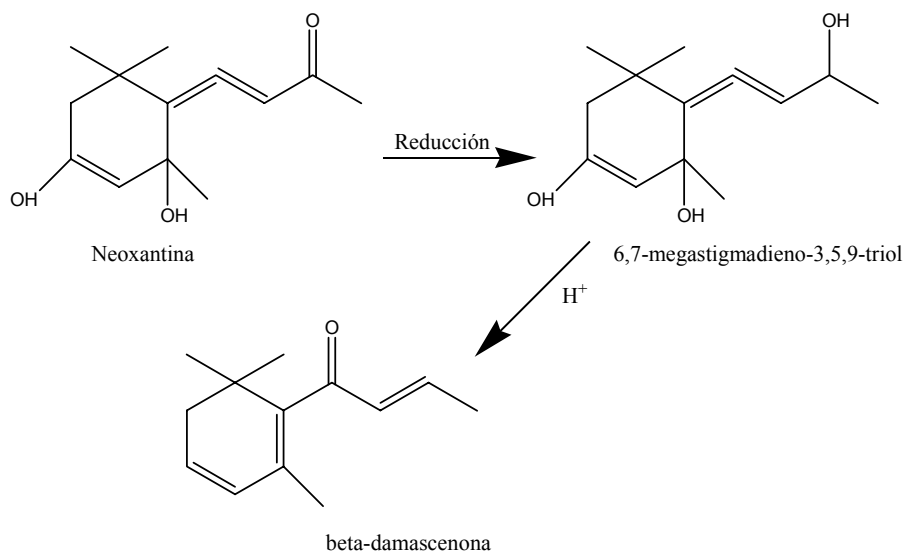


Figura 20 Formación de beta-damascenona en uvas y vino²⁰

Los C13-norisoprenoides están presentes en uvas, principalmente, en forma de precursores no volátiles (carotenoides, o glucósidos, tales como el vomifoliol o el 3-oxo-alfa-ionol).^{19,226} Los glicósidos de estos compuestos, identificados hasta ahora, son todos monoglucósidos, y, aunque no son hidrolizados por las glicosidasas propias de la

uva o de las levaduras, si pueden ser liberados por glicosidasas fúngicas exógenas. Sin embargo, parece que todavía no está muy claro cuales son los mecanismos implicados, y actualmente se desconocen cuales son realmente las reacciones relacionadas con la aparición de derivados C13-norisoprenoides odoríferos.

De Pinho y col.²²⁷ determinan los perfiles de carotenoides en uvas, mostos y vinos fortificados de las variedades de uva cultivadas en la zona del Duero portugués.

Williams y col.²²⁸ relacionan los norisoprenoides volátiles encontrados en los hidrolizados de los precursores existentes en uvas Chardonnay, con su procedencia a partir de luteína, antheraxantina, violaxantina y neoxantina via 3-hidroxi-alfa-ionona, 3-hidroxi-beta-ionona, 5,6-epoxi-3-hidroxi-megastigm-7-en-9-ona y 3,5-dihidroxi-megastigma-6,7-dien-9-ona.

I.4.2.2.3 Otros precursores (alcoholes, compuestos fenólicos, tioles volátiles)

Entre los derivados glicosilados presentes en las uvas, y relacionados con el aroma varietal, pueden encontrarse, además de terpenos y derivados C13-norisoprenoides, los constituidos por agliconas tales como:

- alcoholes lineales o cíclicos (hexanol, feniletanol, alcohol bencílico).
- compuestos fenólicos: ácidos fenólicos y fenoles volátiles derivados (vainillina).

Además, pueden encontrarse los denominados precursores de los tioles volátiles derivados de la cisteína, que parecen ser los responsables del intenso, específico y dominante olor de los vinos de Sauvignon Blanc, un olor que suele ser comparado con el olor de arbustos verdes, o incluso, de orina de gato. Entre los compuestos aromáticos presentes en mostos, que aparecerían como precursores inodoros en forma de S-conjugados de la cisteína,²²⁹ encontramos el 3-mercaptohexanol,²³⁰ 4-metil-4-mercaptopentán-2-ona y 4-metil-4-mercaptopentán-2-ol.^{231,232} Los aromas correspondientes se liberarán durante la fermentación alcohólica, probablemente debido a la acción de una beta-liasa específica. Parece ser, asimismo, que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada, influirá en la intensidad de los aromas liberados.

Des Gachons y col.²³³ estudian la localización de los S-conjugados de la cisteína en la baya, y el efecto que le contacto con los hollejos tiene en el potencial aromático de mostos de Sauvignon Blanc.

I.4.3 Aroma prefermentativo

Los constituyentes volátiles de la etapa prefermentativa se revelan como consecuencia de los diversos tratamientos que sufre la uva, desde que se decide realizar la cosecha hasta que se inicia la fermentación: operaciones de vendimia (especialmente en el caso de que sea mecanizada), transporte (temperatura, mosteo, etc...), estrujado-despalillado-prensado, maceración, etc...

Durante estas operaciones mecánicas, se pone en contacto el mosto de la uva con las partes sólidas, iniciándose toda una serie de reacciones enzimáticas y químicas, potenciadas, en parte, por el aporte de oxígeno que se produce durante las mismas. Entre las reacciones enzimáticas que se desarrollan, además de las implicadas en el pardeamiento, se producen reacciones que darán lugar a compuestos aromáticos, tales como los alcoholes y aldehídos de 6 átomos de carbono, responsables de los olores herbáceos, a partir de ácidos grasos poliinsaturados. La formación de estos últimos compuestos parece variar en función del estado de madurez de la vendimia, de forma que la máxima producción de los mismos aparece antes de la maduración.

I.4.4 Aroma fermentativo

Esta etapa esencial en la obtención del vino implica dos procesos de transformación biológica: la fermentación alcohólica y la maloláctica. Mientras que la primera, común a todos los vinos, conlleva la transformación de los azúcares en etanol y productos secundarios gracias al metabolismo de las levaduras, la segunda, fundamental en el caso de los vinos tintos (gracias a que disminuye la agresividad en boca del vino obtenido al disminuir la acidez y otros caracteres organolépticos desagradables desde el punto de vista organoléptico), se basa en la degradación del ácido málico en ácido láctico por las bacterias lácticas.

Desde el punto de vista aromático, la fermentación alcohólica es la responsable de la aparición de todos aquellos compuestos volátiles característicos comunes en los distintos tipos de los vinos. Esta etapa es la que contribuye en mayor medida, a nivel cuantitativo, a los constituyentes del aroma final del vino.

La fermentación maloláctica, en cambio, permite una modificación sutil del vino, un suavizado del mismo, como consecuencia de la reducción de la presencia del ácido málico. Su contribución al aroma no está muy desarrollada, puesto que la disponibilidad de cepas de bacterias lácticas para evaluar su influencia en las características aromáticas, es relativamente reciente.

Entre los principales compuestos volátiles fermentativos que contribuyen al aroma del vino, podemos indicar los siguientes: alcoholes, ácidos y sus ésteres; compuestos carbonílicos; compuestos azufrados; compuestos nitrogenados; lactonas; o fenoles volátiles.

I.4.5 Influencia de prácticas viticulturales y tecnológicas sobre la componente aromática.

I.4.5.1 Influencia de las prácticas de cultivo

El efecto que distintas prácticas de cultivo de la vid tienen en la composición aromática de la uva, ha sido estudiado por varios autores: Zoecklein y col.²³⁴ realizan diversos estudios acerca de la influencia que el deshojado tiene en la concentración de compuestos glicosilados en uvas de las variedades Riesling y Chardonnay, llegando a la conclusión de que la concentración de estos precursores aromáticos es superior en aquellas uvas sometidas al deshojado a lo largo de la maduración de ambas variedades de uva.

También Bureau y col.²³⁵ Estudian la influencia que la exposición solar tiene en la componente aromática de las uvas para evaluar los efectos que el sombreado de la cepa, con redes de polietileno, o de los racimos, mediante las hojas o con bolsas, tiene en los precursores glicosilados de la variedad Syrah. En este caso observan una disminución cuantitativa de estos compuestos en los racimos sombreados, particularmente para los glicósidos fenólicos y de C13-norisoprenoides. De la misma forma, el sombreado de la cepa reduce el contenido de glicósidos de terpenoles, fenoles y C13-norisoprenoides. Asimismo llegan a la conclusión de que el microclima del racimo afecta más

determinantemente, a la composición de la baya, que el ambiente que rodea a la cepa en cuestión.

Ese mismo grupo realiza un estudio similar con la variedad Moscatel de Frontignan,²³⁶ concretamente sombreando las cepas con una red que sólo deja pasar el 50% y el 70%, y los racimos en un 90%. Llegan a la conclusión de que el sombreado natural de la vegetación no conlleva una disminución en los niveles de compuestos libres o conjugados, en comparación con las uvas totalmente expuestas, y que, al igual que en el caso de la variedad anterior, los racimos sombreados artificialmente muestran menores niveles de monoterpenoles y C13-norisoprenoides.

Un estudio similar para evaluar como influye la exposición solar en la composición aromática, concretamente en las variedades de uva Moscatel Chileno, Moscatel de Alejandría y Moscatel Rosada, es llevado a cabo por Belancic y col.²³⁷ Para ello realizan ensayos con racimos completamente expuestos, racimos sombreados artificialmente de forma que permitan el paso, únicamente, del 20% (sombreados) o del 50% (semi-sombreados) de la exposición solar. Se encuentran las mayores concentraciones de terpenoles libres en los racimos semi-sombreados, los sombreados presentan las menores concentraciones de terpenoles. Además llegan a la conclusión de que la temperatura de la baya parece ser crítica para maximizar los niveles de monoterpenos y el aroma a moscatel de la uva.

Sala y col.²³⁸ evalúan la influencia que el tipo de disposición de la vegetación y la exposición solar tiene en el contenido de 3-alquil-2-metoxipirazinas en mostos y vinos de la variedad Cabernet Sauvignon. Se observa una disminución del contenido de estos compuestos a lo largo del periodo de maduración, así como que los racimos protegidos de la luz solar desde el envero presentan un menor contenido de 3-isobutil-2-metoxipirazina que las muestras de control.

También se ha evaluado el efecto que el riego moderado tiene en el potencial aromático de las variedades españolas Tempranillo y Manto Negro,²³⁹ a través del ensayo de la glucosa glucosídica. Se observan diferencias claras en el potencial aromático entre ambos cultivos y tratamientos (secano, riego), al incrementarse en torno al 20-30% en la variedad Manto Negro, y del 40-60% en la Tempranillo, cuando se someten a irrigación.

La influencia que el suelo y las características ambientales (terroir) tienen en la expresión aromática de la variedad Gewürtztraminer fue estudiada por Dirninger y col.,²⁴⁰ concretamente realizaron ensayos en 5 parcelas con el mismo sistema de

conducción y tratamiento del suelo. Los principales factores tenidos en cuenta fueron el clon y el porta-injerto, la densidad de plantación, la forma de conducción, la edad de las cepas, y la orientación.

Asimismo, parece ser que también los fungicidas²⁴¹ empleados durante el cultivo, son capaces de influir en el aroma de las uvas, concretamente por su efecto inhibidor de la biosíntesis de esteroides. Los resultados sugieren que estos fungicidas (flusilazol y triforina) no tienen influencia en la hidroxilación de monoterpenos libres o en su oxidación posterior, pero sí pueden influir en la biosíntesis de monoterpenos en una etapa temprana, por ejemplo, durante la isomerización del geranil pirofosfato para formar derivados del linalol. Además parecen influir también en las rutas de glicosilación de los monoterpenos conjugados.

I.4.5.2 Influencia de las prácticas tecnológicas

Las distintas prácticas desarrolladas de forma previa, durante o posterior a la fermentación, influirán en la composición aromática final del vino obtenido. De ahí que se hayan realizado numerosos estudios para evaluar cual es esa influencia.

De esta forma se estudian los cambios que las siguientes prácticas tienen en la distribución de compuestos aromáticos libres y conjugados: la maceración carbónica²⁴² o la maceración prefermentativa²⁴³ como medios para aumentar el aroma varietal de vinos de la variedad Moscatel de Frontignan; la adición de levaduras nativas o seleccionadas en la glucosa glucosídica, terpenos libres y otras agliconas de vinos de la variedad Riesling;²⁴⁴ o del efecto de la fermentación, envejecimiento y envejecimiento sobre lías en los glucósidos totales y no fenólicos.²⁴⁵

Castro Vazquez y col.²⁴⁶ estudian la influencia que el tratamiento enzimático con glicosidasas o la maceración prefermentativa tiene en vinos de las variedades Chardonnay, Moscatel de Frontignan, Airén y Macabeo. Se observa que ambos tratamientos incrementan la presencia de los compuestos responsables del aroma varietal.

También Selli y col.²⁴⁷ evalúan el efecto que tiene el contacto con los hollejos (durante 12 horas a 15°C), en los compuestos aromáticos libres y conjugados de los vinos elaborados con la variedad de uva turca Narince.

Wilker y col.²⁴⁸ realizan distintos ensayos para determinar el efecto que tres tipos de tratamientos (adición de mosto, mezcla de vinos, parada de fermentación) para el endulzado de vinos blancos tiene en el aroma de los mismos. También Hernández-Orte y col.²⁴⁹ estudian la influencia que la adición, en este caso de amonio y aminoácidos, tiene en la composición aromática de mostos, concretamente de la variedad de uva Airén.

Asimismo, Ortega-Heras y col.²⁶² estudian la evolución de los compuestos volátiles en vinos varietales durante su envejecimiento en madera, llegando a la conclusión de que la capacidad de extracción de compuestos volátiles del vino a partir de la madera depende de la variedad de uva empleada.

En resumen, se puede concluir indicando, como ya se ha mencionado a lo largo de esta introducción, que la componente aromática de los vinos va a estar determinada tanto por las distintas prácticas y tratamientos aplicados durante el desarrollo de la baya, como por las distintas prácticas empleadas durante la elaboración y conservación del vino obtenido.

I.5 Determinación de compuestos relacionados con el aroma

Son varios factores los que complican el análisis del aroma en alimentos. Es fundamental la identificación de los componentes del alimento que contribuyen al aroma, éstos están habitualmente presentes en cantidades traza o ultra-traza implicando una gran variedad de clases de compuestos químicos (que puede llegar a incrementarse por una manipulación excesiva de la muestra). Las propiedades físicas de estos compuestos son igualmente diversas, variando desde que son gases permanentes a sustancias con punto de ebullición que excede varias centenas de grado. Esto facilita las separaciones pero complica la recuperación simultánea del conjunto de compuestos aromáticos.²⁵⁰

Las propiedades inherentes al tipo de muestras a analizar, en el caso de alimentos, tienen como consecuencia que:²⁵¹

- las concentraciones de los analitos relevantes en el aroma sean extremadamente bajas, implicando bajas concentraciones del umbral de mínimo olor (definido como la mínima concentración necesaria de una sustancia odorífera que tiene el 50% de probabilidad de ser percibido por un individuo), así, para la 2-etil-3,5-dimetilpirazina este umbral es de 0.007 nL/L.²⁵²

- la mayoría de los aromas sean mezclas, extremadamente complejas, de diversas sustancias. Kotseridis y Baumes²⁵³ identifican 48 sustancias volátiles diferentes como odorantes con impacto en vinos de Burdeos.

- para aquellos aromas que son generados biológicamente (plantas, animales), surjan dificultades adicionales debido a la naturaleza dinámica de estos sistemas. Así, la producción de volátiles en plantas puede estar afectada por diversos factores tales como la luz solar, temperatura ambiental, las condiciones de estrés, o la presencia de contaminantes, a niveles traza, en el ambiente.

- algunos odorantes (aquellos compuestos con concentraciones por encima del umbral de percepción) presentan una estabilidad química limitada, como resultado de reacciones de fotólisis, oxidación, etc... Kesselmeier y Staudt²⁵⁴ estiman que el tiempo de vida química atmosférica de los monoterpenos bajo condiciones de luz diurna, varía desde menos de 5 minutos para el alfa-terpineno, a 3 horas para el alfa- y beta-pineno.

En general las técnicas analíticas que se emplean para el estudio de los compuestos aromáticos en vinos son las mismas que se utilizan para el estudio del aroma en otro tipo de matrices agroalimentarias. Sin embargo, es necesario destacar, que en el caso particular del vino, hay que tener en cuenta varios aspectos al realizar los análisis: así, la presencia del etanol puede enmascarar algunos de los compuestos, llegando a dominar los extractos de los compuestos relacionados con el aroma y los cromatogramas. Además, la presencia de otros componentes no volátiles, azúcares, ácidos y compuestos fenólicos, puede complicar los análisis al contaminar las columnas cromatográficas.²⁵⁵

Si tenemos en cuenta todo lo citado anteriormente, es lógico suponer que la selección de las técnicas de aislamiento de los analitos (preparación de muestras) sea una etapa crítica para el análisis de los compuestos relacionados con el aroma, de hecho, dependiendo del tipo de muestra y los objetivos planteados, a veces será necesario recurrir al empleo de más de una de estas técnicas. La técnica seleccionada puede influir en el perfil aromático obtenido, por tanto, el analista debe tener presente en cada ocasión cuales son las ventajas y desventajas de los distintos métodos de aislamiento de estos analitos.

En definitiva, la selección de las técnicas de muestreo, de preparación de muestra, de separación de los analitos, de detección y cuantificación, será determinante y crucial²⁵⁶ para la adecuada caracterización química de los compuestos relacionados con el aroma.

El método analítico a desarrollar para el análisis de estos compuestos, en consecuencia, debe ser capaz de:

- ✓ aislar los componentes volátiles del resto de los presentes en la matriz.
- ✓ permitir una concentración previa de los mismos (dadas las bajas concentraciones en las que se suelen encontrar en las distintas muestras).
- ✓ resolver una mezcla compleja, determinando compuestos presentes en distintos intervalos de concentración.

I.5.1 Técnicas de preparación de muestras

Históricamente, se han empleado cierto número de técnicas entre las que se incluyen la extracción con disolventes, destilación y destilación/extracción simultánea. Las distintas técnicas de muestreo ofrecen una serie de ventajas individuales pero también presentan limitaciones específicas. Problemas comunes a todas ellas son la destrucción potencial de los componentes aromáticos y/o la producción de interferentes.

La similitud entre el aroma inicial y el conseguido en el extracto por las técnicas de aislamiento, es el factor considerado a la hora de juzgar las distintas técnicas analíticas. Las condiciones empleadas deben ser lo más suaves posibles para evitar oxidaciones, degradaciones térmicas, y otros cambios químicos o bioquímicos en la muestra, siendo esto particularmente importante en el caso de compuestos altamente reactivos.

En resumen, el objetivo de esta etapa se reduce a conseguir la transferencia cuantitativa de los analitos de interés a una fase analizable por cromatografía de gases, en la que estos compuestos volátiles se encuentren en concentraciones adecuadas. Para ello, hemos de considerar que, las propiedades determinantes a la hora de seleccionar la técnica más adecuada, son: la volatilidad y su capacidad de ser retenidos selectivamente en distintos materiales.

Entre las técnicas más empleadas para el análisis de los compuestos volátiles en alimentos y bebidas, destacan: las técnicas basadas en distintos tipos de destilación, la extracción líquido-líquido (ELL), la extracción en fase sólida (EFS), o las basadas en el estudio del espacio de cabeza.

I.5.1.1 Técnicas basadas en la destilación

La destilación está basada en la separación de los compuestos en base a las diferencias en sus presiones de vapor. Esta técnica permite separar los compuestos volátiles de los no volátiles. Sin embargo, apenas permite fraccionar ni concentrar los mismos, por lo que debe utilizarse en combinación con algún sistema de transferencia de los analitos a una matriz orgánica que permita concentrarlos. Su capacidad para obtener muestras limpias de solutos no volátiles es su principal ventaja, puesto que no ocasiona problemas en los sistemas cromatográficos.

I.5.1.1.1 Destilación con vapor

Las técnicas de destilación más habitualmente empleadas, se llevan a cabo de dos formas:

- mezclando o suspendiendo la matriz a extraer con agua en un recipiente provisto de un condensador y, mientras hierve la mezcla, recolectando la fase condensada (hidrodestilación). Después del proceso, la fracción orgánica, insoluble en agua, puede ser separada del agua.
- pasando vapor a través de un recipiente que contiene la mezcla matriz-agua (destilación de arrastre de vapor) para obtener un condensado similar.

La hidrodestilación y la destilación asistida por vapor son procedimientos tradicionales para el aislamiento de compuestos volátiles relacionados con el aroma a partir de muestras odoríferas. Al ser procedimientos directos y simples, siguen siendo utilizados ampliamente para la caracterización de aromas, solos o en combinación con otros procedimientos de preparación de muestras.

La destilación con arrastre de vapor tiene la ventaja de que con el aporte del vapor se consigue reducir la presión en la cabeza de la muestra a destilar, consiguiéndose arrastrar compuestos de altos puntos de ebullición que no se conseguirían mediante una destilación simple. Además permite prolongar la destilación todo el tiempo que sea necesario, al permanecer aproximadamente constante el volumen de sustancia a destilar, y son más rápidas. Entre sus inconvenientes hay que citar que no consigue buenas recuperaciones de los solutos más volátiles, que si no se utiliza vacío se produce la formación de artefactos por descomposición térmica, y que además los volátiles en el destilado están significativamente más diluidos que en la destilación simple.

Dimitriadis y Williams²⁵⁷ desarrollan una técnica rápida para la determinación de terpenos volátiles libres (TVL) y potencialmente volátiles (TPV) mediante la destilación con arrastre de vapor. En el dispositivo propuesto, los TVL del mosto, a pH próximo a la neutralidad, son arrastrados por vapor de agua, a continuación se acidifica el mosto (pH 2-2.2) con ácido fosfórico y se recoge la fracción que contiene los TPV.

Este mismo dispositivo es empleado por Girard²⁵⁸ para analizar los compuestos terpénicos volátiles (libres y potenciales) en uvas de la variedad Gewürtztraminer.

I.5.1.1.2 Destilación-Extracción simultánea (DES)

También conocida como método de Lickens-Nickerson. Con este método se pretende superar los inconvenientes que presenta la destilación con arrastre de vapor.

El aparato de Lickens-Nickerson opera a presión reducida para reducir el punto de ebullición de la muestra y minimizar la formación de los artefactos térmicamente inducidos. Este aparato consta de dos matraces, en uno se coloca la muestra con agua destilada, y en el otro se recoge el disolvente extractante que es más denso que el agua (diclorometano, cloroformo, etc...). Ambos matraces se calientan, el agua y los vapores del disolvente se conducen al cuerpo del extractor donde se condensan sobre la superficie de una tubería fría. En esta operación los analitos relacionados con el aroma se eliminan de la matriz por el vapor de agua y se transfieren a la fase orgánica cuando los líquidos condensan. Tanto el agua como el disolvente se recolectan en el cuerpo del extractor después de su condensación y vuelven a los matraces correspondientes, permitiendo un reflujo continuo.

Existen una serie de dificultades prácticas asociadas con su uso, y al hecho de que el empleo de bajas presiones en la zona del extractante dificulta la retención del mismo en el aparato. Se han ensayado algunas modificaciones del mismo, como la inclusión de un condensador de hielo seco/acetona seguido de una trampa de nitrógeno líquido, sin embargo, no se ha conseguido eliminar esos inconvenientes.

Blanch y col.²⁵⁹ emplean esta técnica para la extracción de los compuestos relacionados con el aroma en vinos, para ello ensayan tres modos diferentes de operación: DES a presión atmosférica, DES a presión reducida y DES implicando la concentración del espacio de cabeza dinámico resultante de la purga de la muestra con un gas inerte.

La DES es también empleada por Winterhalter y col.²⁶⁰ para analizar los compuestos volátiles C13-norisoprenoides (TDN, vitispirano, damascenona) en vinos Riesling.

Varios autores^{261,262} han detectado, con esta técnica, problemas de bajas recuperaciones de compuestos con alta volatilidad, pérdidas de analitos con formación de artefactos y oxidación de componentes.

I.5.1.1.3 Otros métodos de destilación

Tanto la destilación a presión atmosférica como la destilación-extracción simultánea, pueden presentar problemas a la hora de caracterizar compuestos relacionados con el aroma, puesto que las temperaturas usualmente necesarias para la operación pueden provocar la degradación de algunos analitos.

La destilación a vacío, que puede desarrollarse en condiciones más suaves, puede superar los problemas anteriormente citados y es una alternativa a los métodos comunes de destilación. Bouchilloux y col.²⁶³ realizan una destilación, entre 35 y 45°C y con presiones entre 0.5 y 1.5 Pa, y derivatización simultánea con ácido p-hidroximercuribenzoico, para determinar, a niveles traza, tioles volátiles en vinos tintos de Burdeos.

Sin embargo hemos de considerar que, a pesar de que si la destilación se realiza a presiones reducidas se reduce el riesgo de formación de artefactos, también se reduce la eficacia del proceso. Además en el caso de muestras de alimentos, puede que las temperaturas empleadas en esta destilación permitan el funcionamiento de distintos sistemas enzimáticos que influirán en la composición de la muestra.

I.5.1.2 Extracción líquido-líquido (ELL)

El principio fundamental en el que se basa esta técnica es en la solubilidad de los analitos entre dos fases distintas. Dadas las características de los compuestos volátiles, el reparto se suele dar entre una fase principalmente acuosa, la matriz de partida, y otra fase orgánica de una polaridad determinada. Las mezclas azeotrópicas con disolventes orgánicos permiten modificar el rango de polaridad de los compuestos extraídos y mejorar la eficiencia.

La extracción simple con un disolvente, seguida de la concentración bajo nitrógeno o en un evaporador rotatorio, ha sido uno de los métodos más antiguamente utilizados en el análisis de compuestos relacionados con el aroma en alimentos. Dada la complejidad de los aromas presentes en estas matrices, es necesario seleccionar un disolvente que nos permita representar fielmente la composición de la matriz original.

Esta extracción puede realizarse en modo discontinuo o continuo. En forma continua se consigue mejorar la sensibilidad, debido a que la recirculación continua de nuevo disolvente orgánico con baja concentración del analito favorece la extracción. La extracción continua requiere, en ocasiones, el calentamiento del disolvente extractante hasta su punto de ebullición, teniendo que tomar precauciones para minimizar la degradación térmica de los analitos extraídos durante este proceso.

Si el disolvente empleado en la extracción continua tiene poca afinidad por algunos de los compuestos de interés, será necesario alargar el tiempo de extracción, llegando a un momento en que la concentración de volátiles existente en el extractante que recircula es similar a la de la matriz, lo que se conoce como efecto de dilución del extracto.

Además hemos de considerar que es inevitable, que junto con los volátiles de interés pasen al extracto otros compuestos, que aunque no aparezcan en concentraciones importantes, pueden dificultar posteriormente el análisis. Por tanto, en estos casos será necesario incluir una etapa de limpieza previa al análisis por CG.

A la hora de seleccionar el disolvente a emplear para realizar la extracción hemos de tener en cuenta que debe ser capaz de concentrarse fácilmente en la etapa posterior a la extracción, por tanto, es preferible que su punto de ebullición sea lo más bajo posible para evitar la degradación de compuestos termolábiles y para evitar pérdidas durante su evaporación.

En las bebidas alcohólicas el etanol y otros productos mayoritarios de la fermentación pueden complicar el aislamiento de los compuestos volátiles. Sin embargo, la presencia del etanol tiene un efecto importante en la capacidad de extracción de distintos sistemas de disolventes, ya que, las solubilidades de los disolventes son mayores que las encontradas en el caso de matrices acuosas, y los coeficientes de extracción son significativamente menores que los encontrados en muestras acuosas como consecuencia de la mayor solubilidad de la mayoría de los compuestos volátiles en sistemas hidroalcohólicos.

En este tipo de muestras, los sistemas que han mostrado mayores eficiencias en la extracción de compuestos aromáticos son las extracciones continuas con trifluorometano, diclorometano, o diversas mezclas azeotrópicas con más de un disolvente, lo que permite modificar el intervalo de polaridades de los compuestos extraídos y mejorar la eficiencia.

La elección del disolvente orgánico para la extracción de muestras vínicas es crítica, siendo los más usados aquellos que presentan una baja afinidad por el etanol. El triclorofluorometano (Freon 11) se ha utilizado ampliamente debido a su baja afinidad por alcoholes de menos de 4 carbonos.²⁶⁴ Su bajo punto de ebullición (23.7°C) minimiza la formación de artefactos durante las extracciones continuas, asimismo permite la evaporación sencilla del mismo con mínimas pérdidas.

Zhou y col.²⁶⁵ utilizan Freon-11 para determinar los componentes aromáticos de vinos de Moscatel, también Ebeler y col.²⁶⁶ emplean el mismo extractante para el análisis del aroma de muestras de brandy, donde comparan la ELL con la MEFS, observando que con la ELL se extraen más eficientemente los alcoholes superiores, siendo mejor la selectividad para ésteres y ácidos en la MEFS. Asimismo, Miklósy y Kerényi²⁶⁷ comparan de esta misma forma los componentes volátiles del aroma de bayas con pudrición noble para la producción de vinos de Tokaj, procedentes de dos zonas de Hungría.

La reciente preocupación sobre la contaminación medioambiental ha limitado el uso de los CFC, y, por tanto, del Freon 11 en investigación. En consecuencia se está extendiendo el uso de otros disolventes, como la mezcla pentano-éter dietílico, o diclorometano.

López y Gómez²⁶⁸ extraen compuestos terpénicos (linalol, alfa-terpineol, citronelol, nerol y geraniol) en “vino artificial” (12% v/v etanol en agua) con distintos disolventes: éter dietílico, n-pentano, Freon-11, n-hexano, 1:1 éter dietílico-pentano, 1:1 éter dietílico-hexano y diclorometano. Los mejores resultados los obtienen con diclorometano y 1:1 éter dietílico-pentano.

Kotseridis y col.²⁶⁹ analizan beta-damascenona en vinos tintos mediante la ELL con éter dietílico-hexano (1:1), al igual que pirazinas, cetonas norisoprenoides, terpenoles y alcoholes de 6 átomos de carbono en vinos de distintos clones de Merlot.²⁷⁰

Rocha y col.²⁷¹ realizan la extracción continua de mostos de las variedades de uva blanca Maria Gomes y Bical, con diclorometano a 50°C durante 25 horas, para analizar los compuestos volátiles y potencialmente volátiles. También utilizan este disolvente: el mismo equipo para identificar los compuestos de impacto en el aroma de vinos tintos de Baga; ²⁷² Camara y col.²⁷³ para determinar sotolon (3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona) en vinos fortificados de Madeira; Ortega-Heras y col.²⁷⁴ al comparar la ELL con técnicas de espacio de cabeza estática y dinámica en el análisis de la composición

aromática de vinos; Schneider y col.²⁷⁵ para estudiar los compuestos volátiles implicados en el aroma de vinos fortificados (vinos dulces naturales) de Garnacha tinta; o Selli²⁷⁶ para el análisis de vinos tintos de la variedad de uva Kalecik Karasi cultivada en Anatolia.

También emplean la ELL con diclorometano: Mallouchos y col.²⁷⁷ al evaluar el efecto biocatalítico del uso de *Saccharomyces cerevisiae* immobilizadas en hollejos de uva en los compuestos volátiles del vino obtenido; Kotseridis y Baumes³⁸ al identificar los compuestos impactantes en el aroma de mostos y vinos tintos de Burdeos; Díaz-Plaza y col.²⁷⁸ cuando comparan los aromas de vinos, con distinto contenido tánico, envejecidos en barricas de roble francés; o Morales y col.²⁷⁹ al estudiar la influencia que la adición de virutas de roble, para acelerar el envejecimiento, tiene en la composición aromática de vinagres de vino.

Castro y col.²⁸⁰, en cambio, realizan una extracción rotatoria y continua con una mezcla de éter dietílico-pentano (2:1), para determinar compuestos volátiles (alcoholes, ácidos, esteres, lactonas, amidas y fenoles) en vinos finos de Jerez. Esta misma mezcla es empleada por Pérez-Prieto y col.²⁸¹ para evaluar el efecto que el origen, volumen y edad de la barrica empleada en vinificación tiene en la composición volátil del vino obtenido; y por Pedersen y col.²⁸² para analizar geraniol, nerol, linalol y alfa-terpineol en vinos.

En el caso del análisis de compuestos azufrados en el aroma del vino,²⁸³ la mezcla pentano-diclorometano (2:1) es la preferida para llevar a cabo la extracción,^{284,285} así como el acetato de etilo.²⁸⁶ Cabaroglu y Canbas²⁸⁷ emplean este mismo sistema de disolventes, para estudiar el efecto que el contacto con los hollejos tiene en la composición aromática de vinos de Moscatel de Alejandría; al igual que Morales y Duque,²⁸⁸ para determinar los volátiles libres y glicosilados presentes en manzanas *Mammea americana*; y que Versini y col.²⁸⁹ para el estudio de los componentes del aroma de vinos de las variedades gallegas Albariño, Loureira y Godello.

I.5.1.3 Extracción en fase sólida (EFS)

En una aplicación típica los componentes del aroma recuperados por extracción con disolventes o destilación se hacen pasar por el cartucho relleno con el adsorbente adecuado. En sus inicios, surgieron varios problemas asociados con la adsorción de volátiles en las paredes del cartucho dando pobres recuperaciones, pero estas limitaciones se han superado y existe gran diversidad de fases sólidas disponibles a la hora de seleccionar el adsorbente más adecuado para la retención de compuestos aromáticos mientras se eluyen los materiales interferentes, o viceversa.

Ferreira y col.²⁹⁰ realizan una comparación entre 7 fases sólidas, (Amberlita-XAD-2, 4, 7 y 16, Porapak Q, C8 y C18), y 7 sistemas disolventes (diclorometano, diclorometano-pentano (1:1), freon 113, éter dietílico-pentano (1:1 y 1:9) y acetato de etilo-pentano (1:3 y 1:20) con o sin efecto adicional de la saturación con sal) para estudiar su habilidad a la hora de extraer compuestos aromáticos en bebidas alcohólicas, llegando a la conclusión de que en todos los casos las ELL pueden ser reemplazadas satisfactoriamente por sistemas de EFS.

En el caso de muestras de vinos y derivados se ha aplicado la EFS a la determinación de precursores aromáticos, tales como los precursores de damascenona en uvas blancas (Chardonnay, Semillon y Sauvignon Blanc)²⁹¹ o glicósidos de mono-, di- y tri-terpenoles, y de alcoholes norisoprenoideos,²⁹² mediante la adsorción en C18; o de glucósidos de C13-norisoprenoideos²⁹³ empleando una resina de XAD-2 para el aislamiento de los mismos y derivatizándolos (en forma de trifluoroacetilos) para su posterior determinación por CG-MS. También utilizan esta última resina: Dieguez y col.²⁹⁴ para evaluar la contribución de los aromas primarios de la uva empleada a la tipicidad de los destilados de Orujo; o Zhou y col.¹⁰¹ al comparar la ELL, con Freon-11, con la elución, mediante este mismo disolvente, de los compuestos volátiles retenidos en este tipo de resina.

Este mismo tipo de adsorbente es utilizado por Kotseridis y Baumes³⁸ al identificar los compuestos odorantes de impacto en vinos y preparados comerciales de levaduras; por Fondvillebagnol y col.²⁹⁵ al determinar compuestos volátiles en mostos en fermentación; o por Edwards y Beelman²⁹⁶ para el análisis de alcoholes superiores, ésteres y ácidos en vinos. Wada y Shibamoto,²⁹⁷ en cambio, determinan el mismo tipo de compuestos volátiles en vino tinto Chablis, usando columnas de Porapak Q (copolímero de etilvinilbenceno-divinilbenceno) y diclorometano para la desorción.

Ortega y col.,²⁹⁸ asimismo, estudian los coeficientes de distribución sólido-líquido en resinas de Porapak Q, para determinar sus propiedades de retención con vistas a su aplicación al análisis de alquil-metoxipirazinas y beta-damascenona en vinos. Los resultados indican que es necesario un lecho de unos 5 cm para conseguir la recuperación cuantitativa de los analitos a partir de 500 ml de vino (diluido a 1000 ml con agua previamente). El límite de detección conseguido en la etapa de aislamiento se sitúa por debajo de los 10 ng/l.

Moret²⁹⁹ desarrolla un método para la determinación cuantitativa de los componentes aromáticos en vino mediante su adsorción en una columna con tierra de diatomeas (de elevada área superficial) y la posterior elución con la mezcla pentano-cloruro de metileno (2:1). Karásek y col.³⁰⁰ emplean Amberlita XAD-7 para la identificación de vinos monovarietales.

En la determinación de clorofenoles en macerados de corchos y muestras de vinos, Insa y col.⁸⁷ comparan la MEFS con la EFS para la preconcentración de estos compuestos previa al análisis por CG de sus derivados acetilados. De las dos fases sólidas ensayadas, C18 y Oasis HLB, se obtienen los mejores resultados con la segunda de ellas. Dieguez,³⁰¹ en cambio, selecciona el C18 para estudiar la evolución de ácidos orgánicos volátiles en aguardientes durante su almacenamiento a distintas temperaturas.

En los últimos años, la fase sólida con base poliestireno-divinilbenceno ha comenzado a emplearse frecuentemente en este tipo de análisis, así López y col.³⁰² determinan compuestos volátiles minoritarios y traza en vinos mediante la EFS con cartuchos de LiChrolut EN, realizando la elución con diclorometano.

Domínguez y col.³⁰³ la emplean para analizar fenoles volátiles (etil- y vinilfenoles) en vinos finos de Jerez, para ello desarrollan un método fácil, rápido y repetible, que consta de una sola etapa, y que permite extraer simultáneamente 12 muestras, para ello emplean un dispositivo de extracción a vacío provisto de 12 posiciones para insertar los correspondientes cartuchos con la fase sólida. La elución de los compuestos se realiza con diclorometano.

Para la determinación cuantitativa de sotolon, maltol y furaneol en vinos, Ferreira y col.³⁰⁴ realizan una EFS, en cartuchos rellenos con 800 mg de este tipo de adsorbente, de 50 ml de vino. Los interferentes se eliminan mediante el paso 15 ml de pentano-diclorometano (20:1), y se recuperan los analitos con 6 ml de diclorometano, concentrándose posteriormente de forma previa a su análisis por CG-MS.

En el caso de muestras de vinagre de vino, Morales y col.³⁰⁰ evalúan los compuestos cedidos por la madera durante su envejecimiento acelerado con la presencia de virutas de roble, para ello ensayan dos tipos de presentaciones comerciales de poliestireno-divinilbenceno (LiChrolut EN y BondElut ENV), llegando a la conclusión de que se consigue extraer un intervalo más amplio de compuestos volátiles con la primera de ellas. Asimismo, Tesfaye y col.³⁰⁵ realizan la EFS, con este mismo adsorbente, de los compuestos volátiles procedentes de la madera utilizada en el envejecimiento acelerado de vinagres, para estudiar cual es la evolución de la composición aromática de los mismos.

Culleré y col.³⁰⁶ la emplean en el desarrollo de un método para fraccionar los extractos de compuestos aromáticos en vinos. En concreto, recuperan los volátiles, previamente retenidos en un cartucho de LiChrolut EN, con 5 ml de diclorometano y a continuación se fracciona este extracto (tras concentrarlo hasta 0.1 ml) mediante el empleo de un lecho preparado al rellenar un recipiente de polipropileno con 0.55 g de LiChrolut EN hasta una altura de 5 cm. El extracto concentrado se adiciona gota a gota dejando que se evapore cada una de ellas antes de añadir la siguiente. En primer lugar, se obtiene una primera fracción por elución con 4 ml de pentano, la segunda fracción se consigue al fluir con una mezcla de pentano-diclorometano (9:1), y, por último, la tercera fracción se recupera con 4 ml de diclorometano. La primera fracción contiene ésteres etílicos y otros compuestos no polares, la segunda los alcoholes y algunos fenoles volátiles, y la tercera los ácidos grasos, derivados de la vainillina y algunas lactonas.

Otra alternativa que surge del empleo de la EFS es la determinación de compuestos volátiles derivatizados directamente en el cartucho en el que se realiza la extracción, concretamente en el caso de LiChrolut EN. Así Culleré y col.³⁰⁷ analizan aldehídos (de entre 5 y 8 carbonos) en vinos a través de la formación de sus *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)oximas en el propio cartucho, de esta forma consiguen mejorar la selectividad y sensibilidad del método.

De la misma forma, Ferreira y col.³⁰⁸ analizan octanal, nonanal, decanal, (*E*)-2-nonenal y (*E*, *Z*)-2,6-nonadienal en vinos tras la formación de sus *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)oximas en el cartucho de EFS.

Mención aparte supone la aplicación de la EFS como etapa previa para la determinación de los compuestos aromáticos (libres y ligados) presentes en uvas y vinos. El aislamiento de glicósidos a partir de vinos y mostos por su retención selectiva

en un adsorbente es una técnica comúnmente empleada.³⁰⁹ Mediante el lavado de la fase sólida con agua tras la etapa de adsorción, los azúcares libres y otros constituyentes polares pueden eliminarse, mientras los glicósidos, menos polares, permanecen retenidos.

Los métodos tradicionales de medida de los productos resultantes de la hidrólisis de los glicósidos, suponen un elevado consumo de tiempo, requiriendo etapas de aislamiento, hidrólisis y análisis por CG,³¹⁰ o restringen su aplicación a variedades aromáticas con un elevado contenido en compuestos terpénicos.³¹¹

Williams y col.³¹² desarrollan un método simple para la determinación de la composición glicosídica total en una muestra mediante la cuantificación de la glucosa glicosídica (GG). Este método se basa en la relación molar uno-uno entre la glucosa y los glicósidos encontrados en uvas. El método implica el aislamiento de los glicósidos por EFS con C18, seguido de una hidrólisis y determinación enzimática de la glucosa liberada.

Puesto que la fracción glicosilada en uvas tintas está dominada por las antocianinas glicosiladas, Iland y col.³¹³ mejoraron el método anterior al realizar una medida espectrofotométrica de las antocianinas, y restársela al valor GG obtenido para obtener un valor de GG sin la interferencia de los compuestos responsables del color de las uvas tintas.

Zoecklein y col.³¹⁴ también modifican el método GG total (GGT) desarrollado por Williams,⁶⁰ realizando la extracción de los glicósidos a pH=13, de forma que los glicósidos fenólicos no se retienen en la fase sólida. Este método de medida de GG libre de fenoles (GGLF) intenta dar una estimación más exacta del conjunto de compuestos precursores del aroma.

Günata y col.³¹⁵ proponen un método para la extracción y determinación de fracción de componentes aromáticos (alcohol bencílico, 2-feniletanol y terpenoles) libres y glicosilados en mostos y vinos. Para ello la muestra de entre 50 y 100ml de mosto o vino se pasa a través de una columna de Amberlita XAD-2. Posteriormente se lava el cartucho con 50ml de agua para eliminar azúcares, ácidos y otros componentes solubles en agua. La separación de la fracción libre se realiza mediante la elución de 50ml de pentano, y la fracción glicosilada se obtiene al eluir con 50ml de acetato de etilo.

Este mismo tipo de resina y de procedimiento ha sido ampliamente utilizado por diversos autores, modificando en algunos casos los disolventes empleados para la elución, para el análisis de: glicósidos monoterpénicos en uvas;³¹⁶ compuestos terpénicos, norisoprenoides y sus precursores en distintas variedades de uva (Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Riesling, Sauvignon Blanc, Sémillon, Syrah);³¹⁷ la localización de compuestos aromáticos libres y ligados entre el hollejo, el jugo y la pulpa en uvas Monastrell, Cabernet Sauvignon y Tempranillo;³¹⁸ componentes aromáticos (libres y ligados) en vinos de variedades de uva españolas: Albariño,^{142,319,320} Loureira,^{142,181} Godello,¹⁴² (Treixadura, Listan, Viura, Xarel.lo, Parellada, Garnacha, Tempranillo),¹⁸⁰ y Monastrell;³²¹ el potencial aromático de tres variedades de Moscatel (de Alejandría, de Hamburgo, y de Frontignan);³²² glicósidos en vino Moscatel;¹⁵⁵ compuestos aromáticos libres y glicosilados en uvas de variedades no florales (Chenin, Colombard, Riesling, Sémillon);³²³ compuestos volátiles liberados tras la hidrólisis de los glicoconjugados de hojas y uvas de las variedades Moscatel de Alejandría y Syrah;³²⁴ compuestos aromáticos de la variedad Emir (cultivada en Anatolia);³²⁵ de las intensidades aromáticas de los compuestos volátiles liberados en los hidrolizados de los precursores extraídos de uvas Tempranillo y Garnacha.³²⁶

Asimismo Oliveira y col.³²⁷ realizan la separación de las fracciones de compuestos aromáticos libres y de precursores glicosilados mediante la EFS con Amberlita XAD-2, con vistas a la caracterización y diferenciación de 5 variedades de uva empleadas en la elaboración de los “Vinhos Verdes” en base a sus compuestos monoterpénicos.

Williams y col.³²⁸ emplean el C18 como adsorbente para el aislamiento de glicósidos monoterpénicos y precursores norisoprenoides de mostos y vinos. En concreto, después de cargar la muestra de mosto o vino y de lavarla con agua, se realiza la elución con metanol. A esa fracción se le elimina el disolvente y se seca, obteniendo un residuo que se disuelve en agua y se extrae con Freon, y en el que no existen compuestos aromáticos libres, es por tanto, la fracción donde se encuentran los precursores de interés.

Este mismo grupo, estudia la presencia de glicósidos monoterpénicos (disacáridos)³²⁹ en uvas y vinos. También proponen la selección de C18 para el fraccionamiento de precursores glicosilados del aroma en uvas y vinos, Mateo y col.,¹⁵⁹ y Batisttuta y col.³³⁰ Así pues la EFS con C18, para la separación de los compuestos libres y ligados relacionados con el aroma, ha sido aplicada por numerosos autores, tanto en uvas como en vinos.

En el caso de las uvas, se ha analizado el potencial aromático de distintas variedades, entre ellas Sémillon,³³¹ Sauvignon Blanc,^{191,332,333} Chardonnay,^{191,334,194} Merlot y Cabernet Sauvignon,³³⁵ Albariño,³³⁶ Cortese,¹⁹⁴ o Pinot Noir.³³⁷

Battistutta¹⁹¹ eluye la fracción libre del vino retenido en el cartucho de C18 con una mezcla de cloroformo-hexano (1:2), empleando metanol para la elución de los glicósidos monoterpénicos. Kotseridis y col.,¹¹⁸ en cambio, determinan los precursores de la beta-damascenona en vinos tintos, tras la separación de la fracción libre con una ELL previa con éter dietílico-hexano (1:1), mediante la elución del cartucho de C18 con etanol.

Recientemente, Schneider y col.³³⁸ han desarrollado un método para el análisis de los glicoconjugados del aroma presentes en uvas mediante el uso de espectrometría FTIR y el empleo de técnicas quimiométricas. Para ello, en primer lugar, aislan estos compuestos del mosto usando cartuchos de C18, y los eluyen con metanol. Además previamente a la EFS utilizan PVPP para eliminar la mayoría de los polifenoles, puesto que interferirán en el análisis por FTIR.

I.5.1.4 Técnicas basadas en el estudio del espacio de cabeza

Estos métodos se basan en las condiciones termodinámicas de las fases en contacto, y en la existencia de una relación entre las concentraciones de cada uno de los componentes existentes en las distintas fases implicadas en un sistema heterogéneo que está en equilibrio.

Se trata de procedimientos basados en la manipulación del espacio de cabeza en contacto con los materiales odorantes. Se ha estudiado ampliamente las ventajas del muestreo del espacio de cabeza para la recuperación de compuestos volátiles asociados con el aroma.

Este tipo de procedimientos pueden clasificarse en dos grupos: las técnicas de espacio de cabeza estáticas y las dinámicas.

☞ **Estáticas:** implican la recuperación en aquellas muestras en equilibrio dentro de un recipiente sellado a una temperatura controlada, retirándose la muestra del espacio de cabeza a través del septum. De forma que el gas en equilibrio con la muestra de interés

es directamente analizado por CG o cualquier otra técnica adecuada, sin otra etapa de tratamiento de muestra.

Sin embargo, puesto que la preconcentración de los analitos a la que conduce es mínima o inexistente, si consideramos los niveles traza o ultra-traza a los que aparecen los compuestos de interés, no suele emplearse para el análisis de aromas; de forma que la utilización de esta técnica de muestreo está limitada fundamentalmente por los bajos límites de detección, si bien en los últimos años se han desarrollado sistemas que permiten incrementar esos límites.

☞ Dinámicas: implica el paso de un gas inerte a través de la muestra y la recolección de los constituyentes volátiles arrastrados en una trampa o sistema de retención. De esta forma el equilibrio entre la muestra y el espacio de cabeza es renovado continuamente, mejorando por tanto la sensibilidad.

Las distintas técnicas de este tipo difieren en el tipo de trampa empleada y en la forma de carga y descarga de la trampa, con métodos entre los que se incluyen: la trampa criogénica, la adsorción en un lecho de adsorbente, las trampas de vapor en columna o el uso de trampas criogénicas de columna completa.

La desorción de los analitos atrapados para el posterior análisis puede llevarse a cabo con pequeños volúmenes de los disolventes adecuados,³³⁹ o usando dispositivos para la desorción térmica (por calentamiento).³⁴⁰ Estos últimos presentan la ventaja de que pueden automatizarse, y el inconveniente de que pueden degradarse algunos compuestos termolábiles.

Entre las trampas empleadas, las trampas de frío tienen la desventaja de que se recoge agua junto con el material volátil, puesto que son condensadores por donde circula nitrógeno líquido, generalmente, provocando la condensación de los volátiles arrastrados.

Las trampas de adsorbentes más comunes son las de carbón activo, o las de polímeros porosos, tales como el Tenax o el Porapak. Así, Mamede y col.³⁴¹ emplean una trampa de Tenax para el análisis de componentes aromáticos en mostos fermentados.

En concreto, en el análisis de los compuestos volátiles del vino, ambos tipos de técnicas, estáticas y dinámicas, han sido ampliamente utilizados. Sin embargo, puesto

que el procedimiento estático a menudo ofrece poca sensibilidad para volátiles traza, es más frecuente el uso del procedimiento dinámico. En este último caso, los analitos suelen atraparse, criogénicamente, en disolventes orgánicos, o en polímeros adsorbentes como Tenax o Porapak Q. El primero es el más ampliamente utilizado para el análisis de muestras de vino, debido a su baja afinidad por el agua y el etanol.³⁴² Así, Rosillo y col.³⁴³ analizan los volátiles libres presentes en distintas variedades de *Vitis vinifera*, con la finalidad de diferenciarlas, mediante el análisis dinámico del espacio de cabeza, para ello purgan las muestras de mosto con He durante 20 minutos y atrapan los volátiles en una trampa de Tenax TA. Este mismo procedimiento es empleado por Girard y col.³⁴⁴ para evaluar los efectos que distintos tipos de vinificación (a 30°C, a 20°C, a 15°C y a 15°C con mosto filtrado por gravedad previamente) tienen en los perfiles de CG de vinos de Pinot Noir.

Los compuestos volátiles habitualmente identificados mediante las técnicas estáticas y dinámicas de espacio de cabeza en muestras vínicas, son, generalmente, ésteres, alcoholes y ácidos asociados con la fermentación alcohólica.^{49,345,346} También se han determinado terpenos (linalol y alfa-terpineol) y norisoprenoides (vitispirano, TDN).^{49,50}

✓ **Microextracción en fase sólida (MEFS)**

Suele ser una técnica seleccionada a menudo para el análisis de los compuestos relacionados con el aroma, puesto que se trata de una técnica libre de disolventes, sensible, que permite un muestreo rápido con bajo coste, y es de fácil operación. Esta técnica emplea una fibra de corta longitud (1-2 cm) de sílice cubierta con un adsorbente. Esta fibra se dispone inmersa directamente en la muestra acuosa o en el espacio de cabeza existente por encima de la muestra líquida o sólida. El equilibrio se alcanza antes en la MEFS de espacio de cabeza (MEFS-EC), que en la MEFS de inmersión puesto que no hay líquido que impida la difusión del analito en la fibra.³⁴⁷ Se trata de una técnica idónea para la obtención de huellas digitales de los aromas de alimentos, aunque su beneficio más obvio es su habilidad para aislar y concentrar compuestos volátiles sin interferencia de los componentes de la matriz.

La MEFS-EC muestra una sensibilidad, para compuestos aromáticos volátiles y semi-volátiles, mucho mayor que otras técnicas convencionales de espacio de cabeza,³⁴⁸ aunque esta última técnica ofrece mayor sensibilidad cuando se analiza compuestos aromáticos extremadamente volátiles.⁴⁴

La extensión en que se produce la adsorción en la fibra de MEFS dependerá de varios parámetros relacionados con el analito y la fibra empleada, de forma que ha de considerarse, entre otros factores, la volatilidad del analito, la concentración del mismo y la fuerza iónica de la muestra. La selección de la fibra de apropiada polaridad y, en menor extensión, el grosor del recubrimiento de la misma, es una etapa crítica para el proceso y depende a su vez de la naturaleza del analito.

La selectividad de la adsorción dependerá del uso de las fibras apropiadas.^{45,349} Esto es especialmente importante en aquellos casos de análisis cuantitativo donde debe controlarse efectivamente la adsorción competitiva.

La MEFS es un método sensible a las condiciones experimentales y cualquier cambio en las mismas puede influir directamente en los coeficientes de distribución y la velocidad de adsorción de los analitos, y, en consecuencia, en la cantidad de analitos adsorbidos y en la reproducibilidad del método. Para obtener resultados reproducibles, deben controlarse cierto número de variables experimentales: método de muestreo (espacio de cabeza o inmersión), volumen de líquido y espacio de cabeza, pH de muestra, contenido salino (puesto que la adición de sal incrementa, usualmente, la adsorción),³⁵⁰ tiempo de muestreo, temperatura, profundidad de inmersión de la fibra, condiciones de agitación y calentamiento (de esta forma se consigue reducir el tiempo en que se alcanza el equilibrio para los compuestos menos volátiles),³⁵¹ etc...

En el caso particular de la MEFS, son varios los autores que han empleado esta técnica para el análisis de compuestos volátiles en vinos, para ello, adsorben los analitos en la fibra seleccionada, para posteriormente desorberlos mediante la introducción de la misma en el puerto de entrada del cromatógrafo de gases.³⁵² Se han empleado distintos tipos de fibras en estos análisis³⁵³: PDMS (polidimetilsiloxano) para muestras de vino o derivados en la determinación de distintos compuestos aromáticos^{354,355,356,357} o tricloroanisoles³⁵⁸ y clorofenoles (tri-, tetra- y penta-clorofenoles);³⁵⁹ CAR-PDMS (carboxen-polidimetilsiloxano) para el análisis de compuestos azufrados^{360,361,362} en vinos o de compuestos aromáticos en vinagres;³⁶³ PA (poliacrilato) para analizar compuestos azufrados³⁶⁴ o compuestos volátiles;^{55,365} CAR-DVB (carboxen-divinilbenceno) para determinar diacetilo³⁶⁶ o benzotiazol³⁶⁷ en vinos; etc...

Buszewski y Ligor,³⁶⁸ Baptista y col.³⁶⁹ y Begala y col.³⁷⁰ emplean fibras de PA para determinar compuestos volátiles en vinos mediante MEFS-EC. También Camara y col.³⁷¹ emplean la misma fibra para analizar los compuestos relacionados con el aroma varietal (monoterpenos y C13-norisoprenoides) en cuatro variedades de uva empleadas en la elaboración de vinos de Madeira.

Numerosos autores han ensayado distintas combinaciones de fibras para el análisis de aromas en vinos así: Ferreira y de Pinho³⁷² evalúan 7 tipos de fibras en la MEFS-EC de compuestos aromáticos en vinos blancos (alcoholes, aldehídos, terpenoles y C13-norisoprenoides), obteniendo la mejor eficiencia en la extracción con la combinación de los recubrimientos DVB-CAR-PDMS; Bonino y col.³⁷³ emplean combinaciones de PDMS-DVB, CAR-DVB y PDMS para la MEFS de compuestos aromáticos en el vino italiano Ruche, seleccionando finalmente la primera de ellas; Demyttenaere y col.³⁷⁴ estudian la composición aromática de vinos blancos griegos con cuatro tipos de fibras: PDMS, PA, CAR-DVB y DVB-CAR-PDMS, y escogen como fibra óptima la de DVB-CAR-PDMS cuando el muestreo se realiza dentro del líquido, y la PDMS cuando el muestreo se realiza en el espacio de cabeza; Sala y col.³⁷⁵ analizan 3-alkil-2-metoxipirazinas en mostos con fibras de PDMS, PDMS-DVB, CAR-PDMS y CW (Carbowax)-DVB, llegando a la conclusión de que la fibra que mejor se adapta a este análisis es la PDMS-DVB; Mestres y col. evalúan distintas fibras (PDMS, PDMS-DVB, PA, CW-DVB, CAR-PDMS, Stable Flex DVB-CAR-PDMS,³⁷⁶ y CAR-PDMS, Stable Flex DVB-CAR-PDMS³⁷⁷) para aplicarlas al análisis de compuestos azufrados con baja volatilidad, decidiéndose en el primer caso por la fibra de CAR-PDMS, y en el segundo por la de DVB-CAR-PDMS; o Cabredo-Pinillos³⁷⁸ determina esteres, alcoholes, terpenoles y ácidos en vino de la D.O.C. Rioja mediante MEFS automatizada, ensayando fibras de PDMS (100 y 7 micras), CW-DVB y PA, y obteniendo los mejores resultados con la CW-DVB.

Mallouchos y col.,³⁷⁹ al igual que Vianna y Ebeler,³⁸⁰ emplean la MEFS como técnica de muestreo en la investigación de la evolución de distintos volátiles (alcoholes, esteres acéticos y esteres etílicos de ácidos grasos) durante la fermentación alcohólica de mostos de uva. También Vallejo-Cordoba y col.³⁸¹ determinan esteres etílicos mediante esta técnica, aunque en este caso lo hacen en muestras de tequila. De la misma forma, Roussis y col.³⁸² estudian la disminución de la concentración de esteres volátiles y terpenoles durante el almacenamiento en condiciones oxidantes de vinos de Moscatel y Xinomavro.

Whiton y Zoecklein³⁸³ determinan carbamato de etilo en vinos mediante MEFS-EC y CG-MS, para ello evalúan distintos tipos de fibras, optimizando el método de muestreo con una fibra de CAR-DVB durante 30 minutos.

Recientemente se han desarrollado métodos de MEFS en el que se produce la derivatización de los compuestos a analizar de forma previa a la extracción,³⁸⁴ o in situ,³⁸⁵ concretamente se ha empleado en el análisis de clorofenoles y cloroanisoles en vinos.

✓ **Extracción por sorción en barra agitadora (ESBA)**

Se trata de otra alternativa recientemente desarrollada para el análisis de muestras acuosas,³⁸⁶ que tiene los mismos fundamentos que la MEFS, con la única diferencia de que la retención de los analitos se produce en el adsorbente (con forma de barra agitadora) que se encuentra inmerso, o sobre la muestra. Para ello se emplea un imán encapsulado y recubierto de PDMS, que se conoce como twister. La extracción se desarrolla mientras se agita la muestra con esta barra agitadora durante un tiempo determinado (dependerá del volumen de muestra y de la velocidad de agitación, oscilando entre los 30 y los 60 minutos).³⁸⁷ Posteriormente, ésta se desorbe en línea con el CG.

Esta técnica se ha aplicado al análisis de distintos tipos de compuestos: pesticidas en frutas y vegetales^{388,389,390,391} o téis;³⁹² volátiles en whisky de Malta³⁹³ o en infusiones de café;³⁹⁴ monoterpenos en distintas plantas;³⁹⁵ conservantes (ácido sórbico, etc..) en bebidas, vinagres o salsas;³⁹⁶ o de contaminantes orgánicos (HAP, PCB, etc...) en aguas.^{397,398,399,400}

Además se ha utilizado en el análisis de muestras de vinos para la determinación de: diversos compuestos volátiles relacionados con el aroma,^{401,402,403} de tricloroanisoles^{404,131} o de fungicidas;⁴⁰⁵ así como en el seguimiento de la evolución de los constituyentes volátiles durante la maduración de uvas Monastrell.⁴⁰⁶

1.5.1.5 Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)

En el análisis de la componente aromática de alimentos en general, la aplicación de la EAU es relativamente reciente.

Cocito y col.⁴⁰⁷ desarrollan, ya en 1995, un método para la extracción rápida de compuestos aromáticos en mostos y vinos mediante ultrasonidos, consiguiendo buenas recuperaciones, linealidad y reproducibilidad para la mayoría de los compuestos estudiados, así como mayor rapidez y simplicidad que utilizando las resinas de C18.

Vila y col.⁴⁰⁸ llevan a cabo la optimización de un método para la extracción de compuestos aromáticos en vinos mediante esta técnica. Para ello, emplean una mezcla de n-pentano-éter dietílico (1:2) como disolvente, y realizan un diseño factorial para optimizar las variables del proceso.

También emplean la EAU Gómez-Plaza y col.⁴⁰⁹ para investigar el aroma de los vinos elaborados con 7 clones de la variedad de uva Monastrell, con vistas a la caracterización y diferenciación entre los distintos clones, realizando la extracción con diclorometano. Este mismo disolvente es empleado por Caldeira y col.⁴¹⁰ en la determinación de los compuestos aromáticos presentes en los extractos hidroalcohólicos de madera empleados en la elaboración de brandies, así como en brandies envejecidos.

Asimismo, se ha aplicado esta técnica al análisis de tricloroanisoles en corchos, comparándola con la ESL con agitación y la extracción Soxhlet, y empleando pentano como disolvente en todos los casos.⁴¹¹

I.5.1.6 Extracción asistida por microondas (EAM)

La aplicación de la EAM al análisis de la componente volátil de alimentos ha sido muy limitada, centrándose los ejemplos encontrados en la bibliografía, precisamente, en el análisis de muestras de vino, mosto o uvas.

Razungles y col.⁴¹² desarrollan un método rápido para el análisis de compuestos volátiles en uvas y vinos mediante EAM, comparándola con los resultados obtenidos mediante la EFS con Amberlita XAD-2. Llegan a la conclusión de que, aunque los rendimientos de extracción obtenidos por ambos métodos son muy similares en las muestras de vino, la EAM es mucho más rápida y proporciona mejores resultados para compuestos polares. En el caso del análisis de uvas, llegan a la misma conclusión: la EAM puede utilizarse para extraer los precursores aromáticos glicosilados, y así lo demuestra el mismo grupo de investigadores al desarrollar un método específico para la extracción de los precursores glicosilados relacionados con el aroma, a partir de uvas y mostos.⁴¹³

También Carro y col.⁴¹⁴ emplean esta técnica para la extracción de monoterpenoles (linalol, alfa-terpineol, citronelol, nerol y geraniol) en muestras de mosto, concretamente con diclorometano.

I.5.1.7 Extracción con fluidos supercríticos (EFSC)

Los compuestos del aroma y otros volátiles se pueden extraer de una forma relativamente fácil con esta técnica gracias, además, a su selectividad y a la posibilidad de acoplarlo directamente con el análisis por CG.

En cuanto a la aplicación de esta técnica al análisis de aromas en vinos podemos citar los siguientes autores: Blanch y col.⁴¹⁵ estudian la aplicabilidad de la EFSC al análisis del aroma del vino considerando tres aproximaciones distintas (EFSC off-line, EFSC con recolección de los analitos en el vaporizador de temperatura programada situado en el extractor, o la EFSC acoplada on-line a través del vaporizador); asimismo Carro y col.⁴¹⁶ proponen la extracción, con CO₂ supercrítico modificado con MeOH, de los componentes libres del aroma (compuestos terpénicos) de mostos y vinos, tras la retención previa en un soporte de Amberlita XAD-2; y Karásek y col.¹⁹⁵ determinan de igual forma la composición aromática de distintos tipos de vinos monovarietales. Palma y col.⁴¹⁷ parten de este mismo planteamiento para desarrollar un método de EFSC de glicósidos de uva.

También Señorans y col.^{418,419,420} han empleado la EFSC, concretamente en la modalidad contracorriente, en el análisis del aroma de destilados. Los progresos que se han realizado en el aislamiento e identificación de precursores aromáticos no volátiles, se deben en parte al desarrollo de la cromatografía en contracorriente (CC). A diferencia de otros tipos de cromatografía, la CC no usa un soporte sólido. La separación implica la partición de los analitos entre dos líquidos inmiscibles (en el caso de la EFSC-CC, entre la muestra y el fluido supercrítico): la fase móvil líquida se hace pasar continuamente a través de la fase estacionaria que está retenida en la columna por la fuerza centrífuga o gravitatoria.^{421,422} Esta técnica permite el aislamiento de precursores aromáticos lábiles que no pueden ser aislados mediante otras técnicas (C18, XAD-2, etc...).^{423,424}

En la tabla que presentamos a continuación se da una descripción de todas las técnicas de preparación de muestras anteriormente mencionadas:

Técnica de extracción	Descripción
Basadas en la destilación	<ul style="list-style-type: none">- Destilación con vapor: la muestra en un recipiente se calienta para permitir la separación de los compuestos en función de sus presiones de vapor, condensándose posteriormente la fracción destilada.- Destilación-extracción simultánea: la muestra se introduce en un matraz con agua y en otro matraz se dispone el disolvente extractante, al calentar ambos recipientes, los analitos se arrastran con el vapor de agua y condensan en la fase acuosa recogida.- Otros métodos de destilación: la destilación se realiza a bajas presiones
Basadas en el Espacio de cabeza	<ul style="list-style-type: none">- Estáticas: consiste en la recuperación de los analitos presentes en el espacio de cabeza de un recipiente sellado que contenga la muestra.- Dinámicas: sobre la muestra se hace pasar un gas para arrastrar los analitos y recolectarlos posteriormente en una trampa o sistema de retención.
Extracción líquido-líquido	La muestra se coloca en contacto con el disolvente extractante seleccionado durante el tiempo necesario.
Extracción en fase sólida	La muestra se hace pasar por el adsorbente seleccionado permitiendo que, tras quedar retenidos los analitos en la fase sólida, se eluyan con pequeños volúmenes del disolvente adecuado.
Asistida con microondas	La muestra se coloca en un recipiente abierto o cerrado y se introduce en el disolvente, suministrándole energía en forma de microondas para facilitar la extracción
Asistida por ultrasonidos	La muestra se coloca en un recipiente junto con el disolvente seleccionado y se somete a la acción de los ultrasonidos para potenciar la extracción.
Con fluidos supercríticos	La muestra se coloca en una cámara a alta presión y es extraída con el fluido supercrítico que puede circular a través de la muestra en circuito cerrado o abierto. Después de la despresurización los analitos son recogidos en un pequeño volumen de disolvente orgánico o en una trampa sólida.

Tabla 4 Características de técnicas de preparación de muestras.

De forma que podemos esquematizar las características de las técnicas de extracción anteriores mediante la tabla siguiente:

<i>Característica</i>	<i>Dest.</i>	<i>Esp. Cab.</i>	<i>ELL</i>	<i>EFS</i>	<i>EAU</i>	<i>EAM</i>	<i>EFSC</i>
<i>Rapidez</i>	-	-	-	++	++	++	++
<i>Cantidad de muestra</i>	++	++	+	+	+	+	-
<i>Consumo de disolventes</i>	++	-	++	+/-	+	+	-
<i>Variedad de disolventes</i>	+		++	++	+	+	-
<i>Exposición a disolventes</i>	++	-	++	+	+	+	-
<i>Habilidad del operador</i>	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+
<i>Coste del equipamiento</i>	-	-	-	+/-	+/-	++	++
<i>Nivel de automatización</i>	-	+/-	-	++	-	++	++

Tabla 5 Comparación de las técnicas Destilación, Espacio de cabeza, ELL, EFS, EAU, EAM y EFSC.

I.5.2 Procedimiento cromatográfico

El análisis por CG de los compuestos volátiles del vino se centró en sus inicios (décadas de los 50 y 60) en la identificación de los alcoholes de fusel y esteres presentes en concentraciones relativamente elevadas. Con el desarrollo de las columnas capilares de alta resolución y de detectores más selectivos y sensibles, se han llegado a identificar más de un millar de compuestos relacionados con el aroma del vino. En general, el tipo de fase estacionaria más empleado en el análisis de muestras de vino es la constituida a partir de polietilenglicol (DB Wax, ZB Wax, Carbowax, etc...).

En función del tipo de detector empleado podemos distinguir entre la CG-DIL (detector de ionización de llama), la CG-EM (detector espectrometría de masas), o la GC-O (detección olfatométrica).

El uso de la espectrometría de masas (EM) en continuo como detector de CG para la identificación de estos compuestos, ha supuesto un importante desarrollo para el análisis de este tipo de muestras. De forma, que actualmente existe una gran disponibilidad de cromatógrafos de gases con detectores de EM y son empleados rutinariamente.

La CG-EM, además de ser especialmente útil en la identificación de compuestos desconocidos, está incrementando su utilidad en el análisis cuantitativo de compuestos volátiles. En los análisis por CG es habitual emplear un patrón interno para seguir las recuperaciones de los analitos y reducir la variabilidad asociada con la preparación de la muestra e inyección. La elección de este patrón interno puede ser complicada (por ejemplo, no debe interferir con la separación cromatográfica pero sí presentar un comportamiento similar a los analitos a cualquier pérdida que se pueda producir durante la preparación de muestra). Es en este punto donde surge la gran utilidad del detector de EM, puesto que permite el empleo de patrones marcados isotópicamente (con propiedades químicas y físicas casi idénticas al analito de interés, pero que no se resuelven durante la separación cromatográfica) al poder buscar masas de iones individuales concretos, y poderse cuantificar un analito separadamente de su patrón marcado isotópicamente.

Dentro de la CG, podemos distinguir distintos procedimientos de análisis: los ensayos de dilución isotópica (EDI), el análisis por dilución de extractos de aroma (ADEA) o el análisis por concentración de extractos de aroma (ACEA).

A. Ensayos de dilución isotópica (EDI)

Emplean patrones internos marcados isotópicamente, como mencionamos en el párrafo anterior, corrigiendo de esa forma las pérdidas que se producen durante la preparación de la muestra y el análisis cromatográfico.

Se ha utilizado para la determinación de distintos compuestos volátiles en muestras de vinos: pirazinas,^{425,426} tricloroanisoles,⁴²⁷ diacetilo,⁹⁴ 4-etilfenol,⁴²⁸ terpenoles (geraniol, nerol, linalol, alfa-terpineol),¹³² o compuestos azufrados.⁴²⁹

B. Análisis por dilución de extractos de aroma (ADEA)

Se trata de un método para la caracterización de la “fuerza” o potencia de un compuesto particular en relación a su umbral de olor. En su forma más simple, se lleva a cabo analizando sucesivas diluciones de una muestra o extracto, hasta que la respuesta odorífera de cada compuesto o región de interés no sea detectado (es decir, los extractos de los compuestos aromáticos se diluyen hasta que no se percibe olor en el puerto sniff, donde el analista coloca la nariz). El valor de la dilución de olor (DO) o dilución de aroma (DA) es el asignado al valor de la dilución de la muestra que conlleva la extinción del olor en el detector olfatorio. Cuanto mayor sea el valor de DO/DA, más significativo será ese compuesto en el aroma o perfil odorífero conjunto de la muestra.

Los resultados, por tanto, se expresan como factor de dilución del aroma (DA), que es la relación entre la concentración del odorante en el extracto inicial y su concentración en el extracto más diluido en el que el olor es todavía detectado por olfatometría. Consecuentemente el factor DA es una medida relativa y es proporcional al valor de actividad de olor de ese compuesto en el aire.

Esta técnica es muy útil en la determinación del mayor contribuyente al perfil aromático de un extracto o del compuesto clave cuando se analiza una muestra para un olor en particular.

Se ha aplicado a la caracterización y cuantificación de diversos compuestos activos desde el punto de vista aromático, en vinos elaborados con distintas variedades de uva: Merlot, Cabernet Sauvignon y Garnacha cultivadas en España;⁴³⁰ Cabernet Sauvignon y Merlot cultivadas en Burdeos;⁵⁰ Garnacha (vino rosado),⁴³¹ Chardonel (híbrido francés-americano),⁴³² Macabeo,⁴³³ o Garnacha del Priorato.⁴³⁴

Así como a la búsqueda de perfiles aromáticos clave para distinguir entre vinos tintos de crianza de alta calidad elaborados en España.⁴³⁵

C. Análisis por concentración de extractos de aroma (ACEA)

Es el método contrario del ADEA. Se empieza con el extracto sin diluir que es concentrado sucesivamente y después de cada etapa se analiza una alícuota por CG olfatométrica. Este procedimiento evita una sobreestimación de los factor DA de odorantes inestables que se degradan en el ADEA.

López y col.¹⁸⁸ analizan las intensidades de los compuestos volátiles liberados por la hidrólisis en medio ácido de los precursores inodoros extraídos de uvas Tempranillo y Garnacha, con un experimento ACEA. Llegan a la conclusión de que los odorantes liberados más importantes son derivados de ácidos grasos insaturados, ácidos grasos y algunas lactonas alifáticas. Sólo beta-damascenona y TDN son los odorantes de impacto derivados de los carotenoides, y el farnesol y 3,7-dimetil-1-eno-3,7-diol de los terpenoles.

Dentro de la aplicación de la CG a la detección de compuestos relacionados con el aroma podemos distinguir:

- CG con captura electrónica: tiene escasa aplicación para ese tipo de analitos, puesto que se utiliza básicamente para la determinación de compuestos halogenados. Juanola y col.²⁰⁶ determinan los contenidos de tricloroanisoles en corchos mediante esta técnica tras una extracción previa, al igual que Martínez-Urunuela y col.⁴⁰⁰
- CG con olfatometría (CG-O), se ha aplicado a la determinación cuantitativa de odorantes de distintos tipos de vinos (mediante AEDA): así, Ferreira y col.²⁶² detectan 69 regiones odoríferas en los perfiles de CG-O, 63 de los cuales pudieron ser identificados; Culleré y col.⁴³⁶ revelan la presencia de 85 notas aromáticas de las que se identificaron

78 odorantes; y lo mismo hacen López y col.²⁵⁷ en vinos de las variedades Merlot, Cabernet Sauvignon y Garnacha; Buettner¹³⁰ en vinos de Chardonnay, o Cadwallader y col.²⁵⁹ en vinos de la variedad híbrida Chardonel.

Asimismo Selli y col.¹⁴⁷ utilizan la CG-O y el análisis de los valores de actividad odorífera para comprobar que el alcohol isoamilico, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, acetato de isoamilo, 2-feniletanol y el ácido octanoico, son compuestos de potente aroma presentes en vinos tintos de la variedad Kalecik Karasi cultivada en Anatolia.

- CG con detector de ionización de llama (GC-DIL), ha sido empleada por diversos autores para la determinación de compuestos volátiles en muestras de uva y vino, usando distintas técnicas de preparación de muestras. Así, Selli y col.¹⁴⁷ utilizan la ELL con diclorometano previa al análisis por GC-DIL, al igual que Ortega-Heras y col.⁴³⁷ Benítez y col.¹⁶⁴, en cambio, tras la extracción con éter dietílico-pentano (2:1); y Ledauphin y col.⁴³⁸ tras la extracción con pentano.
- CG con detector de espectrometría de masas (CG-EM): se ha aplicado extensivamente al análisis de los compuestos relacionados con el aroma de distintos tipos de muestras.

Esta es la técnica más comúnmente empleada para analizar los componentes volátiles, y el potencial aromático, en muestras de interés enológico. Así, Girard y col.⁵⁵ emplean esta técnica para determinar los compuestos volátiles relacionados con el aroma varietal de uvas de la variedad Gewürtztraminer. De igual forma Miklosy y col.⁴³⁹ analizan la fracción aromática de uvas con pudrición noble utilizadas en la producción de vinos de Tokaj.

Este tipo de detección también ha sido empleado en el análisis de muestras de mostos. Vianna y Ebeler¹⁰⁸ utilizan la CG-EM para seguir la evolución de los esteres durante la fermentación de mostos de uvas blancas. También, Kotseridis y Baumes determinan gracias a esta técnica los compuestos volátiles en mostos de las variedades Cabernet Sauvignon y Merlot, al igual que Cabaroglu y col.²¹⁵ en mostos de la variedad de uva Emir cultivada en Turquía.

En cuanto a su aplicación a muestras de vino, son numerosos los autores que seleccionan la detección por EM en la separación por CG de compuestos volátiles. Así, Begala y col.⁹⁸ la emplean para analizar vino “Cannonau de Jerzu”; Ferreira y col.⁴⁴⁰ hacen lo mismo en el análisis de vinos tintos; o Whiton y Zoecklein¹¹¹ la emplean en la determinación de carbamato de etilo.

También debemos indicar que diversos autores emplean la CG-FID y la CG-EM como técnicas complementarias para analizar el mismo tipo de muestras. Tal es el caso de Aznar y col.⁴⁴¹ para predecir las propiedades aromáticas de vinos tintos envejecidos a partir de su composición química; de Ledauphin³⁰³ en la caracterización de destilados Calvados; o de Falque y col.⁴⁴² al analizar los componentes volátiles de vinos de las variedades Loureira, Dona Branca y Treixadura.

-
- ¹ D. Ryan , K. Robards, “Phenolic compounds in olives”, *Analyst*, 1998, **123**, 31R
- ² J. J. Macheix, A. Fleuriet , J. Billot, *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton , FL, 1990.
- ³ J. B. Harborne, T. J. Chapman, *The Flavonoids: Advances in Research*, ed. Chapman , Hall, Londres, 1982.
- ⁴ P. Langcake, “Disease resistance of vitis spp and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon-viniferin, alpha-viniferin and pterostilbene”, *Physiol. Plant Pathol.*, 1981, **18**, 213.
- ⁵ P. Jeandet, R. Bessis, B.F. Maule, P. Meunier, D. Peyron et al., “Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine”, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 316.
- ⁶ A. L. Waterhouse, R.M. Lamuela-Raventós, “The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries”, *Phytochem.*, 1994, **37**, 571.
- ⁷ C. Domínguez, D. A. Guillén, C.G. Barroso, “Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine”, *J. Chromatogr. A*, 2001, **918**, 303.
- ⁸ A. Rommel, R. E. Wrolstad, D. A. Heatherbell, “Blackberry juice and wine - processing and storage effects on anthocyanin composition, color and appearance”, *J. Food Sci.*, 1992, **57**, 385.
- ⁹ V. Hong, R. E. Wrolstad, “Cranberry juice composition”, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1986, **69**, 199.
- ¹⁰ M. Siddiq, J. F. Arnold, N. K. Sinha, J. N. Cash, “Effect of polyphenol oxidase and its inhibitors on anthocyanin changes in plum juice”, *J. Food Process. Preserv.*, 1994, **18**(1), 75.
- ¹¹ N. Ishikura, K. Sugahara, “Survey of anthocyanins in fruits of some angiosperms” *Bot. Mag. Tokio*, 1979, **92**, 157.
- ¹² R. M. Lamuela-Raventós, A. L. Waterhouse, “A direct HPLC separation of wine phenolics”, *Am. J. Enol. Vitic.*, 1994, **45**,1.
- ¹³ L. M. Larocca, M. Giustacchini, N. Maggiano, F. O. Ranelletti et al., “Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-ii estrogen-binding sites in primary human transitional-cell carcinomas “, *J. Urol.*, 1994, **152**, 1029.
- ¹⁴ L. M. Larocca, L. Teofili, S. Sica, M. Piantelli et al., “Quercetin inhibits the growth of leukemic progenitors and induces the expression of transforming growth-factor-beta-1 in these cells”, *Blood*, 1995, **85**, 3654.
- ¹⁵ K. Robards, M. Antolovich, “Analytical chemistry of fruit bioflavonoids - A review”, *Analyst*, 1997, **112**, 11R.
- ¹⁶ M. J. Amiot, M. Tacchini, S. Aubert, J. Nicolas, “Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity”, *J. Food Sci.*, 1992, **57**, 958.
- ¹⁷ M. A. Aramendia, L. García, L. Lafont, J. M. Marinas, “Determination of isoflavones using capillary electrophoresis in combination with electrospray mass-spectrometry”, *J. Chromatogr. A*, 1995, **707**, 327.
- ¹⁸ A. A. Franke, L. J. Custer, C. M. Cerna, K. K. Narala, “Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC”, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1905.
- ¹⁹ M. E. Cuvelier, C. Berset an H. Richard, “Antioxidants constituents in Sage (*Salvia -Officinalis*)”, *J. Agric.Food Chem.*, 1994, **42**, 665.
- ²⁰ S. Z. Dziedzic , B. J. F. Hudson, “Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils”, *Food Chem.*, 1984, **14**, 45.
- ²¹ C. M. Houlihan, C. T. Ho , S. S. Chang, “Structural elucidation of novel antioxidants isolated from rosemary”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1984, **61**, 667.
- ²² S. N. Onyeneho , N. S. Hettiarachchy, “Antioxidant activity of durum-wheat bran”, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 1496

- ²³ V. Cody, E. Middleton, J. B. Harborne, A. Berezit et al., *Plant Flavonoids in Biology, Medicine II. Biochemical, Cellular, Medicinal Properties. Progress in Clinical, Biological Research*, New York, 1988.
- ²⁴ Y. Yilmaz, R.T. Toledo, "Health aspects of functional grape seed constituents", *Trends in Food Sci. & Technol.*, 2004, **15**, 422.
- ²⁵ G.K. Jayaprakasha, T. Selvi, K.K. Sakariah, "Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts", *Food Research International*, 2003, **36**, 117.
- ²⁶ G. Ozkan, O. Sagdic, N.G. Baydar, Z. Kurumahmutoglu, "Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts", *J. Sci. Food & Agric.*, 2004, **84**, 1807.
- ²⁷ H. D. Martín, "The function of natural colorants - the biochromes", *Chimia*, 1995, **49**, 45.
- ²⁸ J. Kuc, "Relevance of phytoalexins - a critical review", *Acta Hort.*, 1994, **381**, 526.
- ²⁹ M. A. Read, "Flavonoids - naturally-occurring antiinflammatory agents", *Am. J. Pathol.*, 1995, **147**, 235.
- ³⁰ R. Ficarra, P. Ficarra, S. Tommasini, M. L. Calabro et al., "Leaf extracts of some cordia species - analgesic and antiinflammatory activities as well as their chromatographic analysis", *Farmaco*, 1995, **50**, 245.
- ³¹ S. Bradamante, L. Barenghi, A. Villa, "Cardiovascular protective effects of resveratrol", *Cardiovasc. Drug Reviews*, 2004, **22**, 169.
- ³² L.X. Wang, A. Heredia, H.J. Song, Z.J. Zhang et al., "Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: Characterization, synthesis, and anti-HIV activity", *J. Pharmac. Sci.*, 2004, **93**, 2448.
- ³³ A.Y. Sun, A. Simonyl, Q. Wang, G. Y. Sun, "Beyond the French paradox: Protection of grape polyphenols against neurodegenerative processes", *Alcoholism-Clin. & Experim. Research*, 2004, **28**, 55.
- ³⁴ L. Bravo, R. Abia, F. Saura-Calixto, "Polyphenols as dietary fiber associated compounds - comparative-study on in-vivo and in-vitro properties", *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1481.
- ³⁵ V. Cheyrier, R. Van Hulst, "Oxidation of trans-caftaric acid and 2-S-glutathionylcaftaric acid in model solutions", *J. Agric. Food Chem.*, 1988, **36**, 10.
- ³⁶ M.T. Escribano-Bailon, O. Dangles, R. Brouillard, "Coupling reactions between flavylum ions and catechin", *Phytochem.*, 1996, **41**, 1583.
- ³⁷ D. A. Guillen, C. G. Barroso, J. A. Pérez-Bustamante, "Automation of sample preparation as a preliminary stage in the high-performance liquid chromatographic determination of polyphenolic compounds in sherry wines", *J. Chromatogr. A*, 1996, **730**, 39.
- ³⁸ J. P. Roggero, "Chromatography of phenolics in wine", *Biofactors*, 1997, **6**, 441.
- ³⁹ E. Revilla, M. Bourzeix, E. Alonso, "Analysis of catechins and proanthocyanidins in grape seeds by hplc with photodiode array detection", *Chromatographia*, 1991, **31**, 465.
- ⁴⁰ C. Betés-Saura, C. Andrés-Lacueva, Lamuela Raventós, "Phenolics in white free run juices and wines from Penedès by High-Performance Liquid Chromatography: changes during vinification", *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 3040.
- ⁴¹ B. Fernández de Simon, T. Hernández, I. Estrella, "Relationship between chemical-structure and biosynthesis and accumulation of certain phenolic-compounds in grape skins during ripening", *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 1992, **194**, 351.
- ⁴² J.M. Ricardo Da Silva, J.P. Rosec, M. Bourzeix, M. Mourgues et al., "Dimer and trimer procyanidins in carignan and mourvedre grapes and red wines", *Vitis*, 1992, **31**, 55.
- ⁴³ P. Perez-Juan, M. Medina, C.G. Barroso, J. Morales, et al., "Application of multivariate data analysis technique to grape growth", *Riv. Vitic. Enol.*, 1998, **51**, 370.

- ⁴⁴ M. Sato, N. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo et al., "Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources", *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 37.
- ⁴⁵ J. Morales, F.J. Jimenez, Perez-Juan, P.M; "Aptitudes enológicas de diferentes cultivares tintos en Montilla-Moriles", XVIII Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros, I.S.B.N: 84-7930-064-7, 1996, pag. 294.
- ⁴⁶ D. Kadim , C. H. Mannheim, "Kinetics of phenolic extraction during aging of model wine solution and white wine in oak barrels", *Am. J. Enol. Vitic.*, 1999, **50**, 33.
- ⁴⁷ P. Valentao, P. B. Andrade, F. Areias, F. Ferreres et al., "Analysis of Vervain flavonoids by HPLC/diode array detector method. Its application to quality control", *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 4579.
- ⁴⁸ A. De Villiers, F. Alberts, F. Lynen, A. Crouch et al., "Evaluation of liquid chromatography and capillary electrophoresis for the elucidation of the artificial colorants brilliant blue and axorubine in red wines", *Chromatographia*, 2003, **58**, 393.
- ⁴⁹ P. Jeandet, A. C. Breuil, M. Adrian, L. A. Weston et al., "HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry", *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 5172.
- ⁵⁰ M. Campos, C. Cavaleiro, A. Paranhos, A. Proença de Cunha et al., *Bull. Liaison-Groupe Polyphenols*, 1992, **16**, 59.
- ⁵¹ L. Bengoechea, C. Gómez-Cordovés, T. Hernández, *Bull. Liaison-Groupe Polyphenols*, 1992, **16**, 88.
- ⁵² A. Baldi, A. Romani, N. Mulinacci, M. Bambagiotti et al., *Bull. Liaison-Groupe Polyphenols*, 1992, **16**, 60.
- ⁵³ A. Peña-Neira, T. Hernández, Concepción García-Vallejo, I. Estrella et al., "A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin", *Eur. Food Res. Technol.*, 2000, **210**, 445.
- ⁵⁴ E. T. Gomes, *Bull. Liaison-Groupe Polyphenols*, 1992, **16**, 90.
- ⁵⁵ M. O. Downey, J.S. Harvey, S.P. Robinson, "Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development", *Australian J. Grape & Wine Res.*, 2003, **9**, 15.
- ⁵⁶ L. Bengoechea, C. Gómez-Cordovés, T. Hernández, *Bull. Liaison-Groupe Polyphenols*, 1992, **16**, 88.
- ⁵⁷ A. M. Le Bon, L. Ziegler, M. J. Amiot, M. Suschetet, *Bull. Liaison-Groupe Polyphenols*, 1992, **16**, 90.
- ⁵⁸ M.A. Rodriguez-Delgado, S. Malovana, J.P. Perez, T.Borges et al., "Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection", *J. Chromatogr. A*, 2001, **912**, 249.
- ⁵⁹ S. Malovana, F.J.G. Montelongo, J.P.Perez, M.A.Rodriguez-Delgado, "Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography", *Anal. Chim. Acta*, 2001, **428**, 245.
- ⁶⁰ C. G. Barroso, J. A. Pérez-Bustamante, D. A. Guillén, C. Viseras, *Quim. Anal.*, 1986, **5**, 312.
- ⁶¹ C. G. Barroso, D. A. Guillén, R. Cela, J. A. Pérez-Bustamante, *Bull. Liaison Groupe Polyphenols*, 1986, **13**, 154.
- ⁶² E. R. Brú, C. G. Barroso, R. Cela, J. A. Pérez-Bustamante, "Development of a rotatory and continuous liquid-liquid extraction technique for phenolic compounds in wine", *Analyst*, 1996, **121**, 297.
- ⁶³ I. Liska, J. Krupcik, P. A. Leclercq, "The use of solid sorbents for direct accumulation of organic-compounds from water matrices - a review of solid-phase extraction techniques", *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1989, **12**, 577.
- ⁶⁴ M-C. Hennion, "Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1999, **856**, 3.
- ⁶⁵ A. Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, "Evaluation of graphitized carbon black as a selective adsorbent for extracting acidic organic compounds from water", *J. Chromatogr. A*, 1993, **642**, 163.

- ⁶⁶ M.S. Mills, E.M. Turman, M.J. Pedersen, "Symposium on solid-phase extraction in environmental and clinical-chemistry - held in conjunction with the 203rd ACS national meeting – San-Francisco, CA (USA), April 5-10, 1992 – foreword", *J Chromatogr. A*, 1993, **629**, 11.
- ⁶⁷ G.A. Csiktusnádi Kiss, E. Forgács, T. Cserháti, M. Candeias et al., "Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic separation of pigments of red wines", *J. Chromatogr. A*, 2000, **889**, 51.
- ⁶⁸ I. Revilla, M.L. Gonzalez-SanJose, "Compositional changes during the storage of red, wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivative levels", *Food Chem.*, 2003, **80**, 205.
- ⁶⁹ J. Pazourek, G.González, A.L. Revilla, J. Havel, "Separation of polyphenols in Canary Islands wine by capillary zone electrophoresis without preconcentration", *J. Chromatogr. A*, 2000, **874**, 111.
- ⁷⁰ J.A.B. Baptista, J.F. de P.Tavares, R.C.B. Carvalho, "Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland versus Azores Islands", *Food Res.Int.*, 2001, **34**, 345.
- ⁷¹ S-P. Wang, K-J Huang, "Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1032**, 273.
- ⁷² S. Kallithraka, I. Arvanitoyannis, A. El-Zajouli, P. Kefalas, "The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines", *Food Chem.*, 2004, **75**, 355.
- ⁷³ G.L. La Torre, G. Laganà, E. Bellocco, F. Vilasi et al., "Improvement on enzymatic hydrolysis of resveratrol glucosides in wine", *Food Chem.*, 2004, **85**, 259.
- ⁷⁴ D. Jornet, O. Busto, J. Guasch, "Solid-phase extraction applied to the determination of ochratoxin A in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 2000, **882**, 29.
- ⁷⁵ A. Leitner, P. Zollner, A. Paolillo, J. Stroka et al., "Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine", *Anal. Chim. Acta*, 2002, **453**, 33.
- ⁷⁶ A. De Villiers, F. Lynen, A. Crouch, P. Sandra, "Development of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of polyphenols, organic acids and sugars in wine", *Chromatographia*, 2004, **59**, 403.
- ⁷⁷ D. Matejicek, O. Mikes, B. Klejdus, D. Sterbová et al., "Changes in contents of phenolic compounds during maturing of barrique red wines", *Food Chem.*, 2005, **90**, 791.
- ⁷⁸ D. Matejicek, B. Klejdus, O. Mikes, D. Sterbova et al., "Application of solid-phase extraction for determination of phenolic compounds in barrique wines", *Analytical & Bioanal. Chem.*, 2003, **377**, 340.
- ⁷⁹ M. Del Alamo, L. Casado, V. Hernández, J.J. Jiménez, "Determination of free molecular phenolics and catechins in wine by solid phase extraction on polymeric cartridges and liquid chromatography with diode array detection", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1049**, 97.
- ⁸⁰ J.M. Sáez, A. Medina, J.V. Gimeno-Adelantado, R.Mateo et al., "Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1029**, 125.
- ⁸¹ F. Chapuis, V. Pichon, F. Lanza, B. Sellergren et al., "Retention mechanism of analytes in the solid-phase extraction process using molecularly imprinted polymers - Application to the extraction of triazines from complex matrices", *J. Chromatogr. B*, 2004, **804**, 93.
- ⁸² R. Weiss, A. Molinelli, M. Jakusch, B. Mizaikoff, "Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compounds", *Bioseparation*, 2001, **10**, 379.
- ⁸³ N.M. Maier, G. Buttinger, S. Welhartizki, E. Gavioli et al., "Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations", *J. Chromatogr. B*, 2004, **804**, 103.

- ⁸⁴ A. V. Filgueiras, J. L. Capelo, I. Lavilla, C. Bendicho, "Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry", *Talanta*, 2000, **53**, 433.
- ⁸⁵ M. Palma, C.G. Barroso, "Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products", *Anal. Chim. Acta*, 2002, **458**, 119.
- ⁸⁶ T. Y. Chu, C.H. Chang, Y.C. Liao, Y.C. Chen, "Microwave-accelerated derivatization processes for the determination of phenolic acids by gas chromatography-mass spectrometry", *Talanta*, 2001, **54**, 1163.
- ⁸⁷ N. Hong, Y.A. Yayhyan, G.S.V. Raghavan, J.R.J.Pare et al., "Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from grape seed", *Nat. Product Letters*, 2001, **15**, 197.
- ⁸⁸ B. W. Wenclawiak, O. P. Heemken, D. Sterzenbach, J. Schipke et al., "Device for efficient solvent collection of environmentally relevant compounds in off-line sfc", *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 4577.
- ⁸⁹ P. R. Eckard, L. T. Taylor, "Trapping capacities of three solid phases for supercritical fluid extraction with pure carbon dioxide", *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1996, **19**, 117.
- ⁹⁰ M. Palma, L. T. Taylor, "Statistical design for optimization of extraction of polyphenols from an inert matrix using carbon dioxide-based fluids", *Anal. Chim. Acta*, 1999, **391**, 321
- ⁹¹ P.L.Buldini, L. Ricci, J.L. Sharma, "Recent applications of sample preparation techniques in food analysis", *J. Chromatogr. A*, 2002, **975**, 47.
- ⁹² M. Valcarcel, M. T. Tena, "Applications of supercritical fluid extraction in food analysis", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, **358**, 561.
- ⁹³ M. T. Tena, A. Ríos, M. Valcárcel, "Supercritical fluid extraction of t-resveratrol and other phenolics from a spiked solid", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1998, **361**, 143.
- ⁹⁴ M. C.Pascual-Martí, A.Salvador,A.Chafer, A.Berna, "Supercritical fluid extraction of resveratrol from grape skin of *Vitis vinifera* and determination by HPLC", *Talanta*, 2001, **54**, 735.
- ⁹⁵ X.Cao, Y.Ito, "Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography", *J.Chromatogr. A*, 2003, **1021**, 117.
- ⁹⁶ M. Palma, L.T. Taylor, R.M. Varela, S.J. Cutler et al., "Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for antimicrobial and agrochemical activities", *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 5044.
- ⁹⁷ M. Palma, L.T. Taylor, "Supercritical fluid extraction of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde from raisins", *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 628.
- ⁹⁸ L. Arce, A.G. Lista, A. Rios, M. Valcarcel, "Screening of polyphenols in grape marc by on-line supercritical fluid extraction - Flow through sensor", *Analytical Letters*, 2001, **34**, 1461.
- ⁹⁹ B. Palenzuela, L. Arce, A. Macho, E. Muñoz et al., "Bioguided extraction of polyphenols from grape marc by using an alternative supercritical-fluid extraction method based on a liquid solvent trap", *Anal. & Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 2021.
- ¹⁰⁰ A. Berna, A.Cháfer, J.B.Montón, "High-pressure solubility data of the system resveratrol (3) plus ethanol (2) plus CO₂ (1)", *J. Supercritical Fluids*, 2001, **19**, 133.
- ¹⁰¹ A.Cháfer, A. Berna, J.B.Montón, R. Muñoz, "High-pressure solubility data of system ethanol (1) plus epicatechin (2) plus CO₂ (3)", *J. Supercritical Fluids*, 2002, **24**, 103.
- ¹⁰² R. Murga, M.T.Sanz, S.Beltrán, J.L.Cabezas, "Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide", *J. Supercritical Fluids*, 2002, **23**, 113.
- ¹⁰³ R. Murga, M.T.Sanz, S.Beltrán, J.L.Cabezas, "Solubility of three hydroxycinnamic acids in supercritical carbon dioxide", *J. Supercritical Fluids*, 2003, **27**, 239.
- ¹⁰⁴ A. Chafer, T. Fornari, A. Berna, R.P. Staeva, "Solubility of quercetin in supercritical CO₂ plus ethanol as a modifier: measurements and thermodynamic modelling", *J. Supercritical Fluids*, 2004, **32**, 89.

- ¹⁰⁵ M.T. Tena, A. Rios, M. Valcarcel, "Supercritical fluid extraction of t-resveratrol and other phenolics from a spiked solid", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1998, **361**, 143.
- ¹⁰⁶ B. E. Richter, B. A. Jones, J. L. Ezzell, N. L. Porter et al., "Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation", *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 1033.
- ¹⁰⁷ T. Sekine, Y. Hasegawa, *Solvent Extraction Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1977.
- ¹⁰⁸ Y. Yang, B. Li, "Subcritical water extraction coupled to high-performance liquid chromatography", *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 1491.
- ¹⁰⁹ Y. Yang, M. Belghazi, A. Lagadec, D. J. Miller et al., "Elution of organic solutes from different polarity sorbents using subcritical water", *J. Chromatogr. A*, 1998, **810**, 149.
- ¹¹⁰ E. Boselli, V. Velazco, M. F. Caboni, G. Lercker, "Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food", *J. Chromatogr. A*, 2001, **917**, 239.
- ¹¹¹ A. Müller, E. Björklund, C. von Holst, "On-line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedingstuffs and food matrices using gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 2001, **925**, 197.
- ¹¹² S. J. Lehotay, C.-H. Lee, "Evaluation of a fibrous cellulose drying agent in supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction of diverse pesticides", *J. Chromatogr. A*, 1997, **785**, 313.
- ¹¹³ M. Papagiannopoulos, B. Zimmermann, A. Mellenthin, M. Krappe et al., "Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt", *J. Chromatogr. A*, 2002, **958**, 9.
- ¹¹⁴ M. Papagiannopoulos, A. Mellenthin, "Automated sample preparation by pressurized liquid extraction-solid-phase extraction for the liquid chromatographic-mass spectrometric investigation of polyphenols in the brewing process", *J. Chromatogr. A*, 2002, **976**, 345.
- ¹¹⁵ M.M. Delgado-Zamarreno, M. Bustamante-Rangel, A. Sanchez-Perez, R. Carabias-Martinez, "Pressurized liquid extraction prior to liquid chromatography with electrochemical detection for the analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1056**, 249.
- ¹¹⁶ B. Klejdus, R. Mikelova, V. Adam, J. Zehnalek et al., "Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of genistin and daidzin in soybean food samples after accelerated solvent extraction with modified content of extraction cell", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **517**, 1.
- ¹¹⁷ M.A. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso, "Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **522**, 169.
- ¹¹⁸ R. M. Alonso-Salces, E. Korta, A. Barranco, L. A. Berrueta et al., "Determination of polyphenolic profiles of Basque cider apple varieties using accelerated solvent extraction", *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 3761.
- ¹¹⁹ R. M. Alonso-Salces, E. Korta, A. Barranco, L. A. Berrueta et al., "Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple", *J. Chromatogr. A*, 2001, **933**, 37.
- ¹²⁰ J. Gonzalez-Rodriguez, P. Perez-Juan, M.D.L. de Castro, "Superheated liquids for extraction of solid residues from winemaking processes", *Anal. & Bioanal. Chem.*, 2003, **377**, 1190.
- ¹²¹ J. Gonzalez-Rodriguez, P. Perez-Juan, M.D.L. de Castro, "Use of superheated liquids for the extraction of non-volatile compounds from wood: liquid chromatography studies", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1038**, 3.
- ¹²² J. Gonzalez-Rodriguez, P. Perez-Juan, M.D.L. de Castro, "Extraction of wood compounds by use of subcritical fluids", *Chromatographia*, 2003, **57**, 363.
- ¹²³ Z.Y. Ju, L.R. Howard, "Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 5207.
- ¹²⁴ R.B. Lo Curto, M.M. Tripodo, "Yeast production from virgin grape marc", *Bioresource Technol.*, 2001, **78**, 5.

- ¹²⁵ M. Pinelo, P. Del Fabbro, L. Manzocco, M.J. Nuñez et al., "Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts", *Food Chem.*, 2005, **92**, 109.
- ¹²⁶ C. Mantell, M. Rodríguez, E. Martínez de la Ossa, "Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modelling", *Chemical Engineer. Sci.*, 2002, **57**, 3831.
- ¹²⁷ S. González-Manzano, J.C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, "Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 283.
- ¹²⁸ R. Serra, C. Mendonça, L. Abrunhosa, A. Pietri et al., "Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 41.
- ¹²⁹ G. González-Neves, D. Charamelo, J. Balado, L. Barreiro et al., "Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 191.
- ¹³⁰ G. González-Neves, L. Barreiro, G. Gil, J. Franco et al., "Anthocyanic composition of Tannat grapes from the south region of Uruguay", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 197.
- ¹³¹ O. Muñoz, M. Sepúlveda, M. Schwartz, "Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from Chilean wine", *Food Chem.*, 2004, **87**, 487.
- ¹³² A. I. Romero-Perez, R.M. Lamuela-Raventos, C. Andres-Lacueva, M.C. de la Torre-Boronat, "Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content", *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 210.
- ¹³³ T. Watanabe, A. Yamamoto, S. Nagai, S. Terabe, "Micellar electrokinetic chromatography as an alternative to high-performance liquid chromatography for separation and determination of phenolic compounds in Japanese spirituous liquor", *J. Chromatogr. A*, 1998, **793**, 409.
- ¹³⁴ A. Baldi, A. Romani, N. Mulinnaci, F. F. Vincieri et al., "HPLC/MS application to anthocyanins of *vitis-vinifera* L", *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 2104.
- ¹³⁵ K. R. Markham, *Techniques of Flavonoids Identification*, Academic Press, Londres, 1982.
- ¹³⁶ J. Greenham, C. Williams, J.B. Harborne, "Identification of lipophilic flavonols by a combination of chromatographic and spectral techniques" *Phytochem. Anal.*, 1995, **6**, 211.
- ¹³⁷ M. Gomez-Minguez, F.J. Heredia, "Effect of the Maceration Technique on the Relationships between Anthocyanin Composition and Objective Color of Syrah Wines", *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 5117.
- ¹³⁸ D.A. Guillen, C.G. Barroso, J.A. Perez-Bustamante, *Quim. Anal.*, 1997, **16**, 21.
- ¹³⁹ M.C. Galvez, C.G. Barroso, J.A. Perez-Bustamante, "Analysis of polyphenolic compounds of different vinegar samples", *Zeitsch. Lebensm. Untersf. Forsch.*, 1994, **199**, 29.
- ¹⁴⁰ C.G. Barroso, M.C. Rodriguez, D.A. Guillen, J.A. Perez-Bustamante, "Analysis of low molecular mass phenolic compounds, furfural and 5-hydroxymethylfurfural in Brandy de Jerez by high-performance liquid chromatography-diode array detection with direct injection", *J. Chromatogr. A*, 1996, **724**, 125.
- ¹⁴¹ L. J. Perez-Prieto, M.L. De la Hera-Orts, J.M. Lopez-Roca, J.I. Fernandez-Fernandez et al., "Oak-matured wines: influence of the characteristics of the barrel on wine colour and sensory characteristics", *J. Sci. Food & Agric.*, 2003, **83**, 1445.
- ¹⁴² M. A. Pozo-Bayon, M.T. Hernandez, P.J. Martin-Alvarez, M.C. Polo, "Study of Low Molecular Weight Phenolic Compounds during the Aging of Sparkling Wines Manufactured with Red and White Grape Varieties", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 2089.
- ¹⁴³ M. D. Sanza, I.N. Dominguez, S.G. Merino, "Influence of different aging systems and oak woods on aged wine color and anthocyanin composition", *Europ. Food Res. & Technol.*, 2004, **219**, 124.
- ¹⁴⁴ M. D. Sanza, I.N. Dominguez, L.M.C. Carcel, L.N. Gracia, "Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 229.

- ¹⁴⁵ B. F. De Simon, T. Hernandez, E. Cadahia, E. Dueñas et al., "Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood", *Europ. Food Res. & Technol.*, 2003, **216**, 150.
- ¹⁴⁶ D. A. Guillén, C. G. Barroso, J.A. Perez-Bustamante, "Selection of column and gradient for the separation of polyphenols in sherry wine by high-performance liquid chromatography incorporating internal standards", *J. Chromatogr. A*, 1996, **724**, 117.
- ¹⁴⁷ L. J. Kosir, B. Lapornik, S. Andersek, A.G. Wondra et al., "Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 277.
- ¹⁴⁸ M. Monagas, V. Nunez, B. Bartolome, C. Gomez-Cordoves, "Anthocyanin-derived pigments in Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon wines produced in Spain", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 2003, **54**, 163.
- ¹⁴⁹ E. Revilla, E. Garcia-Beneytez, F. Cabello, G. Martin-Ortega et al., "Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them", *J. Chromatogr. A*, 2001, **915**, 53.
- ¹⁵⁰ M. Chamka, B. Cathala, W. Cheynier, R. Douillard, "Phenolic composition of champagnes from Chardonnay and Pinot Noir vintages", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 3179.
- ¹⁵¹ M. Ibern-Gomez, C. Andres-Lacueva, R.M. Lamuela-Raventos, A.L. Waterhouse, "Rapid HPLC analysis of phenolic compounds in red wines", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 2002, **53**, 218.
- ¹⁵² R. S. Faustino, S. Sobrattee, A.L. Edel, G.N. Pierce, "Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American Merlot red wines", *Molecular & Cellular Biochem.*, 2003, **249**, 11.
- ¹⁵³ M.V.G. Moreno, C.G. Barroso, "Comparison of the evolution of low molecular weight phenolic compounds in typical Sherry wines: Fino, Amontillado, and Oloroso", *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 7556.
- ¹⁵⁴ L. R. Silva, P.B. Andrade, P. Valentao, R.M. Seabra et al., "Analysis of non-coloured phenolics in red wine: Effect of Dekkera bruxellensis yeast", *Food Chem.*, 2005, **89**, 185.
- ¹⁵⁵ M. A. Pozo-Bayon, M.C. Polo, P.J. Martin Alvarez, E. Pueyo, "Effect of vineyard yield on the composition of sparkling wines produced from the grape cultivar Parellada", *Food Chem.*, 2004, **86**, 413.
- ¹⁵⁶ P. Benitez, R. Castro, C.G. Barroso, "Changes in the polyphenolic and volatile contents of "Fino" sherry wine exposed to ultraviolet and visible radiation during storage", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 6482.
- ¹⁵⁷ A. M. Alonso, D. A. Guillen, C.G. Barroso, "Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content", *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 5832.
- ¹⁵⁸ Z. Kerem, B.A. Bravdo, O. Shoseyov, Y. Tugendhaft, "Rapid liquid chromatography-ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1052**, 211.
- ¹⁵⁹ E. Revilla, J.M. Ryan, "Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation", *J. Chromatogr. A*, 2000, **881**, 461.
- ¹⁶⁰ M. Monagas, C. Gomez-Cordoves, B. Bartolome, O. Laureano et al., "Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from Vitis vinifera L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 6475.
- ¹⁶¹ M. Careri, C. Corradini, L. Elviri, I. Nicoletti et al., "Direct HPLC analysis of quercetin and trans-Resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts", *J. Agric. & Food Chem.*, 2003, **51**, 5226.

- ¹⁶² A. Roldan, V. Palacios, I. Caro, L. Perez, "Resveratrol content of Palomino fino grapes: influence of vintage and fungal infection", *J. Agric. & Food Chem.*, 2003, **51**, 1464.
- ¹⁶³ N. Ratola, J.L. Faria, A. Alves, "Analysis and quantification of trans-resveratrol in wines from Alentejo region (Portugal)", *Food Technol. & Biotechnol.*, 2004, **42**, 125.
- ¹⁶⁴ I. Kolouchova-Hanzlikova, K. Melzoch, V. Filip, J. Smidrkal, "Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines", *Food Chem.*, 2004, **87**, 151.
- ¹⁶⁵ X. Vitrac, J.P. Monti, J. Vercauteren, G. Deffieux et al., "Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection", *Anal. Chim. Acta*, 2002, **458**, 103.
- ¹⁶⁶ S. Hjertén, J-L. Liao, R. Zhang, "High-performance liquid-chromatography on continuous polymer beds", *J. Chromatogr. A*, 1989, **473**, 273.
- ¹⁶⁷ M. Castellari, E. Sartini, A. Fabiani, G. Arfelli et al., "Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column", *J. Chromatogr. A*, 2002, **973**, 221.
- ¹⁶⁸ S. Perez-Magariño, I. Revilla, M.L. Gonzalez-SanJose, S. Beltran, "Various applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds", *J. Chromatogr. A*, 1999, **847**, 75.
- ¹⁶⁹ A. M. A. Borbalan, L. Zorro, D.A. Guillen, C.G. Barroso, "Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power", *J. Chromatogr. A*, 2003, **1012**, 31.
- ¹⁷⁰ B. Baderschneider, P. Winterhalter, "Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity", *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 2788.
- ¹⁷¹ A. Heier, W. Blaas, A. Dross, R. Wittkowski, "Anthocyanin analysis by HPLC/ESI-MS", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 2002, **53**, 78.
- ¹⁷² E. Garcia Beneytez, F. Cabello, E. Revilla, "Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS", *J. Agric. & Food Chem.*, 2003, **51**, 5622.
- ¹⁷³ I. Revilla, S. Perez-Magariño, M.L. Gonzalez-SanJose, S. Beltran, "Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection", *J. Chromatogr. A*, 1999, **847**, 83.
- ¹⁷⁴ G. Stecher, C.W. Huck, M. Popp, G.K. Bonn, "Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, **371**, 73.
- ¹⁷⁵ W.X. Sun, J.M. Miller, "Tandem mass spectrometry of the B-type procyanidins in wine and B-type dehydrodiccatechins in an autoxidation mixture of (+)-catechin and (-)-epicatechin", *J. Mass Spectrom.*, 2003, **38**, 438.
- ¹⁷⁶ M. Careri, C. Corradini, L. Elviri, I. Nicoletti et al., "Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of cis-Resveratrol and trans-Resveratrol: Development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking byproducts", *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 6868.
- ¹⁷⁷ E.G. Yanes, S.R. Gratz, A.M. Stalcup, "Tetraethylammonium tetrafluoroborate: a novel electrolyte with a unique role in the capillary electrophoretic separation of polyphenols found in grape seed extracts", *Analyst*, 2000, **125**, 1919.
- ¹⁷⁸ A. Panossian, G. Mamikonyan, M. Torosyan, E. Gabrielyan et al., "Analysis of aromatic aldehydes in brandy and wine by high-performance capillary electrophoresis", *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 4379.
- ¹⁷⁹ M. Scampicchio, J.Wang, S. Mannino, M.P. Chatrathi, "Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection for rapid separation and detection of phenolic acids", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1049**, 189.

- ¹⁸⁰ L.Y. Gao, Q.C. Chu, J.N. Ye, "Determination of trans-Resveratrol in wines, herbs and health food by capillary electrophoresis with electrochemical detection", *Food Chem.*, 2002, **78**, 255.
- ¹⁸¹ Z. Demianova, H. Siren, R. Kuldvee, M.L. Riekkola, "Nonaqueous capillary electrophoretic separation of polyphenolic compounds in wine using coated capillaries at high pH in methanol", *Electrophoresis*, 2003, **24**, 4264.
- ¹⁸² Y.Y. Peng, Q.C. Chu, F.H. Liu, J.N. Ye, "Determination of phenolic constituents of biological interest in red wine by capillary electrophoresis with electrochemical detection", *J. Agric. & Food Chem.*, **52**, 153.
- ¹⁸³ R. Saenz-Lopez, P. Fernandez-Zurbano, M.T. Tena, "Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1052**, 191.
- ¹⁸⁴ L. Arce, M.T. Tena, A. Rios, M. Valcarcel, "Determination of trans-resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow sample clean-up system followed by capillary electrophoresis separation", *Anal. Chim. Acta*, 1998, **359**, 27.
- ¹⁸⁵ R. C. Minussi, M. Rossi, L. Bologna, L. Cordi et al., "Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines", *Food Chem.*, 2003, **82**, 409.
- ¹⁸⁶ P. B. Andrade, B.M. Oliveira, R.M. Seabra, M.A. Ferreira et al., "Analysis of phenolic compounds in Spanish Albarino and Portuguese Alvarinho and Loureiro wines by capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography", *Electrophoresis*, 2001, **22**, 1568.
- ¹⁸⁷ Y. H. Cao, X. Zhang, Y.Z. Fang, J.N. Ye, "Determination of phenolic compounds in red wine by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection", *Chem. J. Chinese Universities-Chinese*, 2001, **22**, 2011.
- ¹⁸⁸ R. Hamoudova, M. Urbanek, M. Pospisilova, M. Polasek, "Assay of phenolic compounds in red wine by on-line combination of capillary isotachopheresis with capillary zone electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1032**, 281.
- ¹⁸⁹ R. Saenz-Lopez, P. Fernandez-Zurbano, M.T. Tena, "Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the quantitative determination of anthocyanins in wine", *J. Chromatogr. A*, 2003, **990**, 247.
- ¹⁹⁰ D. Calvo, R. Saenz-Lopez, P. Fernandez-Zurbano, M.T. Tena, "Migration order of wine anthocyanins in capillary zone electrophoresis", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **524**, 207.
- ¹⁹¹ R. Saenz-Lopez, P. Fernandez-Zurbano, M.T. Tena, "Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1052**, 191.
- ¹⁹² P. Pietta, C. Gardana, P. Mauri, "Application of HPLC and MECC for the detection of flavonol aglycones in plant-extracts", *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1992, **15**, 136.
- ¹⁹³ P. F. Cancelon, "Capillary electrophoresis - a useful technique for food analysis", *Food Technol.*, 1995, **49**, 52.
- ¹⁹⁴ P. Morin, J. C. Archambault, P. André, M. Dreux et al., "Separation of hydroxylated and methoxylated flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography: Determination of analyte partition coefficients between aqueous and sodium dodecyl sulfate micellar phases", *J. Chromatogr. A*, 1997, **791**, 289.
- ¹⁹⁵ G. Vanhoenacker, A. De Villiers, K. Lazou, D. De Keukeleire et al., "Comparison of high-performance liquid chromatography - mass spectroscopy and capillary electrophoresis - mass spectroscopy for the analysis of phenolic compounds in diethyl ether extracts of red wines", *Chromatographia*, 2001, **54**, 309.
- ¹⁹⁶ P. Ribereau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubordieu, *Handbook of Enology*, Vol. 2, 2004, Ed. Wiley & Sons LTD, England.

- ¹⁹⁷ C. Bayonove, en *Les Acquisitions Récentes en Chromatographie du Vin*, 1993, ed. B. Donèche, Lavoisier, Paris.
- ¹⁹⁸ C. R. Strauss, B. Wilson, P.R. Gooley, P.J. Williams, "Role of monoterpenes in grape and wine flavor", *ACS Symposium Series*, 1986, **317**, 222.
- ¹⁹⁹ C. R. Strauss, B. Wilson, P.J. Williams, "Novel monoterpene diols and diol glycosides in *Vitis vinifera* grapes", *J. Agric. Food Chem.*, 1988, **36**, 569.
- ²⁰⁰ P. J. Williams, C. R. Strauss, B. Wilson, "Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of muscat grapes", *J. Agric. Food Chem.*, 1980, **28**, 766.
- ²⁰¹ J. M. Boidron, P. Torres, *Bull. I. Tech. PO*, 1982, **105**, 107.
- ²⁰² A. Rapp, H. Mandery, H. Niebergall, "New monoterpenediols in grape must and wine and in cultures of botrytis-cinerea" *Vitis*, 1986, **25**, 79.
- ²⁰³ C. Bayonove, R. Cordonnier, P. Dubois, "Study of an aromatic characteristic fraction of Cabernet Sauvignon grape variety, identification of 2-methoxy-3-isobutyl-pyrazine", *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1975, **281**, 75.
- ²⁰⁴ M. S. Allen, M. J. Lacey, S. J. Boyd, *Biotechnology for Improved Foods & Flavours*, 1996, Ed. Gary R. Takeoka, Roy Teranishi, Patrick J. Williams, and Akio Kobayashi, ACS Symposium Series 637, p220.
- ²⁰⁵ M. J. Lacey, M. S. Allen, R.L.N. Harris, W. V. Brown, "Methoxypyrazines in Sauvignon Blanc grapes and wines", *Am. J. Enol. Vitic.*, 1991, **42**, 103.
- ²⁰⁶ D. R. de Boubée, C. Van Leeuwen, D. Dubordieu, "Organoleptic Impact of 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine on Red Bordeaux and Loire Wines. Effect of Environmental Conditions on Concentrations in Grapes during Ripening", *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 4830.
- ²⁰⁷ K. Hashizume, T. Samuta, "Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1999, **50**, 194.
- ²⁰⁸ K. Hashizume, T. Samuta, "Green odorants of grape cluster stem and their ability to cause a wine stemmy flavor", *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 1333.
- ²⁰⁹ R. Baumes, J. Wirth, S. Bureau, Y. Gunata et al., "Biogenesis of C-13-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines", *Anal. Chim. Acta*, 2002, **458**, 3.
- ²¹⁰ M. A. Sefton, I.L. Francis, P.J. Williams, "The volatile composition of Chardonnay juices - a study by flavor precursor analysis", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1993, **44**, 359.
- ²¹¹ P. Winterhalter, "Oxygenated c-13-norisoprenoids - important flavor precursors", *ACS Symposium Series*, 1992, **490**, 98.
- ²¹² C. Oliveira, A.C. Ferreira, P. Costa, J. Guerra et al., "Effect of some viticultural parameters on the grape carotenoid profile", *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 4178.
- ²¹³ R. Di Stefano, "Advances in the study of secondary metabolites occurring in grapes and wines", *Drugs Under Experim. & Clinic. Res.*, 1999, **25**, 53.
- ²¹⁴ B. Wilson, C.R. Strauss, P.J. Williams, "Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing muscat grapes", *J. Agric. Food Chem.*, 1984, **32**, 919.
- ²¹⁵ S. K. Park, J.C. Morrison, D.O. Adams, A. C. Noble, "Distribution of free and glycosidically bound monoterpenes in the skin and mesocarp of Muscat of Alexandria grapes during development", *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 514.
- ²¹⁶ R. Di Stefano, G. Maggiorotto, *Rev. Fr. OEnologie Ed.*, 1993, Symposium International on Connaissance Aromatique des Cépages et Qualité des Vins.
- ²¹⁷ Z. Günata, S. Bitteur, J.-M. Brillouet, C. Bayonove et al., "Sequential enzymic-hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape", *Carbohydr. Res.*, 1988, **184**, 139.

- ²¹⁸ C.R. Strauss, E. Dimitriadis, B. Wilson, P.J. Williams, "Studies on the hydrolysis of two megastigma-3,6,9-triols rationalizing the origins of some volatile C13 norisoprenoids of *Vitis vinifera* grapes", *J. Agric. Food Chem.*, 1986, **34**, 145.
- ²¹⁹ S. Voirin, R. Baumes, S. Bitteur, Z. Günata et al., "Purification and some properties of an alpha-l-arabinofuranosidase from *aspergillus-niger* - action on grape monoterpenyl arabinofuranosylglucosides", *J. Agric. Food Chem.*, 1990, **38**, 772.
- ²²⁰ P. Winterhalter, *Biotechnology for Improved Foods & Flavors*, 1996, Ed. Gary R. Takeoka, Roy Teranishi, Patrick J. Williams, and Akio Kobayashi, ACS Symposium Series 637, p. 295.
- ²²¹ A. Razungles, C. Bayonove, R. Cordonnier, J.C. Sapis, "Grape carotenoids - changes during the maturation period and localization in mature berries", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1988, **39**, 44.
- ²²² A. Razungles, Z. Günata, S. Pinatel, R. Baumes et al., "Quantitative studies on terpenes, norisoprenoides and their precursors in several varieties of grapes", *Sci. Aliments*, 1993, **13**, 59.
- ²²³ A. J. Razungles, R.L. Baumes, C. Dufour, C.N. Sznaper et al., "Effect of sun exposure on carotenoids and C-13-norisoprenoid glycosides in Syrah berries (*Vitis vinifera* L.)", *Sciences des Aliments*, 1998, **18**, 361.
- ²²⁴ C. C. Steel, M. Keller, "Influence of UV-B irradiation on the carotenoid content of *Vitis vinifera* tissues", *Biochem. Soc. Transactions*, 2000, **28**, 883.
- ²²⁵ G. K. Skouroumounis, R. A. Masy-Westropp, M. A. Sefton, P.J. Williams, "Precursors of damascenone in fruit juices", *Tetrah. Letters*, 1992, **33**, 3533.
- ²²⁶ G. K. Skouroumounis, P. Winterhalter, "Glycosidically Bound Norisoprenoids from *Vitis vinifera* cv. Riesling Leaves", *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1068.
- ²²⁷ P.G. de Pinho, A.C.S. Ferreira, M.M. Pinto, J.G. Benitez et al., "Determination of Carotenoid Profiles in Grapes, Musts, and Fortified Wines from Douro Varieties of *Vitis vinifera*", *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 5484.
- ²²⁸ P. J. Williams, M. A. Sefton, I.L. Francis, "Glycosidic precursors of varietal grape and wine flavor", *ACS Symposium Series*, 1992, **490**, 74.
- ²²⁹ T. Tominaga, C.P. des Gachons, D. Dubordieu, "A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-cysteine conjugates", *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 5215.
- ²³⁰ M. L. Murat, T. Tominaga, D. Dubordieu, "Assessing the aromatic potential of Cabernet Sauvignon and Merlot musts used to produce rose wine by assaying the cysteinylated precursor of 3-mercaptohexan-1-ol", *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 5412.
- ²³¹ Ph. Darriet, T. Tominaga, V. Lavigne, J.-N. Boidron, D. Dubordieu, "Evidence of the presence of a 4-mercapto-4-methylpentan-2-one precursor in vitis-vinifera sauvignon blanc grape variety", *C.R. Acad. Sci Paris*, 1993, **316**, 1332.
- ²³² T. Tominaga, I. Masneuf, D. Dubordieu, *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 1995, **29**, 227.
- ²³³ C. P. des Gachons, T. Tominaga, D. Dubordieu, "Localization of S-cysteine conjugates in the berry: Effect of skin contact on aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc must", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 2002, **53**, 144.
- ²³⁴ B. W. Zoecklein, T. K. Wolf, S.E. Duncan, J.E. Marcy et al., "Effect of fruit zone leaf removal on total glycoconjugates and conjugate fraction concentration of Riesling and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) grapes", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1998, **49**, 259.
- ²³⁵ S. M. Bureau, R.L. Baumes, A.J. Razungles, "Effects of vine or bunch shading on the glycosylated flavor precursors in grapes of *Vitis vinifera* L. Cv. Syrah", *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 1290.
- ²³⁶ S. M. Bureau, A.J. Razungles, R.L. Baumes, "The aroma of Muscat of Frontignan grapes: effect of the light environment of vine or bunch on volatiles and glycoconjugates", *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 2012.

- ²³⁷ A. Belancic, E. Agosin, A. Ibacache, E. Bordeu et al., "Influence of sun exposure on the aromatic composition of Chilean Muscat grape cultivars Moscatel de Alejandria and Moscatel rosada", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1997, **48**, 181.
- ²³⁸ C. Sala, O. Busto, J. Guasch, F. Zamora, "Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from the *Vitis vinifera* variety Cabernet Sauvignon", *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 3492.
- ²³⁹ J. M. Escalona, J. Flexas, H.R. Schultz, H. Medrano, "Contribution of different levels of plant canopy to total carbon assimilation and intrinsic water use efficiency of Manto Negro and Tempranillo grapevines", *Acta Hort.*, 1999, **493**, 261.
- ²⁴⁰ N. Dirninger, D. Duc, C. Schneider, V. Dumas et al., "Wine quality and "terroirs": Influence of environmental characteristics on the gewurztraminer flavor profile", *Sci. des Aliments*, 1998, **18**, 193.
- ²⁴¹ C. Aubert, R. Baumes, Z. Günata, J-P. Lepoutre et al., "Effects of sterol biosynthesis inhibiting fungicides on the aroma of grape", *Sci. des Aliments*, 1998, **18**, 41.
- ²⁴² S. Bitteur, C. Tesniere, A. Fauconnet, C. Bayonove et al., "Carbonic anaerobiosis of Muscat grape .2. Changes in the distribution of free and bound terpenols", *Sci. des Aliments*, 1996, **16**, 37.
- ²⁴³ E. Sánchez-Palomo, M.C. Diaz-Maroto, M. S. Perez-Coello, M.A Gonzalez-Viñas et al., *II Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 2003, pág. 319.
- ²⁴⁴ B. W. Zoecklein, J.E. Marcy, J.M. Williams, Y. Jasinsky, "Effect of native yeasts and selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* on glycosyl glucose, potential volatile terpenes, and selected aglycones of white Riesling (*Vitis vinifera*L.) wines", *J. Food Compos. & Anal.*, 1997, **10**, 55.
- ²⁴⁵ B. W. Zoecklein, Y. Jasinsky, H. McMahan, "Effect of Fermentation, Aging, and Agingsur Leon Total and Phenol-Free Riesling (*Vitis vinifera*L.) Glycosides", *J. Food Compos. & Anal.*, 1998, **11**, 240.
- ²⁴⁶ L. Castro Vazquez, M.S. Perez-Coello, M.D. Cabezudo, "Effects of enzyme treatment and skin extraction on varietal volatiles in Spanish wines made from Chardonnay, Muscat, Airén, and Macabeo grapes", *Anal. Chim. Acta*, 2002, **458**, 39.
- ²⁴⁷ S. Selli, A. Canbas, T. Cabaroglu, H. Erten, et al., "Effect of skin contact on the aroma composition of the musts of *Vitis vinifera* L. cv. Muscat of Bornova and Narince grown in Turkey", *Food Control*, 2003, **81**, 341.
- ²⁴⁸ K. L. Wilker, M.R. Dharmadhikari, J.C. Goin, "Effect of sweetening treatments on white wine aroma and composition", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 2004, **55**, 168.
- ²⁴⁹ P. Hernández-Orte, M.J. Ibarz, J. Cacho, V. Ferreira, "Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine", *Food Chem.*, 2005, **89**, 163.
- ²⁵⁰ A. Sides, K. Robards, S. Helliwell, "Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods", *Trends Anal. Chem*, 2000, **19**, 322.
- ²⁵¹ F. Augusto, A. L. Lopes, C. A. Zini, "Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances", *Trends Anal. Chem.*, 2003, **22**, 160.
- ²⁵² R. G. Buttery, L.C. Ling, "Additional studies on flavor components of corn tortilla chips", *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 2764.
- ²⁵³ Y. Kotseridis, R. Baumes, "Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine", *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 400.
- ²⁵⁴ J. Kesselmeier, M. Staudt, "Biogenic volatile organic compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology", *J. Atmos. Chem.*, 1999, **33**, 23.
- ²⁵⁵ S. E. Ebeler, "Analytical chemistry: Unlocking the secrets of wine flavor", *Food Rev. Intern.*, 2001, **17**, 45.

- ²⁵⁶ I. Zabetakis, M.A. Holden, "Strawberry flavour: Analysis and biosynthesis", *J. Sci. Food Agric.*, 1997, **74**, 421.
- ²⁵⁷ E. Dimitriadis, P.J. Williams, "The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavorants of grapes", *Am.J. Enol. & Vitic.*, 1984, **35**, 66.
- ²⁵⁸ B. Girard, L. Fukumoto, G. Mazza, P. Delaquis et al., "Volatile terpene constituents in maturing Gewurztraminer grapes from British Columbia", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 2002, **53**, 99.
- ²⁵⁹ G. P. Blanch, G. Reglero, M. Herraiz, "Rapid extraction of wine aroma compounds using a new simultaneous distillation solvent extraction device", *Food Chem.*, 1996, **56**, 439.
- ²⁶⁰ P. Winterhalter, M. A. Sefton, P.J. Williams, "Volatile c-13-norisoprenoid compounds in riesling wine are generated from multiple precursors", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1990, **41**, 277.
- ²⁶¹ P. Farkas, J. Sadecka, M. Kovac, B. Siegmund et al., "Key odourants of pressure-cooked hen meat", *Food Chem.*, 1997, **60**, 617.
- ²⁶² R. J. Stevenson, X. D. Chen, O.E. Mills, "Modern analyses and binding studies of flavour volatiles with particular reference to dairy protein products", *Food Res. Int.*, 1996, **29**, 265.
- ²⁶³ P. Bouchilloux, P. Darriet, R. Henry, V. Lavigne-Cruege et al., "Identification of volatile and powerful odorous thiols in Bordeaux red wine varieties", *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 3095.
- ²⁶⁴ P. J. Hardy, "Extraction and concentration of volatiles from dilute aqueous and aqueous-alcoholic solution using trichlorofluoromethane", *J. Agric. Food Chem.*, 1969, **17**, 656.
- ²⁶⁵ Y. W. Zhou, R. Riesen, C.S. Gilpin, "Comparison of Amberlite XAD-2/Freon 11 extraction with liquid/liquid extraction for the determination of wine flavor components", *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 818.
- ²⁶⁶ S. E. Ebeler, M.B. Tercien, C.E. Butzke, "Analysis of brandy aroma by solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction", *J. Sci. Food & Agric.*, 2000, **80**, 625.
- ²⁶⁷ E. Miklószy, Z. Kerényi, "Comparison of the volatile aroma components in noble rotted grape berries from two different locations of the Tokaj wine district in Hungary", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 177.
- ²⁶⁸ E. F. López, E. F. Gómez, "Comparison of solvents for determination of monoterpenes in wine using liquid-liquid extraction", *Chromatographia*, 2000, **52**, 798.
- ²⁶⁹ Y. Kotseridis, R.L. Baumes, G.K. Skouroumounis, "Quantitative determination of free and hydrolytically liberated beta-damascenone in red grapes and wines using a stable isotope dilution assay", *J. Chromatogr. A*, 1999, **849**, 245.
- ²⁷⁰ Y. Kotseridis, A. Anocibar Beloqui, A. Bertrand, J.P. Doazan, "An analytical method for studying the volatile compounds of Merlot noir clone wines", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1998, **49**, 44.
- ²⁷¹ S. Rocha, P. Coutinho, A. Barros, M. A. Coimbra et al., "Aroma potential of two Bairrada white grape varieties: Maria Gomes and Bical", *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 4802.
- ²⁷² S. M. Rocha, F. Rodrigues, P. Coutinho, I. Delgadillo et al., "Volatile composition of Baga red wine assessment of the identification of the would-be impact odourants", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 257.
- ²⁷³ J. S. Camara, J.C. Marques, M.A. Alves, A.C.S. Ferreira, "3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone levels in fortified Madeira wines: relationship to sugar content", *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 6765.
- ²⁷⁴ M. Ortega-Heras, M.L. Gonzalez-SanJosé, S. Beltrán, "Aroma composition of wine studied by different extraction methods", *Anal. Chim. Acta*, 2002, **458**, 85.
- ²⁷⁵ R. Schneider, R. Baumes, C. Bayonove, A. Razungles, "Volatile compounds involved in the aroma of sweet fortified wines (Vins Doux Naturels) from Grenache Noir", *J. Agric Food Chem.*, 1998, **46**, 3230.
- ²⁷⁶ S. Selli, T. Cabaroglu, A. Canbas, H. Erten et al., "Volatile composition of red wine from cv. Kalecik Karasi grown in central Anatolia", *Food Chem.*, 2004, **85**, 207.
- ²⁷⁷ A. Mallouchos, P. Skandamis, P. Loukatos, M. Komaitis et al., "Volatile compounds of wines produced by cells immobilized on grape skins", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 3060.

- ²⁷⁸ E. M. Díaz-Plaza, J. R. Reyero, F. Pardo, M.R. Salinas, "Comparison of wine aromas with different tannic content aged in French oak barrels", *Anal. Chim. Acta*, 2002, **458**, 139.
- ²⁷⁹ M. L. Morales, B. Benítez, A.M. Troncoso, "Accelerated aging of wine vinegars with oak chips: evaluation of wood flavour compounds", *Food Chem.*, 2004, **88**, 305.
- ²⁸⁰ R. Castro, R. Natera, P. Benitez, C.G. Barroso, "Comparative analysis of volatile compounds of 'fino' sherry wine by rotatory and continuous liquid-liquid extraction and solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography-mass spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 141.
- ²⁸¹ L. J. Perez-Prieto, J. M. Lopez-Roca, A. Martinez-Cutillas, F.P. Minués et al., "Maturing wines in oak barrels. Effects of origin, volume, and age of the barrel on the wine volatile composition", *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 3272.
- ²⁸² D. S. Pedersen, D. L. Capone, G.K. Skouroumounis, A.P. Pollnitz et al., "Quantitative analysis of geraniol, nerol, linalool, and alpha-terpineol in wine", *Anal. & Bioanal. Chem.*, 2003, **375**, 517.
- ²⁸³ M. Mestres, M.P. Marti, O. Busto, J. Guasch, "Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma", *J. Chromatogr. A*, 2000, **881**, 569.
- ²⁸⁴ C-Y Tai, C-T Ho, "Influence of cysteine oxidation on thermal formation of maillard aromas", *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 3856.
- ²⁸⁵ T. Tominaga, P. Daniel, D. Dubordieu, "Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor", *Vitis*, 1996, **35**, 207.
- ²⁸⁶ H. Guth, "Identification of character impact odorants of different white wine varieties", *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 3022.
- ²⁸⁷ T. Cabaroglu, A. Canbas, "The effect of skin contact on the aromatic composition of the white wine of *Vitis vinifera* L. cv. Muscat of Alexandria grown in Southern Anatolia", *Acta Alimentaria*, 2002, **31**, 45.
- ²⁸⁸ A. L. Morales, C. Duque, "Free and glycosidically bound volatiles in the mammee apple (*Mammea americana*) fruit", *Europ. Food Res. & Technol.*, 2002, **215**, 221.
- ²⁸⁹ G. Versini, I. Orriols, A.D. Serra, "Aroma components of galician Albarino, Loureira and Godello wines", *Vitis*, 1994, **33**, 165.
- ²⁹⁰ V. Ferreira, L. Ortega, A. Escudero, J.F. Cacho, "A comparative study of the ability of different solvents and adsorbents to extract aroma compounds from alcoholic beverages", *J. Chromatogr. Sci.*, 2000, **38**, 469.
- ²⁹¹ M. A. Sefton, G.K. Skouroumounis, R. A. Massy-Westropp, P.J. Williams, "Norisoprenoids in vitis-vinifera white wine grapes and the identification of a precursor of damascenone in these fruits", *Aust. J. Chem.*, 1989, **42**, 2071.
- ²⁹² J. J. Mateo, N. Gentilini, T. Huerta, M. Jiménez et al., "Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine", *J. Chromatogr. A*, 1997, **778**, 219.
- ²⁹³ R. L. Baumes, C.C. Aubert, Z.Y. Günata, W. De Moor et al., *J. Essent. Oil Res.*, 1994, **6**, 587.
- ²⁹⁴ S. C. Dieguez, M.L.G. de la Pena, E. F. Gomez, "Approaches to spirit aroma: contribution of some aromatic compounds to the primary aroma in samples of Orujo spirits", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 7385.
- ²⁹⁵ A. Fondvillebagnol, J. Sarris, C. Bayonove, C. Flanzzy, "Method of analysis of volatile compounds in fermenting grape berries" *Sci. des Aliments*, 1995, **15**, 359.
- ²⁹⁶ C. G. Edwards, R.B. Beelman, "Extraction and analysis of volatile compounds in white wines using Amberlite XAD-2 resin and capillary gas chromatography", *J. Agric. Food Chem.*, 1990, **38**, 216.
- ²⁹⁷ K. Wada, T. Shibamoto, "Isolation and identification of volatile compounds from a wine using solid phase extraction, gas chromatography, and gas chromatography/mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 4362.

- ²⁹⁸ L. Ortega, R. Lopez, J. Cacho, V. Ferreira, "Use of solid-liquid distribution coefficients to determine retention properties of Porapak-Q resins: Determination of optimal conditions to isolate alkyl-methoxypyrazines and beta-damascenone from wine", *J. Chromatogr. A*, 2001, **931**, 31.
- ²⁹⁹ I. Moret, "Quantitative-determination of aroma components in wine by sorbent extraction - improvement and chemometric evaluation", *Analyst*, 1995, **120**, 2561.
- ³⁰⁰ P. Karásek, J. Planeta, E.V. Ostrá, M. Mikesová et al., "Direct continuous supercritical fluid extraction as a novel method of wine analysis: Comparison with conventional indirect extraction and implications for wine variety identification", *J. Chromatogr. A*, 2003, **1002**, 13.
- ³⁰¹ S. C. Diéguez, L.D. Díaz, M.L. G. de la Pena, E.F. Gómez, "Variation of volatile organic acids in spirits during storage at low and room temperatures", *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 2002, **35**, 452.
- ³⁰² R. Lopez, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira, "Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection", *J. Chromatogr. A*, 2002, **966**, 167.
- ³⁰³ C. Domínguez, D.A. Guillén, C.G. Barroso, "Determination of volatile phenols in fino sherry wines", *Anal. Chim. Acta*, 2002, **458**, 95.
- ³⁰⁴ V. Ferreira, I. Jarauta, R. López, J. Cacho, "Quantitative determination of sotolon, maltol and free furaneol in wine by solid-phase extraction and gas chromatography-ion-trap mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 2003, **1010**, 95.
- ³⁰⁵ W. Tesfaye, M.L. Morales, B. Benítez, M.C. Garcia-Parrilla et al., "Evolution of wine vinegar composition during accelerated aging with oak chips", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 239.
- ³⁰⁶ L. Culleré, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira, "Fast fractionation of complex organic extracts by normal-phase chromatography on a solid-phase extraction polymeric sorbent: Optimization of a method to fractionate wine flavor extracts", *J. Chromatogr. A*, 2003, **1017**, 17.
- ³⁰⁷ L. Culleré, J. Cacho, V. Ferreira, "Analysis for wine C5-C8 aldehydes through the determination of their O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **524**, 201.
- ³⁰⁸ V. Ferreira, L. Culleré, R. López, J. Cacho, "Determination of important odor-active aldehydes of wine through gas chromatography-mass spectrometry of their O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge used for selective isolation", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1028**, 339.
- ³⁰⁹ J. J. Mateo, M. Jiménez, "Monoterpenes in grape juice and wines", *J. Chromatogr. A*, 2000, **881**, 557.
- ³¹⁰ S. G. Voirin, R. L. Baumes, Z.Y. Günata, S.M. Bitteur et al., "Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine : I. XAD-2 extraction and gas chromatographic-mass spectrometric determination of synthetic glycosides", *J. Chromatogr. A*, 1982, **590**, 313.
- ³¹¹ E. Dimitriadis, P.J. Williams, "The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavorants of grapes", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1984, **35**, 66.
- ³¹² P. J. Williams, W. Cynkar, I.L. Francis, J.D. Gray et al., "Quantification of glycosides in grapes, juices, and wines through a determination of glycosyl glucose", *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 121.
- ³¹³ P. G. Iland, W. Cynkar, I.L. Francis, P.J. Williams et al., "Optimisation of methods for the determination of total and red-free glycosyl glucose in black grape berries of *Vitis vinifera*", *Aust. J. Grape Wine Res.*, 1996, **2**, 171.
- ³¹⁴ B. W. Zoecklein, L.S. Douglas, Y.W. Yasinski, "Evaluation of the phenol-free glycosyl-glucose determination", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 2000, **51**, 420.
- ³¹⁵ Z. Günata, C.L. Bayonove, R.L. Baumes, R.E. Cordonnier, "The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components", *J. Chromatogr. A*, 1985, **331**, 83.

- ³¹⁶ S. G. Voirin, R. L. Baumes, J-C. Sapis, C.L. Bayonove, "Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine : II. Qualitative and quantitative determination of monoterpene glycosides in grape", *J. Chromatogr. A*, 1991, **595**, 269.
- ³¹⁷ A. Razungles, Z. Günata, S. Pinatel, R. Baumes et al., "Quantitative studies on terpenes, norisoprenoides and their precursors in several varieties of grapes", *Sci. des Aliments*, 1993, **13**, 59.
- ³¹⁸ E. Gomez, A. Martinez, J. Laencina, "Localization of free and bound aromatic-compounds among skin, juice and pulp fractions of some grape varieties", *Vitis*, 1994, **33**, 1.
- ³¹⁹ E. Lopez Tamames, N. Carro Marino, Z.Y. Günata, C. Sapis et al., "Potential aroma in several varieties of spanish grapes", *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 1729.
- ³²⁰ L. C. Lois, S.C. Dieguez, M.L.G. de la Pena, E.F. Gomez, "SPE-GC determination of aromatic compounds in two varieties of white grape during ripening", *Chromatographia*, 2001, **53**, 350.
- ³²¹ M. R. Salinas, G.L. Alonso, F. Pardo, C. Bayonove, "Free and bound volatiles of Monastrell wines", *Sci. des Aliments*, 1998, **18**, 223.
- ³²² N. C. Marino, E.L. Tamames, C.M.G. Jares, "Contribution to the study of the aromatic potential of three Muscat *Vitis vinifera* varieties: Identification of new compounds", *Food Sci. & Technol. Int.*, 1995, **1**, 105.
- ³²³ N. Carro, E. Lopez, Z.Y. Günata, R.L. Baumes et al., "Free and glycosidically bound aroma compounds in grape must of four non-floral *Vitis vinifera* varieties", *Analisis*, 1996, **24**, 254.
- ³²⁴ J. Wirth, W. F. Guo, R. Baumes, Z. Günata, "Volatile compounds released by enzymatic hydrolysis of glycoconjugates of leaves and grape berries from *Vitis vinifera* Muscat of Alexandria and Shiraz cultivars", *J. Agric. & Food Chem.*, 2001, **49**, 2917.
- ³²⁵ T. Cabaroglu, A. Canbas, Z. Günata, , "Aroma compounds of *Vitis vinifera* L. cv. Emir grown in central Anatolia" , *J. Int. des Sci. Vigne et Vin*, 2002, **36**, 213.
- ³²⁶ R. Lopez, E. Ezepeleta, I. Sanchez, J. Cacho et al., "Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry", *Food Chem.*, 2004, **88**, 95.
- ³²⁷ J. M. Oliveira, I. M. Araujo, O.M. Pereira, J. S. Maia et al., "Characterization and differentiation of five "vinhos verdes" grape varieties on the basis of monoterpene compounds", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 269.
- ³²⁸ P. J. Williams, C. R. Strauss, B. Wilson, "Use of C18 reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoid precursors from grape juice and wines", *J. Chromatogr. A*, 1982, **235**, 471.
- ³²⁹ P. J. Williams, C. R. Staruss, B. Wilson, R.A. Massy-Westropp, "Novel monoterpene disaccharide glycosides of vitis-vinifera grapes and wines", *Phytochem.*, 1982, **8**, 2013.
- ³³⁰ F. Battistutta, E. D'Andrea, C. Da Porto, V. Flocea, "Determination of monoterpenols in wine using HRGC with on-column injection", *Acta Alimentaria*, 1998, **27**, 161.
- ³³¹ I. L. Francis, M. A. Sefton, P. J. Williams, "Sensory descriptive analysis of the aroma of hydrolyzed precursor fractions from semillon, chardonnay and sauvignon blanc grape juices", *J. Sci. Food Agric.*, 1992, **59**, 511.
- ³³² M. A. Sefton, I. L. Francis, P. J. Williams, "Free and bound volatile secondary metabolites of vitis-vinifera grape cv sauvignon-blanc", *J. Food Sci.*, 1994, **59**, 142.
- ³³³ M. Fernandez-Gonzalez, R. Di Stefano, "Fractionation of glycoside aroma precursors in neutral grapes. Hydrolysis and conversion by *Saccharomyces cerevisiae*", *Lebensm.-Wiss. u-Technol.*, 2004, **37**, 467.
- ³³⁴ M. A. Sefton, I. L. Francis, P. J. Williams, "The volatile composition of chardonnay juices - a study by flavor precursor analysis", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1993, **44**, 359.

- ³³⁵ M. A. Sefton, "Hydrolytically-released volatile secondary metabolites from a juice sample of *Vitis vinifera* grape cvs Merlot and Cabernet Sauvignon", *Aust. J. Grape & Wine Res.*, 1998, **4**, 30.
- ³³⁶ S. C. Dieguez, L. C. Lois, E. F. Gomez, M.L.G. de la Peña, "Aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Albarino", *Lebensm.-Wiss. u-Technol.*, 2003, **36**, 585.
- ³³⁷ D. Chassagne, H. Alexandre, C. Massoutier, C. Salles et al., "The aroma glycosides composition of Burgundy Pinot noir must", *Vitis*, 2000, **39**, 177.
- ³³⁸ R. Schneider, F. Charrier, M. Moutounet, R. Baumes, "Rapid analysis of grape aroma glycoconjugates using Fourier-transform infrared spectrometry and chemometric techniques", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 91.
- ³³⁹ S. A. Rankin, R. W. Bodyfelt, "Solvent desorption dynamic headspace method for diacetyl and acetoin in buttermilk", *J. Food Sci.*, 1995, **60**, 1205.
- ³⁴⁰ E. Valero, E. Miranda, J.Sanz, I. Martinez-Castro, "Automatic thermal desorption in GC analysis of dairy product volatiles", *Chromatographia*, 2000, **44**, 59.
- ³⁴¹ M.E.O. Mamede, H.M.A.B. Cardillo, G.M. Pastore, "Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: Sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts", *Food Chem.*, 2005, **89**, 63.
- ³⁴² M. R. Salinas, G.L. Alonso, F.J.J. Esteban-Infantes, "Adsorption-thermal desorption gas chromatography applied to the determination of wine aromas" *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1328.
- ³⁴³ L. Rosillo, M.R. Salinas, J. Garito, G.L. Alonso, "Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis - Application to the differentiation of some *Vitis vinifera* varieties", *J. Chromatogr. A*, 1999, **847**, 155.
- ³⁴⁴ B. Girard, D. Yuksel, M. A. Cliff, P. Delaquis, A.G. Reynolds, "Vinification effects on the sensory, colour and GC profiles of Pinot noir wines from British Columbia", *Food Res. Int.*, 2001, **34**, 483.
- ³⁴⁵ M. Shimoda, T. Shibamoto, A.C.J. Noble, "Evaluation of headspace volatiles of cabernet sauvignon wines sampled by an on-column method", *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**, 1664.
- ³⁴⁶ C. Garcia-Jares, S. Garcia-Martin, R. Cela-Torrijos, "Analysis of some highly volatile compounds of wine by means of purge and cold trapping injector capillary gas chromatography. Application to the differentiation of Rias Baixas spanish white wines", *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 764.
- ³⁴⁷ X.P. Yang, T. Peppard, "Solid-phase microextraction for flavor analysis", *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1925.
- ³⁴⁸ M.E. Millar, J.D. Stuart, "Comparison of gas-sampled and SPME-sampled static headspace for the determination of volatile flavor components", *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 23.
- ³⁴⁹ W. M. Coleman, "study of the behavior of polar and nonpolar solid-phase microextraction fibers for the extraction of Maillard reaction products", *J. Chrom. Sci.*, 1997, **35**, 245.
- ³⁵⁰ A. P. Steffan, J. Pawliszyn, "Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction", *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 2187.
- ³⁵¹ Z. Zhang, J. Pawliszyn, "Headspace solid-phase microextraction", *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 1843.
- ³⁵² C. Saenz-Barrio, T. Cedron-Fernandez, "Microextraction of volatile compounds from wine samples and their determination by GC-FID. The effect of the salts and extraction solvents used", *Chromatographia*, 2000, **51**, 221.
- ³⁵³ W. Wardencki, M. Michulec, J. Curylo, "Review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis", *Int. J. Food Sci. & Technol.*, 2004, **39**, 703.
- ³⁵⁴ G. Vas, L. Gal, A. Dobo, K. Vekey, "Determination of volatile aroma compounds of Blaufrankisch wines extracted by solid-phase microextraction", *J. Chrom. Sci.*, 1998, **36**, 505.

- ³⁵⁵ M. A. Pozo-Bayon, E. Pueyo, P.J. Martin-Alvarez, M.C. Polo, "Polydimethylsiloxane solid-phase microextraction-gas chromatography method for the analysis of volatile compounds in wines - Its application to the characterization of varietal wines", *J. Chromatogr. A*, 2001, **922**, 267.
- ³⁵⁶ N. Martorell, M.P. Martí, M. Mestres, O. Busto et al., "Determination of 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol in red wines using headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography", *J. Chromatogr. A*, 2002, **975**, 349.
- ³⁵⁷ A. Guadarrama, J.A. Fernández, M. Iñiguez, J. Souto et al., "Discrimination of wine aroma using an array of conducting polymer sensors in conjunction with solid-phase micro-extraction (SPME) technique", *Sensor & Actuators B*, 2001, **77**, 401.
- ³⁵⁸ J. Beltran, F.J. López, F. Hernández, "Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis", *J. Chromatogr. A*, 2000, **885**, 389.
- ³⁵⁹ S. Insa, V. Salvadó, E. Anticó, "Development of solid-phase extraction and solid-phase microextraction methods for the determination of chlorophenols in cork macerate and wine samples", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1047**, 15.
- ³⁶⁰ D. Garcia De la Calle, M Reichenbacher, K. Danzar, C. Hurlbeck et al., "Use of solid-phase microextraction-capillary-gas chromatography (SPME-CGC) for the varietal characterization of wines by means of chemometrical methods", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1998, **360**, 784.
- ³⁶¹ M. Mestres, M. Marti, O. Busto, J. Guasch, "Simultaneous analysis of thiols, sulphides and disulphides in wine aroma by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1999, **849**, 293.
- ³⁶² M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, "Headspace solid-phase microextraction of sulphides and disulphides using Carboxen-polydimethylsiloxane fibers in the analysis of wine aroma", *J. Chromatogr. A*, 1999, **835**, 137.
- ³⁶³ R. N. Marin, R. C. Mejías, M.V.G. Moreno, C.G. Barroso et al., "Headspace solid-phase microextraction analysis of aroma compounds in vinegar - Validation study", *J. Chromatogr. A*, 2002, **967**, 261.
- ³⁶⁴ M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, "Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile sulphides and disulphides in wine aroma", *J. Chromatogr. A*, 1998, **808**, 211.
- ³⁶⁵ S. Rocha, V. Ramalheira, A. Barros, I. Delgadillo et al., "Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model", *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 5142.
- ³⁶⁶ Y. Hayasaka, E.J. Bartowsky, "Analysis of diacetyl in wine using solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 612.
- ³⁶⁷ V. Bellavia, M. Natangelo, R. Fanelli, D. Rotillo, "Analysis of benzothiazole in italian wines using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 1239.
- ³⁶⁸ B. Buszewski, M. Ligor, "Qualitative and quantitative analyses of volatile organic compounds in wines using SPME-GC", *Chemia Analityczna*, 2001, **46**, 215.
- ³⁶⁹ J. A. B. Baptista, J. F. de P. Tavares, R.C.B. Carvalho, "Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland versus Azores Islands", *Food Res. Intern.*, 2001, **34**, 345.
- ³⁷⁰ M. Begala, L. Corda, G. Podda, M.A. Fedrigo et al., "Headspace solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry in the analysis of the aroma constituents of 'Cannonau of Jerzu' wine", *Rapid Comunic. Mass. Spectrom.*, 2002, **16**, 1086.
- ³⁷¹ J. S. Camara, P. Herbert, J.C. Marques, M.A. Alves, "Varietal flavour compounds of four grape varieties producing Madeira wines", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 203.

- ³⁷² A.C.S. Ferreira, P.G. de Pinho, "Analytical method for determination of some aroma compounds on white wines by solid phase microextraction and gas chromatography", *J. Food Sci.*, 2004, **68**, 2817.
- ³⁷³ M. Bonino, R. Schellinno, C. Rizzi, R. Aigotti et al., "Aroma compounds of an Italian wine (Ruche) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS", *Food Chem.*, 2003, **80**, 125.
- ³⁷⁴ J. C. R. Demyttenaere, C. Dagher, P. Sandra, S. Kallithraka et al., "Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 2003, **985**, 233.
- ³⁷⁵ C. Sala, M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto et al., "Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres", *J. Chromatogr. A*, 2000, **880**, 93.
- ³⁷⁶ M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, "Analysis of low-volatility organic sulphur compounds in wines by solid-phase microextraction and gas chromatography", *J. Chromatogr. A*, 2000, **881**, 583.
- ³⁷⁷ M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, "Application of headspace solid-phase microextraction to the determination of sulphur compounds with low volatility in wines", *J. Chromatogr. A*, 2002, **945**, 211.
- ³⁷⁸ S. Cabredo-Pinillos, T. Cedron-Fernandez, A. Parra-Manzanares, C. Saenz-Barrio, "Determination of volatile compounds in wine by automated solid-phase microextraction and gas chromatography", *Chromatographia*, 2004, **59**, 733.
- ³⁷⁹ A. Mallouchos, M. Komaitis, A. Koutinas, M. Kallenaki, "Investigation of volatiles evolution during the alcoholic fermentation of grape must using free and immobilized cells with the help of solid phase microextraction (SPME) headspace sampling", *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 3840.
- ³⁸⁰ E. Vianna, S.E. Ebeler, "Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 589.
- ³⁸¹ B. Vallejo-Cordoba, A.F. Gonzalez-Cordova, M.C. Estrada-Montoya, "Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis", *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 5567.
- ³⁸² I. G. Roussis, I. Lambropoulos, D. Papadopoulou, "Inhibition of the decline of volatile esters and terpenols during oxidative storage of Muscat-white and Xinomavro-red wine by caffeic acid and N-acetyl-cysteine" *Food Chem.*, 2005, **in press**.
- ³⁸³ R. S. Whiton, B.W. Zoecklein, "Determination of ethyl carbamate in wine by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 2002, **53**, 60.
- ³⁸⁴ A. Martinez-Urunela, J.M. Gonzalez-Saiz, C. Pizarro, "Optimisation of the derivatisation reaction and subsequent headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chlorophenols in red wine", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1048**, 141.
- ³⁸⁵ R. Berthod, O. Flaction, U. Frey, "Fast determination of chlorophenols at the ppt level. A new analytical tool for quality control of cork stoppers?", *Chimia*, 2004, **58**, 560.
- ³⁸⁶ E. Baltussen, C.A. Cramers, P.J.F. Sendra, "Sorbptive sample preparation - a review", *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **373**, 3.
- ³⁸⁷ E. Baltussen, P. Sendra, F. David, C. Cramers, "Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles", *J. Microcol. Separat.*, 1999, **11**, 737.
- ³⁸⁸ L. Wennrich, B. Popp, J. Breuste, "Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in fruit and vegetables using subcritical water extraction combined with sorptive enrichment and CGC-MS", *Chromatographia*, 2001, **53**, 380.
- ³⁸⁹ L. Wennrich, P. Popp, G. Soller, J. Breuste, "Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in strawberries by using accelerated solvent extraction combined with sorptive enrichment and gas chromatography/mass spectrometry", *J. AOAC Int.*, 2001, **84**, 1194.

- ³⁹⁰ C. Bicchi, C. Cordero, P. Rubiolo, P. Sandra, "Stir bar sorptive extraction (SBSE) in sample preparation from heterogeneous matrices: determination of pesticide residues in pear pulp at ppb (ng/g) level", *Eur. Food Res. & Technol.*, 2003, **216**, 449.
- ³⁹¹ P. Sandra, B. Tienpont, F. David, "Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 2003, **1000**, 299.
- ³⁹² C. Bicchi, C. Cordero, C. Iori, P. Rubiolo et al., "SBSE-GC-ECD/FPD in the analysis of pesticide residues in Passiflora Alata dryander herbal teas", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 27.
- ³⁹³ J. C. R. Demyttenaere, J.S. Martinez, R. Verhe, P. Sandra et al., "Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction", *J. Chromatogr. A*, 2003, **985**, 221.
- ³⁹⁴ C. Bicchi, C. Iori, P. Rubiolo, P. Sandra, "Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE), and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted Arabica coffee and coffee brew", *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 449.
- ³⁹⁵ M. Kreck, A. Scharrer, S. Bilke, A. Mosandl, "Enantioselective analysis of monoterpene compounds in essential oils by stir bar sorptive extraction (SBSE)-enantio-MDGC-MS", *Flavour & Fragrance J.*, 2002, **17**, 32.
- ³⁹⁶ N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita et al., "Simultaneous determination of preservatives in beverages, vinegar, aqueous sauces, and quasi-drug drinks by stir-bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC-MS", *Anal. & Bioanal. Chem.*, 2002, **373**, 56.
- ³⁹⁷ F. David, B. Tienpont, P. Sandra, "Stir-bar sorptive extraction of trace organic compounds", *LC GC Europe*, 2003, **16**, 410.
- ³⁹⁸ L. Montero, P. Popp, A. Paschke, J. Pawliszyn, "Polydimethylsiloxane rod extraction, a novel technique for the determination of organic micropollutants in water samples by thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1025**, 17.
- ³⁹⁹ P. Popp, C. Bauer, A. Paschke, L. Montero, "Application of a polysiloxane-based extraction method combined with column liquid chromatography to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **504**, 307.
- ⁴⁰⁰ M. S. Garcia-Falcon, C. Perez-Lamela, J. Simal-Gandara, "Strategies for the extraction of free and bound polycyclic aromatic hydrocarbons in run-off waters rich in organic matter", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **508**, 177.
- ⁴⁰¹ J. Diez, C. Domínguez, D.A. Guillen, C.G. Barroso et al., "Optimisation of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1025**, 263.
- ⁴⁰² A. Buettner, "Investigation of potent odorants and afterodor development in two chardonnay wines using the buccal odor screening system (BOSS)", *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 2339.
- ⁴⁰³ Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor et al., "Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis", *Anal. & Bioanal. Chem.*, 2003, **375**, 948.
- ⁴⁰⁴ A. Zalacain, G.L. Alonso, C. Lorenzo, M. Iñiguez et al., "Stir bar sorptive extraction for the analysis of wine cork taint", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1033**, 173.
- ⁴⁰⁵ P. Sandra, B. Tienpont, J. Vercammen, A. Tredoux et al., "Stir bar sorptive extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine", *J. Chromatogr. A*, 2001, **928**, 117.
- ⁴⁰⁶ M. Salinas, A. Zalacain, F. Pardo, G.L. Alonso, "Stir bar sorptive extraction applied to volatile constituents evolution during Vitis vinifera ripening", *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 4821.
- ⁴⁰⁷ C. Cocito, G. Gaetano, C. Delfini, "Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasound", *Food Chem.*, 1995, **52**, 311.
- ⁴⁰⁸ D. H. Vila, J. H. Mira, R.B. Lucena, M.A.F. Recamales, "Optimization of an extraction method of aroma compounds in white wine using ultrasound", *Talanta*, 1999, **50**, 413.

- ⁴⁰⁹ E. Gomez-Plaza, R. Gil-Muñoz, J. Carreno-Espin, J.A. Fernandez-Lopez et al., "Investigation on the aroma of wines from seven clones of Monastrell grapes", *Eur. Food Res. & Technol.*, 1999, **209**, 257.
- ⁴¹⁰ I. Caldeira, R. Pereira, M.C. Clímaco, A. P. Belchior et al., "Improved method for extraction of aroma compounds in aged brandies and aqueous alcoholic wood extracts using ultrasound", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 125.
- ⁴¹¹ R. Juanola, D. Subira, V. Salvado, J.A.G. Regueiro et al., "Evaluation of an extraction method in the determination of the 2,4,6-trichloroanisole content of tainted cork", *J. Chromatogr. A*, 2002, **953**, 207.
- ⁴¹² A. Razungles, E. Tarhi, R. Baumes, Z. Günata et al., "Rapid analysis of volatile compounds of grapes and wines by microwave extraction", *Sci. des Aliments*, 1994, **14**, 725.
- ⁴¹³ S. Bureau, A. Razungles, R. Baumes, C. Bayonove, "Glycosylated flavor precursor extraction by microwaves from grape juice and grapes", *J. Food Sci.*, 1996, **61**, 557.
- ⁴¹⁴ N. Carro, C.M. Garcia, R. Cela, "Microwave-assisted extraction of monoterpenols in must samples", *Analyst*, 1997, **122**, 325.
- ⁴¹⁵ G. P. Blanch, G. Reglero, M. Herraiz, "Analysis of wine aroma by off-line and online supercritical fluid extraction-gas chromatography", *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 1251.
- ⁴¹⁶ N. Carro, C. M. Garcia, R. Cela, "Supercritical fluid extraction of free fraction components of aroma in wines and musts", *J. Microcolumn Separations*, 1996, **8**, 453.
- ⁴¹⁷ M. Palma, L.T. Taylor, B.W. Zoecklein, L.S. Douglas, "Supercritical fluid extraction of grape glycosides", *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 775.
- ⁴¹⁸ F. J. Senorans, A. Ruiz-Rodriguez, E. Ibanez, J. Tabera et al., "Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of alcoholic beverages", *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 1895.
- ⁴¹⁹ F. J. Senorans, A. Ruiz-Rodriguez, E. Ibanez, J. Tabera et al., "Optimization of countercurrent supercritical fluid extraction conditions for spirits fractionation", *J. Supercritical Fluids*, 2001, **21**, 41.
- ⁴²⁰ F. J. Senorans, A. Ruiz-Rodriguez, E. Ibanez, J. Tabera et al., "Isolation of brandy aroma by countercurrent supercritical fluid extraction", *J. Supercritical Fluids*, 2003, **26**, 129.
- ⁴²¹ Y. Ito, "High-speed countercurrent chromatography", *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1986, **17**, 65.
- ⁴²² A. Marston, K.J. Hostettmann, "Countercurrent chromatography as a preparative tool - applications and perspectives", *J. Chromatogr. A*, 1994, **658**, 315.
- ⁴²³ C. R. Strauss, P.R. Gooley, B. Wilson, P.J. Williams, "Application of droplet countercurrent chromatography to the analysis of conjugated forms of terpenoids, phenols, and other constituents of grape juice", *J. Agric. Food Chem.*, 1987, **35**, 519.
- ⁴²⁴ R. Roscher, P.J. Winterhalter, "Application of multilayer coil countercurrent chromatography for the study of *Vitis vinifera* cv. Riesling leaf glycosides", *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**, 1452.
- ⁴²⁵ M. J. Lacey, M. S. Allen, R. L. N. Harris, W. V. Brown, "Methoxypyrazines in sauvignon blanc grapes and wines", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1991, **42**, 103.
- ⁴²⁶ Y. Kotseridis, R.L. Baumes, A. Bertrand, G.K. Skouroumounis, "Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay", *J. Chromatogr. A*, 1999, **841**, 229.
- ⁴²⁷ T. J. Evans, C.E. Butzke, S. E. Ebeler, "Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 1997, **786**, 293.
- ⁴²⁸ A. P. Pollnitz, K. H. Pardon, M.A. Sefton, "Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine", *J. Chromatogr. A*, 2000, **874**, 101.
- ⁴²⁹ R. Schneider, Y. Kotseridis, J.L. Ray, C. Augier et al., "Quantitative Determination of Sulfur-Containing Wine Odorants at Sub Parts per Billion Levels. 2. Development and Application of a Stable Isotope Dilution Assay", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 3243.

- ⁴³⁰ R. Lopez, V. Ferreira, P. Hernandez, J.F. Cacho, "Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study", *J. Sci. Food & Agric.*, 1999, **79**, 1461.
- ⁴³¹ V. Ferreira, N. Ortiz, A. Escudero, R. Lopez et al., "Chemical characterization of the aroma of Grenache rosé wines: aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies", *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 4048.
- ⁴³² K. R. Cadwallader, J.R. Lopez, S.D. Menke, R. Surakarnkul, " *Nutraceutical Beverages: chemistry, nutrition & health*, 2004, Ed. F. Shahidi and D. K. Weerasinghe, pag. 365.
- ⁴³³ A. Escudero, B. Gogorza, M.A. Melus, N. Ortin et al., "Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values", *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 3516.
- ⁴³⁴ M. P. Marti, M. Mestres, C. Sala, O. Busto et al., "Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine roma", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 7861.
- ⁴³⁵ V. Ferreira, M. Aznar, R. Lopez, J. Cacho, "Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality spanish aged red wines", *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 4818.
- ⁴³⁶ L. Cullere, A. Escudero, J. Cacho, V. Ferreira, "Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines", *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 1653.
- ⁴³⁷ Ortega-Heras, C. Gonzalez-Huerta, P. Herrera, M.L. Gonzalez-Sanjose, "Changes in wine volatile compounds of varietal wines during ageing in wood barrels", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 341.
- ⁴³⁸ J. Ledauphin, H. Guichard, J.F. Saint-Clair, B. Picoche et al., "Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled Calvados. 2. Identification of volatile compounds and key odorants", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 433.
- ⁴³⁹ E. Miklosy, Z. Kalmar, Z. Kerenyi, "Identification of some characteristic aroma compounds in noble rotted grape berries and Aszu wines from Tokaj by GC-MS", *Acta Alimentaria*, 2004, **33**, 215.
- ⁴⁴⁰ V. Ferreira, R. Lopez, J.F. Cacho, "Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties", *J. Sci. Food & Agric.*, 2000, **80**, 1659.
- ⁴⁴¹ M. Aznar, R. Lopez, J. Cacho, V. Ferreira, "Prediction of aged red wine aroma properties from aroma chemical composition. Partial least squares regression models", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 2700.
- ⁴⁴² E. Falque, E. Fernández, D. Dubordieu, "Volatile components of Loureira, Dona Branca, and Treixadura wines", *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 538.

II. PARTE EXPERIMENTAL

II. PARTE EXPERIMENTAL

II.1 REACTIVOS, DISOLVENTES Y SUSTANCIAS PATRONES

Los patrones de los compuestos fenólicos empleados durante el desarrollo experimental del presente trabajo han sido los siguientes:

Patrón	Casa comercial
Procatequialdehído	Fluka AG Buchs, Suiza
Acido gentísico	Merck AG Darmstad, Alemania
Acido cafeico	Fluka AG Buchs, Suiza
Siringialdehído	Fluka AG Buchs, Suiza
Acido p-cumárico	Merck AG Darmstad, Alemania
Vainillina	Fluka AG Buchs, Suiza
Epicatequina	Sarsynthèse, Lab. Sarget, Merignac, Francia
Acido verátrico	Fluka AG Buchs, Suiza
Acido gálico	Merck AG Darmstad, Alemania
Acido p-hidroxibenzoico	Fluka AG Buchs, Suiza
Acido ferúlico	Fluka AG Buchs, Suiza
Acido sinápico	Fluka Chemika, Buchs, Suiza
Veratraldehído	Fluka AG Buchs, Suiza
Esculetina	Sigma Aldrich Chemie Steinhelm, Alemania
Escopoletina	Merck AG Darmstad, Alemania
Catequina	Sigma Chemicals St. Louis, EEUU
2,5-dihidroxibenzaldehído	Fluka Chemika AG Buchs, Suiza
<i>Trans</i> -Resveratrol	Sigma Chemicals St. Louis, EEUU

Para la extracción en fase sólida se han utilizado los siguientes cartuchos:

- Bond Elut PPL, polímero de estireno-divinilbenceno. Varian, California, EEUU.
- Bond Elut C-18, octadecilsílice. Varian, California, EEUU.
- Discovery DSC-18, octadecilsílice. Supelco, Pennsylvania, EEUU.
- Strata C-18E, octadecilsílice. Phenomenex, EEUU.
- Chromabond EASY, polímero de estireno-divinilbenceno, Macherey-Nagel, Düren, Alemania.
- Strata SDB-L, polímero de estireno-divinilbenceno. Phenomenex, EEUU.
- LiChrolut EN, polímero de poliestireno-divinilbenceno. Merck KGaA, Darmstad, Alemania.
- GGT: Strata C-18T, octadecilsílice. Phenomenex, EEUU.

Como soporte inerte durante las pruebas de estabilidad de los compuestos fenólicos en la EFP se ha usado: arena de mar lavada, grano grueso, laboratorios Panreac, Barcelona.

Los disolventes empleados en la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) y en los distintos ensayos de EFP son:

CLAE	Casa suministradora
Metanol (grado CLAE)	Scharlau Chemie, Barcelona
Acido acético glacial (para análisis)	Merck KGaA, Darmstad, Alemania
Acido sulfúrico (Suprapur)	Merck KGaA, Darmstad, Alemania

EFP	Casa suministradora
Etanol (95-96%vol.,Rectapur)	Prolabo, Fontanay S/Bois
Acetato de etilo(R.P. Normapur)	Prolabo, Fontanay S/Bois
Eter dietílico (Extrapur)	Scharlau Chemie, Barcelona
Metanol (grado CLAE)	Scharlau Chemie, Barcelona
Diclorometano (grado CLAE)	Merck KGaA, Darmstad, Alemania

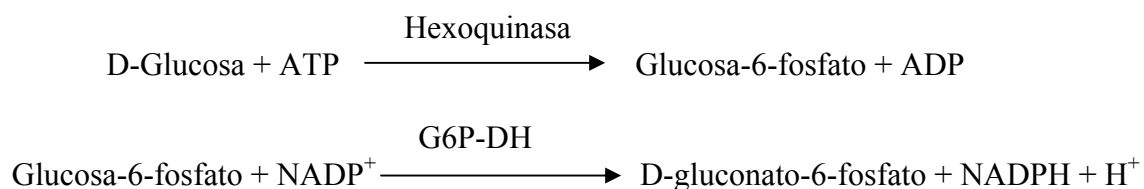
El agua que se utiliza en todos los ensayos se somete a una destilación y posterior paso a través de una resina de intercambio iónico (agua Milli-Q).

Los disolventes de la CLAE son sometidos a una desgasificación en un baño de ultrasonidos.

Los reactivos empleados en los ensayos de la Glucosil-Glucosa son:

Reactivo	Casa suministradora
Trietanolamina	Fluka, Alemania
Hidróxido Sódico	Panreac, Barcelona
Glucosa	Panreac, Barcelona
Ácido sulfúrico (Suprapur)	Merck KGaA, Darmstad, Alemania

Para el análisis espectrofotométrico de la glucosa liberada, se emplea un kit enzimático Boehringer-Mannheim para la determinación de glucosa en alimentos, basado en las siguientes reacciones:



II.2 APARATOS E INSTRUMENTOS

II.2.1 Equipo de extracción con fluidos presurizados

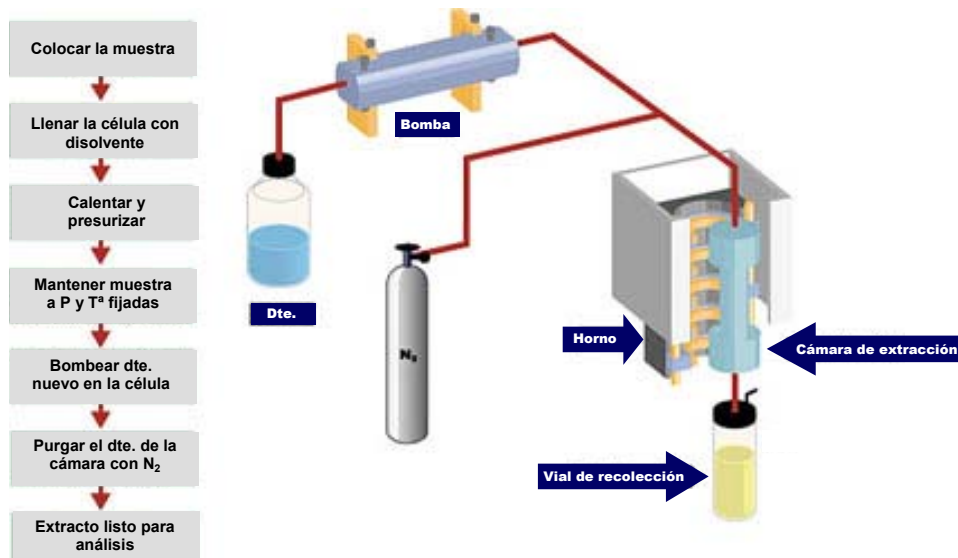
ASE (“Accelerated Solvent Extractor”) modelo 200, Dionex, Sunnyvale, California (EEUU).



Consta de:

- un panel de control para seleccionar las condiciones de la extracción y el funcionamiento del mismo.
- dos carruseles giratorios para la colocación de las cámaras de extracción (de acero inoxidable, disponibles en tamaños de 11, 22 y 33 mL de capacidad) y de los viales de recolección de vidrio (de 40 o 60 mL de capacidad).

El esquema de funcionamiento de este equipo es el siguiente:



II.2.2 Equipos de cromatografía líquida

Se han empleado los equipos descritos a continuación:

- Equipo cromatográfico de líquidos Waters compuesto por:
 - Dos bombas modelo 510.
 - Controladora de bombas PCM.
 - Inyector automático modelo 717.
 - Detector UV-visible de matriz de fotodiodos alineados M996
 - Detector de Fluorescencia 474.
 - Software de control e integración de datos cromatográficos, denominado “Estación Millenium 2010”.

La columna utilizada ha sido LiChrospher 100, RP-18 (5micras), 250x3 mm.

- Equipo cromatográfico de líquidos Dionex compuesto por:
 - Sistema de bombas P680.
 - Inyector automático ASI 100.
 - Horno para columna TCC 100.
 - Detector UV-visible de matriz de fotodiodos alineados PDA 100.
 - Detector de Fluorescencia RF 2000.
 - Software de control e integración de datos cromatográficos, denominado “Chromeleon 6,60”.

La columna utilizada en este caso ha sido Chromolit Performance PR-18e (100x4.6mm) tipo monolítica.

II.2.3 Equipos de cromatografía gaseosa

- Equipo cromatográfico de gases Hewlett-Packard 5890 Series II:
 - con columna capilar DB-WAX (J&W Scientific, Folsom, California, EEUU) de 60m x 0.32 mm.
 - acoplado a un detector de ionización de llama.

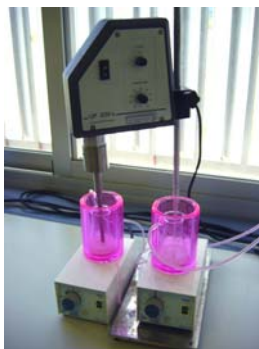
- Equipo cromatográfico de gases GC800 (Fison Instruments, Milan, Italia):
 - acoplado con un detector de masas MS800, operando en modo EI+ (impacto electrónico) a 70 eV en el intervalo de 40 a 400 u.m.a.

II.2.4 Equipo de liofilización



- Liofilizador EZ-Dry, modelo EZ 585 Q, FTS Systems, Stone Ridge, Nueva York.
- Bomba de vacío Telstar G-6/2G-6, Tarrasa, España.

II.2.5 Equipo de extracción asistida con ultrasonidos



- Sonda ultrasónica de alta intensidad, modelo UP 200S (con reguladores de intensidad y de frecuencia), Dr. Hielscher GMBH, Alemania.
- Baño termostático Frigiterm, J.P. Selecta, Barcelona, España.

II.2.6 Otros

- ✓ Balanzas Mettler PL200 y Mettler AE240.

- ✓ Equipo de desionización de agua, Water-Millipore, modelo Milli-Q⁵⁰.

- ✓ Turbo-Vap II de Zymark para la concentración de los extractos mediante un baño a una temperatura fijada y una corriente de N₂.

- ✓ Molinillo de sobremesa.

- ✓ Dispositivo de calentamiento mediante bloques de aluminio VWR, Inglaterra.

- ✓ Dispositivo de EFS Visiprep (12 posiciones), Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, EEUU.

- ✓ Dispositivo de EFS automática Rapitrace (marca registrada), Zymark, Hopkinton, Massachussets, EEUU.

- ✓ Espectrofotómetro UV-visible de doble haz, Jasco, Japón.

- ✓ Agitador magnético SM4, Stuart Scientific, Reino Unido.

- ✓ Baño de ultrasonidos 360W, J.P. Selecta, Barcelona, España.

II.3 TÉCNICAS EXPERIMENTALES

II.3.1 Procedimientos de extracción:

II.3.1.1 para la determinación de compuestos fenólicos

II.3.1.1.1 para la extracción con fluidos presurizados (EFP) sobre muestras (orujos)

- ✓ Disolvente: Metanol
- ✓ Temperatura: 150°C
- ✓ Presión: 100 atmósferas
- ✓ Ciclos de extracc. estática: 3 ciclos de 10 minutos.
- ✓ Purga: 60 segundos.

II.3.1.1.2 para el acoplamiento EFP-EFS sobre muestras (uvas)

- ✓ Disolventes: Agua (1ª etapa), Metanol (2ª etapa).
- ✓ Temperatura: 40°C (agua), 100 o 150°C (metanol).
- ✓ Presión: 40 atmósferas.
- ✓ Ciclos de extracc. estática: 3 ciclos de 5 minutos
- ✓ Purga: 300 segundos

II.3.1.1.3 para la EFP, extracción asistida por ultrasonidos (EAU) y extracción con agitación magnética (AM) sobre muestras de pepitas de uva.

a) EFP

- ✓ Disolvente: Metanol
- ✓ Temperatura: 130°C
- ✓ Presión: 100 atmósferas.
- ✓ Ciclos de extracc. estática: 2 ciclos de 5 minutos
- ✓ Purga: 60 segundos

b) EAU

- ✓ Disolvente: Metanol
- ✓ Temperatura: 10 y 60°C
- ✓ Sonda ultrasónica (2mm): 200W, 24kHz, 100% poder nominal
- ✓ Duración de la extracción: 10 minutos

c) Extracción con agitación magnética

- ✓ Disolvente: Metanol
- ✓ Temperatura: 10 y 60°C
- ✓ Agitación: 50% del valor máximo
- ✓ Duración de la extracción: 10 minutos

II.3.1.2 para la determinación de compuestos relacionados con el aroma

II.3.1.2.1 para la determinación de precursores: EFS sobre mostos

Fracción glucosídica total (GGT)

- ✓ Cartucho de EFS: Strata C-18t
- ✓ Acondicionamiento: 5ml MeOH, 10ml H₂O
- ✓ Volumen de muestra: 2 ml ajustados a pH = 2.25
- ✓ Lavado: 30ml
- ✓ Secado: 2 minutos a vacío (-0,67 atm)
- ✓ Elución: 1,5 ml EtOH + 3ml H₂O

II.3.1.2.2 para la determinación de aromas libres: EFS sobre vinos

- ✓ Acondicionamiento: 4ml CH₂Cl₂, 4ml MeOH,
4ml H₂O-EtOH (12% v/v)
- ✓ Volumen de muestra: 50 ml
- ✓ Lavado: 10ml H₂O
- ✓ Secado: 10 minutos a vacío (-0.67 atm)
- ✓ Elución: 2ml CH₂Cl₂

II.3.2 Procedimientos cromatográficos:

II.3.2.1 para la determinación de compuestos fenólicos en general (CLAE)

- ✓ Fases móviles: disolvente A (5% metanol, 2% ác. acético en agua)
disolvente B (90% metanol, 2% ác. acético en agua)
- ✓ Flujo: 0,5 mL/min.
- ✓ Vol. inyección: 40 µl para muestras de patrones y 80 µl para muestras reales.
- ✓ Detección:
 - matriz de diodos alineados: registrando un espectro por segundo. Resolución 1,2 nm. Barrido de 240 a 390 nm.
 - detector de fluorescencia: longitud de onda de excitación 351 nm y de emisión de 453 nm.
- ✓ Columna: LiChrospher 100, RP-18 (250x3mm, 5micras).
- ✓ Gradiente: Pasando de un 0% a un 100% de disolvente B en 85 min., según la siguiente tabla de gradiente:

<u>Tiempo</u>	<u>%A</u>	<u>%B</u>	<u>Curva</u>
0	100	0	-
5	85	15	6
45	50	50	7
80	50	50	6
85	0	100	6

Se registra durante 100 minutos. Finalmente se hace pasar metanol 100% para limpiar el sistema durante 15 minutos volviéndose a las condiciones iniciales para otra inyección mediante un programa en 10 minutos y posteriormente se deja 20 minutos de estabilizado.

II.3.2.2 para la determinación de *trans*-resveratrol (CLAE)

- ✓ Fases móviles: disolvente A (0,1 % ác. acético en agua)
disolvente B (0,1 % ác. acético en metanol)
- ✓ Flujo: 5 mL/min.
- ✓ Vol. inyección: 20 µl.
- ✓ Detección:
 - matriz de diodos alineados: registrando un espectro por segundo. Resolución 1,2 nm. Barrido de 260 a 350 nm.
 - detector de fluorescencia: longitud de onda de excitación 310 nm y de emisión de 403 nm.
- ✓ Columna: Chromolit Performance PR-18e (100x4.6mm) monolítica.
- ✓ Gradiente: Isocrático a 30%A, 70%B

Se registra durante 5 minutos (el tiempo de elución del *trans*-resveratrol es de 2,0 minutos). Finalmente se hace pasar metanol 100% B para limpiar el sistema durante 5 minutos volviéndose a las condiciones iniciales para otra inyección mediante un programa en 5 minutos y posteriormente se deja 5 minutos de estabilizado.

II.3.2.3 para la determinación de catequinas (CLAE)

- ✓ Fases móviles: disolvente A (2% ác. acético en agua)
disolvente B (90% metanol, 2% ác. acético en agua)
- ✓ Flujo: 0,3 mL/min.
- ✓ Vol. inyección: 80 µl.
- ✓ Detección:
 - matriz de diodos alineados: registrando un espectro por segundo. Resolución 1,2 nm. Barrido de 200 a 400 nm.
 - detector de fluorescencia: longitud de onda de excitación 290 nm y de emisión de 320 nm.

- ✓ Columna: LiChrospher 100, RP-18 (250x3mm, 5micras).
- ✓ Gradiente: Pasando de un 0% a un 100% de disolvente B en 21 min., según la siguiente tabla de gradiente:

<u>Tiempo</u>	<u>%A</u>	<u>%B</u>	<u>Curva</u>
0	80	20	-
10	75	25	6
20	50	50	7
21	0	100	6

Se registra durante 20 minutos (el tiempo de elución de catequina y epicatequina está en torno a los 10 y 15 minutos respectivamente). Finalmente se hace pasar metanol 100% B para limpiar el sistema durante 10 minutos volviéndose a las condiciones iniciales para otra inyección mediante un programa en 5 minutos y posteriormente se deja 10 minutos de estabilizado.

II.3.2.4 para la determinación de compuestos relacionados con el aroma (CG)

- ✓ Gas portador: Helio
- ✓ Temperatura inyector: 200°C
- ✓ Vol. inyección: 1 µl.
- ✓ Detección:
 - ionización de llama ó
 - espectrometría de masas: impacto electrónico + 70 eV, intervalo 40-400 u.m.a.
- ✓ Columna: sílice recubierta con DB-WAX (60m x 0,32 mm).
- ✓ Gradiente: Pasando de 40°C a 230°C en 100 minutos con las siguientes condiciones:
Temperatura inicial: 40°C, tiempo inicial: 5min.
Temperatura final: 230°C, Velocidad: 2°C/min.

Se registra durante 100 minutos. Finalmente se limpia el sistema durante 20 minutos a 230°C, volviéndose a las condiciones iniciales, para otra inyección, de forma automática.

II.3.3 Procedimiento de hidrólisis y medida espectrofotométrica para la determinación de precursores aromáticos:

II.3.3.1 procedimiento de hidrólisis

- ✓ Ácido sulfúrico 2,25M: 2mL.
- ✓ Vol. muestra o patrón: 1mL.
- ✓ Temperatura: 100°C
- ✓ Duración: 60 minutos

II.3.3.2 procedimiento de medida espectrofotométrica

- ✓ Neutralización: - 0,4 mL NaOH 3M
- 0,6 mL tampón trietanolamina (pH = 7,6)
- 0,4 mL muestra o patrón
- ✓ Cubeta: 1 cm.
- ✓ Longitud onda: 340 nm
- ✓ Tampón TRA/NADP/ATP: 1mL
- ✓ Vol. muestra: 100µL.
- ✓ Vol. H₂O: 1,9mL.
- ✓ Vol. enzima: 20µL.

II.4 MUESTREO

Las muestras de orujo de uva Palomino Fino analizadas en el **apartado III.1** fueron tomadas a la salida de una prensa de agotamiento en una bodega de la zona. Previamente las uvas habían sido prensadas mediante prensas horizontales de platos.

Todas las muestras de uva analizadas en los **apartados III.3** y **III.5** durante el desarrollo de este trabajo se han recolectado en Jerez de la Frontera, concretamente en el CIFA (Centro de Investigación y Formación Agraria) “Rancho de la Merced”. El mismo origen tienen las pepitas de uva analizadas en el **apartado III.2**, puesto que estas últimas se obtuvieron a partir de las uvas anteriormente mencionadas.

El muestreo se realizó seleccionando, en primer lugar, entre 8-10 cepas del lineo en estudio de forma que sean lo más representativas posible. De cada una de las cepas seleccionadas en el viñedo para el control de maduración, se corta una porción (con unos 6-10 granos de uva, que se correspondan con distintas partes del mismo, es decir, de las puntas, alas, etc..) de cada uno de los racimos que hayamos seleccionado por presentar, a priori, distintas condiciones de desarrollo (exposición directa al sol, sombreados, más cercanos al terreno, más alejados, etc...) para que el muestreo sea lo más representativo posible de las cepas consideradas durante el seguimiento de la maduración.

Asimismo el día de vendimia, se seleccionan distintas porciones de varios racimos elegidos aleatoriamente en las espuestas utilizadas para la recolección de la uva.

Las fechas de muestreo son las indicadas en las siguientes tablas:

Tabla 1 Días de muestreo (en amarillo durante la maduración y en verde el día de vendimia) de uvas analizadas en el apartado III.3

		2001					
		23 Julio	30 Julio	6 Agosto	13 Agosto	20 Agosto	Vendimia
Viura							21/8
		25 Julio	1 Agosto	8 Agosto	14 Agosto	21 Agosto	Vendimia
Tempranillo							20/8

Tablas 2 y 3 Días de muestreo, indicados en amarillo, y de vendimia, en verde, de las uvas y pepitas analizadas en los apartados III.5 (años 2002 y 2003) y III.2 (año 2002) respectivamente.

	Año 2002									Fecha vend
	12/7	19/7	26/7	2/8	9/8	16/8	23/8	30/8	Vendimia	
Chardonnay										06/8
Mosc.Alej.										29/8
Sauv.Blanc										13/8
Viura										30/8
Garrido										04/9
Pno.testigo										28/8
Traminer										01/8
Mosc.Front.										30/8
Pno.riego										28/8
Vijiriega										04/9
Cab.Sauv.										30/8
Tempranillo										30/8
Syrah										30/8
Pno.negro										02/8
Tint.Rota										30/8
Graciano										05/9

	Año 2003					
	22/7	29/7	05/8	12/8	19/8	Vendimia
Mosc.Alej.						21/8
Sauv.Blanc						06/8
Viura						19/8
Garrido						26/8
Pno.testigo						19/8
Pno.riego						19/8
Vijiriega						21/8
Cab.Sauv.						19/8
Tempranillo						14/8
Syrah						19/8
Tint.Rota						22/8
Graciano						19/8
	22/7	25/7	29/7	31/7	05/8	Vendimia
Chardonnay						05/8
Traminer						31/7
Pno. negro						31/7

Durante el año 2003 se produjo una ola de calor, hacia la mitad del periodo, que afectó a la maduración, en mayor o menor medida, de las variedades estudiadas, lo que unido al hecho de que se comenzó a realizar el muestreo más tarde condujo a que el número de muestreos sea inferior al del año anterior. Además se realizaron muestreos más frecuentes en las variedades más tempranas (Traminer, Palomino Negro y Chardonnay), y en el caso de la variedad Moscatel de Frontignan (Moscatel de Grano Pequeño), sólo se pudo tomar dos muestras, puesto que la uva se pasificó rápidamente, optándose por no incluirla en el estudio realizado sobre las muestras del 2003.

En cuanto al **apartado III.4**, los vinos comerciales analizados fueron los indicados a continuación:

<i>Nombre</i>	<i>Variedad</i>	<i>G. alcohol.</i>	<i>Bodega</i>	<i>Año</i>	<i>Zona</i>
<i>Castillo de Liria</i>	Moscatel	15	Vicente Gandía Plá	2001	Valencia
<i>Castillo de Aguarón</i>	Garnacha	13,5	Soc. Coop. San Roque	2000	Cariñena
<i>Viña Mireia</i>	Moscatel-Traminer	12	Pinord, S.A.	2001	Penedés
<i>Mandolás Oremus Tokaji Furmint</i>	Furmint	14,5	Vega Sicilia	2000	Tokaji (Hungría)
<i>Gran Feudo Blanco dulce de Moscatel</i>	Moscatel de Frontignan	12,5	Julián Chivite	1998	Navarra
<i>Castillo de Irache</i>	Chardonnay	13	Irache, S.L.	2001	Navarra
<i>Moscatel Dorado</i>	Moscatel	18	César Florido	2001	Jerez-Manzanilla Sanlúcar Penedés
<i>Viña Esmeralda</i>	Moscatel-Traminer	11	Torres	2002	Penedés
<i>Sauvignon Marqués de Riscal</i>	Sauvignon Blanc	12,5	Hered. de Marqués de Riscal	2002	Rueda
<i>Original Muscat</i>	Moscatel - Moscatel de Frontignan	12	Miquel Oliver, S.L.	2001	Mallorca
<i>Cresta Real</i>	Verdejo	13	Ahold	2001	Rueda
<i>Ribera del Puerto</i>	Palomino	11	501 del Puerto, S.A	2002	Vinos Tierra de Cádiz

Los vinos jóvenes monovarietales analizados en ese mismo apartado, fueron proporcionados por el CIFA “Rancho de la Merced”, y se elaboraron en sus instalaciones durante la campaña del 2002. Con algunas variedades se realizaron distintos ensayos de vinificación, tal como se indica en la siguiente tabla:

Muestra	Variedad/tipo de muestra	Origen variedad	Tipo de vinificación
Chard	Chardonnay	Universal	Blanco
Cabsauv	Cabernet Sauvignon	Universal	Tinto
Garrido	Garrido	Regional	Blanco
Graciano	Graciano	Nacional	Tinto
Moscmal	Moscatel de Málaga	Universal	Blanco
Moscmalr	Moscatel de Málaga riego	Universal	Blanco
Pno	Palomino	Autóctona	Blanco
Pnor	Palomino riego	Autóctona	Blanco
Pnoenz	Palomino enzimas glucosidasas	Autóctona	Blanco Adición enzimas al final fermentación
Pnomac	Palomino maceración	Autóctona	Blanco maceración
Pnoneg	Palomino Negro	Regional	Tinto
Pnonegbt	Palomino Negro baja temperatura	Regional	Tinto
Pnonegmc	Palomino Negro maceración carbónica	Regional	Maceración carbónica
Syrah	Syrah	Internacional	Tinto
Temprani	Tempranillo	Nacional	Tinto
Trami	Traminer	Internacional	Blanco
Tramimac	Traminer maceración	Internacional	Blanco maceración
Tinrota	Tintilla de Rota	Autóctona	Tinto
Tinrotar	Tintilla de Rota riego	Autóctona	Tinto
Vijirieg	Vijiriega	Regional	Blanco
Viura	Viura	Nacional	Blanco
Viuramac	Viura maceración	Nacional	Blanco maceración
Viuraenz	Viura enzimas glucosidasas	Nacional	Blanco Adición enzimas al final fermentación

Hay que indicar que no todas las variedades de uva controladas durante la maduración en el año 2002 se vinificaron, puesto que esa decisión está sujeta a la disponibilidad de las instalaciones, a la maduración de las distintas variedades cultivadas y a la planificación particular de cada año en el CIFA “Rancho de la Merced”, que es el centro que elabora los vinos anteriormente mencionados y que nos proporciona posteriormente las muestras a analizar.

Los ensayos de riego se realizaron de la siguiente forma:

- **Riego**

Variedad de uva	Modalidad de riego	Dosis total L/m ² (Abril-Julio)	Dosis mensual L/m ²
Palomino fino	por goteo	300	75
Moscatel	por goteo	150	37,5
Tintilla de Rota	por goteo	150	37,5

- **Maceración pelicular: Viura, Traminer y Palomino**

La uva vendimiada se despallilló y se le añadieron 100 ppm de SO₂. Una hora más tarde se le adicionan enzimas con actividad pectinasa (celulasa y hemicelulasa) VINOZYM FCE G, en dosis de 2g/100Kg uva. Se mantuvo durante 6 horas a 4 °C y posteriormente se prensó en prensa neumática. Se realizó el desfangando durante 12 horas a 4 °C.

A continuación el mosto se trasegó a un depósito de acero inoxidable, donde se inoculó con levaduras Fermiblanc arom (20g/Hl) previamente hidratadas. La temperatura de fermentación fue de 18 °C.

- **Adición de enzimas glucosidasas: Viura, y Palomino**

Una vez vendimiada la uva, se molturó en moledora de rodillos y se prensó en prensa horizontal de platos. Al mosto obtenido se le añadieron 60 ppm de SO₂ y enzimas con actividad pectinasa NOVOCLAIR FCE G (1g/Hl de mosto), desfangándose durante 24 horas a 4 °C.

Posteriormente se trasegó el mosto a un depósito de acero inoxidable, donde se inoculó con levaduras Fermiblanc arom (20g/Hl) previamente hidratadas. La temperatura de fermentación fue de 18 °C.

Una vez finalizada la fermentación alcohólica, y con un contenido en azúcares residuales inferiores a 2 g/L, se le añadieron enzimas con actividad β-glucosidasa NOVAROM (5g/Hl de vino).

- **Maceración carbónica: Palomino Negro**

En primer lugar se saturó un depósito con CO₂. La uva vendimiada se despalilló manualmente y se introdujo en el depósito anteriormente mencionado. Durante los tres primeros días del encubado se adicionó CO₂ para asegurar una atmósfera de CO₂.

Cuando el grado Baumé del mosto fue inferior a 1, se prensó la uva y se terminó de fermentar a 18 °C. No se añadieron enzimas ni levaduras, ni se corrigió la acidez. Una vez finalizada la fermentación se corrigió el SO₂ y la acidez.

- **Fermentación a baja temperatura: Palomino negro**

Se realizó como una fermentación tradicional en tinto, con la única diferencia de que la temperatura de fermentación fue de 18 - 20 °C.

Las enzimas utilizadas fueron VINIZYM G (2 g/100 Kg uva), y las levaduras inoculadas fueron FERMIROUGE (en dosis de 20 g/100 Kg uva).

II.5 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y DE LAS CAMARAS DE EXTRACCIÓN

II.5.1 Muestras de orujo

En primer lugar se separan hollejos y pepitas. A continuación se muelen en secuencias de 15 segundos para evitar el calentamiento de la muestra, y se secan a 40°C en una estufa durante 24 horas.

II.5.2 Muestras de uva y pepitas

Las uvas de las distintas variedades de uva estudiadas fueron recogidas a lo largo de su periodo de maduración, tal como se ha indicado en el apartado anterior.

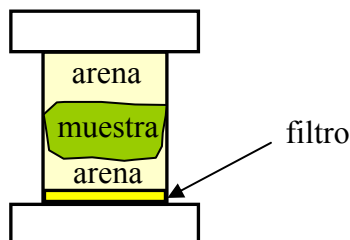
En primer lugar se les retira el pedicelo, y se cortan por la mitad para separar las pepitas del resto de la baya. A continuación se guardaban las pepitas, una vez limpias, en un refrigerador a -20°C.

Las uvas, una vez retiradas las pepitas, se recogían en distintos recipientes para proceder a su liofilización, que se prolongaba el tiempo necesario para que el peso se mantuviese constante.

Una vez liofilizadas, se trituraban con un molinillo de sobremesa y se conservan a -20°C hasta su análisis.

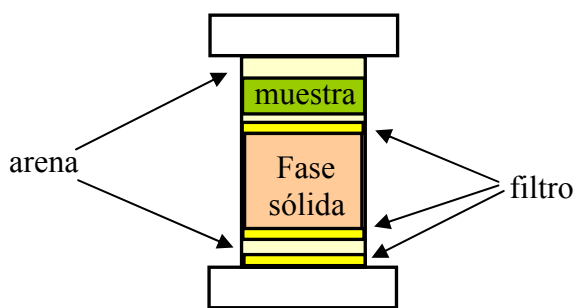
II.5.3 Preparación de la cámara para la EFP (orujo, pepitas)

Cada cámara de extracción se prepara de la siguiente forma:



- ◆ se añade como material soporte arena de mar, llenándose la cámara hasta aproximadamente tres cuartas partes de su capacidad.
- ◆ se adiciona la disolución de patrones o la muestra, y se añade más arena hasta que se llene la cámara, cerrando posteriormente la misma con la tapa superior.

II.5.4 Preparación de la cámara para la EFP-EFS (uvas)



El sistema planteado se prepara de la siguiente forma:

- ◆ se añade la fase sólida de LiChrolut EN sobre un filtro, en torno a 2,5 g, llenándose la cámara hasta casi completar su capacidad, y colocándose otro filtro encima.
- ◆ en el caso de las disoluciones de patrones, se adiciona la disolución sobre la arena que se añade encima de la fase sólida, añadiéndose, si fuese necesario, más arena hasta que se llene la cámara y cerrando posteriormente la misma con la tapa superior. En el caso de muestras, ésta se añade directamente sobre el filtro que se coloca encima de la fase sólida (como indica la figura).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III RESULTADOS Y DISCUSION

III.1 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ORUJOS CON DISOLVENTES A ALTA TEMPERATURA¹ (EFP)

En este apartado se pretende evaluar la estabilidad de distintos compuestos fenólicos en la extracción con disolventes a alta temperatura que se desarrolla cuando se emplea la técnica de extracción con fluidos presurizados (EFP). Los resultados se compararán con los obtenidos cuando se mantienen los mismos compuestos con el disolvente seleccionado en el punto de ebullición del disolvente y en contacto con el aire, para comprobar la influencia que el aire tiene en la degradación de los mismos.

Una vez determinada la estabilidad de estos compuestos, se determinará la viabilidad de la EFP y se aplicará el método de extracción desarrollado a la extracción de compuestos fenólicos a partir de muestras de orujo.

III.1.1 Introducción

Entre los distintos métodos de preparación de muestras para la determinación de compuestos fenólicos en alimentos,² el más empleado es la maceración de la muestra sólida con disolventes orgánicos o con mezclas acuosas.

Se ha propuesto como técnica alternativa la extracción con fluidos supercríticos (EFSC), puesto que ofrece la ventaja de ser más rápida y menos contaminante. Sin embargo, cuando se pretende utilizar el CO₂ sub- o supercrítico para la extracción de compuestos fenólicos, son necesarios elevados porcentajes de modificador orgánico para incrementar la polaridad del fluido extractante.^{3,4,5} En consecuencia, la selectividad entre los compuestos se ve reducida sustancialmente.

Otra alternativa a los métodos clásicos es la extracción con fluidos presurizados (EFP), que, al igual que la EFSC, ofrece la posibilidad de desarrollar extracciones bajo atmósfera inerte y protegidas de la luz. Esto supone una gran ventaja, especialmente en el caso de que lo que se pretenda sea analizar compuestos fenólicos sensibles a esos dos factores. Además el empleo de estas técnicas permite reducir el tiempo de extracción, y por tanto, se reduce asimismo el efecto adverso que la actividad enzimática pueda tener.

En la EFSC, su principal ventaja es la alta capacidad de difusión ofrecida por el fluido de extracción para acceder a los compuestos presentes en la matriz de la muestra. En la EFP, se emplean altas temperaturas y altas presiones para acelerar el proceso de extracción. La presión permite incrementar el contacto entre el fluido extractante y la muestra. La temperatura se utiliza para provocar la ruptura de los enlaces analito-matriz. Además, la temperatura puede modificar considerablemente la permitividad relativa del fluido extractante incrementando la selectividad.⁶

Antes de proponer un método de extracción basado en el empleo de disolventes sobrecalentados, es necesario comprobar que:

- ✓ los analitos no se degradan bajo las condiciones de extracción.
- ✓ los analitos pueden extraerse con el fluido extractante.

Los compuestos fenólicos son fácilmente degradables a altas temperaturas, por tanto es esencial comprobar que no se degradarán durante la EFP.

III.1.2 Estudio de la estabilidad de los compuestos fenólicos durante la extracción a altas temperaturas

El primer punto de este apartado es el estudio de la estabilidad de los compuestos fenólicos durante la extracción, usando metanol como fluido extractante, a distintas temperaturas (40-150°C) como medida de la influencia de la atmósfera inerte en la extracción. Los resultados se compararán con los obtenidos cuando se someten los mismos compuestos a temperatura alta pero en contacto con el aire.

Se prepararon disoluciones en metanol de los siguientes patrones de compuestos fenólicos:

- ácidos benzoicos: ácido gálico (204 ppm), ácido verátrico (106 ppm), ácido p-hidroxibenzoico (424 ppm) y ácido gentísico (100 ppm).
- ácidos cinámicos: ácido ferúlico (220 ppm), ácido p-cumárico (53 ppm), ácido cafeico (99 ppm) y ácido sinápico (203 ppm).
- aldehídos benzoicos: vainillina (152 ppm), protocatequialdehído (153 ppm), veratraldehído (205 ppm) y siringialdehído (509 ppm).
- flavan-3-oles o catequinas: catequina (72 ppm) y epicatequina (55 ppm).
- cumarinas: esculetina (230 ppm) y escopoletina (200 ppm).

Se tomaron esas cantidades de patrones para asegurar suficiente señal en los cromatogramas de los extractos obtenidos, con idea de determinar con facilidad las recuperaciones de los mismos respecto a las referencias diarias de las disoluciones de partida.

Como patrón interno se utilizó el 2,5-dihidroxibenzaldehído, preparándose una disolución acuosa del mismo de 2,918 g/l.

Una vez preparada la cámara o célula de extracción (tal como se indica en el apartado II.5.3) se define el método de extracción a utilizar, para ello se fija cual va a ser la temperatura de extracción, la presión, la duración y número de ciclos de extracción y la duración de la purga y secado.

En este caso vamos a evaluar la estabilidad de dichos compuestos fenólicos cuando se someten a una extracción con el mismo disolvente (metanol puesto que es un disolvente en el que sabemos que se disuelven esos compuestos) y el mismo método de extracción a distintas temperaturas. Se utilizaron como condiciones comunes: 3 ciclos de 10 minutos a 100 atmósferas de presión y una purga de 60 segundos, y se realizaron las extracciones a 40, 50, 100 y 150°C (hubiera sido interesante establecer la estabilidad de los compuestos a temperatura ambiente, 25°C, sin embargo el equipo instrumental no permite trabajar a esta temperatura, siendo 40°C la mínima temperatura de extracción posible).

El proceso de extracción tiene lugar, entonces, de la siguiente forma:

1°. Se introduce la cámara en el horno, se presuriza, se llena la cámara con el disolvente elegido (metanol) y es calentada durante los 5 ó 7 minutos predeterminados por el equipo dependiendo de si se calienta a temperaturas inferiores o superiores a 150°C respectivamente.

2°. Comienza el primer ciclo de extracción y se desarrolla una extracción en estático durante 10 minutos.

3°. Se lleva a cabo la purga con N₂, con el fin de arrastrar los posibles restos de disolvente que hubieran quedado en la célula, recogándose todos los efluentes en el mismo vial.

4°. Se descomprime la célula y se devuelve al carrusel, finalizando el método con un lavado de los conductos con el disolvente empleado (que se desecha).

Diariamente se preparan dos disoluciones que servirán como referencias (antes de la primera y antes de la última extracción diaria respectivamente) con 1mL de la disolución estudiada, más 1 mL de patrón interno y se llevan aproximadamente al mismo volumen que el del extracto obtenido.

Asimismo 1mL de la disolución patrón, diluida hasta aproximadamente 40 mL (volumen aproximado de los extractos) con metanol, se mantiene en el punto de ebullición del metanol (65°C) en una estufa y en viales abiertos para determinar si se produce degradación de los compuestos fenólicos en contacto con el aire durante el mismo tiempo que dura la extracción en el equipo de EFP.

Los extractos de EFP, las disoluciones patrón de la estufa y las referencias diarias se analizan por CLAE, tras haber sido filtradas a través de una membrana de nylon de 0,45 micras de poro. Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las comentadas en el capítulo II.3.2.1

Las áreas de los picos se miden automáticamente y se corrigen respecto al patrón interno. Cada muestra se procesó por triplicado, obteniéndose las siguientes recuperaciones medias (en porcentajes respecto a la media de las dos referencias preparadas diariamente) y desviaciones estándar relativas:

Compuesto fenólico	40°C	50°C	100°C	150°C	Referencia	Estufa, 65°C
Ac. gentísico	103,0 ±4,3	98,6 ±2,3	97,6 ±0,5	100,6 ±2,9	100,8 ±1,5	85,5 ±1,6*
Ac. cafeico	101,4 ±1,9	99,4 ±2,6	102,8 ±1,4	101,9 ±2,9	99,7 ±1,4	92,5 ±6,8
Protocatequiald.	100,3 ±0,4	98,9 ±2,1	103,6 ±1,0	103,6 ±1,4	100,9 ±1,4	96,2 ±4,8
Siringialdehído	101,8 ±4,2	94,4 ±1,5	101,8 ±2,6	101,6 ±0,8	101,1 ±2,8	92,8 ±2,2*
Catequina	99,4 ±1,2	98,9 ±3,1	92,6 ±4,9	87,4 ±3,0*	96,6 ±4,9	63,7 ±8,7*
Ac. p-cumárico	101,2 ±6,8	99,2 ±2,4	102,3 ±1,3	98,8 ±8,6	100,3 ±0,3	109,1 ±9,3
Ac. verátrico	97,1 ±6,5	97,5 ±2,0	99,9 ±1,4	103,8 ±4,9	100,2 ±0,3	100,8 ±0,3
Epicatequina	101,8 ±1,6	98,6 ±1,5	94,1 ±1,7*	86,0 ±2,0*	99,5 ±1,7	63,4 ±7,9*
Vainillina	96,4 ±6,5	95,8 ±2,5	98,1 ±1,7	100,7 ±2,1	99,3 ±1,4	99,2 ±1,1
Ac. gálico	93,5 ±4,5	95,8 ±5,2	92,4 ±6,9	96,1 ±2,5*	100,3 ±0,3	95,2 ±1,3*
Ac. pOHbenzo.	97,6 ±4,5	101,2 ±4,6	98,0 ±3,1	103,1 ±7,1	99,3 ±1,4	92,8 ±2,2*
Esculetina	96,4 ±6,0	98,1 ±3,6	98,1 ±6,9	99,2 ±5,4	100,2 ±0,3	99,3 ±1,1
Ac. ferúlico	101,4 ±7,4	102,2 ±4,6	96,6 ±6,0	96,5 ±6,2	100,9 ±1,4	92,6 ±2,1*
Escopoletina	99,1 ±5,4	101,1 ±5,6	96,7 ±5,7	100,3 ±9,0	100,8 ±1,3	109,0 ±8,0
Ac. sinápico	97,9 ±5,1	100,2 ±5,1	95,8 ±6,2	99,0 ±10,0	99,7 ±1,3	101,8 ±4,9
Veratraldehído	101,3 ±6,4	102,7 ±4,5	96,6 ±4,8	97,7 ±3,6	101,1 ±2,8	84,3 ±0,2*

*: diferencia significativa respecto a la referencia con un nivel de confianza del 95%

Tabla 1 Porcentajes de recuperación +/- desv. est. de los compuestos analizados

Como puede observarse, las recuperaciones medias para todos los compuestos extraídos están en torno al 90%, con las excepciones de la catequina y epicatequina a 150°C. Se han realizado comparaciones estadísticas (ANOVA) para determinar si hay series de datos significativamente distintas a las referencias y tan sólo lo han dado la catequina sometida a extracción a 150°C, la epicatequina a 100 y a 150°C, y el ácido gálico a 150°C (véase las representaciones whisker & plot correspondientes en el anexo I). De forma que, cuanto mayor es la temperatura de extracción, menores recuperaciones se obtienen.

Debe indicarse que las catequinas son los compuestos más fácilmente degradables^{7,8} de entre todos los analizados y son los que presentan mayores problemas de recuperación en las técnicas de extracción sólido/fluido.³ El ácido gálico al presentar tres grupos hidroxilo es también fácilmente degradable.

Las recuperaciones obtenidas de las disoluciones patrón sometidas a 65°C en contacto con el aire en la estufa (durante el mismo tiempo que se prolongan las extracciones con el equipo de EFP) son generalmente inferiores a la referencia. Existen diferencias estadísticas significativas (obtenidas mediante el empleo del ANOVA) en los siguientes compuestos: ácido gentísico, siringialdehído, catequina, epicatequina, ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido ferúlico y veratraldehído. Sus concentraciones son significativamente menores que las referencias. Concretamente, en el caso de la catequina y la epicatequina, donde la concentración es un 34% y un 36% inferior a la referencia respectivamente.

De esta forma se ha comprobado que varios compuestos fenólicos reaccionan fácilmente a alta temperatura (65°C) cuando están en contacto con el aire. Sin embargo, cuando se aplican mayores temperaturas bajo atmósfera de nitrógeno (como en la EFP), no hay degradaciones, por lo que podemos deducir que el proceso de degradación de los compuestos fenólicos es un proceso oxidativo que requiere la presencia de oxígeno.

Así pues se ha comprobado la estabilidad de los mencionados compuestos fenólicos al someterlos a extracciones a elevadas temperaturas, por lo que esta técnica (EFP) es viable para la extracción de dichos compuestos con una temperatura igual o inferior a 100°C.

III.1.3 Propiedades analíticas del método

Se realizaron extracciones, por triplicado y ensayando distintas temperaturas de extracción, en distintos días, determinándose las recuperaciones de cada compuesto, que presentaron las desviaciones estándar mostradas en la tabla 2.

Como puede observarse la repetibilidad proporcionada por la EFP para todos los compuestos supone desviaciones inferiores al 10%. Se puede comprobar como la temperatura de extracción no tiene un efecto apreciable sobre la repetibilidad de la extracción.

Compuesto fenólico	Desv. est. a 40°C (n=3)	Desv. est. a 50°C (n=3)	Desv. est. a 100°C (n=3)	Desv. est. a 150°C (n=3)
Ac. gentísico	4,3	2,3	0,5	2,9
Ac. cafeico	1,9	2,6	1,4	2,9
Protocatequiald.	0,4	2,1	1,0	1,4
Siringialdehído	4,2	1,5	2,6	0,8
Catequina	1,2	3,1	4,9	3,0
Ac. p-cumárico	6,8	2,4	1,3	8,6
Ac. verátrico	6,5	2,0	1,4	4,9
Epicatequina	1,6	1,5	1,7	2,0
Vainillina	6,5	2,5	1,7	2,1
Ac. gálico	4,5	5,2	6,9	2,5
Ac. pOHbenzo.	4,5	4,6	3,1	7,1
Esculetina	6,0	3,6	6,9	5,4
Ac. ferúlico	7,4	4,6	6,0	6,2
Escopoletina	5,4	5,6	5,7	9,0
Ac. sinápico	5,1	5,1	6,2	10,0
Veratraldehído	6,4	4,5	4,8	3,6
Desv. est. media	4,5	3,3	3,5	4,5

Tabla 2 Desviaciones estándar (n=3) de los compuestos fenólicos estudiados, obtenidas en la EFP a las distintas temperaturas ensayadas.

III.1.4 Aplicación de la EFP a muestras reales (orujos)

Tras comprobar el comportamiento de los compuestos fenólicos a distintas temperaturas, se procedió a la extracción de los mismos a partir de muestras reales. Concretamente se sometieron a extracción pepitas de uva y hollejos procedentes de los residuos de vinificación (orujos), usando las mismas condiciones que las aplicadas a los patrones. A los extractos obtenidos se les añade el patrón interno y tras filtrarlos se analizan por CLAE.

El interés de este tipo de muestra radica en que se puede plantear la recuperación de compuestos de tipo fenólico a partir de estos residuos de vinificación, generando un valor añadido para los mismos. Para ello será necesario en primer lugar, determinar el contenido de los compuestos de interés en los mismos, por lo que se pensó en la utilización de la EFP para el desarrollo de este método de análisis.

De esta forma la EFP sería una alternativa que podría plantearse a nivel industrial como forma de recuperar los compuestos de interés en los orujos. Por ello, el apartado que aquí se plantea como desarrollo de un método de análisis, podría servir además como inicio de un estudio de la aplicabilidad de un sistema industrial basado en esta técnica, estableciéndose aquí la influencia de diversos parámetros de extracción en la recuperación de los compuestos. Obviamente, el sistema, en caso de plantearse, deberá ser escalado y las variables ajustadas. En este caso concreto, se ha desarrollado un proyecto fin de carrera de Ingeniería Química donde se han estudiado estos aspectos y se ha realizado el diseño de una planta a nivel industrial para la recuperación de polifenoles a partir de orujos.

Preparación de muestras

Los orujos se obtuvieron a partir de uvas de la variedad Palomino Fino a la salida de prensa, se separaron las semillas de los hollejos y se molieron en un molinillo de sobremesa durante 2 minutos, en secuencias de 15 segundos para evitar el calentamiento de la muestra.

Hay que indicar también que el hecho de realizar la separación entre hollejos y pepitas se debe a la diferente composición entre ambos y, sobre todo, a que ello es posible desde un punto de vista industrial y se lleva a cabo actualmente, por ejemplo, para la obtención a nivel industrial de aceite de pepitas de uva.

Las muestras molidas se secaron durante 24 horas a 40°C en una estufa y se mantuvieron a -20°C antes de la extracción (véase apartado II.5.1).

Para todas las extracciones la cantidad de muestra usada fue de 4 gramos. De esta manera es posible comparar la capacidad de extracción del disolvente usado a distintas temperaturas.

Resultados

Los cromatogramas obtenidos a 280 nm de los extractos resultantes de las muestras de hollejo son los siguientes (la identificación de los compuestos se realiza basándonos en la biblioteca de espectros elaborada previamente en el grupo de investigación):

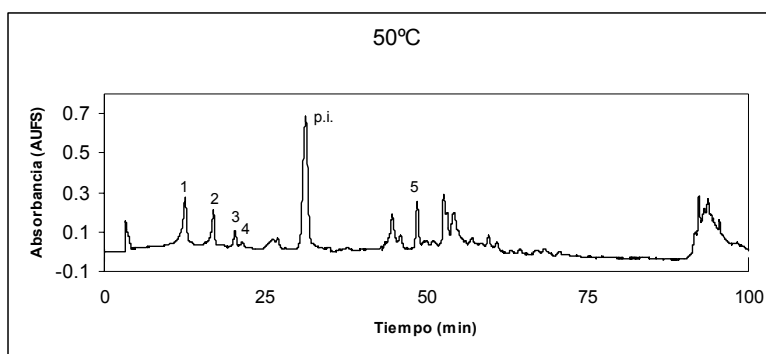


Figura 1 Cromatograma a 280 nm del extracto obtenido a partir de los hollejos a 50°C. 1= ácido gálico, 2= ácido cis-cutárico, 3= ácido caftárico, 4= catequina, p.i.= patrón interno (2,5 dihidroxibenzaldehído), 5= epicatequina.

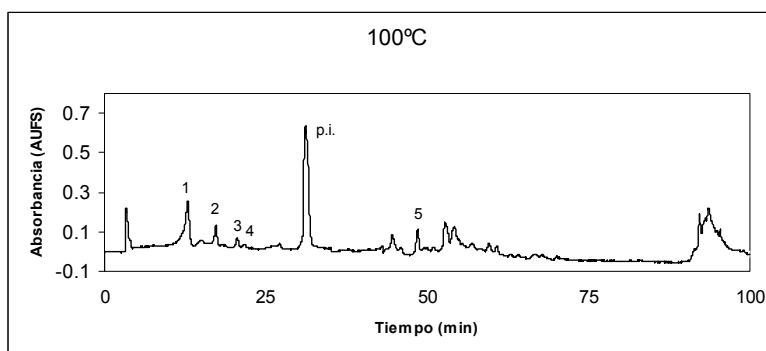


Figura 2 Cromatograma a 280 nm del extracto obtenido a partir de los hollejos a 100°C. 1= ácido gálico, 2 = ácido cis-cutárico, 3 = ácido caftárico, 4 = catequina, p.i. = patrón interno (2,5 dihidroxibenzaldehído), 5= epicatequina.

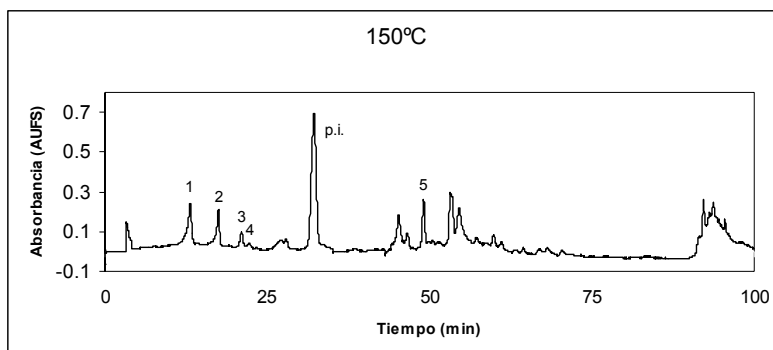


Figura 3 Cromatograma a 280 nm del extracto obtenido a partir de los hollejos a 150°C. 1= ácido gálico, 2 = ácido cis-cutárico, 3 = ácido caftárico, 4 = catequina, p.i. = patrón interno (2,5-dihidroxibenzaldehído), 5= epicatequina.

En el caso de las muestras de pepitas, los cromatogramas a 280 nm son los mostrados a continuación:

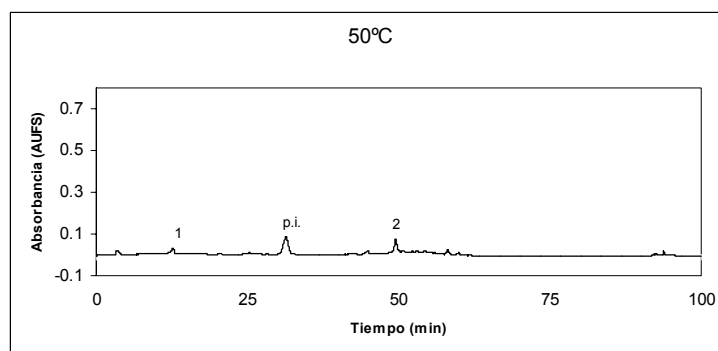


Figura 4 Cromatograma a 280 nm del extracto obtenido a partir de las pepitas a 50°C. 1= ácido gálico, 2= epicatequina, p.i.= patrón interno.

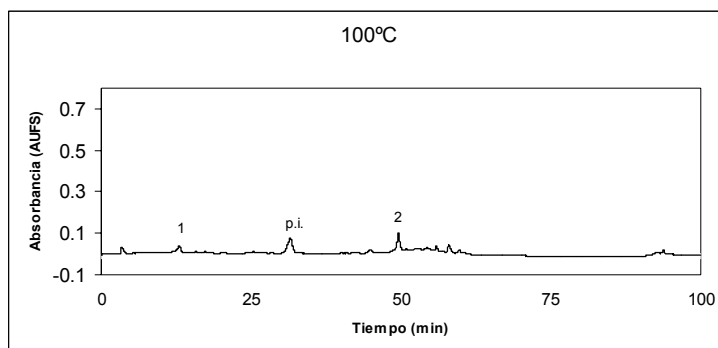


Figura 5 Cromatograma a 280 nm del extracto obtenido a partir de las pepitas a 100°C. 1= ácido gálico, 2= epicatequina, p.i.= patrón interno

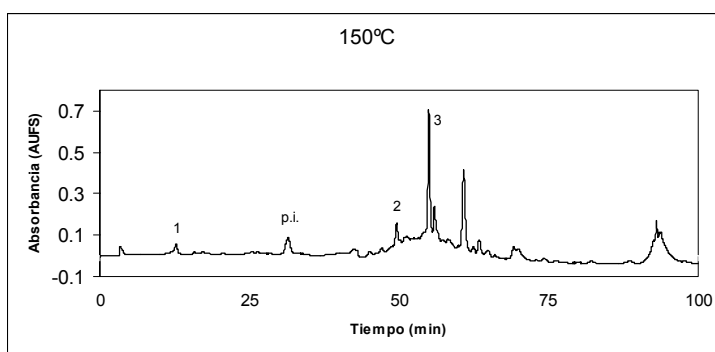


Figura 6 Cromatograma a 280 nm del extracto obtenido a partir de las pepitas a 150°C. 1= ácido gálico, 2= epicatequina, 3= epigallocatequingalato, p.i.= patrón interno.

Se observan pocas diferencias en los extractos de hollejos extraídos a distintas temperaturas, el ácido cis-cutárico se incrementa un 1% con el aumento de la temperatura de extracción de 50 a 100°C, y disminuye un 2% de 100 a 150°C. La recuperación del ácido caftárico se incrementa un 3% de 50 a 100°C pero disminuye un 7% de 100 a 150°C, en el caso de la epicatequina, aumenta un 3% de 50 a 100°C y disminuye un 2% de 100 a 150°C, de tal forma que podemos considerar estas diferencias no significativas.

Respecto a los extractos de las pepitas, los resultados son bastante diferentes en las temperaturas ensayadas. Usando 50, 100 o 150°C existen grandes diferencias tanto en la identidad como en la recuperación de los compuestos fenólicos extraídos. Por ejemplo, la catequina se incrementa un 30%, y la epicatequina un 44%, al aumentar la temperatura de extracción de 50 a 100°C. Cuando se hace la extracción a 150°C la catequina se incrementa en un 32%, y la epicatequina en un 99%, respecto a la recuperación de la extracción a 50°C. Existen algunos compuestos que no se detectan en todas las extracciones llevadas a cabo a 50°C y 100°C, pero que si son detectados en las extracciones a 150°C, por lo que como conclusión podemos decir que deben utilizarse los 150°C para la EFP en pepitas de uva.

Si consideramos que el efecto más importante de la temperatura más alta está relacionado con la ruptura de los enlaces entre los analitos y la matriz, parece que los analitos en las pepitas de uva están más fuertemente unidos a la matriz que en los hollejos.

Podemos concluir que la EFP es una técnica viable a la hora de analizar compuestos fenólicos en orujos, además en la extracción a alta temperatura (100°C) el máximo grado de degradación sufrido por los compuestos fenólicos es del 10%, incluso para los compuestos más oxidables.

En el caso del desarrollo de métodos a escala industrial para la recuperación de compuestos fenólicos a partir orujos, sería más interesante realizar las extracciones a 150 °C de forma que, aunque se degraden parcialmente algunos compuestos como las catequinas, las recuperaciones totales serían mayores. Obviamente habría que evaluar otros parámetros, como el coste que supone el incremento de la temperatura desde 100 hasta 150 °C o lo que ello implica en cuanto a requerimientos de los equipos donde se desarrollaría el proceso.

III.2 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS: EFP Y EAU

En este apartado se estudiará la aplicación de la técnica de EFP a la extracción de catequina y epicatequina con distintos disolventes, comparándose los resultados con los obtenidos cuando se realiza la extracción mediante agitación magnética (AM) y asistida con ultrasonidos (EAU). Una vez seleccionada la técnica y el disolvente que proporcionan las mejores recuperaciones, se procederá a la optimización del método para su aplicación a la determinación de los niveles de catequina y epicatequina totales presentes en muestras de pepitas de uva, puesto que éstas son las fuentes primordiales de catequinas en vinos.

A continuación se empleará la EAU para evaluar el contenido de catequinas que pueden ser potencialmente extraídas, durante la vinificación, de las pepitas. Esta técnica es rápida y sencilla, por lo permite procesar gran número de muestras, por ello se aplicará en las muestras de pepitas tomadas a lo largo del periodo de maduración de diversas variedades de uva. También se establecerán las correlaciones entre esta evolución y la de los parámetros de rutina controlados en este periodo.

Por último se aplicará la EAU, al tiempo que se compara con la AM, para evaluar la influencia que la liofilización previa de las muestras tiene en la extractabilidad de catequinas.

Así pues, con este apartado lo que se pretende es evaluar los factores que afectan a la extracción de catequinas mediante diversas técnicas, facilitando de esta manera métodos rápidos de determinación de las mismas. Además se pretende establecer los efectos de diversas condiciones de extracción en la recuperación de las mismas, lo que podría ser usado posteriormente en el diseño de un proceso de recuperación de catequinas a nivel industrial, bien sea empleando fluidos presurizados, extracción asistida por ultrasonidos o extracción por maceración.

III.2.1 Introducción

La catequina y la epicatequina son dos flavanoles presentes en muchos alimentos de origen vegetal. El interés que existe en el análisis de estos compuestos se debe a su amplia variedad de efectos beneficiosos para la salud humana (tal como se indicó en la introducción de esta memoria).

Estos compuestos pueden ingerirse a partir de alimentos vegetales o de bebidas derivadas de ellos. Así, se ha comprobado la absorción de catequina y la formación de derivados en sangre de seres humanos tras la ingestión de vino tinto.⁹

La determinación analítica de estos dos compuestos en muestras líquidas se ha desarrollado ampliamente, fundamentalmente por CLAE.¹⁰ Su análisis en alimentos sólidos requiere una extracción, son varias las alternativas, a los métodos clásicos de maceración, a considerar en su determinación.

Como ya hemos mencionado anteriormente, la EFP ofrece la ventaja de llevar a cabo extracciones protegidas del aire y de la luz. Puesto que las catequinas son compuestos fotosensibles y fácilmente oxidables (estando implicados en los fenómenos de inestabilidad oxidativa, pardeamiento, etc... de vinos), la EFP constituye una excelente opción para el análisis de las mismas en muestras sólidas.

Las otras dos técnicas evaluadas en este apartado se emplean como técnicas de referencia, sencillas de usar y de bajo coste.

III.2.2 Determinación de catequinas mediante EFP, estudio comparativo con AM y EAU.¹¹

Antes de poner a punto el método de extracción para la determinación de catequinas, se procede a la optimización del método cromatográfico. Para ello, además del detector de matriz de diodos, emplearemos un detector de fluorescencia, puesto que las catequinas son compuestos fluorescentes.¹² De esta forma lo que se pretende es conseguir un método más selectivo, específico, y con un menor límite de detección que en el caso de la detección UV.

Asimismo se realizó una comparación previa a la optimización del método de EFP, para comprobar que las recuperaciones que se consiguen con este método son superiores a otros métodos también aplicables al análisis de estos compuestos.

III.2.2.1 Optimización del método de CLAE

En primer lugar se registraron los espectros de excitación y de emisión de catequina y epicatequina:

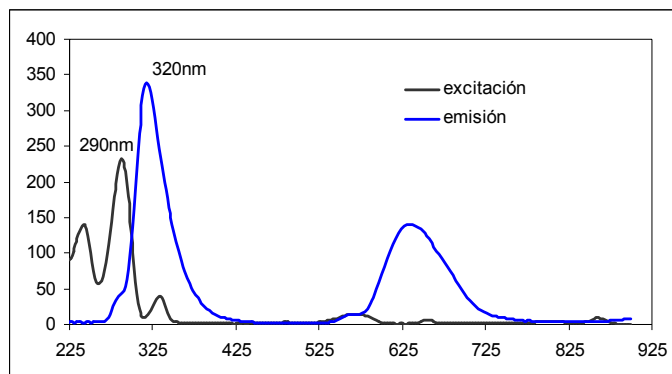


Figura 7 Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de catequina.

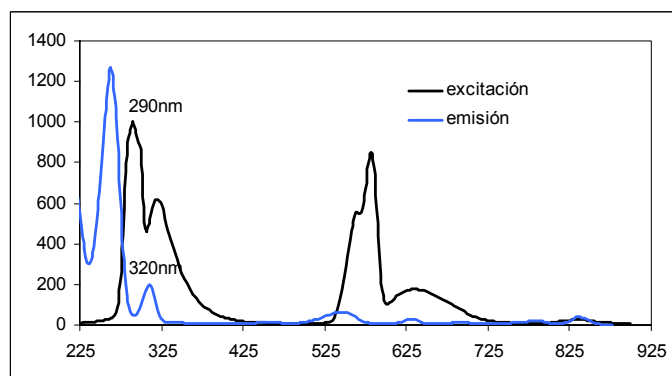


Figura 8 Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de epicatequina.

En base a ellos, se selecciona, como condiciones de medida para la detección selectiva de ambas catequinas, una longitud de onda de excitación 290 nm y de emisión de 320 nm. Estas condiciones son similares a las descritas en la bibliografía.³³

Para acortar el tiempo de análisis se realizaron diversos ensayos cambiando la composición de la fase móvil. Las condiciones finalmente empleadas permiten registrar el pico de catequina alrededor de los 10 minutos y el de epicatequina sobre los 17 minutos, reduciéndose el tiempo de análisis cromatográfico a unos 20 minutos (véase apartado II.3.2.3).

Con estas condiciones, se obtienen cromatogramas como el obtenido en la figura 9. Concretamente, dicho cromatograma es el resultante del análisis del extracto correspondiente a una muestra de pepitas de uva.

La repetibilidad del método cromatográfico se evaluó empleando extractos de muestras reales, siendo la desviación estándar relativa (n=5) de 0,8 y 0,7 % para catequina y epicatequina respectivamente.

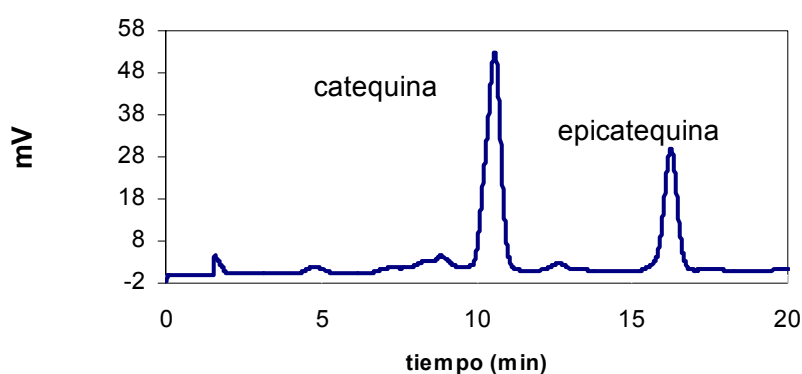


Figura 9 Cromatograma de un extracto obtenido por EFP de pepitas de uva. Condiciones de detección por fluorescencia: excitación 290nm, emisión 320nm.

III.2.2.2 Comparación de los métodos de extracción

Se realizó una comparación de las recuperaciones obtenidas, empleando distintos disolventes, a partir de pepitas de uva (0,5 g) empleando la extracción con agitación (EA), la extracción asistida por ultrasonidos (EAU), y la extracción con fluidos presurizados (EFP).

En los tres sistemas de extracción, se ensayaron cuatro disolventes: agua, metanol, etanol, y acetato de etilo.

En el caso de la AM y la EAU, se realizaron las extracciones a dos temperaturas diferentes: 10 y 60°C. En la EFP se realizaron las extracciones a 100°C.¹

Los resultados obtenidos se presentan mediante las siguientes gráficas:

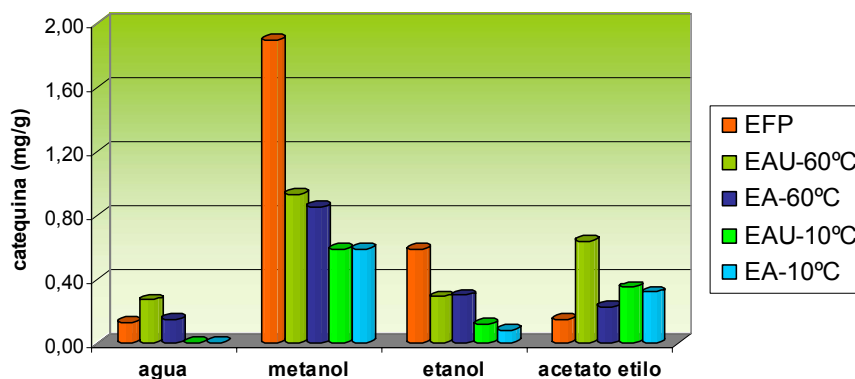


Figura 10 Recuperaciones de catequina obtenidas mediante EFP, EAU (10 y 60°C), y EA (10 y 60°C).

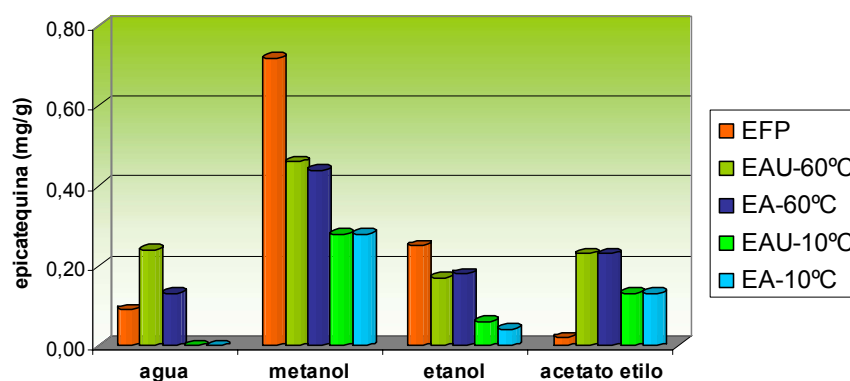


Figura 11 Recuperaciones de epicatequina obtenidas mediante EFP, EAU (10 y 60°C), y EA (10 y 60°C).

Se puede comprobar como a 60 °C, los mejores resultados se obtienen empleando metanol como disolvente. Las recuperaciones obtenidas con metanol son apreciablemente mayores que las que se obtienen con cualquier otro disolvente, tanto en el sistema EA como en el sistema EAU y tanto para catequina como para epicatequina.

Los resultados obtenidos en las experiencias desarrolladas a 10 °C son similares en cuanto a la conclusión del mejor disolvente, nuevamente el metanol es quien produce mayores recuperaciones. En este caso hay que destacar que los cuatro disolventes producen recuperaciones entre un 30 y un 50 por ciento inferiores a las obtenidas cuando se emplean 60 °C como temperatura de extracción y especialmente notable es el caso del agua, ya que en los extractos obtenidos con agua a 10 °C no se detectaron ni catequina ni epicatequina.

En cuanto a los resultados obtenidos empleando la EFP, nuevamente es el metanol el disolvente que produce los mejores resultados, en este caso también con diferencias notables con respecto a los otros tres disolventes. Hay que destacar asimismo que los resultados de los extractos obtenidos mediante EFP son mejores que los obtenidos con las otras dos técnicas para metanol y para etanol, mientras que para el agua las mejores condiciones de extracción son la EAU a 60 °C. Para el acetato de etilo, las recuperaciones obtenidas empleando la EFP son incluso inferiores a las que se obtienen usando la EAU o la EA a 10 °C.

Por todo ello, se puede concluir que el empleo de la EFP usando metanol como disolvente, produce unos resultados en cuanto a recuperación de catequina y de epicatequina notablemente superiores a cualquiera de las otras condiciones de extracción ensayadas para el caso de las pepitas de uva. En el caso de la EFP presenta además la posibilidad de emplear un mayor intervalo de temperaturas, incluso por encima de 100 °C, que podrían incrementar la recuperación o incluso disminuir el tiempo necesario para obtener la misma recuperación.

III.2.2.3 Optimización de la EFP y aplicación sobre pepitas

En primer lugar se desarrollan extracciones entre 100 y 200°C (máxima temperatura admitida por el equipo) para determinar la temperatura óptima para la extracción de catequina y epicatequina a partir de pepitas de uva (obtenidas según apartado II.5.2). Se emplearon tiempos de extracción de 5 y 10 minutos.

Los resultados de las recuperaciones de ambos compuestos se presentan en las siguientes gráficas:

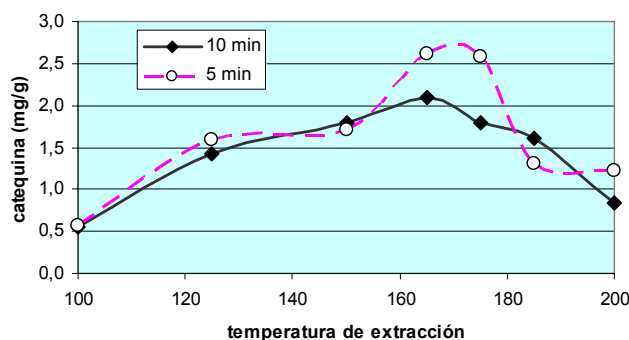


Figura 12 Recuperaciones de catequina a partir de pepitas de uva durante la EFP a distintas temperaturas, usando dos tiempos de extracción diferentes: 5 y 10 minutos.

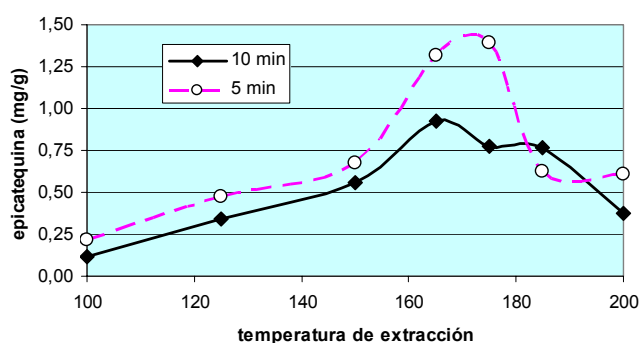


Figura 13 Recuperaciones de epicatequina a partir de pepitas de uva durante la EFP a distintas temperaturas, usando dos tiempos de extracción diferentes: 5 y 10 minutos.

Podemos comprobar que para ambos tiempos de extracción, el comportamiento es similar: la extracción de catequinas se incrementa notablemente a partir de 100°C hasta el intervalo entre 160-180°C, disminuyendo posteriormente de forma drástica hasta la máxima temperatura ensayada (200°C).

Este comportamiento puede atribuirse a la superposición de dos efectos diferentes durante el incremento de temperatura. El primero de ellos es la mayor facilidad de extracción a temperaturas más elevadas debido al debilitamiento de las uniones entre las catequinas y la matriz. El segundo efecto, en este caso de

consecuencias contrarias, es la degradación de estos compuestos a altas temperaturas, incluso en una atmósfera de nitrógeno, como es la que se tiene durante la EFP.

Es además llamativo el hecho de que en las extracciones que se desarrollan tan sólo durante 5 minutos, las recuperaciones obtenidas a temperaturas entre 150 y 180 °C son sensiblemente superiores a las obtenidas cuando la duración de la extracción es de 10 minutos. Este hecho sólo tiene explicación considerando que a esas temperaturas, el efecto de la degradación en 10 minutos, es superior al efecto de incremento de la extracción desde la muestra.

Para comprobar esta suposición se determinó la estabilidad de catequina y epicatequina durante extracciones de 10 minutos de duración a diferentes temperaturas, empleando para ello una disolución patrón de esas sustancias.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente gráfica:

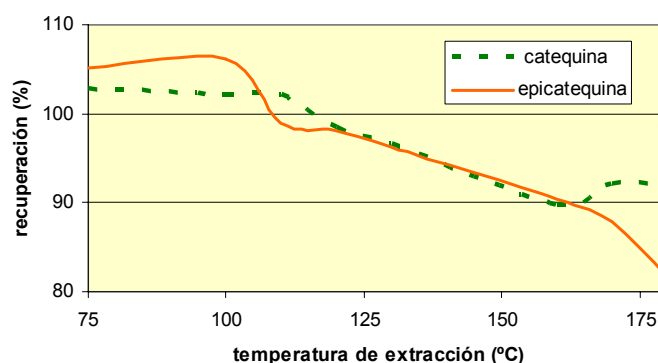


Figura 14 Recuperaciones de los patrones de catequina y epicatequina durante la EFP a distintas temperaturas.

Se puede comprobar que la recuperación es superior al 95% con temperaturas de extracción de hasta 130 °C. A partir de dicha temperatura, la degradación de ambos compuestos es superior al 5% de la muestra sometida a extracción. De esta forma queda

comprobado el efecto del incremento de la degradación de las catequinas durante la extracción de 10 minutos de duración a temperaturas superiores a 130 °C. Este efecto se hace más intenso conforme mayor es la temperatura, llegando a compensar el incremento del grado de extracción de las catequinas a partir de las muestras reales.

Por ello, la máxima temperatura de extracción que se puede aplicar en el sistema de EFP es de 130 °C cuando la duración de la misma es de 10 minutos.

Tras la determinación de la temperatura óptima de extracción, se procedió a la aplicación del método de EFP desarrollado sobre pepitas de uva. Para determinar la repetibilidad del método se realizaron extracciones sobre alícuotas de la misma muestra. Se obtuvo que, para catequina, la desviación estándar relativa del método es del 3,21%, y para epicatequina fue del 2,96% (n=5).

Podemos concluir que la aplicación de la EFP permite la determinación de catequina y epicatequina en muestras reales con métodos de extracción rápidos (10 minutos) y reproducibles. La degradación que ambos compuestos sufren a 130 °C no resulta ser significativa y por ello se puede emplear esta temperatura durante la extracción de dichos compuestos.

III.2.3 Evaluación de las catequinas potencialmente extraíbles de pepitas de uva mediante EAU

Con este apartado lo que se pretendía es obtener información sobre los niveles de catequinas que podrían ser extraídos a partir de las pepitas durante la posterior vinificación, por sus implicaciones en la calidad de los vinos obtenidos. Estas catequinas, que se extraen durante el proceso de maceración sólido-líquido desarrollada durante la fermentación, lo hacen fundamentalmente a partir de la superficie de las pepitas.

La técnica de EAU, junto con el empleo de metanol (con la que se obtienen buenos resultados en la EAU de estos compuestos¹¹), proporciona una alternativa rápida y sencilla, que nos permite acelerar el proceso de extracción producido durante la vinificación. De esta forma este método rápido tiene dos ventajas, por un lado, se minimizan los procesos de degradación a los que son especialmente susceptibles las catequinas (oxidación), y por otro, es posible analizar gran número de muestras, tal como nos interesa en nuestro caso, puesto que se pretende además conocer cual es la evolución de estos compuestos a lo largo del periodo de maduración.

Como muestras se utilizan las pepitas tomadas a lo largo del periodo de maduración del año 2002 de las siguientes variedades de uva: Traminer (TRM), Palomino Negro (PNN), Chardonnay (CHA), Sauvignon Blanc (SBL), Syrah (SYR), Tempranillo (TMP), Palomino riego (PNR), Palomino (PNO), Moscatel de grano pequeño ó Frontignan (MGP), Moscatel de Málaga o Alejandría (MAL), Cabernet Sauvignon (CBS), Viura (VIU), Vijiriega (VIJ), Garrido (GRR), Tintilla de Rota (TTR) y Graciano (GRA).

Con el conocimiento de la evolución de la concentración de catequinas fácilmente extraíbles de las pepitas se pretende proporcionar al enólogo información que le permita evaluar las consecuencias que tendría la elección de una determinada fecha de vendimia, para que de esa forma pueda, si es necesario, establecer a tiempo las acciones correctoras que considere más adecuadas. Esto es, si, por ejemplo, en la vinificación de una uva blanca tras evaluar los parámetros habituales de control en maduración se decide adelantar la fecha de vendimia a un punto donde la concentración de catequinas es considerablemente mayor, se podría plantear la realización de operaciones como la hiperoxidación del mosto o bien la aplicación de dosis mayores de dióxido de azufre, que permitan controlar el desarrollo de oxidaciones en el mosto.

En definitiva, no se pretende aquí añadir otro parámetro a controlar para decidir la fecha de vendimia, sino incrementar la información disponible para el enólogo a la hora de la planificación de las tareas a realizar durante el proceso de vinificación.

Las extracciones se realizan de la siguiente forma: se empleó como disolvente el MeOH, a 60°C, durante 15 minutos y con una cantidad de muestra de 3 pepitas enteras (entre 0,10-0,15 g).

Los extractos se analizan con el método de CLAE optimizado en el apartado anterior y los resultados obtenidos son los presentados en las tablas 3 y 4.

	-56días	-49días	-42días	-35días	-28días	-21días	-14días	-7días	Vend.	Fecha vend.
TRM				2,01		1,72	0,51	0,12	0,17	01-ago
PNN						0,70	n.d.	0,41	0,32	01-ago
CHA					4,20	0,00	1,45	0,63	0,86	06-ago
SBL				1,23		0,95	0,65	0,60	0,42	13-ago
SYR		3,50	1,84	1,49	1,28	1,04	0,83		1,11	23-ago
TMP				2,01		1,72	0,51	0,12	0,17	27-ago
PNR		0,10	0,11	0,06	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01	28-ago
PNO			1,19	0,94	0,28	0,33	0,71	0,41	0,25	28-ago
MGP		6,15	1,41	1,40	1,16	0,93	0,00	1,28	0,26	29-ago
MAL		2,32	6,99	6,18	2,25	1,04	0,78	0,62	0,68	29-ago
CBS		6,78	3,78	3,23	1,58	1,32	1,41		1,75	03-sep
VIU			2,69	2,54	0,51	0,31	0,36	0,18	0,21	03-sep
VIJ		3,32		1,93	0,56	0,57	0,44	0,15	0,20	04-sep
GRR	2,94	n.d.	1,73	2,11	0,72	0,40	0,42	0,30		04-sep
TTR		0,29	0,66	5,14	7,00		0,44		0,61	05-sep
GRA		3,34	2,02	2,00	1,15	0,39	0,49		0,12	05-sep

Tabla 3 Concentración de catequina (mg/g) en pepitas muestreadas a lo largo de la maduración.

	-56días	-49días	-42días	-35días	-28días	-21días	-14días	-7días	Vendimia	Fecha vend.
TRM				3,61		2,70	1,01	0,55	0,56	01-ago
PNN						1,41	0,01	0,77	0,67	01-ago
CHA					10,49	0,01	3,38	1,61	2,32	06-ago
SBL				5,03		2,22	2,50	1,66	1,63	13-ago
SYR		6,56	4,92	6,68	5,11	2,87	2,46		3,36	23-ago
TMP				3,61		2,70	1,01	0,55	0,56	27-ago
PNR		0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	28-ago
PNO			1,17	1,08	0,48	0,51	0,93	0,60	0,48	28-ago
MGP		8,06	3,23	2,51	1,93	1,79	0,00	2,00	0,63	29-ago
MAL		1,05	5,49	5,18	2,82	1,60	1,10	1,02	1,22	29-ago
CBS		4,95	4,72	5,15	2,78	2,20	1,91		3,64	03-sep
VIU			2,73	2,52	1,26	0,74	0,59	0,52	0,62	03-sep
VIJ		2,63		2,04	1,78	1,69	1,42	0,44	0,34	04-sep
GRR	5,15	0,01	3,45	4,24	1,96	1,62	1,25	0,71		04-sep
TTR		1,64	1,34	4,45	6,06		0,95		1,18	05-sep
GRA		3,97	4,98	5,60	2,92	1,67	1,99		0,12	05-sep

Tabla 4 Concentración de epicatequina (mg/g) en pepitas muestreadas a lo largo de la maduración.
n.d.: no detectado. Las celdas en amarillo se refieren a muestras no disponibles.

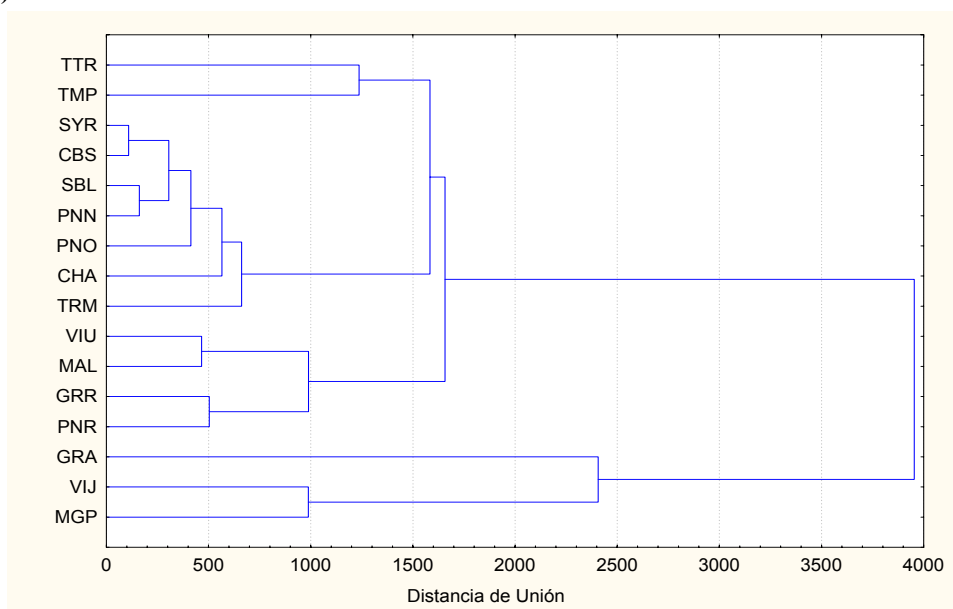
Sobre estas condiciones de extracción concretas hay que indicar que no se han optimizado, sino que han sido adaptadas a partir de los estudios realizados en el grupo de investigación sobre compuestos de estructuras similares y sobre otro tipo de semillas. Como se ha comentado no se pretende una extracción cuantitativa de las catequinas de las pepitas, sino determinar la evolución de la concentración relativa de las mismas en las partes más externas de las pepitas.

El tipo de evolución que muestran las variedades analizadas, en todos los casos, es que a partir de un cierto grado de maduración (entre 21 y 28 días antes de la fecha de vendimia) se produce una disminución apreciable de los contenidos de catequina y epicatequina en las pepitas.

Con el fin de determinar si hay diferencias apreciables en los tipos de comportamiento de las distintas variedades, se realiza un análisis de agrupaciones donde se emplean como variables las evoluciones de catequina y epicatequina. El resultado queda recogido en las figuras 15 a) y b).

En estos dendogramas se puede ver como hay un gran grupo relativamente diferenciado del resto de variedades particulares que presentan un comportamiento distinto, concretamente estas variedades son TTR, TMP, GRA, VIJ y MGP.

a)



b)

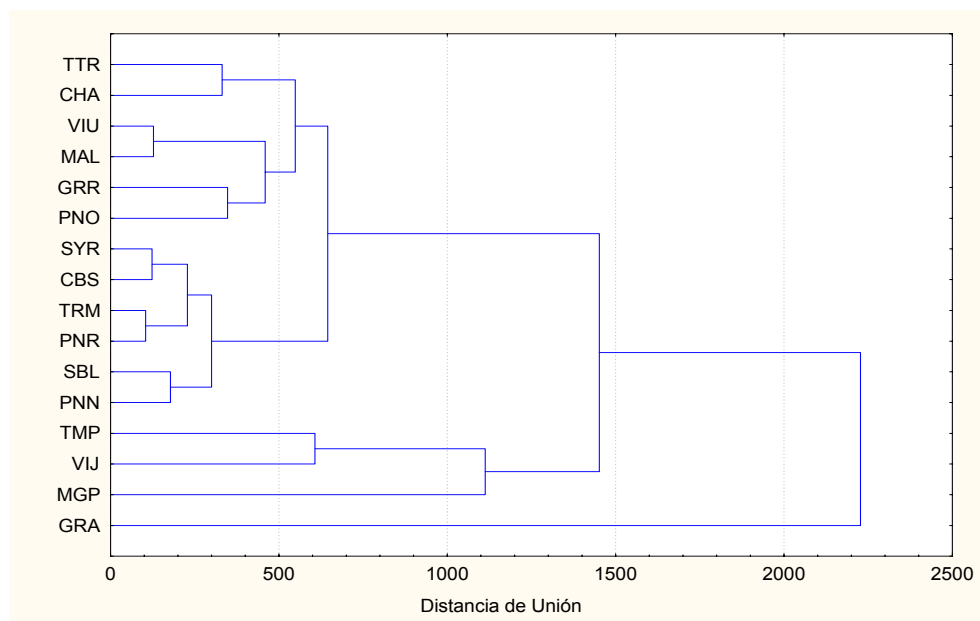


Figura 15 Dendogramas representando los agrupamientos en función de la evolución de catequina (a) y epicatequina (b).

Si se representan los valores medios del grupo formado por SYR, CBS, SBL, PNN, PNO, CHA, TRM, VIU, MAL, GRR y PNR frente a los valores individuales de las otras variedades podemos ver que la diferenciación es clara:

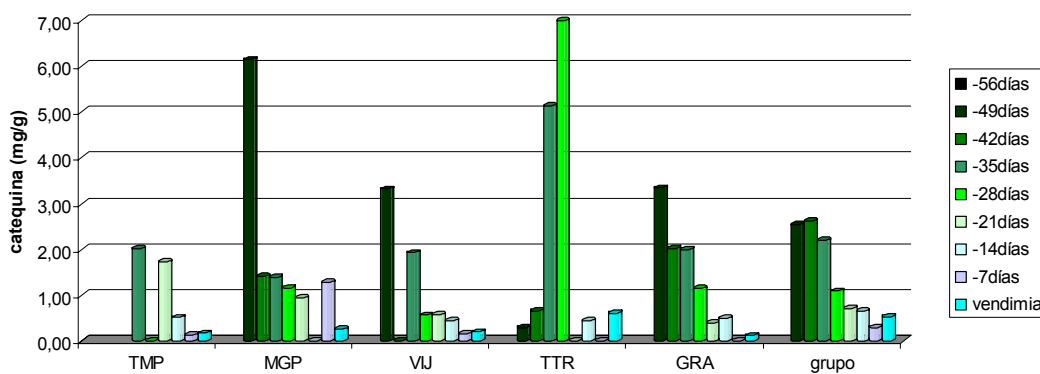


Figura 16 Evolución de catequina en las variedades con el mismo (grupo) y distinto comportamiento.

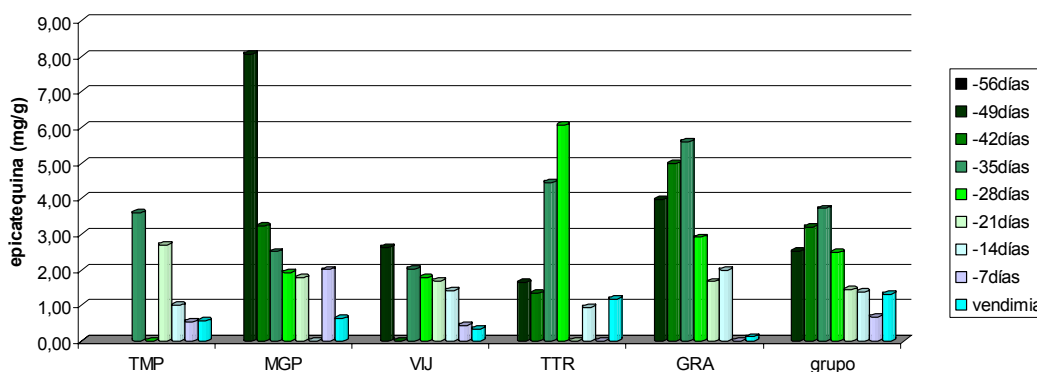


Figura 17 Evolución de epicatequina en las variedades con el mismo (grupo) y distinto comportamiento.

Se puede describir la evolución más general de los valores de catequina y de epicatequina como un ligero incremento hasta unos 45 días antes de la vendimia y posteriormente un descenso acusado hasta unos 20 días antes de vendimia, donde se produce una estabilización de los valores en niveles que rondan los 0,8 mg/g para catequina y los 1,2 mg/g para epicatequina.

En el caso de la variedad TMP (Tempranillo), los valores tanto de catequina como de epicatequina presentan una disminución continuada durante la maduración y la estabilización final se produce en unos niveles inferiores a la media de los valores de las variedades agrupadas. El no registrar el incremento en los primeros muestreos puede deberse a que se produjera con anterioridad al comienzo del muestreo.

La diferencia entre la variedad MGP (Moscatel Grano Pequeño) y la media de las otras variedades se encuentra tanto al principio como al final de la maduración y así los niveles de catequina y epicatequina son alrededor del 100% superiores a la media en el primer punto de muestreo y del 50% en la fecha de vendimia. Además la evolución es un continuo descenso sin que se haya registrado el incremento encontrado al principio de la maduración para otras variedades.

De la misma manera la variedad VIJ (Vijiriega) tampoco muestra el incremento de valores registrado en las otras variedades, en cambio presenta unos niveles de catequina y epicatequina menores durante toda la maduración, además de un descenso continuado que se acentúa al final en la semana cercana a la vendimia.

La variedad TTR (Tintilla de Rota) es la que presenta un comportamiento más diferenciado de las demás, puesto que presenta un incremento tanto para catequina como para epicatequina hasta una fecha más próxima a la vendimia que el resto de variedades. Tras alcanzar un máximo a 33 días de la vendimia luego registra una disminución de ambos parámetros de forma rápida.

La variedad GRA (Graciano) es la única que presenta un comportamiento diferenciado para los dos parámetros. Mientras que la epicatequina registra una evolución similar a la media de las variedades, el comportamiento encontrado para la catequina es totalmente distinto, con una disminución continuada desde el comienzo del seguimiento. Es esta diferenciación entre el comportamiento de catequina y epicatequina lo que hace que esta variedad se diferencia con respecto a las demás.

Tras la caracterización de la evolución de ambos parámetros se ha intentado encontrar alguna correlación entre los niveles de los parámetros analizados y los niveles de los parámetros determinados de forma rutinaria durante la maduración, estos han sido concretamente en este caso: grado Baumé, acidez total, pH, ácido tartárico, peso medio de baya y residuo seco (véase anexo II). A fin de poder determinar si la correlación es posible, se realizó un análisis de conglomerados de variables entre los citados parámetros de rutina y los valores encontrados para catequina y epicatequina, tras realizar la estandarización de los mismos, para evitar de esta manera la influencia de las distintas formas de expresión y unidades.

En el análisis por mínimos cuadrados parciales no se obtuvieron resultados positivos, siendo 0,56 el valor más alto de correlación entre los valores de catequina y epicatequina y los valores de las variables de rutina. Este valor se alcanzó empleando únicamente aquellas variedades que presentan un comportamiento similar en cuanto a evolución de las catequinas, resultando valores inferiores cuando se emplean todas las variedades analizadas en el seguimiento de maduración. Por ello, no es posible estimar los valores de las catequinas disponibles en las variedades analizadas a partir de los datos de los parámetros de rutina.

III.2.4 Influencia de la liofilización en la extractabilidad de catequinas

La disponibilidad de muestras de uva en los seguimientos de maduración se concentra en una época concreta del año (Julio-Septiembre), acumulándose un número considerable de muestras, siendo necesario el almacenamiento y acondicionamiento (desechado) de las muestras para disponer de ellas en el desarrollo del método de análisis.

Existen varias técnicas de desecación posibles: química, térmica y la liofilización. La desecación química implica el empleo de agentes químicos, tales como el sulfato sódico anhidro, pero puede implicar la introducción de contaminantes y supone una mayor manipulación de la muestra. La desecación térmica, aunque es el método más simple, puede producir pérdidas por evaporación o descomposición. La liofilización es una alternativa interesante porque no introduce contaminantes y las posibilidades de degradación son reducidas debido a las bajas temperaturas de operación.

Por este motivo se recurrió al proceso de liofilización y congelación como medio de conservación. La liofilización produce, al eliminar el agua, una concentración de los analitos de interés, pero justamente el hecho de secar la muestra podría afectar al proceso de extracción, por lo que se creyó conveniente evaluar si la liofilización condiciona o no los resultados del proceso de extracción.

Se ha estudiado la influencia de la liofilización en la extracción de diversos compuestos a partir de distintas matrices sólidas, así, se ha comparado el empleo de las microondas frente a la liofilización en la extracción, a partir de material vegetal, de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos¹³; Inakuma y col.¹⁴ evalúan el efecto que la liofilización tiene en la extracción de licopeno (carotenoide) de la piel de tomate, mediante dióxido de carbono supercrítico. También se ha estudiado como influyen distintos métodos de preparación de muestras, entre los que se incluye la liofilización, en el análisis de compuestos fenólicos en hojas de abedul.¹⁵

A la vista de la bibliografía consultada puede deducirse que la posible influencia que la liofilización tenga sobre la extracción de los analitos de interés dependerá, tanto del tipo de muestra a liofilizar, como del analito en cuestión, siendo necesario, por tanto, evaluar en cada caso el efecto que esta etapa puede tener en el análisis.

Para determinar la influencia de este proceso en la extractabilidad de catequinas se realizan extracciones en un baño de ultrasonidos a 60°C (EAU). La duración de la extracción es de 10 minutos y el disolvente empleado es MeOH. A su vez estas extracciones se comparan con las recuperaciones conseguidas cuando se realizan extracciones a la misma temperatura con ayuda de un agitador magnético (EA), de esta forma podemos comprobar si la influencia de la liofilización depende del tipo de extracción a realizar. Todas las extracciones se realizan por duplicado.

Puesto que lo que se pretende es estudiar la influencia que la liofilización tiene en la extracción de los analitos, se realizan extracciones de las muestras (pepitas de uva) antes y después de su liofilización (la cual conlleva una pérdida de peso media del 11,6%).

En el análisis de pepitas de uva (figura 18) los mejores resultados para ambas catequinas se consiguen con el empleo de los ultrasonidos como técnica de extracción y se comprueba que la liofilización de las mismas favorece la extracción en ambos casos, destacando especialmente las recuperaciones obtenidas cuando se realiza la extracción con ultrasonidos de las pepitas liofilizadas.

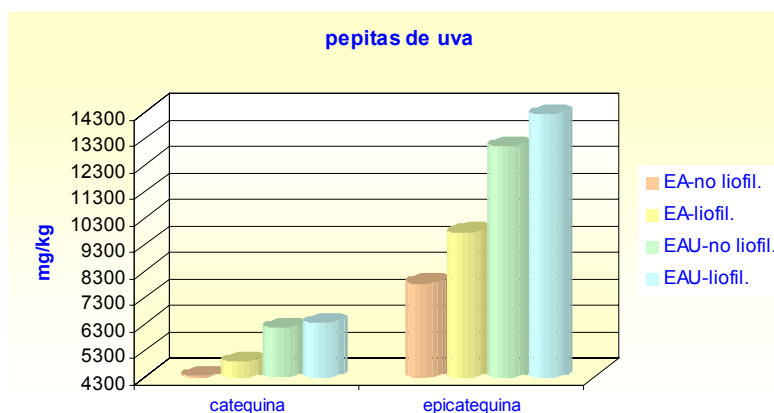


Figura 18 Recuperaciones de catequina y epicatequina obtenidas mediante EAU y EA, a partir de muestras de pepitas de uva, liofilizadas y sin liofilizar.

Podemos concluir que, independientemente de la técnica de extracción empleada, puede evidenciarse que la liofilización previa de las pepitas permite conseguir mayores recuperaciones.

El motivo puede encontrarse en una mayor accesibilidad del disolvente hacia los compuestos a extraer. En cualquier caso, se ha comprobado que la liofilización permite, además de la conservación de las muestras, incrementar las recuperaciones de los compuestos de interés antes que producir degradaciones o pérdidas de analitos.

III.3 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS PRESURIZADOS ACOPLADA CON EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFP-EFS)

En este apartado se procederá al desarrollo de un método de extracción basado en el acoplamiento de una EFP con una EFS con vistas a la obtención de un método selectivo para la determinación de distintos compuestos en uvas.

Para ello se ensayarán distintos disolventes, y condiciones de presión y temperatura, optimizando el método en función del compuesto a analizar (compuestos fenólicos en general, o *trans*-resveratrol en particular). Asimismo, se pondrá de manifiesto la utilidad de esta técnica en el seguimiento de la maduración de uvas.

III.3.1 Introducción

Con el fin de obtener extractos más limpios y para conseguir análisis cromatográficos con menos interferencias se planteó la posibilidad de acoplar una fase semi-sólida dentro de la cámara de extracción de la EFP, con idea de intentar obtener una mejor separación de los analitos del resto de componentes de la muestra sólida a analizar (uvas), especialmente de los azúcares. En el caso de hollejos y pepitas de orujos esta separación no es necesaria debido a la baja concentración de azúcares en las mismas.

Mediante el uso de la EFS, tras una primera EFP, se puede conseguir un mayor grado de selectividad. Se han desarrollado varios métodos de extracción de EFP seguida de una EFS. Sin embargo, la mayoría de ellos llevan a cabo la EFS fuera de la cámara de extracción.^{16,17} Únicamente Müller y col. realizan una etapa de limpieza de aceites, en línea, dentro de la cámara de extracción durante la EFP.¹⁸

Para la determinación de compuestos fenólicos en uvas, vinos y otras bebidas, se han estudiado distintas fases sólidas para la EFS. Los polímeros de estireno-divinilbenceno producen buenos resultados, especialmente si se compara con las fases sólidas basadas en octadecilsílice (C₁₈), que conducen a pobres resultados para aquellos compuestos fenólicos más polares.

Así pues, el principal objetivo de esta investigación es el desarrollo de un método de EFP (puesto que ya se ha comprobado la estabilidad de estos compuestos en la extracción a altas temperaturas)¹ con una etapa de limpieza en línea (EFS), que permita obtener extractos con compuestos fenólicos, pero minimizando la presencia de azúcares en los mismos.

III.3.2 Desarrollo del método para la determinación de compuestos fenólicos¹⁹

La cámara de extracción se prepara, con la fase sólida estudiada en cada caso (LiChrolut EN o PPL) tal se indica en el apartado II.5.4

Antes de llevar a cabo la extracción se debe pasar metanol a través de la fase sólida para activarla, para ello se aplica un método de 3 ciclos de 1 minuto a 40°C y a 40 atmósferas (mínima presión y temperatura admitidas por el equipo).

En primer lugar se determinan las recuperaciones de compuestos utilizando el sistema con la fase sólida. Las pruebas se desarrollan empleando una disolución que contiene ácidos benzoicos, ácidos cinámicos, aldehídos y cumarinas. Primero se utilizó un relleno basado en poliestireno-divinilbenceno (LiChrolut EN), puesto que se encuentran descritos en la bibliografía métodos de EFS empleando este adsorbente con buenos resultados sobre compuestos fenólicos.²⁰ Esta fase sólida presenta interesantes ventajas, concretamente y de forma especialmente interesante, la pérdida de compuestos polares es pequeña en comparación con otras fases sólidas como el C₁₈, clásicamente utilizada en la EFS para la determinación de polifenoles en vinos y otras bebidas.

Para diseñar un método de extracción con una alta selectividad para compuestos fenólicos es necesario determinar el disolvente adecuado para llevar a cabo la extracción, para ello se realizaron extracciones con varios disolventes que cubren un amplio intervalo de polaridades (tabla 5).

Disolventes	Acetato etilo	Agua	Etanol	Éter etílico	Metanol
Cte. dieléctrica	6,02 (25°C)	78,54 (25°C)	24,3 (25°C)	4,34 (20°C)	32,63 (25°C)
Pto. ebullición	77,1°C	100 °C	78,54°C	34,6°C	64,51°C

Tabla 5 Constantes dieléctricas y puntos de ebullición de los disolventes considerados

El metanol ha mostrado capacidad para la extracción de compuestos a partir de matrices similares, sin embargo se ensayaron además los otros disolventes puesto que son habitualmente utilizados para la extracción de polifenoles por maceración, siendo éstos suficientemente solubles en los mismos. El agua se ensayó con idea de probar un disolvente capaz de extraer compuestos polares de la matriz pero con un bajo poder elutrópico del relleno sólido empleado.

Para cada extracción se añadía 1 ml de la mezcla de patrones, sobre la arena situada por encima de la fase sólida, dentro de la cámara de extracción. Para cada disolvente se ensayaron distintas condiciones de extracción, por duplicado, usándose 3 ciclos de 10 minutos a 40 y a 100°C, y con 40 y con 150 atmósferas (para comparar distintas combinaciones de extracción con una temperatura y una presión bajas, y con temperatura y presión altas) dado que hay que tener en cuenta que los cambios de presión, y sobre todo de temperatura, afectan a las polaridades de los disolventes, y, por ello, a sus capacidades elutrópicas. Además no se disponía de datos sobre el comportamiento de la fase sólida en condiciones de alta presión y/o temperatura. A los extractos obtenidos se les añadía el patrón interno y se filtraban inyectándose en el cromatógrafo, excepto en el caso del acetato de etilo y el éter dietílico, que se concentraban hasta sequedad bajo una corriente de N₂ (tras añadir el patrón interno), y se recogían con unos 20 mL de metanol (volumen aproximado de los restantes extractos), antes de filtrar.

Se obtuvieron de esta forma las recuperaciones medias representadas en la figura 19, cuando se realizaron las extracciones a 40°C y 40 atmósferas de presión.

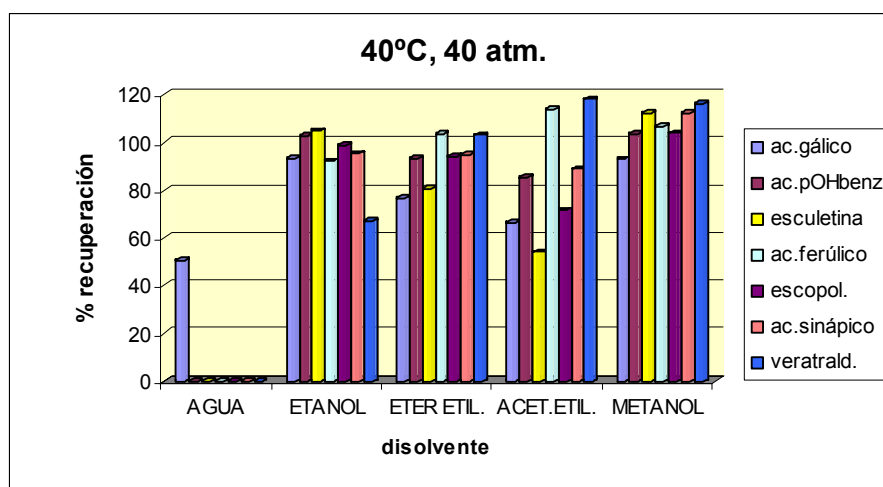


Figura 19 Representación de las recuperaciones obtenidas con los distintos disolventes a 40°C y 40 atmósferas de presión

Estas son las condiciones más suaves de extracción y como puede observarse el agua muestra bajas recuperaciones de la fase sólida usando estas condiciones. Sólo se detecta el ácido gálico en los extractos de agua. Este comportamiento es lógico puesto que este compuesto es el más polar de los compuestos estudiados en este caso y prácticamente el polifenol más polar presente en las muestras reales.

El empleo de etanol como fluido extractante conduce a recuperaciones superiores al 90% para todos los compuestos, excepto para el veratraldehído, donde la recuperación está en torno al 70%.

El metanol produce recuperaciones medias cuantitativas de todos los compuestos considerados, así el porcentaje mínimo de recuperación obtenido es del 93% en el caso del veratraldehído.

Con el acetato de etilo se obtienen distintas recuperaciones medias para los distintos compuestos fenólicos, abarcando, desde una recuperación mínima del 54% para el caso de la esculetina, hasta una máxima de un 118% para el veratraldehído.

En cuanto al éter etílico, se obtienen recuperaciones similares a las conseguidas con el acetato de etilo y con similar tendencia en cuanto al tipo de compuesto fenólico extraído, aunque en general son de mayor magnitud (recuperación media del 90%) que las anteriores, presentando, desde un 76% de recuperación para el ácido gálico, a un 103% para el ácido ferúlico.

Por todo ello podemos deducir que es factible el empleo de etanol, metanol e incluso de éter etílico para la recuperación de compuestos fenólicos retenidos en la fase estacionaria de poliestireno-divinilbenceno a 40°C y 40 atmósferas.

Se ha descrito en la bibliografía^{21,22} que la presión tiene una baja influencia en el poder extractante de los líquidos en la EFP. Sin embargo, como ésta es la primera ocasión en que se acoplan la EFP y la EFS es muy interesante determinar si la presión puede afectar a la retención de los distintos compuestos en la fase sólida.

A continuación se muestran los resultados obtenidos al emplear 150 atmósferas en la extracción a 40°C.

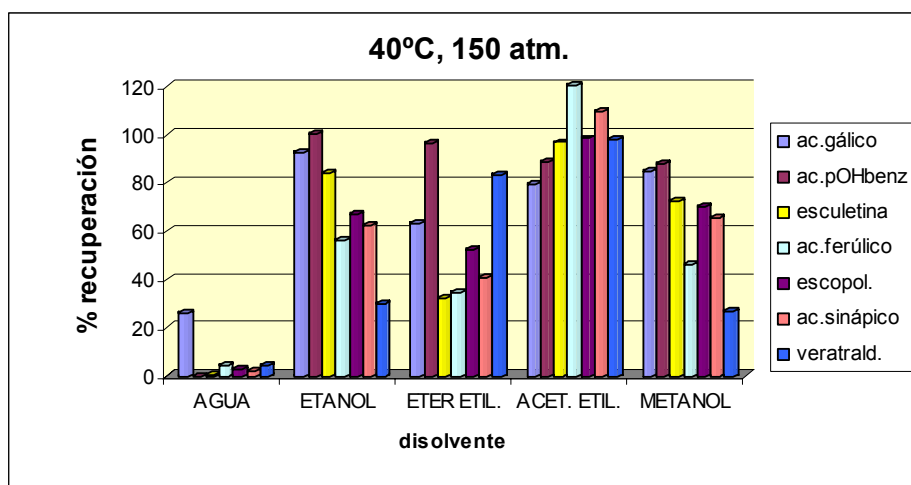


Figura 20 Representación de las recuperaciones con los distintos disolventes a 40°C y 150 atmósferas de presión

En este caso se comprueba que su influencia es realmente alta, así puede verse que las recuperaciones, en general, son menores para todos los fluidos extractantes cuando se emplean 150 atmósferas en lugar de 40 atmósferas a la misma temperatura (figura 20)

El agua sigue logrando bajas recuperaciones: únicamente en el caso del ácido gálico se supera el 25% del mismo, siendo, para el resto de los compuestos, inferiores al 5%.

El mayor poder extractante se consigue con el acetato de etilo, este disolvente es el único de los ensayados que mantiene un poder extractante similar al alcanzado en el experimento anterior. Presenta una media de un 99% de recuperación y tan sólo para el ácido gálico (con un 80%) y el ácido p-hidroxibenzoico (con un 89%) presentan recuperaciones por debajo del 90%.

El resto de los disolventes empleados consiguen, en general, recuperaciones medias inferiores a las conseguidas cuando la presión utilizada, en la extracción a la misma temperatura, es inferior. Así el éter etílico presenta una recuperación media del 57%, y el etanol de un 70%. En los dos casos anteriores, y en el caso del metanol, hay compuestos cuyas recuperaciones no superan el 50%.

Por tanto, el incremento de la presión no mejora las recuperaciones con respecto a las extracciones realizadas a 40°C y 40 atmósferas, tan solo el acetato de etilo presenta unos resultados mejores cuando la presión es de 150 atmósferas. En este caso pensamos que el menor rendimiento de la extracción puede estar relacionado con el desarrollo de caminos preferenciales en el seno de la fase sólida y por tanto, con una insuficiente elución de los polifenoles desde dicha fase. Para explicar esto hay que considerar que cuanto mayor es la presión de trabajo, más brusca es la despresurización de la cámara de extracción, puesto que en el equipo empleado se realiza ésta de forma instantánea desde la presión de trabajo, sea cual sea, hasta presión atmosférica. Y es durante esta despresurización cuando se supone que se forman los canales preferenciales.

A continuación se evaluó el comportamiento del sistema a alta temperatura.

Los resultados obtenidos empleando como condiciones de trabajo 100°C y 40 atm se presentan en la figura 21.

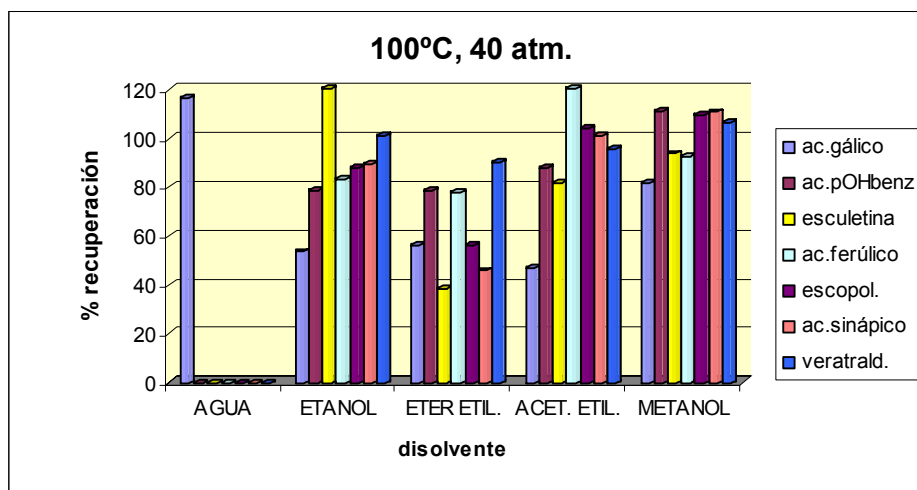


Figura 21 Representación de las recuperaciones con los distintos disolventes a 100°C y 40 atmósferas de presión

Como puede observarse una mayor temperatura produce cambios en el poder elutrópico de los disolventes estudiados. Al aumentar la temperatura se debería producir un incremento de la recuperación desde la fase estacionaria, ya que el incremento de temperatura debe de facilitar la rotura de las uniones entre dicha fase estacionaria y los compuestos retenidos. No es este el caso, al ser la arena un soporte inerte.

Por otro lado, los líquidos calentados por encima de su punto de ebullición presentan propiedades elutrópicas distintas a las mostradas a temperaturas inferiores, puesto que, entre otras propiedades, se modifica su polaridad. Hay que tener en cuenta que las altas temperaturas afectan a la constante dieléctrica de los disolventes, modificando su capacidad de elución de distintos compuestos, de forma que a elevadas temperaturas puede disminuir la constante dieléctrica y por tanto aumentar el poder elutrópico del disolvente, especialmente para los compuestos de menor polaridad.

El agua nuevamente presenta una recuperación alta para el ácido gálico, sin embargo no se detectan más compuestos fenólicos en las extracciones realizadas con este disolvente.

Los otros fluidos extractantes producen, en general, menores recuperaciones para el ácido gálico y p-hidroxibenzoico que en las condiciones previamente ensayadas (a 40°C), aunque se consiguen mejores recuperaciones para otros compuestos, tal como ocurre con el ácido ferúlico y el sinápico (excepto en el caso del éter etílico).

Con metanol se consiguen las mejores recuperaciones, con una media del 101%, de los compuestos de interés (>90% en todos los compuestos, excepto para el ácido gálico) y es el disolvente que presenta un comportamiento más uniforme. El etanol, en cambio, tan sólo permite la recuperación cuantitativa para la esculetina, ácido sinápico y veratraldehído, estando las demás recuperaciones por debajo del 90%.

En el caso del éter etílico, para la mayoría de los compuestos presenta unas recuperaciones bajas, oscilando entre el 46% del ácido sinápico, y el 90% del veratraldehído, y con una media del 63%.

Por último el acetato de etilo, con un 91% de media, presenta menores recuperaciones para el ácido gálico y la esculetina. Podemos concluir que sólo el metanol y, para varios compuestos, el acetato de etilo, resultan eficientes en estas condiciones de extracción.

Los resultados obtenidos trabajando a 100°C y 150 atmósferas se presentan en la figura 22. Con estas condiciones de extracción, el acetato de etilo y el metanol producen recuperaciones medias cuantitativas (>90%) de todos los compuestos estudiados con la excepción del ácido gálico.

El acetato de etilo muestra un comportamiento extractante muy similar al que presenta cuando se emplean como condiciones de extracción 40°C y 150 atmósferas, a diferencia de lo que ocurre en el caso de que se emplee metanol como fluido extractante, ya que, este último extrae mayores cantidades de los compuestos fenólicos en estudio cuando se incrementa la temperatura (llegando a duplicarse la recuperación del ácido ferúlico y a cuadruplicarse la del veratraldehído).

En el caso del etanol la recuperación media fue del 81%, estando sólo el ácido gálico por debajo del 50%, y los restantes compuestos ensayados cercanos o por encima del 80%.

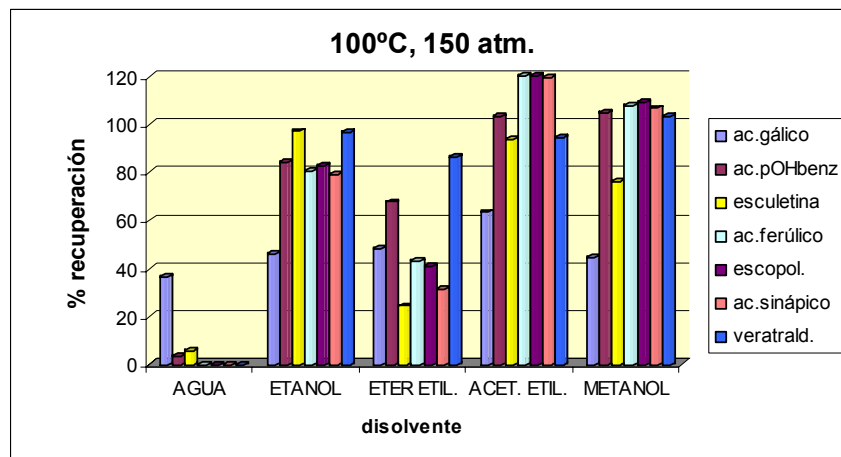


Figura 22 Representación de las recuperaciones con los distintos disolventes a 100°C y 150 atmósferas de presión

El éter etílico volvió a mostrar un comportamiento no satisfactorio con tan sólo un 49% de recuperación media.

El agua extrae únicamente tres compuestos bajo estas condiciones, ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico y esculetina, sin embargo, sólo el ácido gálico tiene una recuperación significativa, del orden del 35%.

Para poder optimizar las condiciones de extracción cuando se acopla una fase sólida a la EFP, es necesario estudiar la influencia de la temperatura y la presión en las recuperaciones de los compuestos fenólicos estudiados. Se puede pensar que un incremento de la temperatura debe facilitar la recuperación de los compuestos tanto desde la muestras como desde la fase sólida. Por el contrario un incremento de la presión de trabajo, puede producir la aparición de caminos preferenciales en la fase sólida en el momento de la despresurización y por tanto una elución poco efectiva de los compuestos retenidos.

Por ello, y con los datos mostrados anteriormente, se ha evaluado la influencia de ambos parámetros de forma independiente.

■ **Influencia de la temperatura:** a continuación se presentan las recuperaciones medias de los compuestos estudiados empleando distintas temperaturas para una misma presión de trabajo:

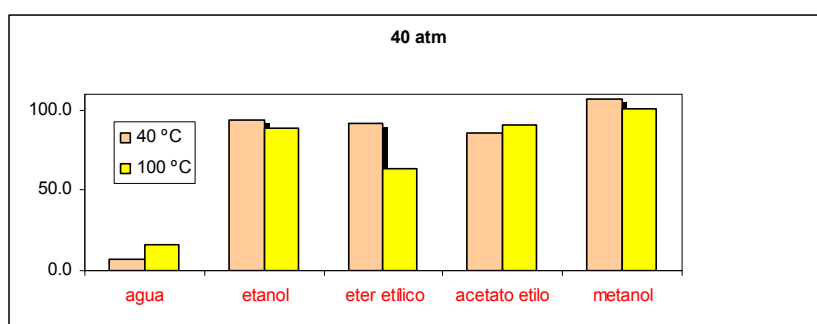


Figura 23 Comparación de las recuperaciones medias con los distintos disolventes a 40 y 100°C con 40 atm. de presión

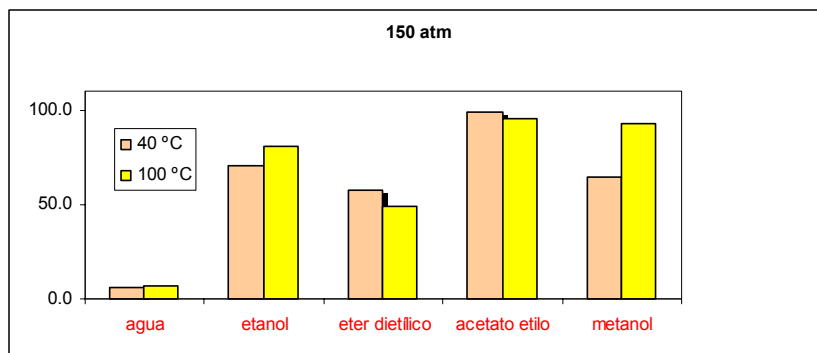


Figura 24 Comparación de las recuperaciones medias a 40 y 100°C con 150 atm. de presión

Como ya se ha comentado en la introducción, la temperatura es la variable con mayor influencia en los procesos de EFP cuando se trabaja con muestras reales. El efecto de liberación de enlaces entre los analitos y la matriz que producen las altas temperaturas es crucial. Sin embargo en el caso de las extracciones aquí presentadas, los compuestos se extraen a partir de un soporte inerte y, por tanto, el efecto de la temperatura, si lo hubiera, debería ser otro. Concretamente hay que suponer que el efecto sobre la constante dieléctrica del disolvente puede afectar a la solubilización de los compuestos en el mismo.

Podemos comprobar que el efecto de la temperatura a presión constante no está muy claro (no existe una tendencia clara, en algunos disolventes aumenta y en otros disminuye, aunque siempre de forma moderada), así en el caso del metanol, al aumentar la temperatura, aumenta la recuperación cuando trabajamos a 150 atmósferas de presión; sin embargo, si se utilizan 40 atmósferas, la temperatura apenas influye en la recuperación, es posible que en este caso el motivo sea que se produce una total recuperación en ambos casos.

En el caso del éter etílico ocurre el efecto contrario, de forma que la recuperación es mayor cuanto menor es la temperatura utilizada cuando se emplean 40 atmósferas de presión, y apenas influye cuando la presión usada es de 150 atmósferas. Esto es probablemente debido a que es el único disolvente de los ensayados que a 40°C ya se encuentra en estado gaseoso fuera de la cámara de extracción.

■ **Efecto de la presión:** a continuación se presentan las recuperaciones medias de los compuestos estudiados empleando distintas presiones con la misma temperatura:

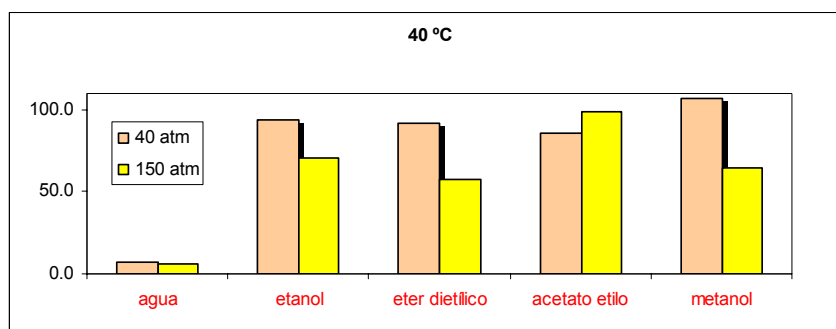


Figura 25 Comparación de las recuperaciones medias a 40°C con 40 y 150 atm. de presión

En aquellas extracciones llevadas a cabo a baja temperatura, cuanto menor es la presión, mayor es la recuperación para la mayoría de los disolventes ensayados, excepto para el caso del acetato de etilo, que muestra el comportamiento contrario. En el caso del metanol, por ejemplo, si se comparan los resultados obtenidos a 40°C, se comprueba que se obtuvieron menores recuperaciones cuanto mayor es la presión, pasando de una recuperación media del 105% a 40 atmósferas, a una del 65% a 150 atmósferas.

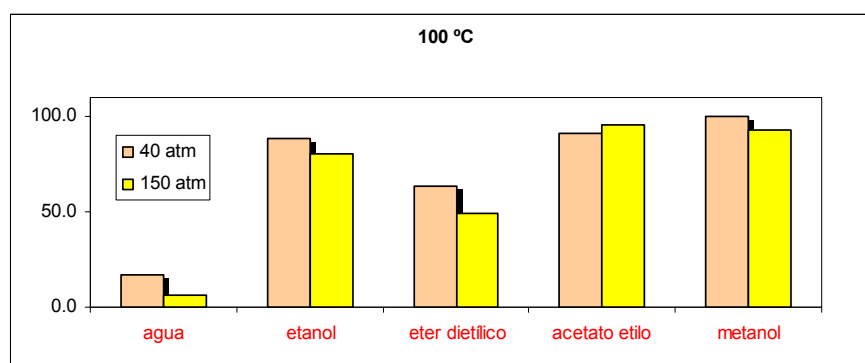


Figura 26 Comparación de las recuperaciones medias a 100°C con 40 y 150 atm. de presión

Cuando se usan altas temperaturas, la presión muestra una influencia pequeña en las recuperaciones, así en el caso del etanol las recuperaciones medias pasan de un 88% a un 81%, las del éter etílico de un 63% a un 49% o las de metanol de un 100,6% a un 93,2%.

Una vez que se ha estudiado el poder extractante de cinco disolventes distintos, y la influencia de la temperatura y de la presión en la capacidad de recuperación de distintos compuestos fenólicos cuando la EFP se acopla con una fase sólida, podríamos seleccionar, a la vista de los resultados, como mejores alternativas para la extracción de compuestos fenólicos en muestras reales (uvas), el empleo de agua y metanol sucesivamente.

Con el agua se ha comprobado que apenas existen recuperaciones de los compuestos fenólicos (excepto del ácido gálico, lo cual es debido a su polaridad), por lo que podríamos extraer en primer lugar con agua, para eliminar los compuestos más polares presentes en la matriz de la muestra sólida, tales como azúcares, lo que nos

permitiría obtener el extracto posterior de los compuestos de interés. Tras la extracción con agua se emplearía el metanol. Como ya se ha visto, con este disolvente se consiguen recuperaciones cuantitativas de todos los compuestos fenólicos estudiados retenidos en la fase sólida. El metanol presenta además la ventaja de que los extractos se pueden concentrar fácilmente bajo corriente de N₂ a temperatura ambiente (método de concentración más adecuado para los compuestos de este tipo). De esta forma se pueden disminuir los límites de detección y de cuantificación del método de análisis.

Con esta propuesta, en principio, entre los compuestos ensayados el único problema lo va a presentar el ácido gálico, que se pierde parcialmente durante la extracción con agua, por ello, y ante la imposibilidad de la retención de la totalidad de este compuesto en la fase sólida ensayada, se ensayó una nueva fase sólida, también del tipo estireno-divinilbenceno, denominada comercialmente PPL (Bond Elut PPL, Varian, California).

Se ensayaron las condiciones en las que la EFS no presentaba buenos resultados, concretamente utilizando agua como disolvente (puesto que lo que nos interesa es reducir las pérdidas de los compuestos fenólicos más polares) a 40 y a 100°C, y con 40 atmósferas de presión.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

% RECUPERACIÓN CON FASE SÓLIDA PPL

Compuesto	40°C, 40 atm	100°C, 40 atm
Ác. Gálico (1)	88,3	77,2
p-OHbenzoico (2)	17,7	50,7
Esculetina (3)	4,3	7,6
Ác. Ferúlico (4)	0,0	0,0
Escopoletina (5)	6,3	6,3
Ác. Sinápico (6)	6,2	6,0
Veratraldehído (7)	0,0	0,0

Tabla 6 Porcentajes de recuperación de los compuestos de referencia usando como fase sólida la PPL con distintas condiciones de extracción

A continuación se comparan las recuperaciones conseguidas con la fase sólida PPL, y con la LiChrolut EN, en las mismas condiciones de presión y temperatura usando agua como fluido extractante:

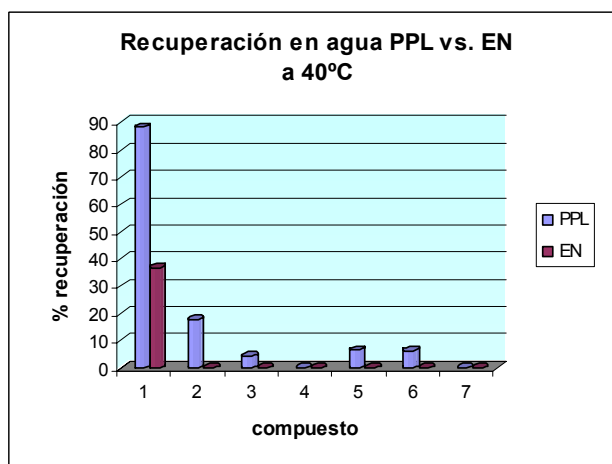


Figura 27 Comparación de la recuperación en agua con PPL o EN a 40°C

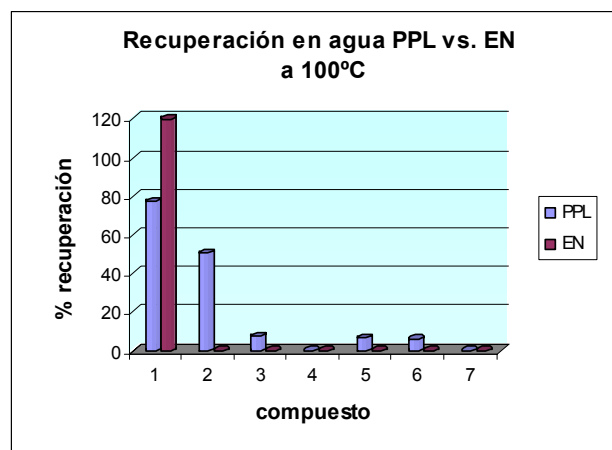


Figura 28 Comparación de la recuperación en agua con PPL o EN a 100°C

Así pues se comprobó que el Bond Elut PPL, además de permitir la recuperación/pérdida del ácido gálico, conduce a la recuperación, aunque en pequeños porcentajes, de otros compuestos estudiados, por lo que no presentaba ventaja alguna frente al LiChrolut EN.

Como conclusiones de este apartado cabe destacar:

- El acoplamiento EFP-EFS es posible y permite la recuperación cuantitativa de todos los polifenoles ensayados salvo del ácido gálico.
- Con el sistema acoplado EFP-EFS la presión pasa a tener un papel importante en el sistema de EFP. Esto que puede en ocasiones ser un inconveniente, al tener que ajustar otro parámetro experimental, se puede usar para incrementar la selectividad de los métodos de extracción, que es uno de los grandes retos de la EFP.

III.3.3 Diseño del método EFP-EFS

Con todo lo visto hasta el momento, y teniendo como objetivo el diseño de un método acoplado de EFP-EFS que permita, en una primera etapa, la limpieza de la muestra, y en una segunda, la elución efectiva de los polifenoles, además de una extracción adicional, se consideran como mejores condiciones de trabajo las siguientes:

a) primera etapa: limpieza/extracción/retención:

El único disolvente que puede satisfacer los requerimientos de extracción con la menor pérdida posible de compuestos fenólicos es el agua, puesto que con cualquier otro, la pérdida de compuestos es sustancialmente mayor.

De entre las condiciones de presión y temperatura evaluadas, las más adecuadas son: 40°C y 150 atmósferas.

b) segunda etapa: extracción/elución:

El mejor disolvente es el metanol y las mejores condiciones 100°C y 40 atmósferas. Si comparamos las recuperaciones obtenidas con metanol con las distintas condiciones de extracción ensayadas, las condiciones que conducirían a las mayores recuperaciones de todos los compuestos fenólicos estudiados serían de 40°C y 40 atmósferas.

Sin embargo seleccionamos como las óptimas las de 100°C y 40 atmósferas porque en la EFP cuanto mayor es la temperatura mejor es la extracción a partir de muestras sólidas y hemos de considerar que lo que pretendemos es desarrollar un método para la extracción de los compuestos fenólicos a partir de muestras sólidas (uvas, ..), de forma que aunque las recuperaciones de escopoletina y gálico son algo menores que a 40°C, con los 100°C la extracción sobre muestras reales se verá más favorecida y además se ha comprobado que en esas condiciones las recuperaciones de todos los compuestos son superiores al 90%, salvo para el caso ya comentado del ácido gálico.

Así pues para el análisis de compuestos fenólicos en muestras sólidas (uvas) mediante EFP-EFS, el método consta de dos etapas y se desarrollaría de la siguiente forma:

- Primera etapa: proceso extracción/retención

Los compuestos fenólicos son extraídos de la muestra y retenidos en la fase sólida. Los compuestos más polares atraviesan la fase sólida con el líquido extractante, mientras que los compuestos menos polares quedan retenidos en ella. Como líquido extractante se utiliza agua.

Se realiza una purga con nitrógeno para eliminar todo el líquido que quede de esta primera etapa antes de llevar a cabo la segunda.

- Segunda etapa: proceso extracción/lavado

Se extraen compuestos adicionales de la muestra. Simultáneamente todos los compuestos fenólicos retenidos en la fase sólida son liberados por el líquido extractante, en esta etapa metanol, recogándose sobre el vial de recolección.

De esta forma los compuestos fenólicos estarán en el segundo extracto, mientras que los compuestos más polares de la muestra no estarán en él, sino en el primer extracto, incluyendo el ácido gálico. El esquema del proceso se muestra en la siguiente figura:

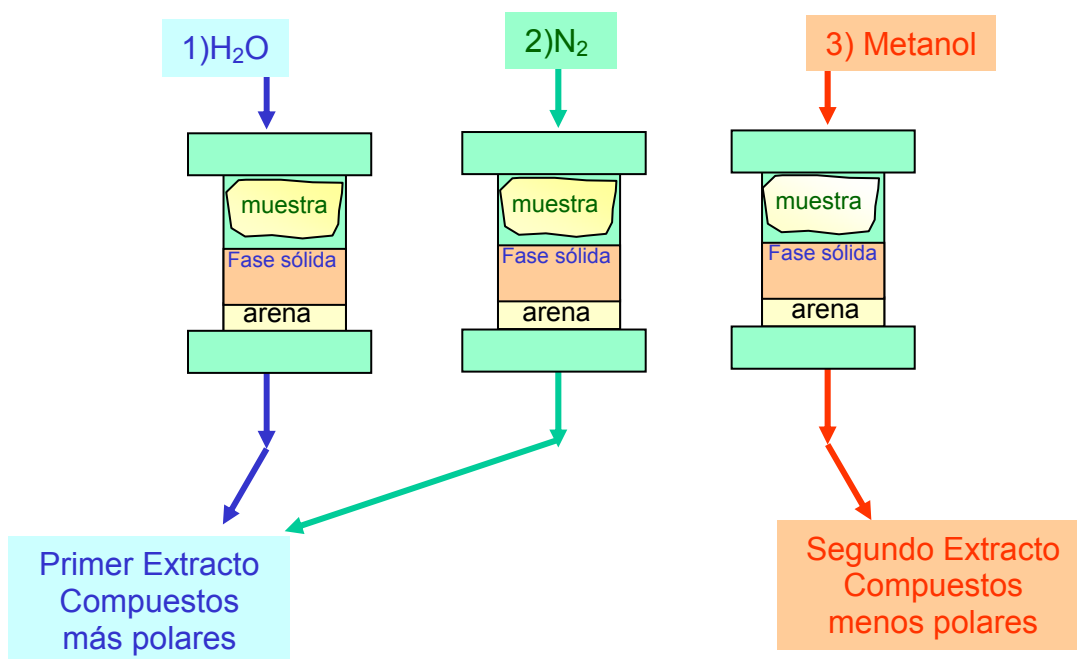


Figura 29 Representación esquemática del método de extracción desarrollado

III.3.4 Metodología

Se realizan 2 extracciones consecutivas, primero con agua y después con metanol, de 3 ciclos de 10 minutos, a 40°C y 150 atmósferas, y a 100°C y 40 atmósferas respectivamente, aumentando el tiempo de purga al máximo admitido por el equipo (300 seg) para conseguir que el relleno quede lo más seco posible.

Tanto al extracto obtenido con agua como al de metanol se le añade el patrón interno, se filtran y se analizan por CLAE (apartado II.3.2.1)

La fase sólida, una vez completados los dos ciclos de extracción, debe lavarse para poder volver a utilizarse, para ello se define un método de lavado que consiste en 1 ciclo de extracción de 5 minutos con metanol, con 300 segundos de purga, para garantizar que el relleno está limpio y seco para la siguiente extracción. Los lavados con metanol fueron analizados, no detectándose en ellos restos de los compuestos fenólicos.

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos de los extractos, acuoso y metanólico, resultantes de la aplicación del método desarrollado. Puede comprobarse que en el extracto acuoso únicamente aparece el ácido gálico, apareciendo el resto de los compuestos fenólicos ensayados en el extracto metanólico.

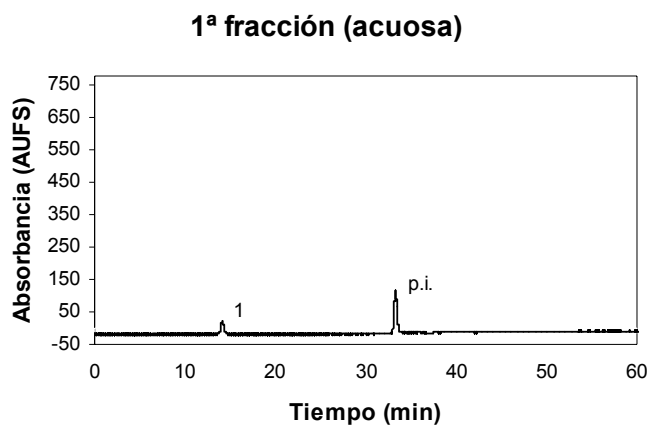


Figura 30 Cromatograma a 280 nm del extracto acuoso de la disolución de patrones empleada. 1: ácido gálico, p.i. : patrón interno (2,5-dihidroxibenzaldehído).

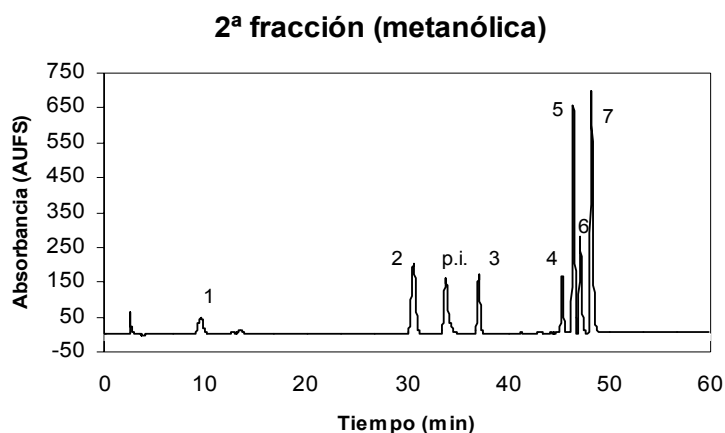


Figura 31 Cromatograma a 280 nm del extracto metanólico de la disolución de patrones empleada. 1: ác. gálico, 2: ác. p-hidroxibenzoico, p.i.: patrón interno, 4: esculetina, 5: ác. ferúlico, 6: escopoletina, 7: ác. sinápico.

III.3.5 Características del método

Se realizaron cuatro aplicaciones del mismo método en días distintos y con referencias diarias para la misma disolución, y se determinó el porcentaje de recuperación de cada compuesto estudiado respecto de la referencia, los resultados son los siguientes:

Compuesto	extracc.1	extracc.2	extracc.3	extracc.4	Media	D.E.R.
Ác. gálico	76,2	61,0	58,6	61,3	64,3	13,1
pOHbenzoico	96,3	99,3	98,7	101,9	99,1	2,2
Esculetina	98,4	93,0	100,6	104,0	99,0	4,4
Ác.ferúlico	93,5	97,0	96,1	94,8	95,4	1,6
Escopoletina	91,6	92,6	93,4	94,8	93,1	1,4
Ác.sinápico	93,9	93,3	95,8	91,0	93,5	2,2
Veratraldehido	91,7	93,6	93,3	91,4	92,5	1,2

Tabla 7 Repetibilidad del método: porcentajes de recuperación y desviación estándar (n=4).

Hay que destacar que la repetibilidad del método de extracción es muy buena. La repetibilidad es una propiedad analítica que se ve muy afectada por los procesos de extracción dentro de los métodos de análisis. En este caso permanece en valores inferiores al 5% de D.E.R. para todos los compuestos ensayados, salvo el ácido gálico.

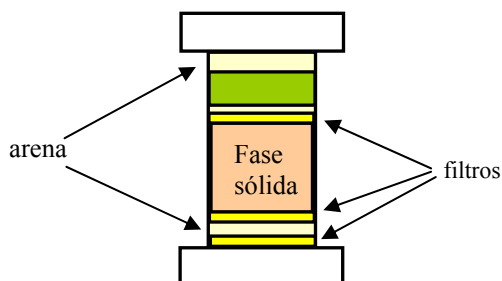
III.3.6 Aplicación a muestras reales (uvas liofilizadas)

III.3.6.1 Para la determinación de compuestos fenólicos

Este método se ha empleado sobre uvas de las variedades Viura (blanca) y Tempranillo (tinta) para la determinación de compuestos fenólicos.

La preparación de muestras de uva se realiza tal como se indica en el apartado II.5.2, obteniendo de esa forma uvas liofilizadas y separadas de las pepitas.

La preparación de la cámara de extracción se lleva a cabo según el esquema siguiente:



Hay que destacar que el interés de no mezclar la fase sólida con la arena o la muestra reside en que tras cada extracción y lavado de la misma puede volver a utilizarse para otras extracciones.

A su vez se hacen extracciones similares (mismas condiciones, disolventes y cantidad de muestra) pero empleando arena como soporte para comparar los resultados con el acoplamiento de la EFP con una fase sólida.

Tras filtrarlos por un filtro de nylon de 0,45 micras, se analizan en el equipo de CLAE. Los cromatogramas de los extractos obtenidos por EFP-EFS se comparan con los obtenidos mediante la EFP en las mismas condiciones y con la misma cantidad de muestra pero usando arena como soporte de la misma, puede observarse como los extractos acuosos obtenidos con la EFP presentan varios compuestos, en cambio los obtenidos con la EFP-EFS apenas presentan señales.

En el caso de los extractos con metanol, con la EFP aparecen pocos compuestos y con la EFP-EFS además de aparecer todos los que aparecen en el extracto acuoso de la EFP, aparecen en mayor número y con señales más intensas.

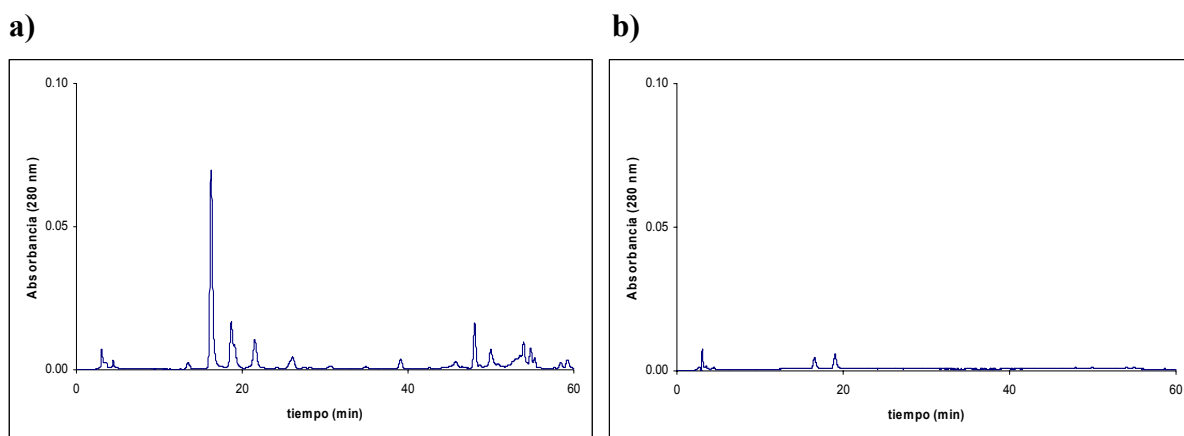


Figura 32 Cromatogramas de los extractos acuosos sobre arena (a) y sobre la fase sólida (b) de la variedad Napoleón.

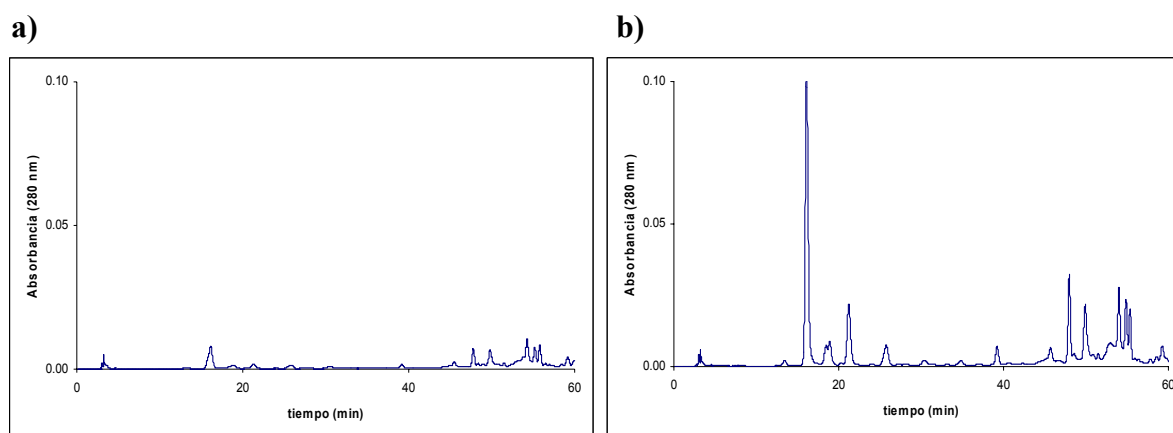


Figura 33 Cromatogramas de los extractos metanólicos sobre arena (a) y sobre la fase sólida (b) de la variedad Napoleón

Como puede comprobarse, gracias al empleo de la fase sólida en la EFP-EFS, los compuestos de interés aparecen mayoritariamente en los extractos metanólicos, lo que nos proporciona la ventaja de que dichos extractos pueden concentrarse permitiendo disminuir los límites de detección/cuantificación.

Utilizando la biblioteca de espectros desarrollada por el grupo de investigación, se puede realizar la identificación de algunos de los compuestos presentes en las uvas, así se puede detectar la presencia de los tres ésteres cinámicos mayoritarios en las uvas durante la maduración: caftárico, *trans*-cutárico y *cis*-cutárico, así como de catequina y epicatequina.

Asimismo empleando las rectas de calibrado (tabla 8) de los ácidos cinámicos correspondientes a dichos ésteres (ácidos cafeico y p-cumárico) y aplicando el coeficiente de corrección molar, puesto que no hay patrones de los mismos disponibles comercialmente, se puede cuantificar esos compuestos fenólicos en la uva de partida a partir del análisis por CLAE de los extractos metanólicos filtrados (tabla 9). Para la determinación de catequina y epicatequina se emplea la detección por fluorescencia, puesto se necesita un método de detección más sensible que la espectroscopia UV-Vis (seleccionándose, tras hacer el barrido de los espectros de ambos patrones, como longitudes de onda de excitación 280 nm y de emisión a 310 nm).

También se puede detectar en los cromatogramas de dichas muestras la presencia de galatos, epigalocatequingalato o epicatequingalato (sin ser posible su identificación completa), aunque por debajo de los límites de cuantificación.

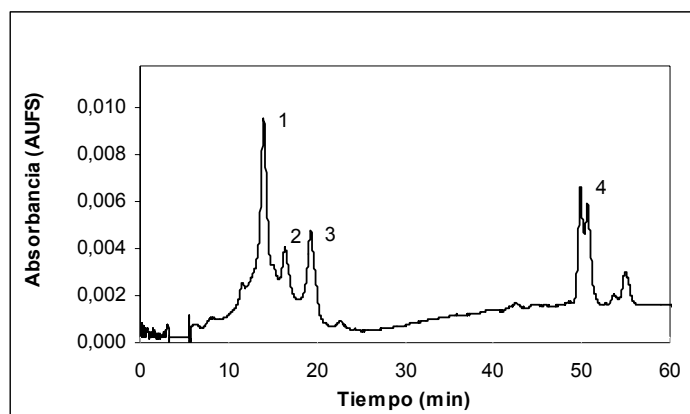


Figura 34 Cromatograma a 320 nm del extracto metanólico sobre la fase sólida de la variedad Viura. 1: ácido caftárico, 2: ácido cis-cutárico, 3: ácido trans-cutárico, 4: compuesto tipo galato.

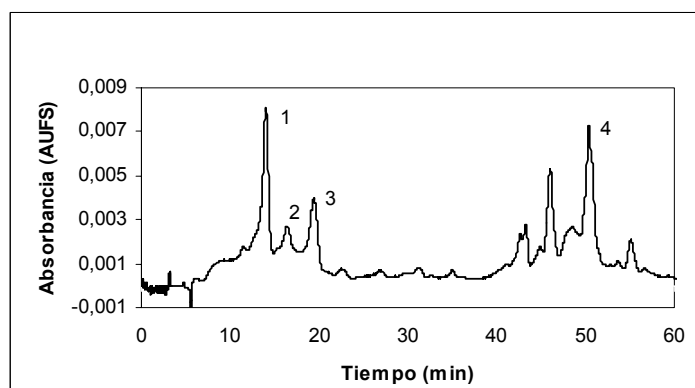


Figura 35 Cromatograma a 320 nm del extracto metanólico sobre la fase sólida de la variedad Tempranillo. 1: ácido caftárico, 2: ácido cis-cutárico, 3: ácido trans-cutárico, 4: galato.

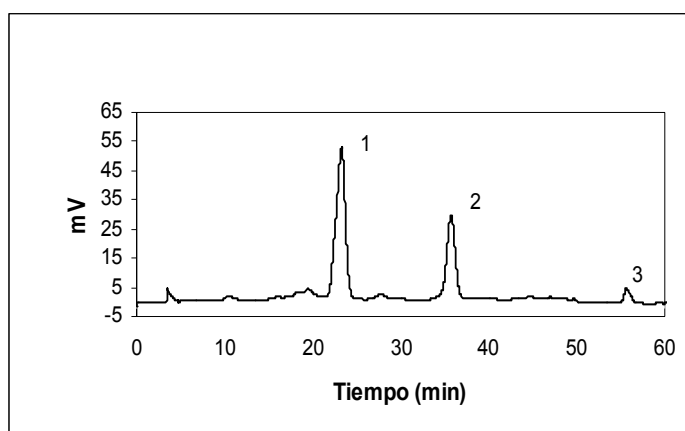


Figura 36 Cromatograma de fluorescencia del extracto metanólico sobre la fase sólida de la variedad Viura. 1: catequina, 2: epicatequina, 3: trans-resveratrol.

Compuesto	ordenada	pendiente	intervalo ppm	LD	LC
<i>Trans</i> -cutárico	4796,4	235008	0,115-1,15	0,051	0,170
Caftárico	-9708,4	322515	0,103-1,03	0,037	0,125
<i>Cis</i> -cutárico	2497,1	242543	0,115-1,15	0,042	0,139
Catequina*	-169026	1000000	0,548-5,48	0,183	0,609
Epicatequina*	-271924	1000000	0,744-7,44	0,207	0,689

Tabla 8 Rectas de calibrado empleadas para cuantificar los ésteres cinámicos, así como la catequina y epicatequina. *: detección por fluorescencia.

Compuesto	Viura vendimia	Tempranillo vendimia
<i>Trans</i> -cutárico	3,06 mg/kg uva	3.84 mg/kg uva
Caftárico	9,79 mg/kg uva	13,96 mg/kg uva
<i>Cis</i> -cutárico	3,08 mg/kg uva	3,38 mg/kg uva
Catequina	93,35 mg/kg uva	78,99 mg/kg uva
Epicatequina	111,45 mg/kg uva	45,64 mg/kg uva

Tabla 9 Cuantificación de ésteres cinámicos, catequina y epicatequina en muestras de vendimia

Además se determinó la reproducibilidad del método al realizar 4 extracciones de la misma muestra de uva (concretamente de la muestra de Viura muestreada el 13-8-01) en distintos días:

Compuesto	Media	D.E.R.
<i>Trans</i> -cutárico	3,65 mg/kg	11,13
Caftárico	9,99 mg/kg	9,67
<i>Cis</i> -cutárico	3,18 mg/kg	5,88
Catequina	173,62 mg/kg	10,26
Epicatequina	129,57 mg/kg	4,8

Tabla 10 Reproducibilidad de la EFP-EFS sobre muestras reales para polifenoles en general

Como puede comprobarse este método aplicado sobre muestras reales tiene una reproducibilidad aceptable, con un máximo de desviación estándar relativa de un 11% para el caso del *trans*-cutárico.

Asimismo, se realizaron reextracciones de las muestras tras llevarse a cabo la segunda etapa (elución con metanol) del método. Se emplearon para ello las mismas condiciones que en dicha etapa. No se detectaron compuestos fenólicos en los re-extractos.

Así pues, con el acoplamiento, en línea, de la EFP con la EFS, se consiguen extracciones satisfactorias de compuestos fenólicos a partir de uvas. La etapa de limpieza en línea se puede aplicar automáticamente y el método de extracción se desarrolla completamente bajo atmósfera inerte. Además este acoplamiento conduce a una menor manipulación de las muestras, y por tanto, a menores probabilidades de degradación de los compuestos extraídos.

III.3.6.2 Seguimiento de la maduración de uvas

El estudio de maduración de la uva tiene un interés claro, como es el conocimiento de la evolución de compuestos de interés y la determinación de la fecha óptima de vendimia, siendo varios los parámetros que interesa controlar durante el seguimiento de la maduración de la uva, entre los que destacan los compuestos fenólicos por su implicación en fenómenos de configuración del color, inestabilidad oxidativa, etc..., teniendo especial interés los ésteres cinámicos, así como la catequina y epicatequina.²³

Así, la determinación de la catequina, epicatequina y de los ésteres cinámicos *trans* y *cis*-cutárico y caftárico, son de especial importancia en el caso de la vinificación de vinos blancos, puesto que al hidrolizarse durante el proceso de elaboración del vino, liberan los correspondientes ácidos cinámicos que son especialmente susceptibles a la oxidación.

Se realizan extracciones de las distintas muestras tomadas durante el periodo de control de la maduración de las variedades de uva antes mencionadas, con el método desarrollado en el apartado III.3.4.

Los resultados obtenidos son los presentados en la figura 37.

Hay que destacar la ausencia de compuestos en los extractos obtenidos con EFP-EFS con agua, salvo una mínima cantidad (muestras 6/8 y 21/8).

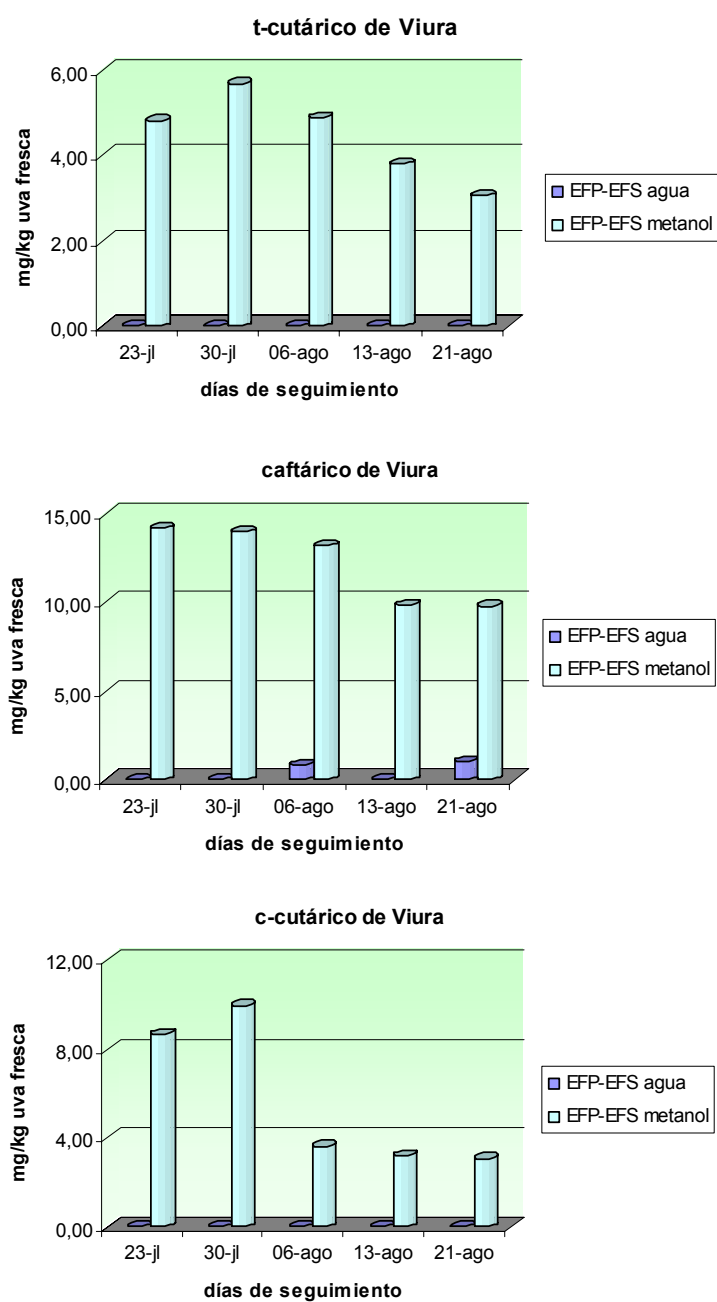


Figura 37 Esteres extraídos en la variedad blanca Viura durante la maduración.

Para seguir la evolución de estos ésteres durante la maduración se considerarán los extractos metanólicos sobre la fase sólida, puesto que a partir de ellos se determinará su concentración en la uva de partida de forma más fiable que los equivalentes extractos acuosos sobre arena (en los que aparecen los ésteres de interés) donde la presencia de otras sustancias en el extracto impide su cuantificación fiable.

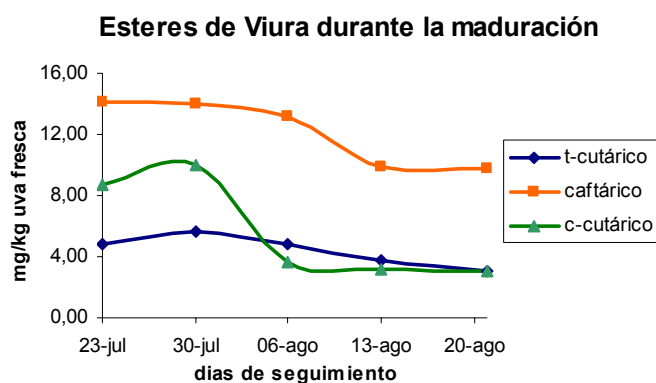


Figura 38 Evolución de los ésteres de la variedad Viura durante la maduración.

La evolución de los ésteres durante la maduración (con condiciones de elevada insolación, altas temperaturas, baja humedad, y precipitaciones prácticamente nulas) es similar para los tres, se produce la disminución de su concentración, probablemente debido a la hidrólisis de los mismos.

Para la vinificación de esta variedad sería interesante que la concentración de estos compuestos fuera la mínima posible puesto que después pueden provocar problemas de pardeamiento en los vinos acabados, por lo que en principio la fecha de vendimia es concorde con esta idea, ya que prácticamente se estabiliza su evolución en esa fecha.

La fecha de vendimia se decidió al considerar otros parámetros básicos, tales como el °Baumé, el peso medio de la baya, la acidez total, el pH y el ácido tartárico.

La evolución de estos parámetros ha sido la siguiente:

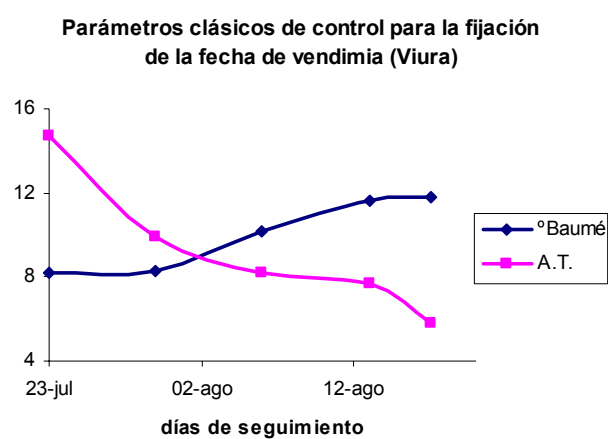
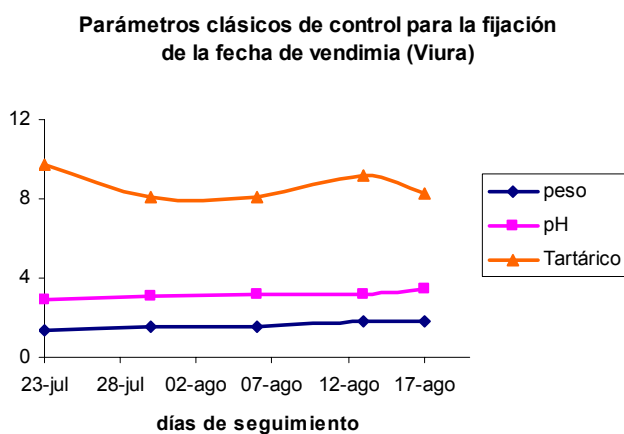


Figura 39 Evolución de los parámetros clásicos de control para la fijación de la fecha óptima de vendimia de la variedad Viura

Respecto a la variedad tinta Tempranillo, los resultados fueron los siguientes:

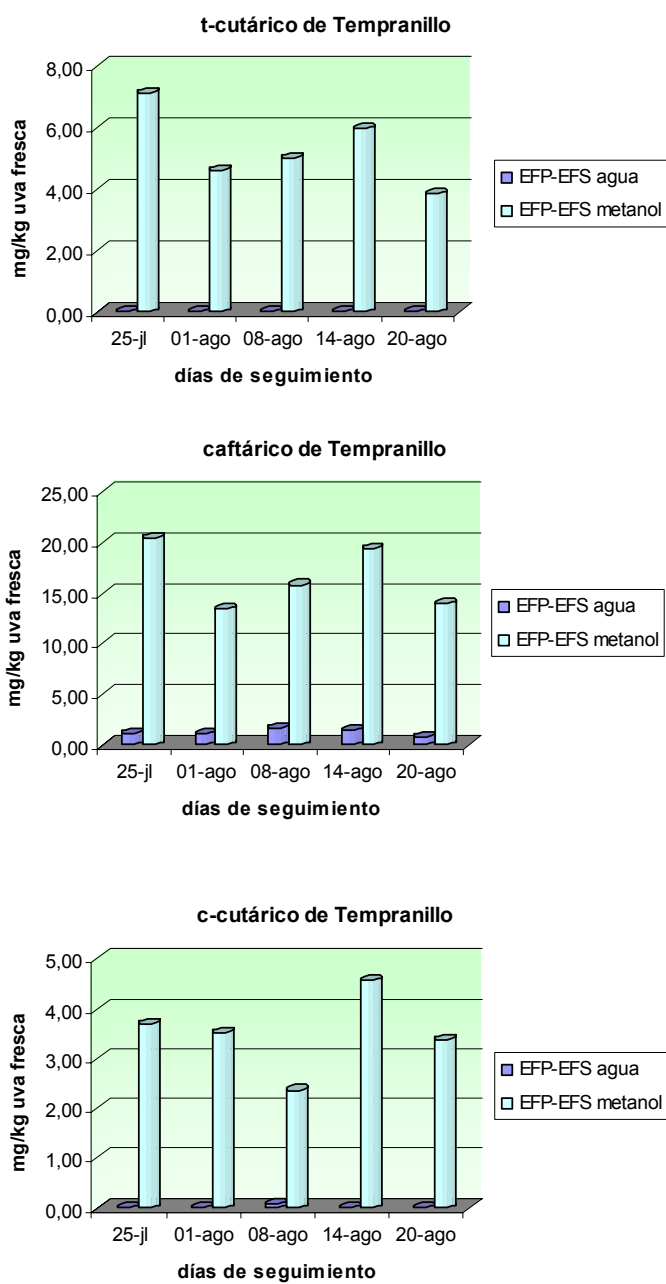


Figura 40 Esteres extraídos en la variedad tinta Tempranillo durante la maduración.

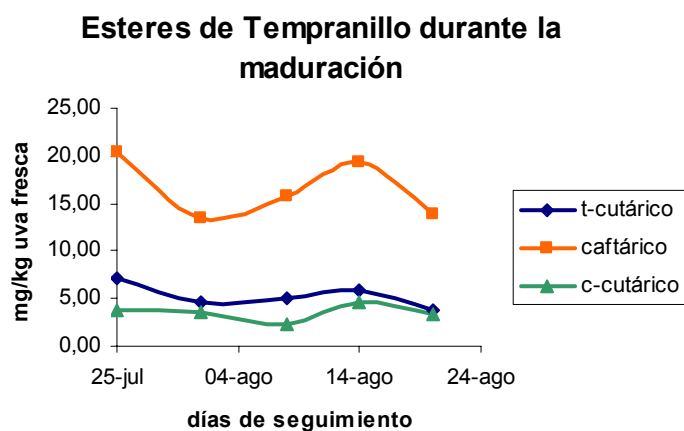
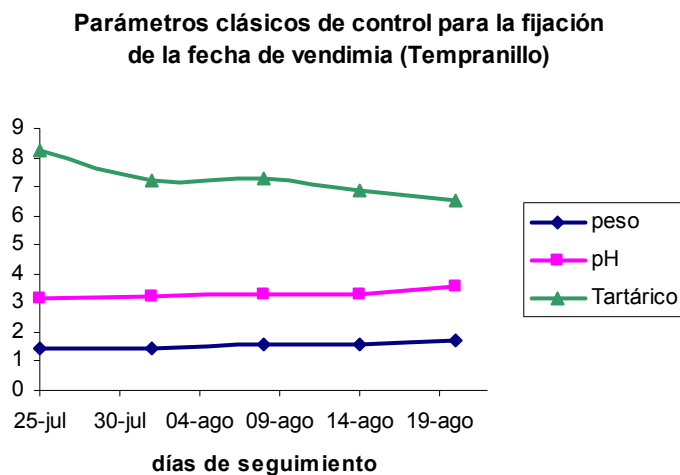


Figura 41 Evolución de los ésteres de la variedad Tempranillo durante la maduración.

Respecto al seguimiento de la maduración y a la fijación de la fecha óptima de vendimia, podemos ver la evolución de los tres ésteres con la maduración en la figura anterior.

La evolución de los otros parámetros considerados para la fijación de la fecha de vendimia fue la siguiente:



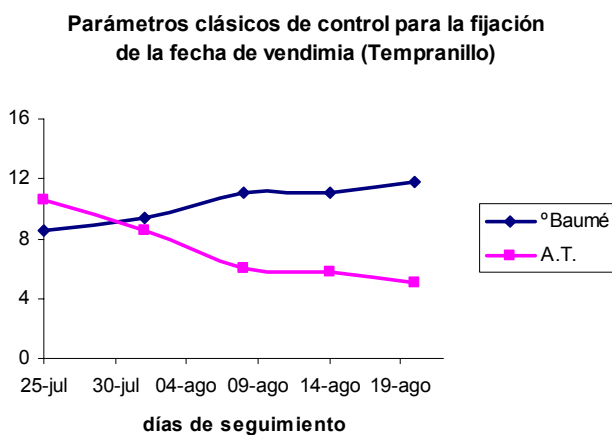
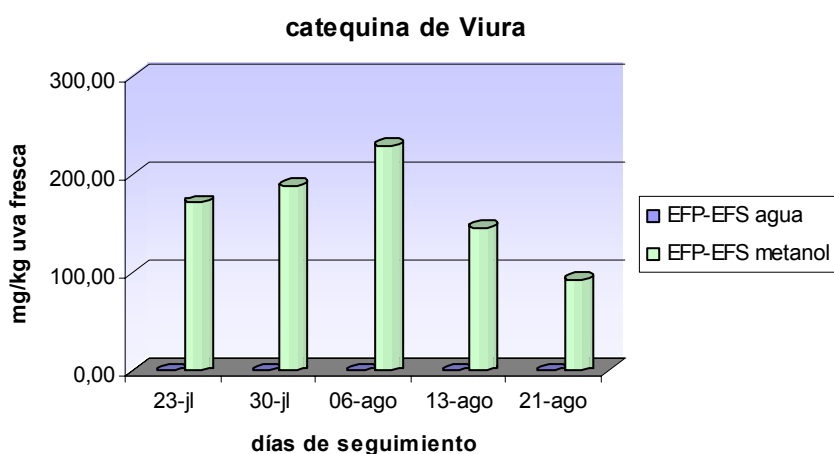


Figura 42 Evolución de los parámetros clásicos de control para la fijación de la fecha óptima de vendimia para la variedad Tempranillo

Como puede comprobarse la fecha de vendimia suele coincidir con la mínima concentración de los mencionados ésteres, por lo que, la evolución de éstos debería ser controlada a la hora de fijar la fecha de vendimia, puesto que la relación entre esterres y parámetros de rutina no tiene porque ser repetitiva.

En la figura 43 se presentan los resultados obtenidos con las catequinas

a)



b)

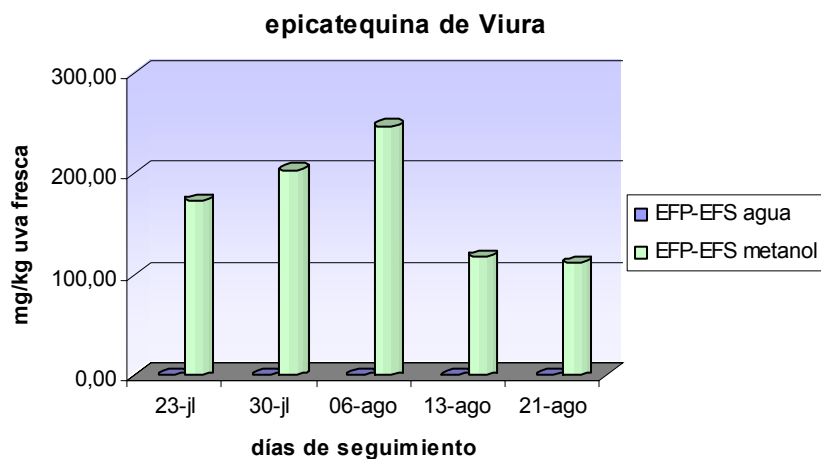


Figura 43 Cantidades extraídas de catequina (a) y epicatequina (b) de la variedad blanca Viura durante la maduración.

La evolución de ambos compuestos es prácticamente idéntica, produciéndose una disminución de su concentración al final de la maduración. En este caso, al no haberse muestreado en sobremaduración no puede determinarse si la disminución sería aún mayor.

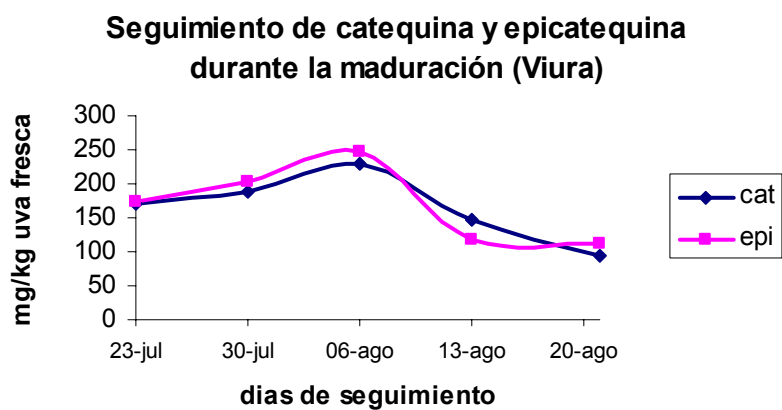
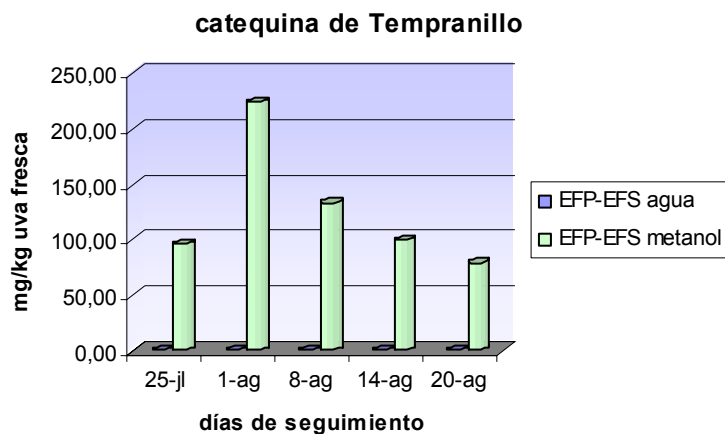


Figura 44 Evolución de las catequinas de la variedad Viura durante la maduración.

En el caso de la variedad Tempranillo los resultados obtenidos se representan en las gráficas mostradas en las figura 45.

a)



b)

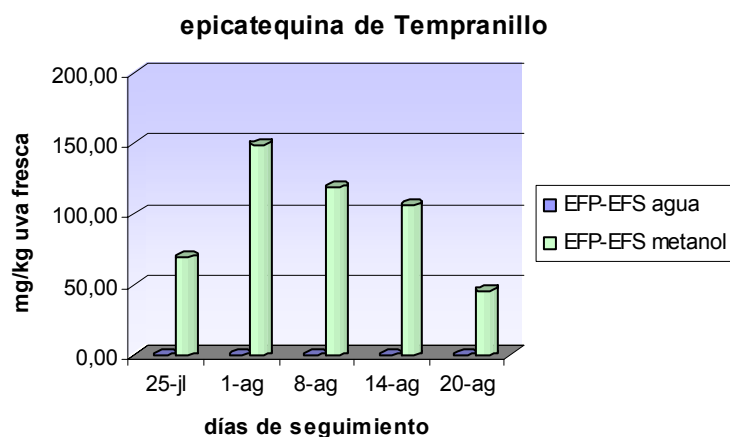


Figura 45 Cantidades extraídas de catequina (a) y epicatequina (b) de la variedad Tempranillo durante la maduración.

En este caso se observa claramente que las mayores concentraciones de catequina y epicatequina se consiguen en los extractos con metanol de EFP-EFS, no extrayéndose ninguno de los dos compuestos con el agua.

Seguimiento de catequina y epicatequina durante la maduración (Tempranillo)

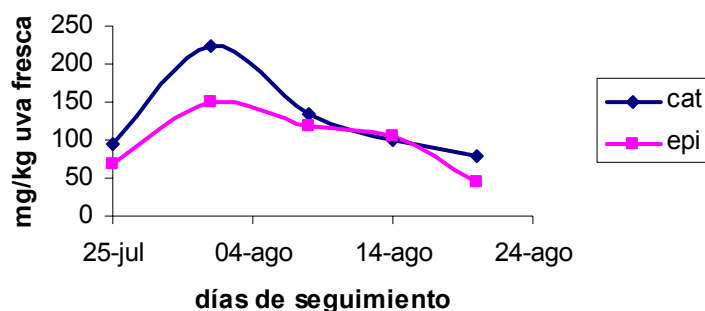


Figura 46 Evolución de las catequinas de la variedad Tempranillo durante la maduración.

Respecto al seguimiento de la maduración de esta variedad tinta, presenta una evolución similar a la de la variedad Viura, aunque en este caso existen mayores diferencias en cuanto a concentración de catequina y epicatequina. La evolución de estos compuestos al final de la maduración sigue siendo la disminución de su concentración.

Se ha comprobado, pues, que la EFP-EFS es un método aplicable a la determinación de compuestos fenólicos a lo largo del periodo de maduración de uvas, siendo capaz de cuantificar los compuestos identificados a pesar de los cambios físicos, químicos y bioquímicos que experimenta la baya durante su desarrollo. La información que aporta este método puede ser de utilidad tanto en la evaluación que distintas labores de manejo de la viña pueden tener en la composición de las uvas, como en permitir una planificación previa del equipamiento a utilizar en la vinificación de estas uvas en función de su composición.

III.3.6.3 Aplicación a la determinación de *trans*-resveratrol²⁴

Este compuesto se cuantifica fácilmente en vinos y otras bebidas utilizando CLAE mediante inyección directa,²⁵ acoplándose en algunos casos a la espectrometría de masas,²⁶ o mediante electroforesis capilar.²⁷ Sin embargo para llevar a cabo su análisis en matrices sólidas de alimentos, se hace necesario una etapa previa de extracción.

Generalmente se ha utilizado la ESL (maceración de las muestras sólidas) para su extracción,² aunque en algunos casos también se ha empleado la EFS^{28,29} sobre los extractos obtenidos mediante la ESL o la EFS directamente del mosto.²⁸ Sin embargo, puesto que estos métodos de maceración generalmente implican largos periodos de tiempo para la extracción, suponen un incremento de la probabilidad de que se produzcan degradaciones.³⁰ Otra alternativa también empleada en el análisis de este compuesto es la EFS.

Estas condiciones de extracción son especialmente problemáticas en el caso del *trans*-resveratrol, puesto que es un compuesto fotosensible y fácilmente oxidable. Por ello, los procesos de extracción deben desarrollarse de forma especialmente cuidadosa, protegiendo las muestras del aire y de la luz.

La EFP supone una buena alternativa a los métodos clásicos de extracción, puesto que evita los procesos de oxidación o fotodegradación, siendo por tanto, un método particularmente recomendable para extraer compuestos que reaccionan fácilmente con el oxígeno³¹ y son fotosensibles, como es el *trans*-resveratrol.

✓ Estudio de la estabilidad del *trans*-resveratrol

En primer lugar, como ya se ha mencionado al inicio de este apartado, hay que estudiar la estabilidad de este compuesto cuando se somete a la acción de las altas temperaturas que se emplean en la EFP, especialmente si se tiene en cuenta que se han publicado trabajos donde se indica la degradación de este compuesto durante los procesos de extracción.¹⁸

Se realizó este estudio de forma similar al descrito en el apartado III.1.2 (3 ciclos de 10 minutos con metanol a 50,100 y 150°C, con 40 atm. de presión), empleando para ello una disolución de patrón de *trans*-resveratrol de 27,5 ppm (dicha disolución se almacena en un recipiente que la preserva de la acción de la luz y se guarda en el frigorífico hasta que no se lleva a cabo la extracción).

Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

Temp. Extracc. (°C)	50	100	150
% recup. ± D.E.R.	104,2 ± 4,5	106,6 ± 4,3	99,5 ± 5,7

Tabla 11 Porcentajes de recuperación de *trans*-resveratrol +/- desviación estándar relativa a las temperaturas ensayadas.

Se comprueba pues que la atmósfera inerte empleada en la EFP, así como la ausencia de luz durante la extracción, permiten que el *trans*-resveratrol no se degrade durante la extracción y se recupere completamente incluso a 150°C (99,5%).

Por otro lado hemos de considerar que, dados los niveles de concentración de este compuesto en las muestras sólidas (uvas), se hace necesario el uso de algún método de detección que sea más sensible que la detección por espectroscopia UV-Vis, por lo que se utiliza un detector de fluorescencia.

Se registraron los espectros de fluorescencia de emisión y excitación del patrón de *trans*-resveratrol para determinar los máximos que presenta el mismo y fijar las condiciones óptimas de detección del compuesto en el detector de fluorescencia.

A continuación se presentan las espectros obtenidos, como puede verse los máximos de excitación y emisión son de 310 y 403 nm respectivamente, de forma que se fijan esas longitudes de onda en el detector de fluorescencia.

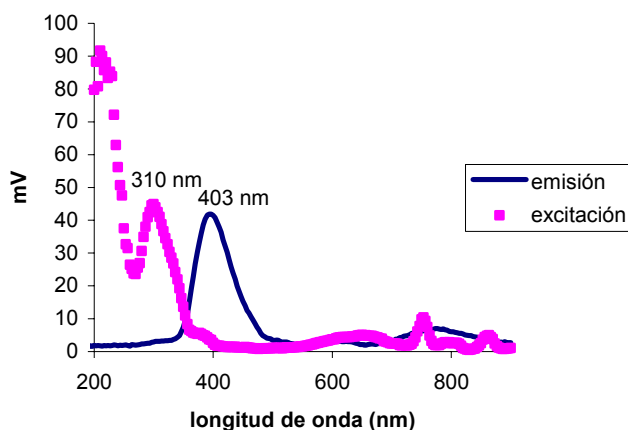


Figura 47 Espectros de excitación y emisión del *trans*-resveratrol

Con las columnas habitualmente empleadas en cromatografía de líquidos es frecuente que los tiempos de retención sean demasiado elevados para este compuesto. De hecho, cuando se aplica el procedimiento cromatográfico empleado para el análisis de los compuestos fenólicos (usando el mismo gradiente de elución pero con detección por fluorescencia), el *trans*-resveratrol se eluye en torno a los 55 minutos (véase figura 36)

Las columnas de tipo monolítico permiten separaciones más rápidas y se han empleado en la determinación de distintos compuestos fenólicos en vinos, entre ellos el *trans*-resveratrol.³²

Así pues, se planteó la posibilidad de emplear una columna cromatográfica sobre un soporte monolítico. De esta forma, al permitir utilizar flujos más elevados, se pretende conseguir una elución mucho más rápida del *trans*-resveratrol en comparación con otros métodos encontrados en la bibliografía, donde Domínguez y col.¹⁶ consiguen la elución de este compuesto alrededor de los 50 minutos, o a los 30 minutos según Castellari y col.¹⁹

Se realizaron varios ensayos empleando porcentajes del disolvente A (0,1% ácido acético en agua) entre 90-60% en modo isocrático. Como muestra se empleó un extracto de uva Tempranillo extraído según la metodología propuesta de EFP-EFS. La mejor separación del pico correspondiente al *trans*-resveratrol se obtiene con las condiciones de 70% de disolvente A y 30% del B (0,1% ácido acético en metanol).

Además, se evaluó el efecto que la temperatura (10, 25 y 40°C por triplicado) a la que se encuentra la columna durante la separación puede tener en la resolución y anchura de pico del *trans*-resveratrol:

Parámetro	10°C	25°C	40°C
Ancho de pico promedio	<i>n.d.</i>	0,18	0,24
Resolución promedio	<i>n.d.</i>	1,30	0,83

Tabla 12 Efecto de la temperatura (10, 25 y 40°C) en la elución (ancho de pico y resolución) del *trans*-resveratrol (n=3).

n.d.: no disponible, picos no resueltos.

En función de estos resultados, se selecciona como condiciones óptimas para la elución: 25°C de temperatura, en modo isocrático de 30% en disolvente B-70% disolvente A, con un flujo de 5 ml/min. De esta forma conseguimos la elución del *trans*-resveratrol en 2,0 minutos (véase figura 48).

Asimismo se evaluó la repetibilidad del método cromatográfico resultante, con una desviación estándar relativa (n=6) de 1,04% en cuanto al tiempo, y de 1,94% en cuanto al área.

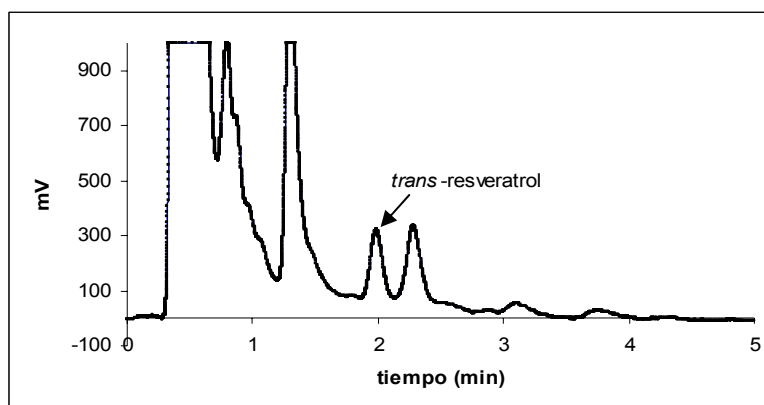


Figura 48 Cromatograma de Fluorescencia del extracto metanólico de la variedad Tempranillo.

Para evaluar la repetibilidad del método completo se realizaron 6 análisis completos de una muestra real (Viura), en distintos días, obteniéndose los siguientes resultados expresados en mg/kg uva:

Compuesto	Extr.1	Extr. 2	Extr. 3	Extr. 4	Extr. 5	Extr. 6	media	Desv. Est.	D.E.R.
resveratrol	2,09	2,23	2,33	2,14	2,06	2,25	2,18	0,1	4,75

Tabla 13 Repetibilidad de la EFP-EFS de trans-resveratrol

Como puede comprobarse la desviación estándar relativa que presenta la EFP-EFS en muestras reales, para el caso del *trans*-resveratrol, también es inferior al 5%, por lo que el método desarrollado se puede considerar de una repetibilidad aceptable para el análisis del resveratrol.

Para cuantificar el *trans*-resveratrol se hacen curvas de calibrado analizando en el equipo de CLAE disoluciones patrón del mismo a distintas concentraciones y representando el área del pico correspondiente frente a la concentración, obteniendo las siguientes rectas de calibrado:

Detección	Ord. origen	pendiente	coef regresión	intervalo (ppm)	LD	LC
280 nm	-4261,5	158621	1,0000	0,11-2,75	0,010	0,032
320 nm	-4060,1	135372	1,0000	0,11-2,75	0,017	0,058
fluoresc.	-188091	42113985	0,9998	0,11-2,75	0,003	0,004

Tabla 14 Rectas de calibrado de *trans*-resveratrol

Como puede comprobarse con los valores de las pendientes de las rectas de calibrado, la sensibilidad del método empleando detección por fluorescencia es 250 veces mayor que la obtenida usando detección UV.

En el caso de variedad de uva tinta Tempranillo, se han encontrado niveles, en las muestras tomadas el día de la vendimia, de 3,11 mg/kg de peso de uva entera seca (preparada tal como se indica en el apartado II.5.2).

De la misma forma pueden determinarse los mg/kg de *trans*-resveratrol en la variedad de vinificación Viura el día de vendimia, y en la variedad tinta de uva de mesa denominada Napoleón.

Compuesto	Viura vendimia	Napoleón (uva mesa)
<i>Trans</i> -resveratrol	2,18 mg/kg uva	0,11 mg/kg uva

Tabla 15 Cuantificación de *trans*-resveratrol en distintas variedades de uva

Asimismo podría realizarse el seguimiento de este compuesto durante la maduración de esas dos variedades de vinificación.

En el caso de la variedad Viura, puede apreciarse como, durante la maduración, el *trans*-resveratrol va aumentando, aunque se aprecia una disminución en su concentración el día de vendimia. Hay que tener en cuenta que se está analizando el resveratrol en la uva entera y su concentración se puede ver afectada por dos efectos que pueden ser contrapuestos, como son la variación en el peso de la baya y la radiación solar.

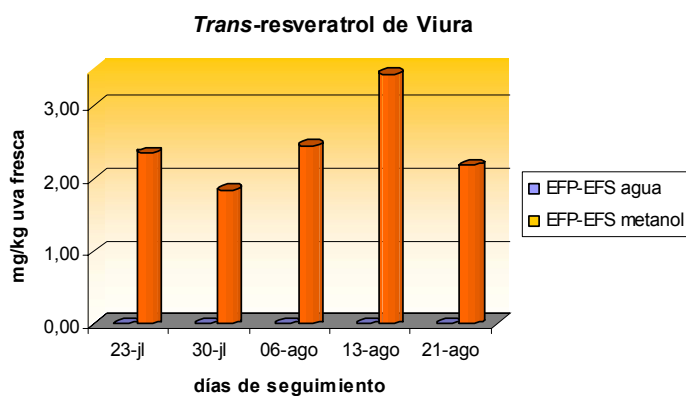


Figura 49 Cantidades extraídas de *trans*-resveratrol de la variedad blanca Viura durante la maduración.

En el caso de la variedad Tempranillo:

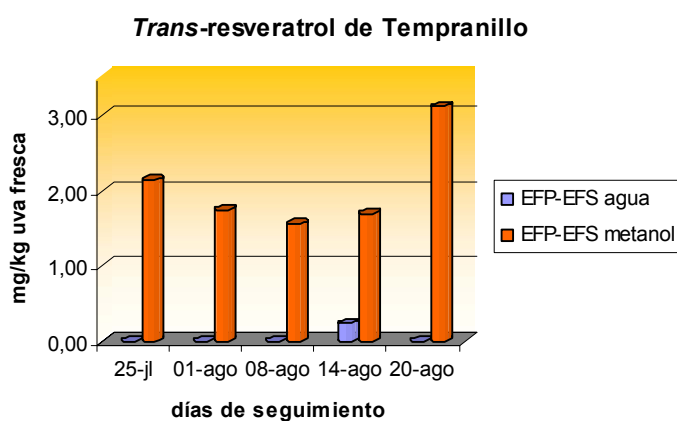


Figura 50 Cantidades extraídas de *trans*-resveratrol de la variedad tinta Tempranillo durante la maduración.

Se puede apreciar como en esta variedad el *trans*-resveratrol se mantiene aproximadamente constante durante la maduración salvo en la última semana donde se aprecia un aumento.

En definitiva con el método desarrollado, el tiempo requerido para la extracción se reduce a unos 40 minutos (una reducción considerable si se compara con los métodos tradicionales de maceración de muestras sólidas). Además permite cuantificar este compuesto en uvas completas, y no únicamente en hollejos (que es donde suele determinarse habitualmente).

Presenta además ventajas concretas respecto a la EFP sin EFS, como es una mayor limpieza de la muestra y, por tanto, menor número de interferencias.

Asimismo el método cromatográfico desarrollado posibilita determinar este compuesto de una forma extremadamente rápida (en torno a los 2 minutos), y el método de detección por fluorescencia desarrollado, permite incrementar la sensibilidad del análisis 250 veces si se compara con la detección por espectroscopia UV-Vis.

En conjunto, el método completo permite determinar el contenido de *trans*-resveratrol, en unos 45 minutos y con una desviación estándar relativa inferior al 5%, en uvas maduras y a lo largo del periodo de maduración.

III.4 APLICACIÓN DE LA EFS EN UVAS Y VINOS

III.4.1 APLICACIÓN DE LA EFS PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCÓSIDOS EN UVAS DURANTE LA MADURACIÓN

En este apartado se pretende determinar los compuestos glucosilados presentes en uvas a lo largo del periodo de maduración de 15 variedades durante dos años (2002 y 2003), mediante el método de la glucosa glucosídica total (GGT).

Con esto lo que se pretende es evaluar la capacidad del método para el análisis de muestras de uva cultivadas en climas cálidos, donde la concentración de azúcar presente en la baya será superior que las encontradas en uvas cultivadas en zonas más meridionales, tales como las de la zona en la que se desarrolló el método de la GGT.

Para ello se seguirá el protocolo desarrollado por B. Zoecklein para la determinación de la GGT en mostos, con la variación de que en nuestro caso en vez de analizar el mosto obtenido, se analiza el mosto obtenido tras realizar la resuspensión de las muestras de uva liofilizadas.

Todos los ensayos correspondientes a este apartado se realizaron en el laboratorio del grupo de investigación “Enology Grape Chemistry Group”, ubicado en el edificio de Food Science & Technology, perteneciente a la Virginia Polytechnic Institute & State University, localizada en Blacksburg, Virginia, EEUU.

III.4.1.1 Introducción

Los metabolitos secundarios sintetizados en la uva son fuentes primordiales del aroma, sabor y color del vino. Los compuestos aromáticos están presentes en forma de volátiles libres y, en parte, como precursores no volátiles unidos a azúcares (glicósidos).³³

Se han identificado cuatro grupos de glicósidos en uvas: beta-D-glucopiranosidos, 6-O-(alfa-L-ramnopiranosil)-beta-D-glucopiranosidos, 6-O-(alfa-L-arabinofuranosil)-beta-D-glucopiranosidos, y 6-O-(beta-D-apiofuranosil)-beta-D-glucopiranosidos.^{34,35}

Los tipos de agliconas son más complejos y se han identificado varios compuestos relacionados biogénicamente: monoterpenoles y monoterpendioles, alcoholes, ácidos, compuestos fenólicos y C13-norisoprenoides.

Debido a su papel potencial en las características del aroma del vino, su cuantificación puede ser útil para los enólogos y viticultores para ayudar a determinar, por ejemplo, el grado óptimo de madurez de las uvas o la necesidad de uso de distintos procedimientos durante la vinificación para potenciar la máximo su contribución a las características organolépticas del vino a obtener.

El método de GGT (glucosa glucosídica total) se ha empleado para examinar los efectos que distintas prácticas de cultivo tienen en la calidad de la uva,^{36,37} y el efecto que las distintas técnicas de procesamiento empleadas en la elaboración de vinos tienen en los niveles de glicósidos encontrados.^{38,39} Sin embargo, hasta el momento no se ha caracterizado la evolución de los compuestos glicosilados durante la maduración.

III.4.1.2 Preparación de las muestras (mostos)

Las uvas muestreadas se liofilizan (véase apartado II.5.1) para facilitar su conservación, se trata de evitar evitando de este modo los procesos de degradación que suelen sufrir durante su almacenamiento, aunque éste se realice a baja temperatura. Posteriormente se rehidratan con agua bidestilada, llevándose a un volumen fijo. Finalmente se filtran por filtro de nylon de 0,45 micras antes de proceder a su análisis.

III.4.1.3 Determinación de la glucosa glucosídica total (GGT)

Estos ensayos se realizan, una vez obtenida la muestra de mosto tal como se indica en el apartado anterior, siguiendo el protocolo de análisis habitualmente empleado por el grupo del Dr. B. Zoecklein, que a su vez está basado en el método desarrollado por Abbott y col.⁴⁰ El método seguido aparece descrito en el apartado II.3.3.

Considerando el peso de muestra analizado, y el porcentaje de liofilización de la misma, los resultados obtenidos son los presentados en la tabla 16

	GGT 2002 (mg/g uva fresca)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Chardonnay	0,121	0,162	0,129	0,163	0,147*			
Mosc.Alej.	0,206	0,177	0,140	0,131	0,186	0,173	0,177*	
Sauv.Blanc	0,118	0,100	0,104	0,156	0,166	0,143*		
Viura	0,201	0,163	0,163	0,123	0,149	0,141	0,111	0,128*
Garrido	0,138	0,128	0,158	0,115	0,149	0,182	0,103	0,172*
Pno.testigo	0,120	0,098	0,152	0,096	0,104	0,156	0,203	0,210
Traminer	0,226	0,214	0,237	0,226*				
Mosc.Front.	0,207	0,265	0,195	0,246	0,268	0,293	0,202	0,290*
Pno.riego	0,113	0,107	0,139	0,092	0,126	0,107	0,105	0,199*
Vijiriega	0,186	0,109	0,103	0,115	0,147	0,123	0,162	0,139*
Cab.Sauv.	0,244	0,204	0,338	0,569	0,572	0,510	0,553*	
Tempranillo	0,198	0,252	0,239	0,256	0,422	0,455	0,544*	
Syrah	0,230	0,262	0,295	0,350	0,403	0,465	0,498*	
Pno.negro	0,303	0,286	0,420	0,372*				
Tint.Rota	0,190	0,256	0,421	0,308	0,384	0,596	0,641*	
Graciano	0,180	0,248	0,368	0,423	0,621	0,507	0,673	0,659*

Tabla 16 Concentración de glucosa glucosídica total (mg/g uva fresca) a lo largo del periodo de maduración del año 2002. *: muestra de vendimia.

Durante el segundo año de muestreo, año 2003, se produjo una ola de calor que aceleró la maduración de prácticamente todas las variedades estudiadas, entre 1 y 3 semanas. De forma, que en este año el número de muestras se redujo en comparación con el año anterior. En el caso de la variedad Moscatel de Frontignan, la uva se pasificó muy rápidamente, permitiendo tomar solamente un muestra, por lo que optamos por no incluir esta variedad en el estudio del año 2003 (tabla 17).

	GGT 2003 (mg/g uva fresca)					
	1	2	3	4	5	6
Chardonnay	0,138	0,138	0,131	0,141	0,215*	
Mosc.Alej.	0,118	0,122	0,137	0,191	0,185	0,189*
Sauv.Blanc	0,098	0,100	0,147	0,18*		
Viura	0,078	0,123	0,143	0,183	0,253*	
Garrido	0,108	0,081	0,117	0,154	0,160	0,129*
Pno.testigo	0,083	0,094	0,115	0,176	0,200*	
Traminer	0,199	0,236	0,204	0,272*		
Pno.riego	0,100	0,086	0,137	0,157	0,109*	
Vijiriega	0,167	0,078	0,122	0,159	0,117	0,136*
Cab.Sauv.	0,373	0,354	0,457	0,396	0,265*	
Tempranillo	0,238	0,313	0,279	0,349	0,312*	
Syrah	0,242	0,310	0,365	0,373	0,513*	
Pno.negro	0,414	0,237	0,428	0,433*		
Tint.Rota	0,210	0,339	0,400	0,426	0,522	0,595*
Graciano	0,208	0,312	0,402	0,508	0,714*	

Tabla 17 Concentración de glucosa glucosídica total (mg/g uva fresca) a lo largo del periodo de maduración del año 2003. *: muestra de vendimia.

Con el fin de caracterizar los comportamientos de las distintas variedades estudiadas y con vistas a agilizar la interpretación de los datos obtenidos, se recurre al análisis de agrupaciones. Además, para que realmente se tenga en cuenta la evolución en puntos similares de maduración, se ordenan los datos según el número de días que resten hasta la fecha de vendimia, de forma que para cada variedad se tiene en cuenta su nivel específico de madurez.

Con todo esto, si estudiamos como se agruparían las distintas variedades de uva estudiadas en función de la evolución de la GGT durante la maduración, a lo largo de los muestreos realizados en el año 2002, se obtiene el siguiente dendograma de la figura 51.

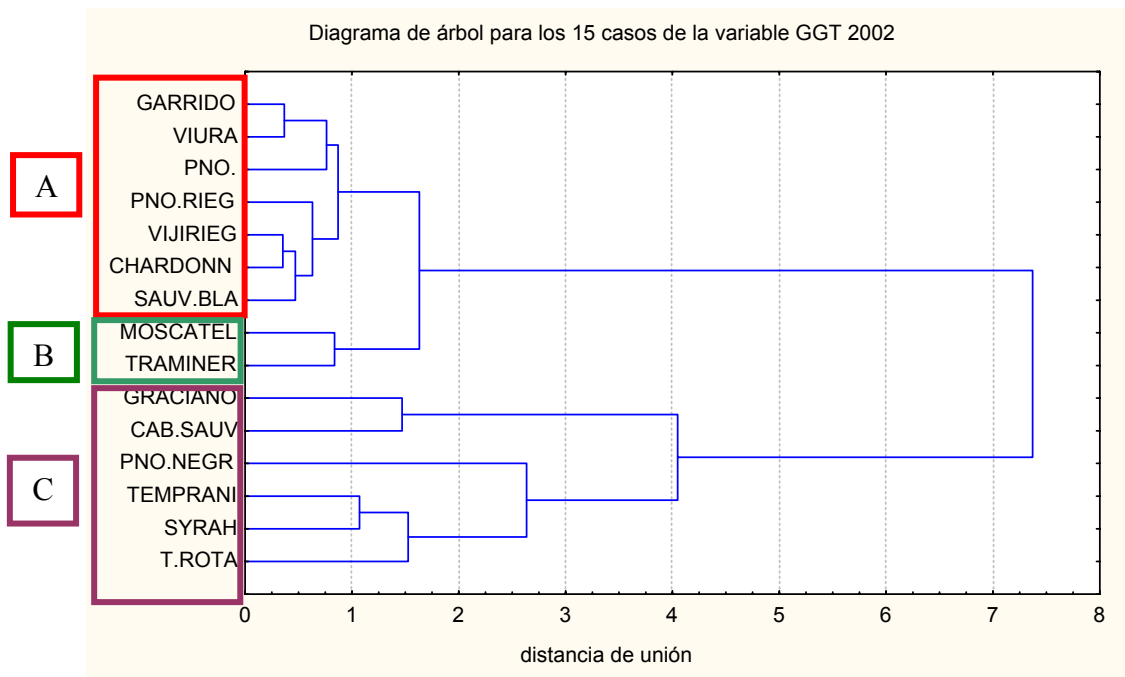


Figura 51 Dendrograma representando la agrupación de las 15 variedades en función de la evolución de la variable GGT a lo largo de la maduración del año 2002.

Puede observarse como se aprecia una separación clara entre variedades blancas y tintas en el año 2002, diferenciándose tres grupos: uno formado por las variedades Moscatel de Alejandría y Traminer (las variedades más aromáticas), otro formado por el resto de las variedades blancas, y el último constituido por las variedades tintas.

Las distancias de unión de las variedades tintas son mayores que las de los otros grupos, por lo que se aprecia un comportamiento más heterogéneo entre ellas.

La evolución de la GGT en cada uno de esos tres grupos es la obtenida al representar los promedios de la GGT existente en cada uno de los grupos diferenciados en función del día de muestreo, tal como se aprecia en la figura 52.

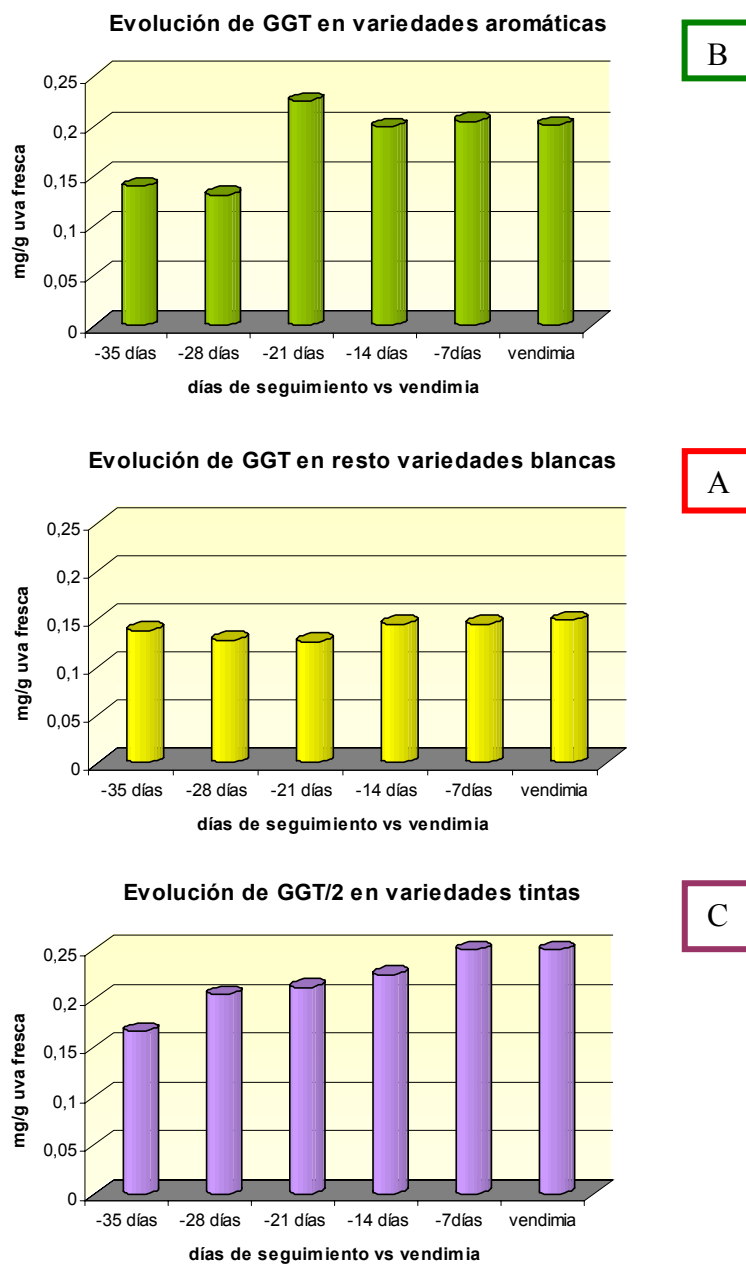


Figura 52 Evolución promedio de GGT para cada uno de los grupos

Se puede comprobar que la justificación de los agrupamientos observados en el diagrama de árbol se encuentra en las distintas evoluciones de la GGT en los tres grupos formados. En las variedades blancas se aprecia un leve descenso de la GGT al inicio del periodo, para luego aumentar de forma paulatina a lo largo de la maduración y llega a estabilizarse antes de vendimia. En el caso de las variedades más aromáticas (Moscatel y Traminer) el contenido en GGT es en torno a un 20% superior al del resto de las variedades blancas, y se aprecia un aumento mucho más acusado de la GGT a partir de la mitad del periodo muestreado, para luego estabilizarse antes de vendimia. En el caso de las tintas, se aprecia un aumento continuo en la concentración de GGT a lo largo de la maduración, llegándose a duplicar, triplicar, o incluso cuadruplicar, los niveles de compuestos glucosilados respecto a las variedades blancas. Se trata, por tanto, de tres comportamientos claramente diferenciados.

Si se realiza el análisis discriminante lineal (ADL) para la variable GGT a lo largo del periodo de maduración 2002 (figura 53), y se representan la clasificación de las variedades en función de las variables canónicas obtenidas, se comprueba que se forman tres grupos, que corroboran la agrupación observada en la figura 51, es decir, un grupo formado por las dos variedades más aromáticas (en rosa), otro por el resto de variedades blancas (en naranja) y el formado por las variedades tintas (en rojo).

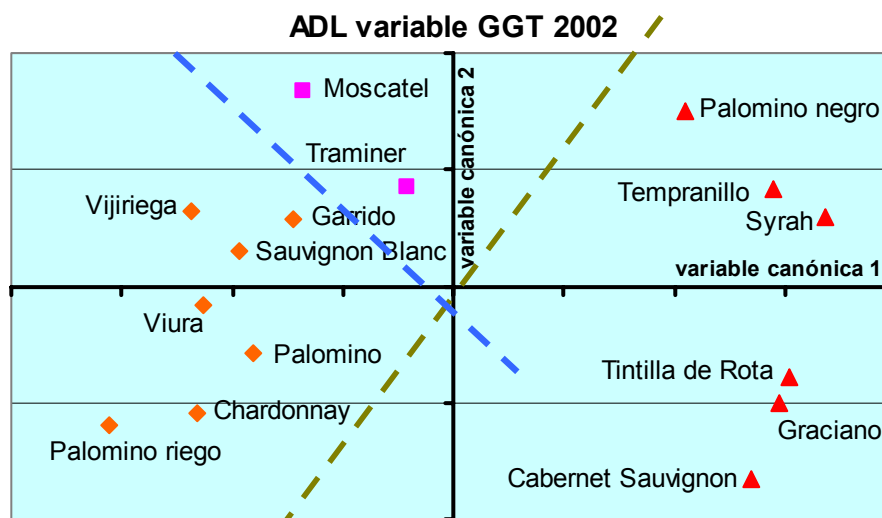


Figura 53 Clasificación de las variedades estudiadas en función de las variables canónicas resultantes del ADL de la evolución de la GGT en el año 2002.

En el año 2003 (figura 54), en cambio, la influencia de la ola de calor provoca modificaciones considerables en el comportamiento de las distintas variedades (en mayor o menor medida), y, aunque, aún así, el comportamiento de las variedades blancas es distinto del de las tintas, también se comprueba como el comportamiento particular de las variedades más aromáticas no se repite como en el año anterior.

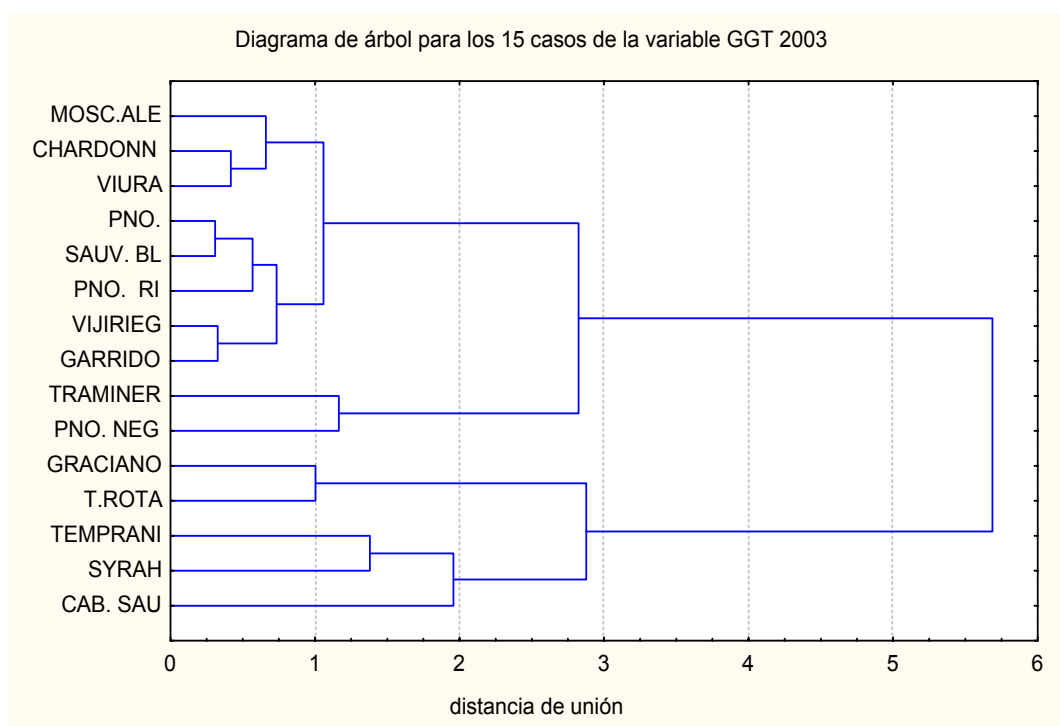


Figura 54 Dendrograma representando la agrupación de las 15 variedades en función de la evolución de la variable GGT a lo largo de la maduración del año 2003.

Este mismo comportamiento se comprueba al realizar el ADL (figura 55) de la evolución de la variable GGT a lo largo del periodo de maduración del 2003. Así, se aprecia que la variedad Moscatel ha desplazado su posición en el dendrograma de la figura 54 respecto al año 2002 (figura 51), incluyéndose dentro del grupo de variedades blancas.

ADL variable GGT 2003

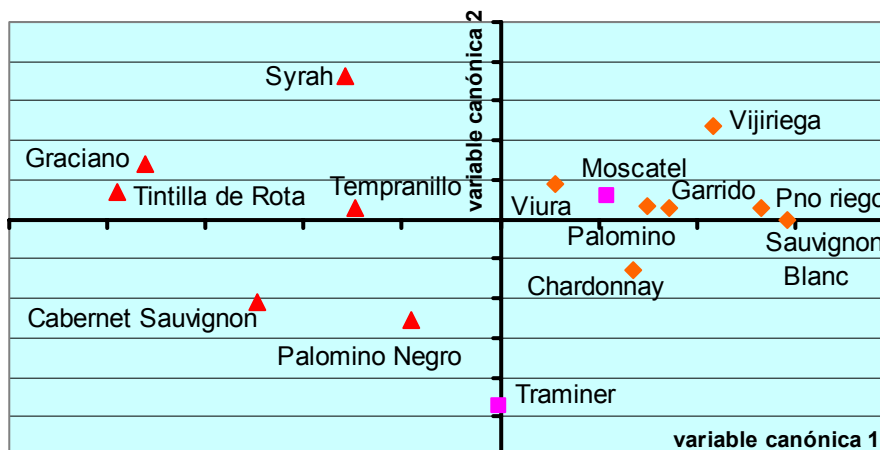


Figura 55 Clasificación de las variedades estudiadas en función de las variables canónicas resultantes del ADL de la evolución de la GGT en el año 2003.

La determinación de las GGT conlleva un elevado consumo de tiempo (máximo 10 muestras, por triplicado, al día por persona) que requiere, además, de algunos aparatos no habituales en los laboratorios de las bodegas, por ello se intentó realizar una estimación de los valores de GGT a partir de otros datos resultantes de análisis más cortos y habitualmente realizados durante la maduración.

Puesto que se dispone de la evolución de los distintos parámetros de rutina empleados habitualmente en maduración: °Bé, acidez total, ácido tartárico, pH, peso medio de baya y residuo seco (véase anexo II) se podría comprobar, en primer lugar, como se agruparían todos los parámetros (clásicos y la GGT) en función de su evolución a lo largo de maduración en las distintas variedades estudiadas, para después intentar determinar algún tipo de correlación.

La agrupación de los parámetros habitualmente analizados en maduración y de la GGT a lo largo del periodo de maduración del año 2002 se muestra en la figura 56.

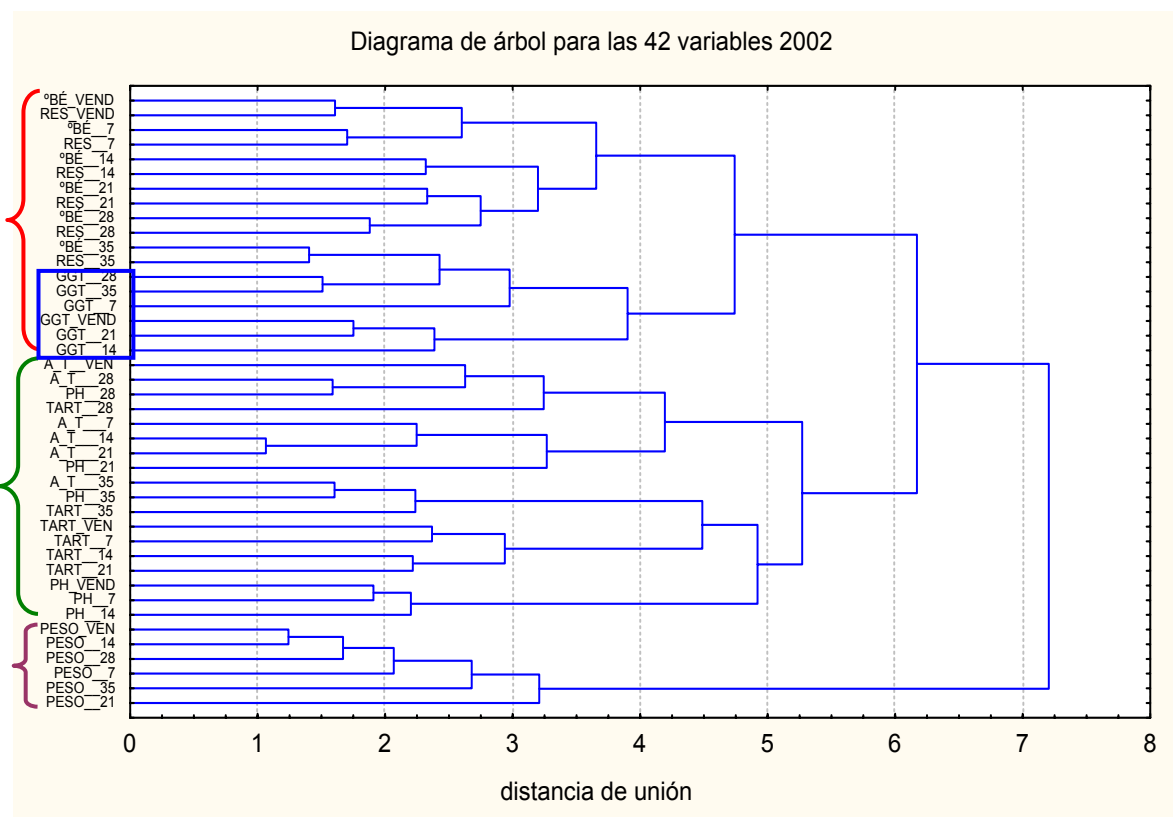


Figura 56 Dendrograma representando la agrupación de todas las variables estudiadas: grado Baumé (°BÉ), acidez total (A.T), [H⁺] (PH), ácido tartárico (TART), peso medio de baya (PESO), residuo seco (RES) y GGT, a lo largo de la maduración en todas las variedades ensayadas en 2002.

Como se puede apreciar, la GGT presenta un comportamiento distinto del resto de los parámetros estudiados, apareciendo todos sus datos agrupados, aunque similar en cierto modo al del residuo seco y del °Baumé. Asimismo se aprecia cierta similitud, lógica, entre el comportamiento de la acidez total y el ácido tartárico, y la [H⁺]. El peso medio conforma el tercer grupo que se distingue.

Si se representa el contenido promedio (de todas las variedades) de cada uno de los parámetros que constituyen los tres grupos diferenciados en el anterior dendrograma (como indican las llaves situadas en el lado izquierdo de la figura 56) a lo largo de los días de muestreo (vendimia, 7 días antes, 14 días antes, 21 días antes, 28 días antes y 35 días antes) del año 2002, se obtienen las siguientes figuras:

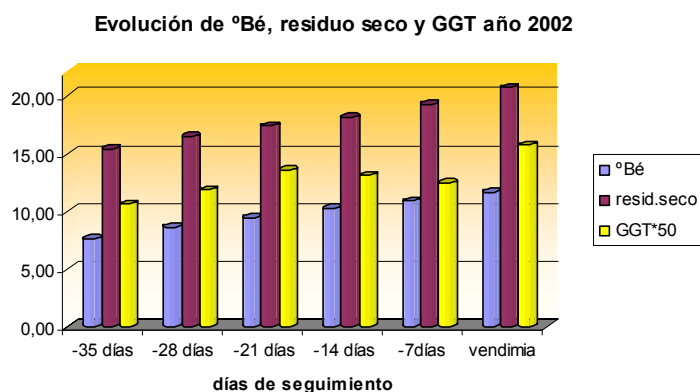


Figura 57 Evolución del contenido promedio de °Bé, residuo seco y GGT en maduración año 2002.

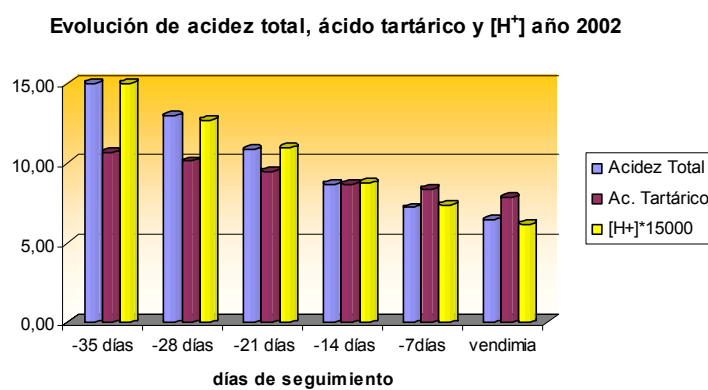


Figura 58 Evolución del promedio de acidez total, ácido tartárico y [H⁺] en maduración año 2002.

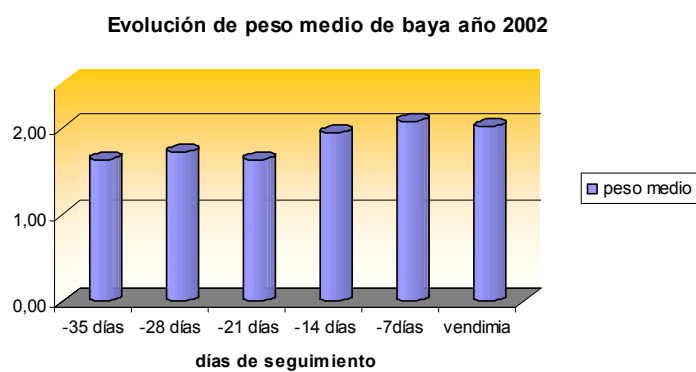


Figura 59 Evolución del contenido promedio del peso medio de baya la maduración año 2002.

En estas gráficas se pone de manifiesto la tendencia ascendente a lo largo de la maduración del °Bé, residuo seco y GGT (aunque ligeramente distinta a la de los dos parámetros anteriores), y la descendente de acidez total, ácido tartárico y $[H^+]$. El peso, por su parte, presenta una tendencia, aunque también ascendente, más heterogénea que los anteriores parámetros. De esta forma se justifican los tres grupos diferenciados en la figura 56.

Asimismo se realiza el análisis de conglomerados para todas las variables, clásicas y GGT, en las 15 variedades ensayadas, y se comprueba que en este caso no se aprecia la misma separación que en la figura 60.

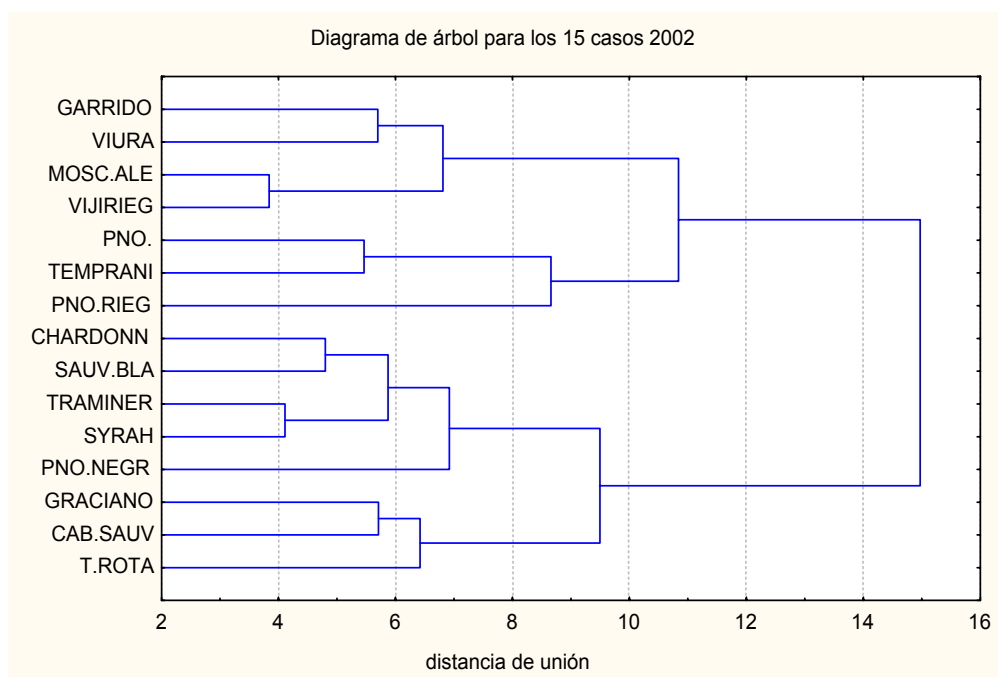


Figura 60 Dendrograma representando la agrupación de todos los casos estudiados, variedades de uva, con todas las variables, a lo largo de la maduración en el año 2002.

El hecho de que GGT, °Bé y residuo seco presenten la misma tendencia a lo largo de la maduración, indica un cierto grado de correlación en los comportamientos de las GGT y otros parámetros, pero queda por establecer si habrá o no algún tipo de regresión que los relacione.

Por tanto vista la correlación que parece existir entre °Bé, residuo seco y GGT, se podría plantear el desarrollo de un método para estimar la GGT a partir de los otros dos parámetros mencionados.

Para ello se aplica la técnica de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). A fin de aprovechar al máximo todos los datos disponibles, se emplean todas las variables de rutina analizadas en la regresión por PLS (teniendo como variable objetivo la GGT y como variables dependientes los datos de los parámetros de rutina), figuras 61-63.

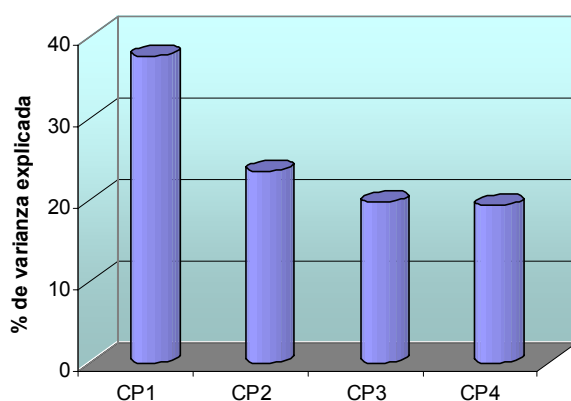


Figura 61 Representación de las varianzas explicadas por las componentes principales del ACP desarrollado previamente al PLS.

En el estudio de componentes principales previo al PLS (Figura 61) se puede apreciar como la varianza explicada por cada componente principal es menor que la explicada por el componente anterior, lo que confirma la bondad de la agrupación en las componentes principales seleccionadas por el programa. La primera componente principal contribuye con el 38% de la varianza total.

Con la representación de la componente principal CP1 frente CP2 (figura 62), podemos comprobar que tanto el Residuo Seco (loading = 0.901) como el Baumé (loading = 0,372) contribuyen a la misma componente principal (CP1) y con el mismo signo, esto es, presentan un comportamiento similar al igual que se había concluido tras el análisis de agrupaciones. Por lo que respecta al resto de parámetros de rutina, la Acidez Total es la principal variable con importancia en la otra componente principal (loading = 0.904) al igual que la concentración de ácido tartárico (loading = 0,375), mientras que el resto de parámetros presenta poca contribución a las dos componentes principales.

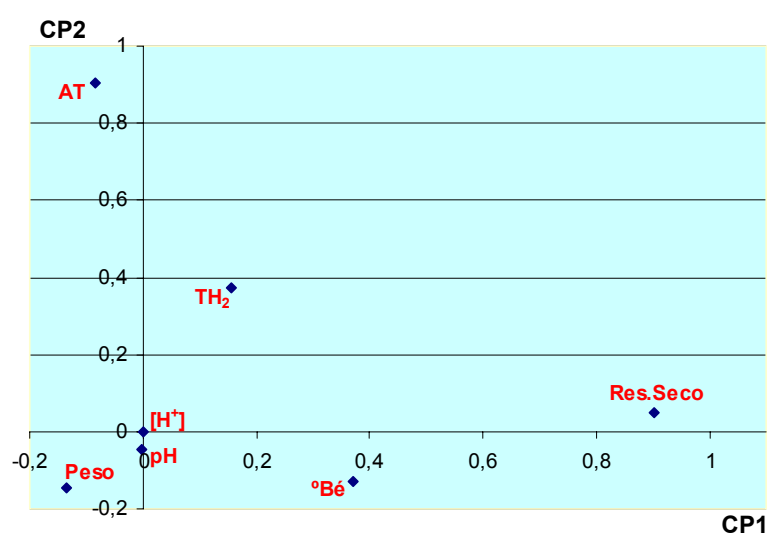


Figura 62 Representación de la componente principal CP1 frente a la CP2.

Por último, y por lo que respecta al resultado de la regresión en sí, el resultado del coeficiente de regresión es de 0,734, pero al representar los valores medidos frente a los predichos con el modelo elaborado por el programa, (figura 63), se obtiene una pendiente de 0,539, esto es, los resultados predichos de GGT según el modelo elaborado empleando las variables de rutina, se quedan muy alejados de los valores reales.

Con todo esto se puede concluir que no es posible establecer una regresión entre el comportamiento de la variable objetivo GGT y el de los parámetros de rutina analizados en maduración.

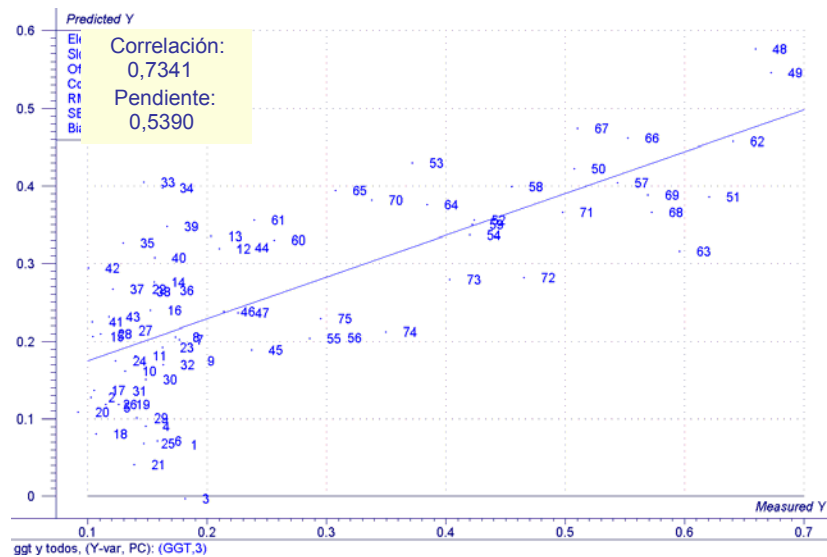


Figura 63 Ajuste de los valores medidos frente a los predichos por el modelo de ACP.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en el año 2003 se produjo una ola de calor durante el periodo de maduración, que afectó en mayor o menor medida a la maduración de las distintas variedades estudiadas.

Si se observan ahora las agrupaciones formadas cuando se evalúan todas las variables en el año 2003 (figura 64), puede comprobarse como la influencia de esta ola de calor se traduce en menores distancias de unión entre las variables analizadas, y, aunque la GGT sigue presentando un comportamiento similar al °Bé y residuo seco, las condiciones climáticas influyen de tal modo que las agrupaciones formadas no son tan claramente distintas como en el 2002.

Cuando se representa el dendograma de los 15 casos (variedades) con todas las variables en el año 2003 (figura 65), se comprueba que tampoco se reproducen los grupos formados en el año anterior.

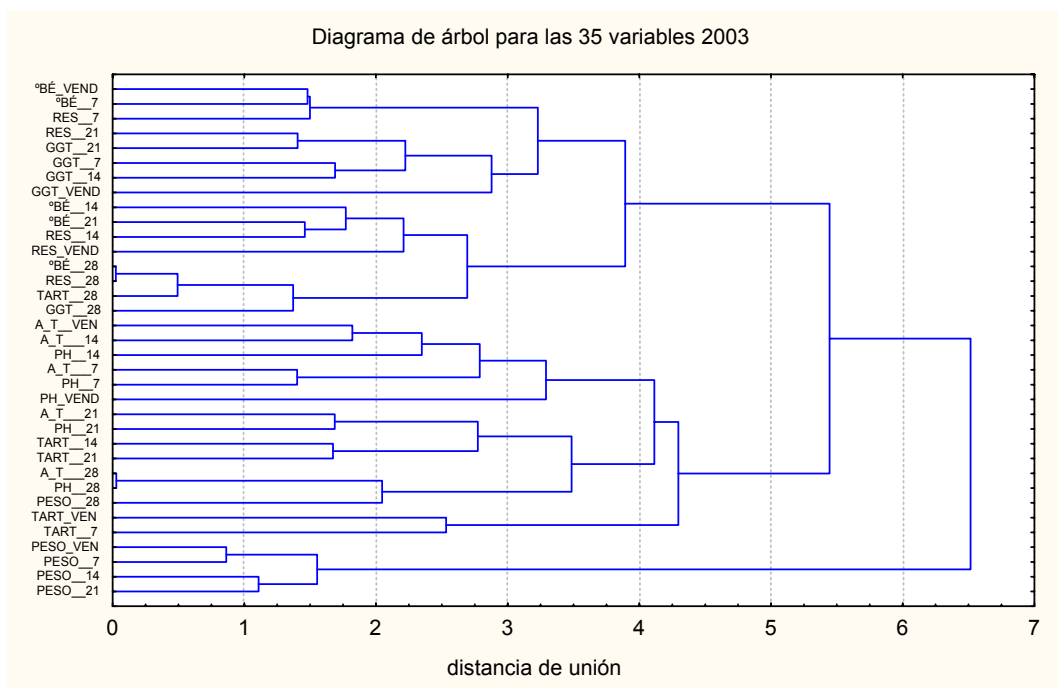


Figura 64 Dendrograma representando la agrupación de todas las variables estudiadas: grado Baumé (°BÉ), acidez total (A.T), [H⁺] (PH), ácido tartárico (TART), peso medio de baya (PESO), residuo seco (RES) y GGT, a lo largo de la maduración en todas las variedades ensayadas en 2003.

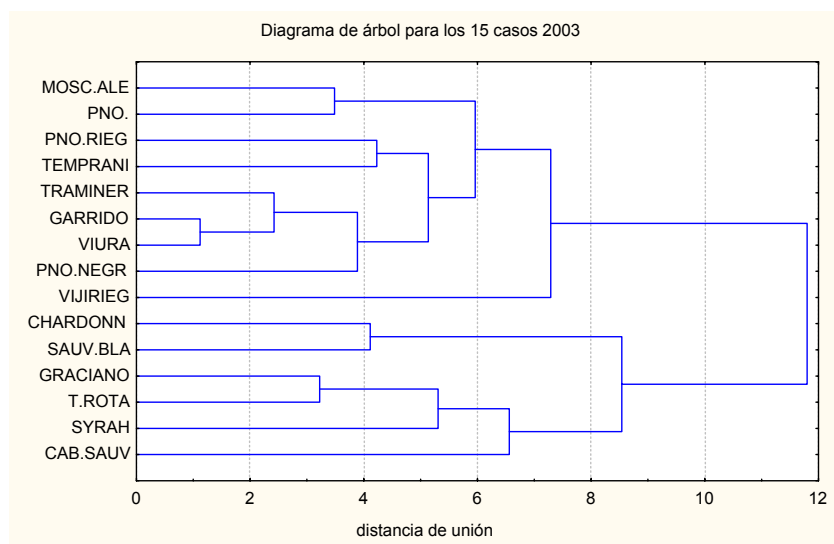


Figura 65 Dendrograma representando la agrupación de todos los casos estudiados, variedades de uva, con todas las variables, a lo largo de la maduración en el año 2003.

Por tanto, puede comprobarse como las condiciones climáticas existentes durante el periodo de maduración son realmente determinantes en la composición de la uva y, particularmente, en los niveles de GGT.

III.4.2 APLICACIÓN DE LA EFS A LA DETERMINACIÓN DE TERPENOS Y OTROS COMPUESTOS VOLÁTILES EN VINOS.

En esta parte del trabajo se desarrollará un método de EFS/CG para la determinación de compuestos terpénicos y otros volátiles relacionados con la componente aromática de distintos vinos.

Para ello se optimizarán las distintas variables que pueden afectar a la recuperación de los terpenos en la etapa de EFS.

El método desarrollado se aplicará sobre distintos tipos de vinos: comerciales y jóvenes monovariales proporcionados por la estación experimental CIFA “Rancho de la Merced” (Jerez de la Frontera) y obtenidos empleando distintas variedades de uva y procedimientos de elaboración.

III.4.2.1 Introducción

La variedad de uva influye considerablemente en el aroma final del vino resultante, especialmente en vino jóvenes. Existen diferentes compuestos volátiles presentes como tales en uvas, o como compuestos derivados de aquellos relacionados con el aroma del vino. Como se ha comentado en la introducción de esta memoria, se sabe que los compuestos terpénicos son responsables del aroma de Moscatel y están relacionados con el aroma de otras variedades de uva aromáticas, como la Gewürtztraminer.⁴¹

En concreto, los terpenoles se consideran un conjunto de compuestos que permiten, en buena parte, caracterizar la tipicidad de un vino en función de la variedad de origen. De hecho, junto con las pirazinas, constituyen las dos familias químicas a las que pertenecen las sustancias volátiles ligadas a la tipicidad aromática de la cepa.

En la uva y el vino existe una gran variedad de compuestos terpénicos identificados, en su mayor parte se trata de monoterpenos y sus derivados (entre los que se incluyen los alcoholes y aldehídos correspondientes).⁴²

Los umbrales de percepción de estos compuestos son especialmente bajos y esto hace que, a pesar de sus bajas concentraciones, sean, en muchos casos, componentes activos del aroma del vino.⁴³

La técnica de separación usualmente empleada para el análisis de los compuestos relacionados con el aroma del vino es la cromatografía gaseosa (CG). Sin embargo, generalmente requiere una etapa de extracción/concentración previa, como consecuencia de las bajas concentraciones en que se encuentran estos compuestos en los vinos. Una de las alternativas es el uso de la EFS.

Recientemente López y col.⁴⁴ analizan compuestos volátiles traza y minoritarios con CG-EM tras la EFS sobre un copolímero de poliestireno-divinilbenceno. Asimismo se ha realizado un amplio estudio sobre la habilidad de distintas fases sólidas para retener compuestos aromáticos a partir de vinos, pero no se evaluaron las fases de estireno-divinilbenceno.

III.4.2.2 Determinación de terpenos mediante EFS y CG⁴⁵

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un método de EFS-CG para la determinación cuantitativa de compuestos terpénicos en muestras de vino. Para ello se estudiará qué tipo de adsorbente (entre distintas fases sólidas basadas en C₁₈ y en poliestireno-divinilbenceno), y qué eluyente, proporcionan mejores resultados para la retención y elución selectiva de dichos compuestos en muestras de vinos.

III.4.2.2.1 Selección de la fase sólida y eluyentes

Para el desarrollo del método se emplea una mezcla de los siguientes patrones de compuestos terpénicos: Linalol, Gamma-Terpineno, Terpineol, Geraniol, Nerol, (+)-Limoneno, D-Citronelol, y Alfa-Terpineno. Estos patrones se disuelven en una matriz vínica formada por una disolución agua-EtOH (12% v/v), con 4 g/L de ácido tartárico (ácido mayoritario en el vino) y con un pH = 3,20. Como patrón interno se utiliza el 2-Octanol.

Se estudiaron dos clases de fases sólidas, en forma de 6 tipos distintos de cartuchos de EFS comerciales, 3 de ellos basados en una fase sólida de octadecilsílice (C₁₈) y los otros 3 constituidos por polímeros de estireno-divinilbenceno.

Las características de los cartuchos empleados se muestran en la siguiente tabla:

Fase Sólida	C-18			Estireno-Divinilbenceno		
Nombre Comercial	Bond Elut-C18	Discovery DSC-18	Strata C-18E	Chromabond EASY	LiChrolut EN	Strata SDB-L
Fabricante	Varian	Supelco	Phenomenex	Macherey-Nagel	Merck	Phenomenex
Cantidad de fase sólida (mg)	500	500	500	500	200, 500	200, 500
Volumen (ml)	3	3	3	6	3, 6	3, 6

Tabla 18 Características de los cartuchos de EFS empleados.

Para el desarrollo del método (selección adsorbente y eluyente) los cartuchos se acondicionan, antes de cada uso, con 4 ml de diclorometano, 4 ml de MeOH y 4 ml de Agua-EtOH (12%), tal como proponen López y col.³⁵ A continuación se prepara la disolución que se pasará por cada uno de éstos. Para ello, se añaden 100 microlitros de la disolución mezcla de los 8 patrones en diclorometano (esta disolución se preparó de forma que cada uno de los compuestos tuviera una concentración adecuada para proporcionar una señal apreciable en el cromatograma, unas 15 ppm), en 50 ml de la matriz vínica anteriormente mencionada. Con esto lo que se pretende es que la retención de los analitos se produzca a partir de una matriz que presenta características similares (en cuanto a grado alcohólico, pH y contenido en azúcares) a los vinos a analizar.

Una vez que se han pasado los 50 ml de la disolución anterior, se añaden 10 ml de agua para conseguir eliminar los restos de azúcares que pudiese presentar el vino a analizar, puesto que estos restos reducirían la vida útil de la columna del CG. Tras el lavado con agua, se deja que los cartuchos se sequen durante 10 minutos, bajo vacío. De esta forma se asegura que no pase agua al interior del CG. A continuación se eluyen los analitos con 2 ml del eluyente estudiado (n-pentano, metanol, diclorometano o etanol), y se vuelven a recoger los 2 ml siguientes para asegurarse de que algunos de ellos no siguen quedando retenidos en la fase sólida. Los extractos obtenidos se inyectan con un automuestreador en el equipo de CG (con el método cromatográfico indicado en el apartado II.3.2.4).

Las dos fracciones de 2 ml de cada eluyente se analizan por CG, las recuperaciones medias obtenidas de los 8 compuestos analizados, con los 6 adsorbentes estudiados, se presentan en la siguiente tabla, y se calculan a partir de dos referencias preparadas diariamente (100 microlitos de disolución patrón en un volumen final de 2 ml de cada eluyente).

Fase Sólida	Basada en C-18			Basada en Estireno-Divinilbenceno		
	Bond Elut C-18	Discovery DSC-18	Strata C-18E	Chromabond EASY	LiChrolut EN	Strata SDB-L
n-Pentano	40,4 (16,6)	29,1 (0,7)	23,7 (5,8)	22,0 (3,3)	29,4 (7,5)	56,4 (12,6)
Metanol	67,0 (3,4)	70,9 (2,4)	95,5 (5,3)	38,7 (15,5)	74,9 (11,9)	76,7 (8,3)
Diclorometano	84,5 (0,2)	91,1 (0,6)	85,4 (0,1)	72,8 (3,2)	104,0 (2,5)	101,2 (0,1)
Etanol	86,0 (0,7)	73,0 (0,8)	85,4 (0,5)	43,2 (11,4)	63,4 (13,2)	72,5 (1,4)

Tabla 19 Recuperaciones medias (n=2) totales de terpenos usando distintas fases sólidas y disolventes. Extractos 2 + 2ml (2ª fracción entre paréntesis).

Si observamos las recuperaciones conseguidas en función de los eluyentes empleados, puede comprobarse que es el n-pentano el que conduce a recuperaciones más pobres, oscilando entre el 22% y el 56,4%. Con los otros tres disolventes, en cambio, se aprecian mayores recuperaciones, siendo, en casi todos los casos, superiores al 60%. El EtOH y el MeOH presentan comportamientos muy similares en la elución de los analitos a partir de las distintas fases sólidas.

El diclorometano es, con diferencia, el que consigue, en todos los casos, las mayores recuperaciones. De hecho, salvo el caso puntual del adsorbente Chromabond EASY (que por otro lado es la fase sólida que conduce a menores recuperaciones con todos los disolventes empleados), sus recuperaciones son superiores al 84%. Además

con este disolvente se consigue eluir totalmente todos los analitos cuando se utilizan dos adsorbentes basados en poliestireno-divinilbenceno, concretamente LiChrolut EN y Strata SDB-L.

En cuanto a los distintos adsorbentes empleados, podemos observar que entre los basados en C-18, el único que proporciona recuperaciones superiores al 95% de los compuestos ensayados, usando MeOH como disolvente extractante, es el Strata C-18E. También se obtienen buenos resultados (recuperaciones mayores del 80%), usando diclorometano o etanol, con Strata C-18E, Bond Elut C-18 y Discovery DSC-18.

De los basados en poliestireno-divinilbenceno, el que muestra peor comportamiento en la retención-elución de los analitos es el Chromabond EASY. Los otros dos adsorbentes empleados (LiChrolut EN, Strata SDB-L) proporcionan recuperaciones cuantitativas cuando se eluyen los compuestos con diclorometano.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, para la EFS de los compuestos terpénicos, se selecciona como eluyente el diclorometano, pues el que conduce a mayores recuperaciones de todos los compuestos ensayados con todas las fases sólidas utilizadas.

Como adsorbentes se emplearían el Strata SDB-L o el LiChrolut EN, puesto que con ambos se consiguen recuperaciones cuantitativas con diclorometano (tabla 20). Viendo estos resultados de forma individual, se observa que se consiguen recuperaciones superiores al 95% para cada compuesto con el LiChrolut EN, por consiguiente seleccionamos esta fase sólida como el adsorbente a emplear.

Por lo tanto, en la EFS de los compuestos terpénicos, se utilizará como adsorbente el LiChrolut EN y como eluyente el diclorometano.

Compuesto	SDB-L	LiChrolut EN
α -terpineno (%)	92,76	98,19
(+)-limoneno (%)	89,21	92,36
γ -terpineno (%)	88,70	92,00
linalol (%)	101,77	101,62
terpineol (%)	102,78	102,42
D-citronelol (%)	103,76	104,17
nerol (%)	106,59	103,11
geraniol (%)	91,70	99,28

Tabla 20 Recuperaciones (n=2) obtenidas para los compuestos terpénicos estudiados empleando cartuchos de SDB-L y LiChrolut EN, y diclorometano como disolvente para la elución.

III.4.2.2.2 Optimización de las variables de extracción

Se estudiaron 5 variables de extracción que pueden influir considerablemente en el proceso de extracción: volumen de agua de lavado, tiempo de secado, volumen de disolvente extractante, nivel de vacío aplicado en el sistema de extracción y cantidad de fase sólida en el cartucho de extracción. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

El empleo de una etapa de lavado con agua puede resultar interesante al permitir eliminar los compuestos más polares, como azúcares, compuestos fenólicos y compuestos glucosilados. Sin embargo, es necesario evaluar, en primer lugar, si el volumen de agua que se empleará para lavar los cartuchos, afectará o no a la capacidad de la fase sólida para retener los compuestos terpénicos. Para ello se realizaron ensayos en los que los cartuchos se lavaban con 0, 5 y 10 ml de agua. Puede comprobarse que en todos los casos las recuperaciones medias totales son cuantitativas (véase tabla 21), por lo tanto el volumen de agua empleado no afecta a la elución posterior de los terpenos. Este comportamiento presenta la interesante ventaja de que, en función del contenido en azúcares de la muestra a analizar, se pueda lavar con distintos volúmenes de agua para asegurarse el lavado completo, sin que ello afecte a la recuperación de los compuestos de interés.

Volumen de Agua (ml)	0	5	10
Recuperación media (%)	100,9 ± 1,5	99,0 ± 2,3	100,1 ± 4,1

Tabla 21 Porcentaje de recuperación media, de todos los compuestos estudiados, con cartuchos LiChrolut EN, empleando distintos volúmenes de agua en el lavado.

Puesto que se realiza el lavado con agua, hemos de asegurarnos que no queden restos de agua que puedan introducirse en el cromatógrafo de gases. Para ello se hace necesaria una etapa de secado. Se realizaron ensayos en los que se dejaba secar el cartucho, bajo un vacío fijado, durante 10, 20 y 30 minutos. A la vista de los resultados (tabla 22), podemos observar que la duración del tiempo de secado no afecta de manera notable a la recuperación de los analitos, y que con 10 minutos se asegura un secado adecuado del adsorbente y se reduce el riesgo de introducir agua en la CG, además de acortar la duración del método de extracción.

Tiempo de secado (min)	10	20	30
Recuperación media (%)	99,8 ± 2,2	99,9 ± 1,9	96,9 ± 1,8

Tabla 22 Porcentajes de recuperación media, de todos los compuestos estudiados, con distintos tiempos de secado para eliminar restos de agua.

Para optimizar el volumen de diclorometano a emplear, se realizaron ensayos en los que se recogían 4 fracciones de 1 ml sucesivamente, sin secado entre ellas. Tras su análisis por CG, puede comprobarse que ya con el primer ml se obtienen recuperaciones superiores al 85% para todos los compuestos (tabla 23), consiguiéndose en la siguiente fracción los porcentajes restantes, de forma que con 2 ml nos aseguramos que se recuperan cuantitativamente todos los compuestos en estudio.

Compuesto	1ª fracción	2º fracción	3ª fracción	4ª fracción
α -terpineno (%)	102,7	4,4	1,1	0,6
(+)-limoneno (%)	96,3	4,1	n.d.	n.d.
γ -terpineno (%)	96,0	3,3	n.d.	n.d.
linalol (%)	100,2	1,4	n.d.	n.d.
terpineol (%)	101,6	1,4	n.d.	n.d.
D-citronelol (%)	99,8	0,9	n.d.	n.d.
nerol (%)	104,9	1,2	n.d.	n.d.
geraniol (%)	118,9	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = no detectado.

Tabla 23 Porcentajes de recuperación en las 4 fracciones consecutivas de 1ml de diclorometano eluidas a partir de cartuchos LiChrolut EN.

Después de determinar el volumen de extracción, es necesario comprobar también si el vacío ejercido durante la etapa de elución influye de forma significativa sobre las recuperaciones de los compuestos de interés. Para ello se realizan ensayos donde se ejerce un vacío de -0,33, -0,50, -0,67 atmósferas (tabla 24). Pudo comprobarse que las recuperaciones de los analitos no se ven afectadas por el nivel de vacío aplicado. Puesto que el vacío ejercido no afecta a la elución completa de los analitos, pero si a la duración de la extracción (cuanto mayor es el vacío ejercido más se acelera el proceso), optamos por emplear el mayor vacío permitido por el dispositivo (-0,67 atm).

Vacío aplicado (atm)	-0,33	-0,50	-0,67
Recuperación media (%)	99,8 ± 1,7	93,1 ± 2,0	102,9 ± 3,2

Tabla 24 Porcentajes de recuperación media, de todos los compuestos estudiados, con distinto nivel de vacío aplicado.

Finalmente, se estudiaron dos cantidades de fase sólida en el cartucho de extracción: 200 y 500 mg. Las recuperaciones obtenidas para los compuestos terpénicos individuales se muestran en la siguiente tabla:

Compuesto	Recuperación media (%) LiChrolut EN 200 mg	Recuperación media (%) LiChrolut EN 500 mg
α -terpineno	101,14	91,23
(+)-limoneno	100,67	98,52
γ -terpineno	94,43	102,14
linalol	107,32	86,93
terpineol	99,64	78,73
D-citronelol	105,41	80,87
nerol	109,39	79,74
geraniol	103,59	76,20

Tabla 25 Recuperaciones medias de los terpenos ensayados obtenidas con cartuchos de LiChrolut EN de 200 y 500 mg.

A la vista de los resultados puede comprobarse que se encuentran recuperaciones ligeramente superiores en los cartuchos de 200 mg. Probablemente para obtener los mismos niveles usando 500 mg de relleno, sería necesario un mayor volumen de disolvente, lo que a su vez produciría una dilución de los analitos y por ello se decide emplear los cartuchos de 200 mg.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el método optimizado sería el siguiente:

1. Acondicionamiento: 4 ml diclorometano, 4 ml MeOH, y 4 ml Agua-EtOH (12% v/v).
2. Etapa de retención: 50 ml de muestra en cartuchos de LiChrolut EN (200 mg).
3. Etapa de lavado y secado: 10 ml de agua, 10 minutos bajo -0,67 atm.
4. Etapa de elución: 2 ml de diclorometano.

III.4.2.2.3 Propiedades analíticas del método

Las propiedades analíticas del método desarrollado se presentan en la siguiente tabla:

Compuesto	Interv. Conc. ($\mu\text{g l}^{-1}$)	r^2	L.D. ($\mu\text{g l}^{-1}$)	L.C. ($\mu\text{g l}^{-1}$)	% Recuperación	Repetibilidad (d.e.r.) n=5	Reproducibilidad (d.e.r.) n=5
α -terpineno	4-501,7	0,9998	1,13	3,73	99,93	4,87	7,66
(+)-limoneno	4-500,7	0,9996	2,10	7,00	97,01	5,86	5,20
γ -terpineno	4-499,7	0,9998	2,13	7,13	96,78	4,41	7,98
linalol	5,3-678,3	1,0000	0,43	1,40	97,87	4,92	5,58
terpineol	5,7-728,0	0,9999	0,40	1,27	96,76	6,54	6,27
D-citronelol	7,0-863,7	0,9992	3,37	11,17	100,83	2,61	5,97
nerol	6,7-846,3	0,9990	0,73	2,47	97,08	6,31	5,97
geraniol	8,0-665,7	0,9994	0,33	1,07	97,59	6,20	6,63

Tabla 26 Propiedades analíticas del método optimizado.

Se empleó el paquete estadístico Alamin⁴⁶ para determinar los límites de detección (L.D.) y de cuantificación (L.C.). Los L.C. resultantes son menores que los niveles de estos compuestos habitualmente encontrados en vinos jóvenes. Asimismo se puede comprobar como el método optimizado presenta una buena repetibilidad y reproducibilidad.

III.4.2.2.4 Aplicación a muestras reales (vinos)

Se analizaron 12 vinos comerciales usando el método desarrollado. El análisis por CG se realizó tal como se indica en el apartado II.3.2.4. Los cromatogramas obtenidos son similares al presentado en la figura 66.

Como puede comprobarse se identificaron además otros compuestos presentes en el extracto, concretamente algunos ésteres y alcoholes.

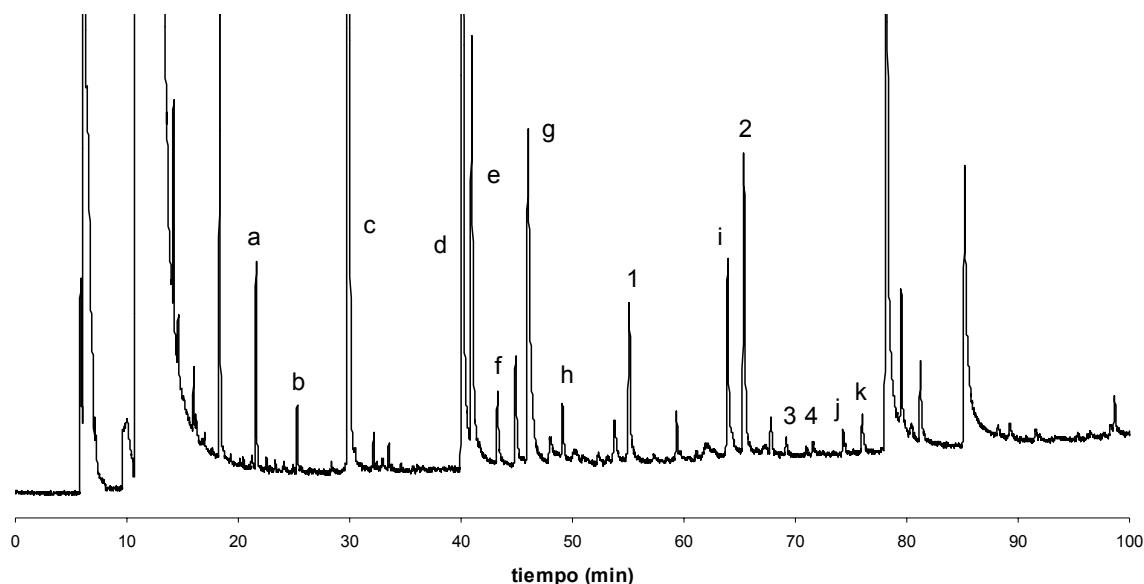


Figura 66 Cromatograma típico de un vino Moscatel: (1) linalol, (2) terpineol, (3) citronelol, (4) nerol. (a) acetato de hexilo, (b) acetato de isoamilo, (c) isoamílico, (d) lactato de etilo, (e) 1-hexanol, (f) trans-hexen-1-ol, (g) octanoato de etilo, (h) isovaleriato de etilo, (i) succinato de dietilo, (j) alcohol bencílico.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 27. Se utilizó el tiempo de retención y la detección por espectrometría de masas para identificar los compuestos terpénicos en las muestras. Se recogieron dos fracciones de 2 mL de diclorometano de cada una de las muestras, y en ninguna de las segundas fracciones se detectaron compuestos terpénicos.

Además, se realizaron reextracciones de los 50 ml de muestra eluída para determinar si la fase sólida era capaz de retener todos los terpenos de las muestras. No se detectaron ninguno de estos compuestos en los reextractos.

Los mayores niveles de compuestos terpénicos se encontraron en vinos elaborados a partir de la variedad de uva Moscatel (en color azul), principalmente debido a los elevados niveles de terpineol que, en algunos vinos, representa más del 50% de los terpenos totales. El linalol y el terpineol son los compuestos presentes en todos los vinos analizados, mientras que el nerol está presente en 11 muestras.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Castillo Irache ^a	n.d.	n.d.	n.d.	21,4	15,5	n.d.	30,4	n.d.	67,3	23
Original Muscat ^b	n.d.	n.d.	n.d.	15,6	107,0	28,47	n.d.	n.d.	151,0	70,8
Marques de Riscal ^c	13,6	n.d.	n.d.	4,9	6	n.d.	29,2	n.d.	53,7	11,2
Viña Esmeralda ^b	n.d.	n.d.	n.d.	102,9	146,1	22,8	25,8	n.d.	297,7	49,1
Gran Feudo ^b	n.d.	n.d.	n.d.	26,8	102,2	22,5	31,9	77,11	260,5	39,2
Viña Mireia ^b	n.d.	n.d.	n.d.	14,7	60,3	20,1	16,7	38,05	149,9	40,2
Cresta Real ^d	8,8	n.d.	n.d.	6,6	9,0	19,1	27,8	n.d.	71,3	12,6
Moscatel Dorado ^b	n.d.	n.d.	n.d.	59,5	115,4	22,2	15,8	n.d.	212,8	54,2
Tokaji Furmint ^e	tr	n.d.	n.d.	15,5	16,6	18,4	34,1	n.d.	93,3	17,8
Castillo Aguarón ^f	8,9	n.d.	n.d.	9,0	13,7	17,1	23,0	64,15	135,9	10,1
Castillo de Liria ^b	n.d.	n.d.	n.d.	87,1	75,0	27,4	18,5	n.d.	208,1	36
Ribera del Puerto ^g	4,5	n.d.	n.d.	5,6	7,0	18,0	85,1	n.d.	120,1	5,8

Variedades de uva: ^a: Chardonnay, ^b: Moscatel, ^c: Sauvignon Blanc, ^d: Verdejo, ^e: Furmint, ^f: Garnacha, ^g: Palomino-Macabeo.

n.d.: no detectado. tr: trazas, por debajo del L.C.

Tabla 27 Concentraciones (µg/L) de compuestos terpénicos en vinos: 1: α-terpineno, 2: Limoneno, 3: γ-terpineno, 4: Linalol, 5: Terpineol, 6: Citronelol, 7: Nerol, 8: Geraniol, 9: Total, 10: % de terpineol.

Compuesto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Isobutanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetato isoamilo	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
3-Metil-1-butanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hexanoato de etilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactato de etilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-hexanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-hexenol	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Octanoato de etilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinato de dietilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido hexanoico	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Alcohol fenético	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malato de dietilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ácido octanoico	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Ácido decanoico	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
Succinato de etilo	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Tyrosol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Hexanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Acetato de hexilo	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Decanoato de etilo	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5-hidroximetil furfural	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-

+: presente, -: no presente

Tabla 28 Compuestos no terpénicos identificados en los vinos analizados. 1: Castillo de Irache, 2: Original Muscat, 3: Marques de Riscal, 4: Viña Esmeralda, 5: Gran Feudo, 6: Viña Mireia, 7: Cresta Real, 8: Moscatel Dorado, 9: Tokaji Furmint, 10: Castillo Aguaron, 11: Castillo de Liria, 12: Ribera del Puerto.

En la tabla 28 se muestran algunos compuestos volátiles, no terpénicos, identificados en esas mismas muestras de vino.

Se realizó asimismo el análisis de componentes principales sobre los resultados encontrados para los vinos comerciales analizados, encontrándose que los terpenos que mayor peso ejercen en las componentes principales representadas son el terpineol y el linalol en la CP1, y el geraniol en la CP2 (figura 67).

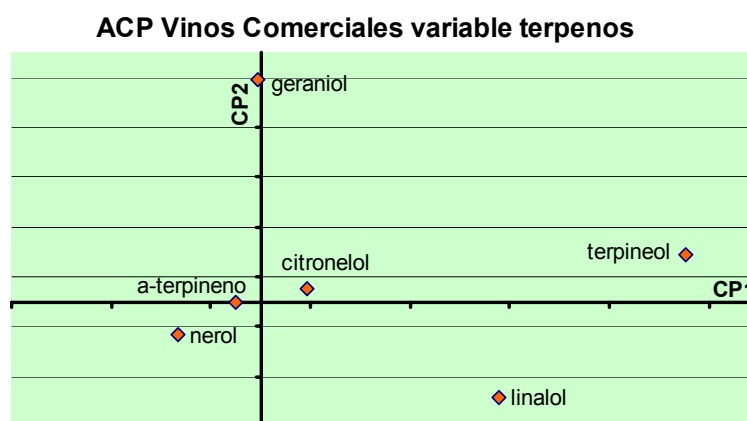


Figura 67 Representación del ACP de la variable terpenos en los vinos comerciales analizados.

En función de esas componentes principales, se obtiene la clasificación de los vinos analizados mostrada en la figura 68.

En esta figura podemos comprobar que los vinos analizados se clasifican en dos grupos bien diferenciados, uno formado por los vinos elaborados, total o parcialmente, con la variedad Moscatel; y los que no se elaboran a partir de esa variedad.

Destaca además el hecho de que el único vino tinto analizado (Castillo de Aguarón), se encuentra separado del resto de vinos sin Moscatel.

Además, entre los vinos elaborados con la variedad Moscatel, se aprecia una cierta diferenciación en función de su composición, según sean monovarietales de Moscatel, sean un coupage con otras variedades (Viña Esmeralda, Viña Mireia, etc.), o incluso de los elaborados con otras variedades de Moscatel distintas de la tradicional (Moscatel de Alejandría), como el Gran Feudo elaborado con 100% de Moscatel de Frontignan (Moscatel de grano menudo).

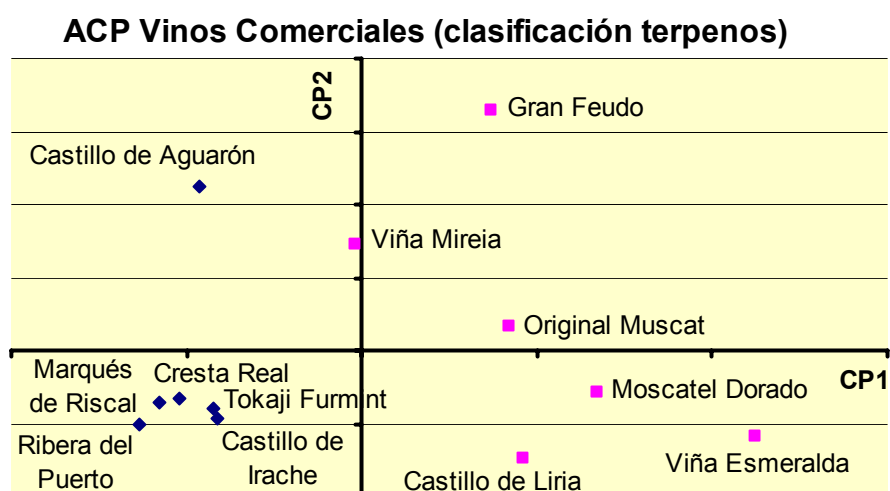


Figura 68 Clasificación de los vinos comerciales analizados en función de la variable terpenos

III.4.2.3 Aplicación del método desarrollado a la determinación de la fracción volátil de vinos jóvenes monovarietales.

Siguiendo con los análisis realizados para determinar la utilidad del método desarrollado de EFS/CG, este se aplicó en la determinación de la composición terpénica y otros componentes del aroma de 23 vinos monovarietales correspondientes a 13 variedades de uva cultivadas en Jerez y elaboradas en diferentes condiciones de vinificación.

De esta manera se han determinado compuestos de tipo terpénico, ésteres, ácidos y alcoholes que permiten, en primer lugar, la caracterización de las variedades estudiadas, y en segundo lugar la evaluación de los efectos que distintas condiciones de vinificación tienen sobre algunos de estos compuestos.

En la tabla 29 se indican cuales son los vinos analizados, y cuales son los distintos procesos de vinificación que los diferencian. Además en algunas variedades se realizan ensayos de riego.

Variedad de uva	Código asignado Tipo de muestra			
Chardonnay	Chard			
	Secano (v.c.)			
Cabernet Sauvignon	Cabsauv			
	Secano (v.c.)			
Garrido	Garrido			
	Secano (v.c.)			
Graciano	Graciano			
	Secano (v.c.)			
Moscatel Alejandría	Moscmal		Moscmalr	
	Secano (v.c.)		Riego (v.c.)	
Palomino	Pno	Pnor	Pnoenz	Pnomac
	Secano (v.c.)*	Riego (v.c.)	Enz. glucosidasas	Maceración en frío
Palomino negro	Pnoneg		Pnonegbt	
	Secano (v.c.)*		Fermentado a baja temperatura	
Syrah	Syrah			
	Secano (v.c.)			
Tempranillo	Temprani			
	Secano (v.c.)			
Gewürtztraminer (Traminer)	Trami		Tramimac	
	Secano (v.c.)*		Maceración en frío	
Tintilla de Rota	Tinrota		Tinrotar	
	Secano (v.c.)		Riego (v.c.)	
Vijiriega	Vijirieg			
	Secano (v.c.)			
Viura	Viura	Viuramac	Viuraenz	
	Secano (v.c.)*	Maceración en frío	Enzimas glucosidasas	

v.c.: vinificación clásica *: testigos frente a los cuales se comparan los otros tipos de ensayos.

Tabla 29 Muestras analizadas, clasificadas en función de la variedad de uva y tipo vinificación

Los extractos obtenidos se analizaron por CG (apartado II.3.2.4) y los resultados medios (n=2) se presentan en las tablas 30 (compuestos terpénicos) y 31 (ésteres y alcoholes).

Muestra	g-terpineno	linalol	terpineol	citronelol	nerol	geraniol
Chard	113,76	n.d.	n.d.	n.d.	30,42	n.d.
Cabsauv	101,61	16,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Garrido	108,59	7,09	n.d.	n.d.	19,55	n.d.
Graciano	18,20	15,59	n.d.	n.d.	90,79	n.d.
Moscmal	137,43	76,35	123,78	18,22	22,50	13,01
Moscmalr	132,85	86,89	89,17	18,70	37,91	12,65
Pno	133,99	9,72	5,26	n.d.	32,81	n.d.
Pnor	155,89	n.d.	3,86	n.d.	37,40	n.d.
Pnoenz	261,38	9,63	5,32	n.d.	35,76	n.d.
Pnomac	246,24	5,16	3,55	n.d.	21,84	n.d.
Pnoneg	69,09	6,35	4,15	n.d.	67,83	n.d.
Pnonegbt	84,81	n.d.	3,82	n.d.	61,85	n.d.
Pnonegmc	95,38	n.d.	4,37	n.d.	47,38	n.d.
Syrah	70,25	15,81	3,90	n.d.	96,78	n.d.
Temprani	21,07	14,49	n.d.	n.d.	100,33	n.d.
Trami	147,65	13,32	15,91	n.d.	18,91	n.d.
Tramimac	127,68	49,63	47,31	31,44	47,95	n.d.
Tinrota	55,64	8,99	3,89	n.d.	52,47	n.d.
Tinrotar	63,18	13,18	5,25	n.d.	72,48	n.d.
Vijirieg	110,95	n.d.	n.d.	n.d.	16,62	n.d.
Viura	122,13	8,90	n.d.	n.d.	29,47	n.d.
Viuramac	140,11	10,87	n.d.	n.d.	45,67	n.d.
Viuraenz	84,08	9,95	4,25	n.d.	28,08	n.d.

n.d.: no detectado

Tabla 30 Concentraciones de compuestos terpénicos ($\mu\text{g/L}$) en los vinos ensayados. El significado de las claves identificativas de las muestras viene indicado en la tabla 29.

Muestra	Acet. de hexilo (1)	Hexan. de etilo (2)	Isoval. de etilo (3)	Decan. de etilo (4)	Succin. de dietilo (5)	Alcohol fenético (6)	Lact. de etilo (7)	1-hexenol (8)
Chard	3802,71	625,76	n.d.	749,83	1609,95	19836,91	6683,07	1554,25
Cabsauv	8413,56	n.d.	71,60	517,75	8869,60	142180,14	6851,06	3246,48
Garrido	4957,09	809,44	n.d.	934,18	3376,98	30692,43	2759,36	725,63
Graciano	11852,74	270,90	64,66	536,53	7249,23	89780,62	6129,16	1902,19
Moscmal	4569,87	181,74	n.d.	n.d.	3540,18	640347,49	1543,56	1148,78
Moscmalr	7235,39	227,57	n.d.	734,42	4903,32	74758,86	1716,09	1414,54
Pno	3101,10	184,67	42,52	636,11	3670,12	60036,30	1546,39	967,46
Pnor	3845,81	933,20	n.d.	686,01	506,39	27075,32	1536,13	584,25
Pnoenz	3248,63	n.d.	n.d.	618,46	2550,83	42902,18	5915,64	1469,58
Pnomac	1995,47	n.d.	31,34	459,01	1464,19	21314,65	3913,86	588,82
Pnoneg	9009,18	766,71	60,11	559,27	5700,90	58825,22	11029,67	2589,78
Pnonegbt	8693,56	688,12	93,41	530,26	4205,79	47176,33	12404,56	2853,44
Pnonegmc	6029,73	672,24	108,98	612,76	6680,80	39742,41	11753,26	689,72
Syrah	11428,61	691,99	72,74	532,53	5195,39	67844,04	8876,04	1968,87
Temprani	11333,78	240,13	76,38	569,75	9733,79	127133,60	8383,83	2484,65
Trami	3470,72	n.d.	n.d.	845,20	986,22	15348,14	2648,54	1118,66
Tramimac	6646,08	820,62	52,50	604,28	3562,64	23374,41	15216,11	2277,38
Tinrota	5256,09	509,41	44,75	386,81	3477,56	38920,62	4548,58	1070,22
Tinrotar	9366,48	779,25	67,55	511,57	6759,96	61095,50	10156,49	1788,34
Vijirieg	4128,10	n.d.	40,27	687,96	3831,27	43983,00	1839,51	999,82
Viura	5968,06	201,33	n.d.	684,75	1704,35	35831,32	7231,25	1446,78
Viuramac	6364,85	184,92	48,85	636,97	4076,93	34748,33	2057,12	915,60
Viuraenz	5510,98	n.d.	n.d.	529,65	1954,62	36041,16	6860,85	1581,52

n.d.: no detectado

Tabla 31 Concentraciones de esteres y alcoholes ($\mu\text{g/L}$) en los vinos ensayados.

Los datos obtenidos son analizados para determinar tanto su variabilidad entre las distintas variedades de uva, como la posible influencia en las mismas de las condiciones de vinificación y cultivo que se han ensayado.

Al realizar un análisis de agrupaciones de todas las muestras analizadas, empleando como variables los compuestos de tipo terpenico, se obtuvo el dendograma de la figura 69. En esta representación puede verse como los terpenos permiten una agrupación característica de las variedades analizadas.

En primer lugar se puede distinguir un grupo bastante homogéneo formado por la gran mayoría de las variedades blancas. A continuación se encuentra otro grupo más heterogéneo, en el que se puede distinguir un subgrupo constituido por las variedades tintas autóctonas (Tintilla de Rota, Palomino negro) bastante diferenciado del subgrupo formado por las otras variedades tintas no autóctonas (Graciano, Tempranillo, Syrah). También se distinguen otros subgrupos formados por la variedad tinta Cabernet Sauvignon, otro correspondiente a la variedad Palomino, y un último grupo donde se integran las variedades más aromáticas: Moscatel (secano y riego) y Traminer maceración, estando este grupo completamente separado del resto de vinos analizados.

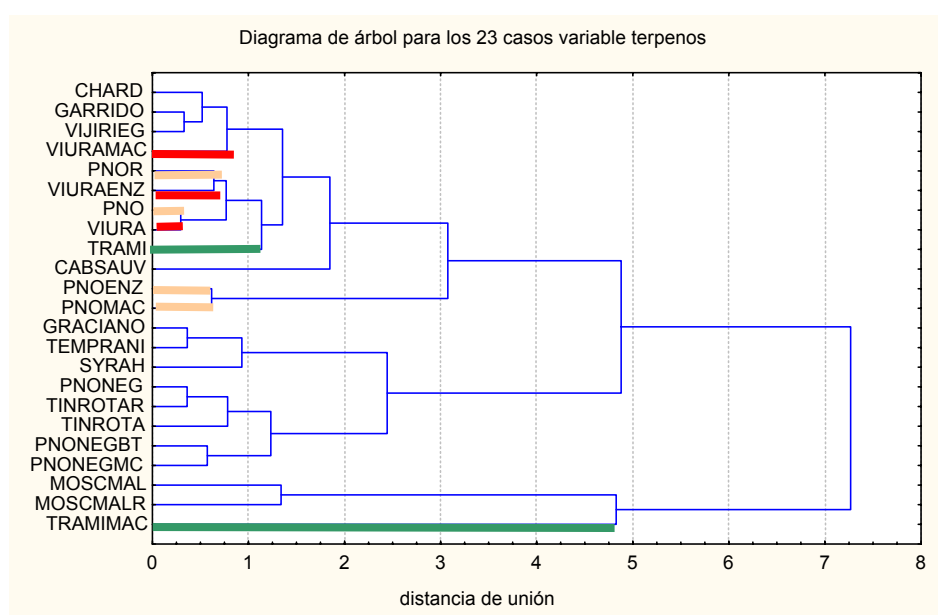


Figura 69 Dendrograma representando la agrupación existente, en función de terpenos, de las variedades analizadas.

Son también muy interesantes los efectos de los procesos de maceración pelicular y el empleo de enzimas glucosidasas en la vinificación. En cuanto a la maceración en frío, hay que recordar que tiene como objetivo fundamental el incremento de los fenómenos de extracción desde las partes sólidas, particularmente de los terpenos y otros compuestos aromáticos presentes en las uvas.

Los resultados muestran que los efectos de este proceso, en cuanto a terpenos, son totalmente dependientes de la variedad empleada. Así, mientras las modificaciones son mínimas en la variedad Viura (líneas en rojo), para la variedad Palomino (líneas en naranja) y Traminer (líneas en verde) si que son notables.

Algo similar ocurre con el empleo de enzimas con actividad glucosidasa. Así, mientras en la variedad Palomino hay un claro efecto (líneas en naranja), para la variedad Viura nuevamente los efectos son menores (líneas en rojo).

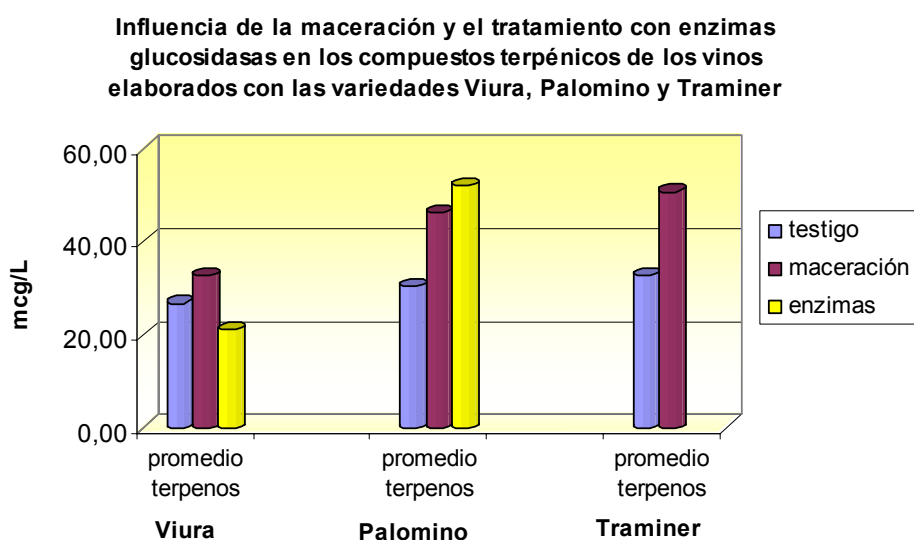


Figura 70 Influencia de los distintos tratamientos sobre la composición terpénica de las variedades Palomino, Gewürtztraminer (Traminer) y Viura.

En general, en la figura 70 se observa que la maceración conduce a un incremento del promedio de los compuestos terpénicos analizados en las tres variedades, especialmente de Palomino y Traminer. En cuanto al empleo de enzimas glucosidasas, se comprueba que es efectiva en el caso de la variedad Palomino, pero no en la variedad Viura.

Si además se evalúa la variación de los terpenos entre los 23 tipos de vinos analizados (figura 71), puede observarse que se registran tres tipos de comportamiento. Tanto el gamma-terpineno, como el nerol, presentan poca similitud, tanto entre ellos, como con el resto de los terpenos, que, a su vez, si tienen un comportamiento muy similar entre todas las variedades analizadas. Esto nos lleva a concluir que deben ser estos dos primeros compuestos los que reflejen las diferencias entre los vinos analizados.

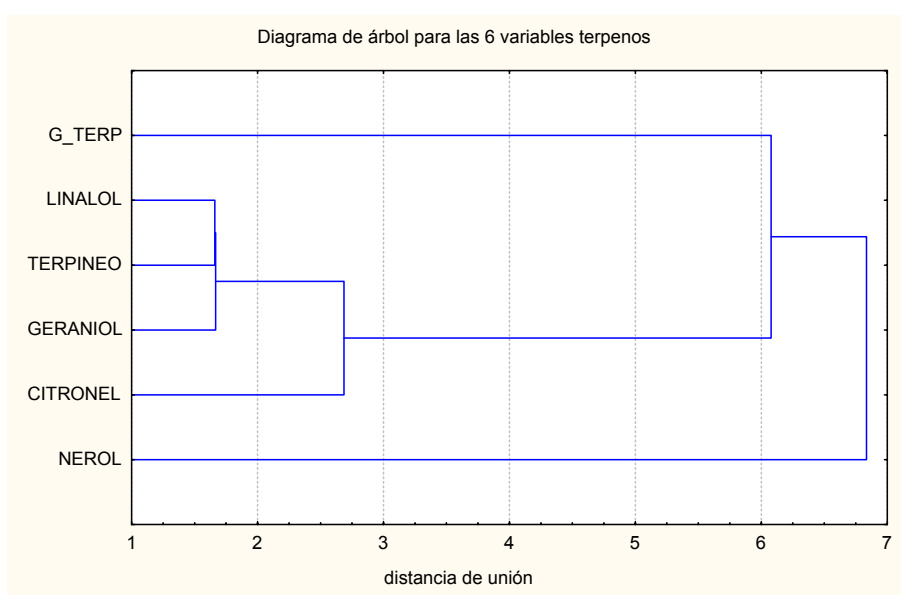


Figura 71 Dendrograma representando la agrupación de los compuestos terpénicos en los 23 casos evaluados.

Para corroborar los resultados obtenidos con los dendogramas y comprobar cuales son los terpenos que permiten la diferenciación de las variedades ensayadas, se realiza un análisis de componentes principales (ACP) en los 23 vinos analizados. Los resultados obtenidos se presentan en la gráfica 72.

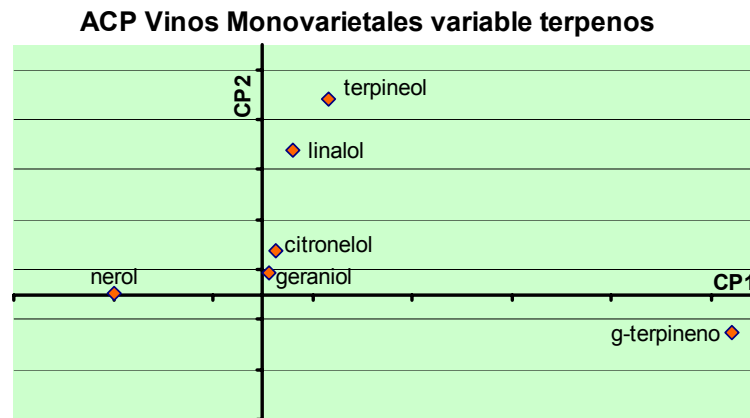


Figura 72 Representación del análisis de componentes principales, variable terpenos, de los 23 vinos analizados.

Con este ACP se puede establecer una clasificación de las muestras analizadas tal como se muestra en la figura 73.

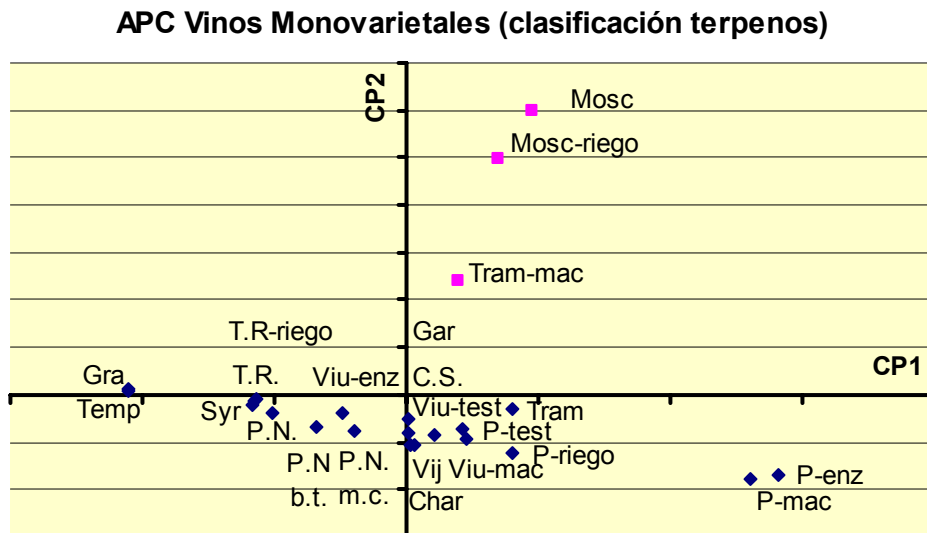


Figura 73 Clasificación de los vinos analizados en función de las CP 1 y 2 para la variable terpenos. Gra: Graciano, Temp: Tempranillo, Syr: Syrah, T.R.:Tintilla de Rota, P.N.: Palomino Negro, Gar: Garrido, C.S: Cabernet Sauvignon, Viu: Viura, Vij: Vijiriega, Char: Chardonnay, P: Palomino, Mosc: Moscatel. Con mac se indica maceración, con b.t: baja temperatura y con m.c.: maceración carbónica

Se puede comprobar como con las componentes principales obtenidas en el ACP, se aprecia una separación entre los vinos considerados más aromáticos (Traminer y Moscatel) y el resto de variedades analizadas.

La diferenciación entre variedades aromáticas y no aromáticas se refleja en la CP2, que como se puede ver en la figura 72, es donde terpineol y linalol presentan una mayor contribución, siendo prácticamente nula la contribución de los otros terpenos. Serán por tanto terpineol y linalol los terpenos más directamente responsables de las características diferenciadoras de las variedades aromáticas. En el caso de la CP1 el compuesto que presenta mayor contribución es el gamma-terpineno.

En cuanto a otros compuestos volátiles (tabla 31), entre los 23 vinos analizados se han encontrado dos grupos de compuestos de carácter diferenciado. El primero de ellos formado principalmente por ésteres etílicos de ácidos grasos y el segundo por otros compuestos relacionados con el proceso de maceración, tal como se aprecia en la figura 74.

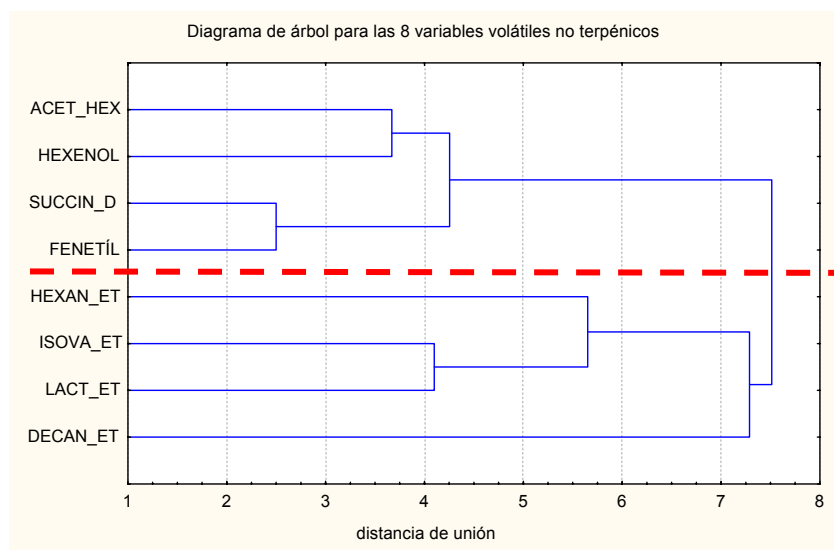


Figura 74 Dendrograma representando la agrupación de las compuestos no terpénicos en los 23 casos evaluados.

Asimismo puede comprobarse que estos compuestos se ven afectados por las condiciones de vinificación orientadas a la obtención de mayores aromas varietales, de forma que tanto la maceración prefermentativa, como el empleo de enzimas con actividad glucosidasa, puede influir en los niveles de los mismos, en este último caso como consecuencia de la actividad esterasa que suele registrarse junto a la actividad glucosidasa.⁴⁷

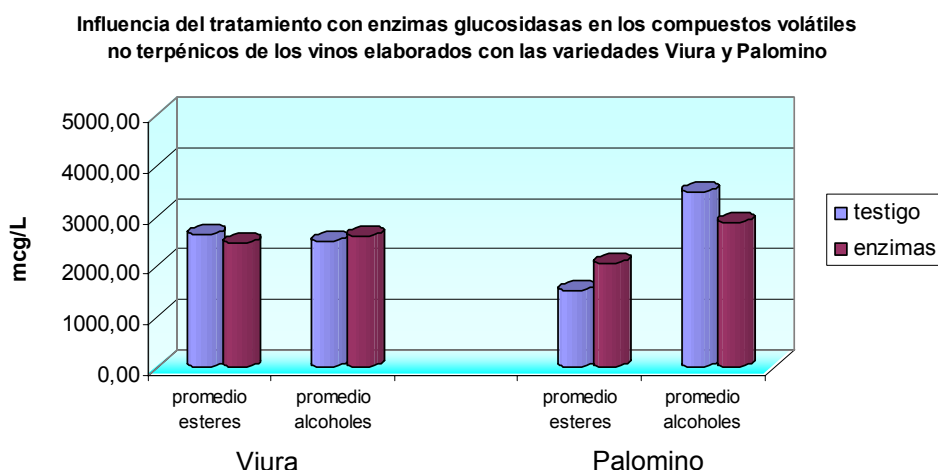


Figura 75 Influencia del tratamiento con enzimas glucosidasas en los compuestos volátiles no terpénicos de los vinos elaborados con las variedades Viura y Palomino.

A la vista de esta figura 75 puede comprobarse que en los vinos analizados no se observa una influencia clara de la actividad esterasa de las enzimas glucosidasas, puesto que mientras que en el caso de la variedad Viura se aprecia una ligera disminución en el contenido de los esteres, en el caso de la variedad Palomino, se aprecia un incremento. Se trata por tanto de enzimas con una actividad esterasa débil o nula.

En el caso de la maceración tampoco parece existir un efecto claro de la influencia que la maceración en frío prefermentativa tiene en las variedades ensayadas, como cabría esperar (véase figura 76). Además este comportamiento es distinto entre ambas variedades. Así, en el caso de la variedad Viura, se aprecia el aumento de algunos compuestos (acetato de hexilo, isovalerato de etilo y succinato de dietilo), una disminución ligera (con mayor o menor intensidad) para los compuestos hexanoato de etilo, decanoato de etilo, alcohol fenílico y 1-hexenol, mientras que el lactato de etilo disminuye de forma considerable en los vinos obtenidos a partir de mostos con maceración.

Sobre la variedad Traminer se aprecia una mayor influencia, de forma que son más acusados los incrementos de todos los compuestos, con dos excepciones: la del isovalerato de etilo que no varía, y del decanoato de etilo, en el que se produce una ligera disminución.

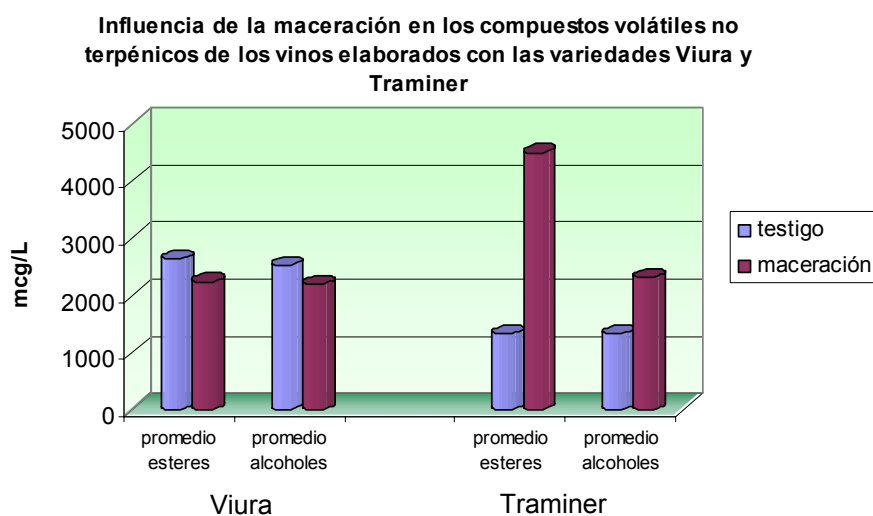


Figura 76 Influencia de la maceración en frío en los compuestos volátiles no terpénicos de los vinos elaborados con las variedades Viura y Gewürtztraminer.

De esta forma, si se evalúan las agrupaciones que se forman en función de estos compuestos volátiles no terpénicos, entre los 23 vinos estudiados, puede apreciarse una diferenciación en función de que se trate de vinos blancos y tintos, y del grado de maceración (figura 77).

Los grupos formados pueden justificarse al evaluar la influencia que el tipo de vinificación (en blanco o tinta) y la maceración, tiene en la composición promedio de estos compuestos volátiles (figura 78).

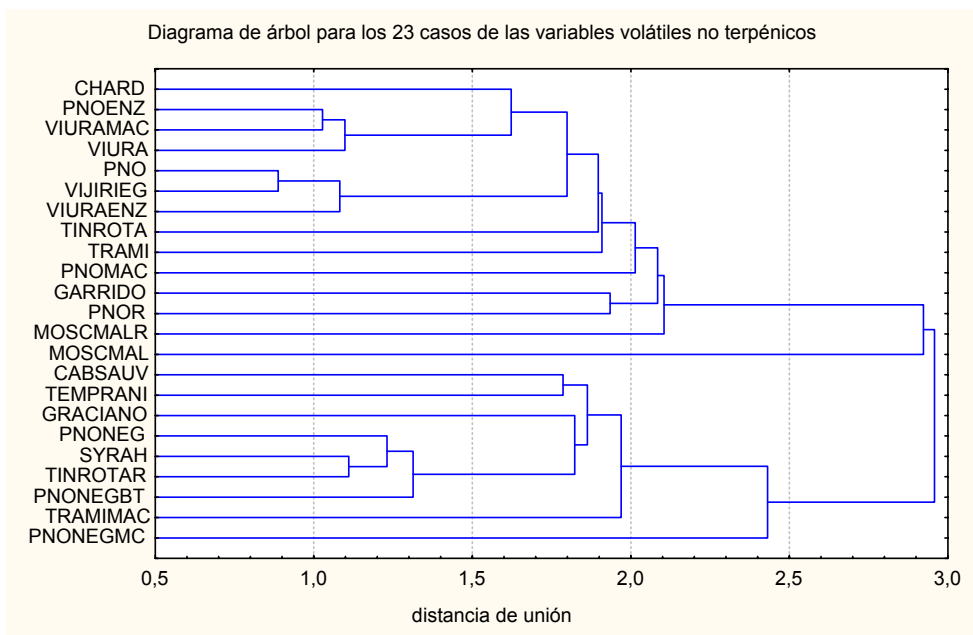


Figura 77 Dendograma que representa la agrupación existente, en función de los compuestos volátiles no terpénicos, de los vinos ensayados.

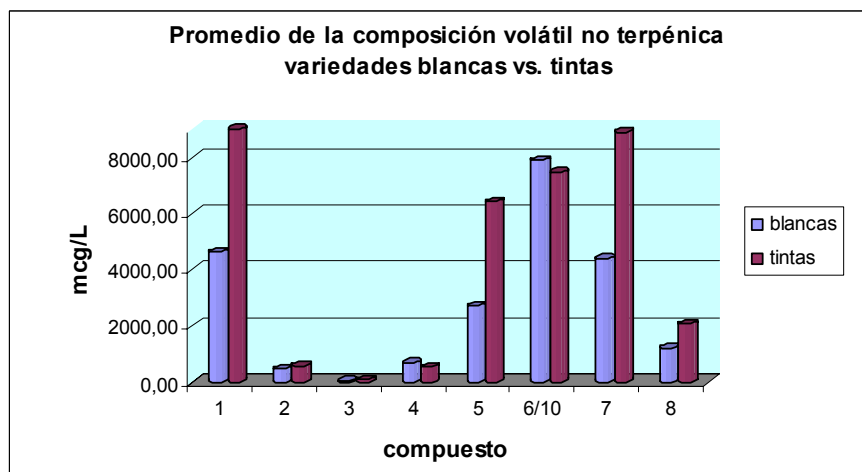


Figura 78 Influencia del tipo de vinificación en los compuestos volátiles no terpénicos de los variedades ensayadas.

Este agrupamiento observado en el dendograma anterior se repite al representar los resultados del análisis de componentes principales, clasificándose de esa forma los vinos analizados en variedades blancas y tintas, con la única excepción de la variedad Tintilla de Rota que aparece en el grupo de las variedades blancas, tal como se aprecia en la figura 79.

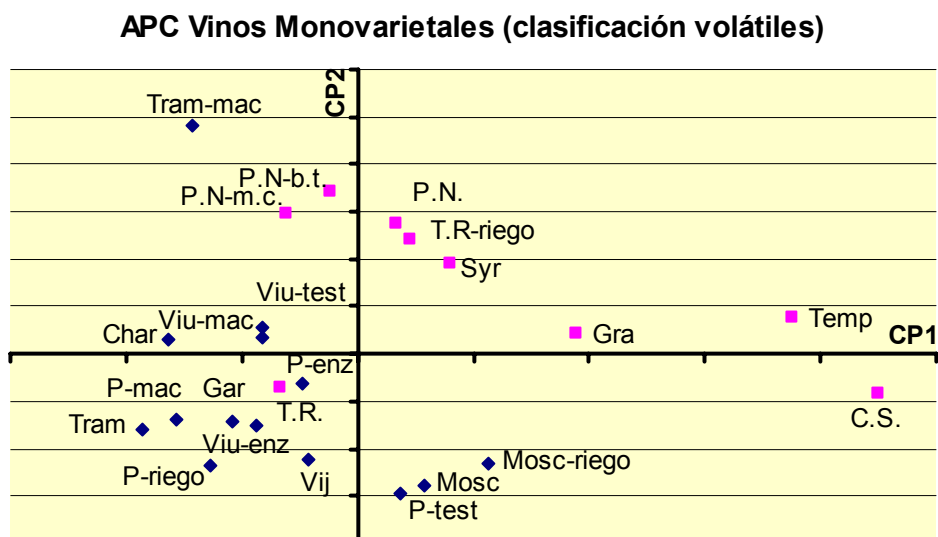


Figura 79 Clasificación de los vinos analizados en función del ACP de la variable compuestos volátiles no terpénicos. Gra: Graciano, Temp: Tempranillo, Syr: Syrah, T.R.:Tintilla de Rota, P.N.: Palomino Negro, Gar: Garrido, C.S: Cabernet Sauvignon, Viu: Viura, Vij: Vijiriega, Char: Chardonnay, P: Palomino, Mosc: Moscatel. Con mac se indica maceración, con b.t: baja temperatura y con m.c.: maceración carbónica.

Asimismo puede comprobarse que la diferenciación entre vinificación con y sin maceración se debe fundamentalmente a los compuestos alcohol fenílico, acetato de hexilo, succinato de dietilo y lactato de etilo, que son los que mayor peso tienen en las componentes principales, y que además se corresponden con el agrupamiento que se aprecia en la figura 80.

Esta diferenciación se debe a que los procesos de maceración hacen que se incremente, por ejemplo, tanto el hexenol, como alguno de sus esteres derivados (acetato de hexilo) en los vinos elaborados mediante maceración con las partes sólidas.

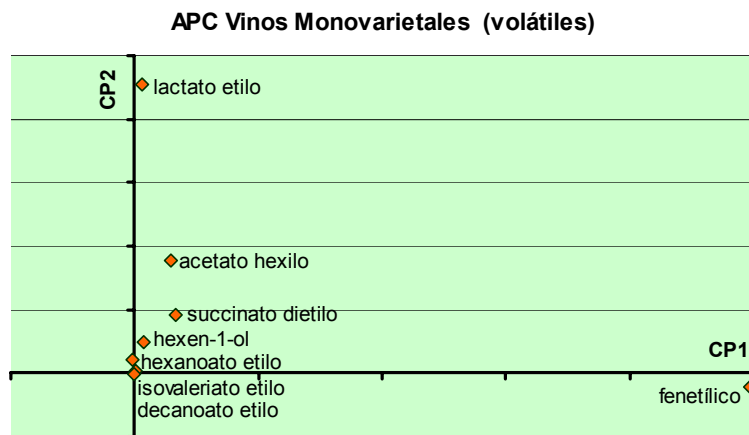


Figura 80 Representación del análisis de componentes principales, variable volátiles no terpénicos, de los 23 vinos analizados.

Finalmente se realiza el análisis de agrupaciones correspondiente a todas las variables (compuestos terpénicos y no terpénicos) en las 23 muestras de vino estudiadas:

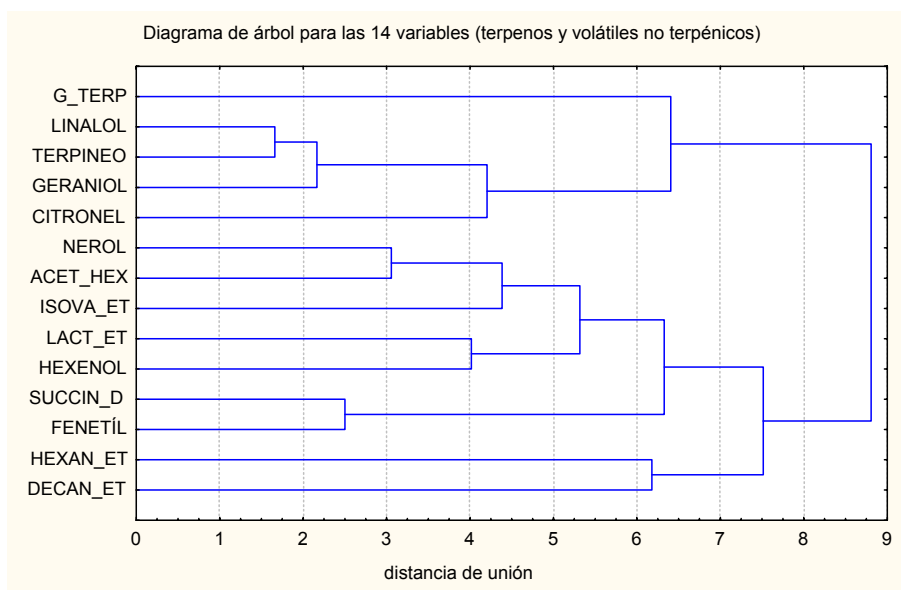


Figura 81 Dendrograma representando la agrupación de todas las variables estudiadas (terpenos y compuestos no terpénicos) en los 23 casos evaluados.

En general, se aprecian dos grupos: un primer grupo formado por todos los compuestos terpénicos, salvo el nerol, que presenta un comportamiento más similar al del segundo grupo, constituido por los compuestos no terpénicos.

Podemos concluir indicando que los compuestos terpénicos parecen mostrar el mismo tipo de variación entre las distintas muestras, sin que se aprecie una clara influencia de la maceración o de otros tratamientos en su composición, aunque sí en función de la variedad de uva empleada.

- ¹ M. Palma, Z. Piñeiro, C.G. Barroso, "Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents", *J. Chromatogr. A*, 2001, **921**, 169.
- ² M. Antolovich, P. Prenzler, K. Robards, D. Ryan, "Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits", *Analyst*, 2000, **125**, 989.
- ³ M. T. Tena, A. Ríos, M. Valcárcel, "Supercritical fluid extraction of t-resveratrol and other phenolics from a spiked solid", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1998, **361**, 143.
- ⁴ M. Palma, L.T. Taylor, "Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide", *J. Chromatogr. A*, 1999, **849**, 117.
- ⁵ M. Palma, L.T. Taylor, "Statistical design for optimization of extraction of polyphenols from an inert matrix using carbon dioxide-based fluids", *Anal. Chim. Acta*, 1999, **391**, 312.
- ⁶ B. van Babel, K. Hartonene, C. Rappe, M.L. Riekkola, "Pressurised hot water/steam extraction of polychlorinated dibenzofurans and naphthalenes from industrial soil", *Analyst*, 1999, **124**, 1351.
- ⁷ J. Burns, P. T. Gardner, J. Oneil, S. Crawford et al., "Relationship among Antioxidant Activity, Vasodilation Capacity, and Phenolic Content of Red Wines", *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 220.
- ⁸ M. Brenes-Balbuena, P. García-García, A. Garrido-Fernández, "Phenolic compounds related to the black color formed during the processing of ripe olives", *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 1192.
- ⁹ G. J. Soleas, E. P. Diamandis, D.M. Goldberg, "Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and resveratrol) and their conjugates in biological fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection", *J. Chromatogr. B*, 2001, **757**, 161.
- ¹⁰ J. K. Lin, C. L. Lin, Y.C. Liang, S.Y. Lin-Shiau et al., "Survey of catechins, gallic acid, and methylxanthines in green, Oolong, Pu-erh, and black Teas", *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 3635.
- ¹¹ Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso, "Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids", *J. Chromatogr. A*, 2004, **1026**, 19.
- ¹² P. Viñas, C. Lopez-Erroz, J.J. Martín-Hernández, M. Hernández-Córdoba, "Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection", *J. Chromatogr. A*, 2000, **871**, 85.
- ¹³ M. Popp, W. Lied, A.J. Meyer, A. Richter, et al., "Sample preservation for determination of organic compounds: Microwave versus freeze-drying", *J. Experim. Botany*, 1996, **47**, 1469.
- ¹⁴ T. Inakuma, M. Yasumoto, M. Koguchi, T. Kobayashi, "Effect of drying methods on extraction of lycopene in tomato skin with supercritical carbon dioxide", *J. Jap. Soc. Food Sci. & Technol.*, 1998, **45**, 740.
- ¹⁵ M. Keinanen, R. Julkunen-Tiitto, "Effect of sample preparation method on Birch (*Betula pendula* Roth) leaf phenolics", *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 2724.
- ¹⁶ A. Hubert, K-D Wenzel, M. Manz, L. Weissflog et al., "High extraction efficiency for POPs in real contaminated soil samples using accelerated solvent extraction", *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 1294.
- ¹⁷ J. A. Field, K. Monohan, R. Reed, "Coupling supercritical CO₂ and subcritical (hot) water for the determination of Dacthal and its acid metabolites in soil", *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 1956.
- ¹⁸ A. Müller, E. Björklund, C. van Holst, "On-line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedingstuffs and food matrices using gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 2001, **925**, 197.
- ¹⁹ M. Palma, Z. Piñeiro, C.G. Barroso, "In-line pressurized-fluid extraction-solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes", *J. Chromatogr. A*, 2002, **968**, 1.
- ²⁰ C. Chilla, D. A. Guillén, C. G. Barroso, J. A. Pérez-Bustamante, "Automated on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography diode array detection of phenolic compounds in sherry wine", *J. Chromatogr. A*, 1996, **750**, 209.

- ²¹ B.E. Richter, B. A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter et al., "Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation", *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 1033.
- ²² X. Lou, H-G. Janssen, C. A. Cramers, "Parameters affecting the accelerated solvent extraction of polymeric samples", *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 1598.
- ²³ P. Fernández- Zurbano, V. Ferreira, A. Escudero, J. Cacho, "Role of hydroxycinnamic acids and flavanols in the oxidation and browning of white wines", *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 4937.
- ²⁴ Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso, "Determination of trans-resveratrol in grapes by pressurized liquid extraction and fast high performance liquid chromatography", enviado *J. Chromatography A*.
- ²⁵ E. Revilla, J. M. Ryan, "Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection without sample preparation", *J. Chromatogr. A*, 2000, **881**, 461.
- ²⁶ C. Domínguez, D.A. Guillén, C.G. Barroso, "Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine", *J. Chromatogr. A*, 2001, **918**, 303.
- ²⁷ L. Arce, M.T. Tena, A. Rios, M. Valcarcel, "Determination of trans-resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow sample clean-up system followed by capillary electrophoresis separation", *Anal. Chim. Acta*, 1998, **359**, 27.
- ²⁸ S. Malovana, F.J.G. Montelongo, J.P. Pérez, M. A. Rodríguez-Delgado, "Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography", *Anal. Chim. Acta*, 2001, **428**, 245.
- ²⁹ A. Roldan, V. Palacios, I. Caro, L. Perez, "Resveratrol content of Palomino fino grapes: influence of vintage and fungal infection", *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 1464.
- ³⁰ B. C. Trela, A. L. Waterhouse, "Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability", *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 1253.
- ³¹ M. Papagiannopoulos, B. Zimmermann, A. Mellenthin, M. Krappe et al., "Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt", *J. Chromatogr. A*, 2002, **958**, 9.
- ³² M. Castellari, E. Sartini, A. Fabiani, G. Arfelli, A. Amati, "Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column", *J. Chromatogr. A*, 2002, **973**, 221.
- ³³ P. J. Williams, C.R. Strauss, B. Wilson, R.A. Massywestropp, "Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene .beta.-D glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes", *J. Agric. Food Chem.*, 1982, **30**, 1219.
- ³⁴ P. J. Williams, C.R. Strauss, B. Wilson, R.A. Massywestropp, "Novel monoterpene disaccharide glycosides of *vitis-vinifera* grapes and wines", *Phytochem.*, 1982, **21**, 2013.
- ³⁵ P. J. Williams, C.R. Strauss, B. Wilson, R.A. Massywestropp, "Glycosides of 2-phenylethanol and benzyl alcohol in *vitis-vinifera* grapes", *Phytochem.*, 1983, **22**, 2039.
- ³⁶ B. W. Zoecklein, T.K. Wolf, S.E. Duncan, J.E. Marcy et al., "Effect of fruit zone leaf removal on total glycoconjugates and conjugate fraction concentration of Riesling and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) grapes", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1998, **49**, 259.
- ³⁷ B. W. Zoecklein, T.K. Wolf, J.E. Marcy, Y. Jasinski, "Effect of fruit zone leaf thinning on total glycosides and selected aglycone concentrations of Riesling (*Vitis vinifera* L.) grapes", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1998, **49**, 35.
- ³⁸ H. M. McMahan, B.W. Zoecklein, Y. W. Jasinski, "The effects of prefermentation maceration temperature and percent alcohol (v/v) at press on the concentration of Cabernet Sauvignon grape glycosides and glycoside fractions", *Am. J. Enol. & Vitic.*, 1999, **50**, 385.

- ³⁹ B. W. Zoecklein, Y. Jasinski, H. McMahon, "Effect of fermentation, aging, and aging sur lie, on total and phenol-free Riesling (*Vitis vinifera*L.) glycosides", *J. Food Comp. Anal.*, 1998, **11**, 240.
- ⁴⁰ N. A. Abbott, P.J. Williams, B.G. Combe, *Proceedings of the 8th Australian Wine Industry Technical Conference*, 1993, C.S. Stockley, R.S. Johnstone et al., (Eds.), Adelaida, pag.72.
- ⁴¹ Z. Y. Günata, C.L. Bayonove, R.E. Cordonnier, A. "Arnaud et al, hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by candida-molischiana and candida-wickerhamii beta-glucosidases", *J. Sci. Food & Agric.*, 1990, **50**, 499.
- ⁴² C. Bayonove, R. Baumes, J. Crouzet, Z. Günata, *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques*, C. Flanzy (Ed.), Technique et Documentation, Paris, 1999, pág. 138.
- ⁴³ V. Ferreira, R. López, J.F. Cacho, "Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties", *J. Sci. Food & Agric.*, 2000, **80**, 1659.
- ⁴⁴ R. López, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira, "Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection", *J. Chromatogr. A*, 2002, **966**, 167.
- ⁴⁵ Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso, "Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 209.
- ⁴⁶ A. M.G. Campana, L.C. Rodríguez, F.A. Barrero, M.R. Ceba et al., "ALAMIN: a chemometric program to check analytical method performance and to assess the trueness by standard addition methodology", *Trends Anal. Chem.*, 1997, **16**, 381.
- ⁴⁷ P. Tamborra, N. Martino, M. Esti, "Laboratory tests on glycosidase preparations in wine", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **513**, 299.

IV. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el trabajo presentado en esta memoria, se pueden enumerar las siguientes conclusiones:

a) En relación a la extracción con fluidos presurizados:

1) Se ha determinado la estabilidad y la extractabilidad de distintos compuestos fenólicos (pertenecientes a varias familias) en condiciones de extracción a alta presión y temperatura, y se ha comprobado que las recuperaciones medias en metanol para todos los compuestos extraídos están en torno al 90%, con las excepciones de la catequina, epicatequina a 150°C.

2) Se ha puesto a punto un método de extracción con fluidos presurizados para la extracción de compuestos polifenólicos. La aplicación del método a muestras reales de orujo (hollejos y pepitas) ha permitido la determinación de compuestos fenólicos mayoritarios presentes en ellas (ácido caftárico, ácido gálico, catequina, epicatequina).

Esta información se considera interesante tanto desde un punto de vista analítico como para su uso en el desarrollo de procesos de recuperación de estos compuestos a partir de residuos de vinificación.

b) En relación al desarrollo de métodos rápidos para el análisis de polifenoles:

3) Se ha puesto a punto un método de extracción con fluidos presurizados para la extracción de catequinas en distintos tipos de muestras, rápido (en torno a los 10 minutos) y reproducible, y se ha optimizado el método cromatográfico para su determinación mediante la detección fluorimétrica

Al comparar este método con la extracción asistida por ultrasonidos o con agitación magnética, se ha comprobado que la extracción con fluidos presurizados es la técnica que proporciona los mejores resultados.

4) Se han evaluado los niveles de catequinas que pueden ser potencialmente extraíbles durante la vinificación. Se ha encontrado un comportamiento homogéneo para la evolución de catequina y epicatequina en las variedades de uva analizadas durante su maduración.

5) Asimismo, se ha comprobado que la extractabilidad de estos compuestos no se ve afectada cuando las muestras se someten a una liofilización previa para eliminar el agua de las mismas, y que, de hecho, ésta se ve favorecida. De forma que la liofilización además de permitir conservar las muestras, permite incrementar las recuperaciones de los compuestos de interés al facilitar la accesibilidad del disolvente hacia los mismos.

c) En relación al aumento de la selectividad mediante acoplamiento de técnicas:

6) Se ha comprobado que el acoplamiento directo entre la EFP y EFS permite la separación de los compuestos fenólicos del resto de otros compuestos presentes en la uva, especialmente azúcares. El método completo se desarrolla bajo atmósfera inerte, y el acoplamiento de ambas técnicas permite reducir el manejo de las muestras y, por tanto, la posibilidad de degradación de los compuestos extraídos.

7) La aplicación del método de EFP-EFS sobre muestras de uvas liofilizadas permite: la determinación de compuestos fenólicos en uvas, de interés por sus implicaciones tecnológicas en la vinificación (relacionados con la sensibilidad al pardeamiento) en el caso de los ésteres caftarico, *cis*-cutárico, *trans*-cutárico, catequina, o epicatequina, o por sus implicaciones biológicas en cuanto a su actividad fisiológica en el organismo en el caso del *trans*-resveratrol.

d) En relación a la determinación de glucósidos en uvas a lo largo de la maduración:

8) Se ha aplicado el método habitual por primera vez sobre muestras de uva liofilizadas. De esta forma se ha estudiado la evolución de estos compuestos (precursores aromáticos) a lo largo de la maduración en distintas variedades de uvas (autóctonas, nacionales y universales) cultivadas en la zona de Jerez, durante dos años consecutivos.

9) Se ha comprobado que para las muestras analizadas no es posible la estimación de los valores de la cantidad total de compuestos glicosilados en función de los parámetros analizados de forma rutinaria.

10) Además se ha puesto de manifiesto la influencia determinante que las condiciones climáticas tienen en el desarrollo de la uva y de los compuestos presentes en ellas que determinarán la calidad del producto a obtener.

e) En relación a la determinación de terpenos y otros volátiles:

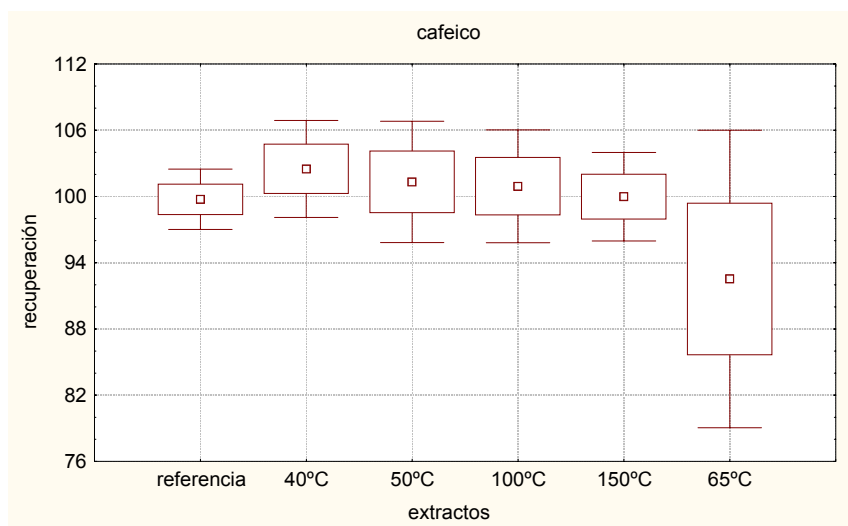
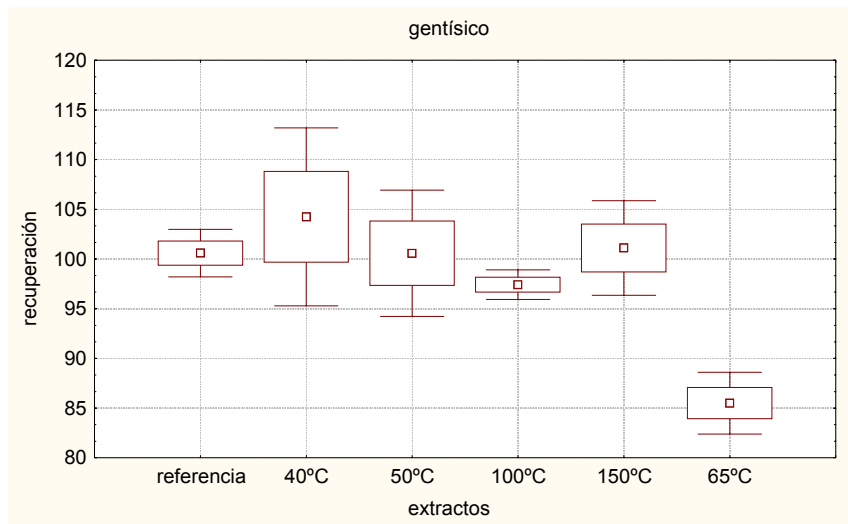
11) Se ha desarrollado un método rápido de análisis cuantitativo de terpenos en vinos mediante la extracción en fase sólida. Tras evaluar distintos disolventes y fases sólidas, se ha seleccionado el diclorometano y la fase sólida basada en estireno-divinilbenceno como la mejor combinación. Se ha realizado la optimización de las variables de extracción y se ha desarrollado un método que ha permitido la determinación de terpenos en vinos comerciales y vinos jóvenes monovarietales (algunos de ellos elaborados con distintas variantes tecnológicas).

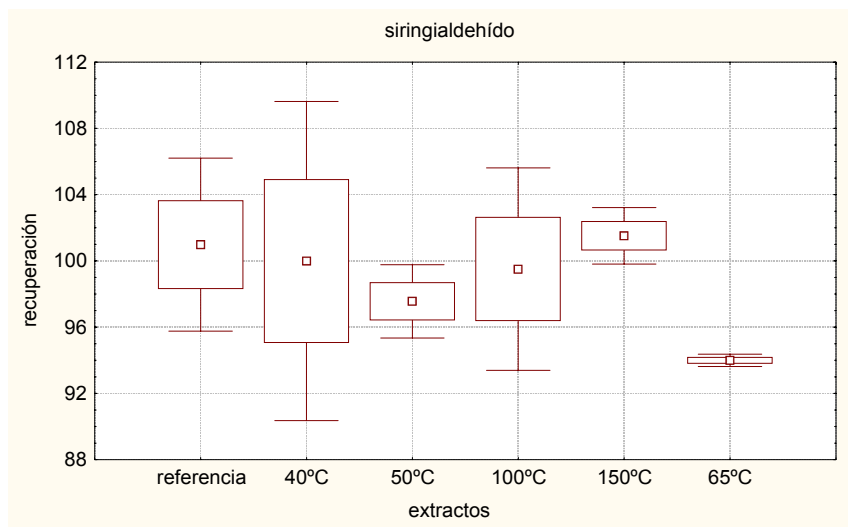
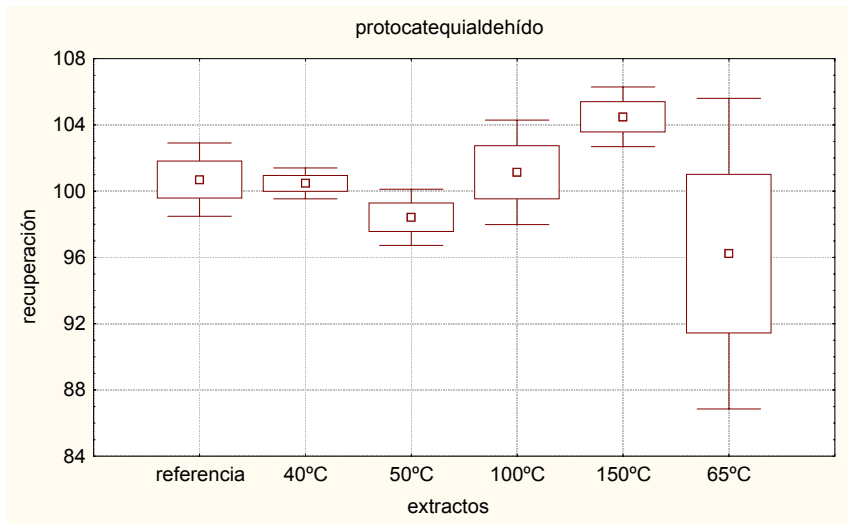
12) Además se han identificado y cuantificado otros compuestos volátiles (ésteres, alcoholes) presentes en estas muestras, y se ha evaluado la influencia que las distintas prácticas enológicas llevadas a cabo durante la vinificación tienen en la componente aromática de estos vinos.

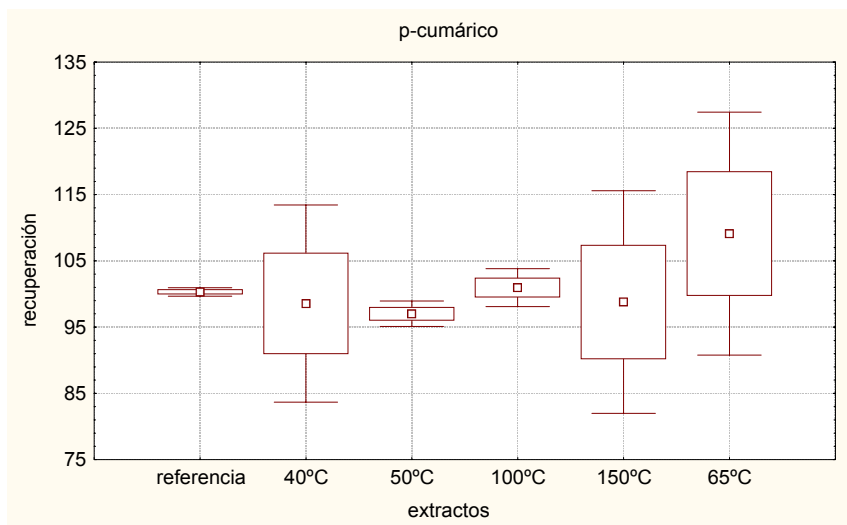
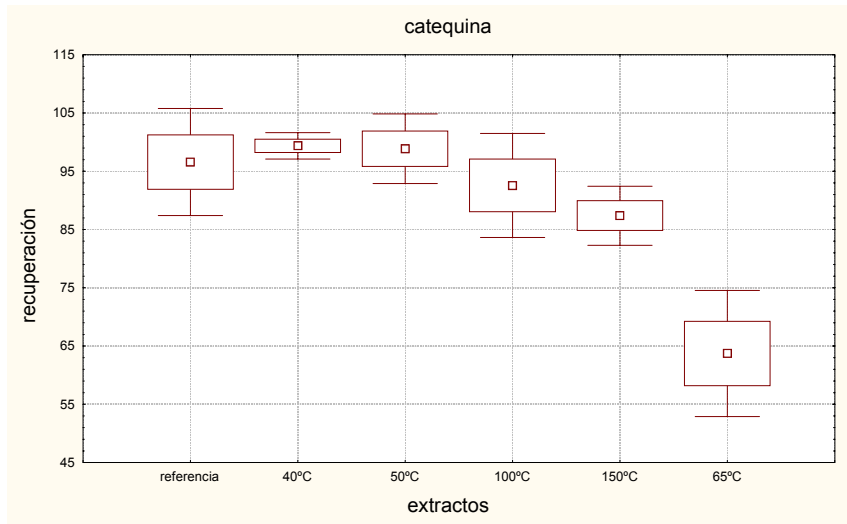
Finalmente conviene destacar que los métodos desarrollados aplicando las técnicas de extracción mencionadas, además de ayudar a obtener mayor información de compuestos de interés enológico, pueden abrir un camino hacia la utilización de algunas de estas técnicas de extracción para la diversificación industrial enológica, como la recuperación de componentes de interés diverso a partir de residuos de la vinificación.

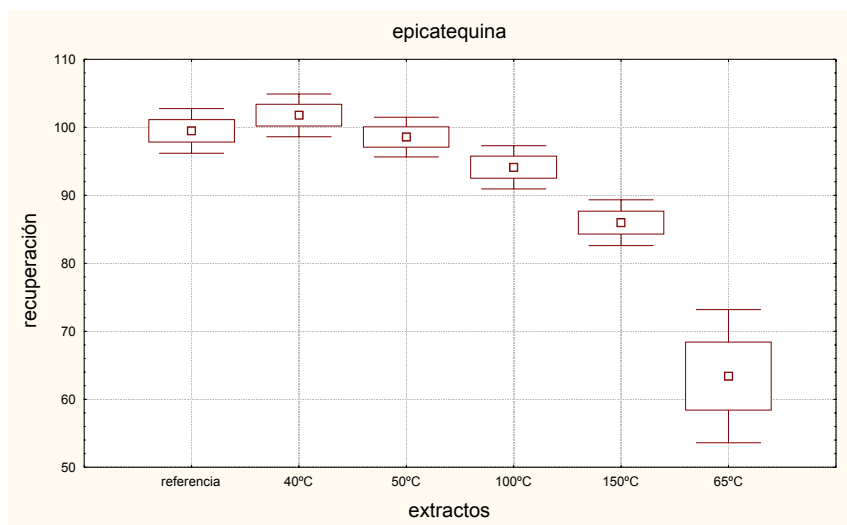
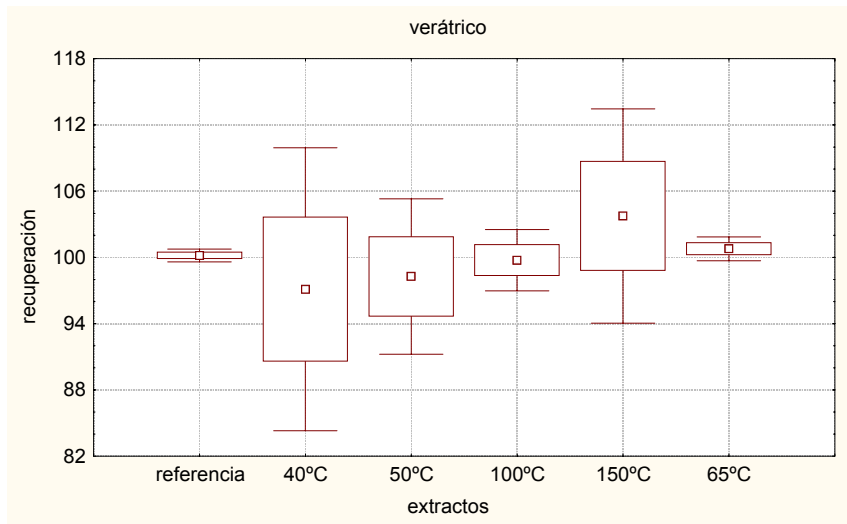
ANEXOS

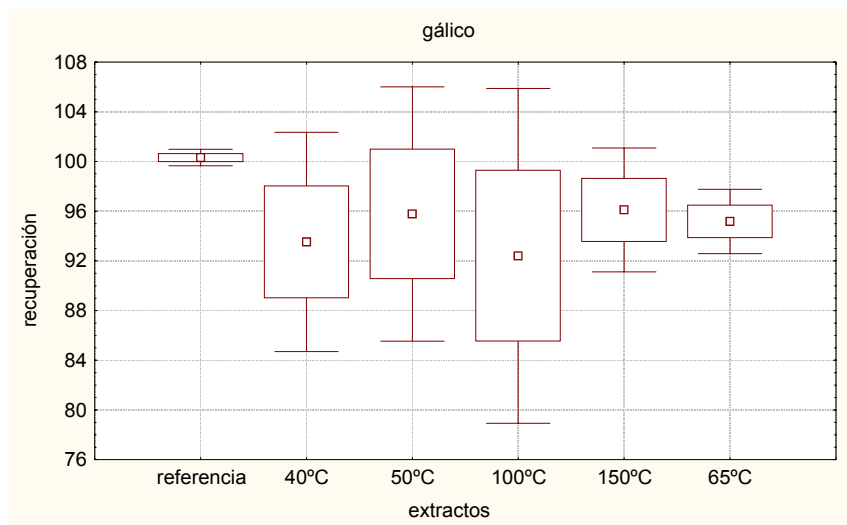
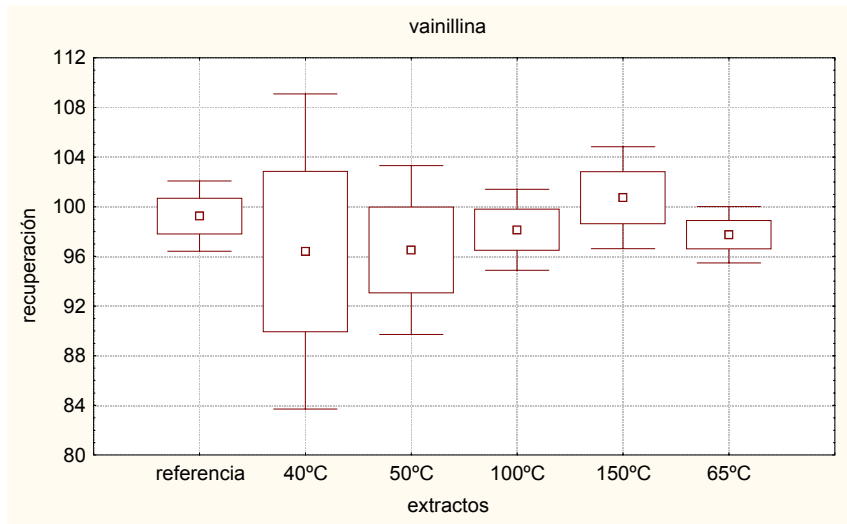
Representación whisker & plot de las recuperaciones de los distintos patrones durante el estudio de la estabilidad de los mismos a altas temperaturas, se representa la recuperación media, la recuperación media \pm desviación estándar y la recuperación media $\pm 1,96$ x desviación estándar.

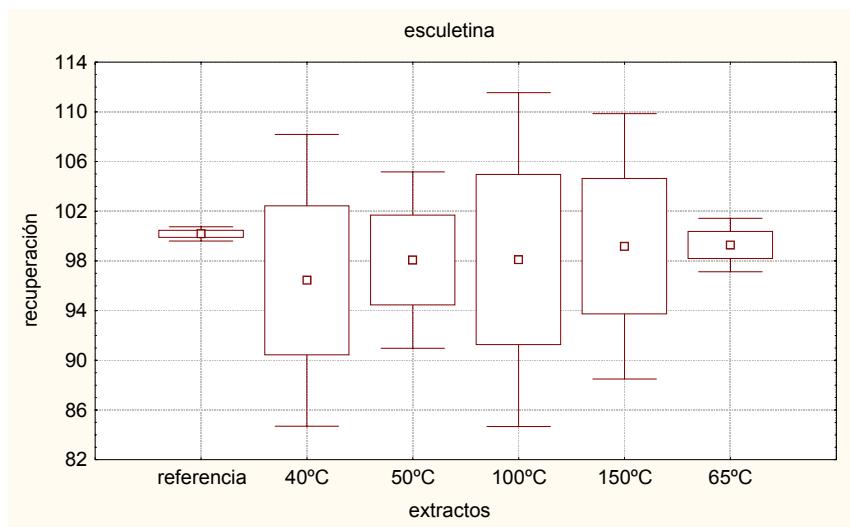
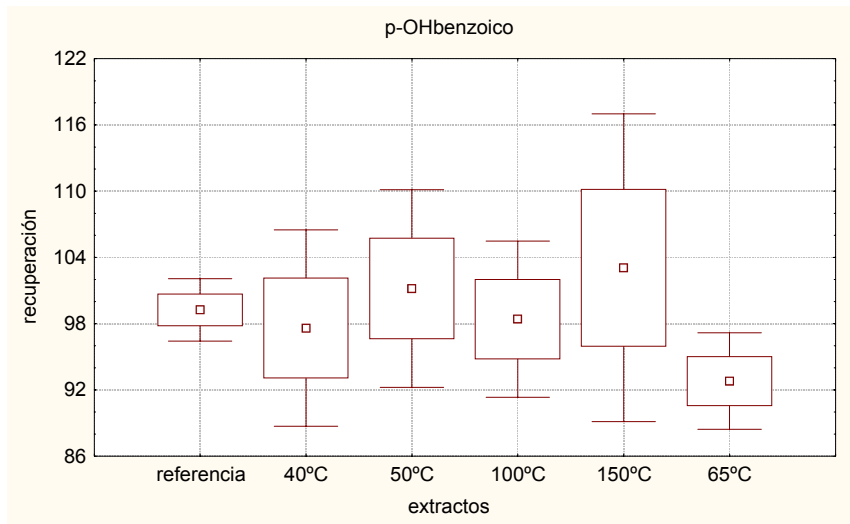


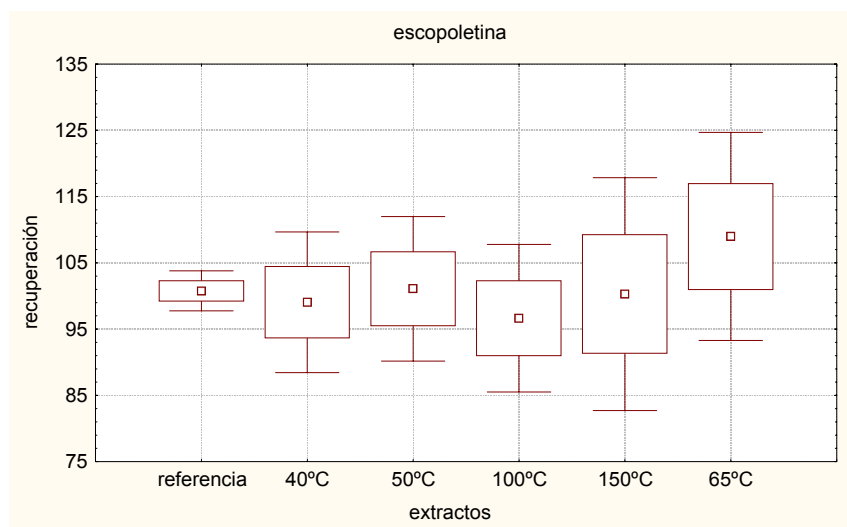
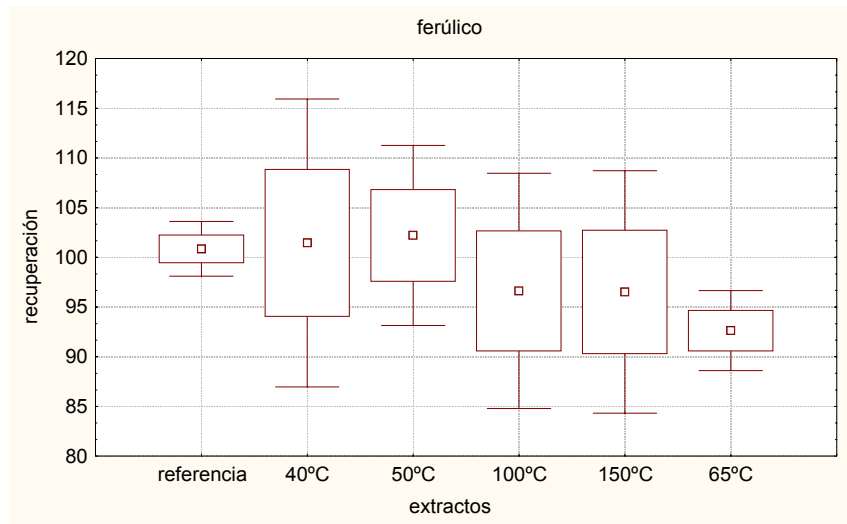


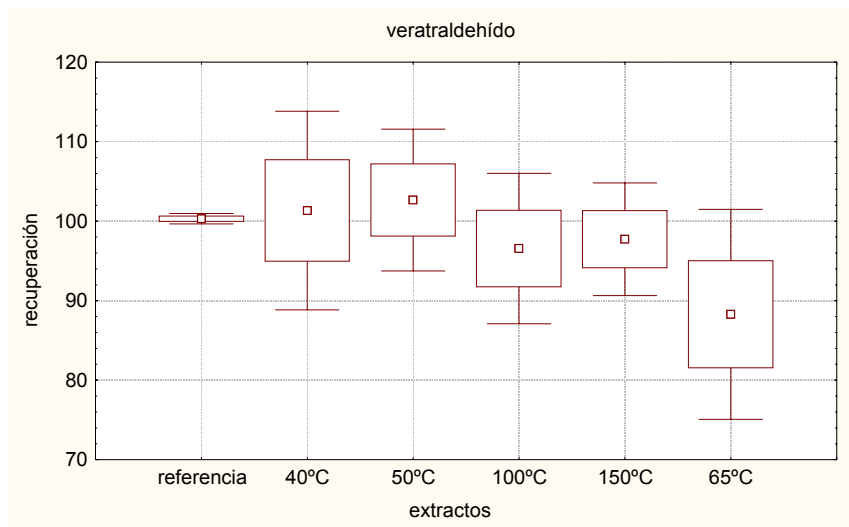
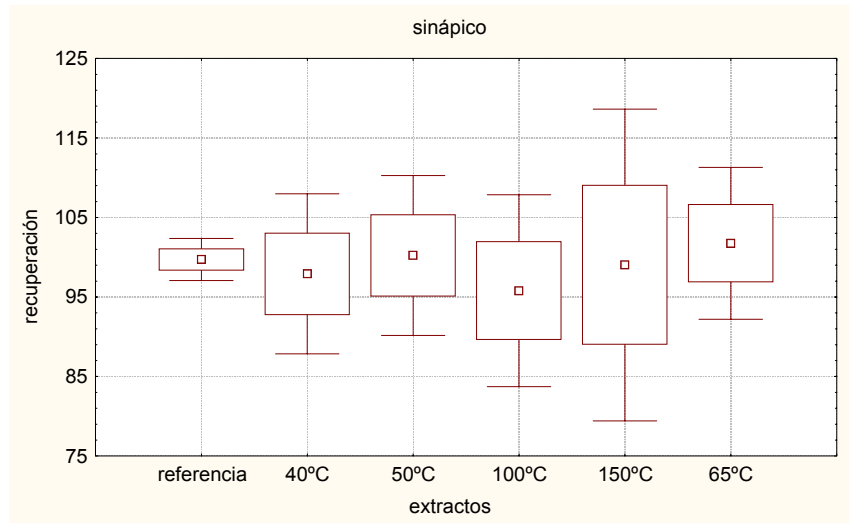












Parámetros clásicos de control durante la maduración de las distintas variedades de uva estudiadas en el **año 2002** (aportados por el CIFA “Rancho de La Merced” de Jerez de la Frontera):

GARRIDO							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
19/07/02	6,0	22,59	2,79	12,29	2,19	10,79	3,72
26/07/02	6,8	14,79	2,9	10,53	2,27	12,43	6,76
02/08/02	7,5	13,14	3,03	11,13	2,39	13,96	8,83
09/08/02	7,8	10,26	3,1	11,03	2,55	14,43	11,89
16/08/02	8,4	8,72	3,09	9,65	2,87	13,07	15,48
23/08/02	8,7	7,39	3,15	8,97	2,92	16,19	19,21
30/08/02	9,2	6,74	3,18	8,38	3,22	15,27	22,55



Garrido



Moscatel de Alejandría

MOSCATEL DE ALEJANDRÍA (MALAGA Ó GRANO GRUESO)							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
19/07/02	6,3	17,25	2,87	11,37	2,28	12,47	5,22
26/07/02	7,9	11,99	3,12	10,05	2,02	15,60	10,34
02/08/02	8,5	8,97	3,18	9,15	2,86	16,39	15,38
09/08/02	9,4	7,78	3,23	9,39	3,07	17,21	20,05
23/08/02	10,8	7,28	3,27	9,03	3,35	18,26	26,65
29/08/02	10,7	6,18	3,32	8,05	2,83	18,31	29,77

Parámetros clásicos de maduración

PALOMINO FINO							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
26/07/02	8,8	8,40	3,17	8,93	1,91	17,92	17,02
02/08/02	10,3	6,31	3,25	8,22	1,95	18,07	27,73
09/08/02	10,4	5,45	3,34	7,44	2,10	19,79	32,66
16/08/02	11,8	5,32	3,38	7,84	2,21	21,29	38,91
23/08/02	12,6	5,34	3,51	7,88	2,18	21,07	42,32



Palomino Fino



Palomino Fino riego

PALOMINO FINO RIEGO							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
26/07/02	7,6	10,65	3,22	6,81	2,51	13,08	11,17
02/08/02	8,1	7,01	3,44	5,98	2,67	15,66	18,54
09/08/02	9,0	5,42	3,48	5,99	2,77	16,49	27,31
16/08/02	10,2	4,78	3,55	6,08	2,67	16,06	36,40
23/08/02	10,5	4,33	3,70	6,05	2,82	17,44	41,57

VIJIRIEGA							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
26/07/02	6,9	16,94	2,92	9,07	2,23	11,91	6,08
02/08/02	7,5	12,91	3,07	8,03	2,66	13,98	8,99
09/08/02	7,7	10,62	3,13	7,16	2,58	13,69	11,30
23/08/02	9,4	8,34	3,18	7,57	2,83	16,89	18,71
30/08/02	9,4	7,73	3,13	8,52	2,88	17,48	20,18
04/09/02	10,4	7,02	3,25	7,25	2,72	19,28	25,32



Vijiriega



Viura

VIURA							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
26/07/02	5,9	17,25	2,85	11,16	1,31	13,35	4,81
02/08/02	7,2	13,12	3,04	10,80	1,11	14,01	8,46
09/08/02	8,2	8,60	3,07	8,50	1,50	15,81	15,23
16/08/02	9,2	7,70	3,12	9,15	1,65	15,26	19,74
23/08/02	10,2	6,30	3,16	8,20	1,90	18,10	27,62
30/08/02	10,6	5,63	3,19	7,75	2,01	18,46	32,50

Parámetros clásicos de maduración

CHARDONNAY							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
12/07/02	8,8	18,70	2,95	10,06	1,23	15,24	7,65
19/07/02	10,5	13,37	3,17	10,19	1,21	17,06	13,46
26/07/02	11,6	10,25	3,25	8,80	1,29	19,38	19,90
02/08/02	12,8	8,34	3,40	9,13	1,32	21,61	27,34
06/08/02	12,8	7,72	3,46	8,92	1,32	21,95	29,53



Chardonnay



Sauvignon Blanc

SAUVIGNON BLANC							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
12/07/02	7,1	24,84	2,84	12,25	1,03	12,47	4,35
19/07/02	9,0	17,28	2,96	11,30	1,29	16,33	8,56
26/07/02	9,9	11,35	3,08	9,38	1,50	16,79	14,71
2/08/02	10,4	9,55	3,27	8,75	1,54	19,11	18,64
9/08/02	11,2	7,00	3,42	8,14	1,62	20,80	27,86
13/08/02	11,7	6,65	3,37	7,47	1,80	19,26	30,83

GEWÜRTZTRAMINER (TRAMINER)							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
12/07/02	8,0	15,53	3,16	10,83	1,26	15,52	8,18
19/07/02	10,3	11,56	3,25	10,30	1,44	17,09	15,14
26/07/02	10,6	8,27	3,36	9,26	1,41	17,06	22,13
1/08/02	11,5	6,69	3,52	8,50	1,55	20,40	30,19



Gewürztraminer



Graciano

GRACIANO							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
2/08/02	8,8	15,77	2,91	13,47	1,24	18,10	9,06
9/08/02	10,4	11,94	2,99	11,15	1,28	20,00	14,91
16/08/02	11,1	10,07	3,08	11,79	1,35	21,46	19,27
30/08/02	12,5	7,86	3,24	10,47	1,34	24,82	28,37
5/09/02	13,2	6,29	3,26	9,02	1,47	25,98	38,00

Parámetros clásicos de maduración

PALOMINO NEGRO							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
12/07/02	9,2	14,55	2,90	6,75	1,45	15,18	10,45
19/07/02	10,5	10,38	3,20	6,45	1,71	16,67	17,34
26/07/02	11,5	7,79	3,26	5,83	1,78	20,31	25,93
02/08/02	12,1	6,11	3,50	5,96	1,92	22,89	35,18



Palomino Negro



Tempranillo

TEMPRANILLO							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
19/07/02	7,0	17,37	2,92	8,58	1,61	15,31	6,10
26/07/02	8,2	11,87	3,06	8,23	1,71	19,11	11,04
02/08/02	8,8	8,10	3,21	6,98	1,75	19,76	17,65
09/08/02	9,2	7,44	3,25	7,42	1,86	20,47	20,43
16/08/02	11,0	6,10	3,28	7,15	2,02	22,16	31,31
30/08/02	11,7	4,74	3,40	6,03	2,26	22,80	43,25

TINTILLA DE ROTA							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
2/08/02	10,0	17,55	2,97	17,55	1,43	18,75	9,69
9/08/02	10,4	13,59	3,05	13,59	1,49	19,46	13,10
16/08/02	12,0	10,66	3,13	10,66	1,48	19,21	19,89
30/08/02	12,5	7,90	3,29	7,90	1,58	22,93	28,23



Tintilla de Rota



Cabernet Sauvignon

CABERNET SAUVIGNON							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
26/07/02	8,9	16,89	2,95	11,30	0,80	18,09	8,64
2/08/02	9,2	12,41	3,07	10,00	0,79	19,56	12,25
9/08/02	10,8	9,95	3,19	9,60	0,92	20,09	18,69
16/08/02	11,5	9,16	3,26	10,46	0,90	22,68	22,05
30/08/02	12,9	6,77	3,38	8,83	1,01	23,31	34,12

Parámetros clásicos de maduración

SYRAH							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
19/07/02	8,4	17,12	3,02	10,30	1,17	14,87	7,88
26/07/02	9,0	12,89	3,05	9,61	1,50	15,95	11,48
02/08/02	9,6	10,25	3,22	9,61	1,51	18,22	15,8
09/08/02	10,6	8,37	3,38	9,19	1,55	18,99	21,86
16/08/02	12,0	8,02	3,44	9,75	1,54	21,03	26,43



Syrah

Parámetros clásicos de control durante la maduración de las distintas variedades de uva estudiadas en el año 2003 (aportados por el CIFA “Rancho de La Merced” de Jerez de la Frontera):

MOSCATEL DE ALEJANDRÍA (MÁLAGA O GRANO GRUESO)							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
22/07/03	6,8	16,61	2,92	10,05	2,47	13,39	6,02
29/07/03	8,1	12,12	3,09	9,58	2,39	13,46	10,73
05/08/03	10,3	11,79	3,20	11,57	2,44	18,00	14,80
12/08/03	12,2	7,93	3,50	9,84	2,66	22,19	27,24
19/08/03	13,5	7,37	3,55	9,42	2,39	22,35	33,11

PALOMINO FINO							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
22/07/03	9,2	9,22	3,10	9,54	2,25	15,62	16,49
29/07/03	10,8	7,47	3,27	9,60	2,23	18,72	24,89
05/08/03	12,6	6,95	3,39	10,44	2,26	19,88	32,51
12/08/03	13,5	5,60	3,52	8,84	1,93	22,62	47,84

PALOMINO FINO RIEGO							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
22/07/03	8,4	10,56	3,10	8,35	2,23	12,85	12,78
29/07/03	9,7	7,18	3,31	8,18	2,34	17,16	22,70
05/08/03	10,1	5,40	3,46	7,29	2,09	17,93	31,85
12/08/03	11,2	4,94	3,54	7,66	2,18	20,69	39,47

VIJIRIEGA							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
22/07/03	5,7	22,89	2,74	9,81	2,03	11,05	3,49
29/07/03	6,9	17,44	2,90	10,00	2,03	13,06	5,81
5/08/03	8,6	11,39	3,07	9,48	2,60	14,90	12,29
12/08/03	10,0	9,29	3,33	9,25	2,56	16,33	18,30
19/08/03	10,5	7,26	3,35	8,31	2,52	18,51	24,79

CHARDONNAY							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
22/07/03	10,5	14,23	3,17	9,09	1,10	18,87	12,65
29/07/03	13,0	8,82	3,41	9,35	1,29	20,63	26,53

Parámetros clásicos de maduración

SAUVIGNON BLANC							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
22/07/03	9,8	17,80	2,98	10,49	1,47	18,00	9,21
29/07/03	10,9	13,62	3,16	9,45	1,57	21,34	13,80
05/08/03	13,0	10,60	3,31	10,67	1,44	25,93	22,08

GEWÜRTZTRAMINER (TRAMINER)							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
22/07/03	10,6	9,92	3,30	8,59	1,30	17,28	18,45
29/07/03	11,5	7,26	3,56	7,21	1,45	21,08	27,82

GRACIANO							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
29/07/03	9,5	17,73	2,90	14,77	1,00	18,87	8,88
05/08/03	13,0	12,17	3,03	13,67	0,93	22,75	19,22
12/08/03	14,30	8,38	3,27	9,82	0,96	26,45	31,38
19/08/03	14,7	7,68	3,30	9,20	0,87	28,64	35,42

PALOMINO NEGRO							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
22/07/03	11,2	9,65	3,30	6,00	1,74	20,19	20,21
29/07/03	11,9	7,73	3,42	6,45	1,72	20,66	27,17

TEMPRANILLO							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
22/07/03	8,7	12,49	3,06	7,35	2,07	17,75	11,37
29/07/03	9,8	8,69	3,25	6,47	2,27	19,77	18,87
05/08/03	11,3	6,66	3,44	6,18	2,16	19,80	29,73
12/08/03	11,7	5,05	3,74	6,38	2,06	22,73	40,79

TINTILLA DE ROTA							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
29/07/03	9,8	20,34	2,92	14,15	1,31	23,99	8,06
05/08/03	12,5	13,23	3,16	11,95	1,26	20,89	16,85
12/08/03	15,0	9,46	3,27	10,44	0,99	25,85	29,49
19/08/03	15,3	7,40	3,45	8,71	1,05	28,06	38,78

CABERNET SAUVIGNON							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
22/07/03	8,4	18,31	2,86	13,05	0,96	17,01	7,37
29/07/03	10,6	12,68	3,08	10,35	1,09	22,05	14,40
05/08/03	12,7	9,52	3,14	7,65	0,89	25,13	23,84
12/08/03	13,4	9,53	3,27	10,22	0,70	23,68	26,22
19/08/03	14,7	7,30	3,35	8,20	0,59	35,14	37,26

SYRAH							
Día de muestreo	°Bé	A.T. (g/L)	pH	Ácido tartárico	peso medio	Residuo seco (%)	índice maduración
22/07/03	8,4	18,57	2,92	11,00	1,27	17,01	7,27
29/07/03	9,5	13,65	3,10	10,26	1,60	20,73	11,64
05/08/03	12,0	9,46	3,30	9,30	1,34	23,51	22,41
12/08/03	13,4	6,86	3,44	7,66	1,08	23,61	35,27

