





**Departamento de Química Analítica  
Facultad de Ciencias**

***Estudio de nuevas estrategias para la caracterización y  
optimización del envejecimiento de Vinos y Brandies de Jerez***

**Mónica Schwarz Rodríguez**

**Tesis Doctoral, 2010**



## **“Estudio de nuevas estrategias para la caracterización y optimización del envejecimiento de Vinos y Brandies de Jerez”**

Memoria presentada por la licenciada D. Mónica Schwarz Rodríguez para optar al  
Grado de Doctor Europeo

Fdo: Mónica Schwarz Rodríguez

La presente tesis ha sido codirigida por el catedrático de Universidad Dr. D. Carmelo García Barroso, y el profesor Titular de Universidad Dr. D. Dominico Guillén Sánchez, del departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz, y cumple con todos los requisitos exigidos por la legislación vigente.

Fdo: Dr. D. Carmelo García Barroso

Fdo: Dr. D. Dominico Guillén Sánchez



Dr. D. Manuel García Vargas, Catedrático de Química Analítica y Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz,

HACE CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Estudio de nuevas estrategias para la caracterización y optimización del envejecimiento de vino y Brandy de Jerez”, constituye la memoria que presenta D. Mónica Schwarz Rodríguez para optar al Grado de Doctor Europeo en Química, 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. Dominico Guillén Sánchez.

Y para que conste y surtan los efectos oportunos, firmo la presente en Puerto Real, a 17 de Mayo de 2010.

Fdo: Dr.D. Manuel García Vargas



La autora de esta tesis ha disfrutado de una beca predoctoral de la Junta de Andalucía.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación del proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía *PO5-AGR-00767* y del proyecto *RTA2006-00036-C02-02*





## AGRADECIMIENTOS

He tenido la gran suerte, de tener que agradecer este trabajo a muchas personas, así que espero que todas y cada una de ellas, se vean reflejadas aunque no las nombre a todas porque la lista sería interminable.

A mis directores de Tesis (los profesores Carmelo G. Barroso y Dominico Guillén), por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto ayudándome en la realización de este trabajo y haberse ajustado, a pesar de sus ocupaciones, a los plazos que les he ido pidiendo.

Al profesor Winterhalter, por haberme permitido trabajar unos meses en su laboratorio, y al gran equipo humano que allí me encontré. Vielen Dank an alle!!

A mis compañeros de trabajo y de las comidas (pasados y presentes), con los que en los últimos cinco años, he compartido viajes, congresos, risas en las comidas, ferias.... y aunque acabo decir compañeros, son algo más que eso, son excelentes amigos, con los que espero poder disfrutar de ellos durante mucho tiempo más y a los que les debo infinitos agradecimientos: por haberme ayudado en el laboratorio siempre que lo he necesitado, por cuidarme los experimentos mientras me fui a Alemania, por visitarme en Granada y Alemania, por hacerme sentir a gusto desde el primer día que llegué..., y por otros tantos motivos: ¡¡Muchas gracias!!

A mis amigos y familiares, que siempre han estado pendientes de cómo iba la tesis, preguntando siempre por los "experimentos del Brandy", guardando los recortes de prensa relacionados con el mundo enológico y regalándome libros de enología; porque cuando uno hace la tesis sobre este tema, pasa a ser en la familia y en la pandilla de amigos (erróneamente) el experto o en este caso, la experta en vinos; a todos ellos ¡¡Muchas gracias por el cariño mostrado!!

A Gloria, Jose María, Fran y Ana, por cuidarme aquí en Cádiz y apoyarme siempre, sobre todo con la estancia en Alemania; muchas gracias! A Fran y Ana, gracias también por su ayuda con el inglés.

A Jose, por innumerables razones, por su paciencia, por acompañarme a ver como iba la columna un domingo por la mañana, por venir a Alemania conmigo..., pero sobre todo por entender que esto es lo que me gusta.

A mis padres y a mi hermano, a ellos les debo todo, y lo que pueda decir en unas líneas se queda infinitamente corto para el inmenso agradecimiento que siento hacia ellos; por ser mis fans más incondicionales, por ser mi referente a seguir, por su ayuda con el alemán, la informática o sus consejos, por el tiempo dedicado y por numerosas razones más: ¡¡Muchísimas gracias!!!

En definitiva, a todos aquellos, que no se sientan reflejados en los párrafos anteriores, pero que han contribuido y me han ayudado a llevar este trabajo a buen puerto, ¡También a ellos muchas gracias!



A mis padres

A mi hermano

A Jose



# INDICE

<b>1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
1.1. JUSTIFICACIÓN .....	21
1.2. OBJETIVOS .....	22
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>25</b>
2.1. BRANDY DE JEREZ .....	27
2.1.1. Breve reseña histórica.....	27
2.1.2. Importancia económica y social .....	28
2.1.3. Elaboración .....	29
2.1.3.1. Destilación del vino. Obtención del aguardiente .....	29
2.1.3.2. Envejecimiento del destilado.....	30
2.1.3.2.1. Sistema de Solera y Criaderas .....	31
2.1.4. Composición analítica del Brandy de Jerez .....	33
2.2. VINO DE JEREZ .....	34
2.2.1. Clasificación .....	36
2.2.1.1. Vinos generosos .....	37
2.2.1.1.1. Fino.....	38
2.2.1.1.2. Amontillado.....	38
2.2.1.1.3. Oloroso .....	38
2.2.1.1.4. Palo Cortado.....	39
2.2.1.2. Vinos Generosos de Licor.....	39
2.2.1.2.1. Pale Cream.....	39
2.2.1.2.2. Médium.....	40
2.2.1.2.3. Cream.....	40
2.2.1.2.4. Vinos dulces .....	40
2.3. PARÁMETROS ANALÍTICOS ESTUDIADOS .....	41
2.3.1. Polifenoles.....	41
2.3.1.1. Clasificación.....	41
2.3.1.1.1. Compuestos fenólicos no flavonoides .....	41
2.3.1.1.2. Compuestos Fenólicos Flavonoideos .....	44
2.3.2. Coordenadas del Color .....	49
2.3.2.1. Especificación del color .....	51
2.3.2.2. Modelo CIE XYZ (1931).....	54
2.3.2.3. Modelo CIELab .....	55
2.3.2.4. Método oficial de determinación de color de vinos y aguardientes .....	56
2.3.3. Los ácidos orgánicos.....	59

2.3.3.1. Métodos de análisis de ácidos orgánicos en compuestos enológicos .....	60
2.3.4. Actividad antioxidante .....	61
4.3.4.1. Métodos directos.....	62
4.3.4.2. Métodos indirectos.....	64
2.4. LA CROMATOGRAFÍA CONTRACORRIENTE.....	68
2.5. BIBLIOGRAFIA.....	71

## **OPTIMIZACION DE LA METODOLOGIA**

<b>3. DESARROLLO DE UN METODO DE ANALISIS DE POLIFENOLES EN BRANDY DE JEREZ MEDIANTE UPLC .....</b>	<b>89</b>
3.1. INTRODUCCION.....	91
3.2. MATERIALES Y METODOS .....	92
3.2.1. Reactivos y disolventes.....	92
3.2.2. Muestras .....	92
3.2.3. Análisis mediante HPLC.....	93
3.2.4. Análisis mediante UPLC.....	93
3.2.5. Tratamiento estadístico .....	94
3.3. RESULTADOS .....	94
3.3.1. Optimización de las condiciones del UPLC .....	94
3.3.2. Validación del método desarrollado .....	97
3.3.3. Comparación entre el método de análisis mediante HPLC y UPLC.....	98
3.3.4. Aplicación del método desarrollado a muestras reales .....	101
3.4. CONCLUSIONES .....	106
3.5. BIBLIOGRAFÍA.....	106
<b>4. CARACTERIZACION POLIFENOLICA DE VINO DE JEREZ MEDIANTE HSCCC .....</b>	<b>111</b>
4.1. INTRODUCCION.....	113
4.2 MATERIALES Y METODOS .....	114
4.2.1 Muestras .....	114
4.2.1.1. Obtención del extracto de Amontillado.....	114
4.2.1.2. Obtención del extracto de Pedro Ximénez.....	115
4.2.2. Elección del disolvente a utilizar en el HSCCC .....	116
4.2.3. HSCCC (High-speed countercurrent chromatography) .....	118
4.2.4.HPLC-DAD .....	119
4.2.5. HPLC-DAD-MS .....	119
4.2.6. HPLC Semipreparativa.....	120
4.2.7. Resonancia magnética nuclear .....	120
4.2.8. Cromatografía en capa fina.....	120

4.2.9. Actividad antioxidante .....	120
4.3. RESULTADOS .....	122
4.3.1. Amontillado .....	122
4.3.1.1. Sistema I: TBME/butanol/Acetonitrilo/agua (1,1/3/1,1/5+0,1%TFA).....	122
4.3.1.2. Sistema II: Hexano/Etilacetato/Etanol/Agua (1/5/1/5) .....	125
4.3.1.3. Sistema III: TBME/ n-Butanol/ Acetonitrilo/ Agua (2/2/15).....	132
4.3.2. Pedro Ximénez.....	134
2.3.2.1. Extracto XAD 7 .....	134
2.3.2.2. Extracto XAD2 .....	136
4.4. CONCLUSIONES.....	141
4.5. BIBLIOGRAFIA.....	141

## **CARACTERIZACION DE SISTEMAS DE ENVEJECIMIENTO DE VINOS Y BRANDIES DE JEREZ**

<b>5. CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE UN BRANDY DE JEREZ DURANTE SU ENVEJECIMIENTO EN UN SISTEMA DE SOLERA Y CRIADERAS. INFLUENCIA DEL ENVINADO.....</b>	<b>149</b>
5.1. INTRODUCCION.....	151
5.2. MATERIALES Y METODOS .....	152
5.2.1. Muestras .....	152
5.2.2. Análisis de polifenoles.....	153
5.2.3. Determinación de ácidos orgánicos de cadena corta.....	153
5.2.4. Medida del Color .....	154
5.2.5. Índice de polifenoles totales .....	154
5.2.6. Tratamiento estadístico .....	154
5.3. RESULTADOS Y DISCUSION .....	155
5.3.1. Compuestos polifenólicos y aldehídos furánicos.....	155
5.3.2. Ácidos orgánicos.....	156
5.3.3. Color e Índice de polifenoles totales.....	157
5.3.4. Tratamiento estadístico .....	158
5.3.5. Influencia del envinado.....	162
5.4. CONCLUSIONES .....	166
5.5. BIBLIOGRAFÍA.....	166
<b>6. SIMULACION DEL ENVEJECIMIENTO DEL BRANDY: TEST DE ENVEJECIMIENTO .....</b>	<b>169</b>
6.1. INTRODUCCION.....	171
6.2. MATERIALES Y METODOS .....	173



6.2.1. Muestras analizadas .....	173
6.2.1.1. Test de envejecimiento acelerado .....	173
6.2.1.2. Ensayos de diferentes holandas .....	173
6.2.2. Test de envejecimiento acelerado .....	174
6.2.3. Análisis de polifenoles .....	174
6.2.4. Análisis de parámetros cromáticos .....	174
6.2.5. Índice de polifenoles totales .....	175
6.2.6. Análisis sensorial .....	175
6.2.7. Análisis estadístico .....	177
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	177
6.3.1. Desarrollo de un test de envejecimiento acelerado para el Brandy de Jerez .....	177
6.3.1.1. Primer Ensayo. ....	179
6.3.1.2. Segundo ensayo .....	180
6.3.1.3. Tercer ensayo .....	186
6.3.1.4. Análisis sensorial .....	189
6.3.1.4.1. Comparaciones múltiples de aguardientes obtenidos en distintas condiciones de operación del método de envejecimiento acelerado .....	190
6.3.1.4.2. Comparación de aguardientes preseleccionados con brandies de distinta edad de envejecimiento .....	191
6.3.1.4.3 Generación de descriptores .....	192
6.3.1.4.4. Evaluación de aguardientes envejecidos en Solera y Criaderas y de manera acelerada mediante pruebas descriptivas .....	194
6.3.2. Aplicación del test para la evaluación del potencial de diferentes variedades de uva para su futuro uso en la elaboración del Brandy de Jerez .....	196
6.3.2.1. Análisis sensorial .....	200
6.4. CONCLUSIONES .....	205
6.5. BIBLIOGRAFÍA .....	206
5.6. ANEXO II .....	209
<b>7. PARAMETROS INDICADORES DE LA EDAD DE VINOS Y BRANDIES DE JEREZ .....</b>	<b>217</b>
7.1. INTRODUCCIÓN .....	217
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	218
7.2.1. Muestras .....	218
7.2.1.1. Brandies de un ensayo experimental de envejecimiento .....	218
7.2.1.2. Vinos de Jerez envejecidos mediante sistema de añadas .....	219
7.2.2. Reactivos .....	220
7.2.3. Índice polifenoles totales y análisis y cuantificación de compuestos polifenólicos .....	220
7.2.4. Medida del poder antioxidante .....	221

7.2.5. Color.....	221
7.2.6. Tratamiento estadístico .....	221
<b>7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>221</b>
7.3.1. Brandies de un ensayo experimental de envejecimiento .....	222
7.3.1.1. Evolución de la actividad antioxidante e índice de polifenoles totales .....	222
7.3.1.2. Regresión por mínimos cuadrados parciales .....	224
7.3.2. Vinos envejecidos mediante sistema de añadas.....	226
7.3.2.1. Evolución de los polifenoles estudiados.....	226
7.3.2.2. Poder antioxidante e índice de polifenoles totales .....	228
7.3.2.3. Color .....	230
7.3.2.5. Tratamiento estadístico.....	231
7.3.2.5.1. Análisis lineal discriminante .....	232
7.3.2.5.2. Regresión por mínimos cuadrados .....	234
7.4. CONCLUSIONES .....	235
7.5. BIBLIOGRAFÍA.....	235
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>239</b>
<b>9. ENGLISH SUMMARY .....</b>	<b>243</b>
<b>10. ARTICULOS DERIVADOS DE LA TESIS.....</b>	<b>285</b>



## **1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS**



## 1.1. JUSTIFICACIÓN

Los vinos y Brandies de la zona de Jerez, gozan de una etapa de envejecimiento en barricas de roble, siguiendo el tradicional sistema de Solera y Criaderas que se traduce en importantes cambios en las características organolépticas del producto de partida. Es durante la etapa de envejecimiento cuando se producen numerosas transformaciones biológicas y físico-químicas entre las que podemos destacar: la evolución en el contenido en polifenoles junto a importantes modificaciones en el contenido en compuestos volátiles, así como otras modificaciones específicas de cada producto.

Todos estos cambios van a venir favorecidos por el aporte de la madera de la bota y por la oxigenación moderada que el producto experimenta gracias a los microporos existentes en la misma. El papel activo de la madera en la elaboración de vinos y brandies de Andalucía es un hecho conocido y probado desde hace bastante tiempo, siendo el proceso de difusión de compuestos extraíbles uno de los principales responsables de los cambios que sufren las bebidas envejecidas.

Aunque el Consejo Regulador del vino de Jerez, permite en determinados vinos (como se verá más adelante) que el envejecimiento se realice por “añadas” (envejecimiento estático), lo tradicional en la zona es el sistema dinámico de Solera y Criaderas, particular sistema de envejecimiento utilizado en Jerez, que implica:

- Mantener las características del vino a lo largo del proceso de envejecimiento, ya que elimina las oscilaciones que tienen lugar entre las diferentes añadas. Este fenómeno presenta un gran interés de índole comercial al mantener homogénea la calidad de los vinos a lo largo de los años. De hecho si comparamos la evolución de un vino envejecido por este sistema con la evolución del mismo vino sometido a un sistema de añada observamos claras diferencias en cuanto a composición y homogeneidad de las mismas.
- Activar el envejecimiento físico-químico, ya que homogeniza los gradientes de concentración que se producen en el interior de la bota por el fenómeno de permeabilidad selectiva, que tiene lugar en las paredes de la bota y aporta periódicamente pequeñas cantidades de aire al vino, activando de este modo los procesos oxidativos de envejecimiento de los mismos.

En el caso del Brandy de Jerez, se mantiene el mismo sistema de envejecimiento, pero existen otros factores que influyen considerablemente en el producto final. Así el reglamento de la denominación específica "Brandy de Jerez" impone que los brandies sean envejecidos en barricas que previamente hayan servido para envejecer vinos de Jerez. Esta práctica aporta a los brandies que se envejecen en estas vasijas, características organolépticas que son propias de los vinos de Jerez, como son los Finos, Amontillados, Olorosos, Pedro Ximénez, etc.

La etapa de envejecimiento es sin duda la fase definitiva en la elaboración de los vinos de Jerez, siendo la más prolongada desde el punto de vista temporal y en la que se perfilan las características organolépticas que van a dar lugar a la amplia tipología de vinos de Jerez. Lo mismo ocurre para el caso del Brandy de Jerez, en cuya elaboración el envejecimiento supone una etapa clave.

## 1.2. OBJETIVOS

Por todo lo anteriormente expuesto en la presente tesis se ha planteado como objetivo general estudiar los vinos y brandies de Jerez en su relación al sistema de envejecimiento, abordando aspectos metodológicos (desarrollo de nuevas metodologías tanto para la caracterización de los vinos y brandies), la caracterización en sí de los vinos y brandies y la búsqueda de parámetros indicadores de su vejez.

Para ello se han organizado los siguientes objetivos:

### a) Respecto a la metodología

1. Revisar la metodología analítica para buscar aquellos métodos más apropiados para la caracterización de vinos y brandies de Jerez. En este sentido se pretende buscar métodos más rápidos y fiables de los que se venían usando en nuestro laboratorio. Puesta a punto y validación de los nuevos métodos seleccionados.
2. Aplicación de técnicas analíticas de separación y aislamiento de compuestos fenólicos a vinos de Jerez, con la idea de obtener fracciones más sencillas que nos permitan identificar un mayor número de compuestos y poder aislar alguno de ellos y evaluar la capacidad antioxidante que aportan.

b) Respecto a los sistemas de envejecimiento

3. Caracterizar un sistema de envejecimiento por Solera y Criaderas de Brandy de Jerez, con objeto de: por un lado, seleccionar aquellos parámetros analíticos que sirvan como parámetros discriminantes a la hora de clasificar las muestras en función de su vejez, y por otro lado, determinar la influencia del envinado de las botas sobre la calidad del producto.
4. Desarrollar y poner a punto un modelo alternativo de envejecimiento acelerado, con vistas a acelerar los procesos de envejecimiento manteniendo la calidad, y así contar con un test que nos permita explorar la potencialidad del uso de destilados de otras variedades de uvas diferentes de la habitualmente usada (Airen) para su envejecimiento como Brandy de Jerez. Para poder comparar la calidad de los productos así logrados se ha establecido un panel sensorial específico.
5. Estudiar el comportamiento de parámetros analíticos (polifenoles, poder antioxidante y color) relacionados con el periodo de envejecimiento en vino y Brandy de Jerez, su uso como indicadores de vejez, y la correlación entre ellos.

Estos objetivos se han desarrollado en siete capítulos agrupados en función de las técnicas empleadas y de los tipos de muestras. Cada capítulo se ha estructurado como un artículo científico.





## **2. ANTECEDENTES**



## 2.1. BRANDY DE JEREZ

### 2.1.1. Breve reseña histórica

No se sabe a ciencia cierta si fue en China o en Babilonia donde se descubrió el arte de la destilación. Lo cierto es que fueron los árabes (entraron en España, muy cerca de Jerez, en el año 711), quienes introdujeron esta técnica de destilación en el mundo occidental. Al no poder beber por razones religiosas los ya afamados vinos de la zona de Jerez, los árabes optaron por destilarlos para la obtención de “al-cohol” para usos antisépticos, medicinales y de perfumería.

No es fácil delimitar la fecha exacta en la que se comienzan a envejecer los aguardientes de vino en botas de roble para producir el preciado brandy. Lo que no cabe duda es que en el siglo XVI ya debía existir una importante producción de aguardientes de vino, como prueba la existencia de un documento, que hace referencia a que en 1580 el ayuntamiento de Jerez, cedió el importe de la renta del Aguardiente (un impuesto municipal sobre la elaboración de aguardiente) para construir un colegio de jesuitas.

En los siglos XVIII y XIX es cuando se consolida en España la producción de aguardientes con fines comerciales destinados a la exportación, especialmente a los países del norte de Europa. Holanda era el principal mercado y desde allí se exportaban de nuevo a casi todo el mundo. Con estos antecedentes no es de extrañar que palabras como “brandy” o “holandas” procedan de aquel país. Brandy es la adaptación inglesa del termino original holandés “brandewijn” (vino quemado) mientras que el término “holandas” (nombre empleado para denominar a los aguardientes de vino de baja graduación utilizados para la elaboración del Brandy de Jerez), parece ser derivado del nombre del país al que se dirigían la mayor parte de las exportaciones. En todo caso, conviene reivindicar que el término “brandewijn” ya se empleaba en la literatura picaresca en el siglo XVII, como puede leerse en la “Vida y obra de Estebadillo González, hombre de buen humor”.

A principios del siglo XIX comienzan a llegar a Jerez ingleses y franceses, que junto con españoles con claros dotes comerciales, van fijando las pautas del característico proceso de elaboración y crianza del Brandy de Jerez e impulsando su comercialización. La creación de marcas de Brandy de Jerez se lleva a cabo a lo largo del siglo XIX por iniciativa de bodegueros

emprendedores que fueron pioneros en la comercialización de marcas que aún hoy están presentes no sólo en España sino en numerosos países del mundo.

A partir del siglo XX el Brandy de Jerez vive una etapa de expansión y reconocimiento en todo el mundo. En España, se consolidó como la principal bebida espirituosa de cuantas se elaboraban y consumían, encontrándose también en los mercados exteriores, teniendo una gran expansión que se ha ido consolidando día a día.

### **2.1.2. Importancia económica y social**

El brandy es una de las grandes bebidas universales. Su consumo está extendido por todo el mundo y son numerosos los países con tradición vitivinícola que elaboran brandy. El brandy tiene en España una gran tradición, ya que constituye uno de los principales elaboradores y consumidores mundiales. El 90% del brandy español procede del Marco de Jerez, único con una Denominación Específica. Su importancia económica se pone de manifiesto si se tiene en cuenta que:

- a) el Brandy de Jerez es la bebida espirituosa más importante de cuantas se elaboran en España, con un volumen de producción en torno a los 67 millones de botellas al año, de las cuales un 60% aproximadamente se consumen en el mercado nacional y un 40% en los mercados exteriores.
- b) El Brandy de Jerez es, con gran diferencia, la bebida espirituosa más exportada de España con un volumen de más de 26 millones de botellas en el año 2007. Se exporta a más de 70 países de los cinco continentes. Entre los principales exportadores del Brandy de Jerez destacan Filipinas, México, Alemania, Gran Bretaña, la producción anual de Brandy de Jerez requiere la destilación de unos 160 millones de litros de vino.
- c) En términos de superficie unas 50000 hectáreas de viñedo íntegramente destinadas a este fin.
- d) El volumen de negocio del Brandy de Jerez es del orden de los 500 millones de euros. Aproximadamente 100 millones corresponden a la exportación y todos los años se aportan a la Hacienda Pública alrededor de 150 millones de euros por diversos conceptos impositivos.

- e) El Brandy de Jerez mantiene unos 15000 empleos en viñas, destilerías, bodegas e industrias auxiliares (fábricas de botellas, cartonajes, artes gráficas, transportes, etc)

### 2.1.3. Elaboración

#### 2.1.3.1. Destilación del vino. Obtención del aguardiente

El primer paso para la elaboración del brandy es la destilación de vinos (fundamentalmente, de las variedades de Airén y Palomino) para la obtención de los correspondientes aguardientes. Los vinos se transforman en aguardientes mediante la destilación que tiene lugar en alambiques y alquitaras de cobre (Figura 1). Durante este aparentemente sencillo proceso, se calienta el vino para que entre en ebullición en la caldera y los vapores resultantes son conducidos hasta un serpentín refrigerado donde vuelven a condensarse.



**Figura 1:** Tradicional Alquitara de cobre

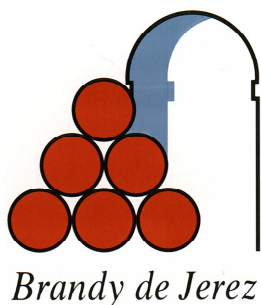
Los aguardientes conseguidos de la destilación se someten a un proceso de envejecimiento en vasijas de roble que anteriormente han contenido vinos de Jerez. Los aromas del vino jerezano inundan el aguardiente con sus cualidades, dando como resultado el Brandy de Jerez.

### 2.1.3.2. Envejecimiento del destilado.

El envejecimiento del Brandy de Jerez se realiza en barricas de roble americano (*Quercus alba*), que se denominan botas en la zona de Jerez. Su capacidad está comprendida entre 250 y 600 litros. La porosidad del roble americano es la apropiada para permitir el contacto del brandy con el oxígeno del aire, facilitando la oxidación que favorece el envejecimiento.

La evolución de todos estos parámetros físico-químicos provocados en gran medida por la influencia de la madera en la elaboración del brandy jerezano vemos que es determinante, contribuyendo a su gusto, aroma y sabor. Es importante la capacidad de cesión de la madera, que depende del tamaño y la edad de la barrica. A menor tamaño, la superficie de madera en contacto con el líquido es mayor, por lo que no conviene utilizar vasijas pequeñas, ya que la influencia de la madera sería excesiva. La experiencia ha determinado el empleo de botas de 500 a 600L como la capacidad más idónea para el envejecimiento del brandy, pues en ella se da el equilibrio ideal entre superficie de madera y volumen de contenido. El reglamento del Consejo Regulador de la denominación específica "Brandy de Jerez" permite vasijas de capacidad inferior a 1000L.

El reglamento establece que debe tratarse de botas envinadas durante al menos tres años, es decir, que hayan contenido durante ese tiempo vino de Jerez: Fino, Oloroso, Amontillado, Pedro Ximénez, etc. Estas botas contribuyen significativamente a dotar al Brandy de Jerez de matices diferentes dependiendo del tipo de botas empleadas. De esta forma, las botas de Fino permiten la obtención de brandies más pálidos que los procedentes de vasijas que hayan contenido Amontillado u Olorosos. El Brandy de Jerez resultante del envejecimiento en botas que hayan contenido Pedro Ximénez, será el más abocado y oscuro. El envinado va a marcar la diferencia fundamental respecto a otros brandies fuera del contexto de la denominación específica "Brandy de Jerez" (Figura 2)

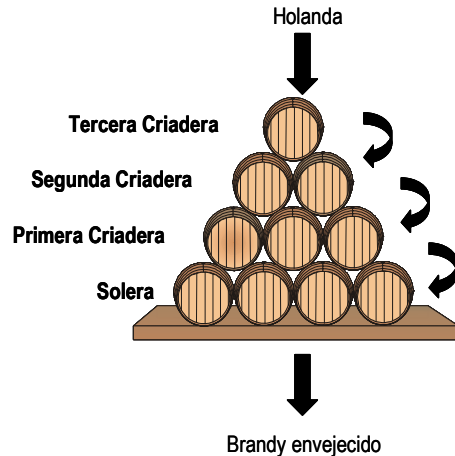


**Figura 2:** Etiqueta que indica la denominación Brandy de Jerez

### 2.1.3.2.1. Sistema de Solera y Criaderas

La adopción para el Brandy de Jerez, de este sistema de envejecimiento tradicional jerezano, usado para la crianza y envejecimiento de los vinos de Jerez, puede calificarse de crucial y es, sin duda, uno de los factores diferenciadores que imprime una singularidad característica al Brandy de Jerez.

Se trata de un procedimiento que podemos clasificar dinámico, a diferencia del envejecimiento estático por Añadas. En el sistema de Añadas, el aguardiente permanece en la misma bota durante todo el periodo de envejecimiento, por lo que no se realizan trasiegos y solo se mezcla con aguardientes procedentes de distintos niveles de envejecimiento con carácter previo a su comercialización. El método de Solera y Criaderas, sin embargo, consiste en un almacenamiento del aguardiente en botas que han sido divididas en grupos, llamadas “escalas”, según la vejez del brandy que contiene. Cada escala está formada, aproximadamente, por el mismo número de botas. La escala que contiene el brandy de mayor vejez se denomina “solera” (situado sobre el suelo), seguida, en orden de vejez por la primeracriadera, segunda criadera, tercera criadera, y así sucesivamente. (Figura 3)



**Figura 3:** Sistema de envejecimiento de Solera y Criaderas

De la solera se extrae una pequeña cantidad (operación llamada “saca”) que debe ser la misma en cada una de las botas que la forman, para su embotellado y distribución. El vacío ocasionado se repone con una porción equivalente de brandy procedente de la primera criadera (operación llamada “rocío”), siguiéndose el mismo procedimiento con la primera y segunda criadera, que se rellenan con el brandy procedente de la segunda y tercera criadera, respectivamente. La tercera criadera, a su vez, se rellena con los aguardientes de vino obtenidos en la destilación. A este



procedimiento de trasiego de aguardientes entre escalas, que se resume en la figura 3, se le denomina “correr escalas”. Las operaciones de saca y rocío se realizan periódicamente, es decir, a intervalos de tiempo constantes. Una vez realizada la saca, y antes del rocío, se mezcla el brandy extraído de cada una de las botas de la misma escala, con el objetivo de homogeneizar el contenido de las botas. El sistema de Solera y Criaderas permite obtener un brandy uniforme en sabor, aroma y color, con las mismas características organolépticas, ya que al ser una pequeña parte la que se va reponiendo sucesivamente, esta porción adquiere las características de la mayor masa de brandy con que se encuentra. Este procedimiento favorece una mayor y más rápida oxidación del Brandy de Jerez, al airearse en los continuos trasiegos.

Después del envejecimiento en el sistema de Solera y Criaderas, se disminuye el grado alcohólico del aguardiente mediante dilución con agua pura hasta situar el producto final al 38-40%. A su vez, se realizan mezclas entre aguardientes pertenecientes a distintos niveles de envejecimiento y/o adiciones de distintos extractos, maceraciones, caramelos..., con el objetivo de mantener la uniformidad del producto frente al consumidor. Al conjunto de estas operaciones se le denomina cabeceo. Finalmente, el brandy se someterá al proceso de estabilización físico-química, que le proporcionará consistencia adecuada antes de ser embotellado.

Según las características de los aguardientes y destilados de vino y del proceso de elaboración y envejecimiento, el consejo Regulador distingue tres tipos de brandies de Jerez:

- Brandy de Jerez Solera: es el brandy que ha sido envejecido en bota más de 6 meses. Su contenido en sustancias volátiles, es decir, la suma de ácidos volátiles, aldehídos, esteroides, y alcoholes superiores deberá ser superior a 200 mg/100mL de alcohol al 100% en volumen.
- Brandy de Jerez Solera Reserva: es el brandy que ha sido envejecido en bota más de un año. Su contenido en sustancias volátiles deberá ser superior a 250mg/100mL de alcohol al 100% en volumen.
- Brandy de Jerez Solera Gran Reserva: es el brandy que ha sido envejecido en bota más de tres años. Su contenido en sustancias volátiles deberá ser superior a 300mg/100mL de alcohol al 100% en volumen.

#### 2.1.4. Composición analítica del Brandy de Jerez

La complejidad sensorial del Brandy de Jerez proviene de su complejidad analítica. El perfil final del Brandy de Jerez es el resultado de las aportaciones que recibe a lo largo de su elaboración:

El primer paso a tener en cuenta en la calidad del brandy sería los compuestos originales de la propia uva: el Brandy de Jerez procede de uvas sanas que dan unos vinos aptos para el consumo directo, con una graduación entre 10.5° y 13°. La variedad utilizada en mayor medida es la Airén, de carácter bastante neutro. Su relación con la calidad de los mostos y vinos derivados fue estudiado por Barba [1]. Los caracteres analíticos de las uvas y por tanto del vino y de los destilados varían en función del año de vendimia [2,3], de la climatología [4], las prácticas durante la vendimia [5,6], etc.

Los procesos de fermentación del mosto del vino, la levadura utilizada [7,8], la conducción de la vinificación [6] o las condiciones de conservación del vino hasta el momento de la destilación son también procesos a tener en cuenta en la calidad del producto final. La posterior destilación del vino es una etapa que condiciona de manera clave la calidad del producto, como apuntan los estudios de caracterización de volátiles obtenidos según distintos sistemas de destilación [9-13].

La última etapa de envejecimiento de bota, tal y como se ha visto anteriormente es sin duda la etapa que confiere al Brandy de Jerez la impronta que lo caracteriza, lo que lo dota de unas características organolépticas propias, produciéndose una evolución en las concentraciones de azúcares, polifenoles o aromas. Así Martínez y Col. [14] estudiaron la cinética de extracción de los azúcares en un sistema de Solera y Criaderas de Brandy de Jerez, concluyendo que los brandies más envejecidos contenían una mayor concentración de azúcares, siendo la arabinosa la que una mayor relación tenía con el envejecimiento. Diversos autores han estudiado las características de destilados envejecidos en madera teniendo en cuenta la evolución de los compuestos volátiles y de compuestos polifenólicos [18] y del poder antioxidante [19].

Otra característica clave del Brandy de Jerez es el envinado previo al que son sometidas las botas antes de su envejecimiento. Durante el tiempo que permanece el vino en las vasijas se producen deposiciones en sus paredes interiores que son luego susceptibles de ser cedidos a los aguardientes que contienen. Básicamente son precipitados de sales cálcicas y potásicas de ácido tartárico, las denominadas “rasuras”, pero además pueden estar presentes las sales de

otros ácidos y algunos otros compuestos en función del vino que contuvieron, entre los que pueden esperarse azúcares si los vinos fueron dulces, Pedro Ximénez o Cream. Carrascal [20] observó la cesión de ácido succínico como característica de botas envinadas, posiblemente debido al “mojado” de la madera que realizó el vino. Además existen determinados polifenoles tales como el ácido *p*-cumárico, que por nuestra experiencia podemos afirmar que son polifenoles que proceden del envinado de la bota.

En el caso del Brandy de Jerez, suponen también una etapa importante el cabeceo y ajuste de la graduación alcohólica, así como determinadas prácticas tradicionales responsables de la amplia gama de Brandies de Jerez de diferentes matices que pueden encontrarse en el mercado, tales como son la adición de extractos de determinados frutos para aromatizar, de color caramelo para ajustar el color, o la edulcoración con azúcar natural.

Los compuestos derivados de cada una de estas etapas, sufren con el paso del tiempo interacciones entre ellos que dan lugar a nuevas sustancias. Respecto al Brandy de Jerez se ha llegado a confirmar experimentalmente la existencia de varias familias de compuestos [20-24] aunque los trabajos sobre su composición son aún insuficientes. Esto se complica si se tiene en cuenta que en la elaboración de los Brandies de Jerez, siguiendo un protocolo común, no coinciden necesariamente las maneras detalladas de hacer entre las distintas bodegas. La diversidad de los Brandies de Jerez en el mercado se consigue mediante la aplicación de determinadas prácticas tradicionales de cada bodega elaboradora.

## 2.2. VINO DE JEREZ

Aunque en la presente tesis, los vinos analizados fueron Pedro Ximénez, Amontillado y Oloroso, se hará una breve introducción al conjunto de vinos de la zona de Jerez [25] para una mejor comprensión.

La denominación de Origen “Jerez Xeres-Sherry”, la más antigua de España, está protegida por el correspondiente Consejo Regulador que vela para que se cumplan todas las normas contenidas en su Reglamento y que fundamentalmente atañen, a la zona geográfica para el cultivo de los viñedos, a las variedades, a la vinificación, a la crianza y al añejamiento (Figura 4). Esta zona, conocida como el triángulo de Jerez, incluye los términos municipales de las ciudades de Sanlúcar de Barrameda, El puerto de Santa María y Jerez de la Frontera.



**Figura 4:** Etiqueta de la denominación de origen del vino de Jerez

Este triángulo goza de un microclima regulado por las aguas que lo delimitan, el océano Atlántico y los ríos Guadalquivir y Guadalete, y los vientos predominantes, el Poniente y el Sur húmedos y templados, y el Levante seco y caluroso. La media pluviométrica anual es de 600 L m<sup>-2</sup>, la de humedad relativa de un 70%, y la de temperatura de 22 °C, siendo su extremo 0 °C y 40 °C. Una característica singular del microclima jerezano son las llamadas blanduras, espacio de finísimo rocío que, aún en verano, envuelve con su benéfica capa de humedad, tierra, flores y frutos. Las tres variedades que se cultivan en la zona de Jerez son Palomino, Pedro Ximénez y Moscatel.

Las tierras para viñedos en la zona de Jerez están clasificadas básicamente por la cantidad de carbonato cálcico que contienen:

- Albariza: tiene un contenido de cal de hasta un 60% en los pagos de Jerez Superior, ubicados al norte y al oeste de Jerez, es una tierra blanca con gran capacidad para absorber y retener agua y produce las mejores uvas para el vino de Jerez.
- Albarizones: con un contenido de cal de un 20%, está formada por albarizas y barro.
- Barros: Su contenido de cal es de un 10% y el resto es en su mayoría arcilla; de color marrón oscuro es rica en materias orgánicas y los vinos que de ella proceden no son tan delicados.
- Arenas: Tierras de color amarillo rojizo, debido a la presencia de óxido de hierro y un alto contenido de aluminatos y silicio; su subsuelo está formado principalmente por arcillas.

### 2.2.1. Clasificación

La diversidad es sin duda uno de los rasgos distintivos de la identidad del Jerez: finos, olorosos, moscateles... vinos diferentes que nos ofrecen una paleta de colores que parece no tener fin, como tampoco lo tienen la variedad extraordinaria de aromas, sabores y texturas que conforman el universo de los vinos de estas denominaciones de origen. Y todo ello a partir de tan sólo tres tipos de uva, blancas todas ellas; pero también de un proceso de elaboración absolutamente genuino. Como consecuencia sin duda de su larga tradición vinícola, la enología de Jerez es una de las más evolucionadas del mundo. Independientemente de la enorme importancia de la materia prima -la uva-, y de su origen y naturaleza, el proceso de elaboración incluye una serie de decisiones del bodeguero que van a ir "conduciendo" el destino del vino, dando lugar a las distintas "familias" de vinos de Jerez; y dentro de cada una de ellas, a los distintos tipos, definidos por su color, aromas, sabores y estructura.

El tipo de crianza es sin duda, un factor fundamental de diferenciación. Aquellos vinos que han sido sometidos exclusivamente a crianza biológica, protegidos del contacto directo con el aire por el velo natural de la flor, van a conservar su palidez inicial y su estructura ligera y etérea, así como a adquirir una serie de notas aromáticas y gustativas peculiares, fruto de la influencia de las levaduras que conforman el velo de flor.

Por su parte, los vinos envejecidos mediante crianza oxidativa o físico-química, en contacto directo con el oxígeno del aire, van a ir adquiriendo tonalidades progresivamente más oscuras, incorporando aromas complejos y sabores característicos que permanecen largamente en el paladar gracias a una estructura cada vez más intensa.

Uno de los factores determinantes en la clasificación de los vinos de Jerez será el mantenimiento o no del velo de flor (encabezamiento de los vinos hasta los 15,5° de alcohol o bien por enzima de 17°, respectivamente). Otro factor fundamental de diferenciación es la forma en la que se vinifican los mostos: es decir, el proceso mediante el que se transforman las uvas en vino joven.

La inmensa mayoría de las uvas que se destinan a la elaboración de vinos de Jerez se vinifican mediante procedimientos que implican la fermentación total de los mostos obtenidos del prensado de uvas frescas. De esa manera se obtienen vinos totalmente secos, es decir, con cantidades de azúcar residual (sin transformar en alcohol) prácticamente insignificantes. Se trata

generalmente de uvas de la variedad Palomino, que tras la recolección de la uva son transportadas rápidamente a los lagares donde, mediante presiones suaves, se obtiene un mosto limpio, pálido y ligero. La fermentación total de esos mostos da lugar al "vino base", un vino blanco totalmente seco, que es el origen de los vinos de Jerez Generosos y de la Manzanilla.

Sin embargo, la vinificación de las variedades Pedro Ximénez y Moscatel presenta peculiaridades importantes. En este caso, el objetivo enológico es elaborar un vino con el máximo contenido en azúcar posible. Por esta razón se eligen variedades - que alcanzan un mayor grado de madurez que la Palomino - y por eso se suelen someter a la técnica del "soleo": durante varios días, los racimos se secan al sol, provocando la evaporación del agua contenida en la uva y la progresiva pasificación de la misma. El mosto obtenido mediante el prensado de esas uvas pasificadas comienza su proceso de fermentación muy lentamente, debido a la altísima concentración de azúcares. Dicha fermentación va a ser detenida por el bodeguero mediante la adición de alcohol de vino, de tal manera que sólo una pequeña parte del azúcar se transforma en alcohol, quedando casi todo el resto del azúcar sin transformar.

Los vinos así obtenidos se utilizan frecuentemente para su "cabeceo" (mezcla) con los vinos secos obtenidos mediante fermentación completa, dando lugar a vinos con distintos niveles de dulzor final.

En definitiva, el tipo de fermentación: completa o parcial, va a posibilitar la obtención de vinos totalmente secos (vinos generosos), o extraordinariamente dulces (vinos dulces naturales). La mezcla de los dos tipos anteriores dará lugar igualmente a vinos con distintos niveles de dulzor (vinos generosos de licor).

#### **2.2.1.1. Vinos generosos.**

Los vinos generosos se definen en el Reglamento del Consejo Regulador como vinos secos (con un máximo de azúcar residual de 5 gramos por litro). Su proceso de elaboración incluye una fermentación completa de los mostos -habitualmente de uva Palomino- al final del cual se produce la aparición del velo de levaduras de "flor" en el vino base.

La decisión del bodeguero de fortificar el vino base bien a 15,5° o bien por encima de 17° de alcohol va a determinar el tipo de crianza a la que va someterse el vino posteriormente. A partir de ahí surgen los distintos tipos de Vino de Jerez Generosos:

#### *2.2.1.1.1. Fino*

El vino Fino se obtiene a partir de la fermentación total de mosto de uva de la variedad Palomino. El vino base así obtenido se encabeza hasta los 15% vol. de alcohol, al objeto de favorecer el desarrollo del velo de Flor; la protección natural de las levaduras va a evitar la oxidación del vino a lo largo de toda su crianza y a conferirle características organolépticas muy especiales. Esta crianza biológica se prolonga durante un período mínimo de tres años y se realiza en botas de roble americano mediante el tradicional sistema de Criaderas y Solera.

#### *2.2.1.1.2. Amontillado*

Procedente de la fermentación completa de mostos de uva palomino, el Amontillado es un vino singular, fruto de la fusión de dos tipos de crianza, la biológica y la oxidativa, lo que hace de los amontillados vinos extraordinariamente complejos e interesantes. Su particular proceso de crianza comienza, como en el caso de los finos y manzanillas, con una fase inicial bajo velo de flor; a lo largo de los primeros años en las criaderas el vino adquiere notas punzantes y acentúa su paladar seco. A partir de un determinado momento, la desaparición del velo de flor provoca una segunda fase de crianza oxidativa, que oscurecerá paulatinamente el vino y lo dotará de concentración y complejidad.

#### *2.2.1.1.3. Oloroso*

Los olorosos son vinos "vocacionales" procedentes de la fermentación completa de mostos de uva Palomino; la especial estructura que muestran desde un principio aconsejan a los catadores su clasificación con destino a crianza oxidativa. El encabezamiento inicial a 17% vol. de alcohol impide el desarrollo del velo de flor, por lo que el vino envejece expuesto en todo momento a la lenta acción del oxígeno mediante el tradicional sistema de Criaderas y Solera. La lenta pérdida de agua a través de las paredes de las botas de madera propicia un continuo proceso de concentración, que hace que el vino vaya ganando en estructura, suavidad y complejidad.

#### 2.2.1.1.4. Palo Cortado

La elaboración del palo cortado es el ejemplo más palpable de la necesidad que tiene el bodeguero jerezano de identificar claramente la auténtica vocación de cada tipo de vino y de actuar en consecuencia. Se trata de vinos procedentes de mostos extremadamente finos, inicialmente encabezados a 15% vol. e identificados inicialmente con un "palo" o raya oblicua. Al término de la fase de sobretaba, la constatación por parte de los catadores de la existencia de determinadas características muy específicas en algunas de las botas en las que ha mantenido el velo de flor, determinará su clasificación como potenciales palos cortados (lo que se ilustra en las botas con una raya horizontal que corta el "palo" original). El vino se vuelve a encabezar por encima de los 17% vol. reconduciéndose así hacia un proceso de crianza oxidativa. Sólo el tiempo en las soleras determinará, al cabo de los años, si esas características apuntadas por el vino joven se confirman con el tiempo, dando lugar a un auténtico palo cortado.

#### 2.2.1.2. Vinos Generosos de Licor

Los vinos Generosos de Licor se definen en el Reglamento del Consejo Regulador como vinos obtenidos mediante la práctica tradicional de cabeceos o combinaciones, a partir de Vinos Generosos con Vinos Dulces Naturales o, en determinados casos, con mosto concentrado. Se trata de vinos con distintos grados de dulzor, pero siempre con un contenido en azúcares superior a 5 gramos por litro. Dependiendo de los vinos generosos utilizados como base y de los niveles de dulzor finales del cabeceo, se distinguen los siguientes tipos de Vino de Jerez Generosos de Licor:

##### 2.2.1.2.1 Pale Cream

El Pale Cream es un vino generoso de licor elaborado a partir de un vino de crianza biológica -fino o manzanilla- al que se ha adicionado mosto concentrado rectificado con objeto de darle un toque de dulzor que mitigue la sensación secante original de estos vinos. Como elemento edulcorante, mejor que los vinos dulces naturales, se prefiere el mosto concentrado rectificado. Este producto procedente de la uva incorpora exclusivamente los azúcares y parte del agua biológica de la misma, permitiendo conservar en el cabeceo final el característico color amarillo pálido original.



#### 2.2.1.2.2. *Médium.*

El Medium es un vino generoso de licor elaborado a partir de una mezcla o "cabeceo" de un vino generoso con un vino dulce natural o bien con mosto concentrado rectificado. Los vinos base para el cabeceo suelen ser bien amontillados o bien vinos que, aunque hayan sido fundamentalmente envejecidos mediante crianza oxidativa, han tenido igualmente un cierta crianza biológica. En todo caso, lo que define fundamentalmente el carácter de Medium es el grado de edulcoración, que debe situarse entre los 45 y los 115 gramos de materias reductoras por litro.

#### 2.2.1.2.3. *Cream*

El Cream es un vino generoso de licor elaborado mediante la mezcla o "cabeceo" de vinos generosos de crianza oxidativa (fundamentalmente olorosos) con un importante aporte de vino dulce natural o bien de mosto concentrado rectificado. La totalidad del proceso de crianza es por tanto de carácter oxidativo y el resultado del cabeceo debe de presentar un contenido en materias reductoras superior a los 115 gramos por litro.

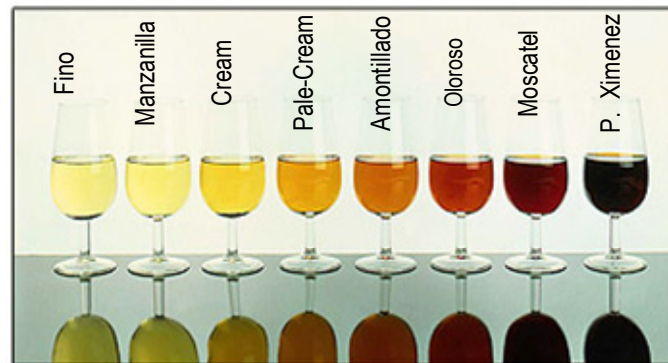
#### 2.2.1.2.4. *Vinos dulces*

Los vinos de Jerez Dulces Naturales son los obtenidos a partir de mostos procedentes de uva muy madura o soleada, generalmente de las variedades Pedro Ximénez o Moscatel. Los mostos, con una gran riqueza en azúcares como consecuencia del proceso de pasificación, son fermentados sólo parcialmente, con el objeto de conservar la mayor parte del dulzor original. Para ello se les adiciona alcohol vínico una vez que comienzan a fermentar. Los vinos así obtenidos envejecen posteriormente en contacto directo con el oxígeno del aire, lo que provoca que los vinos adquieran un intenso color caoba y un aspecto denso.

Dependiendo de las variedades de uva empleadas se distingue dos tipos de vinos dulces naturales. El vino de Jerez Dulce Natural es el procedente de uva muy madura que se somete al proceso tradicional del "soleo", hasta lograr una intensa pasificación del fruto. Tras el prensado se obtienen unos mostos que presentan una extraordinaria concentración de azúcares y un cierto nivel de coloración, el cual se somete a fermentación alcohólica parcial, detenida en su caso mediante la adición de alcohol

vínico. Su crianza es exclusivamente de carácter oxidativo. Según la variedad de la uva empleada sea Moscatel o Pedro Ximénez el vino resultante se denomina con el mismo nombre que la uva (Moscatel o Pedro Ximénez).

En la figura 5, se pueden apreciar las diferencias entre todos los vinos de Jerez que se acaban de explicar:



**Figura 5:** Vinos de Jerez

## 2.3. PARÁMETROS ANALÍTICOS ESTUDIADOS

### 2.3.1. Polifenoles

Los compuestos fenólicos o polifenólicos se caracterizan por poseer en su estructura al menos un anillo aromático en el que existen una o varias sustituciones hidroxílicas. Dada la importancia de los compuestos fenólicos para los productos vitivinícolas, existen numerosas clasificaciones [26-28], atendiendo tanto a sus propiedades como a su papel enológico. Es bastante común clasificarlos en dos grupos: flavonoides y no flavonoides.

#### 2.3.1.1. Clasificación

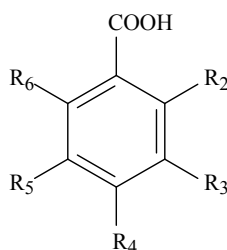
##### 2.3.1.1.1. *Compuestos fenólicos no flavonoides*

A este grupo pertenecen: fenoles sencillos con seis átomos de carbono (C6), los ácidos benzoicos y sus derivados con siete átomos de carbono (C6-C1), los ácidos cinámicos y sus derivados con nueve átomos de carbono (C6-C3), y las cumarinas formadas por un heterociclo

oxigenado de seis átomos acoplado a un anillo bencénico y derivadas de los ácidos cinámicos por ciclación de su cadena lateral. Se pueden considerar los siguientes:

a) Derivados hidroxilados del ácido benzoico

Su estructura es C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Los principales se reflejan en la Tabla 1. Estos compuestos aparecen en la uva en forma de ésteres, siendo liberados poco a poco, por hidrólisis, a lo largo del proceso de elaboración y envejecimiento, dando lugar a la aparición en el vino de ácidos libres y combinados [29,30]. Su existencia en los productos vitivinícolas se debe fundamentalmente a la alcoholisis de la lignina, componente natural de la madera, y que es extraída de ella y degradada posteriormente; también se generan por la degradación parcial de los antocianos durante el proceso de envejecimiento [29].

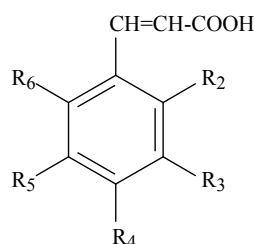


ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
Ác. Gálico	H	OH	OH	OH	H
Ác. 3,5-Dimetoxibenzoico	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
Ác. Verátrico	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
Ác. Vainílico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H
Ác. Salicílico	OH	H	H	H	H
Ác. p-Hidroxibenzoico	H	H	OH	H	H
Ác. Gentísico	OH	H	H	OH	H
Ác. 3-Hidroxibenzoico	H	OH	H	H	H
Ác. Protocatéquico	H	OH	OH	H	H
Ác. Siringico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Ác. α-Resorcílico	H	OH	H	OH	H
Ác. β-Resorcílico	OH	H	OH	H	H
Ác. γ-Resorcílico	OH	H	H	H	OH

**Tabla 1:** Derivados hidroxilados del ácido benzoico

## b) Derivados hidroxilados del ácido cinámico

Con estructura C6-C3. Los más abundantes se presentan en la Tabla 2. Se encuentran en la naturaleza tanto de forma libre como combinados con otras moléculas [31]. Debido al doble enlace que existe en su estructura presentan dos formas isoméricas, cis y trans. Ambas poseen propiedades distintas, siendo la forma trans más estable y por tanto más fácil de encontrar en la naturaleza. Los isómeros se encuentran en equilibrio y pueden transformarse el uno en el otro por acción de la luz ultravioleta.

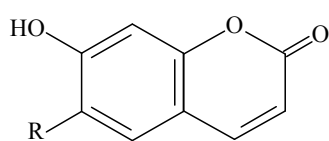


ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Ác. Ferúlico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Ác. o-Cumárico	OH	H	H	H
Ác. 3,4,5-Trimetoxicinámico	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Ác. m-Cumárico	H	OH	H	H
Ác. Cafeico	H	OH	OH	H
Ác. Sinápico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Ác. p-Cumárico	H	H	OH	H

**Tabla 2:** Derivados hidroxilados del Ácido Cinámico

## c) Cumarinas más abundantes

Se producen por hidroxilación, isomerización y ciclación de los ácidos cinámicos en medios donde existen cationes metálicos susceptibles de producir reacciones de oxidación, tal es el caso del vino [32]. También se extraen de la madera durante el envejecimiento. Su estructura se representa en la Figura 6.



R = H      Umbelliferona

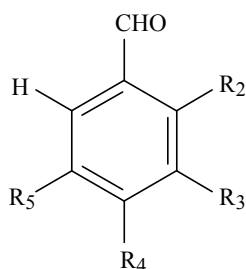
R = OH      Esculetina

R = OCH<sub>3</sub>      Escopoletina

**Figura 6:** Cumarinas

## d) Derivados aldehídicos del ácido benzoico

Su estructura es C6-C1. Los más importantes se muestran en la Tabla 3.



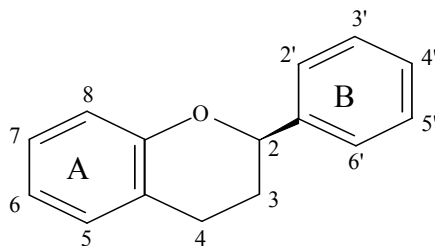
ALDEHÍDOS BENZOICOS	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<i>Vainillina</i>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
<i>o-Vainillina</i>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H
<i>Isovainillina</i>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
3,5-Dimetoxi-4-benzaldehído	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
2,4-Dimetoxibenzaldehído	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
3,4,5-Trimetoxibenzaldehído	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Protocatequialdehído	H	OH	OH	H
2,5-Dihidroxibenzaldehído	OH	H	H	OH
3-Hidroxibenzaldehído	H	OH	H	H
4-Hidroxibenzaldehído	H	H	OH	H
Salicilaldehído	OH	H	H	H
Veratraldehído	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
Anisaldehído	H	H	OCH <sub>3</sub>	H

**Tabla 3:** Derivados aldehídicos del ácido benzoico

Se forman por desaminación oxidativa de aminoácidos y oxidación de alcoholes. Son los principales responsables de los aromas de los vinos, sobre todo de aquellos que han envejecido en madera, ya que su contenido se ve aumentado por la alcoholisis de la lignina contenida en ella, por tanto, tienen una notable participación en envejecimientos en madera [33].

#### 2.3.1.1.2. Compuestos Fenólicos Flavonoideos

Bajo esta denominación se encuentran los compuestos fenólicos con estructuras C6-C3-C6, donde podemos distinguir dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado con tres átomos de carbono, que varía según el tipo de flavonoide (Figura 7).



**Figura 7:** Estructura de un flavonoide

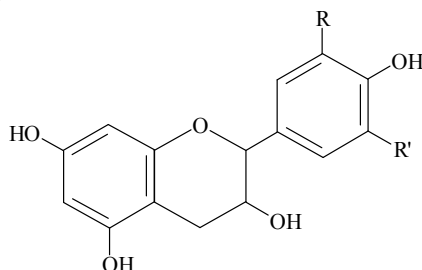
El anillo A, condensado con el heterociclo, se encuentra normalmente dihidroxilado en posición meta, mientras que el anillo B puede encontrarse mono, di o trihidroxilado, presentándose en algunos casos total o parcialmente metoxilado. Los distintos grados de oxidación de los heterociclos van a ser los responsables de las propiedades estructurales de las distintas familias (Tabla 4), siendo los flavanoles los de menor grado de oxidación y los flavonoles los que presentan el heterociclo más oxigenado.

FAMILIA	ESTRUCTURA DE LA CADENA CENTRAL
Catequinas	
Dihidrochalconas	
Charconas	
Flavanonas	
Leucoantocianidinas	
Flaonas	
Antocianidinas	
Auronas	
Flavanonoles	
Flavonoles	

**Tabla 4:** Principales familias de flavonoides

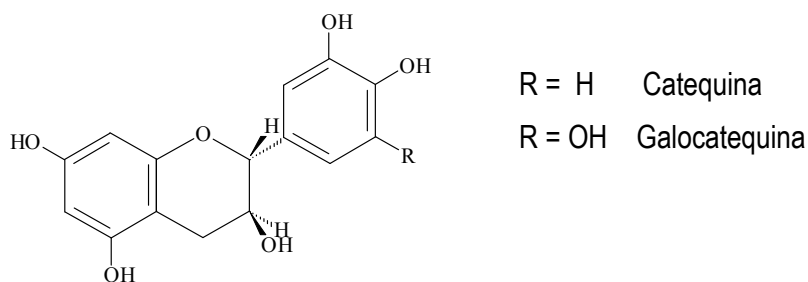
## a) Flavanoles

Dentro de este grupo destacan fundamentalmente las catequinas o 3-flavanoles, que son los fenoles más importantes desde el punto de vista enológico, ya que participan notablemente en el color y pardeamiento por oxidación [34]. Las catequinas se caracterizan principalmente por presentar el heterociclo totalmente saturado con un sustituyente hidroxílico en la posición 3. Vemos su estructura en la Figura 8.



**Figura 8:** Estructura básica de una catequina

Las más frecuentes son dos pares de estereoisómeros: catequina/epicatequina y galocatequina/epigalocatequina. Sus estructuras se encuentran representadas en la Figura 9.



**Figura 9:** Estructura de catequina y galocatequina

Muy importantes en enología son los taninos, polímeros condensados de 3-flavanoles (catequinas) y 3,4-flavandioles (leucoantocianidinas). Se concentran en el hollejo y las pepitas de la uva, presentan coloración amarilla, son insolubles en agua y solubles en alcohol. Tienen las propiedades de precipitar proteínas e inhibir enzimas, precisamente por unirse al apoenzima (que siempre es una proteína). Están presentes en mucha mayor cantidad en vinos tintos que blancos, y explican parcialmente la mayor resistencia de los tintos a la oxidación por su capacidad de inhibir las enzimas oxidantes [35]. Para la elaboración de vinagres envejecidos se prefieren vinos blancos, con menor contenido en taninos, para evitar precipitaciones [36].

## b) Antocianos

Se encuentran mayoritariamente en vinos tintos y rosados, habiéndose detectado en los blancos a nivel de trazas. Son los únicos flavonoides capaces de colorear el medio en que se encuentran; en función del pH presentarán distinta estructura y color [37]. En la Tabla 5 se muestran su estructura general y los más comunes.

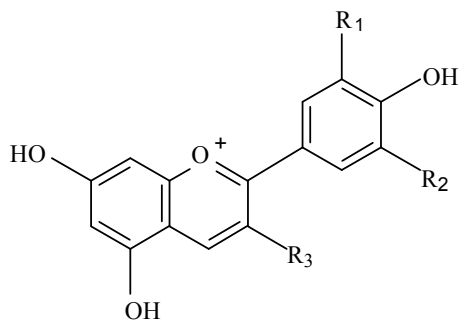


Figura 10

ESPECIE	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>Apigenidina</b>	H	H	H
Pelargonidina	H	H	OH
Luteolidina	OH	H	H
Cianidina	OH	H	OH
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	OH
Delfinidina	OH	OH	OH
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH

Tabla 5: Principales antocianos

## c) Flavonoles

Se caracterizan por la presencia en su estructura de una función carbonílica en la posición 4 y un grupo hidroxilo en la posición 3, ambos en el anillo piránico (Figura 11). Son pigmentos amarillos presentes en las partes sólidas de la uva, de vital importancia en los vinos tintos. Se muestran los más abundantes en la Tabla 6.

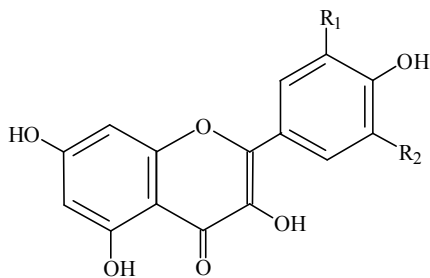


Figura 11

ESPECIE	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Kempferol	H	H
Quercetina	OH	H
Miricetina	OH	OH
Isoametina	OCH <sub>3</sub>	H

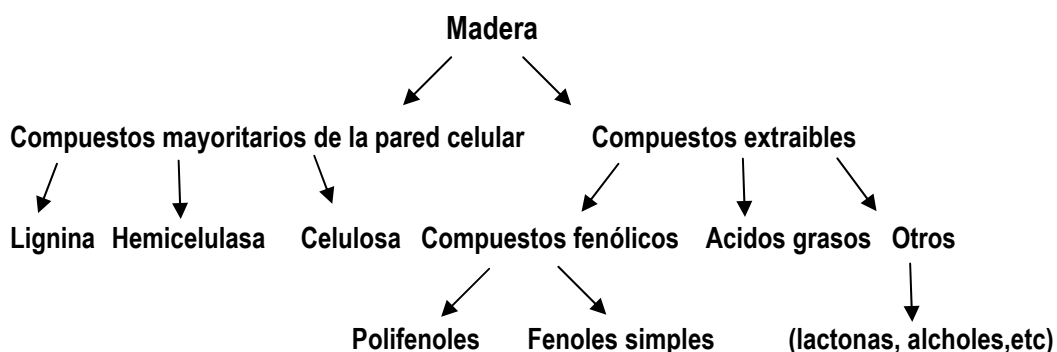
Tabla 6: Flavonoles más comunes



Actualmente, existe un creciente interés por los polifenoles presentes en productos enológicos pues muchos de estos compuestos han demostrado tener importantes acciones biológicas no sólo en las plantas, sino también en el hombre, por lo que cada vez más, los términos vino y salud intentan asociarse [38,39].

La presencia de los polifenoles en el vino tiene dos orígenes fundamentales:

- la presencia de ellos en la materia prima, la propia uva, siendo en general el contenido polifenólico mayor en uvas tintas que en blancas [40] y existiendo también notables diferencias en función de la variedad utilizada [41], del año de la vendimia [42], o de la propia elaboración del vino [43,44].
- su posterior envejecimiento en madera, ya que es en esta etapa donde la madera le va a ceder muchos de sus compuestos (Figura 12) entre los que se encuentran los polifenoles [45]



*Figura 12: Componentes de la madera de roble*

La influencia de la variedad botánica de la madera utilizada en el envejecimiento [46-49], así como el tostado de la madera [50,51] sobre el contenido polifenólico del producto final ha sido ampliamente estudiado.

El análisis de ácidos y aldehídos fenólicos han sido utilizados en numerosos trabajos como parámetros indicativos de la calidad [52] y de la edad del producto investigado [53,54]. En el caso del brandy, aunque ya pueden encontrarse fenoles en el destilado de vino, se considera que la maduración en barricas es el mayor responsable del contenido polifenólico del brandy [55]. Además de la extracción propia de la madera, el Brandy de Jerez, tal y como se ha visto

anteriormente en su elaboración, se envejece en barricas que previamente han envejecido a vinos de Jerez, aportándoles propiedades organolépticas características. Este particular modo de elaboración, supone otra vía de incorporación de polifenoles, este sería el caso por ejemplo del ácido *p*-cumárico.

Sobre la cinética de extracción de los compuestos polifenólicos en un sistema de Solera y Criaderas, como regla general puede decirse que es más rápida en los primeros años, seguida de una estabilización y posterior descenso de su concentración como señal de que el sistema estaría agotado [17,21].

Tradicionalmente, ha sido la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a detector ultravioleta el método más utilizado para el análisis de polifenoles [54,56-58], aunque cada vez son más, los autores que apuestan por la utilización de detectores de masas [59,60] o de fluorescencia [61,62] para la confirmación de los compuestos investigados, sobre todo para aquellos compuestos con una baja absorbancia en el ultravioleta como es el caso de la catequina, epicatequina, procianidinas, o para aquellos compuestos cuyo patrón comercial no exista en el mercado como es el caso del ácido *p*-cutárico o el ácido caftárico. Otros autores han utilizado la electroforesis capilar como método de análisis de los compuestos polifenólicos [63]. Recientemente han sido utilizados métodos novedosos que acortan el tiempo de análisis por trabajar con presiones más elevadas como es el caso del UPLC (*Ultra presión performance chromatography*) acoplado a un detector de ultravioleta visible [64] o acoplado a un detector de masas [65].

### 2.3.2. Coordenadas del Color

Según el Diccionario de Real Academia de la lengua Española, color es la sensación producida por los rayos luminosos que impresionan los órganos visuales y que depende de la longitud de onda, aunque en su acepción física es una propiedad de la luz transmitida, reflejada o emitida por un objeto, que depende de su longitud de onda.

En definitiva podemos definirlo como una sensación producida por la luz transmitida (objetos transparentes), reflejada (objetos opacos o transmitida por un objeto en el rango de detección del ojo humano (380-770 nm, espectro visible), cuando son iluminados por una luz blanca. Es por tanto una característica de las radiaciones del espectro electromagnético que los órganos

visuales perciben como algo diferente en función de la longitud de onda de la luz que reciben. Podemos decir por tanto que el color de un objeto depende de tres factores: un observador con capacidad para interpretar la sensación, la fuente de iluminación y el comportamiento del objeto frente al iluminante.

La radiación es detectada por la retina (órgano fotorreceptor localizado en el ojo) la cual presenta dos tipos de células que actúan a modo de sensores fotométricos: los bastones y los conos. Los primeros determinan la intensidad luminosa de la radiación (visión en blanco y negro) y los segundos son los responsables de la visión del color rojo, azul y verde, ya que son capaces de responder de forma selectiva a los rangos del espectro visible que generan estos colores.

La CIE (Comisión Internacional de l'Eclairage) recomienda en la medida del color utilizar unos estandars tanto para el observador como para la fuente de iluminación. Como observador establece el uso del observador colorimétrico patrón, en su variante 1931 ó 1964; y para el tipo de luz propone los iluminantes A, C, la serie D y F.

<b>Luminante</b>	<b>Simula a:</b>	<b>Temperatura de color (°K)</b>
A	Lámpara incandescente de filamento de tungsteno	2856
C	Luz diurna promedio	6750
D65	Luz natural del día (Iluminante C+ UV)	6500
F2	Lámpara fluorescente blanca	4200
F7	Lámpara fluorescente » luz del día	6500

**Tabla 7:** Iluminantes CIE

Los patrones Iluminantes responden a la necesidad de simular instrumentalmente y de forma normalizada las condiciones naturales bajo las cuales se observa el color (Tabla 7). Cada iluminante presenta un comportamiento diferencial en cuanto a la emisión de energía a lo largo del espectro de luz visible. Los iluminantes de la serie D son los más representativos de la distribución espectral de la luz blanca y son los más utilizados en la actualidad; su nombre viene definido por la letra D y un número que está relacionado con la distribución espectral de un cuerpo negro a una temperatura dada, así el iluminante D65 recibe ese nombre por tener una distribución espectral similar a la de un cuerpo negro a una temperatura de 6504 K. Otro iluminante muy utilizado es el iluminante C, que representa la luz del día medianamente claro.

### 2.3.2.1. Especificación del color

La norma UNE 21302-78 distingue dos acepciones y define como color percibido aquel aspecto de la percepción visual, y como color psicofísico a la característica de la radiación visible. El color percibido se define como el aspecto de la percepción visual mediante el cual un observador puede distinguir entre dos cuerpos del mismo tamaño, forma y textura basándose las diferencias en la composición espectral de las radiaciones relacionadas con la observación.

El color psicofísico es la característica de la radiación visible que permite al observador distinguir las diferencias entre dos objetos de las mismas dimensiones, forma y estructura, siendo estas diferencias de la misma naturaleza que las producidas por una diferencia en la composición espectral de la radiación que interviene en la observación.

En el caso de objetos opacos o superficies, el color puede expresarse en función de la reflectancia espectral, y para el caso de objetos transparentes o disoluciones se expresa en función de la transmitancia espectral.

- Color percibido

El color percibido es por tanto un atributo de la percepción visual, y puede describirse por nombres de color (blanco, rojo, azul, etc.) así como por combinaciones de colores. Se definen tres características del color percibido: luminosidad, tono y saturación.

- ✓ Luminosidad, atributo de la sensación visual según la cual una superficie emite más o menos luz.
- ✓ Tono, atributo de la sensación visual según la cual una superficie parece similar a uno, o a proporciones de dos de los colores percibidos: amarillo, naranja, rojo, verde, azul y púrpura.
- ✓ Saturación, atributo de la sensación visual que permite estimar la proporción de color cromático puro contenido en la sensación total.

El tono y la saturación definen las características colorimétricas de un estímulo de color y reciben, en conjunto, el nombre de cromaticidad.

- Color psicofísico

Aquellos procesos en los que se relacionan fenómenos psicológicos (perceptivos) a fenómenos físicos reciben el nombre de procesos psicofísicos. La medida del color es un proceso psicofísico ya que supone la asignación de números que representen atributos del fenómeno psicológico que denominamos color. Por regla general esta medida no intenta describir directamente las percepciones de color recibidas, sino que intenta relacionar el fenómeno color con el fenómeno físico (flujo luminoso, longitud de onda,...) que provoca la percepción.

La medida del color o colorimetría se sustenta sobre un principio fundamental: cualquier color puede ser igualado por la suma de tres colores primarios convenientemente elegidos (Newton, 1672). Es decir un color desconocido puede especificarse mediante la suma de unas cantidades de luces de tres fuentes primarias, las cuales deben ser suficientemente luminosas e independientes entre si (leyes de Grassman). Estas cantidades reciben el nombre de valores triestímulo.

Matemáticamente este principio puede expresarse de la siguiente forma:

$$c(C) = r(R) + g(G) + b(B)$$

donde r, g, b son los lúmenes de tres fuentes de referencia R, G, B (roja, verde, azul) necesarios para igualar c lúmenes de un color dado C. definiendo como primarios el rojo a 700nm, el verde a 546.1 nm y el azul ( o violeta) a 435.8nm.

Si dividimos la ecuación por c obtenemos

$$(c) = r/c (R) + g/c (G) + b/c (B)$$

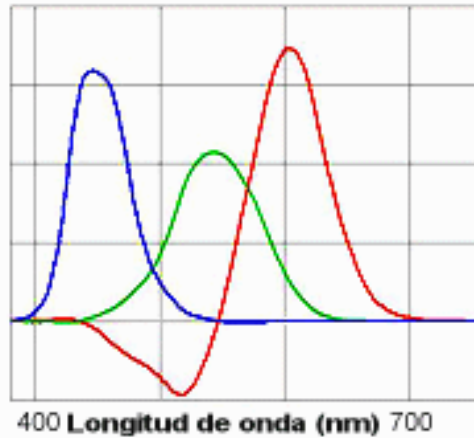
para los cocientes se establecen los siguientes coeficientes:

$$r/c=r \quad g/c=g \quad b/c=b$$

Quedando la ecuación final como

$$(C) = r ( R) +g (G)+b (B)$$

En la figura 13, están representadas las funciones colorimétricas establecidas por la CIE y conocidas como sistema colorimétrico RGB CIE 1931. Observando el gráfico vemos que se obtienen valores negativos de luminancia, lo cual carece de sentido físico.



**Figura 13.** Valores triestímulos de los colores espectrales CIE RGB

Estas gráficas son una representación matemática de un fenómeno real. De hecho experimentalmente se observa que cuando se igualan algunos colores espacialmente espectrales, no es posible obtener un color mediante la suma de las tres luces, es necesario mezclar el color C con una de las luces primarias e igualar la mezcla resultante con las otras dos luces, así por ejemplo:

$$c(C) + r(R) = g(G) + b(B)$$

Los lúmenes de r añadidos a c pueden considerarse como una cantidad negativa quedando la ecuación anterior de la siguiente forma, considerada la verdadera ecuación de igualación del color:

$$c(C) = -r(R) + g(G) + b(B)$$

Si dividimos la ecuación por c tenemos la verdadera ecuación de igualación de color

$$(C) = -r(R) + g(G) + b(B)$$

## 2.3.2.2. Modelo CIE XYZ (1931)

Para evitar valores triestímulos negativos la CIE en 1931 adoptó una serie de valores triestímulos espectrales fuera del dominio de los colores reales, es decir utilizando colores primarios ideales (no reales) obtenidos mediante una transformación matricial como la mostrada, de forma que se obtuvieran curvas colorimétricas iguales, o muy parecida, a la eficiencia luminosa espectral  $V(\lambda)$  y que las ordenadas fueran todas positivas.

$$[X] = a_{11} [R] + a_{12} [G] + a_{13} [B]$$

$$[Y] = a_{11} [R] + a_{12} [G] + a_{13} [B]$$

$$[Z] = a_{11} [R] + a_{12} [G] + a_{13} [B]$$

En este sistema Y lleva toda la información de la luminancia del color, mientras que X y Z codifican la información del color.

La combinación de X, Y y Z permite representar todos los colores posibles. Así  $C = X + Y + Z$ , donde X, Y y Z son las luminancias de las nuevas fuentes consideradas como primarias.

Si llevamos a cabo la siguiente normalización:

$$x = X / (X + Y + Z); \quad y = Y / (X + Y + Z); \quad z = Z / (X + Y + Z)$$

En la siguiente figura (Figura 14) se observa los valores triestímulos de los valores espectrales CIE XYZ.

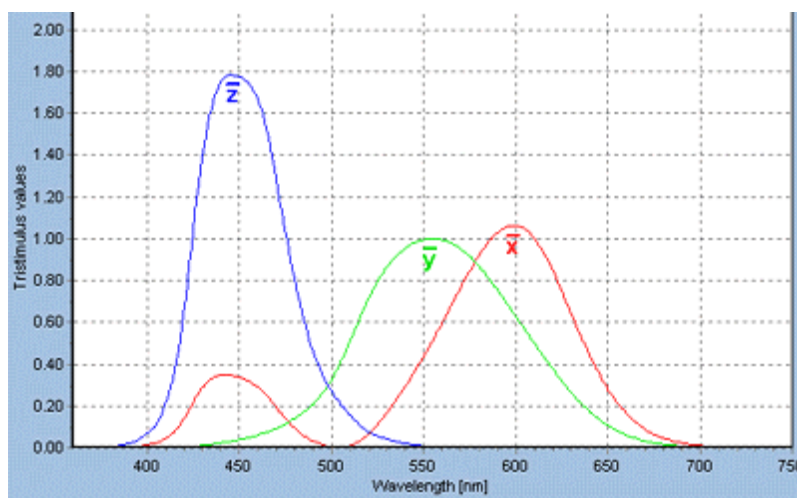
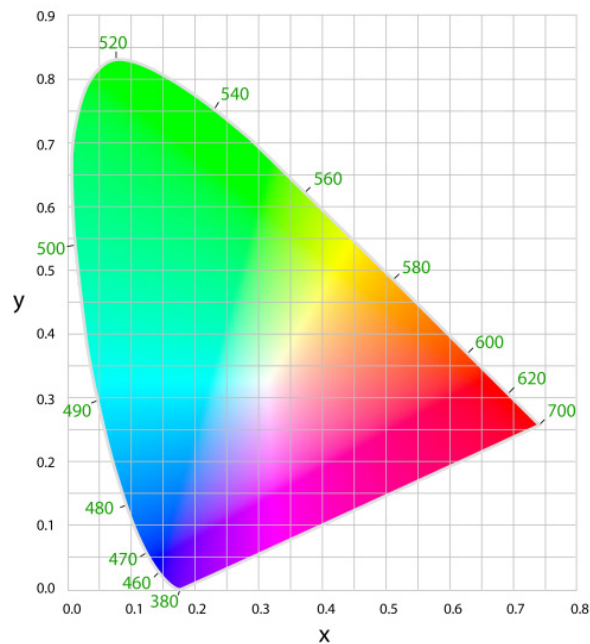


Figura 14: Valores triestímulos de los valores espectrales CIE XYZ

La expresión de la luminancia de un color será  $X+Y+Z=1$ . Llamando a  $x,y,z$  coordenadas cromáticas. Normalmente, para describir un color nos darán  $(x, y)$  e  $Y$ , donde  $(x,y)$  es la cromaticidad. Tenemos que:  $Z= 1-x-y$ ,  $X= x (Y/y)$ ,  $Z=z (Y/y)$ .

Como la representación espacial sobre un plano no es fácil, la representación de estas variables se sustituye por representaciones geométricas planas denominadas diagramas cromática, las cuales son proyecciones generalmente octogonales sobre un plano de los puntos del espacio de color, o representaciones en un plano de las coordenadas colorimétricas (Figura 15).

Estas variables publicadas en 1931, estaban definidas para campos visuales con ángulos de observación de hasta  $4^\circ$ . Sin embargo, debido a que en la práctica se utilizaban campos mayores para comparar colores, en 1959 la CIE publicó los valores triestímulos espectrales para el observador suplementario 4, para ángulos de  $10^\circ$ . En ambos casos estos observadores patrones representan la sensibilidad del ojo humano al rojo, verde y azul, y sus valores se denominan coeficientes tricromáticos de referencia.



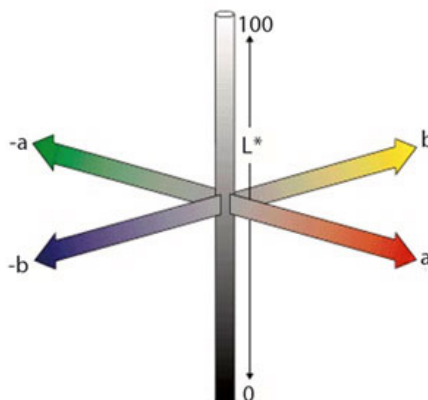
**Figura 15:** Diagrama cromático  $(x,y)$  para el observador CIE 1931

### 2.3.2.3. Modelo CIELab

En el espacio CIELab (Figura 13), las coordenadas cromáticas  $a^*$  y  $b^*$  forman un plano perpendicular a  $L$ , a la que se denomina claridad. La coordenada  $a^*$ , define la desviación del



punto acromático correspondiente a la claridad hacia el rojo si  $a^* > 0$ , o hacia el verde si  $a^* < 0$ . Análogamente, la coordenada  $b^*$ , define la desviación hacia el amarillo si  $b^* > 0$ , hacia azul si  $b^* < 0$ . Los diagramas de cromaticidad en el espacio *CIELab* no son diagramas de cromaticidad propiamente dichos ya que las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  no son proporcionales a los valores triestímulos, es decir, no se relacionan a través de funciones lineales y por ello reciben el nombre de diagramas de croma métrico CIE 1976.



**Figura 16:** Espacio de color *CIELab*

En el *CIELab*, el conjunto de las coordenadas cromáticas  $a$  y  $b$  recibe el nombre de cromaticidad, y junto con la claridad ( $L$ ) definen el color de un estímulo. La cromaticidad no indica explícitamente el tono y la saturación. Este inconveniente se resuelve definiendo dos magnitudes colorimétricas nuevas: la croma ( $C$ ), o pureza, que tiene el valor 0 para estímulos acromáticos, y por lo general no pasa de 150, aunque puede superar este valor para estímulos monocromáticos; el tono angular ( $H$ ), que corresponde al matiz y varía entre  $0^\circ$  y  $360^\circ$  (para estímulos acromáticos  $a=0$  y  $b=0$ ) es una magnitud no definida.

#### 2.3.2.4. Método oficial de determinación de color de vinos y aguardientes

El método oficial de determinación del color del vino en España está publicado en el Boletín Oficial del Estado (14 de octubre de 1981). Según este método el color de los vinos se determina por transparencia como se percibe a la vista, pero por un procedimiento independiente de la apreciación personal, valiéndose de métodos espectrofotométricos triestimulares de las ordenadas seleccionadas de Ardí.

El observador de referencia que se utiliza es el observador CIE 1931, que corresponde a ángulos subtendidos de visión menores o iguales a 4°, y con relación a la luz producida por un cielo nublado (iluminante C).

Según este método el color de los vinos viene definido por las medidas de transmitancia del vino, previamente centrifugado, filtrado y desgasificado, para las longitudes de onda de 625, 550, 495 y 445 nm, utilizando como referencia agua destilada, y en cubetas de cuarzo o vidrio de un centímetro de espesor y de 1.5 de índice máximo de refracción.

Los valores triestímulo X, Y, Z, del vino se calculan mediante las siguientes expresiones:

$$X = 0.42 T_{625} + 0.35 T_{550} + 0.21 T_{445}$$

$$Y = 0.20 T_{625} + 0.63 T_{550} + 0.17 T_{495}$$

$$Z = 0.24 T_{495} + 0.94 T_{445}$$

A partir de estos valores se calculan las coordenadas **x** e **y** del punto representativo del color del vino en el diagrama cromático de la CIE, donde

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \qquad y = \frac{Y}{X+Y+Z}$$

El color del vino se representa en un espacio de tres dimensiones cuyos ejes coordenados son: la luminosidad **Y** expresada en porcentaje, y las coordenadas cromáticas **x** e **y**.

Por otro lado existen otros índices de color que por su rapidez y sencillez de cálculo son muy utilizados por los enólogos para comprobar la evolución de la materia colorante durante la crianza de los vinos. Las características cromáticas de los vinos tintos se suelen determinar mediante la medida de la intensidad colorante y el índice de tonalidad en base a los valores de la absorbancia a dos longitudes de onda 520 nm y 420 nm. La intensidad colorante se define como la suma de las absorbancias a 520 nm y 420 nm, y el índice "tonalidad" como el cociente entre las absorbancias a 420 nm y 520 nm.

La *Office International de la Vigne et du Vin* (OIV) en la resolución OENO 1/2006 decidió reemplazar en el compendio de los métodos internacionales de análisis el método existente de determinación de las características cromáticas por el método de determinación de las características cromáticas según *CIELab*. El método propuesto por la OIV para la determinación

del color de los vinos utiliza el iluminante D65, el observador CIE 1964 y medidas espectrales en trasmittancias entre 380 y 780 nm a intervalos de 5 nm. [66]

El color ha sido un parámetro ampliamente estudiado en los vinos con diferentes finalidades: hay autores que han estudiado su evolución durante el envejecimiento en diferentes variedades de roble observando las diferencias existentes [47, 48], o como parámetro indicador de la calidad del vino durante su almacenamiento en botella [67]; Del Álamo y col. [58] utilizaron junto a otros parámetros, los parámetros cromáticos como indicadores de la edad del vino investigado, mientras que otros autores lo han utilizado para estudiar las diferencias entre vinos envejecidos de forma tradicional y aquellos que estaban envejecidos de forma acelerada mediante el uso de virutas de roble y microoxigenación [49, 68]. También ha sido motivo de estudio, la implicación que tienen en el color algunos polifenoles, fundamentalmente antocianos [69].

Dentro de los vinos de Jerez cabe destacar el trabajo realizado por Recamales y col. [70] para amontillado, utilizando el color como parámetro indicativo de la madera en el que ha sido envejecido el vino, y el realizado por Ortega y col. [71], donde estudian los polifenoles y el color de olorosos en dos modelos diferentes de envejecimiento. Monedero y col. [72], estudiaron las variables cromáticas de vinos Olorosos envejecidos de forma acelerada comparándolos con aquellos que habían sido envejecidos de forma tradicional.

En cuanto a la relación del color con los aguardientes envejecidos en madera, son varios los estudios que existen al respecto, aunque en general, la bibliografía no es muy amplia. MacDougall [73] estudió los espectros de absorbancia y los parámetros cromáticos de una selección de whiskies comerciales, entre los que se encontraban un destilado, dos whiskies de malta, una muestra de whisky del tipo "blended", una de "bourbon" y dos muestras de "caramelo". Se observó que la presencia de caramelo afectaba a la relación entre C y L, hallándose coincidencia entre los whiskies del tipo blended y los caramelos, mientras que los de malta acusaban una cromática menor respecto a la luminosidad. Lehtonen y col. [74] desarrollaron un método analítico simple que permitía diferenciar whiskies, brandies y ronnes de diferentes países y regiones en base a su composición química, absorción UV-Visible (UV-Vis) y pH.

Gomez-Cordobés y col. [75] estudiaron el color junto con otros parámetros a un conjunto de muestras de Brandies españoles y de cognacs, utilizándolos como parámetros identificativos de su calidad.

En cuanto a los brandies de Jerez cabe destacar el estudio realizado por Rodríguez-Dodero [22], donde analiza una serie de brandies comerciales de la zona de Jerez, concluyendo que en los brandies más envejecidos, la luminosidad disminuye y aumenta la proporción de componente rojo ( $a^*$ ) en el tono.

### **2.3.3. Los ácidos orgánicos**

Cualidades como el aroma, el color, la estabilidad o el tiempo de vida de un vino están directamente relacionadas con su contenido en ácidos orgánicos [76, 77]. Los ácidos orgánicos de interés enológico son en general compuestos polihidroxiácidos encontrándose tanto en forma sin disociar como en forma salificada. El tipo de ácido y los niveles en los que se presentan depende de un gran número de factores de muy diversa naturaleza; las condiciones medioambientales, las prácticas enotécnicas utilizadas o la variedad de la uva de partida, son algunos de los más influyentes.

En un primer lugar, los ácidos orgánicos presentes en el mosto tienen su origen en los procesos fotosintéticos que transcurren en la planta durante su crecimiento vegetativo, preferentemente en las hojas y el fruto verde. También son metabolitos intermedios o finales en rutas metabólicas relacionadas con la fermentación de los azúcares, la fermentación maloláctica y la oxidación del etanol [76]. Son numerosos los estudios sobre la evolución de estos ácidos y el pH en la maduración de la uva y durante los procesos de fermentación y elaboración de vinos [78,79]

Dos de estas sustancias son las principales responsables del valor de pH que presentan los mostos de uva y posteriormente el vino: el ácido tartárico y el ácido málico.

El ácido D (+) tartárico es el ácido orgánico mayoritario de la uva. Es específico de muy pocos vegetales siendo en el género *vitis* donde es más abundante. Es el ácido más fuerte de los presentes en las uvas y responsable mayoritario del valor del pH de las mismas, así como de la naturaleza tampón de los mostos, al encontrarse en parte salificado con cationes sodio y potasio. La solubilidad de sus sales, sobre todo del bitartato potásico y del tartrato neutro de calcio (tartratos), en presencia de etanol disminuye de forma drástica dando lugar a la presencia de insolubilizaciones cristalinas características de los procesos fermentativos de mosto de uva, provocando que el contenido sea menor en los vinos que en los mostos del que procede (0.2 a 1.0% p/v), y que el pH de éstos sea algo superior así como menor su acidez; aún así el ácido

tartárico es el ácido orgánico mayoritario en los vinos y otras bebidas derivadas. El ácido málico por el contrario es bastante común en todos los vegetales, siendo uno de los primeros metabolitos que aparecen en la fotosíntesis, concretamente su isómero L (-) málico. Si no se pierde completamente durante la maduración de la uva, puede desaparecer debido a un proceso fermentativo particular denominado fermentación maloláctica, mediante el cual se transforma el ácido málico en ácido láctico disminuyendo así la acidez de los mostos y elevándose el valor del pH. Las sales de este ácido no provocan problemas de solubilidad. Presentan un gran interés enológico, ya que es el responsable del sabor afrutado de los vinos blancos jóvenes.

El contenido de estos dos ácidos mayoritarios en la uva varía entre 3 y 10 g/L dependiendo de distintos factores agronómicos y medioambientales, como la variedad de vid, la localización del viñedo, las condiciones climatológicas (temperatura, lluvia...), la fecha de vendimia, el nivel de nutrición de la vid, el riego, etc.

Otro ácido que podemos encontrar en la vid, aunque de forma minoritaria, es el ácido cítrico. Su presencia, principalmente en las raíces, es debida sobre todo a reacciones características del ciclo de Krebs. Raramente se encuentran ácidos como el fumárico, ascórbico o pirúvico.

En el vino, además de los ácidos tartáricos y málicos, podemos encontrar otros ácidos orgánicos de cierta importancia enológica como son los ácidos succínico, láctico, acético...

En el caso del Brandy, Carrascal y col. [19], confirmaron que la presencia de los ácidos cítrico, tartárico, málico, succínico y fórmico eran consecuencia exclusiva del envinado de las vasijas durante el envejecimiento del aguardiente, ya que en dicho aguardiente, dichos ácidos estaban ausentes. Además, ratificaron que el aumento de ácido fórmico y acético en brandies envejecidos se debía a un comportamiento característico propio de procesos propios de envejecimiento oxidativo.

#### 2.3.3.1. Métodos de análisis de ácidos orgánicos en compuestos enológicos

Los métodos de análisis de los ácidos orgánicos en las muestras de origen enológico son muy diversos. La gran mayoría pueden ser analizados enzimáticamente o espectroscópicamente después de ser separado de otros componentes [80].

La cromatografía de gases ha sido la técnica instrumental tradicional para el análisis de los ácidos orgánicos [81]. Sin embargo esta técnica presenta un inconveniente, los ácidos orgánicos no pueden ser analizados de forma directa, sino que necesitan de un proceso de derivatización que permita convertirlos en compuestos volátiles y poder ser analizados por esta técnica.

Son abundantes los trabajos que utilizan electroforesis capilar de zona (CZE) para el análisis del contenido de ácidos orgánicos en muestras vínicas o de origen enológico [24, 82-87]. En líneas generales estos métodos de análisis presentan el inconveniente de la detección de los compuestos mayoritarios mientras que a los minoritarios en el mismo análisis, en la mayoría de ellos se propone como preparación de la muestra la dilución de la misma con agua hasta concentraciones 1/50 lo que conlleva a la no detección de los compuestos que se encuentran en menor concentración, por otro lado suele ser frecuente los problemas de irreproducibilidad y de ruido de fondo de la línea base por elevados contenidos iónicos en las muestras reales analizadas.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es otra de las técnicas de análisis utilizadas para el análisis de ácidos orgánicos en muestras de origen enológico, tanto en fase reversa con supresión iónica como de intercambio iónico con distintos detectores: UV-Vis [76,88], conductimétrico [89], índice de refracción [77] o electroquímicos [91].

En esta línea Castro y col. [92], realizan un estudio comparativo del contenido de ácidos orgánicos de muestras de vinagre de Jerez utilizando la CZE y la cromatografía de exclusión iónica con detección conductimétrica. En este estudio ponen de manifiesto que si bien ambas técnicas dan resultados similares para la mayoría de los ácidos considerados, la CZE muestra problemas con la detección del ácido málico y requiere de una dilución previa de las muestras analizadas, sin embargo la técnica de exclusión iónica permite el análisis de las muestras únicamente con una filtración previa de la misma por un filtro de 0.45 micras.

#### **2.3.4. Actividad antioxidante**

Por definición, la actividad antioxidante es la capacidad de un compuesto para inhibir la degradación oxidativa, por ejemplo, la peroxidación de lípidos. Los compuestos fenólicos son los principales componentes antioxidantes de los alimentos. A pesar de que la actividad antioxidante

de los polifenoles está asociada a varios mecanismos, su elevada reactividad frente a radicales libres activos se considera el mecanismo principal.

Sería posible medir todos los componentes antioxidantes de una muestra individualmente, pero esto resultaría lento y costoso. Además, los distintos componentes antioxidantes cooperan entre sí frente a la oxidación, por lo que su examen aislado no reflejaría con exactitud los efectos de su acción combinada. Por lo tanto, el interés se centra en la medida de la actividad antioxidante total, considerándola como una característica global del producto, sin fijarse en los componentes individuales que contribuyen a ella.

Existen numerosos métodos de determinación de la actividad antioxidante de compuestos y alimentos, si bien resulta necesario distinguir entre aquellos que estudian el efecto de su presencia sobre la degradación oxidativa de un sistema de referencia (métodos directos), y aquellos otros que se basan en la capacidad de las sustancias objeto de estudio para atrapar determinados radicales libres que habitualmente no están relacionados con la degradación oxidativa real (métodos indirectos)

#### 2.3.4.1. Métodos directos

Los métodos directos se basan en estudiar el efecto de compuestos antioxidantes sobre la degradación oxidativa de un sistema de referencia. Entre los sustratos utilizados se encuentran lípidos aislados, aceites, proteínas, material genético, así como sistemas que cuentan con sustancias de interés biológico, tal como plasma sanguíneo, lipoproteínas de baja densidad (LDL) o membranas celulares. Vamos a ver a continuación algunos de ellos:

##### ➤ Métodos que emplean $\beta$ -caroteno y ácido linoleico

Durante los años 60 e incluso antes, la oxidación del  $\beta$ -caroteno sirvió, frecuentemente, como criterio para determinar la actividad de enzimas que causaban la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y sus ésteres [92,93] y para la evaluación comparativa de antioxidantes en oxidaciones enzimáticas [94,95] y no enzimáticas [96]. La insolubilidad del caroteno en medio acuoso y la solubilidad dependiente del pH de los ácidos grasos constituían grandes dificultades para este método. En 1970 Ben Aziz y col. [97], lograron solubilizar en medio acuoso tanto el  $\beta$ -caroteno como el ácido linoleico,

también muy utilizado, gracias al uso de Tween 20. Esto permitió mejorar las condiciones de los ensayos espectrofotométricos.

El ensayo BCB ( $\beta$ -carotene bleaching), consiste en la inducción de la oxidación del mismo, que puede realizarse por métodos enzimáticos, por acción del calor o las radiaciones UV. De este modo, se registra la pérdida de color de la disolución por medida de la absorbancia a 460 nm, que es el máximo de absorción de la disolución de caroteno. Al ser añadidos los compuestos antioxidantes en estudio, la decoloración será más lenta. Este método se usó hace años y continúa usándose actualmente para el estudio de la actividad antioxidante en plantas [98-101] y vinos [102].

La combinación  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico, ha sido ampliamente utilizada, así nos encontramos en la bibliografía investigaciones determinando el poder antioxidante en plantas medicinales [103] o trigo [104,105]

El ácido linoleico se ha usado en numerosos estudios sobre la actividad antioxidante de compuestos polifenólicos, bien artificiales o bien naturales, en uvas, orujos y vinos [106,107], té [108], verduras [109], salvado de arroz [110], o plantas medicinales [111]. Normalmente se añaden los compuestos en estudio a una emulsión de este ácido, se induce su autooxidación (frecuentemente por calor) y se registra la extensión de la oxidación por distintos métodos: medida de dienos conjugados [112], método del tiocianato [108], o métodos del TBA y DETBA –ácido dietiltiobarbitúrico. [109, 113]

#### ➤ Métodos que emplean membranas

La peroxidación de lípidos por reacciones radicalarias en cadena es una reacción importante para los procesos fisiológicos y toxicológicos en la salud y enfermedad humanas, así como para la estabilidad de productos alimentarios durante su almacenamiento [114]. En las biomembranas, tienen lugar alteraciones en la estructura y pérdida de la función protectora.

En estudios de peroxidación es frecuente el uso de membranas biológicas como modelo procedentes de microsomas de retículo endoplásmico del hígado (115-117), membranas de eritrocitos de mamíferos (118,119), sin embargo presentan numerosos problemas por la presencia de enzimas y otros compuestos. La alternativa a este método se encuentra



en el uso de membranas artificiales, liposomas, que junto a técnicas de fluorescencia u otras se aplica al estudio de la peroxidación de lípidos y compuestos liposolubles [120] y la evaluación de la actividad antioxidante. Se han publicado estudios sobre la actividad antioxidante de compuestos fenólicos vegetales con liposomas [121-125].

➤ Métodos que emplean LDL

A lo largo de los últimos años son numerosas las publicaciones que utilizan las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en estudios sobre actividad antioxidante. Son muchos los artículos realizados sobre el efecto de los compuestos polifenólicos del vino [126-129], uvas [130], orujos [131] bayas [122] o té [132,133] en la oxidación de las LDL.

Dicha oxidación, es una reacción en cadena radicalaria que genera hidroperóxidos con dienos conjugados (DC) como principal producto inicial, cuya formación puede seguirse fácilmente por espectrofotometría registrando la absorbancia a 234nm [134]. Tras la adición del oxidante: iones de cobre [135,136] o 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloruro, (AAPH) [137] tiene lugar una fase de oxidación lenta (fase de retraso) debida a los antioxidantes presentes, y a continuación la velocidad de oxidación aumenta considerablemente (fase de propagación). Tanto la duración de la fase de retraso como la velocidad máxima de oxidación durante la fase de propagación se usan como índices de resistencia a la oxidación de las LDL [135].

En 1995 Vinson y Hontz [138] describieron un nuevo índice antioxidante para compuestos fenólicos, PAOXI, que representa una medida combinada de la cantidad y calidad de antioxidantes. Miden la cantidad de compuestos fenólicos capaces de inhibir el 50% de la oxidación de las lipoproteínas de baja y muy baja densidad, LDL+VLDL (IC50). La extensión de la oxidación se registra por fluorescencia de los productos de peroxidación de lípidos que reaccionan con el ácido tiobarbúrico, y el índice PAOXI se calcula dividiendo la concentración total de fenoles por el IC50. El ensayo lo aplicaron al estudio de vinos [139] y verduras [140].

#### 2.3.4.2. Métodos indirectos

La mayoría de los métodos indirectos evalúan la capacidad de las sustancias para capturar radicales libres, lo que constituye un intento de imitar los mecanismos naturales implicados en la

oxidación de lípidos. Cada uno de los métodos se basa en la generación de un radical diferente, actuando a través de distintos mecanismos y midiendo distintos puntos finales, normalmente fluorescentes o quimioluminiscentes. Algunos de los más usuales vamos a verlos a continuación:

El método TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Paramete) que desarrollaron Wayner y col. [141], junto con sus posteriores modificaciones es uno de los métodos más utilizados. Este ensayo es un test para medir la actividad antioxidante del plasma y sus resultados se expresaron como el número ( $\mu$ moles) de radicales peroxilo atrapados por litro de plasma. El test está basado en la medida del oxígeno consumido durante una reacción de peroxidación de lípidos controlada, inducida por descomposición térmica de un azo-compuesto, el 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (ABAP). El valor del TRAP es el resultado de la eficacia del sistema, atendiendo al sinergismo entre antioxidantes además de a sus concentraciones independientes. Este parámetro puede representar una primera aproximación en el estudio de la actividad antioxidante de una mezcla derivada de un alimento, bebida o similar. [142,143]

En 1993, Cao y col. [144], desarrollaron y validaron un método que ha sido ampliamente utilizado: el método ORAC (Oxigen Radical Absorbance Capacity). En este método se utiliza el AAPH como generador de los radicales peroxilo. El valor ORAC se obtiene calculando la diferencia de áreas bajo las curvas de descenso de fluorescencia de b-Ficoeritrina a lo largo del tiempo entre el blanco y una muestra. Los resultados finales se expresan usando equivalentes de Trolox. Este método ha sido utilizado en numerosas ocasiones, en plantas medicinales [145], verduras [143] o vinos [146,147]. Ou y col. [148], modificaron este método sustituyendo la b-Ficoeritrina por Fluorosceína, al comprobar que los resultados eran mejores.

En el TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) que fue utilizado por Miller [140] originalmente, se mide el tiempo que tarda el radical ABTS (Ácido 2,2' - azino - bis (3 - etilbenzotiazolina - 6 -sulfónico) tamponado a un pH de 7,4 en ser oxidado hasta el radical libre estable ABTS<sup>+</sup> en presencia de compuestos antioxidantes donadores de átomos de hidrógeno, tal como los polifenoles, que retardan dicha oxidación o bien disminuyen la absorbancia de la disolución por captura del radical, realizándose la medida a 734nm, longitud de onda en la que el radical coloreado presenta un máximo. El resultado final se expresa como equivalentes del compuesto de referencia ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxílico (Trolox) que generarían la misma respuesta.

Las distintas variantes de este método se diferencian en la manera de generar el radical y también en la medida que se tome como indicativo de la actividad de las sustancias antioxidantes. Así, se habla del TEAC I [149,150], cuando se han utilizado como agentes oxidantes generadores de ABTS<sup>+</sup> disoluciones de peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y metilmioglobina y se mide en este caso la habilidad de los antioxidantes para retrasar su aparición; de TEAC II [151] si para la generación del ión radical se filtró la disolución de ABTS a través de polvo de dióxido de manganeso (MnO<sub>2</sub>) y de TEAC III [152] cuando el compuesto oxidante fue persulfato de potasio (K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>). El ensayo TEAC I permite únicamente su aplicación a antioxidantes hidrofílicos, mientras el TEAC II se utiliza normalmente para antioxidantes con carácter lipofílico como carotenoides y tocoferoles. El ensayo TEAC III por su parte puede aplicarse tanto a unas sustancias como a otras, cambiando únicamente el disolvente de reacción. [153,154].

Una modificación de este método ha sido comercializada como Kit por la casa Randox® (método TAS, Total Antioxidant Status), capaz de medir el estado antioxidante total en bebidas. El uso de este Kit ha sido descrito en la bibliografía para determinar el estado antioxidante total de cerveza, vinos tintos y blancos [155] y bebidas alcohólicas destiladas [156].

Otra variación del método de Miller, es la generación electroquímica del catión radical, que es fácilmente detectable mediante espectrofotometría ultravioleta-visible [157]. Este método se desarrolló a partir del TEPA "Test electroquímico del pardeamiento acelerado" [158]. La oxidación electroquímica evita la necesidad de usar reactivos oxidantes que podrían producir interferencias. De esta forma, aumenta la sencillez y rapidez de la metodología, y únicamente requiere la medida del tiempo y la absorbancia. Los resultados obtenidos mediante este método han sido comparados con los proporcionados por el Kit comercial de la casa Randox®, no encontrándose diferencias significativas entre ambos [159]. Así, el método electroquímico ha sido aplicado a la medida de la actividad antioxidante en vinos (tintos y blancos), vinagres y brandies de Jerez [160] y subproductos de vinificación [161].

Entre los inconvenientes del método de Miller se encuentra la escasa selectividad del radical ABTS (Ácido 2,2' - azino - bis (3 - etilbenzotiazolina - 6 -sulfónico) que reacciona con compuestos dadores de H independientemente de cual sea su actividad antioxidante real. El uso del radical libre estable 2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) mejora la selectividad. El radical DPPH tiene un máximo de absorción a 517 nm y genera un producto incoloro cuando captura un

antioxidante. De esta forma, se mide la disminución de la absorbancia a 515nm de una disolución estable del radical DPPH en presencia de sustancias antioxidante con grupos OH activos donadores de H capaces de capturar los radicales libres. Este método es ampliamente utilizado y se ha aplicado a la determinación de la actividad antioxidante de salvado de arroz [110], plantas medicinales [103], té [133], coñacs comerciales [162], licores de Mirto (arbusto aromático) [163], vinos [136,164] y zumos de granada [165]. Milardovic y col. [166] han modificado este método, introduciendo la detección amperométrica de la concentración residual del radical libre. El detector amperométrico presenta algunas ventajas sobre el espectrofotométrico, ya que la respuesta del detector no se ve afectada por la falta de transparencia y turbidez de las muestras. El método modificado fue aplicado con éxito a la determinación de la actividad antioxidante de vinos tintos y zumos de frutas.

Los métodos para medir el poder reductor son de los pocos que utilizan compuestos inorgánicos para la medida de la capacidad reductora de las sustancias en estudio, en concreto de su capacidad para reducir  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . El ensayo de uso más extendido, desarrollado por Oyaizu, [167] se basa en la formación de ferrocianuro férrico que absorbe a 700 nm. Cuanto mayor sea la absorbancia en el medio de reacción, mayor será el poder reductor de las sustancias antioxidantes que se evalúan. Este método se ha aplicado a la medida del poder reductor en salvado de arroz [110] cerveza, vinos tintos y blancos [155]. Por su parte, en el ensayo FRAP (Ferric reducing antioxidant power) [168], la reducción del metal es monitorizada en presencia de 2,4,6,-tripiridil-s-triazina mediante la medida de absorbancia a 593 nm del complejo azul, producto de su reacción con  $Fe^{2+}$ . El resultado se expresa en equivalentes de ácido ascórbico. Este ensayo ha sido muy utilizado para determinar el poder antioxidante en diferentes alimentos [169], zumos de granadas [165] y en vinos [170-172].

En el ensayo de quimioluminiscencia del luminol el método se basa en la capacidad del luminol y compuestos relacionados para producir luminiscencia bajo un flujo de radicales libres (quimioluminiscencia). La emisión de luz se suprime en presencia de sustancias antioxidantes que actúan como capturadores de radicales, y reaparece cuando los antioxidantes se consumen. El tiempo de supresión de luz es indicativo del contenido de antioxidantes del medio. Este método, que resulta muy atractivo por el reducido tiempo de análisis (varios minutos) y la posibilidad de automatización se ha utilizado para determinar poder antioxidante en martinis [173], y en vinos [174].

La potenciometría es la técnica instrumental que más recientemente ha comenzado a aplicarse a la medida de la actividad antioxidante. Presenta sobre el resto de métodos la ventaja de basar la medida en el comportamiento electroquímico de las muestras, que dependerá directamente de la estructura química de los compuestos antioxidantes. Los compuestos antioxidantes con habilidad para actuar como reductores en solución tienden a ser fácilmente oxidables en electrodos inertes. Kilmartin y col., [175] han clasificado una serie de polifenoles en cuanto a su fuerza reductora, utilizando voltametría cíclica con electrodo de carbono. También de esta manera se ha determinado el poder antioxidante en vinos [176]. Mannino y col. [177] utilizan un sistema FIA (análisis por inyección de flujo) acoplado a un detector electroquímico con un electrodo de carbono, que les permite la medida de gran número de muestras y no requiere reactivos, para la medida de la actividad antioxidante y ha sido aplicado a vinos [178].

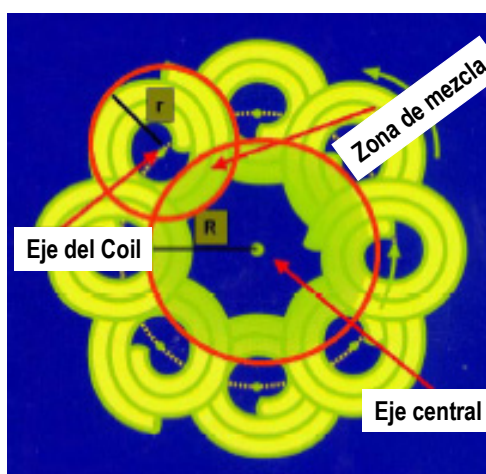
La fotodegradación y seguimiento de la generación de radicales libres y especies paramagnéticas mediante espectroscopia EPR es una novedosa aplicación de esta técnica a la determinación de la actividad antioxidante de alimentos. Partiendo del método DPPH, Ukeda, H. y col. [179] han desarrollado un sistema basado en la detección mediante resonancia de spin electrónico (ESR) que emplea el DPPH como radical libre modelo. El método ha sido aplicado a diferentes alimentos [180,181]. El sistema de detección, presenta como ventaja sobre la colorimetría que está libre de interferencias por parte de los pigmentos presentes en los alimentos. El ensayo de reducción del radical de Fremy, se basa en la capacidad del radical libre estable de Fremy (nitrosodisulfonato de potasio) para reaccionar con sustancias capaces de ceder H. El seguimiento de la reacción se realiza mediante ESR. Este método ha sido aplicado a vinos tintos [182].

## **2.4. LA CROMATOGRAFÍA CONTRACORRIENTE**

La cromatografía contracorriente es un tipo de cromatografía líquido-líquido donde tanto la fase estacionaria como la fase móvil son líquidas. La cromatografía contracorriente es la técnica cromatográfica que separa solutos por sus diferentes coeficientes de distribución en dos solventes inmiscibles. Dicha técnica se desarrolló en la década de los 70. [183]

El principio de la HSCCC se basa en sucesivos procesos de distribución de las sustancias que queremos separar entre dos fases líquidas, inmiscibles entre sí, de las cuales, una de las fases se retiene en el aparato como fase estacionaria. Esto se consigue a través del movimiento

planetario del tubo separador de teflón (Coil), que se encuentra recogido en una bobina. El Coil gira alrededor de su propio eje, así como en la misma dirección del eje central de la centrifuga. Este movimiento planetario no lleva sólo a una retención de la fase estacionaria, sino también hay fuerzas permanentemente cambiantes que ejercen un efecto sobre la fase móvil y estacionaria, de lo que resultan procesos de mezcla y separación de forma alternante en el Coil. (Figura 17). El proceso de distribución propiamente dicho se realiza mezclándose las dos fases en la parte del tubo proximal al eje giratorio (campo de fuerza débil) y en la parte distal (campo de fuerza fuerte) se separan de nuevo.

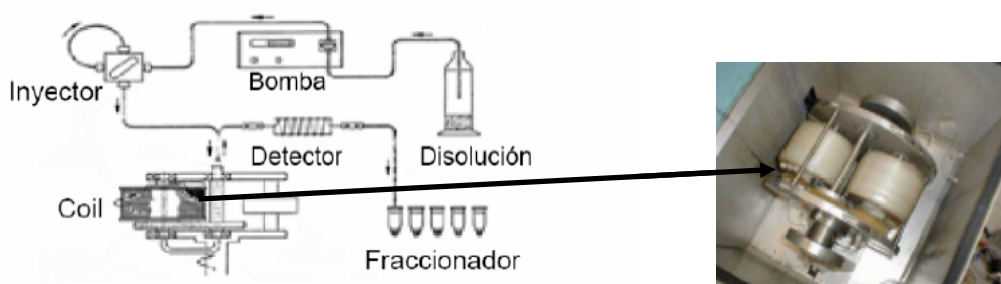


**Figura 17.** Esquema del funcionamiento del Coil

Los compuestos introducidos en el sistema, se someten a procesos de distribución eficaces entre las fase estacionaria y móvil. La separación se consigue a través de la diferente polaridad de los analitos y por tanto de los diferentes coeficientes de distribución de las sustancias en ambas fases [184, 185].

La cromatografía en contracorriente es una técnica cromatográfica eficiente, que no necesita de una fase estacionaria fija; y por tanto ofrece las ventajas de evitar la adsorción irreversible de moléculas en superficies activas y además, la muestra inyectada se puede recuperar completamente. Para empezar la separación, se rellena el Coil inicialmente con una de las dos fases (fase estacionaria). A continuación se inyecta la muestra previamente disuelta en las dos fases (fase estacionaria y fase móvil) en la misma proporción. El siguiente paso sería bombear hacia el Coil la fase móvil, y de forma simultánea se conecta la rotación. Las dos fases (estacionaria y móvil), se bombearán a través de una bomba de HPLC, la separación será

monitorizada por un cromatograma a través de un detector UV-Vis (Figura 18). El fraccionamiento de la muestra será recogido en tubos de ensayos. Con ayuda del cromatograma y cromatografía en capa fina, las fracciones serán unidas. Una vez unidas las fracciones, se concentrará y liofilizará hasta obtener un extracto seco, para posteriormente analizar mediante HPLC-PAD-MS, y con ayuda de HPLC semipreparativo conseguir aislar compuestos puros que podamos elucidar su estructura química mediante resonancia magnética nuclear (RMN).



**Figura 18:** Esquema de un equipo HSCCC

A lo largo de los últimos años son numerosos los disolventes que se han utilizado para separar gran cantidad de compuestos, lo que la hace una técnica muy versátil. Es imprescindible en esta técnica que el sistema disolvente forme dos fases. La elección de este sistema disolvente de dos fases es el paso más importante en la HSCCC donde tener un disolvente adecuado podría suponer aproximadamente el 90% del éxito obtenido en el HSCCC. Para la elección del sistema de disolvente se realizarán diferentes ensayos según los compuestos que queramos separar. En este sentido Ito, [186] elaboró un completísimo listado de los solventes utilizados hasta la fecha para los diferentes compuestos estudiados hasta el momento. Es fundamental que los analitos sean estables y solubles en el sistema y que el sistema elegido proporcione un adecuado coeficiente de partición de los analitos. El obtener un coeficiente de partición apropiado implicará la adecuada elección del sistema. El coeficiente de partición ( $k$ ) representa la relación de la cantidad de analito encontrada en cada uno de las dos fases del sistema, y está relacionado con la afinidad del analito por uno de los disolventes con respecto al otro; se expresa por la cantidad de soluto en la fase estacionaria, dividido por el de la fase móvil como en la cromatografía líquida convencional. Los valores adecuados de  $K$  para la HSCCC están entre:  $0.5 \leq k \leq 1.0$ . Si el valor es menor o mayor la repartición de la muestra no es buena entre las dos fases y no hay una

buena separación. En el caso de que sea menor solo sale un solo pico, por lo que no hay separación de la muestra y si es mayor tarda mucho más en separarse.

El HSCCC ha sido una técnica ampliamente utilizada para el fraccionamiento y aislamiento de compuestos en múltiples alimentos. Así, ha sido en numerosas ocasiones utilizadas para el aislamiento de antocianos en frutas y verduras *Citrus Sinensis* [187-190]. Diferentes grupos de compuestos han sido aislados con éxito mediante ésta técnica en diferentes matrices como los carotenoides [191-193], o las betalainas en vegetales [194].

Respecto a los productos enológicos, son también cuantiosos los estudios que han utilizado HSCCC. Así, Köhler y col [195] aislaron diferentes procianidinas en extractos de uvas. En vino tinto Sala y col. [196] identificaron y aislaron diferentes antocianos, mientras que Degenhardt y col. [197], estudiaron la contribución al color que tenían los distintos pigmentos estudiados. Noguer y col. [198], investigaron el poder antioxidante de diferentes fracciones de vino tinto previamente fraccionadas mediante HSCCC. En cuanto al vino blanco, Baderschneider y col. [199]., realizaron trabajos muy interesantes, aislando 101 compuestos pertenecientes a derivados de ácidos benzoicos y cinámicos, flavonoles y lignanos en vino blanco variedad Riesling, evaluando la capacidad antioxidante de dichos compuestos También aislaron derivados estilbenos no descritos anteriormente [200].

## 2.5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Barba, P.; González, M.A.; Pueyo, E.; Martín, P.J.; Cabezudo, M.D. (1992). Concordancia de las características químicas y sensoriales de los mostos Airen con el perfil sensorial de las uvas. XX Congreso mundial de la Viña y el Vino y 72ª Asamblea general de la O.I.V. Madrid.
- [2] Mazerolles, G.; Vidal, J.P.; Lablanquie, O.; Cantagrel, R. (1992). Caractérisation analytique des eaux-de-vie nouvelles provenant de récoltes différentes. 1er Symposium Scientifique International de Cognac. Cognac (Francia).
- [3] Lee, J.-E., Hwang, G.-S., Van Den Berg, F., Lee, C.-H., Hong, Y.-S. (2009). Evidence of vintage effects on grape wines using 1H NMR-based metabolomic study. *Analytica Chimica Acta*, 648 (1), 71-76.
- [4] Ramos, M.C., Jones, G.V., Martínez-Casasnovas, J.A. (2008). Structure and trends in climate parameters affecting winegrape production in northeast Spain. *Climate Research*, 38 (1), 1-15.



- [5] **Lurton, L.; Mazerolles, G.; Galy, B.; Cantagrel, R.** (1990). Influence de la technologie de vinification sur la qualite des eaux-de-vie de Cognac: exemples des norisoprenoides at des alcools superieurs. 1er Symposium International sur les Eaux-deVie Traditionnelles d'Origine Viticole. Bordeaux (France).
- [6] **Darias-Martin, J., Diaz-Gonzalez, D., Diaz-Romero, C.** (2004) Influence of two pressing processes on the quality of must in white wine production. *Journal of Food Engineering*, 63 (3), 335-340.
- [7] **Lurton, L.; Snackers, G.; Roulland, C.; Galy, B.; Versavaud, A.** (1995) Influence on the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 67 (4), 485-491.
- [8] **Son, H.-S., Hwang, G.-S., Park, W.-M., Hong, Y.-S., Lee, C.-H.** (2009) Metabolomic characterization of malolactic fermentation and fermentative behaviors of wine yeasts in grape wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (11), 4801-4809.
- [9] **Gómez, J.** (1991) La elaboración del Brandy de Jerez. *VitiVincultura*, (11-12), 37-42.
- [10] **Grandal, M.M.** (1994). El aroma del Brandy de Jerez: aspecto analítico. VI Curso superior de Viticultura y Enología en climas cálidos.
- [11] **Avakiants, S.** (1992) Influence des différents méthodes de distillation des vins sur les substances volatiles et la qualité des eaux-de-vie. 1er Symposium Scientifique International de Cognac. Cognac (Francia).
- [12] **Versini, G.; Dalla, A.; Monetti, A.; Inama, S.; Ramponi, M.** (1995) Differenze compositive fra grappe del Trentino in funzione dei sistemi tradizionali di distillazione e del processo aziendale. *La rivista di scienza dell'alimentazione*, 24 (3), 427-436.
- [13] **Gerogiannaki-Christopoulou, M.** (2009) Development for a procedure for the determination of 2-phenylethanol in hellenic wine distillates (*Vitis Vinifera* L.) and their changes during distillation. *European Food Research and Technology* 229 (3), 383-389.
- [14] **Martinez Montero C., Rodriguez Dodero M.D.C., Guillen Sanchez D.A., Garcia Barroso C.** (2005) Sugar contents of Brandy de Jerez during its aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (4), 1058-1064.
- [15] **Mangas J., Rodriguez R., Moreno J., Suarez B., Blanco D.** (1996) Evolution of Aromatic and Furanic Congeners in the Maturation of Cider Brandy: A Contribution to Its Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (10), 3303-3307.
- [16] **Rodriguez Madrera R., Blanco Gomis D., Mangas Alonso J.J.** (2003) Influence of distillation system, oak wood type, and aging time on volatile compounds of cider brandy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (19), 5709-5714.
- [17] **Duran E., Delgado R., Natera R., Castro R., Barroso. C. G.** (2009) Characterization and differentiation of sherry brandies with different periods of ageing in wood. IV Symposium on Recent Advances in Food Technology.

- [18] **Rodríguez M.C., Guillén D., Schwarz M., Barroso C.G.** (2010) Phenolic compounds and furanic derivatives in the characterization and quality control of Brandy de Jerez. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2), 990-997.
- [19] **Schwarz, M., Rodríguez, M., Martínez, C., Bosquet, V., Guillén, D., Barroso, C.G.** (2009) Antioxidant activity of Brandy de Jerez and other aged distillates, and correlation with their polyphenolic content. *Food Chemistry*, 116 (1), 29-33.
- [20] **Carrascal V.** (2003) Estudio de los ácidos orgánicos y su relación con las prácticas tradicionales de fabricación. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- [21] **Diez, J.** (1982) Estudio analítico de la evolución de algunos componentes del aroma del brandy jerezano con el soleraje. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- [22] **Rodríguez Dodero M.C.** (2004). Estudio analítico de la composición polifenólica del brandy de jerez y su relación con la elaboración, envejecimiento, caracterización y calidad. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- [23] **Martínez, C.** (2007). "Estudio de parámetros alternativos como indicadores del envejecimiento y de la calidad del brandy de Jerez". Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- [24] **Moreno, V.G.; Jurado, C.; Barroso, C.G.** (2001). Method devised for determining low molecular weight organics acids in vinic samples by capillary electrophoresis: validation of the method with real samples. *European Food Research Technology*, 213, 381-385.
- [25] **Consejo Regulador de vino de Jerez**
- [26] **Mareca Y.** (1982) "Origen, composición y evolución del vino". De Alhambra. Madrid.
- [27] **Ribereau-Gayon J, Peyneaud E, Sudraud P.** (1976). "Sciences et techniques du vin", Tomo 1. Ed. Dunod. París.
- [28] **Harborne JB, Simmonds NW.** (1964). "Biochemistry of phenolics compounds". De Harborne. Academic Press. New York.
- [29] **Mareca Cortes Y.** (1968) "Enología". Ed. Alhambra. Madrid.
- [30] **Barroso, C.G., Torrijos, R.C., Perez-Bustamante, J.A.** (1986). Evolution of phenolic acids and aldehydes during the different production process of "Fino" Sherry wine. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 182, 413-418.
- [31] **Ribereau-Gayon P.** "Les composés phenoliques des vegetaux". Dunod. París. 1968.
- [32] **Henning K, Bourkhardt R.** (1960). Detection of phenolic compounds and hydroxy acids in grapes, wines, and similar beverages. *American Journal of Enology and Viticulture* ; 11, 64-79.
- [33] **Drawert F, Leupold G, Lessing V, Querény Z** (1976). Gaschromatographische Bestimmung der Inhaltsstoffe von Gärungsgetränken. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 162, 407-414.

- [34] **García Barroso, C., López Sánchez, L., Otero, J.C., Cela, R., Pérez-Bustamante, J.A.** (1989). Studies on the browning of fino sherry and its relation to polyphenolic compounds *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 189 (4), 322-325.
- [35] **De Rosa T.** “Tecnología del vino tinto” Ed. Mundi-Prensa. Madrid, 1988.
- [36] **Guzmán Chozas M.** (1998) “El vinagre. Características, atributos y control de calidad” Ed. Díaz de Santos. Madrid.
- [37] **Ribereau Gayon J.** (1954). “Enología: Transformaciones y tratamientos de los vinos” Ed. Salvat-Editores S.A. Barcelona.
- [38] **Rice-Evans, C.** (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 797–809.
- [39] **Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE.** (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 341 (8852), 1103-1104.
- [40] **Katalinić, V., Možina, S.S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenkov, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., Boban, M.** (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119 (2), 715-723.
- [41] **Pour Nikfardjam M.S., Pickering G.J.** (2008). Influence of variety and commercial yeast preparation on red wine made from autochthonous Hungarian and Canadian grapes. Part I: Phenolic composition. *European Food Research and Technology*, 227 (4), 1077-1083.
- [42] **Lee, J.-E., Hwang, G.-S., Van Den Berg, F., Lee, C.-H., Hong, Y.-S.** Evidence of vintage effects on grape wines using 1H NMR-based metabolomic study. (2009). *Analytica Chimica Acta*, 648 (1), 71-76.
- [43] **Bosso, A., Guaita, M., Panero, L., Borsa, D., Follis, R.** (2009). Influence of two winemaking techniques on polyphenolic composition and color of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60 (3), 379-385.
- [44] **Sacchi, K. L., Viso'n, L. F., & Adams, D. O.** (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56 (3), 197–205.
- [45] **Mosedale J.R., Puech J.L.** (1998). Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 9 (3), 95-101.
- [46] **Prida A., Puech J.-L.** (2006). Influence of geographical origin and botanical species on the content of extractives in American, French, and East European oak woods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (21), 8115-8126.
- [47] **Cadahía, E., Fernández de Simón, B., Sanz, M., Poveda, P., Colio, J.** (2008) Chemical and chromatic characteristics of Tempranillo, Cabernet Sauvignon and Merlot wines from DO Navarra aged in Spanish and French oak barrels. *Food Chemistry*, 115 (2), 639-649.
- [48] **Hernandez T., Estrella I., Duenas M., De Simon B.F., Cadahia E.** (2007). Influence of wood origin in the polyphenolic composition of a Spanish red wine aging in bottle, after

- storage in barrels of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology*, 224 (6), 695-705.
- [49] **Del Alamo Sanza M., Dominguez I.N., Merino S.G.** (2004). Influence of different aging systems and oak woods on aged wine color and anthocyanin composition. *European Food Research and Technology*, 219 (2), 124-132.
- [50] **Matejcek D., Mikes O., Klejdus B., Sterbova D., Kuban V.** (2005). Changes in contents of phenolic compounds during maturing of barrique red wines. *Food Chemistry*, 90 (4), 791-800.
- [51] **Chatonnet P.** (1999). Discrimination and control of toasting intensity and quality of oak wood barrels. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50 (4), 479-494.
- [52] **Garcia-Ruiz A., Bartolome B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., Moreno-Arribas M.V.** (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19 (9), 835-841.
- [53] **Muñoz-Muñoz A.C., Grenier A.C., Gutierrez-Pulido H., Cervantes-Martinez J.** (2008). Development and validation of a High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection method for the determination of aging markers in tequila. *Journal of Chromatography A*, 1213 (2), 218-223.
- [54] **Del Álamo, M., Nevares, I., Gallego, L., Martin, C., Merino, S.** (2008). Aging markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Analytica Chimica Acta* 621 (1), 86-99.
- [55] **Schwarz M., Rodríguez M.C., Guillén D., Barroso C.G** (2009) Desarrollo de un test de envejecimiento acelerado para el Brandy de Jerez. Gienol 2009
- [56] **Frangipane M.T., Santis D.D., Ceccarelli A.** (2007). Influence of oak woods of different geographical origins on quality of wines aged in barriques and using oak chips. *Food Chemistry*, 103 (1), 46-54.
- [57] **Gambelli L., Santaroni G.P** (2004). Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17 (5), 613-618.
- [58] **Cerezo A.B., Tesfaye W., Torija M.J., Mateo E., Garcia-Parrilla M.C., Troncoso A.M.** (2008) The phenolic composition of red wine vinegar produced in barrels made from different woods. *Food Chemistry*, 109 (3), 606-615.
- [59] **Kammerer D., Claus A., Carle R., Schieber A.** (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (14), 4360-4367.
- [60] **Garcia-Marino M., Rivas-Gonzalo J.C., Ibanez E., Garcia-Moreno C.** (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta*, 563 (1), 44-50.
- [61] **de Quirós, A.R.-B., Lage-Yusty, M.A., López-Hernández, J.** (2009). HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*, 42 (8), 1018-1022.

- [62] **Rodriguez-Delgado M.-A., Gonzalez-Hernandez G., Conde-Gonzalez J.-E., Perez-Trujillo J.-P.** (2002). Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry*, 78 (4), 523-532.
- [63] **Panosyan A.G., Mamikonyan G., Torosyan M., Abramyan A., Oganessian A., Gabrielyan E.S., Grigoryants A., Mkhitarian, S., Lapin B.V.** (2002). Determination of phenolic aldehydes in cognacs and wines by capillary electrophoresis: New cognac quality markers. *Journal of Analytical Chemistry*, 57 (4), 356-361.
- [64] **Spáčil, Z., Nováková, L., Solich, P.** (2008). Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta*, 76 (1), 189-199.
- [65] **Sáenz-Navajas, M.-P., Tena, M.T., Fernández-Zurbano, P.** (2009). Study of hydroxycinnamic acids and malvidin 3-monoglucoside derivatives using capillary zone electrophoresis and ultra-performance liquid chromatography. *Food Chemistry* 92 (2), 269-283.
- [66] **Hernández Castell, M. J.**, (2009). Estudio de parámetros relacionados con la calidad y seguridad Alimentaria de vinos dulces andaluces Naturales. Tesis Doctoral, Universidad de Cádiz.
- [67] **Monagas M., Martin-Alvarez P.J., Gomez-Cordoves C., Bartolome B.** (2006). Time course of the colour of young red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *International Journal of Food Science and Technology*, 41 (8), 892-899.
- [68] **Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Cano-Mozo, E., González-Sanjosé, M.L.** (2009). The influence of oak wood chips, micro-oxygenation treatment, and grape variety on colour, and anthocyanin and phenolic composition of red wines. *Journal of Food Composition and Analysis* 22 (3), 204-211.
- [69] **Gutierrez I.H., Lorenzo E.S.-P., Espinosa A.V.** (2005) Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry* 92 (2), 269-283.
- [70] **Recamales, A.F., Hernanz, D., Álvarez, C., González-Miret, M.L., Heredia, F.J.** (2007). Colour of Amontillado wines aged in two oak barrel types. *European Food Research and Technology* 224 (3), 321-327.
- [71] **Ortega, A.F., Mayen, M., Medina, M.** (2008). Study of colour and phenolic compounds in two models of oxidative ageing for sherry type white wines. *Food Control* 19 (10), 949-956.
- [72] **Monedero, L.; Olalla, M.; Villalón, M.; López, H.; López, M.C.** (2000). Standardisation of the chromatic characteristics of sobretablas wine macerates obtained by an accelerated ageing technique using heating and oak shavings. *Food Chemistry*, 69, 47-54.
- [73] **MacDougall, D.B.** (1989). Measurement of food and beverage colour appearance, Distilled Beverage Flavour: Recent Developments. Ed. VCH.

- [74] **Lehtonen, P.; Keller, L.; Ali-Mattila, E.** (1999). Multimethod analysis of matured distilled alcoholic beverages for brand identification. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 208, 413-417.
- [75] **Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.** (1993). Application of principal component analysis to simple determinations of brandies as a means of verifying quality. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 197 (3), 260-263.
- [76] **García Romero, E.; Sanchez Munoz, G.; Martín Alvarez, P. J.; Cabezudo Ibanez, M. D.** (1993). Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 655 (1), 111-117.
- [77] **López-Tamames, E.; Piug-Deu, M.A.; Teixeira, E.; Buxaderas, S.** (1996). Organic acids, sugars, and glycerol content in white winemaking products determined by HPLC: Relationship to climate and varietal factors. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(2), 193-198.
- [78] **Johnson, T.; Nagel, C.W.** (1976). Composition of central Washington grapes during maturation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), 15-20.
- [79] **Amerine, M. A.; Winkler, A. J.** (1942). Maturity studies with California grapes. II. Titratable acidity, pH and organic acid content. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 40, 313-324.
- [80] **Rebelein, H.** (1961). Colorimetric determination of tartaric and lactic acids in wine and fruit juice. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 57, 36-41.
- [81] **Giumanini, A.G., Verardo, G., Della Martina, D., Toniutti, N.** (2001). Improved method for the analysis of organic acids and new derivatization of alcohols in complex natural aqueous matrixes: Application to wine and apple vinegar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (6), 2875-2882.
- [82] **Arellano, M., Andrianary, J., Dedieu, F., Couderc, F., & Puig, P.** (1997). Method development and validation for the simultaneous determination of organic acid and inorganic acids by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 765 (2), 321-328.
- [83] **Castiñeira, A., Peña, R. M., Herrero, C., & García-Martín, S.** (2000). Simultaneous determination of organic acids in wine samples by capillary electrophoresis and UV detection: Optimization with five different background electrolytes. *HRC –Journal of High Resolution Chromatography*, 23 (11), 647-652.
- [84] **Castiñeira, A., Peña, R. M., Herrero, C., & García-Martín, S.** (2002). Analysis of organic acids in wine by capillary electrophoresis with direct UV detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15 (3), 319-331.
- [85] **Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F.** (2007). Simple determination of main organic acid in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Food Chemistry*, 102 (1), 104-112.

- [86] **Moreno, M.V.G., Jurado, C.J., Barroso, C.G.** (2003). Determination of organic acids by capillary electrophoresis with simultaneous addition of Ca and Mg as complexing agents. *Chromatographia*, 57 (3-4), 185-189.
- [87] **Rovio, S., Kalliola, A., Sirén, H., Tamminen, T.** (2010). Determination of the carboxylic acids in acidic and basic process samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1217 (8), 1407-1413.
- [88] **Rudnitskaya, A., Rocha, S.M., Legin, A., Pereira, V., Marques, J.C.** (2010). Evaluation of the feasibility of the electronic tongue as a rapid analytical tool for wine age prediction and quantification of the organic acids and phenolic compounds. The case-study of Madeira wine. *Analytica Chimica Acta*, 662 (1), 82-89.
- [89] **Guillén D.A., Barroso C.G., Zorro L., Carrascal V., Pérez-Bustamante J.A.** (1998). Organic acids analysis in "brandy de jerez" ion-exclusion chromatography, "post-column" buffering and conductimetric detection. *Analisis*, 26(4), 30-60.
- [90] **Casella, I.G.; Gatta, M.** (2002). Determination of Aliphatic Organic Acids by High-Performance Liquid Chromatography with Pulsed Electrochemical Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (1), 23-28.
- [91] **Castro, R., Moreno, M.V.G., Natera, R., García-Rowe, F., Hernández, M.J., Barroso, C.G.** (2002). Comparative analysis of the organic acid content of vinegar by capillary electrophoresis and ion-exclusion chromatography with conductimetric detection. *Chromatographia*, 56 (1-2), 57-61.
- [92] **Blain JA, Hawthorn J, Todd JP.** (1953). Bleaching of carotene by a lipoxidase-linoleate system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 4 (12), 580-587.
- [93] **Tookey HL, Wilson RG, Lohmar RL, Dutton HJ.** (1958). Coupled oxidation of carotene and linoleate catalyzed by lipoxidase. *The Journal of biological chemistry*, 230 (1), 65-72.
- [94] **Shearer G, Blain JA.** (1966). Comparison of antioxidants in primary and secondary oxidations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17 (12), 533-536.
- [95] **Ben Aziz A, Grossman S, Budowski P, Ascarelli I, Bondi A.** (1968). Antioxidant properties of lucerne extracts *Journal of the Science of Food and Agriculture* 19, 605-608.
- [96] **Budowski P; Bondi A** (1960). Autoxidation of carotene and vitamin A. Influence of fat and antioxidants. *Archives of biochemistry and biophysics* 89, 66-73.
- [97] **Ben-Aziz A; Grossman S; Ascarelli I; Budowski P** (1970). Linoleate oxidation induced by lipoxygenase and heme proteins: a direct spectrophotometric assay. *Analytical biochemistry*, 34 (1), 88-100.
- [98] **Pratt, Dan E.** (1965). Lipid antioxidants in plant tissue. *Journal Food Science* 30(5), 737-4.
- [99] **Gazzani, G., Papetti, A., Massolini, G., Daglia, M.** (1998). Anti-and Prooxidant Activity of Water Soluble Components of Some Common Diet Vegetables and the Effect of Thermal Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (10), 4118-4122.

- [100] **Gorinstein S., Caspi A., Libman I., Lerner H. T., Huang D., Leontowicz H., Leontowicz M., Tashma Z., Katrich E., Feng S., Trakhtenberg S.** (2006). Red grapefruit positively influences serum triglyceride level in patients suffering from coronary atherosclerosis: Studies in vitro and in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (5), 1887-1892.
- [101] **Amin I. Mukhrizah O.** (2006). Antioxidant capacity of methanolic and water extracts prepared from food-processing by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 778-784.
- [102] **Ganic, K. Kovacevic; Persuric, D.; Komes, D.; Banovic, M.; Dragovic-Uzelac, V.; Piljac, J.** (2005). Phenolic composition and antioxidant activity of Malvasia istriana must and wine. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 58(2-3-4), 91-98.
- [103] **Sokmen, M., Angelova, M., Krumova, E., Pashova, S., Ivancheva, S., Sokmen, A., Serkedjieva, J.** (2005). In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from Geranium sanguineum L. *Life Sciences*, 76 (25), 2981-2993.
- [104] **Liyana-Pathirana, Chandrika M., Shahidi F.** (2006). Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (3), 477-485.
- [105] **Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C. M., Wall D. S.** (2006). Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, 99 (3), 478-483.
- [106] **Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B., Kinsella, J.E.** (1994). Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (1), 64-69.
- [107] **Larrauri, J.A., Rupérez, P., Saura-Calixto, F.** (1997). Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (4) 1390-1393.
- [108] **Yen, G.C., Hsieh, C.L.** (1998). Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (10), 3952-3957.
- [109] **Furuta, S., Nishiba, Y., Suda, I.** (1997). Fluorometric assay for screening antioxidative activity of vegetables. *Journal of Food Science*, 62 (3), 526-528.
- [110] **Iqbal, S., Bhanger, M. I., Anwar, F.** (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*, 93 (2), 265-272.
- [111] **Zai-Qun, I.** (2006). A Special Antioxidant to protect linoleic acid against free-radical-induced peroxidation in micelles. *Journal of Physical Chemistry A*, 110 (19), 6372-6378.
- [112] **Torel, J, Cillard, J, Cillard, P.** (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 25 (2), 383-385.



- [113] Xanthopoulou, M.N., Fragopoulou, E., Kalathara, K., Nomikos, T., Karantonis, H.C., Antonopoulou, S. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts. *Food Chemistry*, 120 (3), 665-672.
- [114] Schaich, K.M. (1992). Metals and lipid oxidation. Contemporary issues. *Lipids*, 27 (3), 209-218.
- [115] Monahan, F.J., Gray, J.I., Asghar, A., Haug, A., Strasburg, G.M., Buckley, D.J., Morrissey, P.A. (1994). Influence of diet on lipid oxidation and membrane structure in porcine muscle microsomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (1), 59-63.
- [116] Cascon, E.; Roig, R.; Salvado, M. J.; Arola, L.; Blade, C. (2001). Effects of wine flavonoids on oxidative status and lipid synthesis and secretion in hepatocytes. *Bulletin de l'O.I.V.* 74 (845-846), 504-518.
- [117] Plumb, G.W., Chambers, S.J., Lambert, N., Bartolomé, B., Heaney, R.K., Wanigatunga, S., Aruoma, O.I., Halliwell, B., Williamson, G. (1996). Antioxidant actions of fruit, herb and spice extracts. *Journal of Food Lipids* 3 (3), 171-188.
- [118] McKenna, R., Kézdy, F.J., Epps, D.E. (1991). Kinetic analysis of the free-radical-induced lipid peroxidation in human erythrocyte membranes: evaluation of potential antioxidants using cis-parinaric acid to monitor peroxidation. *Analytical Biochemistry*, 196 (2), 443-450.
- [119] Thomas, J.P., Maiorino, M., Ursini, F., Girotti, A.W. (1990). Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *Journal of Biological Chemistry*, 265(1) 454-461.
- [120] Yin, M.C., Cheng, W.S. (1998). Antioxidant Activity of Several Allium Members. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (10), 4097-4101.
- [121] Arora, A., Nair, M.G., Strasburg, G.M. (1998). Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine*, 24 (9), 1355-1363.
- [122] Heinonen, I.M., Meyer, A.S., Frankel, E.N. (1998). Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (10), 4107-4112.
- [123] Rackova, L., Firakova, S., Kostalova, D., Stefek, M., Sturdik, E., Majekova, M. (2005). Oxidation of liposomal membrane suppressed by flavonoids: Quantitative structure-activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13 (23), 6477-6484.
- [124] Ly, T.N., Shimoyamada, M., Yamauchi, R. (2006). Isolation and Characterization of Rosmarinic Acid Oligomers in *Celastrus hindsii* Benth Leaves and Their Antioxidative Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (11), 3786-3793.
- [125] Azevedo, J., Fernandes, I., Faria, A., Oliveira, J., Fernandes, A., Freitas, V., Mateus, N. (2010). Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins. *Food Chemistry* 119 (2), 518-523.

- [126] Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Teissedre, P.L. (1995). Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (4), 890-894.
- [127] Abu-Amsha, R., Croft, K.D., Puddey, I.B., Proudfoot, J.M., Beilin, L.J. (1996). Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: Identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clinical Science* 91 (4), 449-458.
- [128] Yildirim Yildirim, H.K., Akçay, Y.D., Güvenc, U., Sözmen, E.Y. (2004). Protection capacity against low -density lipoprotein oxidation and antioxidant potential of some organic and non-organic wines. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55 (5), 351-362.
- [129] Yildirim, H.K., Akçay, Y.D., Güvenc, U., Altindişli, A., Sözmen, E.Y. (2005). Antioxidant activities of organic grape, pomace, juice, must, wine and their correlation with phenolic content. *International Journal of Food Science and Technology*, 40 (2), 133-142.
- [130] Frankel, E.N., Bosanek, C.A., Meyer, A.S., Silliman, K., Kirk, L.L. (1998). Commercial Grape Juices Inhibit the in Vitro Oxidation of Human Low-density Lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (3), 834-838.
- [131] Meyer, A.S., Jepsen, S.M., Sørensen, N.S. (1998). Enzymic Release of Antioxidants for Human Low-Density Lipoprotein from Grape Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (7), 2439-2446.
- [132] Yamanaka, N., Oda, O., Nagao, S. (1997). Green tea catechins such as (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin accelerate Cu<sup>2+</sup>-induced low-density lipoprotein oxidation in propagation phase. *FEBS Letters*, 401 (2-3), 230-234.
- [133] Ohmori, R., Iwamoto, T., Tago, M., Takeo, T., Unno, T., Itakura, H., Kondo, K. (2005). Antioxidant activity of various teas against free radicals and LDL oxidation. *Lipids*, 40 (8), 849-853.
- [134] Puhl, H., Waeg, G., Esterbauer, H. (1994). Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods in Enzymology*, 233, 425-444.
- [135] Esterbauer, H., Ramos, P. (1995). Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 127, 31-64.
- [136] Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.-L., Haroutounian, S.A. (2010). Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International* 43 (3), pp. 805-813.
- [137] Frei, B., Gaziano, J.M. (1993). Content of antioxidants, preformed lipid hydroperoxides, and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metal ion-dependent and -independent oxidation. *Journal of Lipid Research* 34 (12), 2135-2145.

- [138] **Vinson, J.A., Hao, Y., Su, X., Zubik, L.** (1998). Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (9), 3630-3634.
- [139] **Gunduc, N.; El, S. N.** (2003). Assessing antioxidant activities of phenolic compounds of common Turkish food and drinks on in vitro low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Food Science*, 68 (8), 2591-2595.
- [140] **Vinson, J.A., Hontz, B.A.** (1995). Phenol Antioxidant Index: Comparative Antioxidant Effectiveness of Red and White Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (2), 401-403.
- [141] **Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S.** (1985). Quantitative measurement of the total , peroxy radical - trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letters*, 187 (1), 33-7.
- [142] **Serafini, M., Maiani, G., Ferro-Luzzi, A.** (1997). Effect of Ethanol on Red Wine Tannin-Protein (BSA) Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (8), 3148-3151.
- [143] **Číž, M., Čížová, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A., Lojek, A.** (2010). Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, 21 (4), 518-523.
- [144] **Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G.** (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14 (3), 303-311.
- [145] **Lizcano, L.J., Bakkali, F., Begoña Ruiz-Larrea, M., Ignacio Ruiz-Sanz, J.** (2010). Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chemistry*, 119 (4), 1566-1570.
- [146] **Rivero-Pérez, M.D., González-Sanjosé, M.L., Ortega-Herás, M., Muñiz, P.** (2008). Antioxidant potential of single-variety red wines aged in the barrel and in the bottle. *Food Chemistry*, 111 (4), 957-964.
- [147] **Cerezo, A.B., Espartero, J.L., Winterhalter, P., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M.** (2009). (+)-Dihydrorobinetin: A marker of vinegar aging in acacia (*Robinia pseudoacacia*) wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (20), 9551-9554.
- [148] **Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L.** (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10), 4619-4626.
- [149] **Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A.** (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84 (4), 407-412.
- [150] **Almajano, M.P., Carbó, R., Jiménez, J.A.L., Gordon, M.H.** (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108 (1), 55-63.

- [151] Miller, N.J., Rice-Evans, C.A. (1996). Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 2 (3), 161-171.
- [152] Pellegrini, N., Re, R., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology*, 299, 379-389.
- [153] Breksa III, A.P., Manners, G.D. (2006). Evaluation of the Antioxidant Capacity of Limonin, Nomilin, and Limonin Glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (11), 3827-3831.
- [154] Hoener, K.; Cervellati, R. (2005). Evaluation of antioxidant activity of spirits using two different free radical scavenging testing methods. *Italian Journal of Food Science*, 17(4), 395-406
- [155] Lugasi, A. & Hóvári, J. (2003). Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahrung-Food*. 47 (2), 79-86.
- [156] Goldberg, D.M., Hoffman, B., Yang, J., Soleas, G.J. (1999). Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (10), 3978-3985.
- [157] Alonso, Á.M., Guillén, D.A., Barroso, C.G. (2003). Development of an electrochemical method for the determination of antioxidant activity. Application to grape-derived products. *European Food Research and Technology*. 216 (5), 445-448.
- [158] Palma & Barroso, (1998), Patente nacional P9601884.
- [159] Alonso, Á.M., Guillén, D.A., Barroso, C.G. (2002) Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (11), 3112-3115.
- [160] Alonso, Á.M., Castro, R., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Barroso, C.G. (2004). Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Research International*, 37 (7), 715-721.
- [161] Alonso, Á.M., Guillén, D.A., Barroso, C.G., Puertas, B., García, A. (2002). Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21), 5832-5836.
- [162] Porto, C.D., Calligaris, S., Celotti, E., Nicoli, M.C. (2000). Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH• test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (9), 4241-4245.
- [163] Vacca, V., Piga, A., Del Caro, A., Fenu, P.A.M., Agabbio, M. (2003). Changes in phenolic compounds, colour and antioxidant activity in industrial red myrtle liqueurs during storage. *Nahrung/Food*. 47 (6), 442-447.

- [164] **Arnous, A., Makris, D.P., Kefalas, P.** (2001). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (12), 5736-5742.
- [165] **Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A.** (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (10), 4581-4589.
- [166] **Milardović, S., Iveković, D., Grabarić, B.S.** (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry* 68 (2), 175-180.
- [167] **Oyaizu, M.** (1986). Studies of products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal Nutrition*, 44 (6), 307-315.
- [168] **Benzie I.F.F. & Strain, J.J.** 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239 (1), 70-76.
- [169] **Pulido, R., Hernández-García, M., Saura-Calixto, F.** (2003). Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57 (10), 1275-1282.
- [170] **Rodrigo, R., Castillo, R., Carrasco, R., Huerta, P., Moreno, M.** (2005). Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the in vitro antioxidant capacity of wine. *Life Sciences*, 76 (8), 889-900.
- [171] **Katalinić, V., Milos, M., Modun, D., Musić, I., Boban, M.** (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry*, 86 (4), 593-600.
- [172] **Mudnic, I., Modun, D., Rastija, V., Vukovic, J., Brizic, I., Katalinic, V., Kozina, B., Medic-Saric, M., Boban, M.** (2009). Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry*, 119 (3), 1205-1210.
- [173] **Trevithick, C.C., Chartrand, M.M., Wahlman, J., Rahman, F., Hirst, M., Trevithick, J.R.** (1999). Shaken, not stirred: bioanalytical study of the antioxidant activities of martinis. *British Medical Journal*, 319 (7225), 1600-1602.
- [174] **Girotti, S., Ferri, E., Fini, F., Bolelli, L., Sabatini, A.G., Budini, R., Sichertova, D.** (2004). Automated and manual luminescent assay of antioxidant capacity: analytical features by comparison. *Talanta*, 64 (3), 665-670.
- [175] **Kilmartin, P.A., Zou, H., Waterhouse, A.L.** (2001). A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (4), 1957-1965.
- [176] **Roginsky, V., De Beer, D., Harbertson, J.F., Kilmartin, P.A., Barsukova, T., Adams, D.O.** (2006). The antioxidant activity of Californian Red wines does not correlate with age. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86 (5), 834-840.

- [177] Mannino, S., Brenna, O., Buratti, S., Cosio, M.S. (1998). A new method for the evaluation of the antioxidant power of wines. *Electroanalysis*, 10 (13), 908-912.
- [178] Brenna, O.V., Pagliarini, E. (2001). Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10), 4841-4844.
- [179] Ukeda, H., Adachi, Y., Sawamura, M. (2002). Flow injection analysis of DPPH radical based on electron spin resonance. *Talanta*, 58 (6), 1279-1283.
- [180] Wasek, Marek; Gierczyk, Jerzy; Wawer, Iwona. (2001). Electron spin resonance assessment of the antioxidant potential of fruit juices and wines. *Molecular Physics Reports*, 33(Nuclear Magnetic Resonance and Its Applications), 152-154.
- [181] Polovka, M. (2006). EPR spectroscopy: a tool to characterize stability and antioxidant properties of foods. *Journal of Food and Nutrition Research* 45(1), 1-11.
- [182] Burns, J., Gardner, P.T., Matthews, D., Duthie, G.G., Lean, M.E.J., Crozier, A. (2001). Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during Vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (12), 5797-5808.
- [183] Ito Y., Bowman R.L. (1970). Countercurrent chromatography: Liquid-liquid partition chromatography without solid support. *Science*, 167 (3916), 281-283.
- [184] Ito, Y. (1987). High-speed countercurrent chromatography. *Nature*, 326 (6111), 419-420.
- [185] Ito, Y., Sandlin, J., Bowers, W.G. (1982). High-speed preparative counter-current chromatography with a coil planet centrifuge. *Journal of Chromatography A*, 244 (2), 247-258.
- [186] Ito, Y. (2005). Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1065 (2), 145-168.
- [187] Hillebrand, S., Schwarz, M., Winterhalter, P. (2004). Characterization of anthocyanins and pyranoanthocyanins from blood orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (24), 7331-7338.
- [188] Eichhorn S., Winterhalter P. (2005). Anthocyanins from pigmented potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Food Research International*, 38 (8-9), 943-948.
- [189] Hillebrand, S., Montilla, E.C., Köhler, N., Winterhalter, P. (2009) Cyanidin-based anthocyanins from fruits and vegetables: Large-scale isolation by countercurrent chromatography *Agro Food Industry Hi-Tech*, 20 (4), 52-55.
- [190] Qiu F., Luo J., Yao S., Ma L., Kong L. (2009). Preparative isolation and purification of anthocyanins from purple sweet potato by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Separation Science*, 32 (12), 2146-2151.
- [191] Aman R., Carle R., Conrad J., Beifuss U., Schieber A. (2005). Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1074 (1-2), 99-105.

- [192] **Baldermann S., Ropeter K., Kohler N., Fleischmann P.** (2008). Isolation of all-trans lycopene by high-speed counter-current chromatography using a temperature-controlled solvent system. *Journal of Chromatography A*, 1192 (1), 191-193.
- [193] **Baldermann S., Reinhard A., Kohler N., Fleischmann P.** (2007). Application of high-speed counter-current chromatography for the isolation of 9'-cis-neoxanthin from fresh spinach. *Journal of Chromatography A*, 1151 (1-2), 183-186.
- [194] **Jerz G., Skotzki T., Fiege K., Winterhalter P., Wybraniec S.** (2008). Separation of betalains from berries of *Phytolacca americana* by ion-pair high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1190 (1-2), 63-73.
- [195] **Kohler N., Wray V., Winterhalter P.** (2008). Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracts by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1177 (1), 114-125.
- [196] **Salas E., Duenas M., Schwarz M., Winterhalter P., Cheynier V., Fulcrand H.** (2005). Characterization of pigments from different high speed countercurrent chromatography wine fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (11), 4536-4546.
- [197] **Degenhardt A., Hofmann S., Knapp H., Winterhalter P.** (2000). Preparative isolation of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and application of the color activity concept to red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (12), 5812-5818.
- [198] **Noguer M., Cerezo A.B., Rentzsch M., Winterhalter P., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C.** (2008). Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (19), 8879-8884.
- [199] **Baderschneider B., Winterhalter P.** (2001). Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (6), 2788-2798.
- [200] **Baderschneider B., Winterhalter P.** (2000). Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (7), 2681-2686.

# **OPTIMIZACION DE LA METODOLOGIA**





**3. DESARROLLO DE UN METODO DE  
ANALISIS DE POLIFENOLES EN  
BRANDY DE JEREZ MEDIANTE UPLC**



### 3.1. INTRODUCCION

El Brandy de Jerez se somete a envejecimiento en la etapa final de su elaboración. A esta etapa de envejecimiento debe el Brandy de Jerez, gran parte de su contenido polifenólico [1-5]. La influencia de los polifenoles en el aroma y el flavor del Brandy han sido estudiados por muchos autores [6,7].

Debido a los numerosos fraudes que existen actualmente en la industria alimentaria, ésta necesita de profesionales y metodología que permitan garantizar la autenticidad del producto. Por tanto, la caracterización de Brandy de Jerez, está adquiriendo un considerable interés comercial, ya que dicha caracterización nos permitiría diferenciar analíticamente un producto en concreto de otros similares existentes en el mercado, consiguiendo así, proteger su autenticidad [8].

Además, es de sobra conocido que los compuestos antioxidantes juegan un papel fundamental en la salud, previniendo diversas enfermedades, gracias a su capacidad de capturar, desactivar o reparar el daño producido por radicales libres implicados en diferentes enfermedades. Esta actividad protectora de muchos alimentos debida a su capacidad antioxidante, ha sido atribuida a su contenido polifenólico [9,10]. Por todas estas razones, el análisis de polifenoles en Brandy de Jerez, está siendo considerado de una gran importancia.

Son diversos los métodos descritos para la determinación de compuestos polifenólicos. Panosyan y col. [11] propone un nuevo método usando *High Performance capillary electrophoresis* (HPCE). Sin embargo hasta el momento, ha sido la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la principal herramienta usada en el análisis de polifenoles en bebidas espirituosas.

La cromatografía líquida de ultra-alta resolución, *Ultra-performance liquid chromatography* (UPLC), es una evolución de la HPLC que usa fases estacionarias , con un tamaño de partícula  $1.7\mu$  y esto unido a un equipo instrumental que permite trabajar a presiones mucho más elevada que las convencionales [15-19], se muestra como una mejora en el análisis cromatográfico. En comparación con el tradicional HPLC, el UPLC ofrece muchas ventajas, entre las que se encuentran fundamentalmente una reducción del tiempo de análisis, una mejora en la resolución,

obteniéndose picos más estrechos y separados y una reducción en el consumo de disolventes [20-22].

En el presente capítulo se muestra los estudios tendentes a optimizar un nuevo método para el análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular y derivados furánicos en Brandy de Jerez mediante UPLC para así tener un método más rápido y reproducible que el que se venía utilizando en nuestro Grupo de Investigación. Los compuestos polifenólicos estudiados fueron los siguientes: ácido gálico, ácido protocatéuico, protocatequialdehído, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido vainílico, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido siríngico, vainillina, ácido *p*-cumárico y siringialdehído, y los derivados furánicos: 5-hidroximetilfurfural, furfural y metilfurfural. El método del UPLC fue desarrollado a partir del que previamente habíamos desarrollado para Brandy de Jerez usando HPLC [14].

## **3.2. MATERIALES Y METODOS**

### **3.2.1. Reactivos y disolventes**

Tanto el Acetonitrilo como el Metanol utilizados fueron de grado de pureza HPLC de Panreac (Barcelona, España) y el ácido acético de Merk (Darmstadt, Alemania). El agua mili-Q, fue obtenido usando un sistema de Millipore (Bedford, MA, USA). Los patrones utilizados fueron de Fluka (Buchs, Suiza) y Sigma (St. Louis, MO, USA). Para las curvas de calibrado, los patrones fueron disueltos en etanol (40% v/v) y agua miliQ, formando una matriz sintética, similar a la de Brandy. Las rectas de calibrado se construyeron con siete niveles y estos fueron analizados por triplicado.

### **3.2.2. Muestras**

La optimización y puesta a punto del gradiente de elución se realizó con una disolución de etanol al 40% de los 14 patrones estudiados.

Se aplicó el método validado a un conjunto de 33 muestras representativas de los tres tipos de Brandy de Jerez: Solera (S, envejecido en botas de roble en sistema de soler a y criadera durante 6 meses), Solera Reserva (SR, envejecido durante mínimo 1 año) y Solera Gran Reserva (SGR, envejecidos por un mínimo de 3 años), perteneciendo 11 a cada grupo. Estas

muestras de brandies fueron suministradas por el Consejo Regulador de la Denominación Específica de Brandy de Jerez.

### 3.2.3. Análisis mediante HPLC

Los análisis realizados mediante HPLC, fueron realizados por un sistema de Waters (Milford, MA, USA) consistente en dos bombas, una modelo 616 y la otra modelo 510, un inyector automático de muestras modelo 717 y un detector ultravioleta visible, de matriz de fotodiodos, modelo 996. La separación de los compuestos fenólicos fue llevada a cabo con una columna LiChrospher RP-C18 (Merck) de dimensiones 250x4mm de diámetro interno, y un tamaño de partícula de 5 $\mu$ m. Las condiciones cromatográficas para los Brandies fueron las siguientes: 1mL min<sup>-1</sup> de caudal de flujo, 50mL de volumen de inyección y los eluyentes fueron el A: (5% metanol, 2% ácido acético, 93% agua) y B (90% metanol, 2% ácido acético y 8% agua). El gradiente fue el siguiente: a los 0 minutos 100% A, 20 minutos 90% A y a los 60 minutos 25% A. La columna fue reequilibrada antes de cada análisis. Todas las muestras, antes de su análisis fueron filtradas a través de membranas de 22 $\mu$ m de tamaño de poro (Millipore).

### 3.2.4. Análisis mediante UPLC

Estos análisis fueron realizados en un sistema Acquity UPLC de Waters acoplado a un detector de ultravioleta-visible de matriz de fotodiodos. El método finalmente optimizado, se muestra a continuación. La columna utilizada para la separación de compuestos fue una Acquity UPLC BEH C18, de dimensiones 100x2.1 mm de diámetro interno, con 1.7  $\mu$ m de tamaño de partícula (Waters). La temperatura de la columna se mantuvo a una temperatura constante de 47°C. Los disolventes fueron los siguientes: disolvente A (3% acetonitrilo, 2% ácido acético y 95% agua miliQ) y el disolvente B (85% acetonitrilo, 2% ácido acético y 13% agua), con un flujo de 0.7 mL min<sup>-1</sup>, dando un máximo de presión de 10400 psi, el cual está dentro de las capacidades del UPLC. El volumen de inyección fue de 2.5 $\mu$ l. El gradiente a lo largo de 6.5 minutos fue el siguiente: 0 min 100% A, a los 3 min 90% A, a los 4 min 90% A, y a los 6.5 min 25% A. Finalmente la columna entre análisis fue lavada con 100% B durante 3 minutos y equilibrada con 100% A durante otros tres minutos. Todas las muestras fueron filtradas por membranas de tamaño de poro 0.22  $\mu$ m antes de analizarlas.

La identificación de cada compuesto fue llevada a cabo comparando el tiempo de retención y su espectro en el ultravioleta-visible de los brandies, con aquellos que habían sido previamente obtenidos mediante el análisis de los patrones.

### **3.2.5. Tratamiento estadístico**

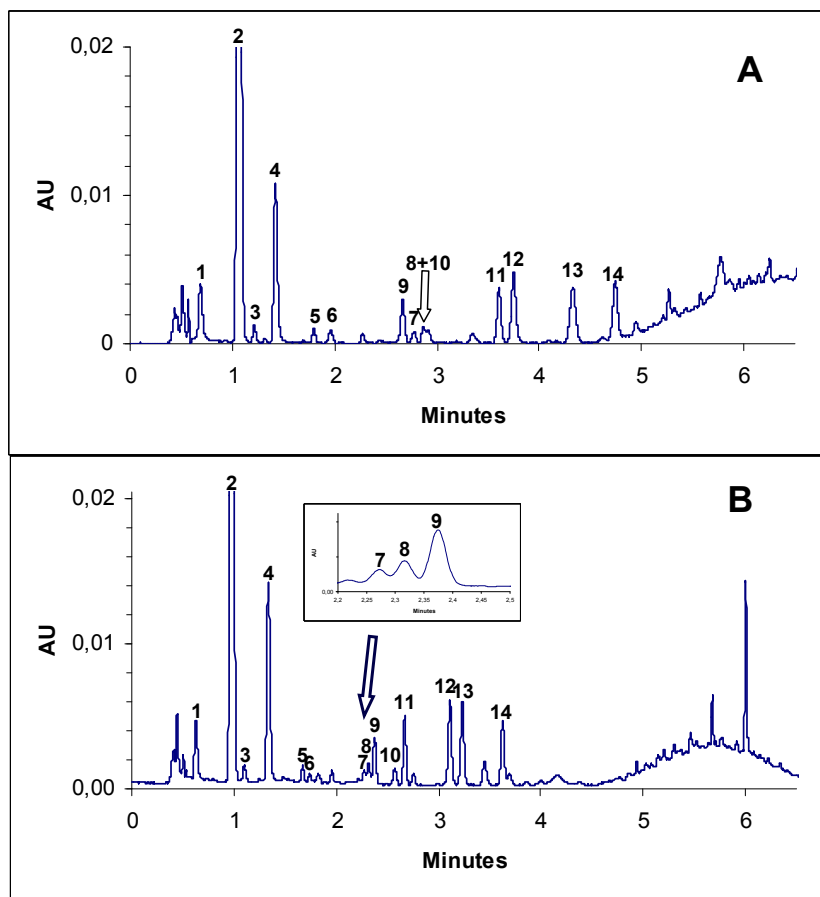
Inicialmente, se les realizó ANOVA de un factor para cada uno de los compuestos con la finalidad de determinar diferencias significativas entre los tres grupos de muestras. Para estudiar la diferenciación de los tres grupos de muestras en función de su envejecimiento se empleó un estudio de análisis de componentes principales. Por último, para obtener las funciones que nos permitieran clasificar a una muestra desconocida en uno de los tres grupos comerciales estudiados, se le aplicó al conjunto de muestras un análisis lineal discriminante (LDA). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa Statistica 7.0 (Tulsa, Oklahoma, USA).

## **3.3. RESULTADOS**

### **3.3.1. Optimización de las condiciones del UPLC**

Lo primero que se hizo fue probar dos diferentes columnas, las dos Acquity UPLC BEH de Waters, una de dimensiones 50x2.1mm con un tamaño de partícula 1.7 $\mu$ m y la otra de dimensiones 100x2.1 mm con el mismo tamaño de partícula que la anterior. La columna más corta resultó ser insuficiente para obtener una buena separación cromatográfica.

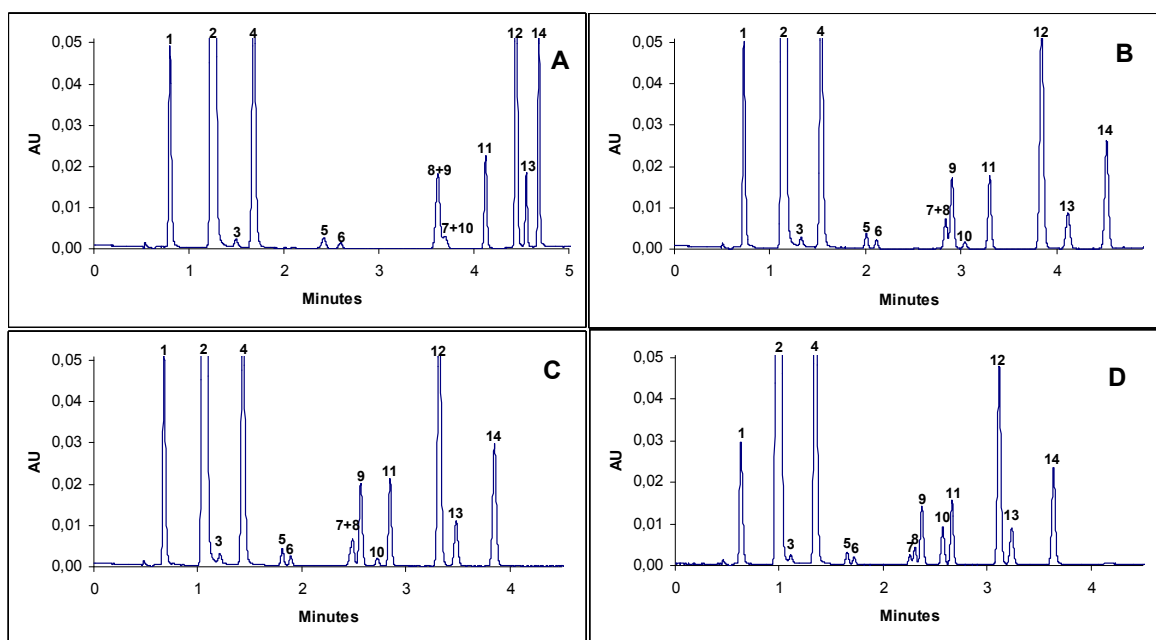
Para obtener una mejor resolución, se probó con Acetonitrilo en vez de con metanol, que era lo que se utilizaba en los disolventes en el método optimizado para el HPLC. Los resultados mostraron que el Acetonitrilo resultó ser más beneficioso para la separación que el metanol, obteniendo en el cromatograma con acetonitrilo un mayor número de picos resueltos que el cromatograma obtenido con metanol (figura 1), por lo que se decidió utilizar Acetonitrilo en lugar de Metanol.



**Figura 1:** Cromatograma A modificador orgánico metanol, y el cromatograma B, modificador orgánico acetonitrilo. Identificación de los picos: 1: ácido gálico, 2: 5-hydroximetilfurfural, 3: ácido protocatéuico, 4: furfural, 5: protocatequialdehído, 6: ácido *p*-hydroxibenzoico, 7: ácido cafeico, 8: ácido vainilico, 9: *p*-hidroxibenzaldehído, 10: metilfurfural, 11: ácido siríngico, 12: Vainillina, 13: ácido *p*-cumárico y 14: siringialdehído.

Para la optimización del gradiente, el punto de partida fue el método previamente desarrollado por nuestro grupo de investigación [14], con la ayuda del software Acquity UPLC performance calculation de Waters. Fue necesario realizar algunos cambios al gradiente, así como aumentar la temperatura de la columna para mejorar la separación y conseguir una mejor resolución. Diferentes temperaturas entre 15 y 50° C fueron ensayadas, consiguiendo la mejor separación para los 14 compuestos a 47°C (Figura 2).





**Figura 2:** Mezcla de patrones obtenidos con diferentes gradientes y temperaturas de columna: A: 0 min. 100% A, 3min. 95% A (linear), 3.5 min 90% A (linear), 6.5 min. 25% A (linear); temperatura de columna: 35°; B,C and D: 0 min. 100% A, 3min. 90% A (linear), 4min. 90% A, 6.5 min. 25% A (linear) con 40°, 44° y 47° como temperatura de columna respectivamente. D fue el método elegido. La longitud de onda fue de 280nm. Las claves 1-14 son las mismas que la Figura 1.

Se calculó el tiempo de retención ( $t_r$ ), el factor de retención ( $k$ ), y el factor de separación ( $\alpha$ ) de cada compuesto bajo las condiciones de HPLC y del UPLC, tal y como se puede observar en la tabla 1. En términos generales, ambos métodos presentaron una buena resolución y factor de separación.

Compuestos	Solución estándar (mg L <sup>-1</sup> )	$t_r$		$K$		$\alpha$		$R_s$	
		UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC
ÁcidoGálico	1.851	0.637	6.10	0.498	1.85	-	-	-	-
5-OHmetilfurfural	11.78	1.000	8.90	1.353	2.30	2.715	1.658	9.1	2.6
ÁcidoProtocatéquico	0.187	1.120	11.91	1.636	3.81	1.201	1.426	1.9	3.1
Furfural	1.663	1.359	15.64	2.198	5.44	1.343	1.371	6.8	4.9
Protocatequialdehído	0.086	1.668	16.95	2.924	7.45	1.330	1.094	8.8	1.9
Ácido <p>-OHbenzoico</p>	0.164	1.736	20.31	3.084	8.16	1.054	1.222	2.2	5.3
Ácidocafeico	0.101	2.273	31.00	4.348	15.76	1.409	1.041	15.3	2.1
ÁcidoVainílico	0.302	2.321	29.84	4.461	15.13	1.026	1.144	1.4	7.8
<i>p</i> -OHbenzaldehído	0.147	2.389	26.31	4.621	13.22	1.035	1.325	2.7	13.3
Metilfurfural	0.205	2.591	32.02	5.096	16.31	1.102	1.034	5.7	1.8
ÁcidoSiringico	0.705	2.678	37.50	5.300	19.27	1.040	1.181	2.4	10.9
Vainillina	1.774	3.134	38.75	6.374	19.95	1.202	1.035	11.4	2.7
Ácido <p>-cumárico</p>	0.288	3.253	46.16	6.655	23.95	1.044	1.025	2.9	4.4
Siringialdehído	1.774	3.655	45.04	7.601	23.35	1.1421	1.171	10.1	13.9

**Tabla 1:** Parámetros cromatográficos para ambos métodos (HPLC y UPLC)

Se comprobó que no hubiera efecto matriz mediante el método de las adiciones estándar. El efecto matriz es el cambio en la pendiente de la curva de calibrado, o alteración de la sensibilidad, producida por la matriz. El efecto es debido a la particular forma química en que se

encuentra el analito en la muestra, y también, a su entorno químico-físico, esto es, a la presencia de componentes de la muestra que interaccionan con el analito. Los estándares de calibración se preparan por adición de disoluciones de estándar a la misma muestra. Se busca comparar la pendiente de la recta de calibrado obtenida usando soluciones estándar con la obtenida por medio del método de adiciones estándar. Mediante el tratamiento estadístico de los datos se determina con un cierto nivel de confianza si existe diferencia significativa entre las pendientes [23]. Los resultados mostraron ausencia de efecto matriz.

### 3.3.2. Validación del método desarrollado

La validación del método se llevó a cabo de acuerdo a los siguientes parámetros: límite de detección y cuantificación, sensibilidad analítica, precisión y exactitud. La sensibilidad analítica, los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ respectivamente) fueron calculados usando el software ALAMIN [24-26]. Estos parámetros fueron calculados para cada compuesto a partir de las curvas de calibrado, usando el método desarrollado del UPLC (Tabla 2).

Compuestos	$\lambda$ (nm)	Rango (mg L <sup>-1</sup> )	Ecuaciones de regresión	R <sup>2</sup>	AS	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )
Ácido Gálico	271	0.018-18.57	Y=6427.8x + 1024.5	0.999	0.163	0.178	0.574
5-OHmetilfurfural	283.5	1.178-117.81	Y=18541 x+6435.9	0.999	0.592	0.399	1.391
Ácido Protocatéquico	280	0.093-3.74	Y= 3830x +3.725	0.998	0.071	0.049	0.164
Furfural	276.5	0.131-13.17	Y=20723x +1036.4	0.999	0.105	0.094	0.313
Protocatequialdehido	280	0.043-0.86	Y=10855x+50.47	0.999	0.016	0.011	0.033
Ácido p-OHbenzoico	255	0.082-1.64	Y=15546x+42.256	1.000	0.009	0.009	0.031
Ácido cafeico	324	0.051-1.08	Y=12984x+113.21	0.998	0.015	0.011	0.049
Ácido Vainillico	261	0.15-3.02	Y= 10272x +136.2	0.999	0.019	0.017	0.057
p-OHbenzaldehido	283.5	0.029-2.95	Y=16907x + 429.41	0.999	0.021	0.019	0.062
Metilfurfural	292	0.10-1.64	Y=20651x+283.79	0.999	0.012	0.012	0.041
Ácido Siringico	274.3	0.07-7.05	Y=7527.6x +129.72	0.999	0.031	0.049	0.166
Vainillina	310	0.17-17.19	Y=9137x+457.79	0.999	0.076	0.056	0.189
Ácido p-cumárico	310	0.02-2.88	Y= 18733x+140.82	0.999	0.019	0.017	0.058
Siringialdehido	308	0.177-17.74	Y=9954.3x +523.83	0.999	0.071	0.067	0.225

**Tabla 2:** Datos de calibración de los 14 polifenoles investigados obtenidos con el método propuesto.

La precisión del método fue evaluada mediante la desviación estándar de las medidas repetidas de una muestra de brandy. Tanto la repetibilidad intra-día como la repetibilidad inter-día de cada compuesto fue calculada atendiendo a dos parámetros: repetibilidad en el tiempo de retención y la repetibilidad en el área de pico. Para la repetibilidad intra-día, las muestras de brandy fueron analizadas por quintuplicado durante un día mientras que para el cálculo de la repetibilidad inter-día, los brandies fueron analizados, también, por quintuplicado durante tres días consecutivos. La recuperación se determinó para evaluar la exactitud del método, y fue calculada por comparación con los resultados obtenidos en los análisis de las muestras de adición de estándar

para tres niveles de concentración. Los resultados de precisión y recuperación se encuentran en la tabla 3.

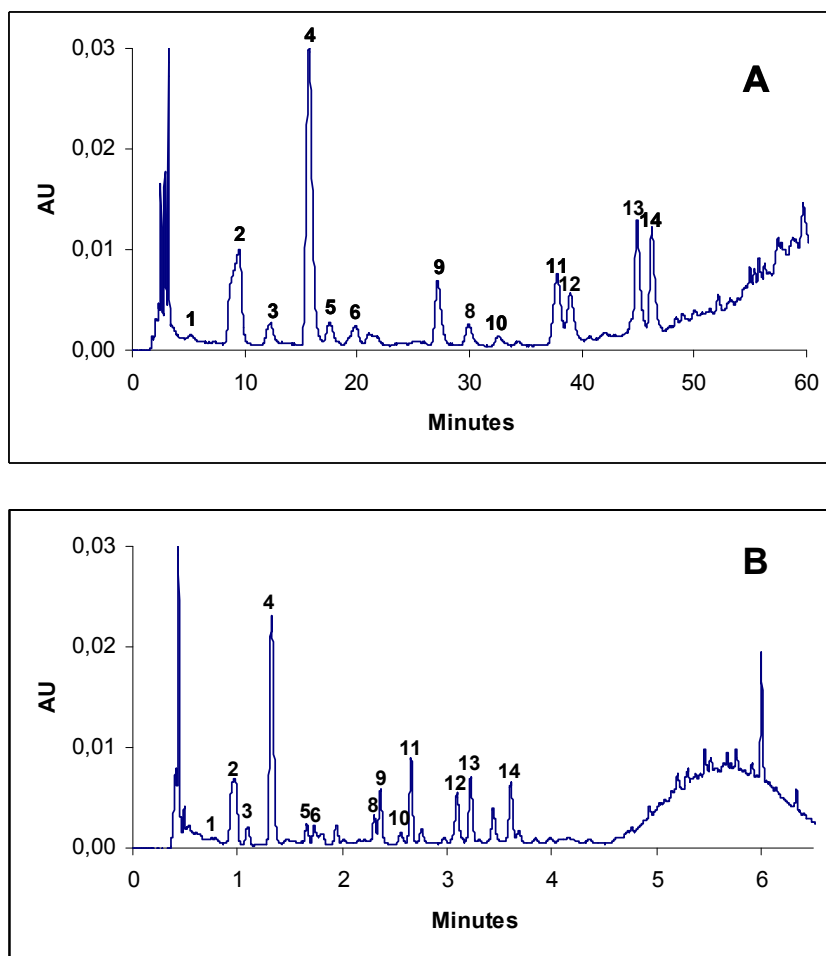
Compuestos	Intra day n=5		Inter day n=15		Recuperación
	t <sub>R</sub> ±SD	Area ±SD	t <sub>R</sub> ±SD	Area ±SD	Media <sup>a</sup> ±SD
Ácido Gálico	0.637 ± 0.001	4852 ± 136.99	0.631 ± 0.003	4826 ± 300.98	97.31 ± 0.01
5-OHmetilfurfural	0.996 ± 0.001	71321 ± 3426.1	0.981 ± 0.004	71245 ± 2877.1	98.99 ± 0.004
Ácido Protocatéquico	1.120 ± 0.002	2171 ± 95.89	1.105 ± 0.006	2161 ± 108.1	103.18 ± 2.51
Furfural	1.354 ± 0.002	14507 ± 236.04	1.336 ± 0.003	13962 ± 461.5	97.86 ± 0.205
Protocatequialdehído	1.668 ± 0.001	1675 ± 83.8	1.657 ± 0.015	1601 ± 79.3	97.87 ± 1.022
Ácido <i>p</i> -OHbenzoico	1.736 ± 0.004	948 ± 28.28	1.727 ± 0.014	1009 ± 62.3	95.31 ± 1.004
Ácido cafeico	2.277 ± 0.005	1576 ± 106.3	2.261 ± 0.013	1640 ± 114.1	98.39 ± 0.015
Ácido Vainílico	2.321 ± 0.005	2236 ± 113.1	2.311 ± 0.013	2257 ± 108.5	98.31 ± 0.008
<i>p</i> -OHbenzaldehído	2.379 ± 0.003	4445 ± 151.47	2.369 ± 0.013	4333 ± 168.3	98.83 ± 0.007
Metilfurfural	2.579 ± 0.005	1167 ± 122.1	2.568 ± 0.014	1097 ± 96.8	98.57 ± 0.009
Ácido Siringico	2.678 ± 0.004	6723 ± 119.21	2.658 ± 0.013	6523 ± 162.8	96.99 ± 0.004
Vainillina	3.134 ± 0.003	5013 ± 124.3	3.147 ± 0.009	4806 ± 282.9	98.14 ± 0.029
Ácido <i>p</i> -cumárico	3.253 ± 0.003	11867 ± 265.2	3.239 ± 0.007	11762 ± 302.3	97.08 ± 0.005
Siringialdehído	3.655 ± 0.003	6190 ± 48.5	3.655 ± 0.007	6048 ± 229.38	97.64 ± 0.345

Tabla 3: Repetibilidad inter e intra day

### 3.3.3. Comparación entre el método de análisis mediante HPLC y UPLC

Comparando los datos y los cromatogramas obtenidos de los análisis mediante HPLC y UPLC, las ventajas del método del UPLC serían las siguientes:

- El tiempo de análisis con el UPLC (6.5min), es casi 10 veces menor que el necesario para realizar el mismo análisis mediante HPLC (figura 3)
- El hecho de que el tiempo de análisis sea más corto, junto con el hecho de que el flujo fue algo menor que con el HPLC (0.7mL min<sup>-1</sup>); hizo que el consumo de disolvente en el UPLC fuera menor, 4.55 ml por análisis frente a la cantidad necesaria para el método HPLC que era de 60 ml.
- El volumen de inyección de muestra es considerablemente menor en el UPLC que en el HPLC (2.5 µL microlitros frente a 50 µL).



**Figura 3:** Comparación de un mismo Brandy mediante HPLC (A) y UPLC (B)  
Claves igual que en la figura 1.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 4, 11 de los 14 compuestos presentaron un LOD más bajo en UPLC que en HPLC, siendo para dos de ellos prácticamente igual (*p*-hidroxibenzaldehído y vainillina); es decir, tan sólo para un compuesto: el hidroximetilfurfural, el límite de detección fue considerablemente mayor con el UPLC que con el HPLC. El comportamiento en cuanto al límite de cuantificación se refiere, fue similar.

En relación a la repetibilidad, RSD en términos de tiempo de retención (inter e intra day) fue mejor en UPLC que en HPLC. Para RSD en términos de área, se puede decir lo mismo para ocho de los compuestos bajo estudio.

Por tanto, teniendo en cuenta estos datos, podemos confirmar que el método presentado para UPLC, es suficientemente selectivo y sensible para ser aplicado al brandy, suponiendo una mejora en la productividad al necesitarse un tiempo considerablemente menor (60 min frente a 6.5 min) así como un considerable ahorro de disolvente y en consecuencia una reducción de residuos.

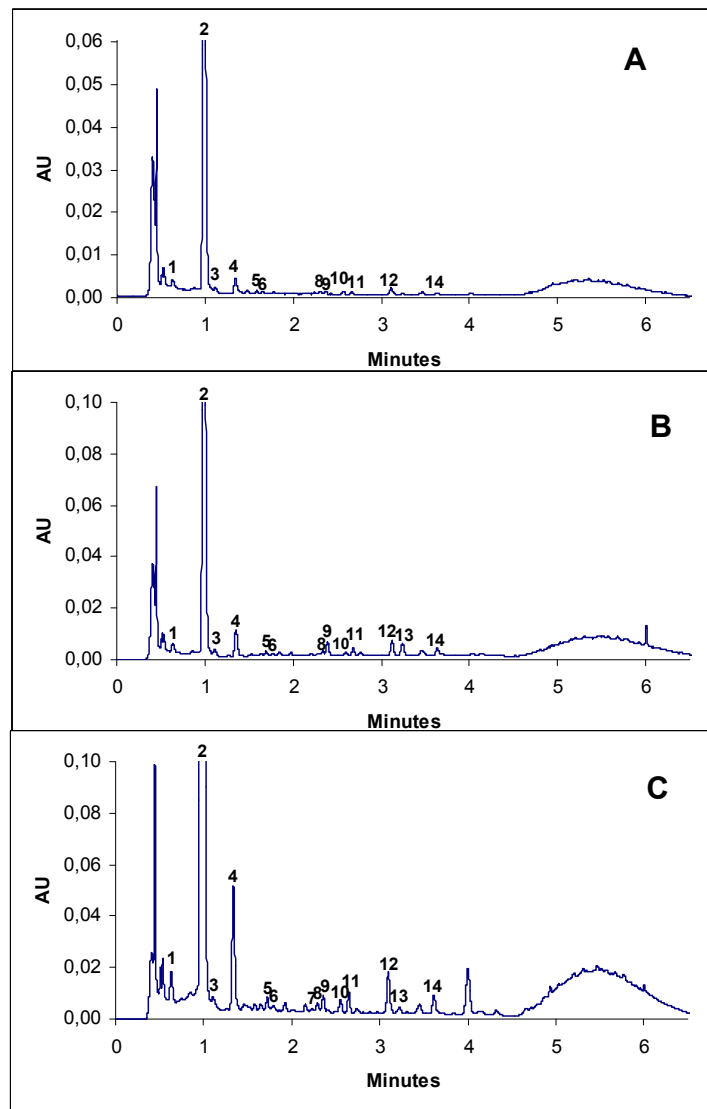
Compuestos	LOD (mg L <sup>-1</sup> )		LOQ (mg L <sup>-1</sup> )		AS		t <sub>R</sub> RSD % (intra day)		t <sub>R</sub> RSD % (inter day)		Area RSD % (intra day)		Area RSD % (inter day)	
	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
Ácido Gálico	0.754	0.178	2.514	0.571	0.254	0.163	0.1	0.2	2.5	0.6	4.8	3.1	5.7	6.2
5-OHmetilfurfural	0.158	0.399	0.526	1.811	0.053	0.592	0.1	0.1	1.2	0.4	3.3	4.8	4.1	3.9
Ácido Protocatequico	0.065	0.049	0.216	0.164	0.029	0.071	0.5	0.2	2.7	0.5	6.2	4.7	7.7	4.4
Furfural	0.197	0.094	0.657	0.313	0.066	0.105	0.3	0.1	0.9	0.3	1.6	1.6	3.6	3.3
Protocatequialdehido	0.023	0.011	0.077	0.033	0.019	0.016	0.3	0.1	2.5	0.9	5.2	4.4	8.1	4.9
Ácido <i>p</i> -OHbenzoico	0.048	0.009	0.163	0.031	0.021	0.009	0.2	0.2	1.3	0.8	4.6	4.8	7.5	6.1
Ácido cafeico	0.028	0.011	0.094	0.049	0.095	0.015	0.3	0.2	1.9	0.6	5.4	6.4	7.6	6.9
Ácido Vainílico	0.019	0.017	0.044	0.058	0.063	0.019	0.3	0.2	1.6	0.6	5.5	5.1	3.6	4.8
<i>p</i> -OHbenzaldehido	0.013	0.019	0.067	0.064	0.045	0.021	0.3	0.1	1.5	0.4	7.5	3.4	7.7	3.8
Metilfurfural	0.153	0.012	0.509	0.041	0.085	0.012	0.3	0.1	0.7	0.4	5.1	7.1	6.2	8.8
Ácido Siríngico	0.093	0.049	0.311	0.163	0.035	0.031	0.3	0.1	1.2	0.5	2.1	1.7	2.3	2.4
Vainillina	0.055	0.056	0.183	0.232	0.018	0.076	0.3	0.1	0.9	0.3	5.6	3.9	5.5	5.8
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.028	0.017	0.092	0.058	0.093	0.019	0.4	0.1	0.2	0.2	1.1	2.2	1.3	2.5
Siringialdehido	0.133	0.067	0.443	0.225	0.049	0.071	0.3	0.08	0.7	0.2	1.4	0.7	8.1	3.7

**Tabla 4.** Comparación entre HPLC y UPLC

### 3.3.4. Aplicación del método desarrollado a muestras reales

Para la validación del método, se consideró necesaria la aplicación a un número representativo de muestras de Brandy. Así se analizaron un total de 33 muestras comerciales, 11 Brandy Solera, 11 Brandy Solera Reserva y otros 11 Brandy Solera Gran Reserva.

Los cromatogramas tipo de un Brandy Solera, Solera Reserva, y Solera Gran Reserva se muestran en la figura 4.



**Figura 4:** Cromatogramas tipo de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva

Tal y como era de esperar, las mayores concentraciones de polifenoles se encuentran en los brandies que han sido envejecidos un mayor tiempo, los Solera Gran Reserva. Esto es lógico ya que es de sobra conocida la relación de los polifenoles con el envejecimiento en madera [2-5].

3. Análisis de compuestos polifenólicos en Brandy de Jerez mediante UPLC

Compuestos	S1 (mg L <sup>-1</sup> )	S2 (mg L <sup>-1</sup> )	S3 (mg L <sup>-1</sup> )	S4 (mg L <sup>-1</sup> )	S5 (mg L <sup>-1</sup> )	S6 (mg L <sup>-1</sup> )	S7 (mg L <sup>-1</sup> )	S8 (mg L <sup>-1</sup> )	S9 (mg L <sup>-1</sup> )	S10 (mg L <sup>-1</sup> )	S11 (mg L <sup>-1</sup> )
Ácido Gálico	1.747	1.118	5.412	N.D	N.D	N.D	2.582	0.774	0.744	N.D	N.D
5-OHmetilfurfural	13.482	32.266	48.211	13.824	12.184	12.095	41.173	17.54	13.946	12.24	6.907
Ácido Protocatéuico	0.761	N.D	N.D	0.404	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.365	N.D
Furfural	0.317	0.468	0.375	1.826	0.523	0.629	0.865	N.D	1.326	0.427	0.335
Protocatequialdehido	0.131	N.D	N.D	0.131	N.D	N.D	N.D	0.132	N.D	0.251	N.D
Ácido <i>p</i> -OHbenzoico	N.D	N.D	N.D	0.167	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Ácido cafeico	0.077	N.D	N.D	0.187	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Ácido Vainílico	0.261	N.D	N.D	0.341	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
<i>p</i> -OHbenzaldehido	0.067	N.D	N.D	0.319	N.D	0.105	0.101	N.D	0.108	0.103	N.D
Metilfurfural	0.093	0.068	0.062	0.165	N.D	0.206	N.D	N.D	N.D	0.215	N.D
Ácido Siringico	0.138	0.173	N.D	0.721	N.D	0.272	N.D	N.D	N.D	0.355	N.D
Vainillina	0.271	0.129	N.D	1.391	0.365	0.688	N.D	0.468	2.708	N.D	0.673
Ácido <i>p</i> -cumárico	N.D	N.D	N.D	0.519	N.D	0.033	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Siringialdehido	0.192	N.D	N.D	1.176	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

5a

Compuestos	SR1 (mg L <sup>-1</sup> )	SR2 (mg L <sup>-1</sup> )	SR3 (mg L <sup>-1</sup> )	SR4 (mg L <sup>-1</sup> )	SR5 (mg L <sup>-1</sup> )	SR6 (mg L <sup>-1</sup> )	SR7 (mg L <sup>-1</sup> )	SR8 (mg L <sup>-1</sup> )	SR9 (mg L <sup>-1</sup> )	SR10 (mg L <sup>-1</sup> )	SR11 (mg L <sup>-1</sup> )
Ácido Gálico	1.508	1.169	1.47	0.689	3.823	1.918	0.689	0.858	0.973	1.811	3.226
5-OHmetilfurfural	25.481	5.733	28.24	12.941	18.665	38.805	2.544	13.309	6.464	12.548	19.519
Ácido Protocatéuico	1.397	0.493	N.D	0.352	1.355	2.218	0.511	N.D	0.323	0.531	0.641
Furfural	1.071	1.426	0.31	1.171	4.021	5.035	3.772	0.986	2.796	1.612	1.332
Protocatequialdehido	0.231	0.063	N.D	0.065	0.467	0.402	0.131	N.D	0.124	0.111	0.167
Ácido <i>p</i> -OHbenzoico	0.235	0.105	0.045	0.123	0.277	0.331	0.167	N.D	0.142	0.128	0.098
Ácido cafeico	0.123	N.D	N.D	N.D	0.222	0.123	N.D	N.D	N.D	0.188	N.D
Ácido Vainílico	0.601	0.423	0.052	0.303	0.691	1.109	0.558	0.202	0.392	0.245	0.319
<i>p</i> -OHbenzaldehido	0.609	0.267	0.117	0.172	0.525	0.538	0.297	0.106	0.282	0.206	0.108
Metilfurfural	0.148	0.267	0.084	N.D	0.499	0.474	0.209	0.102	0.109	0.196	0.181
Ácido Siringico	0.828	0.095	0.252	0.542	1.392	2.063	0.826	0.459	0.788	0.546	0.602
Vainillina	1.188	0.741	0.436	0.885	1.705	3.067	2.828	2.58	4.293	0.609	0.717
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.844	0.575	0.113	0.037	0.488	0.273	0.115	N.D	0.249	0.188	0.035
Siringialdehido	1.126	0.261	0.477	0.919	2.351	2.739	1.576	0.815	1.308	1.114	1.085

5b

Compuestos	SGR1 (mg L <sup>-1</sup> )	SGR2 (mg L <sup>-1</sup> )	SGR3 (mg L <sup>-1</sup> )	SGR4 (mg L <sup>-1</sup> )	SGR5 (mg L <sup>-1</sup> )	SGR6 (mg L <sup>-1</sup> )	SGR7 (mg L <sup>-1</sup> )	SGR8 (mg L <sup>-1</sup> )	SGR9 (mg L <sup>-1</sup> )	SGR10 (mg L <sup>-1</sup> )	SGR11 (mg L <sup>-1</sup> )
Ácido Gálico	10.911	5.702	7.402	6.018	3.876	2.084	N.D	N.D	2.064	3.717	0.982
5-OHmetilfurfural	31.217	18.874	19.428	17.654	87.093	48.621	31.335	40.341	37.541	64.975	16.434
Ácido Protocatéuico	3.347	1.071	3.595	1.128	1.811	1.705	3.247	3.519	0.873	1.674	2.338
Furfural	3.905	3.975	4.681	6.771	7.965	11.897	7.606	9.528	4.496	6.981	7.857
Protocatequialdehido	0.322	0.165	0.678	0.487	0.354	0.573	0.365	0.232	0.206	0.476	0.439
Ácido <i>p</i> -OHbenzoico	0.599	0.263	0.469	0.183	0.265	0.058	0.461	0.441	0.167	0.281	0.209
Ácido cafeico	0.668	0.301	0.231	0.121	0.129	0.109	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Ácido Vainílico	1.963	0.221	1.317	1.093	0.737	1.759	1.698	1.431	0.812	1.197	1.244
<i>p</i> -OHbenzaldehido	1.056	0.371	0.729	0.253	0.476	0.884	0.487	0.941	0.302	0.677	0.202
Metilfurfural	0.288	0.311	0.651	0.502	1.008	0.919	0.388	0.791	0.658	1.052	0.626
Ácido Siringico	4.095	2.884	2.081	2.698	1.478	3.515	2.585	1.111	1.339	2.618	2.396
Vainillina	4.761	2.375	3.295	2.229	2.363	3.263	3.314	2.197	1.555	2.415	1.498
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.458	0.248	0.329	0.052	0.254	1.318	0.171	0.285	0.044	0.631	0.061
Siringialdehido	7.177	5.541	2.778	5.212	2.333	6.355	4.371	4.094	2.099	4.125	3.805

5c

**Table 5.** Contenido de los compuestos investigados en Brandy Solera (S) (Tabla 5a), Solera Reserva (SR) (Tabla 5b) y Solera Gran Reserva (SGR) (Tabla 5c). N.D: no detectado

Se realizó un estudio estadístico del conjunto de muestras estudiadas. En primer lugar, se investigó mediante análisis de la varianza la posibilidad de diferenciar los distintos tipos comerciales de brandies en base a estos compuestos. Tal y como se ve en la tabla 6, todos excepto el ácido cafeico presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de brandies de distinto tiempo medio de envejecimiento. Esto podría ser debido a que el cafeico no es un compuesto extraído propiamente de la madera, sino que su vía de incorporación al Brandy, como nos demuestra nuestra experiencia y más adelante veremos, es el envinado previo de las botas.

Compuestos	Media S	Media SR	Media SGR	p-Valor
Ácido Gálico	1.125	3.886	3.886	0.017446
5-OHmetilfurfural	16.749	20.321	37.592	0.01214
Ácido Protocatéuico	0.13909	0.711	2.2098	0.000001
Furfural	0.6446	2.1392	6.8783	0.000
Protocatequialdehido	0.0586	0.16009	0.3906	0.000011
Ácido <i>p</i> -OHbenzoico	0.01582	0.15009	0.3087	0.000006
Ácido cafeico	0.024	0.0596	0.1417	0.11
Ácido Vainílico	0.0547	0.445	1.2247	0.00000
<i>p</i> -OHbenzaldehido	0.073	0.293	0.579	0.000015
Metilfurfural	0.0735	0.2062	0.654	0.000000
Ácido Siringico	0.1508	0.763	2.4363	0.000000
Vainillina	0.6084	1.7317	2.6604	0.000257
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.0501	0.2651	0.35009	0.045640
Siringialdehido	0.1245	1.2519	4.3536	0.000000

**Tabla 6:** Análisis de la varianza para cada compuesto  
*p*-Valor < 0.05 muestra diferencias estadísticamente significativas.

Al realizar un análisis de componentes principales, con las tres primeras componentes principales, la varianza explicada fue de un 82,12%, si bien, es la primera componente con un 62%, la que más contribuye.

Tal y como se puede observar en la figura 5, la mayoría de las variables se relacionan con la componente 1. Debido a que la relación de los polifenoles con el envejecimiento es bien conocida [27, 28], nos hace pensar que la dimensión de la componente 1 se corresponde con el tiempo de envejecimiento. El hecho de que el ácido gálico tenga una menor correlación con la variable 1 que el resto de polifenoles, nos hace presuponer que en la aportación del ácido gálico al brandy, hay implicados más mecanismos además del de la cesión por parte de la madera, como podría ser el envinado de la bota. Además, vemos que los derivados furánicos, especialmente hidroximetilfurfural, también se alejan de la componente 1. La presencia de derivados furánicos en el brandy, se debe, además del envejecimiento en madera, a otras dos circunstancias: a su presencia en la materia prima (en los aguardientes iniciales), y a su relación





Para obtener las ecuaciones de clasificación que permitirían asignar tipo comercial a una muestra desconocida se realizó un LDA.

En la tabla 7 se muestran las funciones de clasificación que permitirían asignar a una nueva muestra desconocida, su categoría comercial (S, SR, SGR). De entre las variables participantes, las más discriminantes fueron: Siringialdehído, metilfurfural y ácido *p*-cumárico.

	S	SR	SGR
Siringialdehído	0.1875	1.0799	5.978
Metilfurfural	2.5630	9.0320	33.105
Ácido <i>p</i> -cumárico	-0.3803	-0.5011	-14.519
Ácido <i>p</i> -ohbenzoico	0.9584	19.4511	10.436
Ácido Protocatéquico	0.0217	-1.7742	0.686
Constante	-1.2037	-3.4686	-24.766

**Table 7:** Análisis Discriminante: Funciones de Clasificación

El siringialdehído está directamente relacionado con el tiempo de envejecimiento [27,30], por lo que parece lógico que sea una de las variables que discrimine en el modelo. El metilfurfural por su parte, tal y como se ha visto anteriormente, está presente en el propio aguardiente inicial, lo que podría indicar que la calidad de las holandas podría ser diferente, en función del brandy final que se quiera obtener, justificando así su contribución al modelo discriminante. El ácido *p*-cumárico, es un compuesto que procede del envinado de las botas, por lo que su disponibilidad está limitada, ya que sus niveles se ven afectados por el flujo de aguardiente que pasan a través de la solera en un periodo de tiempo determinado.

Por tanto, cada una de estas variables, se puede relacionar con la calidad de los brandies desde diferentes puntos de vista.

En la tabla 8, se observa como la clasificación de los Brandy Solera es de un 90%, los Solera Reserva de un 72%, y la de los Solera Gran Reserva es de un 100%. Esto se ve claramente en el gráfico de la figura 7, donde efectivamente, se ve como hay una buena separación entre los tres grupos de muestras, siendo muy buena para los brandies gran reserva.

	Porcentaje	S	SR	SGR
S	90.9091	10	1	0
SR	72.7273	2	8	1
SGR	100.0000	0	0	11
Total	87.8788	12	9	12

**Tabla 8:** Análisis Discriminante: Porcentaje de Clasificación

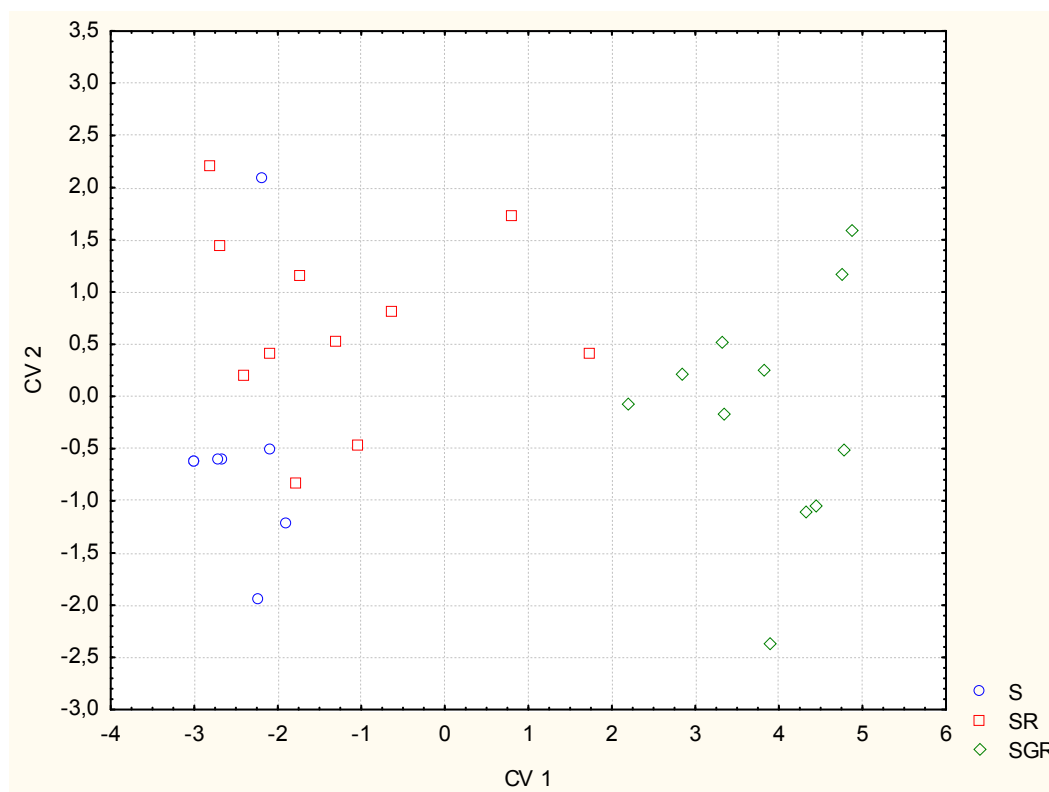


Figura 7: Análisis lineal Discriminante: Proyección de las variables canónicas

### 3.4. CONCLUSIONES

En este capítulo, se ha desarrollado un método simple y reproducible para el análisis de compuestos fenólicos y derivados furánicos en el brandy de Jerez mediante UPLC.

La validación del método ha dado como resultado unos buenos límites de detección y cuantificación, así como linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión.

Comparando con HPLC, el método desarrollado mediante UPLC, ofrece una elevada sensibilidad, precisión y velocidad de análisis para la determinación simultánea de polifenoles en Brandy, proponiendo el UPLC como una herramienta muy útil para el análisis de compuestos relacionados con la calidad del Brandy. Usando el UPLC se permitió acortar el tiempo de análisis casi diez veces comparándolo con el sistema mediante HPLC.

### 3.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Canas, S., Leandro, M. C., Spranger, M. I., Belchior, A. P. (1999). Low Molecular Weight Organic Compounds of Chestnut Wood (*Castanea sativa* L.) and Corresponding Aged Brandies *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (12), 5023-5030.

- [2] Viriot, C., Scalbert, A., Lapierre, C., Moutounet, M. (1993). Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (11), 1872-1879.
- [3] Mosedale, J.R., Puech, J.L. (1998) Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 9 (3), 95-101.
- [4] Martínez Montero, C., Rodríguez Dodero, M.D.C., Guillén Sánchez, D.A., García Barroso, C. (2005). Sugar contents of Brandy de Jerez during its aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (4), 1058-1064.
- [5] Rodríguez Madrera, R., Blanco Gomis, D., Mangas Alonso, J.J. (2003). Influence of Distillation System, Oak Wood Type, and Aging Time on Composition of Cider Brandy in Phenolic and Furanic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (27), 7969-7973.
- [6] Caldeira, I., Belchior, A.P., Clímaco, M.C., Bruno De Sousa, R.. (2002). Aroma profile of Portuguese brandies aged in chestnut and oak woods. *Analytica Chimica Acta*, 458 (1), 55-62.
- [7] Caldeira, I., Mateus, A.M., Belchior, A.P. (2006). Flavour and odour profile modifications during the first five years of Lourinhã brandy maturation on different wooden barrels. *Analytica Chimica Acta*, 563 (1), 264-273.
- [8] Savchuk, S.A., Kolesov, G.M. (2005). Chromatographic techniques in the quality control of cognacs and cognac spirits. *Journal of Analytical Chemistry*, 60 (8), 752-771.
- [9] Kuroda, Y., Hara, Y. (1999). Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research*, 436 (1), 69-97.
- [10] López, M., Martínez, F., Del Valle, C., Orte, C., Miró, M. (2001). Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 922 (1-2), 359-363.
- [11] Panosyan, A.G., Mamikonyan, G., Torosyan, M., Abramyan, A., Oganessian, A., Gabrielyan, E.S., Grigoryants, A., Mkhitarian, S., Lapin, B.V. (2002). Determination of Phenolic Aldehydes in Cognacs and Wines by Capillary Electrophoresis: New Cognac Quality Markers. *Journal of Analytical Chemistry*, 57 (4), 356-361.
- [12] De Aquino, F.W.B., Rodrigues, S., Do Nascimento, R.F., Casimiro, A.R.S. (2006). Simultaneous determination of aging markers in sugar cane spirits. *Food Chemistry*, 98 (3), 569-574.
- [13] Canas, S., Belchoir, A.P., Spranger, M.I., Bruno-De-Sousa, R. (2003). High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes and furanic derivatives in brandies. Development and validation. *Journal of Separation Science*, 26 (6-7), 496-502.

- [14] Barroso, C.G., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Pérez-Bustamante, J. (1996). 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. *Journal of Chromatography A*, 724 (1-2), 125-129.
- [15] Swartz M.E. (2005). UPLC™: An introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 28 (7-8), 1253-1263.
- [16] Nováková, L., Matysová, L., Solich, P. (2006). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68 (3), 908-918.
- [17] Yang, F.Q., Guan, J., Li, S.P. (2007). Fast simultaneous determination of fourteen nucleosides and nucleobases in cultured Cordyceps using ultra-performance liquid chromatography. *Talanta*, 73 (2), 269-273.
- [18] Wang, X., Zhao, T., Gao, X., Dan, M., Zhou, M., Jia, W. (2007). Simultaneous determination of 17 ginsenosides in rat urine by ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 594 (2), 265-273.
- [19] Nováková, L., Solichová, D., Solich, P. (2006). Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical 2 approaches during analysis of diclofenac gel. *Journal of Separation Science* 29 (16), 2433-2443.
- [20] Guan, J., Lai, C.M., Li, S.P. (2007). A rapid method for the simultaneous determination of 11 saponins in Panax notoginseng using ultra performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44 (4), 996-1000.
- [21] Liu, M., Li, Y., Chou, G., Cheng, X., Zhang, M., Wang, Z. (2007). Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb Radix Salviae Miltiorrhizae. *Journal of Chromatography A*, 1157, 51-55.
- [22] Zhang, Y., Jiao, J., Cai, Z., Zhang, Y., Ren, Y. (2007). An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1142 (2), 194-198.
- [23] Cela, R. (1994). Avances en quimiometría práctica. Universidad de Santiago, Servicios de publicaciones e intercambio científico, Santiago de Compostela.
- [24] García Campaña, A.M., Cuadros Rodríguez, L., Alés Barrero, F., Román Ceba, M., Sierra Fernández, J.L. (1997). ALAMIN: a chemometric program to check analytical method performance and to assess the trueness by standard addition methodology. *Trends in Analytical Chemistry*, 16 (7), 381-385.
- [25] Guerrero, E.D., Chinnici, F., Natali, N., Marín, R.N., Riponi, C. (2008). Solid-phase extraction method for determination of volatile compounds in traditional balsamic vinegar. *Journal of Separation Science*, 31 (16-17), 3030-3036.

- [26] **Barbero, G.F., Liazid, A., Palma, M., Barroso, C.G.** (2008). Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column. *Food Chemistry*, 107 (3), 1276-1282.
- [27] **García Moreno, M.V, Garcia Barroso, C.** (2002). Comparison of the evolution of low molecular weight phenolic compounds in typical Sherry wines: Fino, Amontillado, and Oloroso. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (26), 7556-7563.
- [28] **Hernández, T., Estrella, I., Dueñas, M., De Simón, B.F., Cadahía, E.** (2007). Influence of wood origin in the polyphenolic composition of a Spanish red wine aging in bottle, after storage in barrels of Spanish, French and American oak Wood. *European food research and technology*, 224 (6), 695-705.
- [29] **Quesada Granados J., Villalón Mir M., Lopez Serrana H., López Martinez M.C.** (1996). The influence of added caramel on furanic aldehyde content of matured brandies. *Food Chemistry*, 56 (4), 415-419.
- [30] **Matějčíček, D., Mikeš, O., Klejdus, B., Štěřbová, D., Kubán, V.** (2005). Changes in contents of phenolic compounds during maturing of barrique red wines. *Food Chemistry*, 90 (4), 791-800



**4. CARACTERIZACION POLIFENOLICA  
DE VINO DE JEREZ MEDIANTE HSCCC**





## 4.1. INTRODUCCION

Debido a la particular elaboración de los vino de Jerez, éstos presentan una matriz muy compleja. Por esto se decidió intentar identificar nuevos compuestos hasta ahora no estudiados con nuevas técnicas. Los dos vinos que se decidieron analizar fueron: Amontillado procedente de la escala Solera, y vino dulce Pedro Ximénez también procedente de la solera.

El amontillado, vino generoso del marco de Jerez, se encuentra en su elaboración entre el fino y el oloroso. Comienza teniendo crianza biológica, al igual que el fino, para después dejar morir a la levadura dejando que el vino se oxide, adquiriendo el color ámbar que le caracteriza, teniendo por tanto también, crianza oxidativa. Estos dos modos de crianza, junto con el tradicional sistema de envejecimiento de Solera y Criaderas, le aportarán al vino una serie de características organolépticas señas de su identidad. Los estudios sobre el contenido polifenólico de este vino son aún escasos, aunque en la bibliografía encontramos algunos trabajos. García y col. [1] estudiaron una solera de Amontillado, analizando las diferencias con Oloroso y Fino. Identificó hasta un total de 17 polifenoles de bajo peso molecular. Estrella y col. [2], realizó un estudio parecido identificando igual número de compuestos. Otros análisis como el estudio de componentes volátiles [3], o el estudio de los parámetros cromáticos [4], han sido también realizados para el Amontillado.

En cuanto al vino Pedro Ximénez, se le une una dificultad añadida, el elevado contenido en azúcar hace que su matriz sea mucho más compleja. Debido a esta complejidad, es un vino sumamente interesante. De los vinos de Jerez, es el que presenta un mayor contenido en actividad antioxidante. En cuanto a los estudios realizados sobre este vino cabe destacar el realizado por Serratos y col. [5], donde extrae el contenido polifenólico de un mosto de Pedro Ximénez pasándolo por un cartucho C18, identificando un total de 19 compuestos polifenólicos entre ácidos benzoicos, derivados cinámicos y flavonoles. Peinado y col., [6] estudió el poder antioxidante de diferentes fracciones polifenólicas de un mosto de Pedro Ximénez conseguidas mediante extracción en fase sólida. Márquez y col. [7], estudió el contenido en volátiles de vinos dulces de Andalucía entre los que se encontraban la variedad Pedro Ximénez.

La cromatografía en contracorriente es una técnica cromatográfica líquido-líquido ampliamente utilizada para el aislamiento preparativo de productos naturales debido a sus condiciones suaves

de separación y su alto rendimiento para la extracción de compuestos de gran pureza [8-11]. Además, ha sido utilizado en numerosas ocasiones para el aislamiento e identificación de compuestos polifenólicos en vinos [12-15].

En este capítulo, se plantea como objetivo el fraccionamiento de los dos vinos anteriormente mencionados mediante el uso de HSCCC, y poder así obtener fracciones más sencillas que nos permitan identificar un mayor número de compuestos polifenólicos y poder aislar alguno de ellos. Además a las fracciones obtenidas se les evaluará su actividad antioxidante, con idea de poder relacionar dicha actividad con algún compuesto en concreto.

## **4.2 MATERIALES Y METODOS**

### **4.2.1 Muestras**

Los dos vinos analizados en el presente capítulo han sido suministrados por la bodega Gonzalez-Byass: los dos son pertenecientes a la escala Solera de un sistema de Solera y Criaderas.

#### **4.2.1.1. Obtención del extracto de Amontillado**

En una columna de dimensiones 100 cm de longitud y 6 cm de diámetro, rellena de Amberlita XAD 7, previamente acondicionada con 2L de metanol y después 2L de agua, se le adicionó el Amontillado. El Amontillado tiene una graduación alcohólica de 17°; por lo que la muestra tuvo que ser fuertemente diluida (1:4). Después de pasar la muestra, la columna fue lavada con 3L de agua, con la finalidad de eliminar azúcares y otros compuestos no retenidos en la columna. A continuación se extrajo el contenido polifenólico, utilizando como eluyente 2 L de una mezcla de metanol y ácido acético (19:1). Este extracto (1.25 g /L de vino) fue concentrado mediante el uso de rotavapor para posteriormente ser liofilizado. Así se consiguió obtener un extracto enriquecido en polifenoles, obteniéndose un total de 14g.

Además, en el caso del Amontillado, con el objetivo de obtener fracciones más apolares, se decidió obtener un extracto de etilacetato, mediante una extracción líquido-líquido. Para ello se pesaron 2g del anterior extracto liofilizado de amontillado y se disolvió en 500 ml de agua. A continuación se trasvasó a un embudo de decantación al que se le volvió a añadir 500 ml de etilacetato. Se agitó y decantó la fase orgánica. La extracción se repitió hasta tres veces, para

estar seguros de habernos quedado sólo con la fase orgánica. Todas las fases orgánicas obtenidas fueron reunidas, y posteriormente se concentraron en rotavapor y se liofilizaron. En total se utilizaron 6 g del extracto XAD 7, obteniéndose un total de 1,3 g de extracto liofilizado de la extracción realizada con etilacetato.

#### 4.2.1.2. Obtención del extracto de Pedro Ximénez

El procedimiento fue el mismo descrito en el apartado anterior (Figura 1). La única diferencia fue que se obtuvo un rendimiento mayor. El vino Pedro Ximénez, tal y como se ha comentado con anterioridad, está elaborado a partir de uvas pasas, por lo que los compuestos presentes en la uva, como los compuestos polifenólicos, se encuentran concentrados, esto justificaría el mayor rendimiento de este vino frente al Amontillado. Para este vino se obtuvo un rendimiento de 1,5 g/L de vino, consiguiendo un total de 6g de extracto XAD7.

Por otra parte, para este vino, también, se decidió ensayar otra resina, amberlita tipo XAD2. Esta resina tiene la propiedad de adsorber compuestos polifenólicos glicosilados por lo que al tratarse de un vino dulce, se pensó que podía ser interesante su utilización. En este caso se partió de 2 L de vino Pedro Ximénez obteniéndose 2,8 g de extracto liofilizado, siendo el rendimiento algo menor para esta resina. El procedimiento de extracción fue exactamente igual que para la amberlita XAD7. Para ambas resinas, la muestra fue diluida al igual que en el caso del amontillado en un proporción 1:4

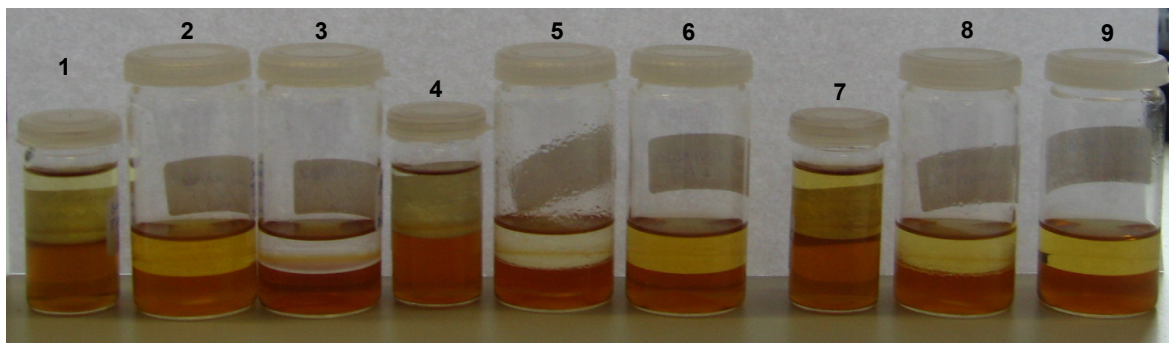


**Figura 1:** Procedimiento para la elaboración del extracto XAD7 y XAD2

#### 4.2.2. Elección del disolvente a utilizar en el HSCCC

En el HSCCC, la elección de los disolventes inmiscibles que se van a utilizar en función de los compuestos que se vayan a estudiar suponen un paso importantísimo. De la idoneidad de la elección va a suponer el éxito del método aplicado [16]. Para la elección de los disolventes a utilizar, se debe tener en cuenta la experiencia anterior con los compuestos a estudiar, en este caso, polifenoles, así como la bibliografía consultada, y una vez que se ha elegido entre unos cuantos, se debe analizar su coeficiente de partición. El coeficiente de partición ( $k$ ) representa la relación de la cantidad de analito encontrada en cada uno de las dos fases del sistema, y se encuentra relacionado con la afinidad del analito por uno de los disolventes sobre el otro. Se expresa como la cantidad de soluto en la fase estacionaria, dividido por el de la fase móvil como en la cromatografía líquida convencional. Los valores adecuados de  $K$  para la HSCCC están entre:  $0,5 \leq K \leq 1,0$ . Si el valor es menor o mayor la repartición de la muestra no es buena entre las dos fases y no hay una buena separación. En el caso de que sea menor solo sale un solo pico, por lo que no hay separación de la muestra y si es mayor tardará mucho más en separarse. Para la elección del sistema de disolventes, se pesa una cantidad de nuestra muestra: 5mg, y se le adiciona 2,5 ml de la fase acuosa del sistema a probar y 2,5 ml de la fase orgánica. En nuestro caso, en base a la bibliografía [17] y con pequeñas modificaciones según los resultados, se ensayaron los diferentes disolventes

1. Hexano/Etilacetato/metanol (1/1,2/1)
2. TBME (Terc-metil-butil-eter) / n-Butanol/ Acetonitrilo/ Agua (2/2/15)
3. Hexano/Etilacetato/n-butanol/Agua (1/10/1/10)
4. TBME/n-Butanol/Acetonitrilo/Agua (1/3/1/5)
5. n-butanol/Acetonitrilo/Agua (4/1/5)
6. TBME/butanol/Acetonitrilo/agua [1,1/3/1,1/5+0,1% Ácido trifluoroacético (TFA)]
7. TBME/butanol/Acetonitrilo/agua (1/3/1/5+0,1%TFA)
8. TMBE/n-butanol/ACN/Agua (0,5/3,5/1/5)
9. TBME/n-Butanol/Acetonitrilo/Agua (1/4/1/5)



**Figura 2:** elección de diferentes solventes para los extractos de ambos vinos

Así por ejemplo en la figura 2, se observa claramente como los sistemas 3 y 5 de la foto, no serían unos sistemas aptos para este tipo de muestra ya que los analitos no se disolvieron en ambas fases. Para el resto de sistemas habría que calcular el coeficiente de partición para una adecuada elección de acuerdo a la siguiente ecuación:  $K = \frac{[\text{fase orgánica}]}{[\text{fase acuosa}]}$ . Esto se puede realizar o bien analizando ambos sistemas mediante HPLC, o mediante cromatografía en capa fina, entre otros. En nuestro caso, el que mejor resultado obtuvo para ambos vinos y los que se decidieron utilizar fueron los siguientes sistemas:

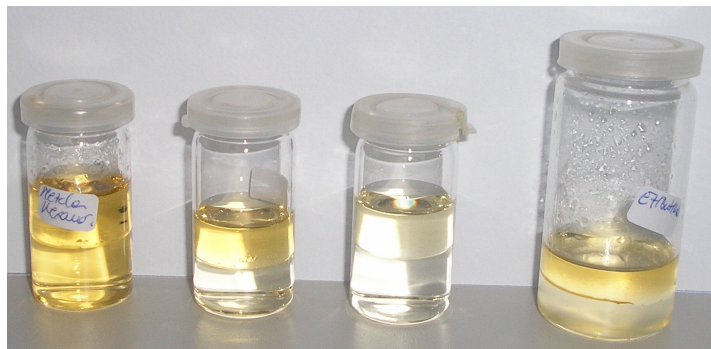
7. TBME/butanol/Acetonitrilo/agua (1,1/3/1,1/5+0,1%TFA)

2. TBME/ n-Butanol/ Acetonitrilo/ Agua (2/2/15)

Para el extracto de etilacetato del Amontillado se decidió ensayar en base a la bibliografía, los siguientes sistemas de disolventes:

- Hexano/Etilacetato/Etanol/Agua (1/5/1/5)
- Etilacetato/Etanol/Agua (5/1/5)
- Etilacetato/n butanol/Agua (1/5/6)
- Etilacetato/n butanol/etanol/agua (30/6//10/50)

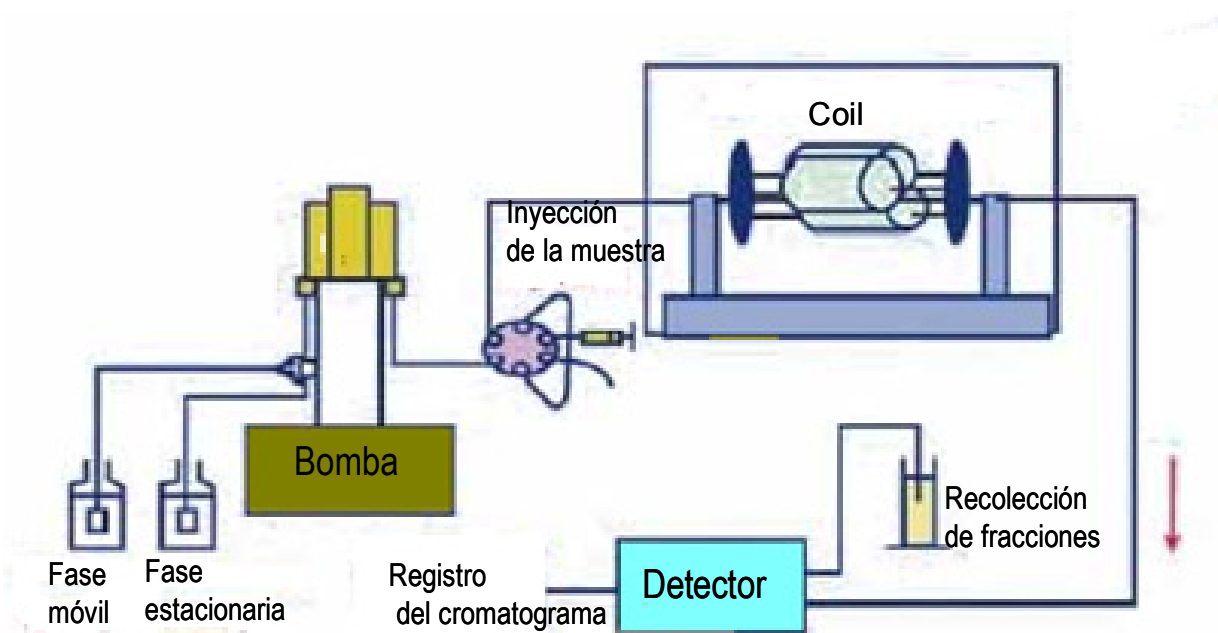
De estos cuatro sistemas, tal y como puede verse en la figura 3, sólo el primero de los mencionados fue bueno. Se analizaron mediante cromatografía en capa fina ambas fases, observando que los analitos aparecían en ambas fases obteniendo un buen coeficiente de partición. Se decidió utilizar dicho disolvente para el extracto de etilacetato de amontillado.



**Figura 3:** Elección de distintos sistemas de solventes para el extracto de Etilacetato

#### 4.2.3. HSCCC (High-speed countercurrent chromatography)

El equipo utilizado en el presente capítulo fue un HSCCC modelo CCC-1000 de Pharma-Tech Research (Baltimore, MD, USA). La separación fue llevada a cabo a temperatura ambiente, a una velocidad de rotación de 850rpm, y a un flujo de 4 mL min<sup>-1</sup>. En todos los sistemas utilizados, la fase acuosa fue utilizada como fase móvil en el modo de elución: *head to coil*. Las bombas utilizadas para los disolventes fueron de Jasco, modelo Biotronic bomba HPLC BT3020. La muestra (850mg) fue siempre disuelta en una mezcla de la fase orgánica y acuosa en una proporción 1:1 e inyectada en el sistema mediante un loop de inyección (50ml). La detección de los compuestos fue monitorizada por un Knauer UV-vis detector a 280nm, registrando el cromatograma mediante un polígrafo. Las fracciones son recogidas en tubos de ensayo mediante un colector de fracciones (Pharmacia LKB Super Frac) (Figura 4)



**Figura 4:** Esquema de un cromatógrafo en contracorriente

#### 4.2.4. HPLC-DAD

Las fracciones fueron analizadas inicialmente mediante HPLC de Jasco (Alemania), con una bomba modelo PU 2080 Plus, acoplado a un detector UV-Vis modelo MD-2080 Plus. La columna utilizada fue una Phenomenex Luna 250 x 4,6 mm con 3 $\mu$ m de tamaño de partícula. Los disolventes fueron los siguientes; disolvente A: 87% Agua y 10% Acetonitrilo y el disolvente B: 40% agua y 50% Acetonitrilo. El gradiente utilizado: 0 min: 6%B; 20min: 20% B; 35min 40% B; 40 min: 60% B; 45min: 90%B; 55min: 6% B. El volumen de inyección fue de 20 $\mu$ l y el flujo de 0.5ml/min.

#### 4.2.5. HPLC-DAD-MS

Para confirmar los compuestos anteriormente identificados, se decidió analizar las fracciones también mediante HPLC (Waters 2695) acoplado a un PDA (Waters 2996) y a un espectrómetro de masas (Waters micromass ZQ) con una interfase electrospray (ESI). La columna utilizada fue una Geminis Phenomenex C18 (250x2.0 mm de diámetro interno). El volumen de inyección fue de 20 $\mu$ l. El eluyente A: 3% Metanol, 2% Ácido acético y 95% agua, mientras que el eluyente B: fue un 93% metanol, 2% ácido acético y 5% agua. El gradiente utilizado fue el siguiente: 0 min 100% A, 5 min 95% A; 40 min 95% A; 50 min 100% B; 60 min 100%; 70 min 100% A. Para la



identificación por ESI-MS<sup>n</sup> se utilizaron los siguientes parámetros: modos de ionización positivo y negativo con N<sub>2</sub> como gas de secado a un flujo de 11 mL min<sup>-1</sup>, la temperatura de secado fue 250° C, el voltaje del capilar: 3500 V y el voltaje del capilar de salida 15 V. El rango de escaneado m/z fue de 100-1000.

#### **4.2.6. HPLC Semipreparativa**

La purificación de los compuestos se realizó mediante HPLC semipreparativa mediante un sistema de HPLC Agilent 1200 series, que comprende una bomba cuaternaria, un autosampler, un detector UV-Vis, y un recolector de fracciones. La separación fue llevada a cabo mediante una columna Phenomenex Luna 250 x 15,0 mm con 5µm de tamaño de partícula.

#### **4.2.7. Resonancia magnética nuclear**

Para la identificación de los compuestos aislados, se empleó la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN). Se han llevado a cabo estudios de protón (<sup>1</sup>H-RMN), de carbono (<sup>13</sup>C-RMN), realizados mediante un equipo Bruker AMX 300 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania) a 300.13 y 75.49 MHz, respectivamente.

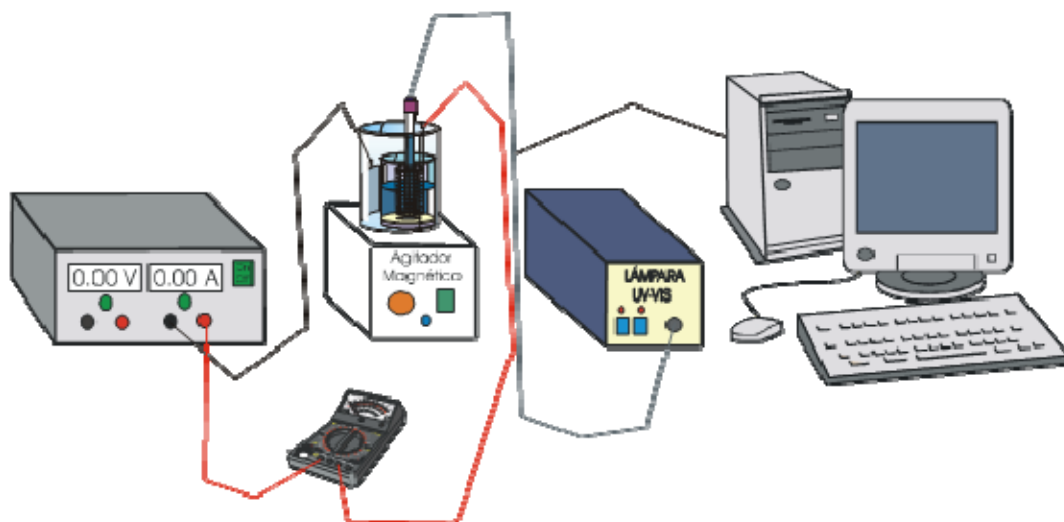
#### **4.2.8. Cromatografía en capa fina**

Se utilizaron placas de silica gel, utilizando tras varias pruebas y en base a la bibliografía [18] el siguiente sistema de eluyente: Etilacetato/Etilmetilcetona/Ácido Fórmico/Agua (4/3,5/1/1).

#### **4.2.9. Actividad antioxidante**

El dispositivo para la medida del poder antioxidante se basa en la generación del catión-radical cromóforo ABTS<sup>•+</sup>, por oxidación del ABTS en el ánodo y en la habilidad de los antioxidantes presentes de la muestra estudiada para retrasar su aparición.

Este método ha sido validado y estudiado previamente en el grupo de investigación [19] a partir del dispositivo del "TEPA" (Test electroquímico del pardeamiento acelerado), desarrollado y patentado por el grupo de investigación [20].

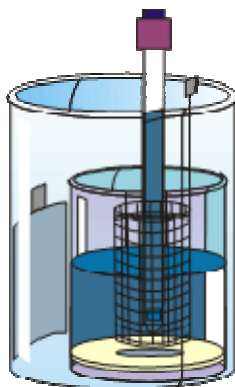


**Figura 5:** Dispositivo para la medida del poder antioxidante

El dispositivo (Figura 5) consiste en: un vaso de precipitado de 80ml (cátodo) dentro del cual se sitúa un vaso filtrante de 30 mL, con tamaño de poro n°4 (ánodo).

Un electrodo de platino plano (30x60 mm) se sitúa en el cátodo y un electrodo de platino con forma de malla cilíndrica (h = 22 mm, d = 22 mm) se sitúa en el ánodo. Dentro del vaso filtrante hay una barra agitadora, en continua agitación durante el experimento por un agitador magnético (detalle del vaso de precipitado, figura 6).

La fuente de alimentación utilizada (FAC-307C de Promax) permite fijar las condiciones de trabajo y regular la intensidad constante. Para el seguimiento espectrofotométrico de la reacción se utiliza un espectrofotómetro miniaturizado (PC 2000 de Ocean Optics) acoplado a una sonda de transmisión UV-Vis, con una fuente de luz halógena-deuterio (DH-2000 de Top Sensor System) y la intensidad de corriente se mide con un multímetro (Hewlett-Packard). El espectrofotómetro miniaturizado se maneja mediante el programa OOIBase32.



**Figura 6:** Detalle del vaso precipitado

El protocolo desarrollado para la medida del poder antioxidante de una muestra se detalla a continuación:

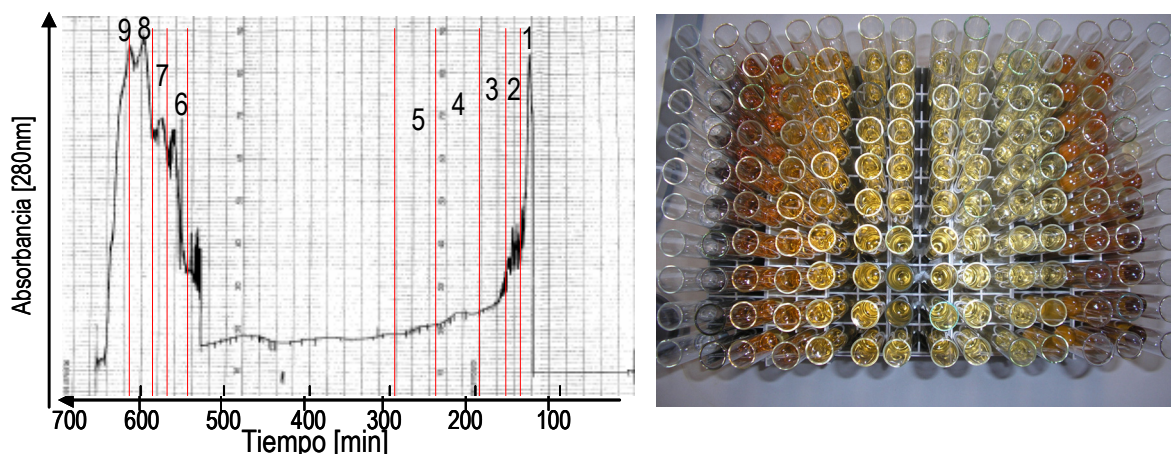
1. Se lavan los electrodos de platino durante 10 minutos con ácido nítrico 60%. Después, se enjuagan con agua destilada y se calinan a la llama, durante medio minuto el cilíndrico y un minuto por cada cara el laminar.
2. Se colocan en el cátodo 30 mL de acetato de zinc saturado (40%) y en el ánodo 25 mL de la disolución de ABTS 50  $\mu$ M a pH = 6, a la que se añaden alícuotas de las muestras en estudio. La disolución de ABTS se mantiene en continua agitación.
3. Antes de comenzar el ensayo, se registra el negro del espectrofotómetro con la sonda desconectada. Entonces se introduce la sonda en el recipiente del ánodo y se registra como blanco la disolución inicial antes de oxidar.
4. Se introducen los electrodos en los polos respectivos y se aplica una intensidad constante de 2 mA. Para comprobar que no hay variaciones, se registra cada 30 segundos con el multímetro.
5. El espectrofotómetro registra continuamente la absorbancia a 414 y 734 nm y el tiempo. El ensayo se da por terminado cuando se alcanza el máximo de absorbancia a 414 nm.
6. La función de respuesta utilizada son los culombios empleados en la oxidación de las muestras añadidas, calculados a partir del porcentaje de variación de la función (absorbancia 414 nm / absorbancia 734 nm) a lo largo del tiempo. Cuando esta variación se hace inferior al 10 %, se considera que ha comenzado la oxidación del ABTS y por tanto concluido la del antioxidante o muestra añadidos.

### **4.3. RESULTADOS**

#### **4.3.1. Amontillado**

##### **4.3.1.1. Sistema I: TBME/butanol/Acetonitrilo/agua (1,1/3/1,1/5+0,1%TFA)**

Con este sistema de disolventes, se consiguió separar el extracto XAD7 enriquecido en polifenoles en 9 fracciones.



**Figura 7:** Cromatograma y tubos recolectados mediante este primer sistema de disolventes

Una vez realizado el fraccionamiento y recogidas las fracciones en los tubos de ensayo (Figura 7), y con ayuda del propio cromatograma y la cromatografía en capa fina realizada para cada 3 tubos se reunieron los tubos pertenecientes a cada fracción (Figura 8). Posteriormente se concentran mediante rotavapor para seguidamente ser liofilizados y pesados.



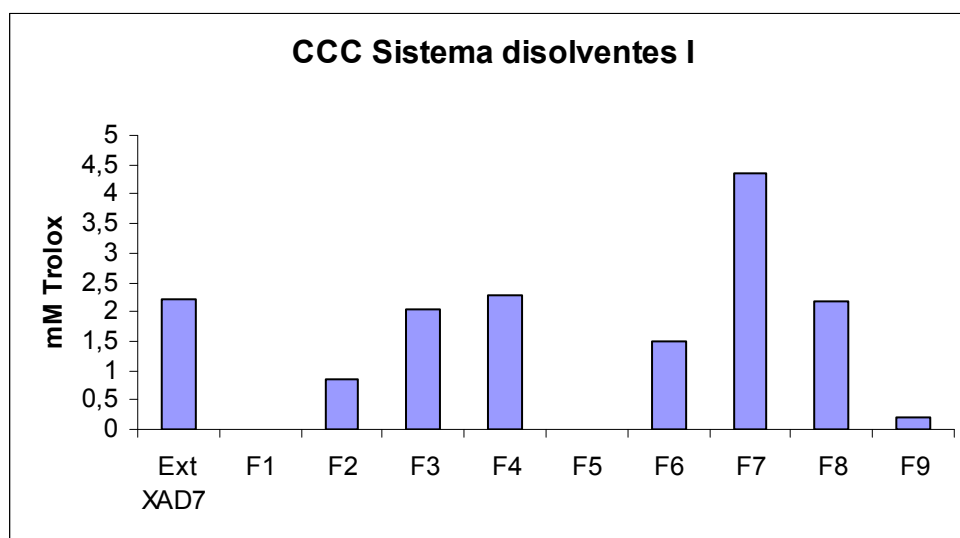
**Figura 8:** Fracciones obtenidas con este disolvente

Como se ha dicho anteriormente con este sistema se obtuvieron 9 fracciones cuyo peso se puede ver en la tabla 4. Las 9 fracciones se analizaron mediante HPLC-DAD y posteriormente mediante HPLC-DAD-MS. Las fracciones analizadas resultaron ser aún demasiadas complejas, si bien se identificaron algunos compuestos.

Fracciones	Peso (mg)
F 1	56
F 2	32
F 3	30
F 4	22
F 5	56.6
F 6	20.9
F 7	34.2
F 8	52
F 9	101.6

**Tabla 4:** Peso de las 9 fracciones obtenidas

Al analizar el poder antioxidante de dichas fracciones, todas se midieron con las mismas concentraciones, pesando una cantidad fija de cada fracción y diluyendola en metanol, la relación fue 1mg de muestra en 500 $\mu$ l de metanol. Tal y como se puede observar en la figura 9, la fracción 7 resultó ser la que tenía una mayor actividad antioxidante. Los polifenoles identificados en la fracción 7 fueron los siguientes: ácido protocatéquico, protocatequialdehído, ácido caftárico, ácido siríngico y siringialdehído (figura 10). De todos estos compuestos, algunos de ellos, como el ácido protocatéquico, el ácido siríngico [21] o el ácido caftárico [22] han sido relacionados con la actividad antioxidante, justificándose por tanto el elevado poder antioxidante de esta fracción. Además de lo comentado cabe destacar que si se compara la actividad antioxidante del extracto crudo (llamado en la gráfica Ext XAD 7), no es muy elevado si se compara con el de otras fracciones como F7 o F8; esto confirmaría la hipótesis del efecto antagónico que pueden presentar algunos polifenoles en cuanto a actividad antioxidante se refieren, defendido por algunos autores [23,24].



**Figura 9:** Actividad antioxidante de las distintas fracciones obtenidas con el primer sistema de disolventes

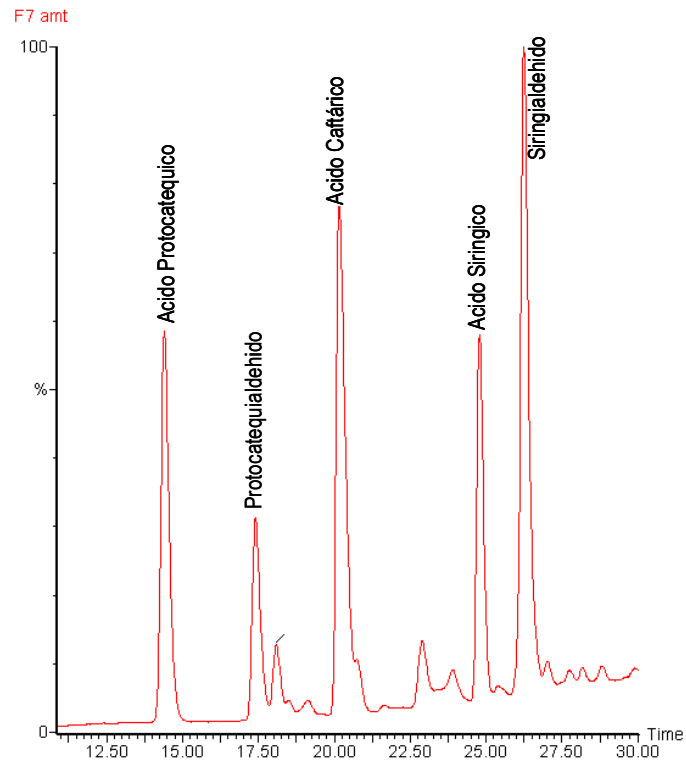


Figura 10: Cromatograma obtenido a 280 nm para la fracción 7

#### 4.3.1.2. Sistema II: Hexano/Etilacetato/Etanol/Agua (1/5/1/5)

Para obtener fracciones más simples y más apolares, se decidió obtener un extracto de etilacetato del extracto XAD7, y a éste realizarle un fraccionamiento mediante HSCCC con el II Sistema de disolventes. En este análisis, se obtuvieron 12 fracciones (figura 11), con resultados más satisfactorios.

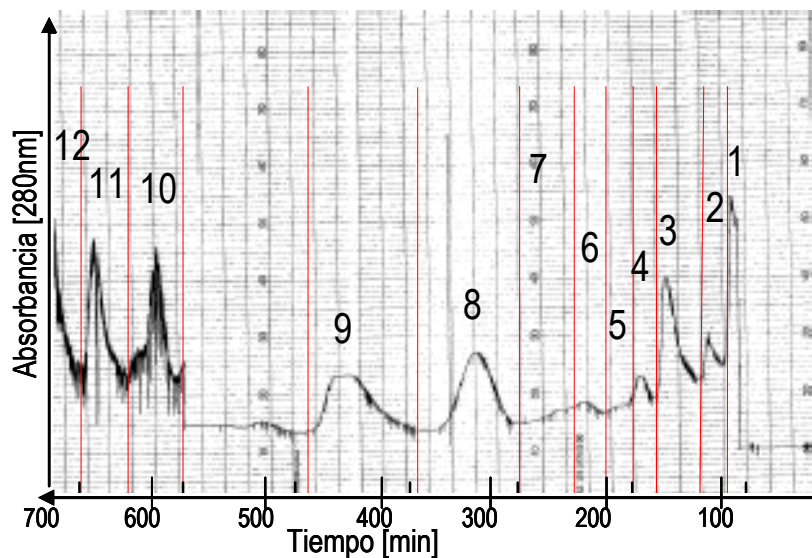


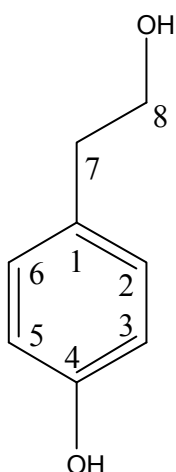
Figura 11: Cromatograma obtenido con el segundo sistema de disolventes

Las cantidades de las diferentes fracciones y los compuestos identificados en cada uno de ellas, las encontramos en la tabla 5:

Fracciones	Cantidad obtenida (mg)	Compuestos identificados
F1	30	Ácido Caftárico <sup>1</sup>
F2	13	
F3	33	Ácido Gálico <sup>2</sup> , Ácido Cis <i>p</i> -cutárico <sup>3</sup> , Ácido trans <i>p</i> -cutárico <sup>4</sup> , Ácido Fectárico <sup>5</sup>
F4	14	Hidroximetilfurfural <sup>6</sup>
F5	20	
F6	30	
F7	12.3	
F8	50	Ácido protocatéquico <sup>7</sup> y Tirosol <sup>8</sup>
F9	80	Ácido siríngico <sup>9</sup> ,
F10	24	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico <sup>10</sup> , ácidovainílico <sup>11</sup> , ácido cafeico <sup>12</sup> , siringialdehido <sup>13</sup> , escopoletina <sup>14</sup>
F11	12.9	<i>p</i> -hidroxibenzaldehido <sup>15</sup> , vainillina <sup>16</sup> , veratraldehido <sup>17</sup> , ácido cis <i>p</i> -cumárico <sup>18</sup> , ácido trans <i>p</i> -cumárico <sup>19</sup> y ácido ferúlico <sup>20</sup>
F12	58.5	Epigallocatequina <sup>21</sup> , Protocatequialdehido <sup>22</sup>

**Tabla 5:** Peso y compuestos identificados en las 12 Fracciones obtenidas

Se identificaron un total de 22 compuestos mediante HPLC-DAD-MS, consiguiéndose aislar 2 de ellos, siendo purificados mediante HPLC-semipreparativa y elucidando su posterior estructura química mediante RMN. Fueron los compuestos de la fracción 8: Tyrosol del que se obtuvieron 16 mg y ácido protocatéquico del que se obtuvieron 6 mg. Los Resultados se ven en las tablas 6 y 7 y figura 12 y 15, para el tyrosol y el ácido protocatéquico respectivamente. Sus espectros de UV-Vis y masas se observan en las figuras 13 y 14 respectivamente.



Posición	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)	DEPT
1	-	131	Q
2	6,8 d (J=8,5 Hz)	130	CH
3	6,5 d (J=8,5 Hz)	116	CH
4	-	156	Q
5	6,5 d (J=8,5 Hz)	116	CH
6	6,8 d (J=8,5 Hz)	130	CH
7	2,6 t (J= 7,2 Hz)	40	CH <sub>2</sub>
8	3,5 t (J=7,2 Hz)	65	CH <sub>2</sub>

Figura 12: Tyrosol

Tabla 6: Resultados RMN para Tyrosol

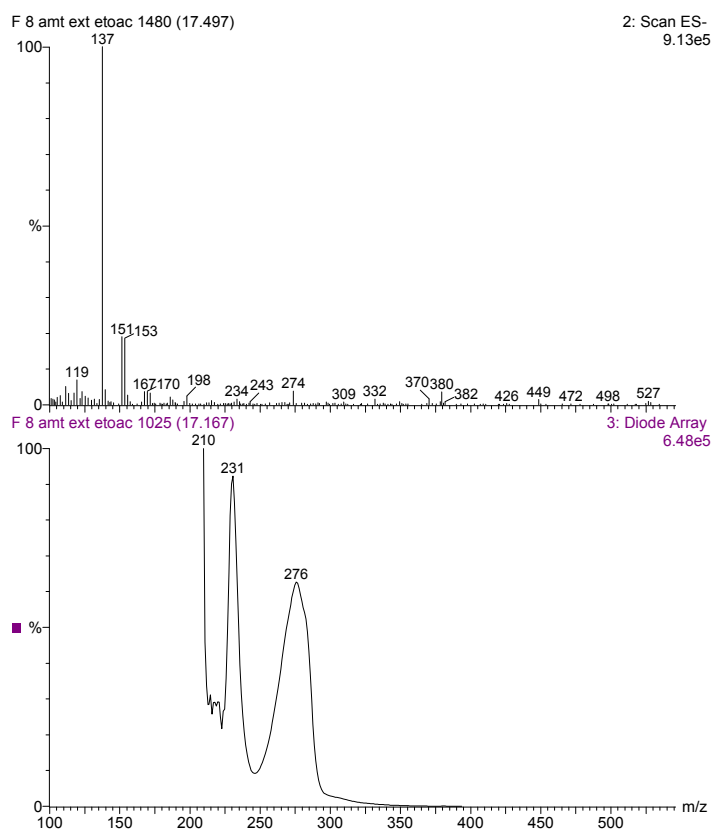


Figura 13: Espectro de UV-Vis y masas del Tyrosol



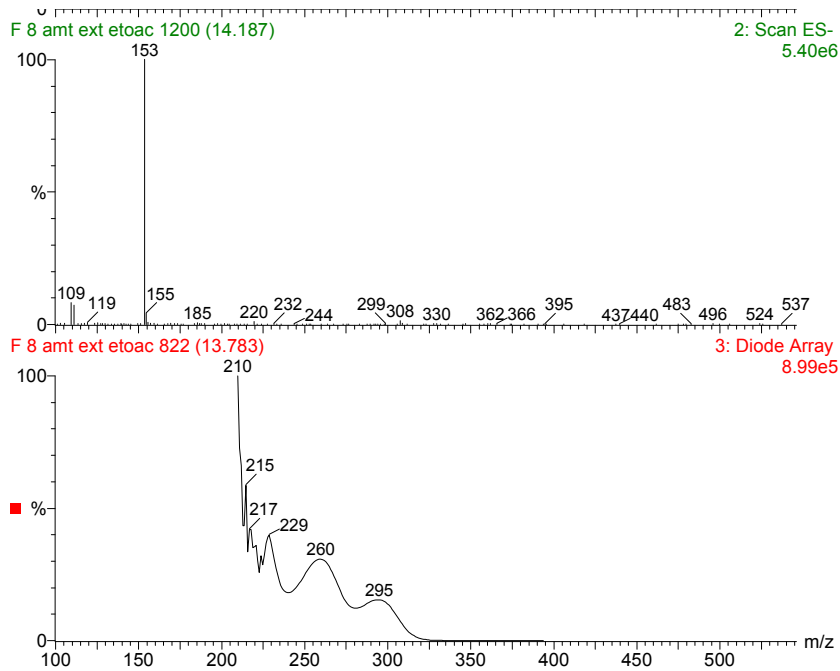
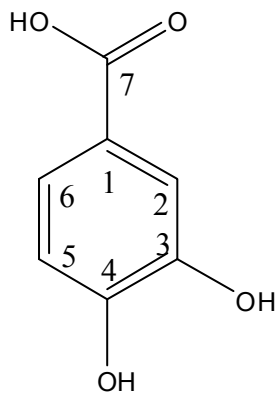


Figura 14: Espectro de UV-Vis y masas del ácido protocatéquico

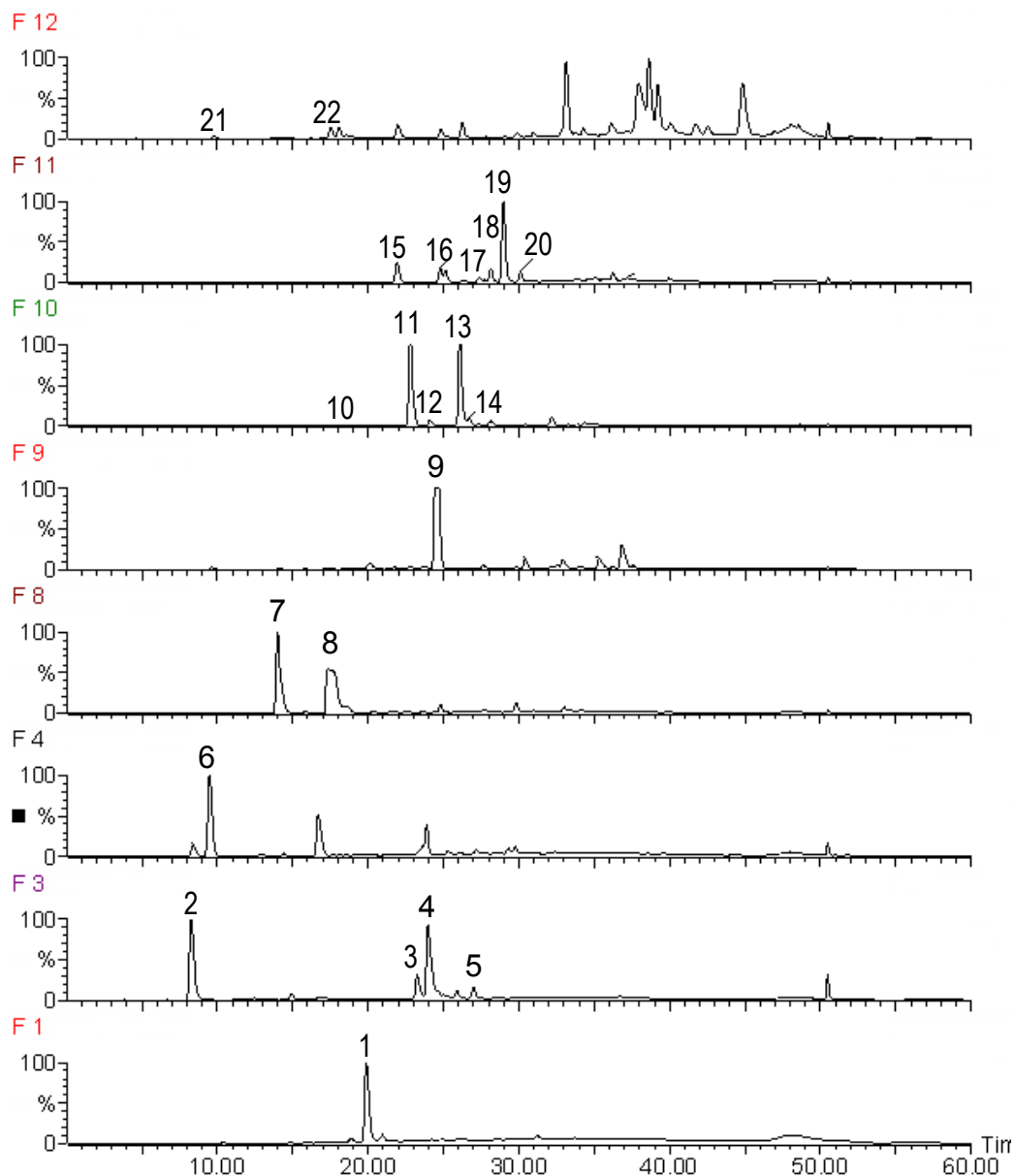


Posición	<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>13</sup> C (ppm)	DEPT
1	-	123,9	Q
2	7,3 m	115	CH
3	-	146	Q
4	-	151	Q
5	6,7 m	117	CH
6	7,3 m	123,1	CH
7	-	170	Q

Figura 15: Ácido Protocatéquico

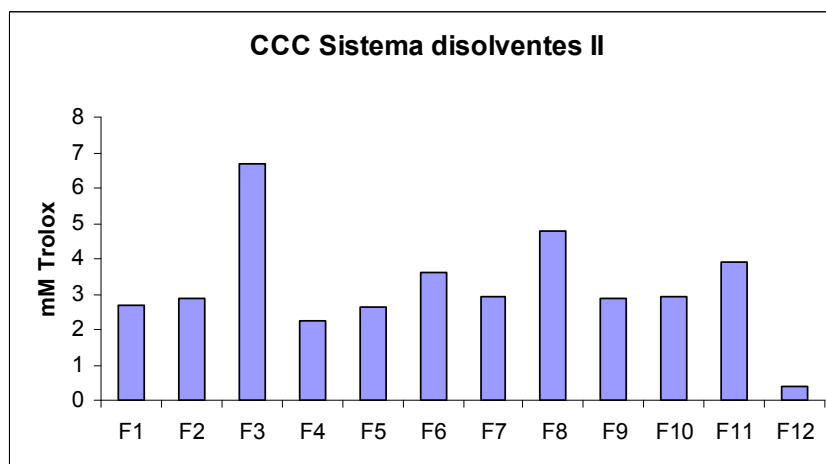
Tabla 7: Resultados RMN para el ácido protocatéquico

Los cromatogramas de las fracciones que se consiguieron identificar compuestos en este CCC se observan en la figura 16:



**Figura 16:** Cromatogramas obtenidos de diferentes fracciones a 280nm. Claves 1-22, las mismas que en tabla 5

Para medir la actividad antioxidante de estas fracciones, se concentraron un poco más que en el caso anterior en una proporción 1mg de muestra: 250 $\mu$ l de metanol (Figura 17).



**Figura 17:** Actividad antioxidante de las 12 fracciones obtenidas con el II sistema de disolventes.

Tal y como puede observarse en la figura 17, la fracción 3 resultó tener una mayor actividad antioxidante que los demás. En dicha fracción se encuentra: el ácido gálico y diferentes ésteres de ácidos cinámicos, ambos han sido relacionados con la actividad antioxidante [21,22], por lo que se justificaría un mayor poder antioxidante frente al resto de fracciones. Cabe resaltar también la actividad antioxidante de la fracción 8. Recordemos que en esta fracción los dos compuestos mayoritarios fueron el ácido protocatéquico y el tyrosol. El ácido protocatéquico ha obtenido buenas correlaciones con la actividad antioxidante en diferentes investigaciones [21,25], del tyrosol por su parte (presente en la fracción 8), ha sido puesta de manifiesto su contribución en recientes investigaciones a la actividad antioxidante en vinos blancos [27].

Además de los compuestos identificados hasta el momento, cabe destacar en este fraccionamiento (presentes en la fracción 9), la presencia de 4 compuestos no identificados, que por su espectro en el UV-Vis y por su masa molecular nos hacen pensar que son derivados hidroxicinámicos, derivados del ácido cafeico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico. A continuación en la siguiente gráfica (Figura 18), pasamos a verlos con un mayor detenimiento.

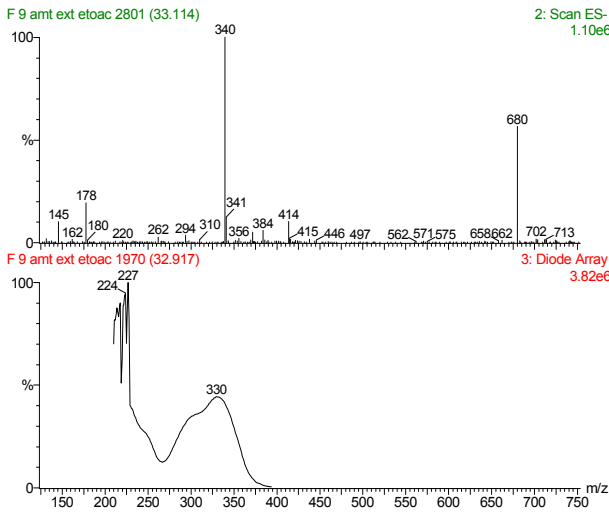


Figura 18a

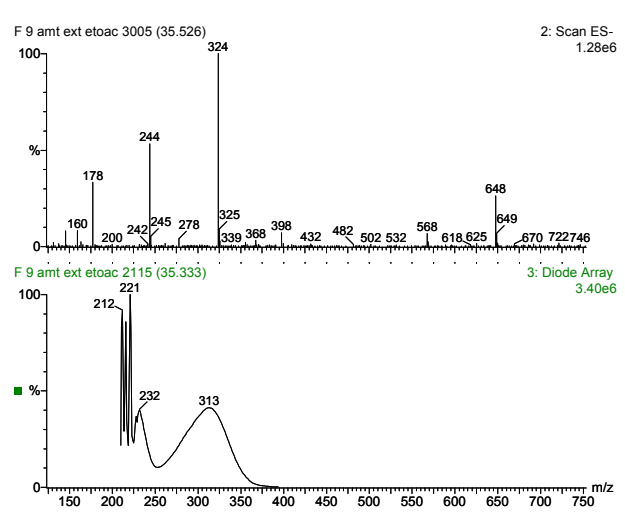


Figura 18b

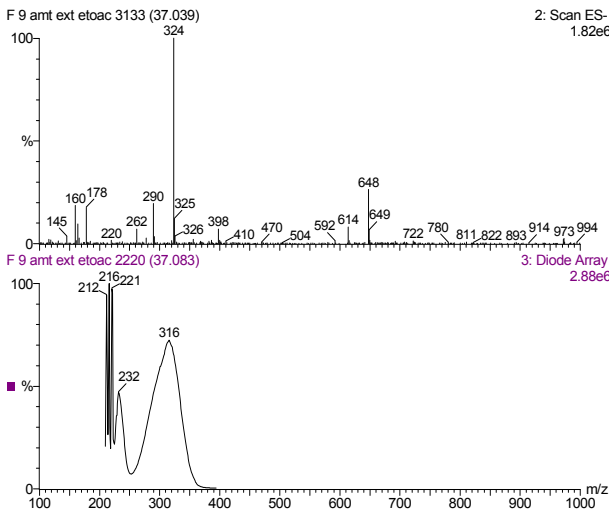


Figura 18c

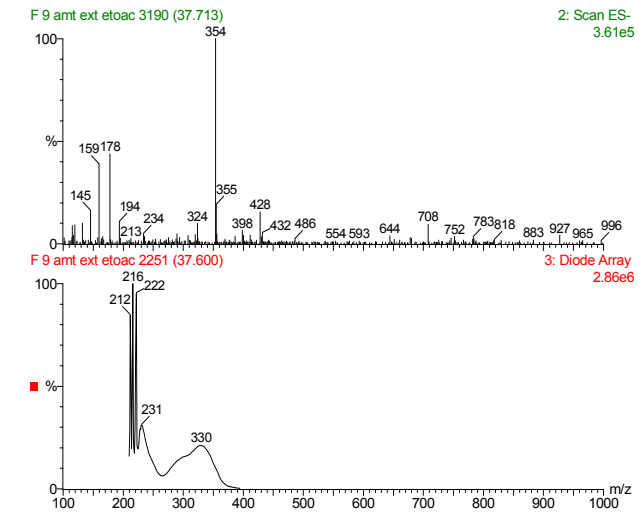


Figura 18d

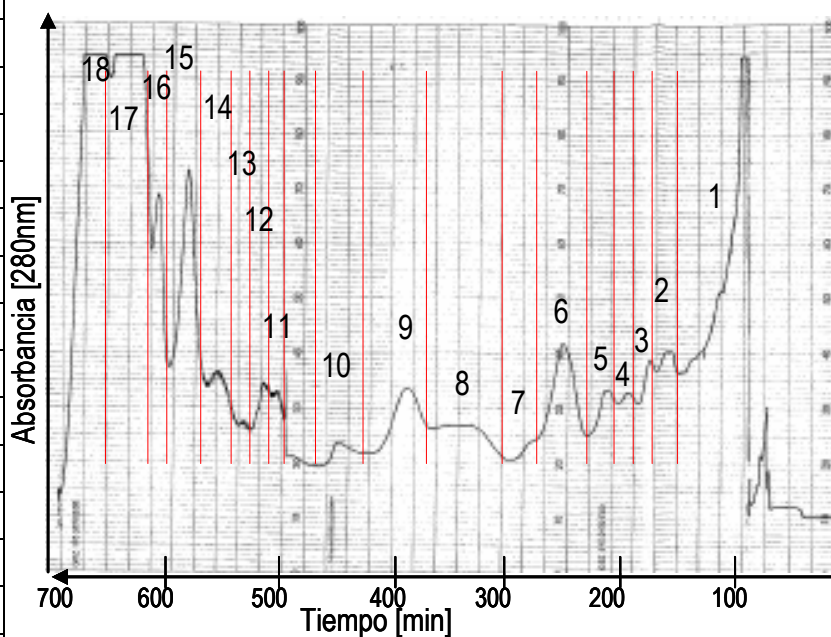
Figura 18: Espectros de los cuatro compuestos hidroxicinámicos desconocidos

## 4.3.1.3. Sistema III: TBME/ n-Butanol/ Acetonitrilo/ Agua (2/2/15)

Se probó un tercer sistema con la intención de conseguir fracciones más simples que nos permitieran identificar más compuestos.

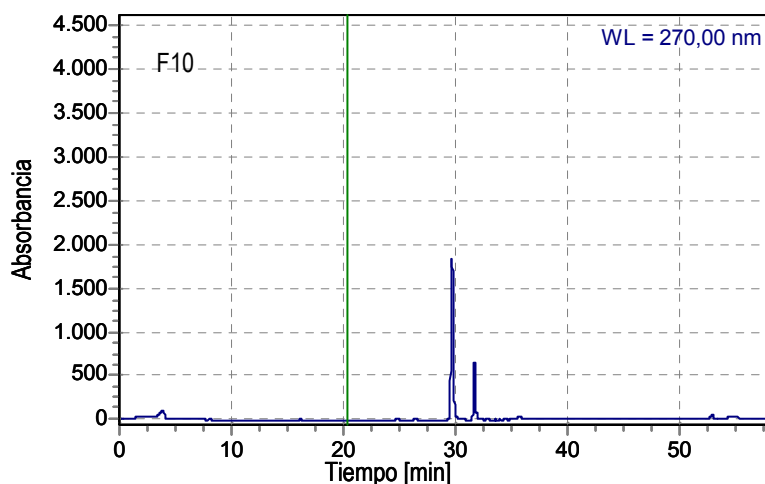
Tal y como se puede observar en el cromatograma de la figura 19 con este sistema de disolventes se obtuvo un excelente fraccionamiento, consiguiendo un total de 18 fracciones. Sin embargo, con este tercer sistema, hubo un problema en la inyección con considerable pérdida de muestra, por lo que las fracciones obtenidas fueron pequeñas tal y como se puede observar en la siguiente tabla (tabla 8).

Fracciones	Peso (mg)
F1	75.3
F2	20.5
F3	8
F4	7.1
F5	8.4
F6	8
F7	7.2
F8	9.2
F9	5.9
F10	12.2
F11	8.5
F12	19.2
F13	12.5
F14	27
F15	17.3
F16	8.64
F17	112.5
F18	36.9



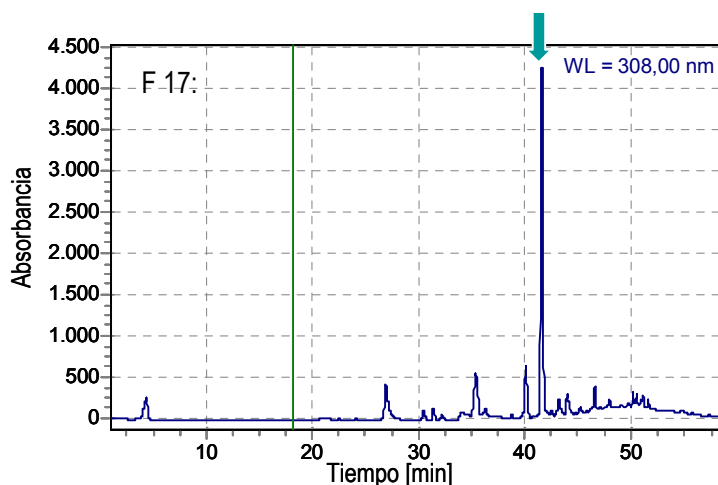
**Tabla 8:** Peso de las diferentes fracciones **Figura 19.** Fraccionamiento obtenido con el sistema de Disolventes III

A pesar del elevado número de fracciones, la mayoría de ellas siguieron teniendo un elevado número de compuestos. Algunas de ellas sí que resultaron ser buenas para aislar compuestos. Así, la fracción 10 resultó tener sólo dos compuestos tal y como se ve en la siguiente figura 20, pero al tener sólo 12 mg, no se consiguieron aislarlos.



**Figura 20:** Fracción 10 obtenido mediante el sistema de Disolventes III

En la fracción 17, se intentó aislar un compuesto mayoritario (tr: 42min) (figura 21), pero la fracción resultó ser todavía muy compleja, con un gran número de compuestos, y la purificación del compuesto mediante HPLC semipreparativo, no fue posible:



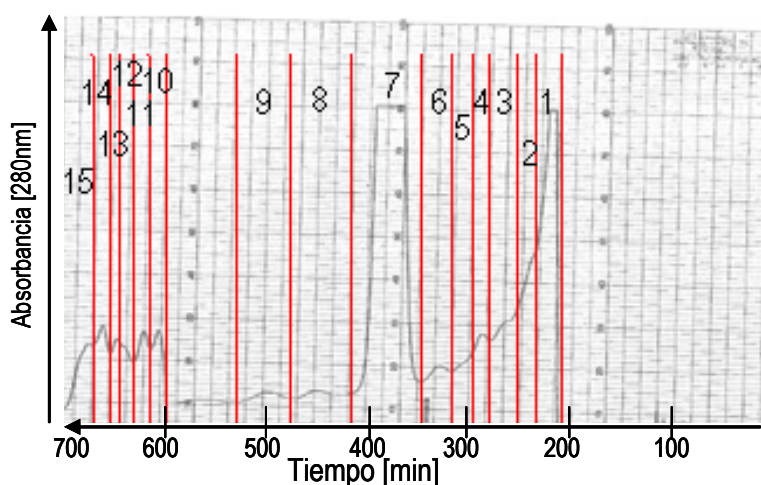
**Figura 21:** Fracción 17 obtenida mediante sistema de solventes III

Con este tercer sistema, no se pudieron aislar más compuestos, pero sí que se consiguieron identificar 4 compuestos más, la catequina en la fracción 14, la esculetina en la fracción 16 y el ácido isovainillico y la isovanillina en la fracción 17, ascendiendo el número de compuestos identificados entre los tres sistemas a 26.

### 4.3.2. Pedro Ximénez

#### 4.3.2.1. Extracto XAD 7

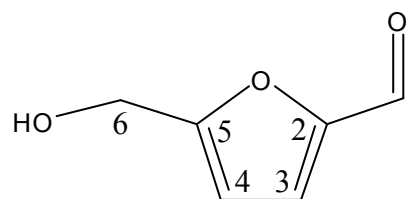
Se utilizaron 6L de vino para obtener un total de 9g de extracto XAD7 aproximadamente. Con este extracto se realizó un solo sistema, el mismo que el primero realizado en el Amontillado. El sistema utilizado: TBME/butanol/Acetonitrilo/agua (1,1/3/1,1/5+0,1%TFA), permitió el siguiente fraccionamiento (Figura 22)



**Figura 22:** Fraccionamiento obtenido para el extracto XAD7 PX

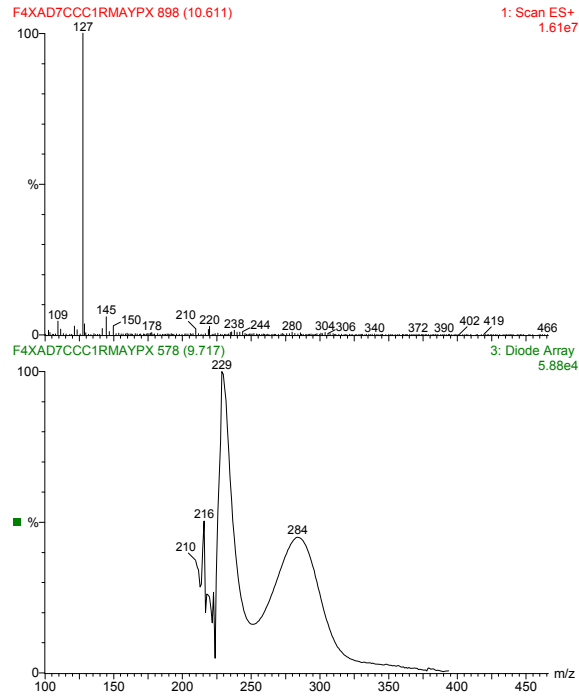
La fracción 4, resultó ser de una extraordinaria pureza, aunque hizo falta de HPLC semipreparativo para poder aislar el compuesto: el hidroximetilfurfural. Los resultados se ven en la figura 23 y tabla 9. Su espectro de UV-Vis y masa se puede observar en la figura 24.

Posición	<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>13</sup> C (ppm)	DEPT
1	9,4 s	179	CH
2	-	154	q
3	7,3 d (J=3,6 Hz)	125	CH
4	6,5 d (J=3,6 Hz)	111	CH
5	-	163	q
6	4,4 s	57,6	CH <sub>2</sub>



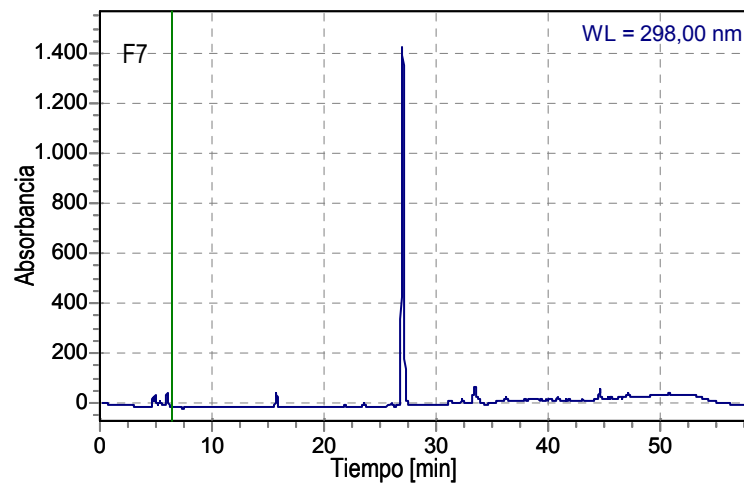
**Tabla 9:** Datos RMN para el hidroximetilfurfural

**Figura 23:** Hidroximetilfurfural



**Figura 24:** Espectro de UV-Vis y Masas para el Hidroximetilfural

La fracción 7 (figura 25), también resultó ser una fracción bastante limpia; se le realizó un RMN, pero no se pudo elucidar su estructura química por tener todavía demasiadas impurezas. Debido a la escasa cantidad que se tenía, no se pudo purificar.



**Figura 25:** Cromatograma de la fraccion 7



De las 11 fracciones que se obtuvieron, en la siguiente tabla (tabla 7), se observa el peso de cada fracción con los compuestos identificados en cada una de ellas. Se identificaron un total de 19 compuestos.

Fracciones	Peso (mg)	Compuestos identificados
F1	250	
F2	33	
F3	47	
F4	60	Hidroximetilfurfural
F5	28.1	
F6	6.7	
F7	11	
F8	11.7	Ácido Gálico
F9	65.1	Ácido Protocatéquico, tyrosol
F10	21	Protocatequialdehído, ácido caftárico, isovainillina, <i>p</i> -hidroxibenzaldehído, ácido vainíllico, ácido <i>p</i> -cutárico, ácido trans-fertárico
F11	50	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, <i>p</i> -hidroxibenzaldehído, vainillina, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido <i>p</i> -cumárico (cis y trans) y coniferaldehído

**Tabla 10:** Peso e identificación de compuestos de las fracciones obtenidas para el extracto XAD7 PX

Debido a que varias fracciones habían sido utilizadas en HPLC- Semipreparativo, no se pudo medir la actividad antioxidante de dichas fracciones.

#### 4.3.2.2. Extracto XAD2

Se utilizó el mismo sistema de disolventes que para el extracto XAD 7. El hecho de utilizar Amberlita XAD2, es porque esta resina es muy afín a los polifenoles glucosilados, y como el vino Pedro Ximénez, se trata de un vino dulce, se pensó que podía ser interesante los resultados. No obstante, en contra de nuestras hipótesis preliminares, el fraccionamiento resultó muy similar al del extracto XAD7 tal y como se puede observar en la figura 26. Se obtuvieron 15 fracciones, en las cuales se encontraron prácticamente los mismos compuestos que en el extracto XAD 7.

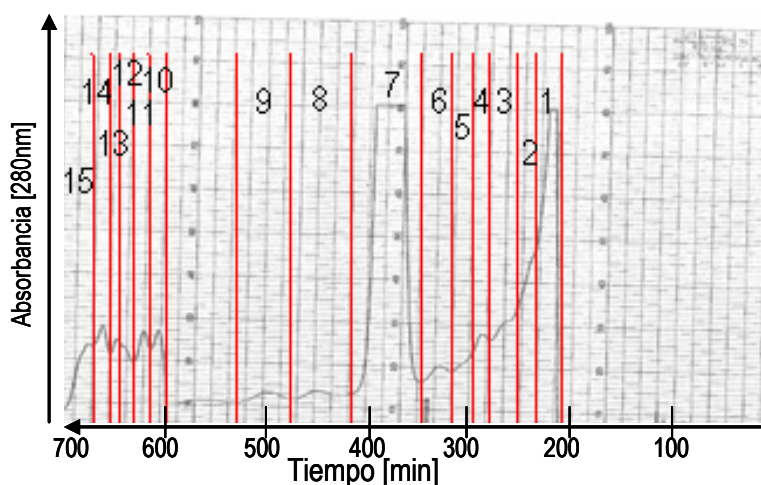


Figura 26: Fraccionamiento obtenido para el extracto XAD2 PX.

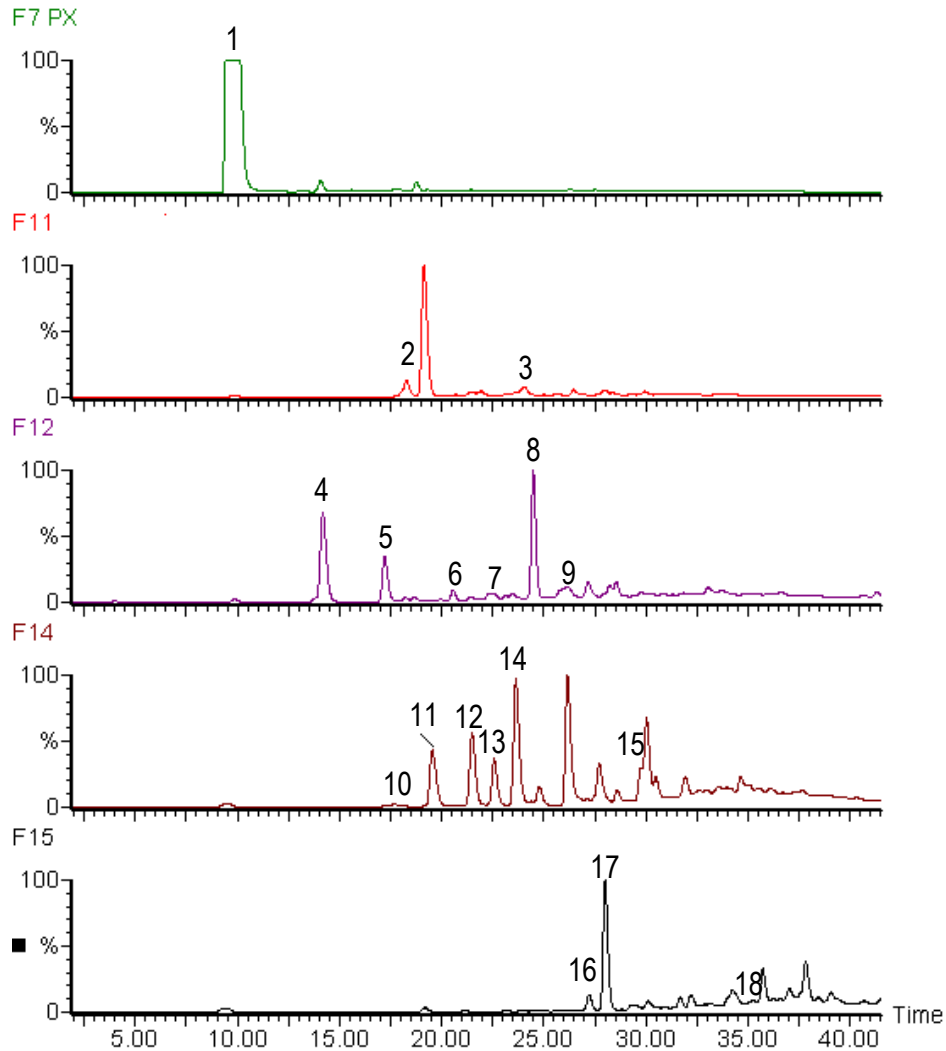
El peso de las diferentes fracciones se puede observar en la tabla 11

Fracciones	Peso (mg)	Compuestos identificados
F1	183	
F2	28	
F3	30	
F4	91	
F5	5:	
F6	68	
F7	90	Hidroximetilfurfural <sup>1</sup>
F8	110	
F9	14,2	
F10	130,7	
F11	11:	Tyrosol <sup>2</sup> , Siringialdehido <sup>3</sup>
F12	16	Ácido protocatéquico <sup>4</sup> , protocatequialdehido <sup>5</sup> , isovainillina <sup>6</sup> , esculetina <sup>7</sup> ácido siríngico <sup>8</sup> , ácido ferúrico <sup>9</sup>
F13	10,8	
F14	18	Ácidoisovainílico <sup>10</sup> , ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico <sup>11</sup> , <i>p</i> -hidroxibenzaldehido <sup>12</sup> , ácido vainílico <sup>13</sup> , ácido cafeico <sup>14</sup> , ácido ferúlico <sup>15</sup>
F15	30	Ácido <i>p</i> -cumárico (cis <sup>16</sup> y trans <sup>17</sup> ), Sinapaldehido <sup>18</sup>

Tabla 11: Peso y compuestos identificados en este fraccionamiento

En este fraccionamiento se consiguieron identificar un total de 18 compuestos, de los cuales, la esculetina, el sinapaldehido, el ácido isovainílico y el siringialdehido no fueron identificados con

el extracto XAD7, por lo que entre los dos extractos se identificaron un total de 23 compuestos en el vino Pedro Ximénez. En la figura 27 observamos los cromatogramas de las fracciones donde se consiguieron identificar compuestos.



**Figura 27:** Compuestos identificados en las diferentes fracciones obtenidas para el extracto XAD2 de PX.  $\lambda = 280\text{nm}$

A estas fracciones se le analizó su poder antioxidante, dando los siguientes resultados que se ven en la figura 28

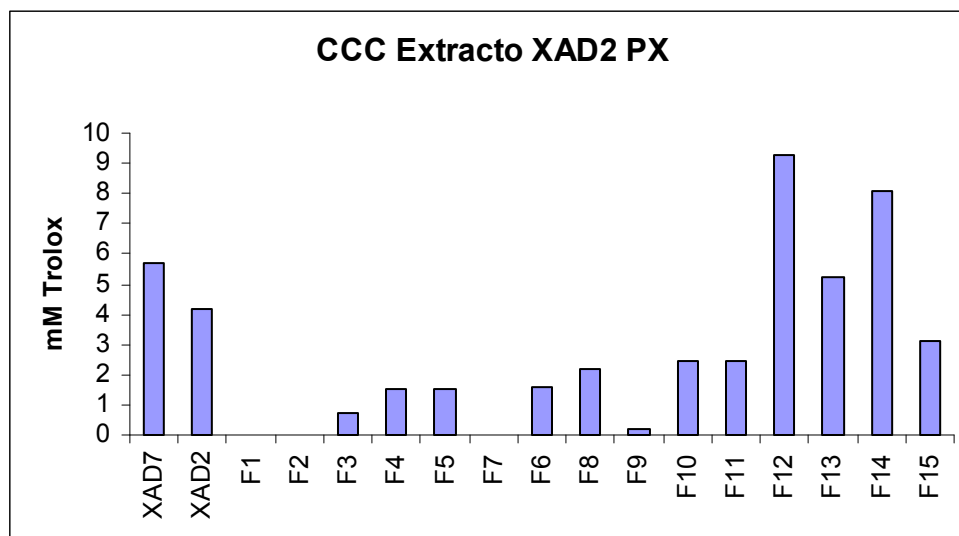


Figura 28: Actividad antioxidante de las fracciones del extracto XAD 2.

Al igual que ocurría en el caso del Amontillado, la actividad antioxidante del extracto crudo (en la gráfica XAD2), no es muy elevada si se compara con fracciones tales como F12 o F14, justificándose este hecho por un posible efecto antagónico entre los polifenoles presentes.

Observamos como las fracciones 12 y 14, son las que presentaron una mayor actividad antioxidante. En la fracción 12 los compuestos identificados fueron ácido protocatéquico, protocatequialdehído, isovanillina, esculetina, ácido siríngico y ácido ferúrico, siendo el ácido protocatéquico y el ácido siríngico, los mayoritarios. Como se ha ido viendo anteriormente, ambos han sido relacionados con la actividad antioxidante [26], pudiendo ser los responsables en gran medida de la actividad antioxidante de esta fracción. En la fracción 14, se identificaron el ácido isovainílico, el ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido vainílico, ácido cafeico y ácido ferúrico, siendo el ácido cafeico el mayoritario. El ácido cafeico ha sido relacionado en numerosas investigaciones con el poder antioxidante [27-28], pudiendo ser el compuesto que de forma mayoritaria contribuiría al poder antioxidante de esta fracción. En el proceso de elaboración del vino Pedro Ximénez tal y como se ha visto con anterioridad, las uvas se pasifican; en este proceso de pasificación debido a las altas temperaturas, se produce la reacción de Maillard; Moreno y col. [29] han encontrado en mostos de variedad Pedro Ximénez una elevada correlación entre la actividad antioxidante y la concentración de azúcares, así como entre la actividad antioxidante y la absorbancia a 420nm, atribuido a los compuestos que se producen en el pardeamiento durante la reacción de Maillard, sugiriendo que los compuestos resultantes de esta reacción contribuyen de una manera importante en la actividad antioxidante

del Pedro Ximénez. Además, no hay que olvidar, que son algunos los autores que correlacionan el Hidroximetilfurfural con la actividad antioxidante [30] y puesto que este es el compuesto mayoritario de forma indiscutible de este vino, no se descarta esta posibilidad. En este sentido, Zhao y col., [31] estudiaron la actividad antioxidante de diferentes extractos de uvas pasas, llegando a la conclusión de que la elevada actividad antioxidante de estos compuestos se debía al contenido en ácido fenólicos de bajo peso molecular y al Hidroximetilfurfural, y no a los polifenoles de elevado peso molecular como ocurre en el caso del vino tinto. Por tanto, en base a la bibliografía y a la experiencia obtenida podemos decir que no hay un único compuesto responsable en gran medida de la actividad antioxidante, sino que son varios los factores que hacen que este vino procedente de uva blanca, tenga una elevada actividad antioxidante.

En la tabla 12 encontramos una tabla resumen de los compuestos identificados en ambos vinos:

Compuestos	Tiempo de retención	$\lambda_{\max}$ (nm)	Mw	Fragmentos ESI+	Fragmentos ESI-
Ácido Gálico	8.28	271	170	171	169
Hidroximetilfurfural	9.52	283	126.11	127	-
Epigallocatequina*	13.75	278	306.28	-	-
Ácido Protocatequico	14.02	260 y 290	154	155	153
Tyrosol	17.3	276	138.16	-	137
Catequina*	18.01	278	290	-	-
Protocatequialdehído	17.52	280 y 310	138	140	137
Ácido Caféico	19.90	329	330	-	149,180,312
Ácido isovainílico	19.26	268 y 305	168	170	168
Ácido <i>p</i> -ohbenzoico	20.11	255		-	137
<i>p</i> -ohbenzaldehído	21.93	283.5	122	123	121
Isovainillina	20.40	276 y 306	152	154	152
Esculetina	22.53	298 y 350	178.15	179	177
Ácido Vainílico	22.75	261 y 293	168	170	168
Ácido Cafeico	24.10	325	180	180	178
Ácido <i>cis</i> <i>p</i> -cutárico	23.26	312	314	-	149,163,296
Ácido <i>trans</i> <i>p</i> -cutárico	24.01	314	314	-	149,163,296
Ácido Siringico	24.42	274	198	199	197
Vainillina	24.78	280 y 310	152	153	151
Siringialdehído	25.91	308	182	184	182
Ácido Fectárico	25.99	329	344	-	149,193,326
Escopoletina	26.45	275 y 340	192	193	191

Veratraldehido	27.38	278 y 305	167	168	-
Ácido cis <i>p</i> -cumárico	28.13	298	164	166	163 y 119
Ácido trans <i>p</i> -cumárico	28.97	310	164	166	163 y 119
Ácido Ferúlico	30.08	323	194	195	193
Coniferaldehido*	36.18	340	178	-	-
Sinapaldehido	36.95	339	208.2	210	-

\*Compuestos que no se han identificado por el espectro de masas, pero sí por su espectro de UV-Vis y tiempo de retención coincidente con el patrón.

**Tabla 12:** Compuestos identificados en ambos vinos.

#### 4.4. CONCLUSIONES

A modo de conclusión, podemos constatar a partir de esta experiencia, la compleja matriz polifenólica de los dos vinos estudiados, consecuencia probablemente en el amontillado de su particular modo de elaboración, combinación de crianza biológica y oxidativa en el sistema de envejecimiento de Solera y Criaderas en barrica de roble americano, y en el caso del Pedro Ximénez de su elevado contenido en azúcar.

También podemos confirmar, tal y como se ha visto, que el HSCCC, es una técnica idónea para la identificación y aislamiento de compuestos en matrices complejas como es el caso, siendo una excelente herramienta en el futuro para poder aislar nuevos compuestos en el vino de Jerez.

#### 4.5. BIBLIOGRAFIA

- [1] **García Moreno, M.V, García Barroso, C.** (2002). Comparison of the evolution of low molecular weight phenolic compounds in typical Sherry wines: Fino, Amontillado, and Oloroso. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (26), 7556-7563
- [2] **Estrella, M.I., Hernández, M.T., Olano, A.** (1986). Changes in polyalcohol and phenol compound contents in the ageing of sherry wines. *Food Chemistry*, 20 (2), 137-152.
- [3] **Zea, L., Moyano, L., Medina, M.** (2008). Odorant active compounds in Amontillado wines obtained by combination of two consecutive ageing processes. *European Food Research and Technology*, 227 (6), 1687-1692.
- [4] **Recamales, A.F., Hernanz, D., Álvarez, C., González-Miret, M.L., Heredia, F.J.** (2007). Colour of Amontillado wines aged in two oak barrel types *European Food Research and Technology* 224 (3), 321-327.
- [5] **Serratos, M.P., Lopez-Toledano, A., Merida, J., Medina, M.** (2007). Changes in color and phenolic compounds during the raising of grape Cv. Pedro Ximénez. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (8), 2810-2816.

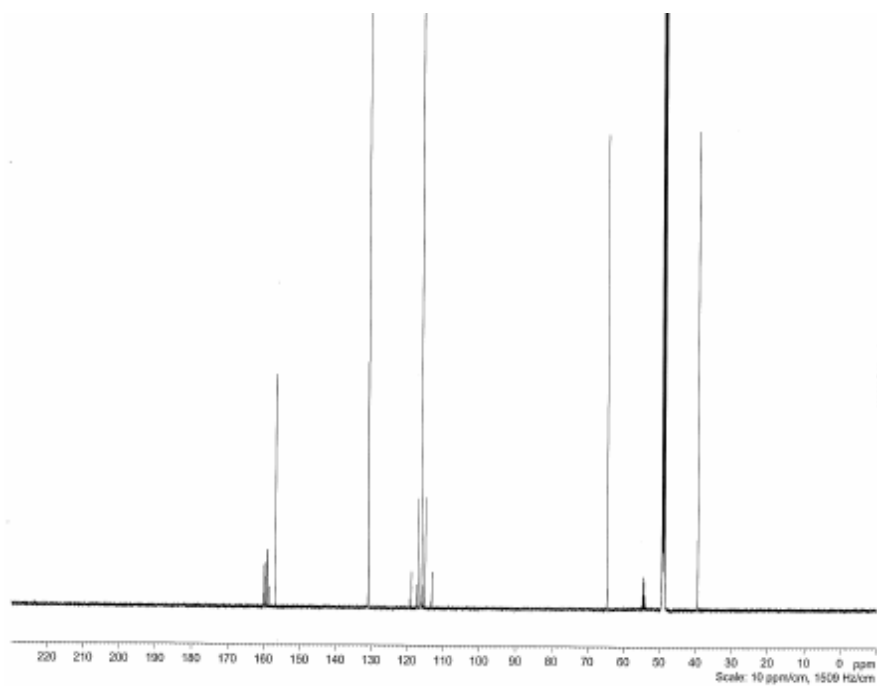
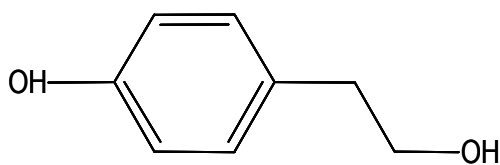
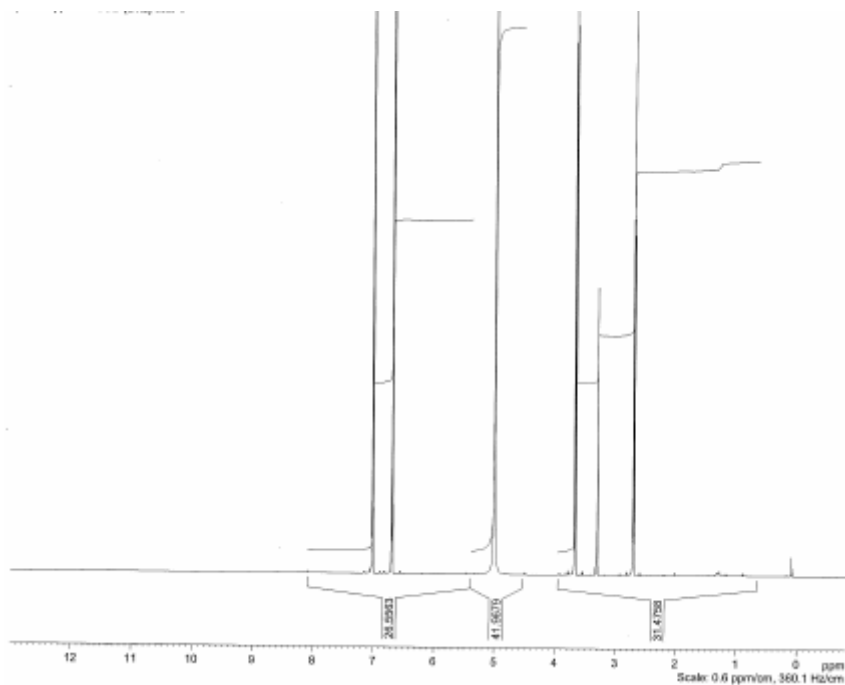
- [6] **Peinado, J., Lopez de Lerma, N., Moreno, J., Peinado, R.A.** (2009). Antioxidant activity of different phenolics fractions isolated in must from Pedro Ximénez grapes at different stages of the off-vine drying process. *Food Chemistry*, 114 (3), 1050-1055.
- [7] **Márquez, R., Castro, R., Natera, R., García-Barroso, C.** (2008). Characterisation of the volatile fraction of Andalusian sweet wines. *European Food Research and Technology*, 226 (6), 1479-1484.
- [8] **Hillebrand, S., Schwarz, M., Winterhalter, P.** (2004). Characterization of anthocyanins and pyranoanthocyanins from blood orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (24), 7331-7338.
- [9] **Eichhorn S., Winterhalter P.** (2005). Anthocyanins from pigmented potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Food Research International*, 38 (8-9), 943-948.
- [10] **Hillebrand, S., Montilla, E.C., Köhler, N., Winterhalter, P.** (2009). Cyanidin-based anthocyanins from fruits and vegetables: Large-scale isolation by countercurrent chromatography *Agro Food Industry Hi-Tech*, 20 (4), 52-55.
- [11] **Qiu F., Luo J., Yao S., Ma L., Kong L.** (2009). Preparative isolation and purification of anthocyanins from purple sweet potato by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Separation Science*, 32 (12), 2146-2151.
- [12] **Salas E., Duenas M., Schwarz M., Winterhalter P., Cheynier V., Fulcrand H.** (2005). Characterization of pigments from different high speed countercurrent chromatography wine fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (11), 4536-4546.
- [13] **Degenhardt A., Hofmann S., Knapp H., Winterhalter P.** (2000). Preparative isolation of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and application of the color activity concept to red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (12), 5812-5818.
- [14] **Noguer M., Cerezo A.B., Rentzsch M., Winterhalter P., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C.** (2008). Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (19), 8879-8884.
- [15] **Baderschneider B., Winterhalter P.** (2001). Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (6), 2788-2798.
- [16] **Winterhalter, P.** (2007). Application of countercurrent chromatography (CCC) to the analysis of natural pigments. *Trends in Food Science and Technology*, 18 (10), 507-513.
- [17] **Ito, Y.** (2005). Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1065 (2), 145-168.
- [18] **Köhler N.** (2008). Tesis Doctoral. Univerisidad técnica de Braunschweig, instituto química de los alimentos.

- [19] **Alonso, Á.M., Guillén, D.A., Barroso, C.G.** (2003). Development of an electrochemical method for the determination of antioxidant activity. Application to grape-derived products. *European Food Research and Technology*, 216 (5), 445-448.
- [20] **Palma & Barroso**, (1998), Patente nacional P9601884.
- [21] **Alonso, Á.M., Castro, R., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Barroso, C.G.** (2004). Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Research International*, 37 (7), 715-721.
- [22] **Feliciano, R.P., Bravo, M.N., Pires, M.M., Serra, A.T., Duarte, C.M., Boas, L.V., Bronze, M.R.** (2009). Phenolic content and antioxidant activity of moscatel dessert wines from the setúbal region in Portugal. *Food Analytical Methods*, 2 (2), 149-161.
- [23] **Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Bayir, Y., Halici, M.** (2005). Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*. 76 (2), 216-219.
- [24] **Parker, T.L., Miller, S.A., Myers, L.E., Miguez, F.E., Engeseth, N.J.** (2010). Evaluation of synergistic antioxidant potential of complex mixtures using oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and electron paramagnetic resonance (EPR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (1), 209-217.
- [25] **Mudnic, I., Modun, D., Rastija, V., Vukovic, J., Brizic, I., Katalinic, V., Kozina, B., Medic-Sarice, M., Boban, M.** (2010). Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry*, 119 (3), 1205-1210.
- [26] **Dudley, J.I., Lekli, I., Mukherjee, S., Das, M., Bertelli, A., Das, D.K.** (2008). Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: Resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (20), 9362-9373.
- [27] **Zhao, H., Chen, W., Lu, J., Zhao, M.** (2010). Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, 119 (3), 1150-1158.
- [28] **Cheng, J.-C., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.-L.** (2007). Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 104 (1), 132-139.
- [29] **Moreno, J., Peinado, J., Peinado, R.A.** (2007). Antioxidant activity of musts from Pedro Ximénez grapes subjected to off-vine drying process. *Food Chemistry*, 104 (1), 224-228.
- [30] **Fernández-Pachón, M.S., Villaño, D., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C.** (2006). Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta*, 563 (1-2 SPEC. ISS.), 101-108.
- [31] **Zhao, B., Hall III, C.A.** (2008). Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. *Food Chemistry*, 108 (2), 511-518.

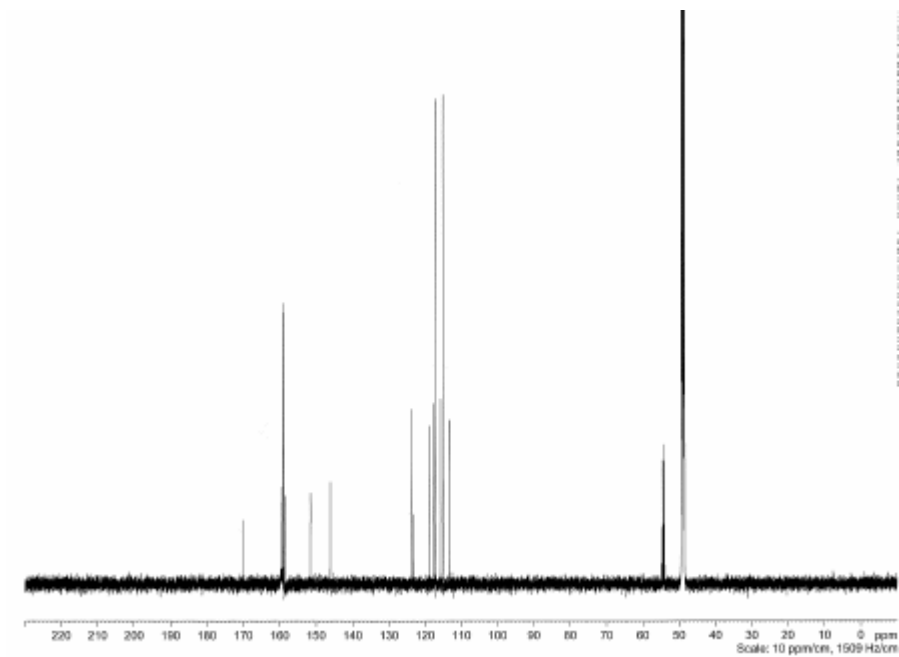
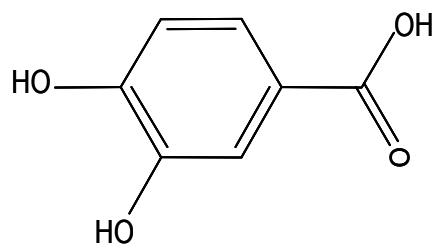
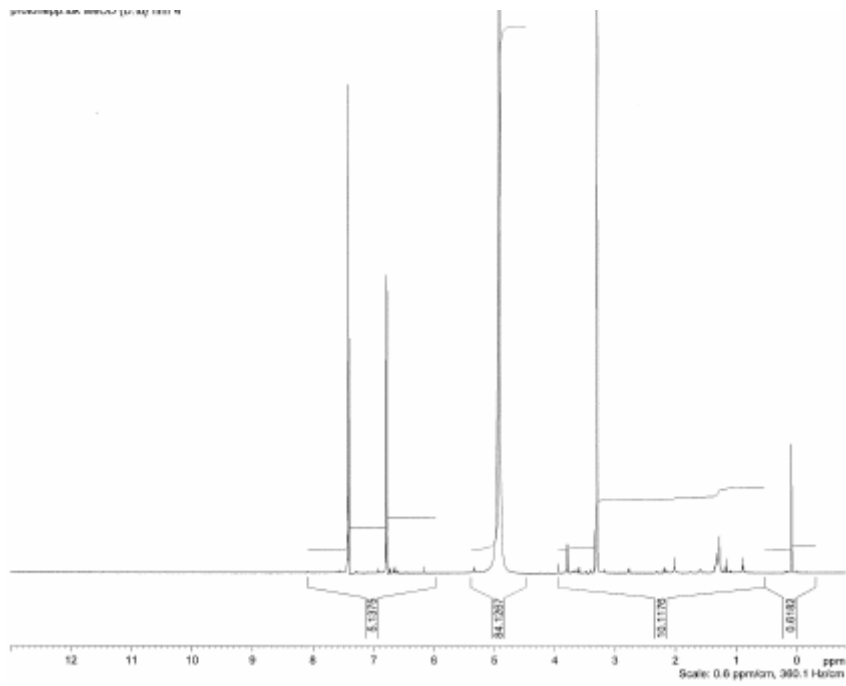


## 7.5. ANEXO I: ESPECTROS $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

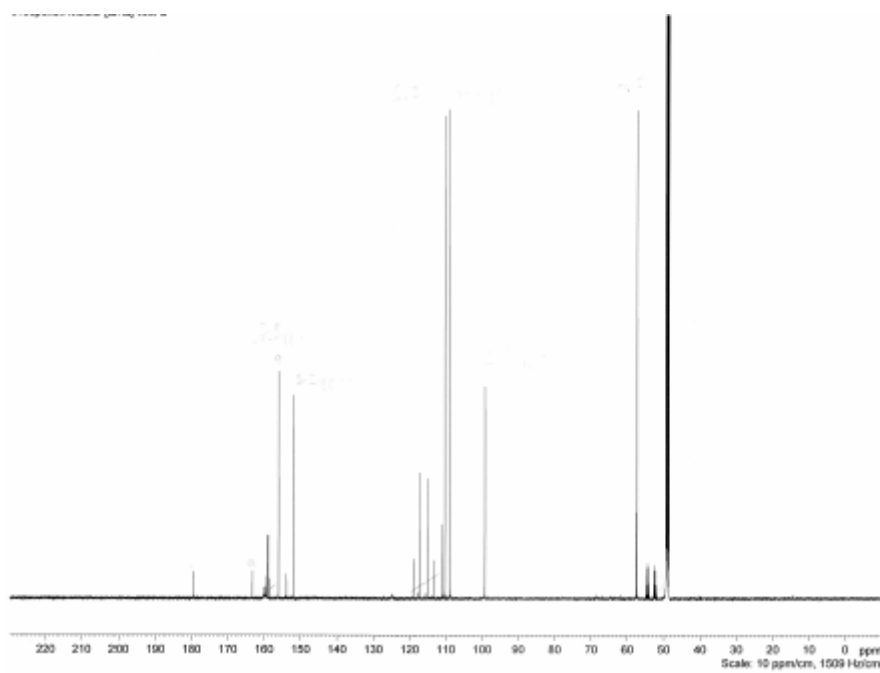
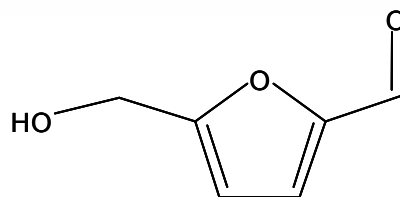
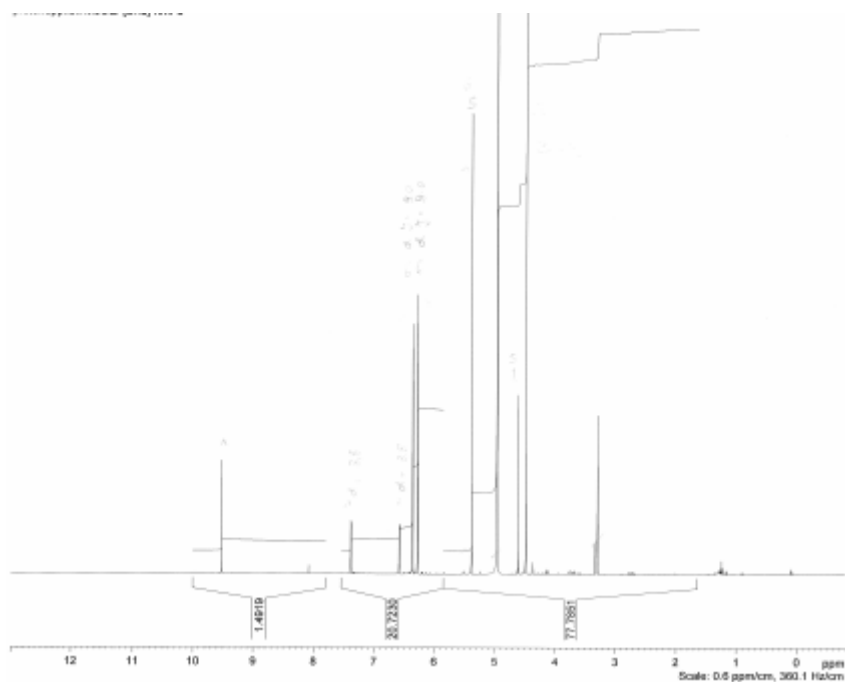
### TYROSOL:



### ÁCIDO PROTOCATÉQUICO



### HIDROXIMETILFURFURAL



**CARACTERIZACION DE SISTEMAS DE  
ENVEJECIMIENTO EN VINOS Y  
BRANDIES DE JEREZ**



**5. CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE UN BRANDY  
DE JEREZ DURANTE SU ENVEJECIMIENTO EN UN  
SISTEMA DE SOLERA Y CRIADERAS.  
INFLUENCIA DEL ENVINADO**



## 5.1. INTRODUCCION

Gracias al desarrollo de la tecnología y de los métodos de control, ha surgido una continua preocupación por la puesta en el mercado de productos cada vez de mayor calidad, lo que sin duda se debe a un importante incremento de la competencia y el desarrollo de la economía de mercado. Hoy en día se busca que el producto que llegue al consumidor sea de calidad y satisfaga exigencias, que cada vez son mayores.

Los Brandyes de Jerez gozan de una etapa de envejecimiento en barricas de roble, siguiendo el tradicional sistema de Solera y Criaderas que se traduce en importantes cambios en las características organolépticas del producto de partida. Es durante la etapa de envejecimiento cuando se producen numerosas transformaciones físico-químicas [1,2].

Son numerosos los trabajos que relacionan los polifenoles con el envejecimiento (debido fundamentalmente a la cesión de la madera) del vino [3-5] o del brandy [6-8]. El color también ha sido utilizado en repetidas ocasiones como un marcador de la edad en el vino [9,10]. En el caso de los ácidos orgánicos, aunque no tienen una relación directa con el envejecimiento, en el caso del Brandy de Jerez juega un papel importante ya que su presencia se debe, en gran parte al envinado de la bota [11], que por otro lado es condición indispensable para el envejecimiento del Brandy, según marca el reglamento de la denominación específica Brandy de Jerez. Además, los ácidos orgánicos han sido utilizados en diferentes trabajos como parámetros, junto a otros, indicadores de la edad de productos enológicos [12,13].

Con vistas a garantizar la calidad del Brandy, en el presente capítulo se ha caracterizado analíticamente una solera de envejecimiento de Brandy de Jerez envinada con Pedro Ximénez. El hecho de que las botas se encuentren envinadas con vino dulce, variedad Pedro Ximénez, junto con su particular elaboración, hace de este brandy un producto de muy elevada calidad, por lo que resulta importante tenerlo bien caracterizado para proteger su autenticidad y así poder evitar futuros fraudes. Se han realizado muestreos periódicos cada dos meses durante dos años, haciéndolos coincidir con las operaciones de sacas y rocíos. En este capítulo se ha estudiado la evolución de diferentes parámetros en dicha solera: color, índice de polifenoles totales, ácidos orgánicos de cadena corta, e identificación y cuantificación de polifenoles presentes en el Brandy, con dos objetivos fundamentales: establecer un modelo que nos permita clasificar las



muestras en función de su vejez media y por otro determinar como influye el envinado en el producto final, comparando nuestras muestras con otros Brandies de investigaciones anteriores.

## 5.2. MATERIALES Y METODOS

### 5.2.1. Muestras

Las muestras proceden de un sistema formado por una solera y 8 criaderas (Figura 1) de botas envinadas con vino dulce variedad Pedro Ximénez, suministradas por la Bodega Sánchez Romate. Las operaciones de sacas y rocío se realizaron 4 veces al año, es decir, cada tres meses, haciendo coincidir dicho momento con los muestreos realizados, obteniendo a lo largo de dos años un total de 72 muestras.

De acuerdo con el Consejo Regulador del Brandy de Jerez y atendiendo a su edad media de envejecimiento, hay tres categorías de Brandy: Brandy de Jerez Solera (envejecido por un mínimo de seis meses), Brandy Solera Reserva (envejecido como mínimo de un año) y Solera Gran Reserva (envejecido por un período de tiempo superior a los tres años). A partir del calendario de sacas y rocíos suministrados por la Bodega, y con la ayuda de las fórmulas del cálculo del tiempo medio de envejecimiento, se pudieron establecer los tiempos medios reales de cada una de las muestras, englobando a las muestras de la 8ª Criadera dentro de los Brandies Solera, los pertenecientes a la 6ª y 7ª Criadera dentro de los Brandies Solera, y al resto en el grupo de los Brandies Solera Gran Reserva.

Para ver la influencia del envinado se decidió comparar este grupo de muestras con otros dos grupos de Brandies de anteriores investigaciones:

- Muestras procedentes de un sistema Piloto experimental de Solera y Criaderas constituido por 15 botas de roble americano envinadas con vino de Jerez oloroso. El seguimiento analítico fue realizado durante 5 años [2, 14].
- Un conjunto de Brandies de Jerez Comerciales, todos ellos suministrados por los servicios de inspección del consejo Regulador de la Denominación Especifica Brandy de Jerez, que las recibió ya embotelladas desde los almacenes de cada una de las empresas inscritas en el Registro de Bodegas de elaboración y envejecimiento de Jerez [11,14].

### 5.2.2. Análisis de polifenoles

Se realizó utilizando un sistema Acquity UPLC de Waters acoplado a un detector de ultravioleta-visible (UV-Vis), mediante una columna Acquity UPLC BEH C18, de dimensiones 100x2.1 mm de diámetro interno, con 1.7  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, siguiendo el método explicado en el anterior capítulo [15].

### 5.2.3. Determinación de ácidos orgánicos de cadena corta

Los distintos ácidos orgánicos presentes en las muestras fueron determinados por cromatografía de exclusión iónica (IEC) con detección conductimétrica, siguiendo el método descrito por Guillén y col. [16]. Todas las muestras fueron previamente filtradas mediante filtros de membrana de 0.45 $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Para incrementar la sensibilidad en la detección, se añade una solución tampón en el flujo de entrada de columna.

La columna utilizada fue: Phenomenex (Rezex ROA-Organic AcidH+8%, 300x7.8 mm). La temperatura de la columna se mantuvo a 60°C, el volumen de inyección 40  $\mu\text{l}$ , y el flujo utilizado de 0.5 mL min<sup>-1</sup>.

Se estudió, para cada ácido orgánico, el área de pico obtenido mediante empleo de detección conductimétrica directa, a excepción del ácido cítrico para el cual se utilizó la altura de pico. Los distintos ácidos orgánicos han sido cuantificados tras la realización de sus rectas de calibrado. Para ello se emplearon los correspondientes patrones con una disolución al 40% etanol con objeto de utilizar una matriz similar al Brandy. En la tabla 1, se ven las condiciones de dichas curvas de calibrado:

Compuestos	Rango (mg L <sup>-1</sup> )	Ecuaciones	R <sup>2</sup>	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )
Ácido Cítrico	20-1000	$y = 4.5728x + 36.883$	0.999	13.234	44.121
Ácido Tartárico	80-4000	$y = 210.13x - 1083.6$	0.999	32.352	107.84
Ácido Málico	60-3000	$y = 199.33x + 1634.3$	0.999	31.622	105.411
Ácido Succínico	14-700	$y = 223.64x - 122.33$	0.997	9.994	33.313
Ácido Láctico	10-500	$y = 68.401x + 491.9$	0.999	12.112	40.361
Ácido Fórmico	10-500	$y = 289.44x + 562.86$	0.999	6.473	21.577
Ácido Acético	20-1000	$y = 175.11x + 2991.4$	0.999	10.578	31.256

**Tabla 1.** Curvas de calibrado de los ácidos orgánicos

#### 5.2.4. Medida del Color

Todas las muestras fueron sometidas a medición de su espectro UV-Vis, cada 10 nm, en el intervalo de 380-770 nm, empleando un espectrofotómetro Helios Gamma (Unicam, Cambridge, Reino Unido) para posterior cálculo de los parámetros CIELab. Como iluminante se utilizó el D65 con un ángulo de observación de 10°. La parametrización de los espectros registrados hasta sus coordenadas cromáticas se realizó por duplicado, según las directrices del método oficial de la Comisión Internacional de l'Eclairage (C.I.E.) [17]

#### 5.2.5. Índice de polifenoles totales

Se analizó siguiendo el método de Folin-Ciocalteu [18]. El calibrado se realizó con disoluciones de ácido gálico entre 0 y 1000 mg L<sup>-1</sup> (0, 250, 500, 750 y 1000 mg L<sup>-1</sup>) medidas por duplicado y los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico (Gallic Acid Equivalents, GAE). La recta resultante fue:

$$\text{GAE (mg/L)} = (\text{Abs}_{750} - 0.024) / 0.0011$$

#### 5.2.6. Tratamiento estadístico

Dentro de la caracterización del sistema de Solera y criaderas, para cada compuesto, Anova de un factor fue realizado para poder determinar diferencias significativas entre los tres diferentes grupos de muestras. Un análisis de componentes principales fue aplicado para estudiar su diferenciación en base a las tres categorías de Brandies. Por último, y para poder obtener las ecuaciones que nos va a permitir poder clasificar una muestra en uno de los grupos comerciales estudiados se realizó un análisis lineal discriminante.

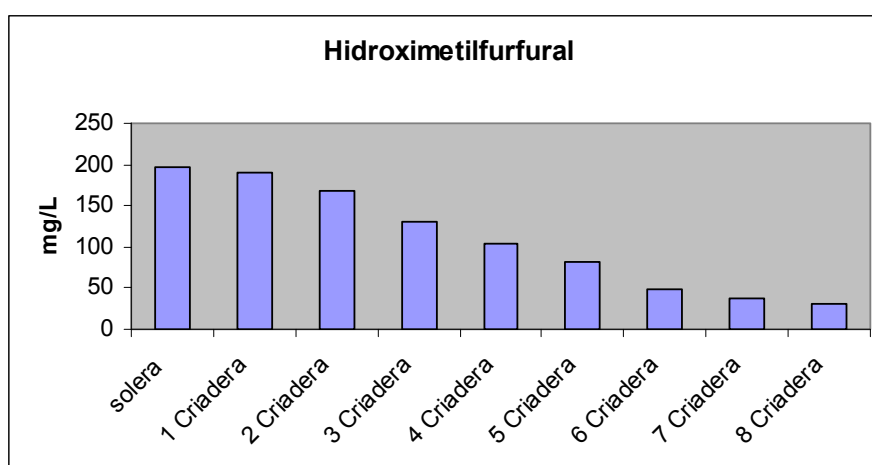
Se comparó este grupo de muestras con otros dos conjuntos de brandies de investigaciones anteriores, realizándoles un análisis de componentes principales y análisis lineal discriminante.

Todo fue realizado mediante el Software Statistica 7.0 (Tulsa, Oklahoma, USA).

## 5.3. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.3.1. Compuestos polifenólicos y aldehídos furánicos

La relación entre compuestos polifenólicos y envejecimiento ha sido probada y motivo de numerosos estudios [3-5]. Muchos de los polifenoles estudiados proceden de la cesión desde la madera durante el envejecimiento, como ocurre con los ácidos gálico, protocatéuico o vainílico [3], mientras otros como los ácidos *p*-cumárico o el ácido cafeico provienen del envinado de las botas. Por su parte, los aldehidos furánicos tienen distinta procedencia: por un lado, los furfurales están ya presentes en el destilado de origen, como consecuencia del calentamiento que sufren los compuestos aromáticos en el proceso de destilación [19-21]; además los aldehidos furánicos están presentes en el brandy por la extracción de la madera [22-23], y por último la presencia del hidroximetilfurfural puede ser debida a la práctica permitida de adición de caramelo una vez que ha sido envejecido el brandy [24]. La adición de caramelo es una práctica habitual antes del embotellado final, para rectificar el color del producto. No es el caso de nuestras muestras, ya que las muestras objeto de este estudio han sido analizadas inmediatamente después del muestreo sin haber sufrido ninguna adición. Además, el hidroximetilfurfural en este caso particular tiene otra vía de incorporación más: el envinado de las botas. Las botas tal y como se ha dicho anteriormente están envinadas con un vino dulce elaborado con uvas pasas de la variedad Pedro Ximénez; las uvas pasas debido a las altas temperaturas que soportan durante su pasificación, adquieren altos niveles en hidroximetilfurfural [25]. En el gráfico 1, se observa la diferente concentración en las distintas escalas en uno de los muestreos.



**Figura 1:** Evolución del Hidroximetilfurfural a lo largo de un muestreo (Junio 2008)

En cuanto a la evolución temporal de los compuestos, en el gráfico de la figura 2 se han representado sólo los correspondientes a la escala de la solera por considerarse la más representativa del brandy. Al observar la evolución de los compuestos, se detecta un ligero aumento a lo largo del tiempo, aunque en general hay poca evolución, lo cual parece indicar que el sistema se encuentra en una fase de equilibrio. Los sistemas de Solera y Criaderas se caracterizan al principio por una cesión importante y ascendente de todos los compuestos, para pasados unos años llegar a una fase de estabilidad [14], en la cual estaría en este momento este sistema.

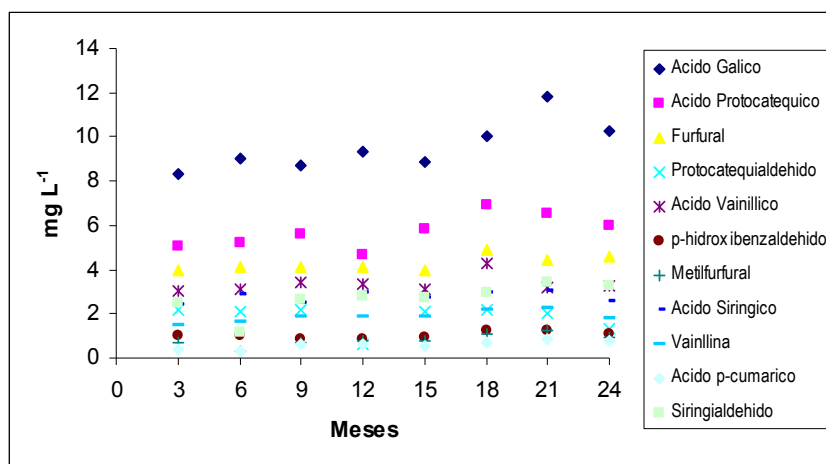


Figura 2. Evolución de los polifenoles a lo largo de dos años en la escala Solera

### 5.3.2. Ácidos orgánicos

De los ácidos orgánicos estudiados, los ácidos tartárico, láctico y acético fueron los que presentaron mayores concentraciones, tal y como se observa en la figura 3, donde se muestran los contenidos en las 8 escalas en unos de los muestreos realizados.

Los ácidos acético y láctico están presentes en el aguardiente de partida. Si a esto le sumamos los aportados por el envinado de la bota, esto podría justificar las elevadas concentraciones. En el caso del ácido tartárico (mayoritario en los vinos de Jerez, [12]), se trata exclusivamente de una cesión por parte de la bota, procedente del envinado, ya que ni en la madera de roble, ni en el aguardiente de partida, se encuentra dicho compuesto [11].

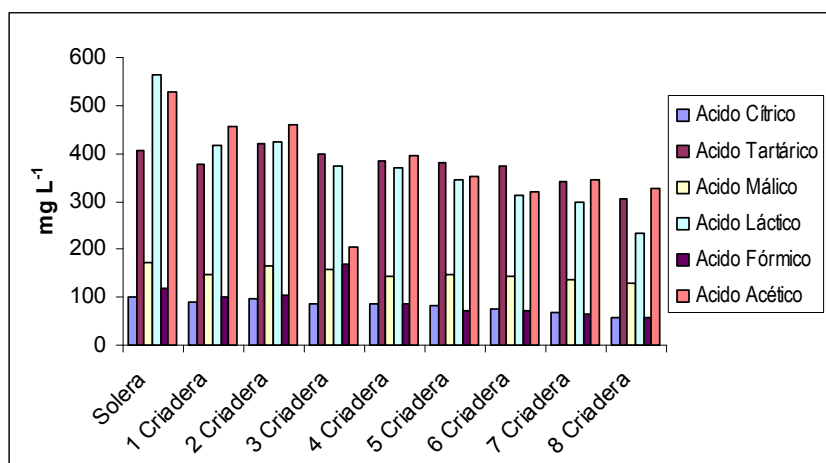


Figura 3: Evolución de los ácidos orgánicos (Marzo 2007)

Como se observa en la figura 3, las concentraciones de los ácidos orgánicos para los brandies de la solera y por tanto los más envejecidos son las más elevadas, lo que ya comprobaron Moreno y col [26].

### 5.3.3. Color e Índice de polifenoles totales

De acuerdo a los valores de los parámetros cromáticos de la tabla 2, las muestras más envejecidas, correspondientes a la solera y primeras criaderas, presentan un color más oscuro (menor valor del parámetro luminosidad  $L^*$  y tono  $H^*$ ) con una tonalidad amarillo-marrón más acusada (mayores valores de  $a^*$  y  $b^*$ ).

En la figura 4, proyección de las variables  $CIE_{Lab}$   $a^*$  frente a  $b^*$ , se observa como hay un cierto solapamiento entre las diferentes escalas, aunque si parece evidente que hay una diferenciación entre las mismas que se ve claramente, si comparamos las muestras más jóvenes (8<sup>a</sup> Criadera) con las más envejecidas (Solera).

Muestras	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$H^*$	$C^*$
Solera	54.488	30.686	81.113	79.277	86.723
1 Criadera	56.126	29.445	80.959	70.013	86.148
2 Criadera	58.352	27.651	80.761	71.099	85.362
3 Criadera	60.969	25.592	79.903	72.241	83.901
4 Criadera	62.462	24.293	79.383	72.984	83.017
5 Criadera	64.829	21.124	76.094	74.484	78.972
6 Criadera	67.515	19.075	75.261	75.777	77.641
7 Criadera	67.860	18.803	73.777	75.701	76.135
8 Criadera	73.601	12.721	63.931	78.745	65.184

Tabla 2: Parámetros Cromáticos (Marzo 2007)

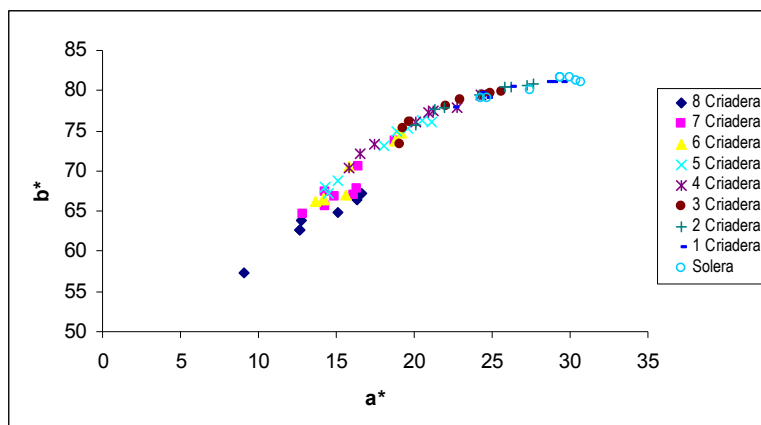


Figura 4: Proyección de las coordenadas cromáticas  $a^*$  frente  $b^*$

Atendiendo al índice de polifenoles totales (Figura 5), se observa como dentro de la misma escala apenas hay evolución temporal, detectándose claras diferencias entre las distintas escalas. Esto confirmaría la hipótesis anteriormente comentada en relación al resto de parámetros, de que el sistema objeto de estudio se encuentra en una fase de estabilidad.

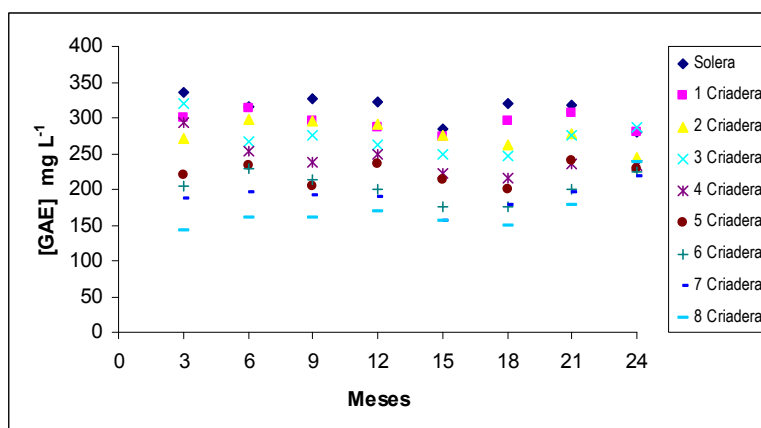


Figura 5: Evolución del Índice de polifenoles totales a lo largo de los dos años

### 5.3.4. Tratamiento estadístico

Se realizó un estudio estadístico del conjunto de muestras analizadas. Tal y como se dijo anteriormente, atendiendo a su tiempo medio de envejecimiento, los brandies correspondientes a la 8ª Criadera pertenecen a la categoría de brandies Solera, los de la 6ª y 7ª Criaderas a la de Solera Reserva y el resto de escalas corresponden con brandies Solera Gran Reserva. En primer lugar, se investigó mediante análisis de la varianza la posibilidad de diferenciar los distintos tipos comerciales de brandies en base a los parámetros estudiados. De acuerdo a la tabla 3, todas las variables excepto furfural presentaron diferencias significativas entre los

diferentes tipos de Brandy. El hecho de que el furfural no lo haga puede ser debido a que su presencia en el brandy no solo es debido al envejecimiento en madera, sino también a que la propia materia prima del brandy, el destilado de uva, lo contiene, por lo que no se podría utilizar como marcador de envejecimiento [27].

	Media S	Media SR	Media SGR	p-Valor
Ácido Gálico	4.951	5.576	7.539	0.000001
5-Hydroximetilfurfural	30.5919	65.147	143.732	0.000000
Ácido Protocatéquico	3.054	3.703	4.851	0.000005
Furfural	3.142	3.674	4.183	0.466996
Protocatequialdehído	0.817	1.026	1.469	0.000566
Ácido Vainílico	1.181	1.554	2.687	0.000000
p-hydroxibenzaldehído	0.442	0.545	0.794	0.000003
Metilfurfural	0.377	0.401	0.689	0.006298
Ácido Siríngico	1.096	1.369	2.129	0.000000
Vainillina	0.772	0.989	1.485	0.000000
Ácido p-cumárico	0.286	0.379	0.558	0.000031
Siringialdehído	1.175	1.505	2.193	0.000000
L*	63.762	70.314	70.576	0.000001
a*	14.089	15.898	22.986	0.000000
b*	66.340	69.011	77.402	0.000000
H*	73.596	76.922	77.073	0.000000
C*	68.262	70.831	80.813	0.000000
Ácido Cítrico	48.587	61.277	83.038	0.000000
Ácido Tartárico	292.493	349.182	407.562	0.000000
Ácido Máfico	111.187	126.955	148.625	0.000000
Ácido Succínico	218.118	256.335	356.101	0.000000
Ácido Láctico	49.921	62.787	90.698	0.000000
Ácido Fórmico	330.452	341.368	397.452	0.000239

**Tabla 3:** Análisis de la varianza para cada compuesto

Al conjunto de las variables se les realizó comparaciones post-hoc (Bonferroni), y se vio que ninguno de los compuestos permite discriminar entre los distintos grupos, por lo que se decidió tratar al conjunto de muestras mediante análisis multivariante.

Al realizar un análisis de componentes principales la varianza explicada fue del 80% utilizando las tres primeras componentes, si bien es la primera componente con un 61.5% la que contribuye de manera significativa.

En la figura 6 se observa cómo la mayoría de las variables se asocian a la componente 1. Debido a que la relación entre polifenoles y envejecimiento es sobradamente conocida [2-8] y que tanto el color [9,10], como los ácidos orgánicos [11-13] han sido utilizados anteriormente como marcadores del envejecimiento, podemos suponer que la dimensión de la componente 1, se asocia con la edad de envejecimiento. Por otro lado, el furfural presenta de nuevo un comportamiento algo distinto, representando el mayor peso en la componente 2, que de acuerdo



a la hipótesis planteada anteriormente estaría relacionada con la naturaleza de los destilados usados en el sistema de envejecimiento.

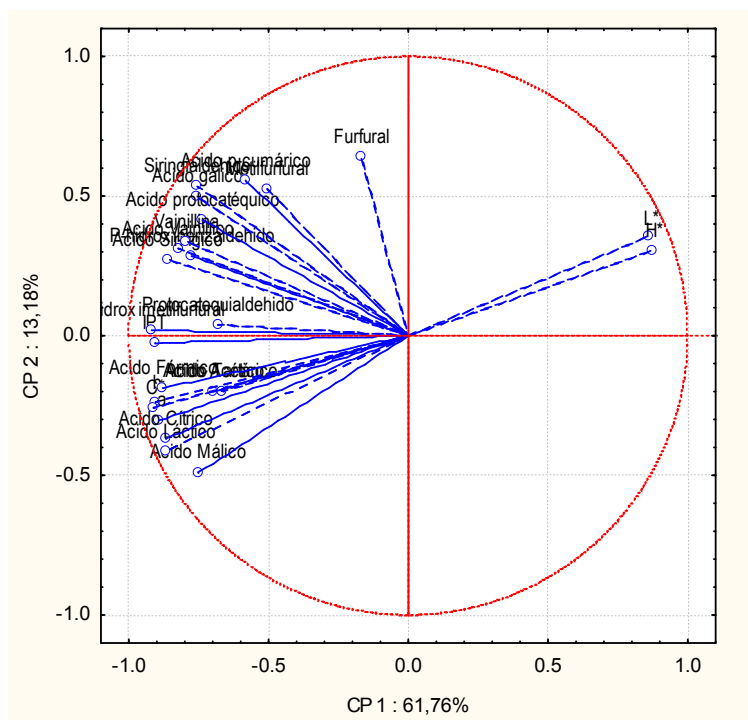


Figura 6: Proyección de las variables sobre el plano de las componentes principales

Al analizar la figura 7, proyección de las muestras sobre el plano de las componentes principales, se observa un ordenamiento a lo largo de la componente 1, relacionada con el envejecimiento.

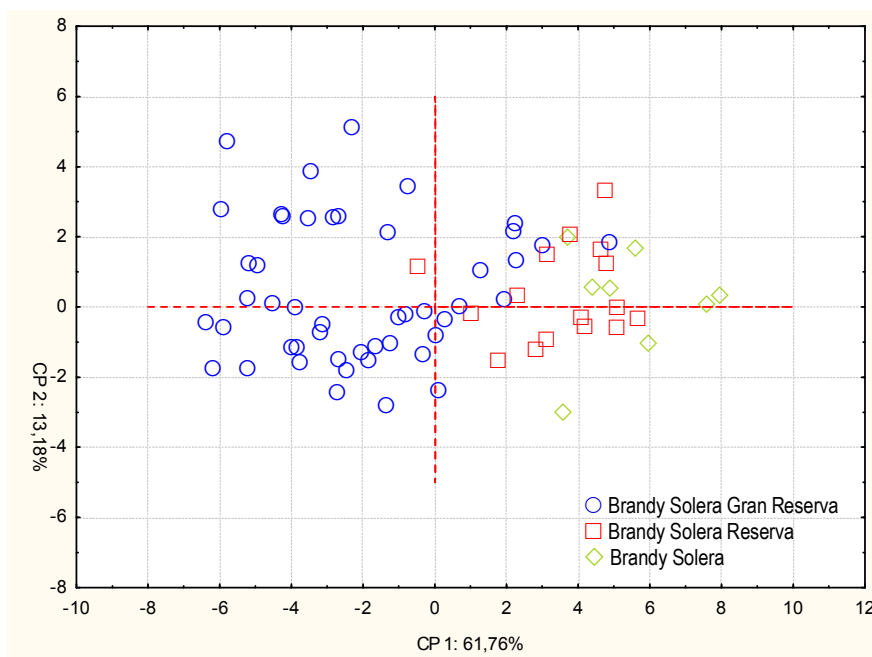
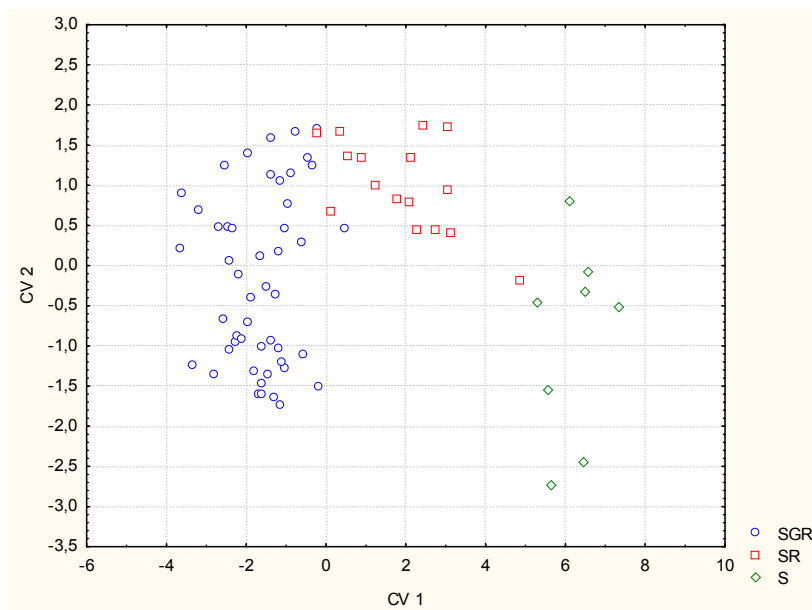


Figura 7: Análisis de componentes principales: proyección de las muestras.

Se estudió la posibilidad de diferenciar de manera analítica los tipos comerciales de Brandy de Jerez, utilizando para ello la técnica estadística multivariante de obtención de funciones discriminantes lineales a partir de los parámetros estudiados. La aplicación del LDA a la totalidad de los datos, extrae como variables significativas de capacidad discriminante a las siguientes:  $a^*$ ,  $b^*$ , ácido cítrico, ácido málico e índice de polifenoles totales.

Como hemos visto anteriormente las variables cromáticas nos dan una información muy importante a la hora de clasificar nuestras muestras en función del envejecimiento por lo que parece lógico que aparezcan como unas de las variables con más peso en nuestro modelo discriminativo. La relación del parámetro índice de polifenoles totales con el envejecimiento es de sobra conocida, lo cual justifica también la aparición de esta variable como una de las que más discrimina. El peso de los ácidos orgánicos en el modelo discriminativo, tiene su origen en el envinado de las botas, así cuanto más tiempo ha estado envejecida en la bota, mayor cantidad de estos ácidos orgánicos, pudiéndose utilizar en el caso particular del Brandy de Jerez, como un parámetro relacionado con el envejecimiento, de ahí que aparezcan como variables significativas en el modelo discriminante.

La clasificación obtenida fue para los Solera Gran Reserva del 97 %, la de los Solera Reserva del 87.5 %, y la de los Brandyes pertenecientes al grupo Solera del 100%. Esto se visualiza en la figura 8, donde efectivamente, se ve como hay una clara diferenciación entre los tres grupos.



**Figura 8:** Análisis lineal discriminante. Proyección de los casos en el plano canónico

### 5.3.5. Influencia del envinado

Para determinar la influencia del envinado de las botas se compararon los parámetros estudiados, con otros resultados de anteriores trabajos de investigación [11,14]. Aunque en el apartado de Materiales y métodos se han mencionado estas muestras, haremos un breve repaso a ellas. Las muestras vistas a lo largo del capítulo (envejecidas en botas envinadas con vino Pedro Ximénez), se compararon con otros dos grupos de muestras:

- Un sistema Piloto de Solera y Criaderas constituido por 15 botas de roble americano envinadas con vino de Jerez Oloroso. El seguimiento analítico fue realizado durante 5 años. (2,11). Al tratarse de un sistema experimental puesto a punto por miembros de nuestro grupo de investigación, nos consta que es un sistema en el que no hubo adición de caramelo ni ninguna otra práctica permitida por el consejo regulador y que es usual en las bodegas de la zona.
- Un conjunto de Brandies de Jerez Comerciales, todos ellos suministrados por los servicios de inspección del consejo Regulador de la Denominación Especifica Brandy de Jerez, que las recibió ya embotelladas desde los almacenes de cada una de las empresas inscritas en el Registro de Bodegas de elaboración y envejecimiento de Jerez [11,14]. De este conjunto de muestras, según la información recibida, tan sólo uno fue envejecido en botas envinadas con Pedro Ximénez (la muestra con la nomenclatura BSGR25); a esta muestra se le hizo un seguimiento especial, para ver su posible similitud con las muestras que se han visto en el presente capítulo por presentar un envejecimiento similar. Este conjunto de muestras a pesar de ser todos Brandies de Jerez, presentan una gran heterogeneidad, puesto que cada uno ha sido elaborado siguiendo las directrices propias de cada bodega, y cuya información es siempre complicada de recibir puesto que forma parte del “secreto de elaboración” de las mismas.

Se les realizó un análisis de componentes principales al conjunto de muestras, obteniendo interesantes resultados. Las variables utilizadas fueron las vistas hasta el momento: compuestos polifenólicos, parámetros cromáticos y ácidos orgánicos. Con las tres primeras componentes se explicó el 85% de la varianza, si bien es la primera componente la que mayor peso tiene con un 65.34%. En la figura 9, se observa como hay una clara diferenciación de los tres grupos

estudiados a lo largo de la componente 1. El ordenamiento hacia abajo a lo largo de la componente 2, se asociaría al tiempo de envejecimiento, situándose las muestras más envejecidas en la parte de abajo del gráfico.

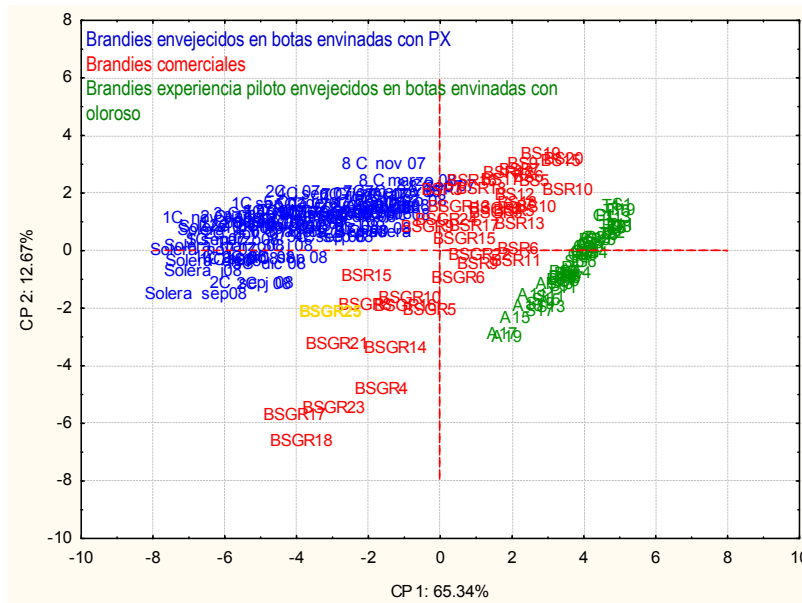


Figura 9: Análisis de componentes principales: Proyección de los casos.

El BSGR25 es un brandy Solera Gran Reserva del grupo de los comerciales, cuyo envejecimiento ha sido realizado en una bota envinada con vino Pedro Ximénez. En el gráfico 9 es la muestra que está de amarillo. Como se puede observar, está prácticamente rozando con el grupo de muestras que habían sido envejecidas con Pedro Ximénez, confirmando por tanto su similitud en su elaboración.

Si analizamos el peso de las variables con respecto a las componentes (gráfico 10), observamos como en la componente 1, los compuestos con un mayor peso son los ácidos orgánicos, los parámetros cromáticos y el hidroximetilfurfural. Los ácidos orgánicos son compuestos cuya aparición en el brandy, tal y como se ha mencionado anteriormente, se debe en gran medida al envinado previo de la bota. Los parámetros cromáticos son también variables, que dependen mucho del envinado de la bota, así un brandy envejecido en bota envinada con Pedro Ximénez, tendrá un color mucho más oscuro que aquel que ha sido envejecido en botas envinadas con oloroso. Todo esto nos hace presuponer que la componente 1 podría estar relacionada con el origen del envinado de la bota. Por su parte, el hidroximetilfurfural es un compuesto que como se ha visto anteriormente puede aparecer por varias razones, siendo una de ellas la aportación del vino Pedro Ximénez en aquellas botas que previamente habían contenido dicho vino, estando

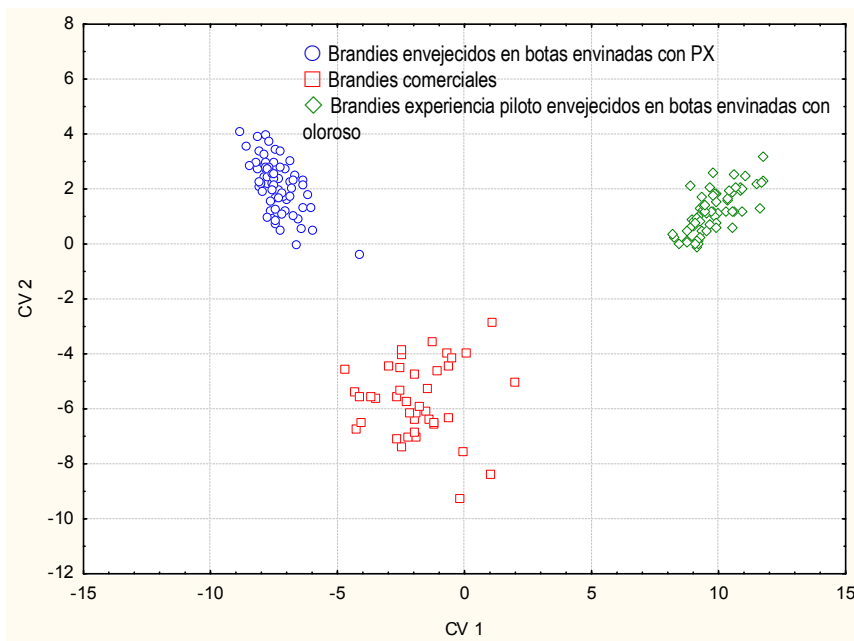


Compuestos	$\rho$ -valor
Ácido Máfico	0.000000
H	0.000000
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.000009
<i>a</i> *	0.003279
Ácido Tartárico	0.000000
Vainillina	0.000008
Hidroximetilfurfural	0.000000
Ácido vainílico	0.000000
Siringaldehido	0.000057
<i>b</i> *	0.000000
C	0.000000
Ácido láctico	0.000837

**Tabla 4:** Variables discriminantes en el Análisis lineal Discriminante

Podemos observar como la mayoría de las variables que resultaron ser discriminantes en el modelo están relacionadas con el envinado de la bota: los ácidos orgánicos, los parámetros cromáticos, el ácido *p*-cumárico y el hidroximetilfurfural.

La clasificación obtenida para los tres grupos fue del 100%, tal y como se puede ver en la siguiente gráfica:



**Figura 11:** Análisis lineal discriminante: Proyección de los casos en el plano canónico

## 5.4. CONCLUSIONES

Debido a que el proceso de envejecimiento del Brandy de Jerez es una de sus etapas más importantes, y en donde adquiere, en mayor medida, sus especiales características, la caracterización de diferentes parámetros analíticos y su seguimiento a lo largo de dos años de envejecimiento en un sistema de Solera y Criaderas realizados en el presente trabajo, se considera de una gran utilidad para establecer parámetros objetivos de calidad, con vistas a su control, detección de fraude, toma de decisiones en su proceso de elaboración, etc. Además, se ha demostrado que los parámetros estudiados, polifenoles, parámetros cromáticos y ácidos orgánicos, son variables discriminantes importantes a la hora de clasificar a los brandies en función de su vejez.

Por otro lado, se ha visto como algunos de los parámetros estudiados, como los ácidos orgánicos o los parámetros cromáticos son variables que podrían servir para diferenciar el origen del envinado en un grupo heterogéneo de muestras, sirviendo por tanto, como parámetros que verifican la autenticidad del Brandy de Jerez.

## 5.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] **Martinez Montero C., Rodriguez Dodero M.D.C., Guillen Sanchez D.A., Garcia Barroso C.** (2005). Sugar contents of Brandy de Jerez during its aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (4), 1058-1064.
- [2] **Rodríguez Dodero, M.C., Guillén-Sánchez, D.A., Schwarz Rodríguez, M., García-Barroso, C.** (2010). Phenolic compounds and furanic derivatives in the characterization and quality control of Brandy de Jerez. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2), 990-997.
- [3] **Cadahía, E., De Simón, B.F., Vallejo, R., Sanz, M., Broto, M.** (2007). Volatile compound evolution in Spanish oak wood (*Quercus petraea* and *Quercus pyrenaica*) during natural seasoning. *Am American Journal of Enology and Viticulture*, 58 (2), 163-172.
- [4] **García Moreno, M.V, García Barroso, C.** (2002). Comparison of the evolution of low molecular weight phenolic compounds in typical Sherry wines: Fino, Amontillado, and Oloroso. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (26), 7556-7563.
- [5] **Hernández, T., Estrella, I., Dueñas, M., De Simón, B.F., Cadahía, E.** (2007). Influence of wood origin in the polyphenolic composition of a Spanish red wine aging in bottle, after storage in barrels of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology*, 224 (6), 695-705.

- [6] Schwarz, M., Rodríguez, M., Martínez, C., Bosquet, V., Guillén, D., Barroso, C.G. (2009). Antioxidant activity of Brandy de Jerez and other aged distillates, and correlation with their polyphenolic content. *Food Chemistry*, 116 (1), 29-33.
- [7] Canas, S., Casanova, V., Pedro Belchior, A. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (8), 626-633.
- [8] Barroso, C.G., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Pérez-Bustamante, J.A. (1996). 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. *Journal of Chromatography A*, 724 (1-2), 125-129.
- [9] García-Puente Rivas, E., Alcalde-Eon, C., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, M.T. (2006). Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. *Analytica Chimica Acta*, 563 (1-2), 215-222.
- [10] Del Álamo, M., Nevares, I., Gallego, L., Martín, C., Merino, S. (2008). Aging markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Analytica Chimica Acta*, 621 (1), 86-99.
- [11] Carrascal V. (2003) Estudio de los ácidos orgánicos y su relación con las prácticas tradicionales de fabricación. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- [12] Guillén, D.A., Palma, M., Natera, R., Romero, R., Barroso, C.G. (2005). Determination of the age of Sherry wines by regression techniques using routine parameters and phenolic and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (7), 2412-2417.
- [13] Lamikanra, O. (1997). Changes in Organic Acid Composition during Fermentation and Aging of Noble Muscadine Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (3), 935-937.
- [14] Rodríguez Dodero, M.C. (2005). Analytical study of phenolic composition of sherry brandy and its relation to the elaboration process, ageing, characterization and quality Ed. Bell & Howell.
- [15] Schwarz, M., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Barroso, C.G. (2009). Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez. *Journal of Separation Science*, 32 (11), 1782-1790.
- [16] Guillén, D.A., Barroso, C.G., Zorro, L., Carrascal, V., Pérez-Bustamante, J.A. (1998), Organic acids analysis in 'Brandy de Jerez' by ion-exclusion chromatography, 'post-column' buffering and conductimetric detection. *Analisis*, 26 (4), 186-189.
- [17] C.I.E. (1986). Colorimetry, 2nd edn. Publication C.I.E. No.15.2, Central Bureau of the Commission Internationale de L'Eclairage, Vienna.
- [18] Singleton, V. L. Rossi, Joseph A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-58.



- [19] **Onishi, M., Guymon, J.F., Crowell, E.A.** (1977). Changes in Some Volatile Constituents of Brandy During Aging. *Am American Journal of Enology and Viticulture*, 28 (3), 152-158.
- [20] **Jeuring, H.J., Kupperts, F.J.** (1980). High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 63 (6), 1215-1218.
- [21] **Rodríguez Madrera, R., Blanco Gomis, D., Mangas Alonso, J.J.** (2003). Influence of Distillation System, Oak Wood Type, and Aging Time on Composition of Cider Brandy in Phenolic and Furanic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (27), 7969-7973.
- [22] **Caldeira, I., Clímaco, M.C., Bruno De Sousa, R., Belchior, A.P.** (2006). Volatile composition of oak and chestnut woods used in brandy ageing: Modification induced by heat treatment. *Journal of Food Engineering*, 76 (2), 202-211.
- [23] **Rodríguez-Bencomo, J.J., Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., González-Huerta, C., González-San José, M.L.** (2008). Importance of chip selection and elaboration process on the aromatic composition of finished wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (13), 5102-5111.
- [24] **Quesada Granados, J., Villalón Mir, M., López García-Serrana, H., Lopez Martínez, M.C.** (1996). Influence of aging factors on the furanic aldehyde contents of matured brandies: Aging markers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (6), 1378-1381.
- [25] **Karadeniz, F., Durst, R.W., Wrolstad, R.E.** (2000). Polyphenolic composition of raisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (11), 5343-5350.
- [26] **Moreno M.V.G., Jurado J.C., Barroso C.G.** (2001). Method devised for determining low molecular weight organic acids in vinic samples by capillary electrophoresis: validation of the method with real samples. *European Food Research Technology*, 213, 381-385
- [27] **Quesada Granados, J., Villalón Mir, M., López García-Serrana, H., Lopez Martínez, M.C.** (1996). Influence of aging factors on the furanic aldehyde contents of matured brandies: Aging markers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (6), 1378-13.

**6. SIMULACION DEL ENVEJECIMIENTO DEL  
BRANDY: TEST DE ENVEJECIMIENTO**



## 6.1. INTRODUCCION

El Brandy de Jerez presenta unas propiedades organolépticas propias debidas fundamentalmente al sistema de elaboración del mismo. El uso del típico sistema de envejecimiento de Solera y Criaderas, junto al obligado uso de botas envinadas con vinos de Jerez, le confiere una acusada personalidad. La necesidad de las empresas de realizar ensayos en la búsqueda de una diversidad de productos, amparados bajo la Denominación Específica, se ve frenada al necesitar al menos 3 años de envejecimiento y un gran volumen de aguardiente para establecer una solera que cumpla los requisitos de la normativa vigente. Por ello, es interesante contar con un sistema de envejecimiento alternativo, que acorte los tiempos así como el volumen de aguardiente necesario, que permita obtener, a escala de laboratorio, un producto similar al obtenido mediante el sistema tradicional y así poder evaluar la viabilidad del nuevo producto.

El empleo de virutas de roble para acelerar el proceso de envejecimiento, es una práctica ampliamente utilizada en la enología para el caso de los vinos, y existen diversos trabajos donde se estudia su influencia sobre diferentes parámetros como son el contenido polifenólico, color, y las características sensoriales [1-5]. También, han sido diversos los estudios realizados para determinar la influencia del tamaño o el tostado de la viruta [6]. En el caso del vino de Jerez, Monedero y col. [7], propusieron un método alternativo de envejecimiento acelerado para el vino Oloroso. Para el caso del Vinagre de Jerez, se han realizado varios estudios a escala de laboratorio, donde se ha investigado la influencia de la adición de virutas, como propuesta de envejecimiento acelerado, en el contenido volátil, contenido polifenólico y en el perfil organoléptico [8-12], obteniéndose interesantes resultados. Recientemente Duran y col., [13] realizaron un estudio comparativo entre las muestras de vinagre de Jerez envejecidos mediante un sistema tradicional de Solera y Criaderas con aquellas que habían sido envejecidas de forma acelerada con virutas y microoxigenación obteniéndose resultados muy satisfactorios. Para el caso de las bebidas espirituosas, la bibliografía es escasa, si bien hay investigaciones sobre ron [14,15].

Por otro lado, los aguardientes para Brandy de Jerez se obtienen fundamentalmente a partir de vinos elaborados con uvas de la variedad Airén, procedentes de los viñedos situados en Castilla La Mancha. La razón por la que se vienen utilizando vinos de esta variedad, se debe

principalmente a que es la variedad más cultivada en España (unas 500.000 ha) y de alguna manera se encontró una utilización para los excedentes de vino que se producían en esa zona. No obstante, esto puede ser una limitación para la calidad de los destilados y por tanto la del brandy que se elabora con ellos, ya que no se busca el vino más adecuado para dar un destilado de calidad, sino el que resulte más económico. También supone una limitación a la hora de conseguir un producto catalogado como “Denominación de Origen”. La denominación de Origen es una calificación que se emplea para proteger legalmente ciertos alimentos que se producen en una zona determinada, contra productores de otras zonas que quisieran aprovechar el buen nombre que han creado los originales, en un largo tiempo de fabricación o cultivo, pero para ello es exigencia que la uva utilizada sea de la zona, y no de Castilla La Mancha como viene siendo hasta ahora. Además, las variedades de uva están sufriendo las consecuencias debido al cambio de la climatología de los últimos años, perdiendo en ocasiones gran parte de una vendimia por diferentes condiciones ambientales. Por eso interesa investigar una posible alternativa a la variedad de uva Airén que pueda por un lado mejorar la calidad del Brandy y por otro permita optar al Brandy de Jerez por una “Denominación de Origen”.

En el presente capítulo se proponen por tanto dos objetivos:

- Obtener un test alternativo de envejecimiento acelerado con virutas de roble de tostado medio, que permita en un periodo corto de tiempo obtener un producto con calidad similar al que se obtiene mediante envejecimiento tradicional. Para ello se ha realizado un experimento a escala de laboratorio con diferentes condiciones de cantidad de viruta y método de extracción, comparándolo analítica y sensorialmente con un brandy envejecido mediante sistema tradicional.
- Valorar la viabilidad de holandas de diferentes variedades de uvas (Airén, Colombard, Corredera, Doradilla, Garrido fino, Jaén blanco, Moscatel de Málaga, Palomino fino, Ugni blanc y Zalema) para la elaboración de Brandy de Jerez, envejeciéndolas mediante el test diseñado en el anterior punto, y así poder plantear alternativas a la variedad Airén. Las holandas envejecidas fueron analítica y sensorialmente evaluadas.

## 6.2. MATERIALES Y METODOS

### 6.2.1. Muestras analizadas

#### 6.2.1.1. Test de envejecimiento acelerado

Las holandas utilizadas para optimizar el test de envejecimiento acelerado (graduación alcohólica al 40%) fueron suministradas por bodegas Garvey.

Las muestras de referencia con las que se comparan los resultados obtenidos son una serie de muestras de brandies procedentes de una experiencia piloto realizada en colaboración con el Consejo de la Denominación Específica Brandy de Jerez. En esta experiencia se realizó un seguimiento analítico del aguardiente durante su etapa de envejecimiento. El sistema experimental estaba constituido por 15 botas de roble americano (la denominada bota jerezana). Doce de estas botas se destinaron a envejecer aguardiente según el sistema dinámico de Solera y Criaderas en 4 escalas (solera –S-, primera criadera –P-, segunda criadera –G-, y tercera criadera–T-) de 3 botas cada una, mientras que las tres restantes contuvieron el mismo aguardiente pero envejecido de manera estática, representando el sistema de añadas. Las botas de este sistema experimental fueron previamente envinadas con vino Oloroso. Durante 5 años se realizaron muestreos trimestrales analizándose diferentes parámetros [16-18]. Para el tratamiento de los datos se asignó a cada muestra la categoría comercial correspondiente (S, SR o SGR) en función de su tiempo medio de envejecimiento. El contar con este sistema experimental es de una gran importancia, puesto que sabemos a ciencia cierta que a las muestras no se les ha realizado ninguna de las prácticas permitidas por el consejo Regulador del Brandy de Jerez (la adición de caramelo y/o infusiones...) pudiendo por tanto comparar las muestras que hemos envejecido de forma acelerada con estas que han sido envejecidas de acuerdo al sistema tradicional.

#### 6.2.1.2. Ensayos de diferentes holandas

Un total de 10 holandas de vinos varietales de la cosecha 2006 elaborados por el Rancho de la Merced [19] (centro IFAPA de Jerez de la Frontera), fueron sometidas a envejecimiento acelerado mediante el test optimizado. Las variedades utilizadas fueron: Airén, Colombard, Corredera, Doradilla, Garrido fino, Jaén blanco, Moscatel de Málaga, Palomino fino, Ugni blanc y Zalema.

### 6.2.2. Test de envejecimiento acelerado

Se utilizaron virutas de roble americano, tostado medio, suministradas por Nutritec. El tamaño de la viruta utilizada era de 3-5mm. Los ensayos han sido realizados con distintas condiciones:

- Agitación mediante agitadores magnéticos OVAV (Micromix 8L).
- Baño de Ultrasonido JPSELECTA con recirculador de agua para el control de la temperatura (JULABO F12).

Se realizaron en probetas con un volumen de 150 ml de aguardiente y virutas de madera en diferentes cantidades. Para la determinación de la cantidad de virutas se calculó la relación superficie/volumen de una bota jerezana (64 cm<sup>2</sup>/L), utilizándose diferentes valores a partir de este dato. Para optimizar dicha cantidad fueron medidas y pesadas un total de 100 virutas haciendo un promedio de ellas. Las virutas empaquetadas en unas “bolsitas tipo infusión” se sumergían en el destilado a envejecer dentro de la probeta. Además, las virutas fueron “pretratadas” con diferentes condiciones con la intención de suavizar la extracción de la madera. Estas distintas condiciones, se verán con más detalle en los siguientes apartados.

### 6.2.3. Análisis de polifenoles

Los compuestos polifenólicos se determinaron por UPLC mediante el método optimizado en el capítulo 3, de la presente memoria [20].

De manera breve, el análisis de los compuestos polifenólicos se llevó a cabo empleando un sistema Waters Acquity UPLC™ (Waters Corp., Milford, EE.UU.) acoplado a un sistema de detección de fotodiodo array. Se empleó una columna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm D.I., con 1.7 µm de tamaño de partícula) suministrada también por Waters. La temperatura de la columna se mantuvo a 47 °C. El sistema binario de fases fue el siguiente: Fase A: 3% de acetonitrilo, 2% de ácido acético, 95% de agua; Fase B: 85% de acetonitrilo, 2% de ácido acético, 13% de agua. El flujo empleado fue de 0.7 mL min<sup>-1</sup>.

### 6.2.4. Análisis de parámetros cromáticos

Todas las muestras fueron sometidas a medición de su espectro UV-Vis, cada 10 nm, en el intervalo de 380-770 nm, empleando un espectrofotómetro Helios Gamma (Unicam, Cambridge,

Reino Unido) para posterior cálculo de los parámetros CIELab. Como iluminante se utilizó el D65 con un ángulo de observación de 10°.

#### **6.2.5. Índice de polifenoles totales**

Se realizó siguiendo el método de Folin-Ciocalteu, tal y como se ha visto en capítulos anteriores. La curva de calibrado se realizó con ácido gálico en un rango de 0-1000 mg L<sup>-1</sup>, expresándose los resultados en GAE (equivalentes de ácido gálico).

#### **6.2.6. Análisis sensorial**

Las sesiones se llevaron a cabo en una sala de cata normalizada (UNE 87004) [21], donde se minimiza la influencia de estímulos externos en los juicios emitidos. La temperatura de la sala se fijó en 22 °C. Se presentaron 15 mL de muestra en catadora de aceite de vidrio azul, para así evitar la influencia del color en el juicio, y tapa para minimizar la pérdida de aromas. Las evaluaciones se hicieron exclusivamente por vía orthonasal.

Los jueces, pertenecientes todos al personal de laboratorio, tuvieron un periodo de entrenamiento en aspectos generales y específicos, durante el cual se evaluó la repetibilidad de sus juicios y la homogeneidad del panel. Adicionalmente, los duplicados de las pruebas discriminativas y descriptivas del estudio se utilizaron para validar la reproducibilidad de los jueces, mientras que para cada descriptor, los ANOVAs de dos factores (Jueces x Muestras ó Jueces x Semanas) permitieron estudiar la homogeneidad del panel.

Como muestras de referencia utilizadas en el análisis sensorial se utilizaron, fueron al igual que anteriormente, muestras envejecidas en el sistema de Solera y Criaderas experimental ya comentado y fueron las siguientes:

- S04 (Tiempo Medio de envejecimiento equivalente a Solera)
- S07 (Tiempo Medio de envejecimiento equivalente a Solera Reserva)
- S13 (Tiempo Medio de envejecimiento equivalente a Solera Reserva)
- S16 (Tiempo Medio de envejecimiento equivalente a Solera Gran Reserva)



Se realizaron diversos tipos de pruebas (por duplicado).

1. De comparación múltiple (UNE-EN ISO 5495) [22]: Permite evaluar diferencias entre más de 2 muestras, habitualmente de 3 a 6. Al juez se le informa cuál es la de referencia, y ésta se incluye entre las muestras que se degustan. Se le pide a continuación que señale de cada muestra si ésta es o no diferente a la de referencia, y que además señale el grado de diferencia de acuerdo a la escala que se proporciona. Sin embargo, en el presente estudio el enfoque fue distinto, ya que se solicitó a los jueces que evaluaran el grado de semejanza con la muestra de referencia, lo cual afecta al tratamiento de datos y a la expresión de los resultados.

2. Triangulares (UNE-EN ISO 4120) [23]. Esta prueba discriminativa ampliada tiene como objetivo detectar diferencias entre dos muestras, y opcionalmente el sentido de la diferencia. En ella se presenta a los jueces tres muestras de las cuales dos son iguales, y se les pide que identifiquen la muestra que es diferente. Se amplió el esquema básico de la prueba, interrogando a los jueces sobre el valor cuantitativo aproximado de esa diferencia (escalas de 5 puntos: ninguna, débil, media, fuerte, muy fuerte), y opcionalmente sobre la naturaleza de la característica que marca la diferencia. Esta variación no afecta a la manera de tratar los datos. El tratamiento de datos es sencillo, mediante tablas de significancia para un nivel de certidumbre del 95% y el número de juicios que se obtuvo en cada comparación.

3. Generación de descriptores. En esta prueba, que se realiza previamente a la evaluación descriptiva, se presenta a los jueces una muestra representativa de las que son objeto de interés, pidiéndoles que anoten las sensaciones percibidas para cada una de ellas. Un estudio de frecuencias permite seleccionar las que mejor definen a las muestras en estudio.

4. Descriptivas. Las pruebas descriptivas pretenden definir de manera completa las propiedades del producto, y de manera general medir su intensidad, es decir, caracterizar cualitativa y cuantitativamente uno o más atributos sensoriales. Proporcionan mucha información, aunque por su mayor complejidad el entrenamiento de los jueces debe ser más intenso, y la interpretación de los datos es laboriosa. De entre ellas, la determinación del perfil sensorial (UNE 87017) [24] consiste en una descripción minuciosa de las características que conforman una propiedad sensorial determinada (sabor o textura), seguida de la estimación de la intensidad de cada una de ellas. Para ello, se utilizaron

escalas de intervalo (UNE-ISO 4121), [25] de 9 puntos, en las que la intensidad de cada atributo se define en uno de los puntos (extremos o intermedios) que tiene marcada la escala. Se resuelve en parte el problema de la subjetividad de los jueces con las escalas continuas, pero tienen el inconveniente de que es difícil lograr dar una descripción adecuada de los puntos intermedios. Los datos generados son habitualmente representados en gráficos de araña, que facilitan la comparación.

5. De ordenamiento (UNE 87023), [26], para la evaluación de las preferencias entre los distintos aguardientes envejecidos elaborados. Este tipo de prueba discriminativa está indicada cuando son varias las muestras a comparar, pues minimiza el consumo de muestra y la fatiga sensorial de los jueces. Tras presentar a los jueces la serie de aguardientes envejecidos, se les pidió que los evaluaran de izquierda a derecha, y que posteriormente los ordenaran de menor a mayor preferencia. Para la interpretación de los resultados obtenidos se aplicó la prueba de Friedman.

Los cuestionarios utilizados para la realización de las distintas pruebas se muestran en el anexo II al final del capítulo.

### **6.2.7. Análisis estadístico**

Para estudiar los parámetros analíticos se llevaron a cabo análisis de componentes principales (Principal Component Analysis, PCA) y análisis lineal discriminante (Linear Discriminant Analysis, LDA) empleando el paquete informático Statistica, versión 7.0. (Statsoft Inc., Oklahoma, EE.UU.) Para el tratamiento de datos derivados del análisis sensorial también se utilizó dicho software.

## **6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.3.1. Desarrollo de un test de envejecimiento acelerado para el Brandy de Jerez**

Para la obtención de un modelo definitivo de envejecimiento acelerado, se han realizado ensayos atendiendo a diferentes criterios: método de extracción, cantidad de viruta y el envinado de la viruta.

Con el objetivo de una mayor comprensión de la nomenclatura de las muestras, a continuación se muestra un cuadro resumen (tabla 1) de los tres ensayos realizados, sus objetivos y las diferentes condiciones ensayadas.

6. Simulación del envejecimiento del Brandy. Test de envejecimiento

Ensayo	Objetivo	Muestras	Condiciones	Duración
<b>1 Ensayo</b>	Elección del método de extracción más efectivo	Testigo x	Holanda macerada con una cantidad de viruta x <sup>1</sup>	4 meses
		Testigo 2x	Holanda macerada con una cantidad de viruta 2x	4 meses
		Agitación 300 x	Holandas envejecidas a una velocidad de agitación de 300 rpm, con una cantidad x de viruta.	4 meses
		Agitación 300 2x	Holandas envejecidas a una velocidad de agitación de 300 rpm, con una cantidad 2x de viruta.	4 meses
		Agitación 600 x	Holandas envejecidas a una velocidad de agitación de 600 rpm, con una cantidad x de viruta.	4 meses
		Agitación 600 2x	Holandas envejecidas a una velocidad de agitación de 600 rpm, con una cantidad 2x de viruta.	4 meses
		Ultrasonido x	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta x	30 días
		Ultrasonido 2x	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta x	30 días
<b>2 Ensayo</b>	Optimizar la cantidad de virutas y ensayar una nueva variable: el envinado de las virutas.	X sin envinar	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta x sin envinar	30 días
		X envinado	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta x envinada. El envinado se realizó mediante maceración con oloroso.	30 días
		2x sin envinar	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta 2x sin envinar	30 días
		2x envinado	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta 2x envinadas. Envinado de las virutas se realizó mediante maceración con oloroso.	30 días
		3x envinado	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta 3x envinadas. Envinado de las virutas se realizó mediante maceración con oloroso.	30 días
		4x sin envinar	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta 4x sin envinar	30 días
		4x envinado	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta 3x envinadas. Envinado de las virutas se realizó mediante maceración con oloroso.	30 días
<b>3 Ensayo</b>	Optimizar el envinado de la viruta.	2x env 1H US	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta 2x envinadas. El envinado se realizó de la siguiente manera: 9gr de virutas con 80ml de oloroso durante 1hora en baño ultrasonido, después 24 en maceración con el vino oloroso y posterior secado en estufa durante 10 horas.	30 días
		3x env 1H US	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta 3x envinadas. El envinado se realizó de la siguiente manera: 9gr de virutas con 80ml de oloroso durante 1hora en baño ultrasonido, después 24 en maceración con el vino oloroso y posterior secado en estufa durante 10 horas.	30 días
		2X env 4H US	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta 2x envinadas. El envinado se realizó con 9gr de virutas en 80ml de oloroso durante 4hora en baño ultrasonido, después 24 en maceración con el vino oloroso y posterior secado en estufa durante 10 horas.	30 días
		3X env 4H US	Holandas envejecidas en ultrasonido con una cantidad de viruta 3x envinadas. El envinado se realizó de la siguiente manera: 9gr de virutas con 80ml de oloroso durante 4hora en baño ultrasonido, después 24 en maceración con el vino oloroso y posterior secado en estufa durante 10 horas.	30 días

**Tabla 1:** Cuadro resumen de los tres ensayos realizados

1: x: cantidad equivalente a la relación superficie/ volumen en una bota Jerezana (64cm<sup>2</sup>/L)

#### 6.3.1.1. Primer Ensayo.

Este primer ensayo tuvo como objetivo seleccionar el método de extracción más efectivo de entre los siguientes: en estático, con agitación a diferentes velocidades (a 300rpm y a 600 rpm), y con ultrasonido. Ambos métodos de extracción han sido utilizados y evaluados en numerosas investigaciones [27,28].

Las cantidades de viruta fueron  $x$  y  $2x$ , siendo  $x$ , tal y como se ha comentado con anterioridad, la cantidad necesaria para obtener una relación superficie/volumen equivalente a la de la bota jerezana ( $64 \text{ cm}^2/\text{L}$ ). La duración de los ensayos fue diferente, siendo de 4 meses de duración para los ensayos testigo (sin agitación ni ultrasonido) y con agitación, y de 30 días para el que utilizó ultrasonido. En cada muestreo, se tomaron 2 ml del aguardiente, siendo a continuación repuestos por otros 2 ml del inicial. Se muestreó una vez a la semana para los ensayos testigo y con agitación y dos veces por semana para el experimento con ultrasonido, haciéndoles los correspondientes análisis, para su posterior comparación con las muestras de referencia. La figura 1 muestra los resultados del análisis de componentes principales de estos primeros datos junto con las muestras referencia. A partir de la diferenciación y ordenamiento de las muestras del sistema de Solera y Criaderas de referencia en el eje de la CP1, puede concluirse que ésta se halla íntimamente relacionada con la vejez del aguardiente, en sentido creciente hacia la derecha. Tal como puede observarse, el grupo de muestras de ultrasonido con una cantidad de viruta  $x$  presenta en un mes unas características semejantes a las muestras Solera Reserva, mientras las de ultrasonido con cantidad  $2x$  se sitúan en los alrededores de los aguardientes de mayor vejez (Solera Gran Reserva). Teniendo en cuenta esto y que la duración del ensayo con ultrasonido fue de un mes, frente a los 4 meses que duraron el resto, la conclusión de estos ensayos preliminares fue la elección del ultrasonido como método acelerante más eficaz.

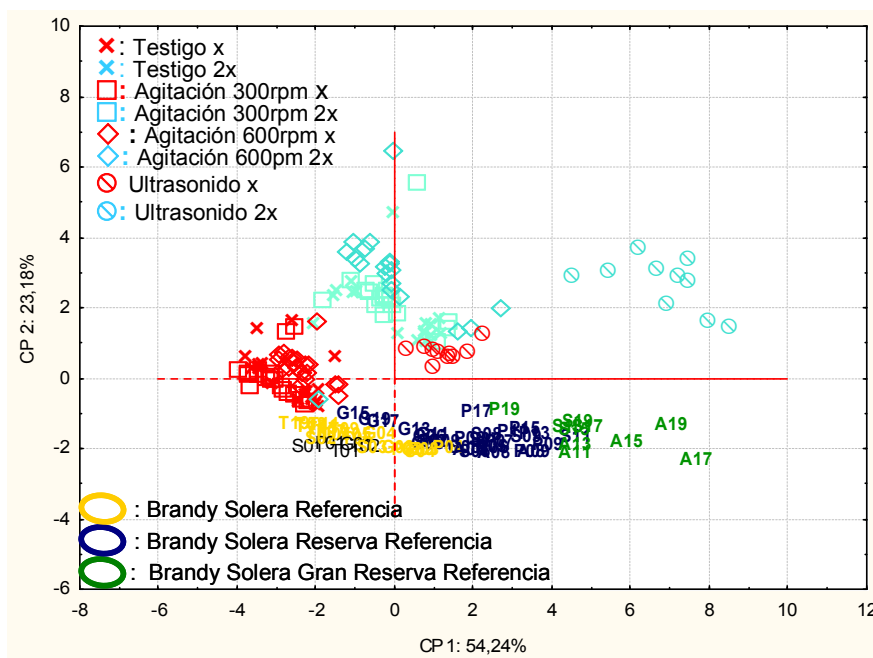


Figura 1. PCA de las muestras del primer ensayo junto a las muestras de referencia

### 6.3.1.2. Segundo ensayo

En el segundo test, se ensayaron sobre diferentes cantidades de virutas, jugando con una nueva variable: el envinado de las virutas, experimentando con cantidad de viruta x, 2x, 3x y 4x con o sin envinar. Por motivos de espacio en el baño de ultrasonido, la cantidad 3x, solo fue experimentada de forma envinada. En este segundo ensayo se adaptaron a las probetas mediante uniones esmeriladas columnas Vigreux hechas a medida, con el objeto de evitar pérdidas por evaporación, ya que en el primer ensayo éstas habían sido en torno al 10%. (Fig. 2)



Figura 2: Probetas + Condensador Vigreux en el ultrasonido en el segundo ensayo

Además, el envinado adquiere otra función fundamental, relacionada con el pretratamiento de las virutas antes de utilizarlas para el envejecimiento. Uno de los problemas observados en el anterior ensayo, fue que la extracción de algunos compuestos tales como el ácido gálico, coniferaldehído y sinapaldehído era muy fuerte. Según la bibliografía consultada, son varios los tratamientos realizados con los chips de madera de roble en la utilización de envejecimiento acelerado. Así Monedero y col.[6], proponen una extrapolación al laboratorio del método francés del tratamiento de la madera antes de construir la barrica y, tras distintos estudios de maceraciones en diferentes condiciones, concluyeron que aquellas virutas calentadas a 180° C durante 3 horas y maceradas posteriormente con una mezcla de alcohol agua (35%) durante 2 horas, fueron en su caso, las que mejores resultados proporcionaron.

En nuestro caso, se propone incluir este pretratamiento de las virutas, en el envinado. Teniendo en cuenta que el Brandy de Jerez tiene como característica el estar envejecidas en botas que previamente han contenido vino de Jerez, se pensó que el envinado de las virutas era una variable fundamental a tener en cuenta. El envinado se realizó con vino oloroso, ya que este era el vino que contenían las botas que después se destinaron a envejecer el brandy de manera tradicional mediante el sistema de Solera y Criadera experimental, el brandy de referencia. Se pesó una cantidad fija de viruta (9 gramos), envinándolas con 80ml de oloroso durante 15 horas, dejándolas luego secar al aire libre. Por tanto, se plantea este segundo ensayo con dos objetivos fundamentales, estudiar las diferencias entre aguardientes tratados con distintas cantidades de viruta, evaluando asimismo la contribución del envinado previo de las virutas para confirmar la hipótesis de que la extracción de compuestos polifénolicos de la madera es menor en el caso de las muestras envinadas. La duración del ensayo fue de 30 días.

Se realizó un análisis de componentes principales al conjunto de muestras de esta experiencia, teniendo como objetivo estudiar la posible separación entre las muestras envinadas y las no envinadas. Tal y como se puede apreciar en la figura 3 hay un ordenamiento de izquierda a derecha de las muestras según la cantidad de viruta empleada, asociando por tanto todos los compuestos de la componente 1 al envejecimiento en madera, mientras que la componente 2, nos hace una ligera diferenciación entre las muestras sin envinar que se sitúan en la parte superior de la gráfica (color azul) y las envinadas (color rojo) en la parte inferior. Esta diferenciación es tanto mayor, cuanto mayor es la cantidad de viruta utilizada: así, se diferencian muy bien entre el grupo de muestras 4x envinado del 4x sin envinar, mientras que para los

aguardientes que se envejecieron con cantidad de virutas x, no se aprecian apenas diferencias entre las que están envinadas y las que no.

El ácido p-cumárico tal y como se ve en el gráfico 4 es la variable más relacionada con la componente 2, lo que confirmaría que la aparición de este compuesto en el Brandy de Jerez, se debe al envinado de la madera.

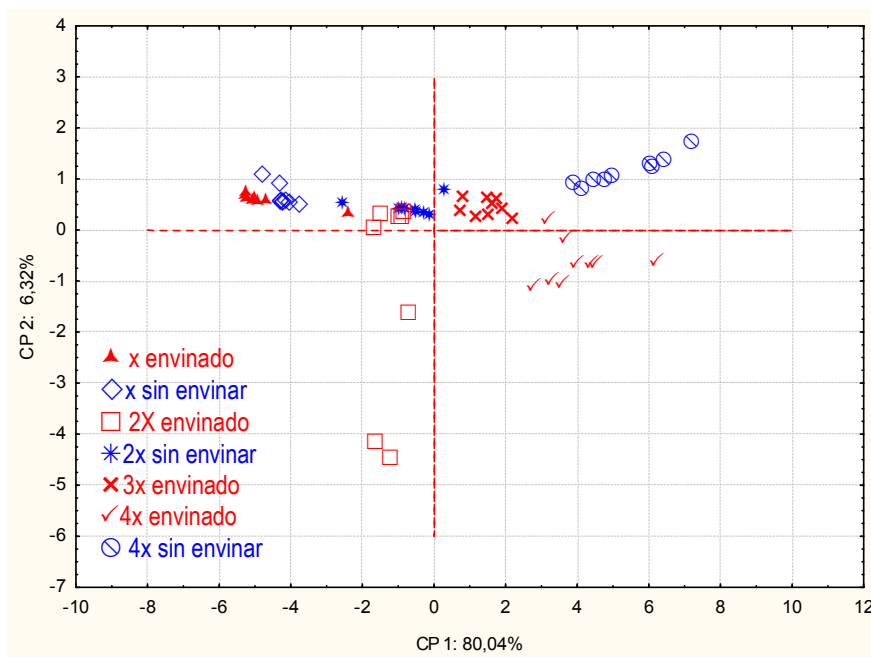


Figura 3: Análisis de Componentes principales: muestras del 2º Ensayo. Proyección de los casos

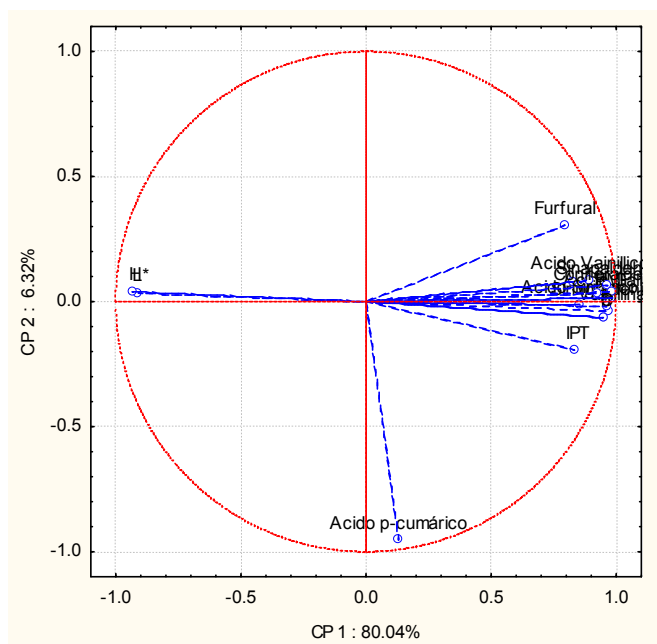
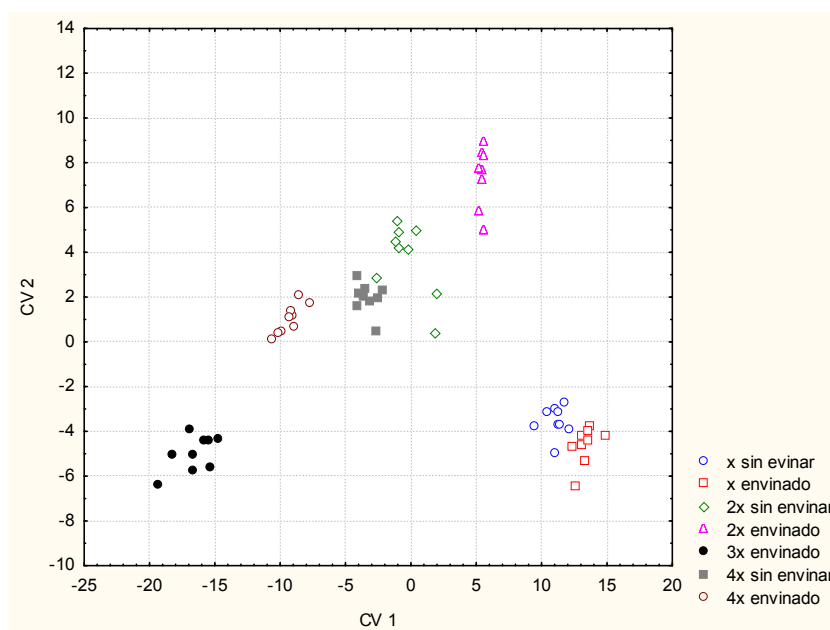


Figura 4: Análisis de Componentes principales: muestras del 2º Ensayo. Proyección de las variables

Para evaluar el grado de diferenciación de los distintos aguardientes, y determinar qué variables permiten discriminarlos en mayor medida, se empleó a continuación una técnica quimiométrica supervisada, como es el análisis lineal discriminante (LDA, linear discriminant analysis). La tabla de clasificación mostró un porcentaje de correcta clasificación del 100% tal y como se puede observar en la figura 5, confirmándose las diferencias entre los aguardientes envejecidos de manera acelerada bajo distintas condiciones. Las variables con mayor peso en estas funciones fueron: ácido vainílico, vainillina, furfural, la componente cromática  $a^*$ , ácido gálico y ácido  $p$ -cumárico.



**Figura 5:** Análisis lineal Discriminante: Muestras 2º Ensayo. Proyección de las variables canónicas

Además, se confirmó, que la extracción de compuestos polifenólicos fue menor para las muestras envejecidas con virutas envinadas, tal y como se puede observar en la figura 6. La diferencia entre muestras envinadas y no envinadas es más clara para las muestras con mayor cantidad de viruta, aunque las concentraciones, fundamentalmente, de ácido gálico, coniferaldehído y sinapaldehído seguían siendo considerablemente elevadas.



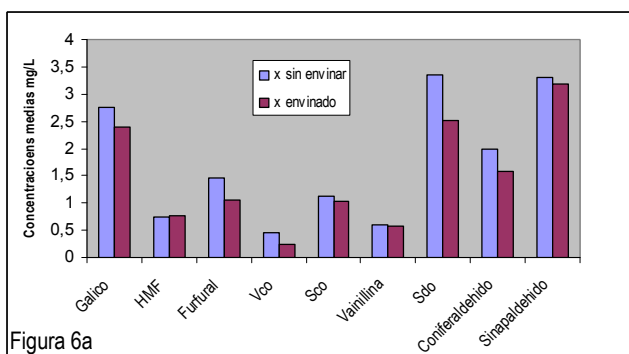


Figura 6a

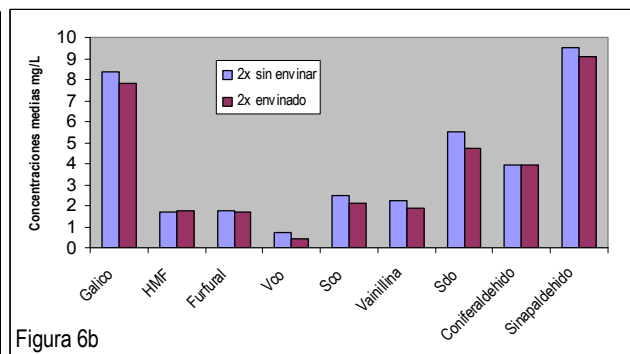


Figura 6b

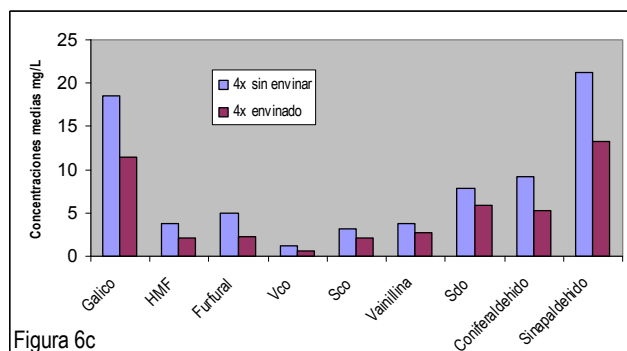
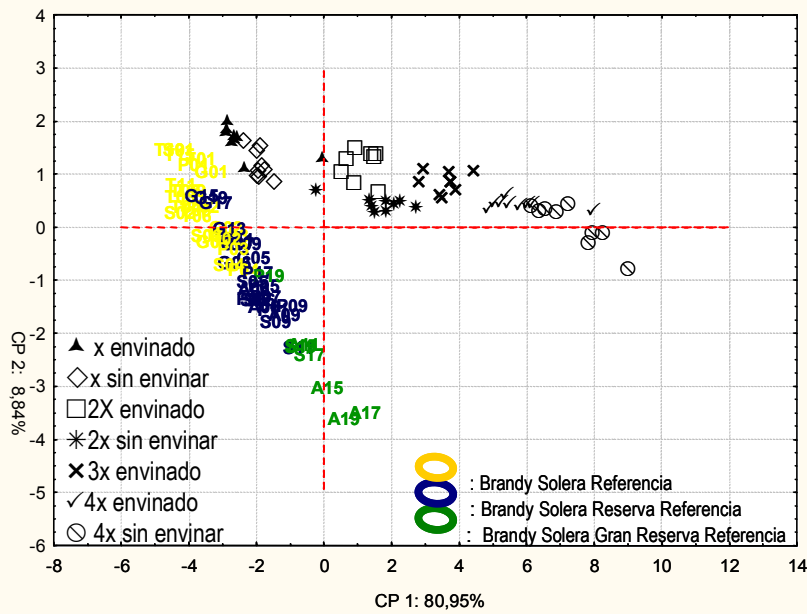


Figura 6c

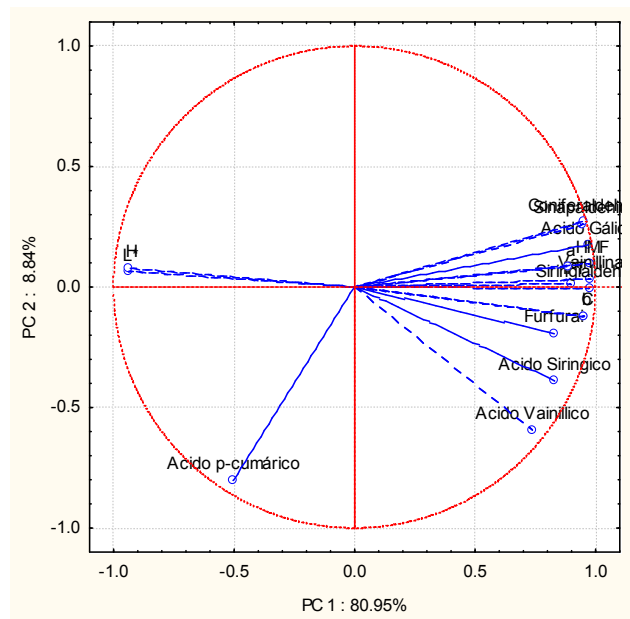
**Figura 6:** Concentraciones ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de los compuestos de muestras envinadas y no envinadas con diferentes cantidades de virutas, x (fig 6a), 2x (fig 6b), 4x (fig 6c). Claves: Vco: Ácido Vainillico; Sco: Ácido Siringico, Sdo: Siringialdehído.

Se realizó un análisis de componentes principales a las muestras de este ensayo y al conjunto de muestras de referencia que habían sido envejecidas de forma tradicional. De este análisis de componentes principales se extraen 2 componentes principales que explican casi un 90% de la varianza (Figura 7). La CP1 es la que tiene el mayor peso de las variables con un 80,9%, mientras que la componente 2 contribuye con un 8,8%. Esto se ve más claramente en la figura 8, donde se confirma que todos los compuestos excepto el ácido *p*-cumárico están relacionados directamente con la extracción de la madera teniendo una fuerte influencia en la componente 1. Estos compuestos son los responsables del ordenamiento de izquierda a derecha a lo largo de dicha componente de las muestras más envejecidas, para las muestras del sistema tradicional, y sobre todo atendiendo a la cantidad de viruta utilizada para las muestras envejecidas de forma acelerada, quedando tanto más a la derecha cuanto mayor es la cantidad de viruta. Comparando los dos grupos de muestras (los aguardientes envejecidos de forma acelerada con aquellos otros envejecidos de forma tradicional) y atendiendo sólo a la componente 1, las muestras con una cantidad 2x y 3x se situarían en el plano en el mismo sitio que las muestras correspondientes a los grupos solera reserva y solera gran reserva, mientras que muestras envejecidas con cantidades superiores de virutas (4x) se alejaron demasiado del comportamiento de las muestras

de referencia. Por lo tanto, se seleccionaron para continuar con futuros experimentos las cantidades de viruta 2x y 3x.



**Figura 7:** Análisis de Componentes principales, muestras 2º Ensayo y muestras de referencia. Proyección de los casos.



**Figura 8:** Análisis de Componentes principales, muestras 2º Ensayo y muestras de referencia. Proyección de las variables.

Además las muestras con cantidades de virutas 2x y 3x sensorialmente fueron las preferidas y también las de mayor semejanza con un aguardiente del sistema experimental de edad equivalente a la categoría solera reserva, aunque la mayoría de los jueces detectaron un atributo negativo calificado como olor a “cerrado” y/o “verde”. Se pensó que las virutas no estaban

suficientemente secas, por lo que en el siguiente ensayo se profundizó en el envinado de las virutas, envinándolas durante diferentes tiempos variables y sometiénolas después a secado.

En cuanto a la evaporación sufrida en este ensayo, consiguió reducir de un 10 a un 7%, por lo que en el siguiente ensayo se siguieron usando los condensadores Vigreux.

#### 6.3.1.3. Tercer ensayo

Atendiendo al primer y segundo ensayo se fijaron las cantidades de viruta 2x y 3x utilizando ultrasonido. En el tercer y último ensayo se probaron diferentes condiciones del envinado de la viruta. Teniendo en cuenta que la extracción de algunos compuestos polifenólicos seguía siendo todavía alta, se pensó en utilizar ultrasonidos en el envinado de las virutas como tratamiento previo a su utilización en el sistema de envejecimiento acelerado y suavizar así la extracción.

Se sometieron a prueba aguardientes con una cantidad de viruta 2x y 3x envinadas de dos diferentes formas:

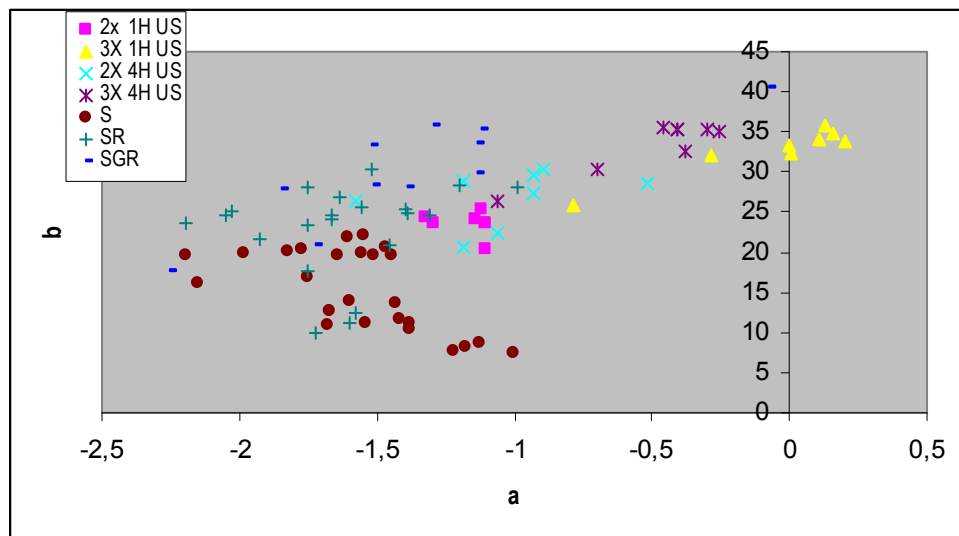
- 9 g de virutas con 80ml de oloroso durante 1 hora en baño ultrasonido, seguido de 24 horas en maceración con vino oloroso y posterior secado en estufa durante 10 horas. Así la nomenclatura 2x 1H US y 3x 1HUS, indica que son muestras envejecidas con una cantidad de viruta 2x y 3x respectivamente y envinadas de la forma descrita.
- 9 g de virutas con 80ml de oloroso durante 4 horas en baño ultrasonido, seguido de 24 horas en maceración con el vino oloroso y posterior secado en estufa durante 10 horas. La nomenclatura 2x 4H US y 3x 4HUS, indica que son muestras envejecidas con una cantidad de viruta 2x y 3x respectivamente y envinadas de la forma recién comentada.

En este ensayo, se decidió realizar una muestra por duplicado para evaluar la reproducibilidad del método. La muestra con la que se le realizó el duplicado fue: 2x 4H US. En la tabla 2, se encuentran listados la repetibilidad de los diferentes parámetros estudiados, en términos de desviación estandar relativa en porcentaje (RSD %). Tal y como se puede observar en dicha tabla, los datos de repetibilidad fueron aceptables para el método propuesto teniendo en cuenta el bajo grado de automatización del mismo. Por razones de tiempo, no fue posible realizar un mayor número de réplicas.

Parámetros	RSD% (Muestra 2x 4H US)
IPT	3.81
Ácido Gálico	10.12
HMF	5.92
Furfural	3.84
Ácido Vainílico	5.64
Ácido Siringico	2.58
Vainillina	3.81
Siringialdehido	0.12
Coniferaldehido	0.19
Sinapaldehido	0.68
$L^*$	0.53
$a^*$	12.51
$b^*$	3.14
$H^*$	0.51
$C^*$	3.09

**Tabla 2:** Repetibilidad de las muestra 2x 4HUS de los parámetros estudiados en términos de RSD%

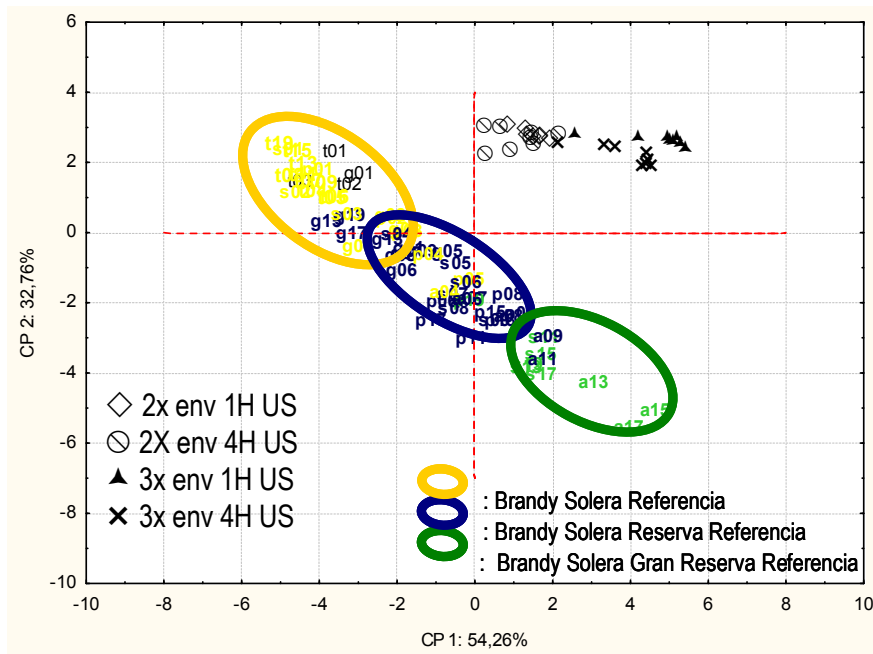
Al comparar las muestras de este ensayo con las muestras de referencia desde un punto de vista del color, se observa en la representación de los parámetros cromáticos  $a^*$  frente a  $b^*$ , (Figura 9) que las muestras envejecidas con una cantidad de viruta 2x, se sitúa en la misma zona que algunas de las muestras solera reserva y solera gran reserva; sin embargo las muestras envejecidas con una cantidad de viruta 3x, se alejan de las muestras de referencia (muestras S, SR, SGR: Brandies Solera; Solera Reserva y Solera Gran Reserva respectivamente)



**Figura 9:** Parámetros cromáticos a-b. Muestras del tercer ensayo y muestras de referencia.

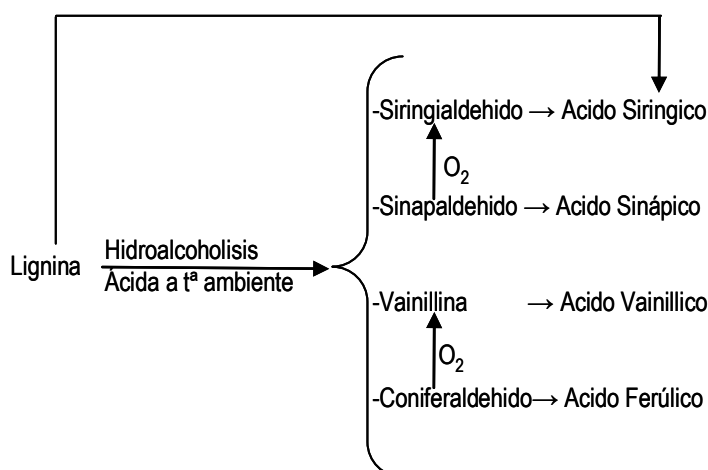
En la figura 10, proyección de las muestras en el plano de las componentes principales 1 y 2 obtenidas en el análisis de componentes principales de este último ensayo, podemos comparar los resultados con los de las muestras de referencia para el conjunto de las variables

estudiadas. Según se ordenan las muestras de las criaderas y solera de referencia, hacia la derecha y hacia abajo aumenta el envejecimiento del brandy. Las muestras sometidas a envejecimiento acelerado se sitúan en la parte superior derecha de la gráfica. Atendiendo únicamente a la componente 1, dichas muestras se encuentran a la misma altura que las muestras de los grupos Brandy Solera Reserva y Solera Gran Reserva de las muestras de referencia. Según las variables más influyentes en el análisis de componentes principales (tabla 3), y teniendo en cuenta las reacciones en las que participan los compuestos fenólicos procedentes de la madera y el oxígeno (figura 11), podría relacionarse la componente 1 con los fenómenos de extracción y la 2 con los de oxidación, ausentes en los brandies de envejecimiento acelerado por el deficiente aporte de oxígeno.



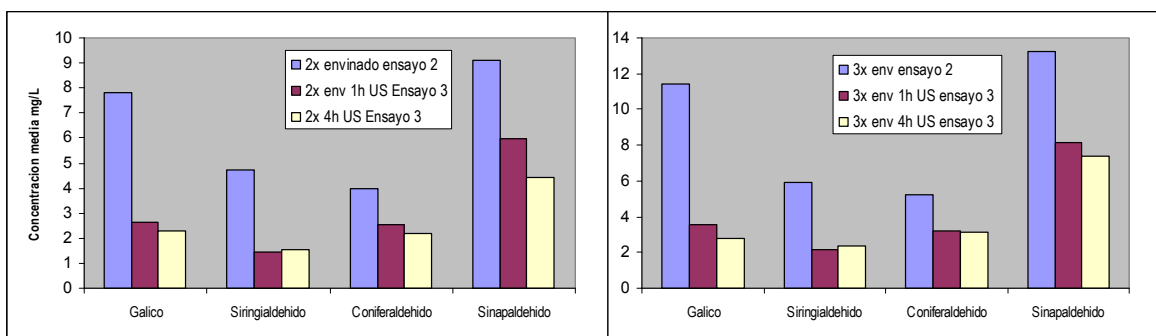
**Figura 10:** Análisis de Componentes principales. Muestras del tercer ensayo y muestras de referencia. Proyección de los casos

	CP1	CP2
IPT	<b>0.764</b>	-0.286
Ácido Gálico	<b>0.914</b>	0.184
Hidroximetilfurfural	<b>0.923</b>	-0.199
Furfural	0.680	-0.194
Ácido Vainillico	0.027	<b>-0.990</b>
Ácido Siríngico	0.054	<b>-0.988</b>
Vainillina	0.693	-0.642
Siringialdehido	0.442	<b>-0.866</b>
Ácido <i>p</i> -cumárico	-0.296	<b>-0.867</b>
Coniferaldehido	<b>0.733</b>	0.657
Sinapaldehido	<b>0.742</b>	0.639
<i>L</i>	<b>-0.972</b>	-0.041
<i>a</i> *	0.671	0.497
<i>b</i> *	<b>0.949</b>	-0.195
<i>H</i> *	<b>-0.942</b>	-0.064
Explicac varianza	8,031	6,013
Prp total	0,472	0,353



**Tabla 3:** Pesos de las variables en la CP1 y CP2 **Figura 11:** Mecanismo de reacción y formación de compuestos fenólicos

Además, se consiguió el otro objetivo que se pretendía alcanzar en este ensayo, el de suavizar la extracción de la madera disminuyendo la concentración de los compuestos polifenólicos. En la figura 12 (que muestran las diferentes concentraciones de polifenoles en comparación con el ensayo anterior de los compuestos que tenían su concentración más elevada), puede observarse de forma clara que se consigue reducir considerablemente la concentración con esta nueva forma de envinar la viruta, aunque no se detecte diferencia significativa entre los dos tiempos de extracción en ultrasonido ensayados.



**Figura 12:** Concentraciones de polifenoles en muestras de los ensayos 2 y 3

#### 6.3.1.4. Análisis sensorial

Las muestras de este último ensayo se sometieron a análisis sensorial. Se analizó la repetibilidad de las puntuaciones en las pruebas descriptivas. Para el tratamiento de estos datos,

se eliminaron de manera puntual aquellos juicios que en función de los valores duplicados mostraron una diferencia mayor o igual a 3 puntos de la escala establecida.

Para cada descriptor, los ANOVAs de dos factores (Jueces x Muestras) permitieron estudiar la homogeneidad del panel. En función de éstos, en algunos casos se observó discrepancia entre las puntuaciones de un solo juez respecto de la del resto del panel, descartándose en tal caso su juicio en los descriptores afectados.

#### 6.3.1.4.1. Comparaciones múltiples de aguardientes obtenidos en distintas condiciones de operación del método de envejecimiento acelerado

Se realizaron pruebas de comparación múltiple respecto a una muestra estándar de aguardiente envejecida en bota de manera natural, con el fin de seleccionar de manera preliminar las mejores condiciones de envejecimiento acelerado de entre las inicialmente ensayadas.

Para ello, las muestras correspondientes a distintas condiciones de operación del método de envejecimiento acelerado se compararon con el aguardiente S13, envejecido en bota de roble de acuerdo al sistema de Solera y Criaderas durante un tiempo medio equivalente a un Solera Reserva. Tras la comparación, los jueces debían indicar el grado de semejanza en una escala de 5 puntos, que incluía la ausencia de diferencia, esto es: ninguna (0), débil (1), media (2), fuerte (3), muy fuerte (4). El cuestionario de evaluación corresponde al cuestionario 1 del anexo II.

Los resultados se muestran en la tabla 4, de la que puede concluirse que la muestra más parecida a la referencia es la 2x1HUS, seguida de la 3x1HUS, con grados de semejanza media-fuerte y débil-media respectivamente.

	N	Media	Modo	Frecuencia	Minimo	Maximo	Desviación Estandar
2x 1H US	13	2,23	3	4	0	4	1.23
2x 4H US	13	1,61	1	7	1	4	0.87
3x 1H US	13	1,84	Múltiple	4	0	3	0.99
3x 4H US	13	1,77	1	5	0	4	1.30
2x 4H US Repetibilidad	13	1,46	1	7	0	4	0.97

**Tabla 4:** Resultados Prueba Comparaciones Múltiples

Cualitativamente, algunos jueces identificaron las muestras cuyas virtudes habían sido envinadas 4H con oloroso en el ultrasonido, como semejantes a aquellas que habían sido envinadas durante 1H, pero de olor menos intenso.

De manera complementaria, se solicitó a los jueces que indicaran con un orden de prelación los 3 mejores aguardientes. El sumatorio de las puntuaciones para cada uno confirmó la preferencia por los 2x1HUS y 3x1HUS.

Los jueces no detectaron diferencias significativas entre las muestras 2x 4H US y su duplicado.

#### 6.3.1.4.2. Comparación de aguardientes preseleccionados con brandies de distinta edad de envejecimiento

Para asignar edad aproximada a los destilados envejecidos de manera acelerada preseleccionados (2x1H y 3x1H), se evaluó mediante pruebas discriminativas su grado de semejanza con aguardientes de envejecimiento natural de edades medias correspondientes a los tipos S, SR y SGR.

Se presentó a los jueces 6 triángulos, pidiéndoles que identificaran en cada uno la muestra diferente, y que cuantificaran la intensidad de la diferencia en una escala de 5 puntos: ninguna (0), débil (1), media (2), fuerte (3), muy fuerte (4), de acuerdo al cuestionario 2 del anexo II. Los resultados de las pruebas triangulares se muestran en la tabla 5.

Comparaciones	Nº de juicios coincidentes	¿Presentan las muestras diferencia significativa? <sup>1</sup>	Media de la diferencia <sup>2</sup>
2x1H-S	14	Sí	1,93
2x1H-SR	12	Sí	1,67
<b>2x1H-SGR</b>	<b>9</b>	<b>Sí</b>	<b>1,00</b>
3x1H-S	11	Sí	1,91
3x1H-SR	12	Sí	2,17
<b>3x1H-SGR</b>	<b>9</b>	<b>Sí</b>	<b>1,38</b>

<sup>1</sup>Mínimo nº de juicios coincidentes (N=15; 95% certidumbre): 9

<sup>2</sup>Escala: 0=Ausencia; 1=Débil; 2=Media; 3=Fuerte; 4=Muy fuerte

**Tabla 5:** Resultados pruebas discriminativas triangulares

En todas las comparaciones se diferencian de manera significativa los aguardientes de envejecimiento acelerado de los de envejecimiento natural, si bien el grado de diferencia es menor con respecto a los SGR, sobre todo para el aguardiente 2x1H, para el que el grado de diferencia se definió como débil. Cualitativamente, la diferencia es atribuida en numerosos casos a una mayor intensidad del olor a roble en los aguardientes envejecidos de manera acelerada. Algunos jueces sin embargo les atribuyen olores químicos.



#### 6.3.1.4.3 Generación de descriptores

En distintas sesiones, se presentaron a los jueces las muestras seleccionadas en las pruebas anteriores, aquellas elaboradas en las condiciones que producía los mejores aguardientes (2x1HUS y 3x1HUS), junto con otros obtenidos por envejecimiento en Solera y Criaderas de edad equivalente a Solera (S04) y SGR (S16). Se les pedía entonces que anotaran en forma de tormenta de ideas las sensaciones percibidas en nariz para cada una de las muestras, tal como se muestra en el cuestionario 3 del anexo II.

Se muestra a continuación en el gráfico de frecuencias de los descriptores propuestos por los jueces para el conjunto de las cuatro muestras (Figura 13).

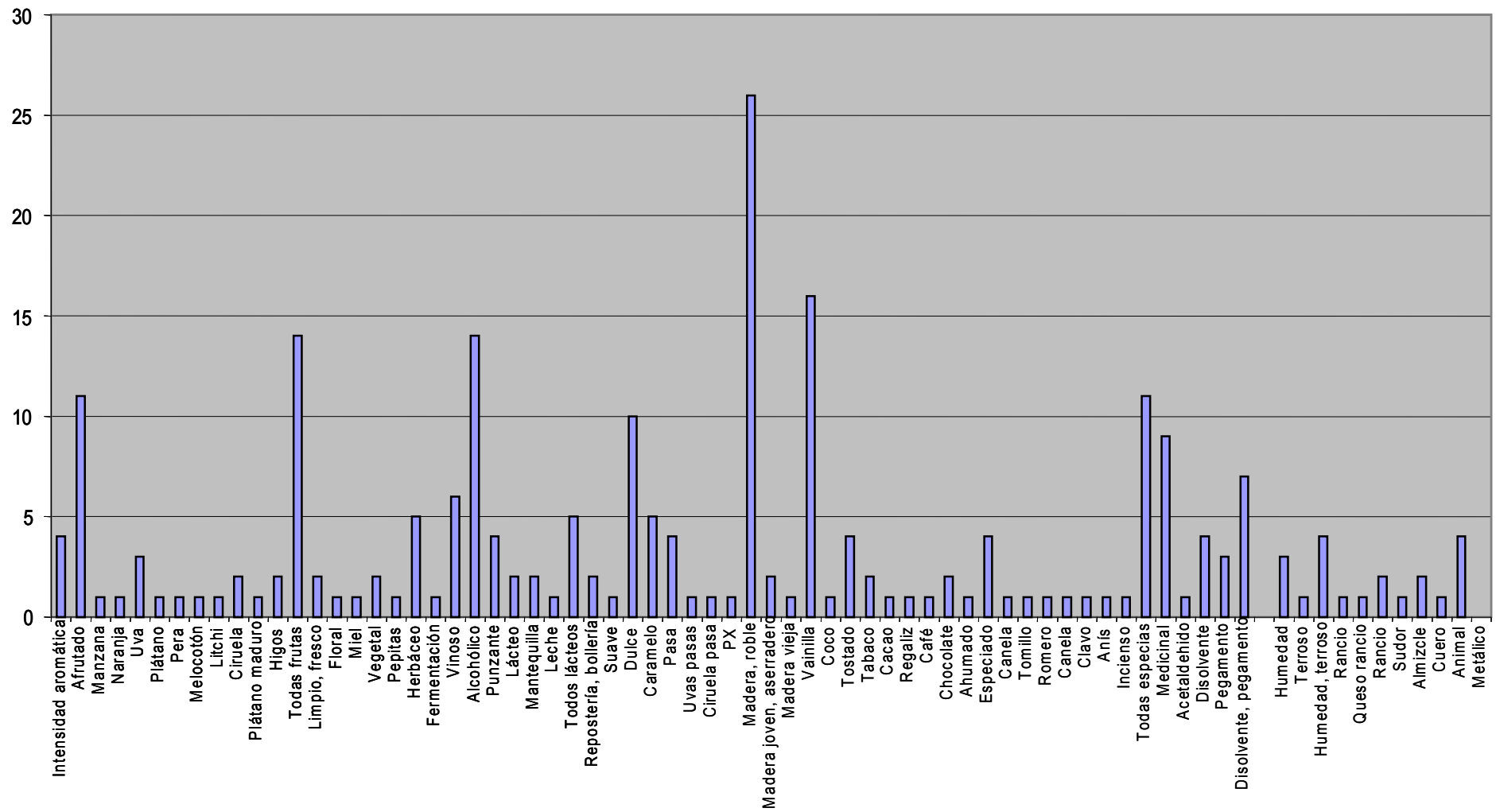


Figura 13. Gráfico de frecuencias de los descriptores propuestos por los jueces

Como puede observarse, los descriptores más utilizados (con una frecuencia mayor de 5 en total) fueron: afrutado, herbáceo, vinoso, alcohólico, lácteo, dulce, caramelo, madera, vainilla, especiado, medicinal, disolvente. Se incluyen los de frecuencia 4: intensidad aromática, tostado, humedad, y animal, además de una evaluación global (impresión general).

Se diseñó de esta forma la hoja de cata (hoja 4 del anexo II) de aguardientes envejecidos que se muestra, con la que se realizaron las evaluaciones descriptivas.

#### **6.3.1.4.4. Evaluación de aguardientes envejecidos en Solera y Criaderas y de manera acelerada mediante pruebas descriptivas**

Se llevaron a cabo las evaluaciones descriptivas cuantitativas de los mejores aguardientes de envejecimiento acelerado.

Al calcular las medias para cada atributo, lácteo, humedad y animal presentaron valores muy bajos, por lo que habrá que reconsiderar la eliminación de éstos 2 últimos para el análisis multivariado, pues podrían aportar discriminación entre las muestras.

El análisis de la varianza del descriptor *impresión general* no confirma diferencia estadísticamente significativa entre las muestras, si bien establece el siguiente orden según puntuación creciente: 3x1H-S02-2x1H-S04-S13-S07-S16.

Se aplicó el análisis estadístico multivariante mediante Componentes Principales al conjunto de los datos, extrayéndose 5 componentes que explican el 73% de la varianza. De acuerdo a la tabla 6, puede hacerse la siguiente interpretación de las primeras componentes, en función de los pesos de las variables en cada una:

- CP1: dulce y vainilla, característicos de un fino aroma de envejecimiento, por lo que se plantea la hipótesis de que se relacione con las reacciones que ocurren lentamente entre los compuestos extraídos del roble y con participación del oxígeno.
- CP2: herbáceo, químico y humedad, notas negativas.
- CP4: intensidad aromática, madera, tostado y especiado, notas asociadas a un acusado carácter amaderado.

La impresión general se relaciona de manera positiva con CP1 y de forma inversa con CP2.

Tabla 6: Análisis de componentes principales: peso de la variables

	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4	CP 5
Intensidad Aromática	0.140	-0.109	0.211	<b>0.766</b>	0.091
Afrutado	0.015	0.119	<b>0.919</b>	0.123	0.149
Herbáceo	-0.088	<b>0.756</b>	0.173	0.073	0.016
Vinoso	0.155	0.194	0.161	0.228	<b>0.743</b>
Alcohólico	-0.109	-0.028	0.027	0.486	<b>0.699</b>
Lácteo	0.669	0.379	-0.013	0.123	0.358
Dulce	<b>0.739</b>	-0.169	0.248	0.346	0.021
Madera	0.423	0.219	-0.231	<b>0.725</b>	-0.067
Vainilla	<b>0.726</b>	-0.145	-0.162	0.422	-0.115
Tostado	0.304	0.186	-0.149	<b>0.729</b>	0.172
Especiado	-0.041	0.168	0.125	<b>0.735</b>	0.161
Químico	0.274	<b>0.736</b>	0.044	-0.035	0.367
Humedad	-0.061	<b>0.812</b>	0.076	0.215	-0.268
Animal	0.093	0.614	-0.231	0.431	0.319
Impresión General	0.652	-0.591	0.281	0.369	-0.071
Expl.Var	2.011	2.872	1.268	3.127	1.589
Prp.Totl	0.134	0.191	0.084	0.208	0.105

Las medias de los valores de las componentes para cada muestra se representaron en el nuevo espacio CP1-CP2-CP4, pudiendo observarse en la figura 14.

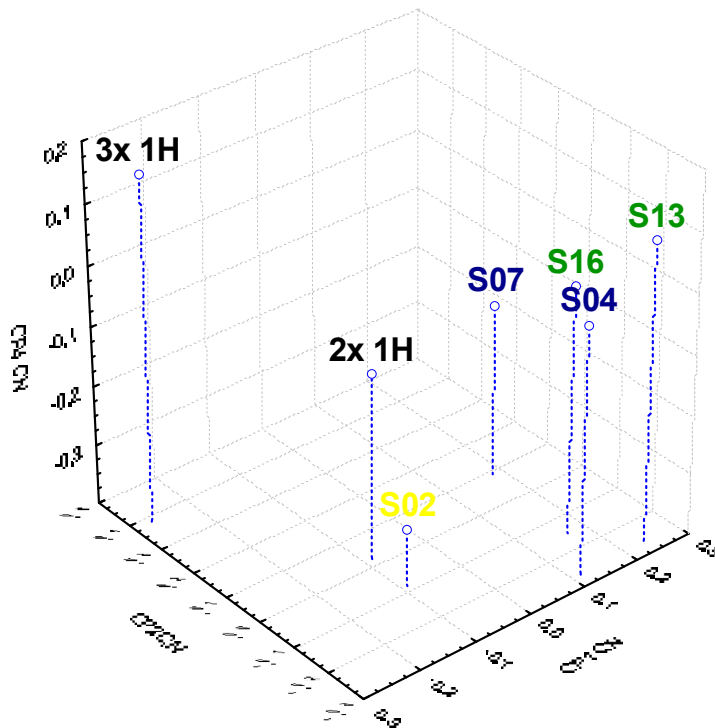


Figura 14: Espacio tridimensional PC1-PC2-PC4

En base la figura 14, pueden hacerse las siguientes consideraciones:

1. Los aguardientes de la solera se ordenan a lo largo de la CP1 en función de su tiempo medio de envejecimiento. El ensayo 2x1H se sitúa sobre el aguardiente de menor vejez (S02), y el 3x1H en valores menores.
2. Respecto a la CP2, solo 3x1H presenta valores elevados, alejados del resto de las muestras, incluida la del ensayo acelerado 2x1H.
3. La CP4, relacionada con la intensidad aromática debida principalmente a los procesos de extracción de la madera, presenta los mayores valores para la muestra de envejecimiento acelerado con mayor cantidad de roble (3x1H). 2x1H se sitúa en los niveles SR (S04, S07) y SGR (S13, S16), mientras el brandy de menor tiempo de envejecimiento S02 alcanza los menores valores.

Puede concluirse pues, que la muestra 2x1HUS, (obtenida mediante envejecimiento acelerado con una cantidad de viruta que proporciona una relación superficie/volumen doble a la de la bota jerezana y envinada con oloroso durante 1 hora de ultrasonido, 24 horas de maceración y posterior secado en estufa durante 10 horas), presentó en el plazo de 1 mes características sensoriales semejantes a brandies Solera Reserva envejecidos de forma tradicional en sistema de Solera y Criaderas.

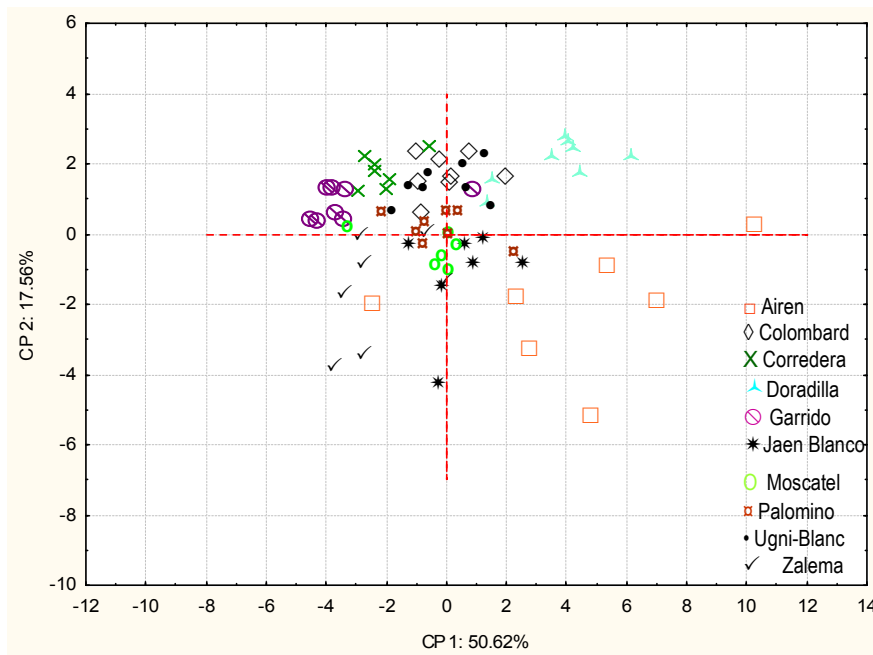
### **6.3.2. Aplicación del test para la evaluación del potencial de diferentes variedades de uva para su futuro uso en la elaboración del Brandy de Jerez**

Actualmente casi el 100% de las “holandas” provienen de vinos de la variedad Airén provenientes de Castilla La Mancha. Son muchas las bodegas interesadas en transformar la actual denominación específica del Brandy de Jerez, en denominación de Origen, para lo cual es condición indispensable que la uva con la que se elabora el destilado inicial sea una uva de la zona. Con este objetivo, con el de encontrar variedades autóctonas que sean capaces de ser una alternativa a la variedad de uva Airén, se realizó el presente estudio.

En esta segunda parte del presente capítulo, se analizaron holandas de 10 variedades de uvas diferentes (Airén, Colombar, Corredera, Doradilla, Garrido fino, Jaén blanco, Moscatel de Málaga, Palomino fino, Ugni blanc y Zalema) envejecidas mediante el test puesto a punto en la primera parte del capítulo. Se evaluaron tanto analítica como sensorialmente, comparándolas

con brandies de referencia envejecidos de forma tradicional. Las holandas de 10 variedades de diferentes uvas se envejecieron durante 1 mes con el método optimizado anteriormente. A todas estas holandas envejecidas se les realizaron los mismos análisis que en el apartado anterior: cuantificación de compuestos polifenólicos mediante UPLC, determinación del índice de polifenoles totales mediante Folin-Ciocalteu y análisis de parámetros cromáticos.

Con el conjunto de parámetros estudiados, se realizó un análisis de componentes principales a las holandas envejecidas de diferentes variedades con la finalidad de estudiar posibles diferencias en su comportamiento. Tal y como se aprecia en la figura 15, las holandas de la variedad Airén, se sitúan a la derecha del gráfico, algo más alejadas del resto de las variedades, asemejándose en su comportamiento las variedades Jaén Blanco y Moscatel. Si analizamos el peso de las variables en las componentes principales (tabla 7), observamos como a la componente 1 se asocian la mayoría de los polifenoles así como los parámetros cromáticos, mientras que en la componente 2, son ácido *p*-cumárico y el coniferaldehído los que mayor influencia tienen. En la componente principal 3, tan solo el parámetro cromático *a*\* tiene un peso relevante.



**Figura 15:** Análisis de componentes principales. Proyección de los casos.

	CP1: 50.62%	CP2: 17.56%	CP3: 8.8%	CP4: 6.78%
IPT	0.521	-0.672	-0.251	0.165
ÁcidoGálico	<b>0.752</b>	0.497	0.112	0.049
HMF	0.697	0.178	-0.049	0.282
Furfural	0.639	-0.381	-0.240	0.492
ÁcidoVainillico	<b>0.844</b>	0.077	0.127	0.271
ÁcidoSiringico	<b>0.882</b>	0.104	0.099	0.288
Vainillina	<b>0.905</b>	0.242	0.184	-0.023
ÁcidoP-cumárico	0.167	<b>0.719</b>	0.033	-0.333
Siringaldehido	<b>0.881</b>	0.058	0.177	-0.016
Coniferaldehido	0.479	<b>0.718</b>	-0.331	0.121
Sinapaldehido	0.148	0.680	-0.507	0.015
L*	<b>-0.783</b>	0.458	0.071	0.172
a (roj-ver)	0.421	-0.229	<b>-0.747</b>	-0.277
b (am-az)	<b>0.879</b>	-0.147	0.298	-0.273
H* (tono)	<b>-0.811</b>	0.224	0.264	0.438
C* (croma)	<b>0.879</b>	-0.146	0.302	-0.272

**Tabla 7:** Peso de las variables en el análisis de componentes principales

Finalmente, se realizó un análisis de componentes principales con la totalidad de los parámetros estudiados al conjunto de muestras: las holandas de diferentes variedades envejecidas más las muestras de referencia procedentes del sistema experimental de solera y criadera. Las dos primeras componentes explican el 80% de la variabilidad entre las muestras. En la figura 16, se observa como la componente 2 hace una diferenciación entre las muestras envejecidas tradicionalmente y las holandas envejecidas de forma acelerada; si analizamos el peso de las variables en estas dos primera componentes, observamos como las variables que más peso tienen en la componente 2, son los polifenoles extraíbles directamente de la madera: el ácido gálico, el coniferaldehido y el sinapaldehido (Figura 17). Tal y como se había visto al comienzo del presente capítulo, la extracción de estos compuestos se había conseguido suavizar con el pretratamiento de las virutas, no obstante seguía siendo algo elevada si se compara con el proceso tradicional de envejecimiento, pudiendo ser esta la causa que diferencia a las muestras envejecidas mediante sistema tradicional y muestras envejecidas de forma acelerada a lo largo de la componente 2.

Sin embargo, a pesar de esta diferenciación cabe resaltar el ordenamiento de las muestras a lo largo de la componente 1 en función de su vejez media, quedando las menos envejecidas a la izquierda (Solera) y las más envejecidas a la derecha. Por tanto, atendiendo a este ordenamiento de la componente 1, podemos decir en cuanto a las holandas envejecidas, que la variedad Airén es la que más rápidamente ha alcanzado un nivel de envejecimiento similar al de

las muestras Solera Reserva y Solera Gran Reserva, seguidas de la variedades Jaén Blanco, Moscatel y Doradilla, aunque ésta se sitúa en una parte más inferior.

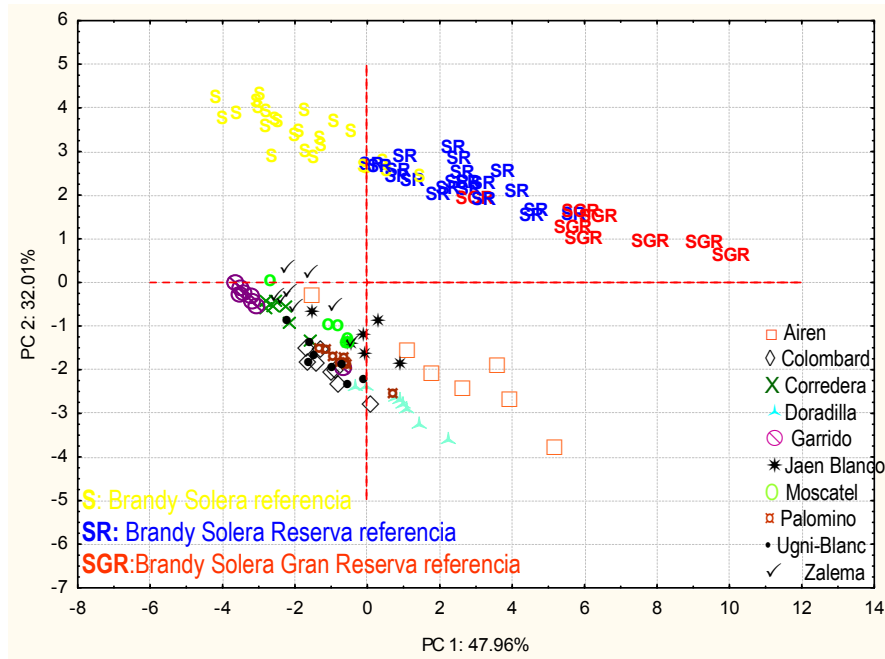


Figura 16: Análisis de componentes principales. Proyección de los casos

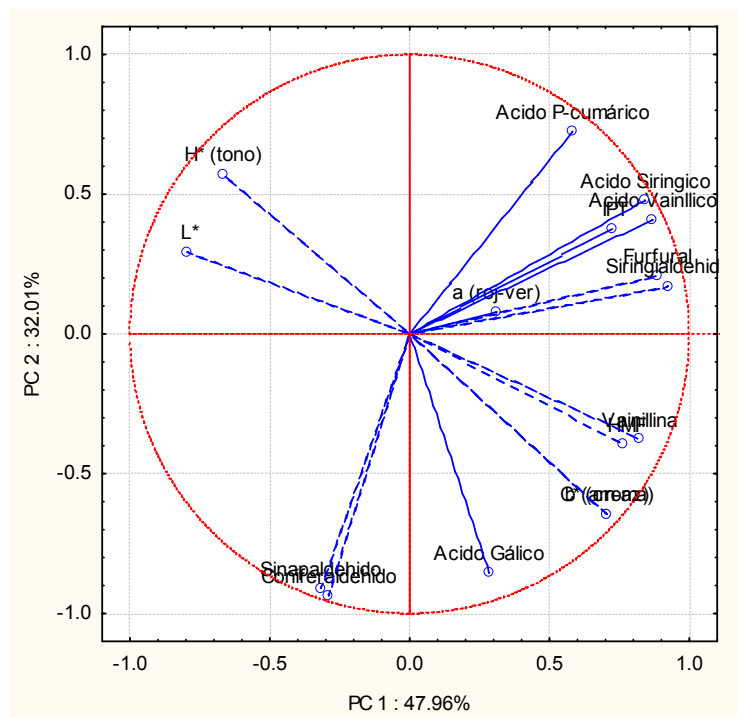


Figura 17: Análisis de Componentes principales. Proyección de las variables

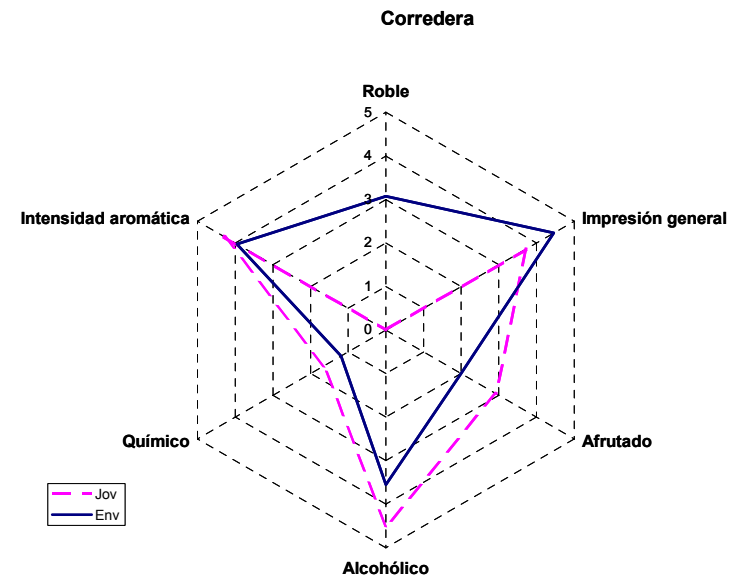
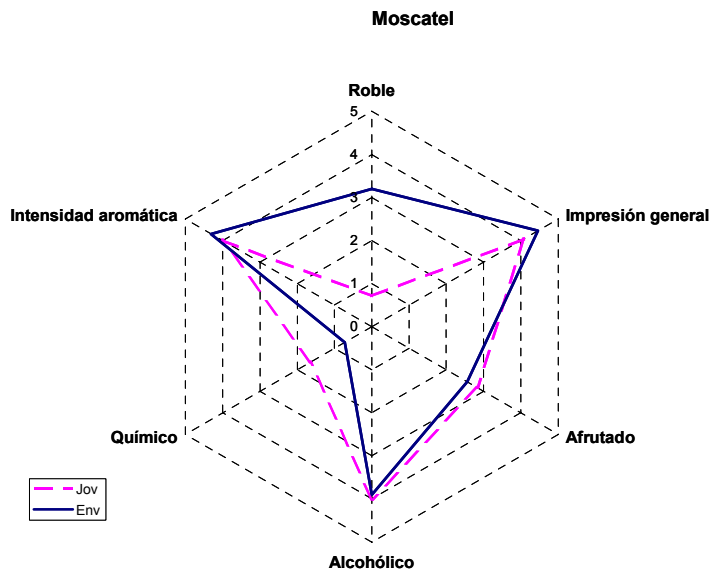
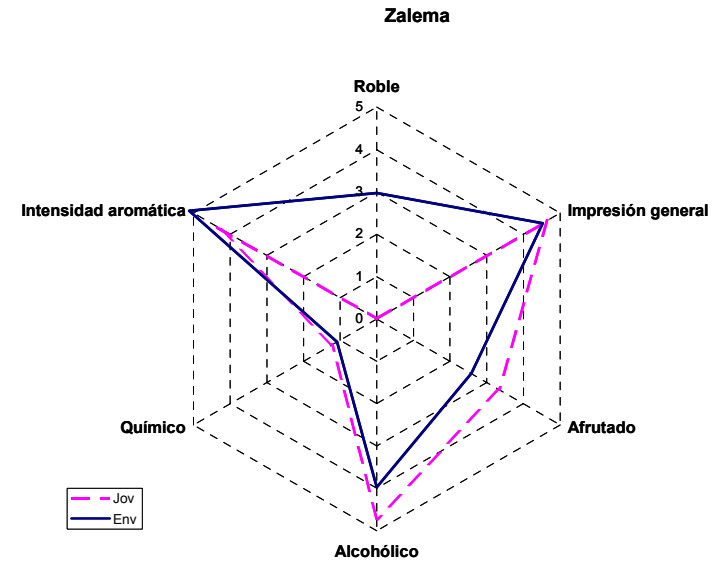
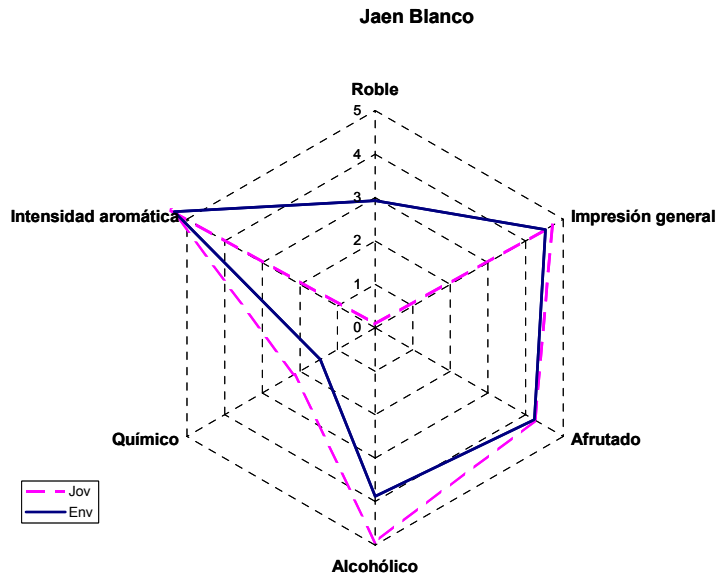


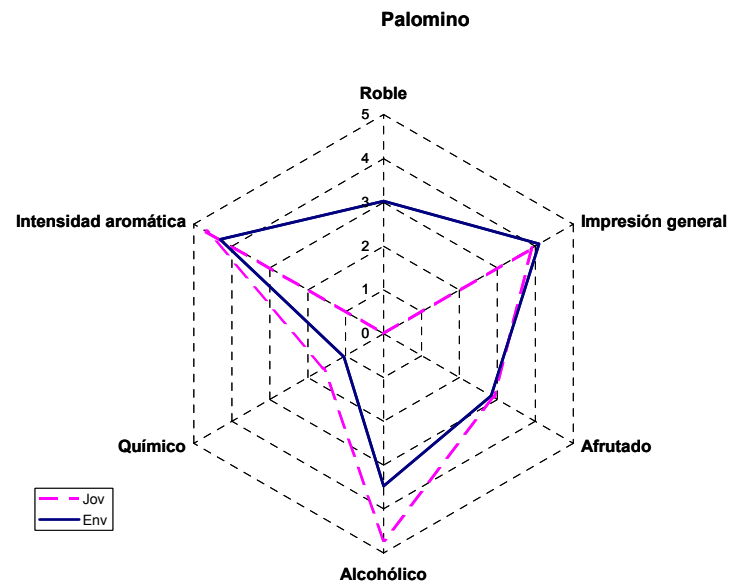
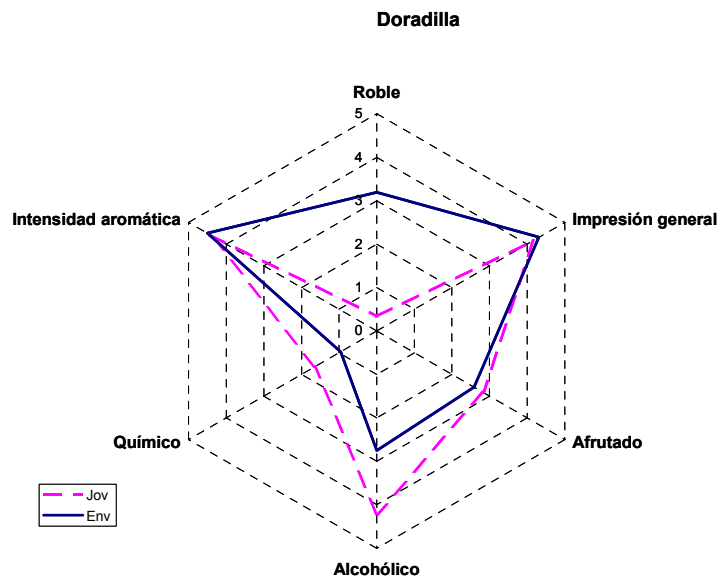
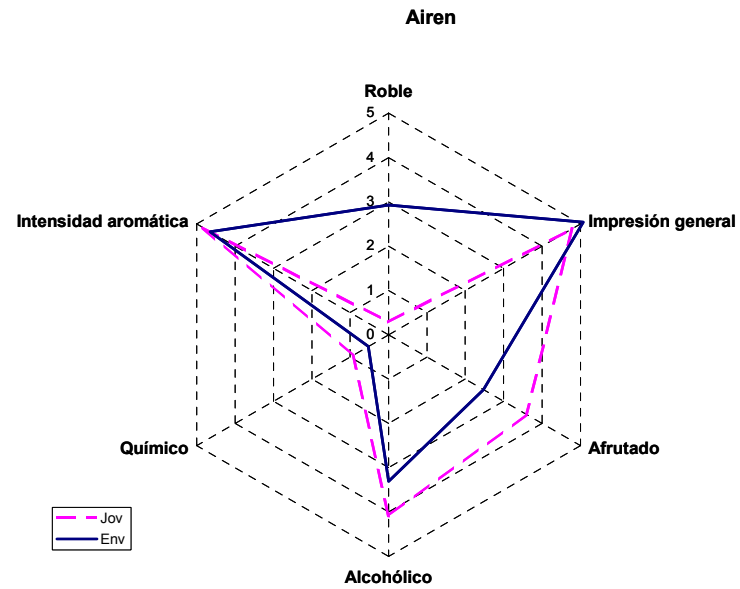
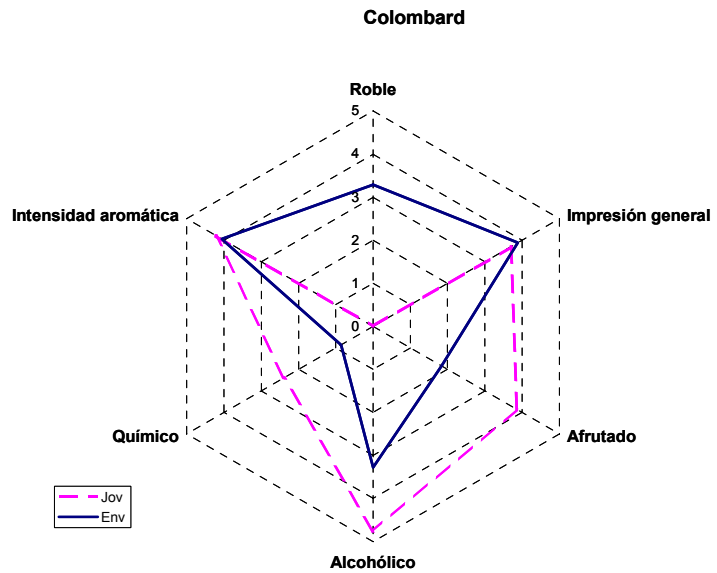
### 6.3.2.1. Análisis sensorial

Las holandas sometidas a envejecimiento acelerado fueron analizadas sensorialmente, realizándose la evaluación descriptiva de cada una de ellas por duplicado.

Para cada descriptor, se realizaron ANOVAs con el objeto de averiguar cuales eran los atributos que mejor diferenciaban las distintas variedades, y si éstos eran los mismos en la Holanda joven y en la envejecida. Ninguno de los descriptores diferenció individualmente las holandas elaboradas con distintas variedades de uva (ni entre las jóvenes ni entre las envejecidas), y en todo caso lo hicieron de manera no significativa desde un punto de vista estadístico.

Cuando se analizó el efecto del envejecimiento, algunos descriptores modifican sus valores de manera significativa: disminuyeron afrutado, herbáceo y alcohólico, y aumentaron tostado, vainilla, roble y dulce. Respecto a las variables negativas, la nota química disminuyó y la animal aumentó, al envejecer las holandas. Sería necesario realizar estudios posteriores para intentar esclarecer a qué se deben estas notas negativas que aparecen en el envejecimiento acelerado, si bien algunos trabajos de envejecimiento artificial realizados en el grupo de investigación con muestras de vinagre pusieron de relieve el importante papel de la oxigenación durante el envejecimiento acelerado con virutas [13]. En la figura 18, nos permite obtener una clara idea del efecto del envejecimiento sobre las holandas, al representar en forma de gráficos de arañas, los valores de los descriptores más representativos: roble, impresión general, afrutado, alcohólico, químico e intensidad aromática; confirmando lo anteriormente comentado, que en líneas generales los descriptores roble e impresión general aumentan en las holandas envejecidas, mientras que las notas química, alcohólica y afrutada disminuyen en comparación con las holandas jóvenes.





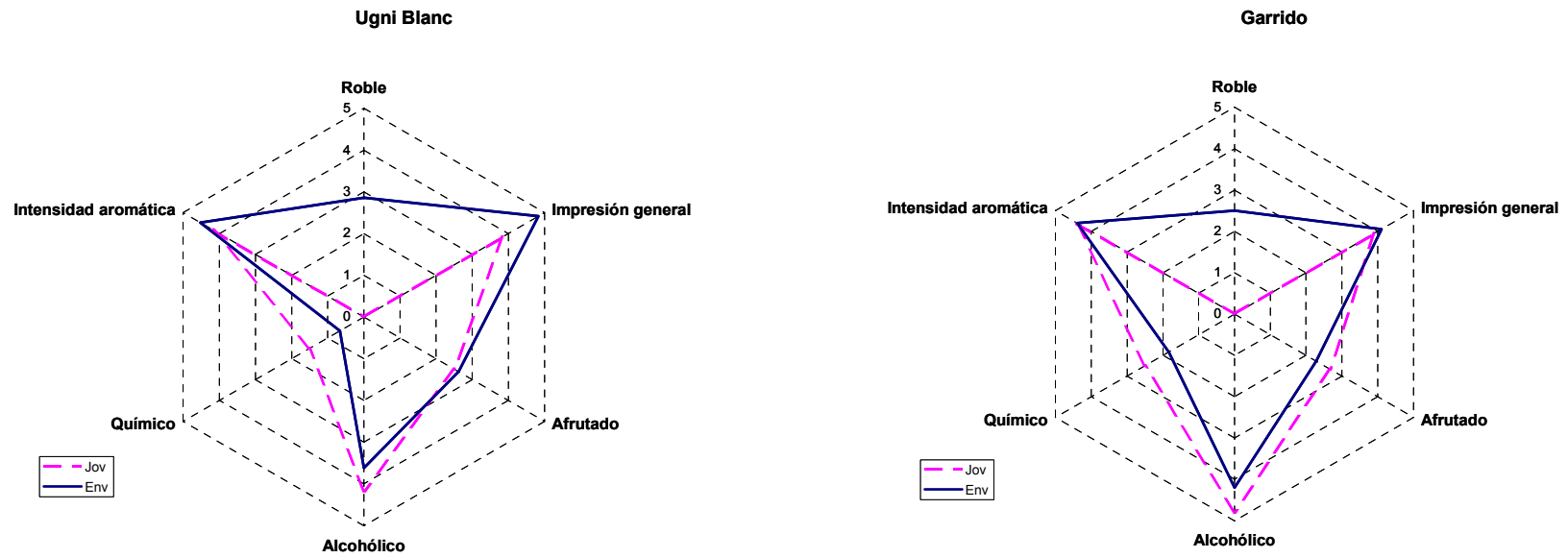
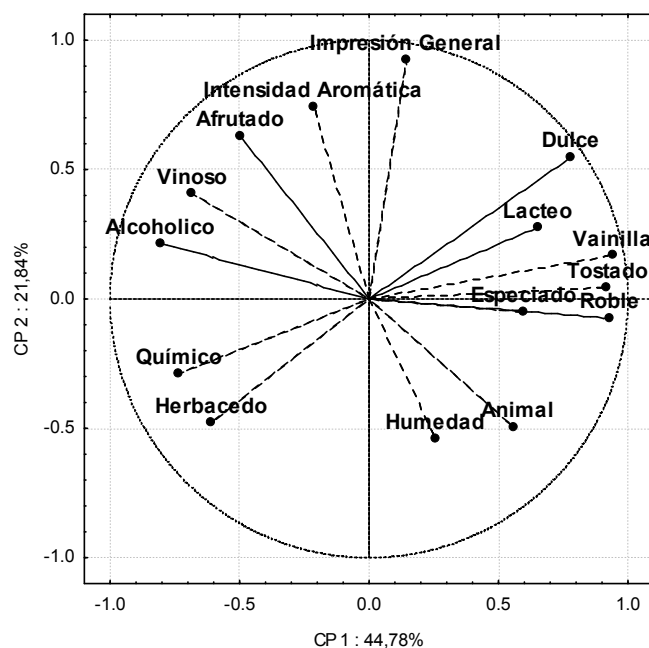


Figura 18: Gráficos de araña de todas las variedades diferenciando entre holanda sin envejecer y envejecida

En el ordenamiento de las medias, los mayores valores en los atributos positivos y en calidad corresponden a Moscatel, Zalema, Doradilla y Airén, mientras que para los negativos es Colombar la de mayor puntuación.

A la vista de los resultados, parece recomendable abordar el tratamiento de los datos desde un punto de vista multivariante. Se realizó un análisis factorial sobre el conjunto de las holandas sin envejecer y las envejecidas de manera acelerada, extrayéndose 2 factores que explican el 67% de la varianza total de los datos.

La figura 19 representa la proyección de las variables sobre el plano de estos 2 factores. Según puede observarse, el factor 1 contiene información sobre el envejecimiento, al incluir variables como roble, vainilla, tostado y especiado con valores positivos elevados, en oposición a los variables vinoso y alcohólico que se sitúan en el eje negativo. El factor 2 por su parte parece relacionarse con la calidad, vista la significativa contribución de descriptores tales como intensidad aromática y afrutada, junto con la impresión general, frente a los pesos negativos de humedad y animal.



**Figura 19:** Análisis de componentes principales. Proyección de las variables

La proyección de las muestras sobre el nuevo plano se muestra en la figura 20, en la que se observa una clara diferenciación entre las holandas jóvenes (en amarillo) y las envejecidas (en marrón), a izquierda y derecha en el factor 1 respectivamente. Por otro lado, la situación respecto al factor 2 permite identificar las variedades mejor valoradas y de mayor intensidad

aromática y con notas afrutadas, apuntando hacia Moscatel, Airen, Jaen Blanco y Zalema, tanto en las holandas frescas como en las envejecidas.

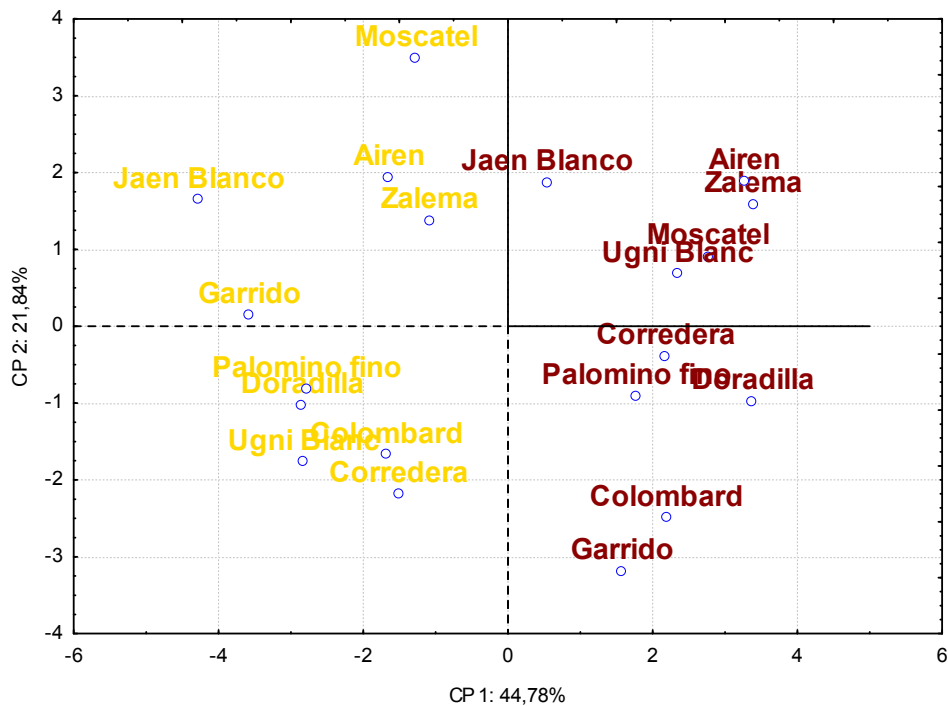


Figura 20: Análisis de componentes principales. Proyección de los casos.

Resulta interesante, sin embargo, que el efecto del envejecimiento es distinto en función de la variedad, mejorando la impresión general en algunas de las peor puntuadas como Holanda joven (Ugni Blanc, Corredera), mientras Moscatel y Garrido empeoran su valoración global. El resto de las variedades no modifican de manera apreciable su aceptabilidad.

## 6.4. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos, se puede proponer el método alternativo de envejecimiento acelerado como herramienta válida para obtener brandy de características similares a los brandies envejecidos mediante sistema tradicional, pero con un importante ahorro de tiempo.

Por otro lado, podemos concluir, teniendo en cuenta las evaluaciones analíticas y sensoriales que las holandas que tuvieron un comportamiento similar y aceptable a la variedad Airén fue la variedad Jaén Blanco, seguida de la Moscatel.

## 6.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] **Del Álamo, M., Nevares, I., Cárcel, L.M.** (2006). Redox potential evolution during red wine aging in alternative systems. *Analytica Chimica Acta*, 563, 223-228.
- [2] **Del Alamo Sanza, M., Escudero, J.A.F., De Castro Torío, R.** (2004). Changes in phenolic compounds and colour parameters of red wine aged with oak chips and in oak barrels. *Food Science and Technology International*, 10 (4), 233-241.
- [3] **Del Alamo Sanza, M., Nevares Domínguez, I., Cárcel Cárcel, L.M., Navas Gracia, L.** (2004). Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. *Analytica Chimica Acta*, 513 (1), 229-237.
- [4] **Monedero, L., Olalla, M., Villalón, M., López-García, H., López, M.C.** (2000). Standardisation of the chromatic characteristics of sobretablas wine macerates obtained by an accelerated ageing technique using heating and oak shavings. *Food Chemistry*, 69 (1), 47-54.
- [5] **Gutiérrez Afonso, V.L.** (2002). Sensory Descriptive Analysis between white wines fermented with oak chips and in barrels. *Journal of Food Science*, 67 (6), 2415-2419.
- [6] **Fernández de Simón, B., Cadahía, E., del Álamo, M., Nevares, I.** (2010). Effect of size, seasoning and toasting in the volatile compounds in toasted oak wood and in a red wine treated with them. *Analytica Chimica Acta*, 660 (1-2), 211-220.
- [7] **Monedero, L., Olalla, M., Quesada, J.J., Ga, H.L., Lopez Martinez, M.C.** (2000). Exhaustion Techniques in the Selection Description of Phenolic Compounds in Jerez Wine Extracts Obtained by an Accelerated Aging Technique, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (5), 1754-1764.
- [8] **Morales, M.L., Tesfaye, W., Carmen García-Parrilla, M., Casas, J.A., Troncoso, A.M.** (2002). Evolution of the aroma profile of sherry wine vinegars during an experimental aging in wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (11), 3173-3178.
- [9] **Morales, M.L., Benítez, B., Troncoso, A.M.** (2004). Accelerated aging of wine vinegars with oak chips: Evaluation of wood flavour compounds. *Food Chemistry*, 88 (2), 305-315.
- [10] **Morales Gómez, M.L., Bellido, B.B., Tesfaye, W., Callejón Fernandez, R.M., Valencia, D.V., Fernandez-Pachón, M.S., García-Parrilla, M.D.C., Troncoso González, A.M.** (2006). *Journal of Food Science*, 71 (3), 238-242.
- [11] **Tesfaye, W., Morales, M.L., Benítez, B., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M.** (2004). Evolution of wine vinegar composition during accelerated aging with oak chips. *Analytica Chimica Acta*, 513 (1), 239-245.
- [12] **Tesfaye, W., Morales, M.L., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M.** (2002). Evolution of phenolic compounds during an experimental aging in wood of Sherry vinegar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (24), pp. 7053-7061

- [13] Durán, E., Natera, R., Castro, R., Ruiz, M.J., Rodríguez, M.C., Barroso, C.G. (2008) Accelerated aging studies with microoxygenation and chips in the production of a sherry wine vinegar. II Internacional Conference on Acetic Acid Bacteria. Japan, 2008.
- [14] Quesada Granados J., Merelo Guervos J.J., Oliveras Lopez M.J., Gonzalez Penalver J., Olalla Herrera M., Blanca Herrera R., Lopez Martinez M.C. (2002). Application of artificial aging techniques to samples of rum and comparison with traditionally aged rums by analysis with artificial neural nets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (6), 1470-1477.
- [15] Blanco Carvajal, I., Giménez Martínez, R., González, M.D., Vazquez, M.A. (2000). Application of the accelerated ageing method of brandy about polyphenolic content in various types of rums. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 19 (4), 251-256.
- [16] Rodríguez Dodero M.C. (2004). Estudio analítico de la composición polifenólica del brandy de jerez y su relación con la elaboración, envejecimiento, caracterización y calidad. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- [17] Martínez Montero C., Rodríguez Dodero M.D.C., Guillen Sanchez D.A., García Barroso C. (2005). Sugar contents of Brandy de Jerez during its aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (4), 1058-1064.
- [18] Rodríguez M.C., Guillén D., Schwarz M., Barroso C.G. (2010). Phenolic compounds and furanic derivatives in the characterization and quality control of Brandy de Jerez. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2), 990-997.
- [19] Puertas, B., Jurado, S., Cantos, E., Jiménez, M.J., Guerrero, R. (2009). Rentabilidad del cultivo de variedades de vid para la producción de holandas para brandy de Jerez. Libro de actas X Congreso Nacional de Investigación Enológica.
- [20] Schwarz, M., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Barroso, C.G. (2009). Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez. *Journal of Separation Science*, 32 (11), 1782-1790
- [21] UNE 87004, (1979). Análisis sensorial. Guía para la instalación de una sala de cata. (ISO 8589:2007), IRANOR, Madrid (Spain).
- [22] UNE-EN ISO 4120, (2008). Análisis sensorial. Metodología. Prueba triangular. (ISO 4120:2004), AENOR, Madrid (Spain).
- [23] UNE 87017, (1992). Sensory analysis. Methodology. Método para establecer el perfil olfativo gustativo. (ISO 6564:1985), AENOR, Madrid (Spain).
- [24] UNE-ISO 4121, (2006). Análisis sensorial. Metodología. Directrices para la utilización de escalas de respuestas cuantitativas. (ISO 4121:2003), AENOR, Madrid (Spain).
- [25] UNE 87023, (1995). Análisis sensorial. Metodología. Prueba de ordenación. AENOR, Madrid (Spain).
- [26] UNE-EN ISO 5495, Análisis sensorial. Metodología. Prueba de comparación por parejas (ISO 5495:2005 e ISO 5495:2005/Cor 1:2006), AENOR, Madrid.



- [27] Barbero, G.F., Liazid, A., Palma, M., Barroso, C.G. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, 75 (5), 1332-1337.
- [28] Liazid, A., Schwarz, M., Varela, R.M., Palma, M., Guillén, D.A., Brigui, J., Macías, F.A., Barroso, C.G. (2009). Evaluation of various extraction techniques for obtaining bioactive extracts from pine seeds. *Food and Bioproducts Processing* (In press).

## 5.6. ANEXO II

## Cuestionario 1:

**Comparación múltiple de aguardientes envejecidos**

Tiene disponible una muestra de referencia (Ref.), con la cual hay que comparar las restantes.

En el orden de izquierda a derecha, proceda de la siguiente forma para cada una:

1. Anote el código de 3 cifras de la muestra.
2. Sin agitar la Ref., destápela, acerque la nariz y huela.
3. Con la copa de la Ref. destapada, agítela.
4. Huela de nuevo la Ref., intentando fijar en la memoria las sensaciones percibidas.
5. Tome ahora la muestra de la serie y proceda de la misma forma.
6. Anote su grado de SEMEJANZA con la muestra de referencia, marcando con una X en la casilla correspondiente.
7. Describa las sensaciones aromáticas que le provoca la muestra.

Descanse un minuto antes de continuar con la siguiente muestra

Código	Grado de semejanza				
	Ausencia	Débil	Media	Fuerte	Muy fuerte
	Descriptores				
	Descriptores				
	Descriptores				
	Descriptores				
	Descriptores				

Por último, indique **las 3 muestras que más le gustaron**, en orden de mayor a menor preferencia

Preferencia	Más	→	Menos
Código			

**GRACIAS**

**Questionario 2:**

**Discriminación de diferencias entre aguardientes envejecidos mediante prueba triangular**

Tendrá disponibles una serie de triángulos de muestras. Para cada uno, proceda de la siguiente forma:

1. Anote los códigos de las muestras en la columna "Códigos del triángulo"
2. Huela las 3 muestras que se le presentan una vez, o una sola vez más si es que lo necesita.
3. Indique, rodeando el código con un círculo, cuál de ellas es diferente.
4. Especifique el grado de diferencia que encuentra, marcando con una X en la casilla correspondiente.
5. Describa en qué consiste la diferencia detectada.
6. Descanse un minuto antes de continuar con el siguiente triángulo.

Códigos del triángulo	Grado de diferencia				
	Ausencia	Débil	Media	Fuerte	Muy fuerte
	Descripción de la diferencia				
	Descripción de la diferencia				
	Descripción de la diferencia				

**GRACIAS**

### Cuestionario 3

#### Generación de descriptores aromáticos en aguardientes envejecidos

Tiene disponibles una serie de muestras de aguardientes envejecidos. Para cada una, proceda como sigue.

1. Anote el código de 3 cifras de la muestra.
2. Destape y huela.
3. Sepárese de la copa y agítela procurando mojar las paredes interiores.
4. Acerque la nariz de nuevo y huela.
5. Anote las sensaciones.
6. Descanse un minuto antes de continuar con la siguiente muestra.

Código	Descriptores

**GRACIAS**

### Cuestionario 4 Evaluación de aguardientes mediante prueba descriptiva

Tendrá disponibles una serie de muestras. Para cada una, proceda de la siguiente forma:

1. Destape la copa y huela en su interior.
2. Mueva ligeramente la copa y huela de nuevo.
3. Para cada atributo, señale la marca vertical de la escala de 9 puntos que a su juicio corresponde con la intensidad del estímulo.
4. Finalmente, puntúe su impresión general de la muestra en la escala hedónica.
5. Descanse un minuto antes de continuar con la siguiente muestra.

CÓDIGO DE LA MUESTRA:					
<b>Atributos</b>	<b>Ausente</b>	<b>Débil</b>	<b>Medio</b>	<b>Pronunciado</b>	<b>Muy pronunciado</b>
Intensidad aromática	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Afrutado	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Herbáceo	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Vinoso	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Alcohólico	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Lácteo	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Dulce, caramelo	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Madera, roble	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Vainilla	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Tostado (tabaco, café, cacao, ahumado)	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Especiado (anís, canela, tomillo, romero, clavo)	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Químico (disolvente, pegamento, medicinal)	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Humedad, hongo, terroso	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Animal (sudor, almizcle, cuero)	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
Otros (especificar): .....	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
.....	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
.....	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
<b>Impresión general</b>	<b>Malo</b>	<b>Mediocre</b>	<b>Aceptable</b>	<b>Bueno</b>	<b>Muy Bueno</b>
	_____;	_____;	_____;	_____;	_____;
<b>OBSERVACIONES (Opcional)</b>					

**GRACIAS**

### Cuestionario 5

#### Ordenamiento por preferencia de aguardientes envejecidos

1. Huela las 5 muestras que se le presentan, en el orden de izquierda a derecha.
2. Coloque en la tabla inferior los códigos de las muestras, por orden decreciente de preferencia.

<b>Preferencia</b>	<b>Más</b>	<b>→</b>	<b>→</b>	<b>→</b>	<b>Menos</b>
Código					

**COMENTARIOS:**.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**GRACIAS**



## **7. PARAMETROS INDICADORES DE LA EDAD DE VINOS Y BRANDIES DE JEREZ**





## 7.1. INTRODUCCIÓN

Existen gran número de trabajos publicados acerca de la relación entre el consumo de antioxidantes y la disminución de la incidencia de ciertas enfermedades cardiovasculares y cáncer [1,2]. La actividad antioxidante que presenta el vino, se debe en gran medida a los compuestos polifenólicos presentes en el mismo [3-6]. Dichos compuestos polifenólicos, serán aportados no sólo por la propia materia prima, la uva, sino por la madera en su etapa de envejecimiento, influyendo diversos factores, como el tipo de madera [7,8], o el tostado de la misma [9]. En el caso de los destilados envejecidos como es el caso del brandy, su contenido polifenólico, se debe casi únicamente a su etapa de envejecimiento en madera. Dado que los compuestos polifenólicos van incrementando su concentración a lo largo del proceso de envejecimiento, podría ser posible poder establecer una relación directa entre el poder antioxidante y el tiempo de envejecimiento en madera [10].

La evolución de los polifenoles de bajo peso molecular en productos enológicos de Jerez durante su etapa de envejecimiento ha sido estudiado por diversos autores: Moreno y col. [11] estudiaron la evolución durante un año en tres diferentes tipos de vino de Jerez envejecidos mediante el sistema dinámico de solera y criadera identificando las diferencias entre ellos; Tesfaye y col., [12] estudiaron durante dos años la evolución de polifenoles en vinagres de Jerez envejecidos, encontrando un aumento considerable en la concentración de la mayoría de los compuestos a lo largo del periodo de tiempo estudiado. Para el caso del Brandy, la evolución de compuestos polifenólicos durante su envejecimiento ha sido estudiado por Rodríguez y col. [13,14].

Por su parte, son numerosos los trabajos que estudian la evolución del color en vinos durante su envejecimiento [15,16], utilizándolos en algunos casos como parámetro indicativo de la edad del producto enológico estudiado [17]. Dentro de los estudios del color en productos enológicos de Jerez, cabe destacar el realizado por Recamales y col. [18] para amontillado utilizando el color como parámetro indicativo de la madera en el que ha sido envejecido el vino; o el de Rodríguez Doderó para Brandy de Jerez [13].

En el presente capítulo, se ha estudiado la evolución de las características cromáticas, del poder antioxidante y de los polifenoles así como la relación entre estos dos últimos parámetros en dos grupos de muestras: un grupo de muestras de Brandies procedentes de un sistema experimental

de Solera y Criaderas para brandy y otro grupo de muestras de vinos de Jerez envejecidos mediante sistema de Añadas. También se ha pretendido comprobar si a causa del envejecimiento en barricas de roble, debido a la cesión de los polifenoles de la madera al vino, produce un aumento de su poder antioxidante, de manera que éste se pueda relacionar directamente con la edad del vino, siendo en consecuencia el parámetro poder antioxidante, junto a otros, un indicador de la calidad del producto enológico.

## 7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.2.1. Muestras

Se han analizado dos grupos de muestras:

#### 7.2.1.1. Brandies de un ensayo experimental de envejecimiento

Las muestras analizadas fueron las correspondientes a un sistema experimental de envejecimiento procedentes de una experiencia piloto realizada en colaboración entre el Grupo Investigador y el Consejo de la Denominación Específica Brandy de Jerez. El sistema experimental estaba constituido por 15 botas de roble americano (la llamada bota jerezana). Doce de estas botas se destinaron a envejecer aguardiente según el sistema dinámico de soleras y criaderas, mientras que los tres restantes contuvieron el mismo aguardiente pero envejecido de manera estática, representando el sistema de añadas. Las botas del sistema dinámico se dispusieron en grupos de tres por cada escala: de mayor a menor vejez: solera-S- (botas 6, 11, 15), primera criadera -P- (botas 5, 10,14), segunda criadera -G- (botas 2, 8,13) y tercera criadera -T- (botas 1, 7,12), tal como se muestra en la figura 4. El envejecimiento estático o añadas -A- se desarrolló en las botas 3, 4 y 9 (fig 4). Todas las botas empleadas fueron envinadas con vino de Jerez Oloroso procedente de Bodegas Garvey. (Figura 1)



**Figura 1:** Distribución espacial de las botas en el sistema experimental

Las botas fueron desfondadas, rascadas y lavadas con agua a presión, conforme a los procedimientos tradicionales de la comarca. A estas muestras se les determinó su actividad antioxidante y su índice de polifenoles totales.

A partir del calendario modificado de sacas y rocíos, y con la ayuda de las fórmulas de cálculo de tiempo medio de envejecimiento, se establecieron los tiempos medios reales de cada una de las muestras (tabla 1).

Escala T		Escala G		Escala P		Escala Solera	
Muestras	Vejez media (Años)	Muestras	Vejez media (Años)	Muestras	Vejez media (Años)	Muestras	Vejez media (Años)
T1	0.25	G1	0.25	P1	0.25	S1	0.25
T2	0.45	G2	0.51	P2	0.51	S2	0.51
T3	0.58	G3	0.74	P3	0.76	S3	0.76
T4	0.67	G4	0.94	P4	0.99	S4	0.99
T5	0.77	G5	1.14	P5	1.25	S5	1.26
T6	0.9	G6	1.37	P6	1.54	S6	1.58
T7	0.87	G7	1.45	P7	1.69	S7	1.77
T8	0.87	G8	1.52	P8	1.85	S8	1.97
T9	0.97	G9	1.68	P9	2.09	S9	2.26
T11	1.03	G11	1.85	P11	2.41	S11	2.7
T13	0.99	G13	1.88	P13	2.57	S13	3
T15	1.05	G15	2.01	P15	2.79	S15	3.34
T17	1.02	G17	2.01	P17	2.87	S17	3.54
T19	1.13	G19	2.14	P19	3.06	S19	3.82

**Tabla 1:** Vejez media de las diferentes escalas del sistema experimental de envejecimiento de Solera y Criadera

#### 7.2.1.2. Vinos de Jerez envejecidos mediante sistema de añadas

Los vinos de Jerez son envejecidos mediante el sistema tradicional dinámico de Solera y Criaderas; o mediante sistema estático de añadas. En el sistema dinámico las barricas se disponen en diferentes escalas existiendo un trasvase periódico de vino de la escala de menor vejez a la escala de mayor vejez, mientras que en el sistema estático de añadas, no existe dicho trasvase.

Las muestras analizadas en este trabajo corresponden a un conjunto de 26 muestras que engloba a vinos envejecidos por el sistema estático de añadas y que cubre desde 1935 hasta 1999. Se trata de vinos olorosos, y por tanto elaborados mediante crianza oxidativa, con uva blanca variedad Palomino Fino y envejecidos en barricas de roble americano. Las muestras, así

como la información sobre la edad del vino fueron suministradas por la Bodegas Williams & Humbert, la cual mantiene una bodega especial para estos vinos.

Las muestras analizadas en el presente trabajo se consideran de un enorme valor por tratarse en algunos casos de muestras de una gran vejez y muy escasas.

### **7.2.2. Reactivos**

El reactivo de Folin (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) y el carbonato de sodio, (Panreac, Barcelona, Spain) fueron empleados para la medida del índice de polifenoles totales. Para la calibración se utilizó ácido gálico. (Merck, Darmstadt, Germany).

Una disolución saturada de Zn (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (Panreac) y una disolución de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Sigma Aldrich) en un tampon fosfato (pH 6) fueron usados en el sistema electrolítico para medir el poder antioxidante. La recta de calibrado fue elaborada con Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) de Sigma-Aldrich.

Los disolventes empleados para el análisis del UPLC fueron preparados con Acetonitrilo, ácido acético (calidad HPLC, Merck) y agua mili Q (Millipore, Bedford, MA.)

La calibración fue realizada con los correspondientes patrones de los polifenoles identificados, suministrados por Sigma Aldrich, Merck, y Fluka (Buchs, Switzerland). Las sustancias patrones fueron disueltas en un modelo vínico (15% etanol ajustado a pH 3.5 con ácido tartárico)

### **7.2.3. Índice polifenoles totales y análisis y cuantificación de compuestos polifenólicos**

El índice de polifenoles totales (IPT) fue determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu [19] y el análisis y cuantificación de polifenoles fue realizado en el caso de las muestras del conjunto de los vinos envejecidos por añadas, mediante UPLC, acoplado a un detector de UV-Vis [20], y para el caso del conjunto de muestras de Brandies fueron analizadas mediante HPLC de Waters (Milford, MA, USA) consistente en dos bombas, una modelo 616 y la otra modelo 510, un inyector automático de muestras modelo 717 y un detector ultravioleta visible, de matriz de fotodiodos, modelo 996; siguiendo el método de Rodríguez y col. [21].

#### **7.2.4. Medida del poder antioxidante**

La actividad antioxidante ha sido analizada mediante el método validado y estudiado previamente en el grupo de investigación [22] y anteriormente explicado en el apartado 4.2.9.

#### **7.2.5. Color**

El análisis de parámetros cromáticos, se ha llevado a cabo, tal y como se ha visto en capítulos anteriores con un espectrofotómetro Helio UV-Vis midiendo entre 380-770nm, para posterior cálculo de parámetros CIELab.

#### **7.2.6. Tratamiento estadístico**

Para el tratamiento estadístico del conjunto de las muestras de vinos envejecidos por añadas, se dividió al conjunto de muestras en 7 grupos, clasificándolas por tiempo de envejecimiento, según la década de la añada. Para poder determinar diferencias significativas entre los distintos grupos de muestras, se les realizó *one-way ANOVA*. Posteriormente y con la intención de saber si alguno de los parámetros estudiados podía servir como parámetro diferenciador entre los distintos grupos, se les realizó análisis *post-hoc* (test de Bonferroni), confirmándose que de forma univariante, ninguna permitía diferenciar entre todos los grupos por lo que se decidió aplicar técnicas multivariantes. Por eso se les realizó un análisis lineal discriminante que permitiera obtener las funciones de clasificación que permitiera clasificar una muestra desconocida en función de su edad. Estos análisis fueron realizados mediante el paquete informático Statistica versión 7.0.

Tanto para el conjunto de muestras de Brandies, como para el de vinos envejecidos mediante añadas, se les realizó una regresión por mínimos cuadrados parciales que fue realizado mediante Unscrambler versión 7.5 (COMO ASA, Noruega).

### **7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

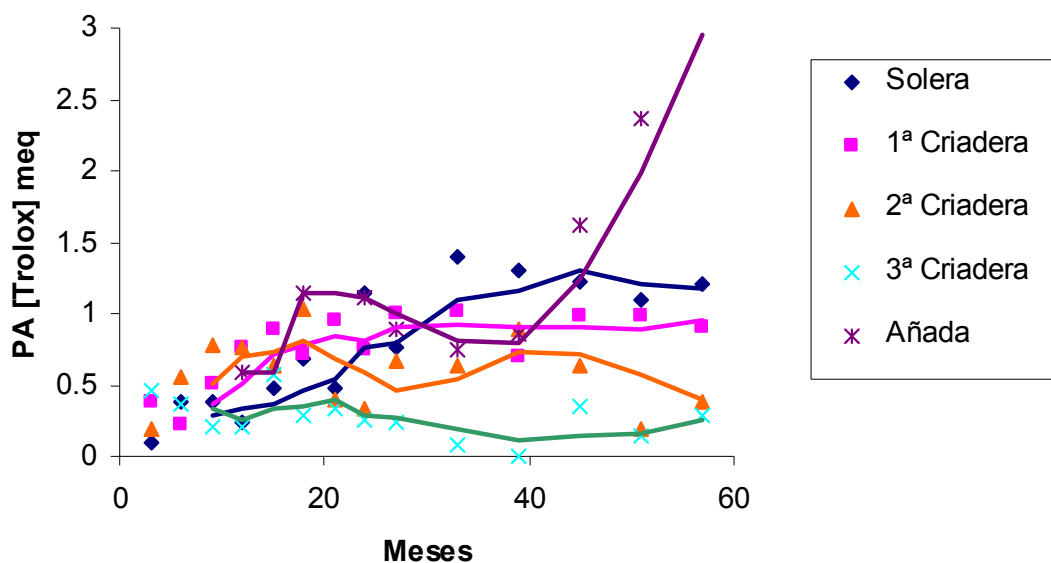
Tal y como se ha mencionado anteriormente, el objetivo de este estudio es realizar el seguimiento de la evolución del color y de los compuestos polifenólicos estudiados en muestras que han sido envejecidas durante un largo periodo de tiempo, así como investigar la posible relación de estos compuestos polifenólicos con el poder antioxidante de dichas muestras, y

poder establecer una relación entre estos parámetros y la edad del producto enológico estudiado: brandy y vino de Jerez.

### 7.3.1. Brandies de un ensayo experimental de envejecimiento

#### 7.3.1.1. Evolución de la actividad antioxidante e índice de polifenoles totales

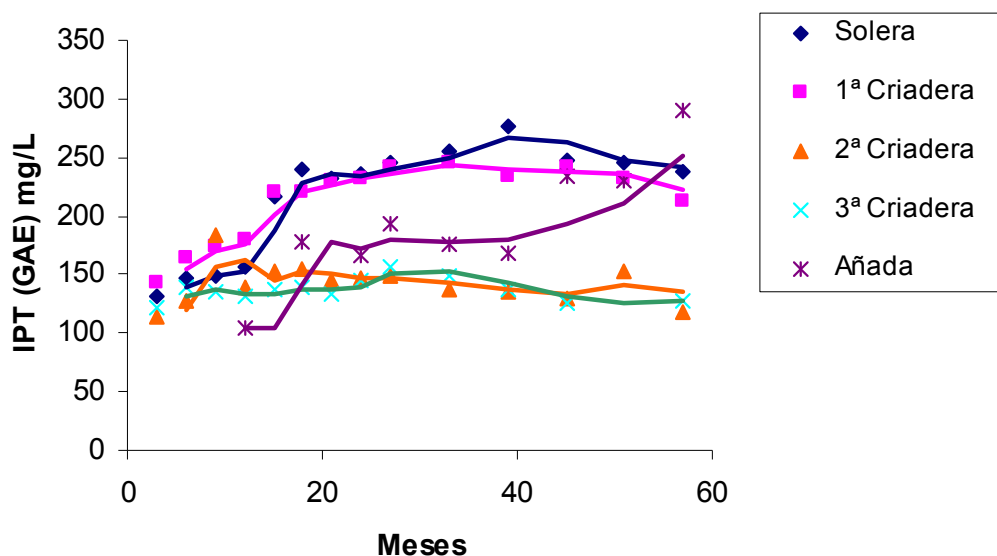
En la figura 2 se recoge la evolución del poder antioxidante frente al número de saca (en meses) en el sistema piloto de Solera y Criaderas. Los puntos que aparecen en la gráfica son datos experimentales, mientras que las líneas han sido calculadas mediante media móvil utilizando tres períodos. Se observa como en la figura 2, se produce un aumento inicial en la solera y primera criadera, del poder antioxidante hasta aproximadamente el mes 33, a partir de la cual hay una estabilización. Sin embargo, en la segunda, y sobre todo en la tercera criadera, se observa disminución del poder antioxidante prácticamente desde el inicio de la experiencia, lo que podría deberse a un acusado efecto de dilución respecto del de extracción. En el sistema de añadas, se observa, a partir de la saca 35, un aumento importante del poder antioxidante.



**Figura 2:** Evolución del poder Antioxidante de las muestras de Brandy envejecidas mediante Solera y Criadera y Añadas.

En la figura 3 se recoge la evolución del índice de polifenoles totales, frente al número de meses en el sistema piloto de Solera y Criaderas. En dicha figura se observa, que las muestras procedentes de la segunda y tercera criadera, no sufren ninguna modificación en su contenido de polifenoles, a medida que aumentan el número de meses de envejecimiento. Sin embargo, en

la primera criadera y solera, si que hay una evolución ascendente, a medida que aumenta el envejecimiento de la muestra, aumentando el IPT (al igual que ocurría con el poder antioxidante), hasta el mes 39, donde se estabiliza o hay una ligera disminución. En el caso de las muestras envejecidas por el sistema de añadas, el índice de polifenoles totales aumenta de una manera significativa a medida que aumenta los meses de envejecimiento.



**Figura 3:** Evolución del índice de polifenoles totales en muestras de Brandy envejecidas mediante Solera y Criadera y Añadas en el sistema experimental de envejecimiento.

El hecho de que tanto el índice de polifenoles totales como la actividad antioxidante más elevada sea la correspondiente a muestras de la escala solera y a las muestras envejecidas mediante el sistema de añadas es lógico puesto que la escala solera es la que contiene las muestras más envejecidas, y por otro lado las muestras envejecidas mediante el sistema de añadas no sufren efecto de dilución al no tener procesos de saca y rocío por lo que también es lógico que su actividad antioxidante e índice de polifenoles totales tenga valores elevados.

La correlación entre los dos parámetros IPT-Poder Antioxidante, fue de 0.71 y 0.79 para las muestras correspondientes a la escala Solera y para las muestras envejecidas mediante el sistema de Añadas respectivamente, confirmado el papel de los compuestos polifenólicos en la actividad antioxidante de los destilados envejecidos.

Se calculó la correlación entre el poder antioxidante y las concentraciones de los diferentes compuestos polifenólicos investigados reflejados en la tabla 2.



Compuestos	Escala Solera	Muestras Añadas
Ácido Gálico	<b>0.795</b>	0.6597
Hidroximetilfurfural	0.662	0.451
Ácido protocatequico	<b>0.717</b>	<b>0.733</b>
Furfural	0.603	0.546
Ácido Vainillico	<b>0.771</b>	0.642
p-hidroxibenzaldehido	0.427	0.583
Ácido Siringico	<b>0.724</b>	0.583
Vainillina	<b>0.701</b>	<b>0.803</b>
Ácido p-cumárico	0.457	0.676
Siringialdehido	0.653	0.556
Sinapaldehido	0.671	0.625
Coniferaldehido	<b>0.804</b>	<b>0.889</b>

**Tabla 2:** Correlación entre el poder antioxidante y los compuestos polifenólicos investigados

Tal y como se puede observar en la tabla 2, los compuestos ácido gálico, ácido protocatequico, vainillina, ácido vainillico, ácido siringico, y Coniferaldehido obtuvieron una buena correlación con el poder antioxidante. Estos tres últimos compuestos obtuvieron también buenas correlaciones para un grupo de brandies comerciales investigados por Alonso y col. [23]

En cuanto a la correlación Poder antioxidante-vejez media de la muestra, la correlación fue de 0.76 y 0.7 para las muestras correspondientes a la escala Solera y para las muestras envejecidas mediante el sistema de Añadas respectivamente, lo que confirma que la actividad antioxidante y el envejecimiento en madera son dos parámetros que están estrechamente relacionados.

#### 7.3.1.2. Regresión por mínimos cuadrados parciales

Para obtener un modelo predictivo de la edad de las muestras, se le aplicó un análisis de regresión lineal múltiple. En la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) se utilizan como variables predictoras vectores que explican menos varianza que los componentes principales, pero a cambio están más correlacionados con las respuestas. Dichos vectores se suelen denominar “variables latentes”. La expresión “variable latente” significa que el vector en cuestión ha sido optimizado desde el punto de vista de su utilización como variable predictora para pronosticar una respuesta dada o un pequeño grupo de respuestas.

Las variables independientes que consideramos en el PLS fueron: el índice de polifenoles totales, la actividad antioxidante, los parámetros CIELab y las concentraciones de ácido gálico, Hidroximetilfurfural, ácido protocatequico, p-hidroxibenzaldehido, ácido vainillico, vainillina, ácido siringico, siringialdehido, coniferaldehido y sinapaldehido.

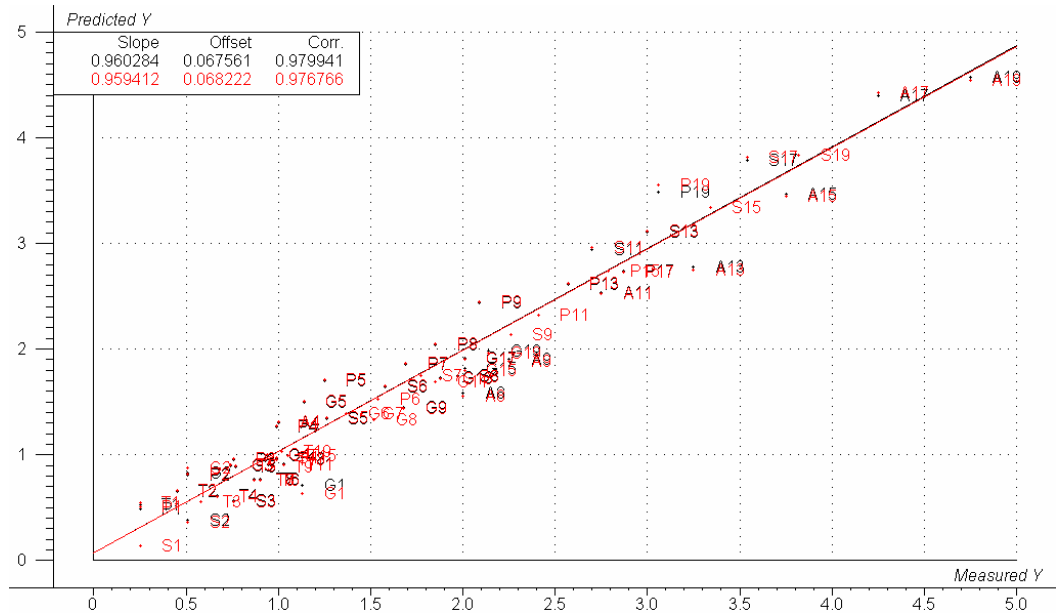
Para este conjunto de muestras, la aplicación de la regresión por mínimos cuadrados parciales con validación cruzada proporcionó una fiabilidad del ajuste del 97.6%, cuyos parámetros se muestran en la tabla 3. El elevado coeficiente de correlación para la validación cruzada revela que existe una relación importante entre estos parámetros y el tiempo medio de envejecimiento. También es preciso destacar los valores bajos del error cuadrático medio de predicción (RMSEP), tanto para calibración como para validación (0.225 años es decir, 2.64 meses), que revelan que el modelo tiene una elevada capacidad predictiva y de nuevo confirman la relación entre los parámetros estudiados y el tiempo medio de envejecimiento.

	<b>Pendiente</b>	<b>Ordenada en el Origen</b>	<b>Coeficiente de Correlación</b>	<b>Error Cuadrático Medio</b>
<b>Calibración</b>	0.960	0.067	0.979	0.209
<b>Validación</b>	0.959	0.068	0.976	0.225

**Tabla 3:** Parámetros de la regresión por mínimos cuadrados parciales para la predicción del tiempo medio de envejecimiento (años).

En la figura 4 se muestra la representación gráfica de los valores de tiempo medio de envejecimiento calculados para cada muestra, frente a los estimados mediante mínimos cuadrados parciales. La recta  $Y=X$  reflejaría la hipotética coincidencia absoluta entre ambos valores. Se observa la elevada correlación existente, como se pone de manifiesto en los valores de las pendientes (0.96 tanto para calibración como para validación).

En conclusión podemos decir que es posible establecer relación entre el tiempo medio de envejecimiento de una muestra del ensayo de envejecimiento con los parámetros estudiados: polifenoles presentes en el Brandy, actividad antioxidante, parámetros cromáticos e índice de polifenoles totales.



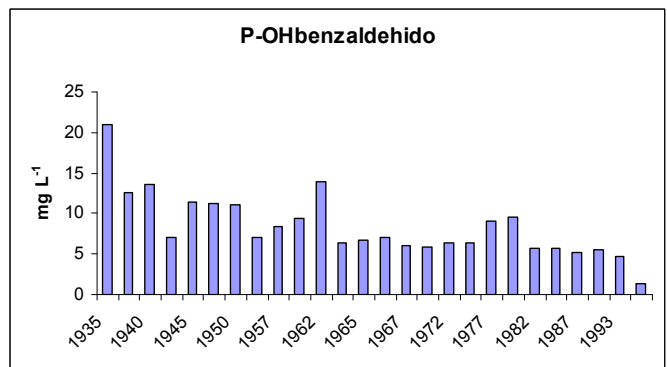
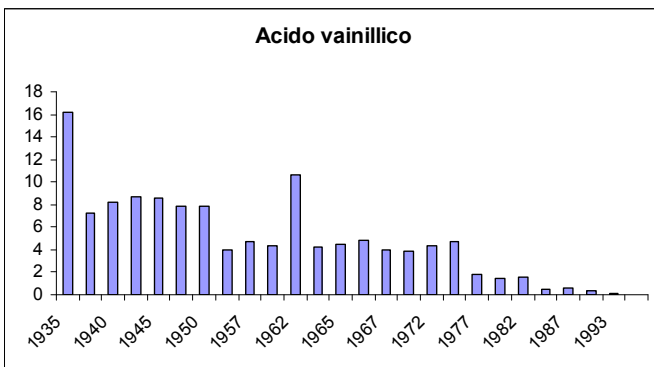
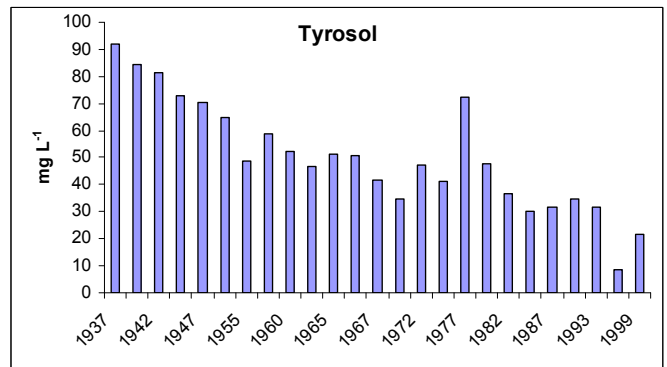
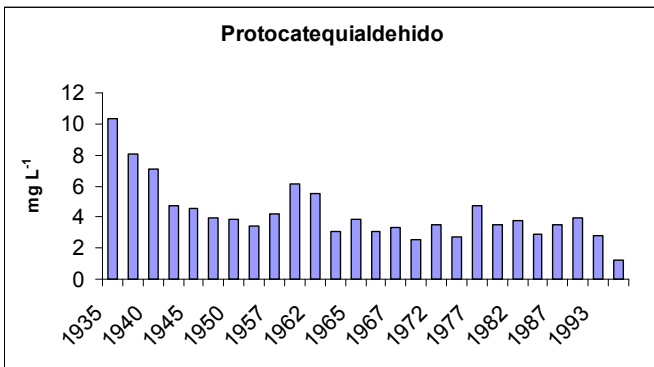
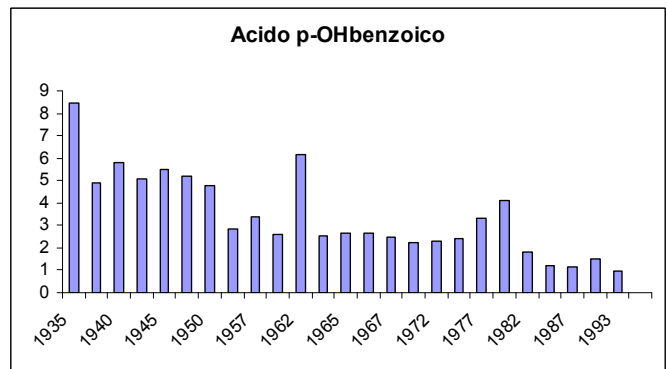
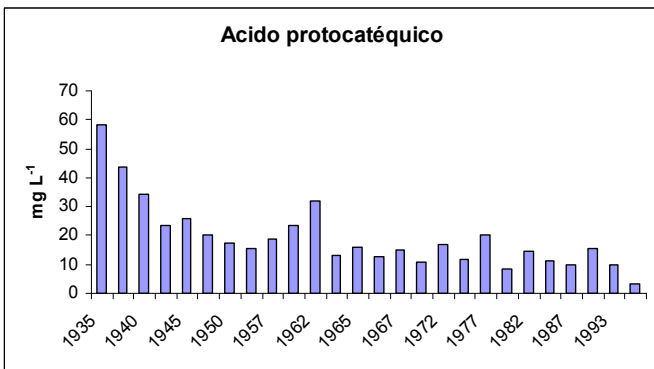
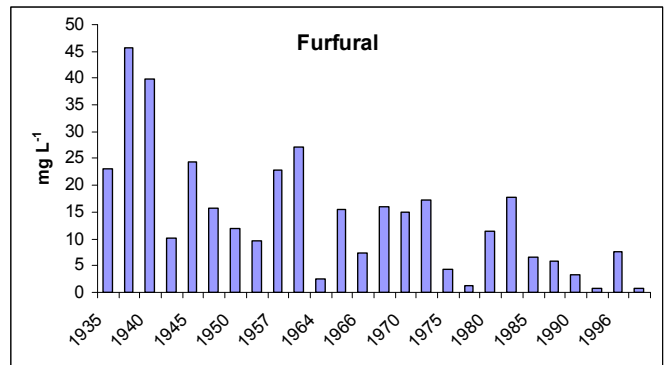
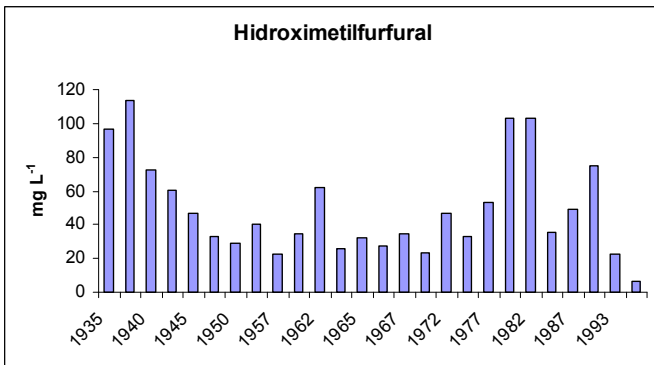
**Figura 4:** Grado de coincidencia entre los valores medidos y los predichos por el modelo de mínimos cuadrados parciales.

### 7.3.2. Vinos envejecidos mediante sistema de añadas

#### 7.3.2.1. Evolución de los polifenoles estudiados

En la figura 5, se muestra la evolución de los distintos compuestos cuantificados a lo largo de las diferentes añadas. Tal y como se puede observar, en general la concentración de los compuestos estudiados, aumentan en los vinos que han sido envejecidos un mayor número de años. Moreno y col. [12], estudiaron la evolución de polifenoles en vinos de Jerez oloroso, fino y amontillado envejecidos mediante un sistema dinámico de solera y criadera. En sus investigaciones relacionadas con el vino oloroso, observan como hay un aumento en las muestras más envejecidas para los ácidos benzoicos, aumento que no observó para el resto de los compuestos. La diferencia de comportamiento entre aquellas muestras y las nuestras, se debe muy probablemente al sistema de envejecimiento, ya que en el sistema dinámico de Solera y Criaderas la concentración de los compuestos aumentan en los primeros años de envejecimiento pero luego tienden a mantenerse constante como consecuencia de las constantes diluciones a las que son sometidas en el movimiento de escalas durante los muestreos [14]. Sin embargo, las muestras que son objeto del presente estudio han sido envejecidas mediante un sistema estático de envejecimiento por lo que es lógico que prácticamente todos los compuestos vean incrementada su concentración al aumentar el tiempo

de envejecimiento. Por otro lado, las referencias encontradas estudian la evolución en un periodo de tiempo menor que el que se considera en el presente trabajo.



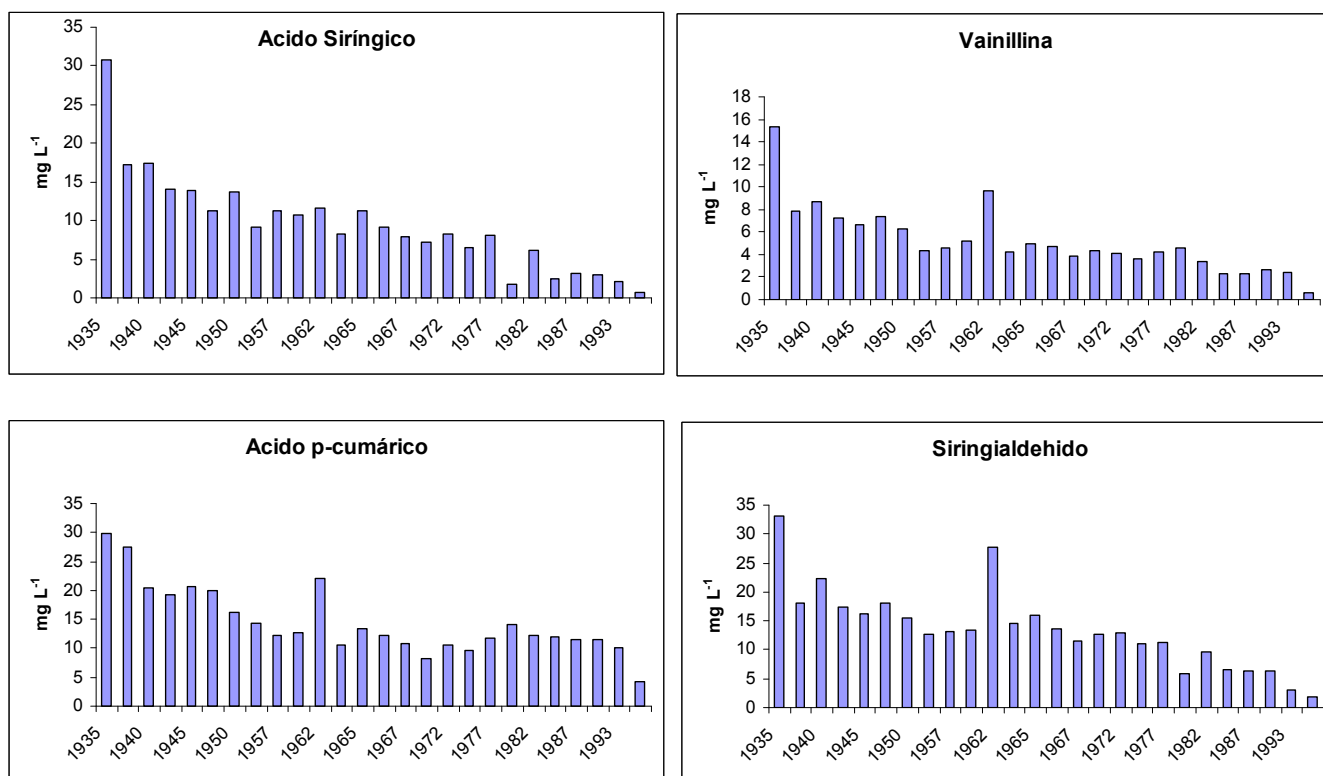


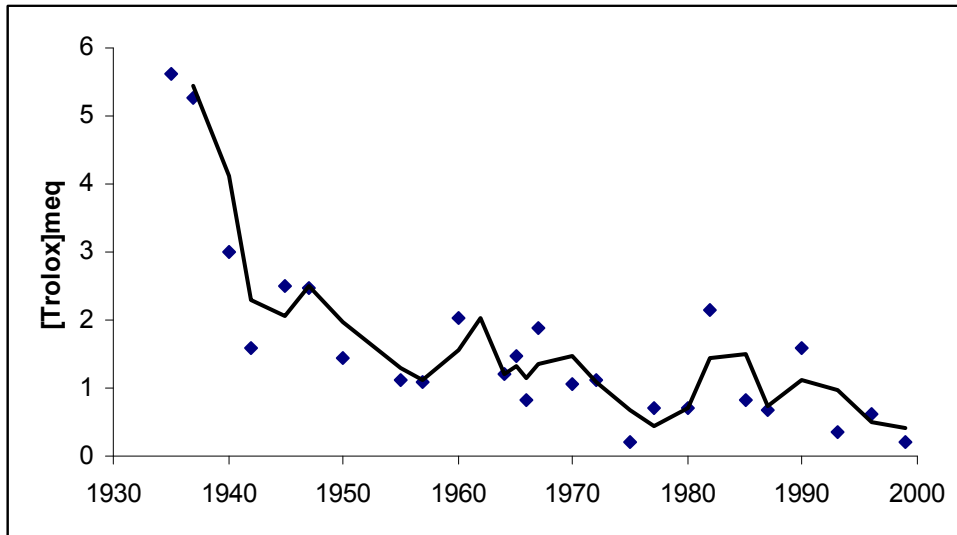
Figura 5. Evolución de los diferentes compuestos polifenólicos estudiados

Los compuestos que se presentan en una mayor concentración en las muestras más envejecidas son los aldehidos furánicos (hidroximetilfurfural y furfural), ácido protocatéuico, Tyrosol, ácido *p*-cumárico y el siringialdehido. Los aldehidos furánicos, especialmente hidroximetilfurfural, son compuestos mayoritarios en los diferentes productos enológicos de la zona de Jerez, en vinos como es el caso [12], brandies [20] y también en vinagres [13]. La presencia de estos compuestos furánicos se debe a dos hechos fundamentales: la adición de color caramelo [24] o por el envejecimiento en madera [25]. Debido a que las muestras analizadas no contienen dicha rectificación del color mediante adición de caramelo, la presencia de los furfuraldehidos en nuestras muestras se deberá al envejecimiento en madera. Si se observa el contenido de hidroximetilfurfural aumenta considerablemente en las muestras envejecidas a partir de 1980, teniendo en cuenta el hidroximetilfurfural está relacionado con el tostado de la madera [26], esto podría ser debido a cambios en las botas durante esos años, sin embargo este dato no ha sido aclarado por la bodega.

### 7.3.2.2. Poder antioxidante e índice de polifenoles totales

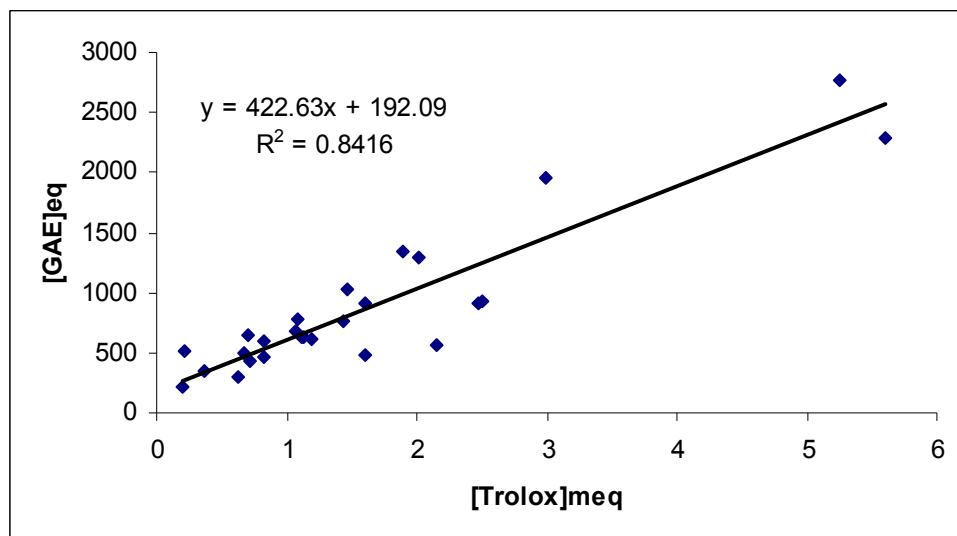
Si observamos la evolución del poder antioxidante en relación con los años de envejecimiento (Figura 6), podemos ver como, en general hay una evolución ascendente conforme las muestras son más envejecidas, siendo esta tendencia más clara a partir de la añada 1950, es decir para

los vinos muy viejos. Además podemos ver como las muestras más envejecidas presentan un extraordinario poder antioxidante. Teniendo en cuenta que los vinos estudiados son elaborados con uva blanca, cuyo contenido polifenólico y poder antioxidante es inferior al de la uva tinta, podemos presuponer que el elevado poder antioxidante de estas muestras se debe a los polifenoles que han sido aportados durante el largo envejecimiento en madera, pudiendo por tanto relacionar de una forma clara el poder antioxidante con el envejecimiento en madera.



**Figura 6:** evolución del poder antioxidante a lo largo de las diferentes añadas

El índice de polifenoles totales y el poder antioxidante fueron medidos para la totalidad de las muestras, encontrándose una buena correlación  $r^2=0,8416$  tal y como se observa en la figura 7, confirmándose por tanto la elevada influencia de los polifenoles con el poder antioxidante.



**Figura 7:** Relación entre poder antioxidante e IPT

No obstante, tal y como han señalado otros autores [23], no todos los polifenoles tienen la misma influencia en el poder antioxidante, por lo que se consideró interesante estudiar la relación individual de los polifenoles estudiados con el poder antioxidante de las muestras. La tabla 4 recoge los resultados. Tal y como podemos observar en dicha tabla, son los compuestos ácido protocatequico, Protocatequialdehido, ácido Siríngico, Vainillina y ácido *p*-cumárico, los que muestran unas correlaciones más altas ( $r^2 > 0.7$ ). Estos resultados se muestran en consonancia con Alonso y col. [23] que obtuvieron también una buena correlación para estos mismos compuestos (excepto el protocatequialdehido) en vinagres de Jerez envejecidos en madera.

Compuestos	R <sup>2</sup>
Hidroximetilfurfural	0.544
Furfural	0.661
Ácido protocatequico	<b>0.869</b>
Protocatequialdehido	<b>0.804</b>
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	0.645
Tyrosol	0.671
Ácido Vainílico	0.645
<i>p</i> -hidroxibenzaldehido	0.667
Ácido Siríngico	<b>0.821</b>
Vainillina	<b>0.729</b>
Ácido <i>p</i> -cumárico	<b>0.798</b>
Siringialdehido	0.617

**Tabla 4:** Correlación entre los resultados cromatográficos y poder antioxidante

### 7.3.2.3. Color

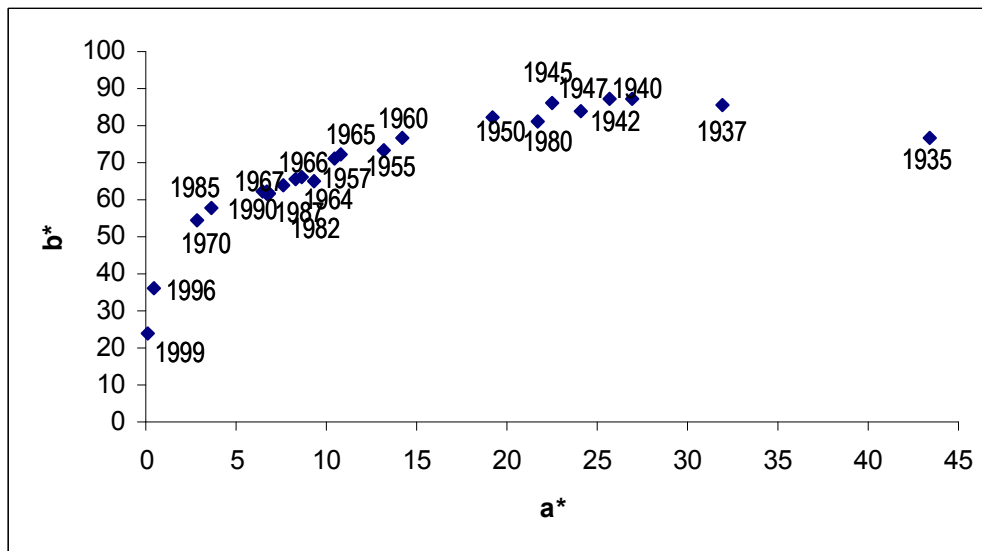
De acuerdo a los valores de los parámetros cromáticos de la tabla 5, las muestras más envejecidas presentan un color más oscuro (menor valor del parámetro luminosidad  $L^*$ ) con un aumento de las tonalidades rojas y amarillas (mayores valores de  $a^*$  y  $b^*$ ) en distinta magnitud, lo que se traduce en tono ( $H^*$ ) con mayor contribución del rojo.

	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$H^*$	$C^*$
1935	43.288	43.447	76.690	60.467	88.141
1937	57.543	31.962	85.311	69.461	91.102
1940	64.933	26.953	87.284	72.839	91.350
1942	65.471	25.702	87.171	73.572	90.881
1945	69.258	22.482	85.965	75.344	88.857
1947	66.311	24.125	83.826	73.944	87.229
1950	71.323	19.184	82.259	76.872	84.466
1955	75.585	13.129	73.503	79.872	74.667
1957	78.694	10.412	70.949	81.651	71.709
1960	75.978	14.191	76.658	79.512	77.960
1964	70.342	9.330	65.224	81.859	65.888
1965	77.691	10.852	72.104	81.441	72.916

1966	78.781	8.632	66.308	82.582	66.867
1967	81.021	6.492	62.292	84.050	62.629
1970	80.852	2.800	54.181	87.041	54.253
1972	80.749	6.749	62.280	83.815	62.645
1975	80.101	6.659	61.801	83.850	62.158
1977	80.101	6.659	61.801	83.850	62.158
1980	65.355	21.753	81.168	74.997	84.032
1982	78.693	8.338	65.770	82.775	66.296
1985	83.834	3.588	57.785	86.447	57.896
1987	79.402	7.643	63.965	83.186	64.420
1990	78.212	6.819	61.763	83.699	62.139
1993	78.212	6.819	61.763	83.699	62.139
1996	89.826	0.451	35.849	90.719	35.8527
1999	88.148	0.084	24.159	89.801	24.159

**Tabla 5:** Parámetros cromáticos en los vinos de diferentes añadas

En la figura 8, proyección de las variables *CIELab*  $a^*$  frente a  $b^*$ , se observa como hay un cierto ordenamiento en función de la vejez de las muestras.



**Figura 8:** Proyección de las variables cromáticas  $a^*$ - $b^*$

### 7.3.2.5. Tratamiento estadístico

Atendiendo a la añada de envejecimiento, se agruparon las muestras en siete diferentes grupos, en función de la década en la que se inició el envejecimiento de las muestras. Se realizó un estudio estadístico del conjunto de muestras estudiadas. En primer lugar, se investigó mediante análisis de la varianza la posibilidad de diferenciar los distintos grupos preestablecidos en base a estos compuestos. Tal y como se ve en la tabla 6, todos presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de muestras ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, al realizar las comparaciones post-hoc (Bonferroni), se vio que ninguno de ellos permite discriminar entre



los siete grupos, por lo que se decidió tratar al conjunto de muestras mediante análisis multivariante usando análisis lineal discriminante (LDA). Las concentraciones de los polifenoles y aldehidos furánicos fueron expresadas en mg L<sup>-1</sup>.

Clasificación	Media de las muestras entre 1935-1940	Media de las muestras entre 1941-1950	Media de las muestras entre 1951-1960	Media de las muestras entre 1961-1970	Media de las muestras entre 1971-1980	Media de las muestras entre 1981-1990	Media de las muestras entre 1991-1999	p-valor
5-hidroximetilfurfural	94.284	42.277	32.545	34.224	59.098	65.624	14.565	0.004
Ácido protocatéquico	45.358	21.653	19.129	16.584	14.285	12.859	6.795	0.000
Furfural	36.172	15.587	19.853	11.721	8.533	8.345	0.761	0.001
Protocatequialdehído	8.475	4.277	4.596	3.567	3.582	3.545	2.007	0.000
Ácido p-hidroxibenzoico	6.374	5.146	2.954	3.127	3.033	1.408	0.491	0.000
Tirosol	99.606	72.274	53.398	51.605	52.049	33.298	26.688	0.000
Ácido Vainílico	10.533	8.259	4.333	5.343	3.049	0.776	0.086	0.000
p-hidroxibenzaldehído	15.734	10.185	8.263	7.697	7.808	5.529	2.990	0.000
Ácido Siringico	21.815	13.245	10.355	9.229	6.188	3.724	1.445	0.000
Vainillina	10.655	6.878	4.703	5.271	4.155	2.673	1.506	0.000
Ácido p-cumárico	25.864	18.970	13.117	12.926	11.524	11.811	7.187	0.000
Siringialdehído	24.472	16.820	13.033	16.018	10.283	7.251	2.467	0.000
L*	55.255	68.091	76.752	73.056	76.576	80.036	83.180	0.010
a*	34.120	22.874	12.577	12.404	10.455	6.597	3.451	0.001
b*	83.095	84.805	73.703	66.712	66.762	62.321	42.961	0.001
H*	67.589	74.933	80.345	80.433	81.628	84.027	86.750	0.003
C*	90.198	87.858	74.778	68.427	67.749	62.688	43.149	0.000
Actividad antioxidante	4.620	2.004	1.409	1.439	0.685	1.309	0.279	0.000
IPT	2387.444	877.056	904.185	824.000	556.361	501.361	280.389	0.000

**Tabla 6:** Análisis de la varianza de cada compuesto

### 7.3.2.5.1. Análisis lineal discriminante

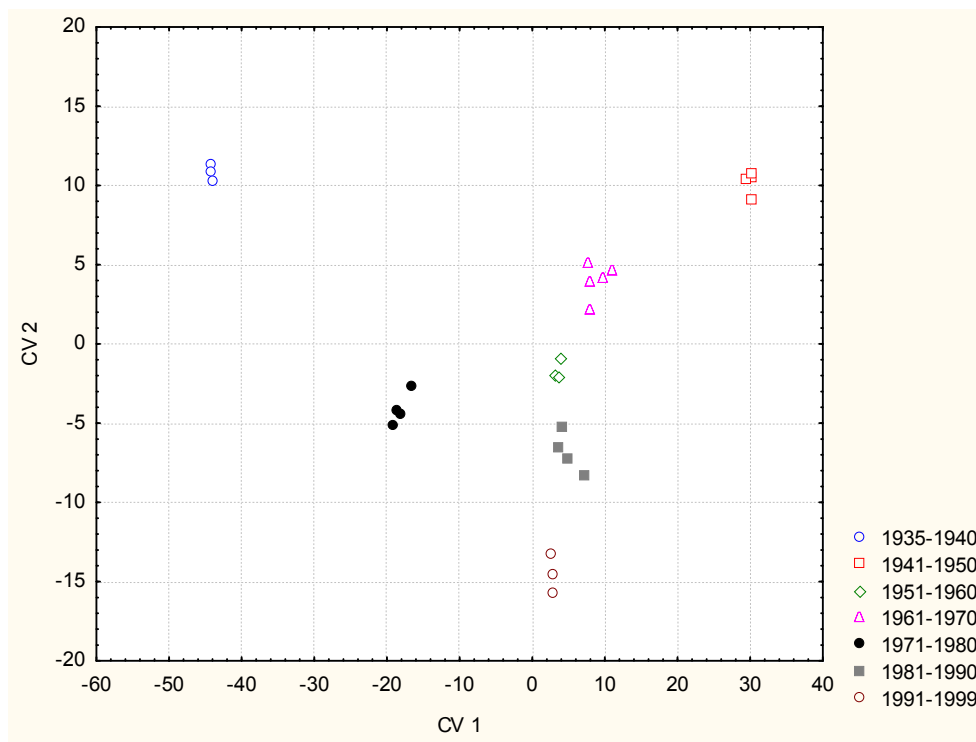
Al aplicar al conjunto de muestras el LDA, se obtuvieron las ecuaciones que permitirían englobar a una muestra desconocida en uno de los grupos anteriormente mencionados según su tiempo medio de envejecimiento. Así, en la tabla 7 se muestran las funciones de clasificación que harían posible la asignación de edad.

	Muestras de 1935-1940	Muestras de 1941-1950	Muestras de 1951-1960	Muestras de 1961-1970	Muestras de 1971-1980	Muestras de 1981-1990	Muestras de 1991-1999
IPT	-18	-21	-20	-20	-19	-20	-20
Ácido p-hidroxibenzoico	9951	11261	10733	10852	10337	10728	10665
Protocatequialdehído	14630	16479	15757	15931	15215	15797	15672
5-hidroximetilfurfural	-287	-329	-314	-317	-301	-314	-314
b*	-1277	-1437	-1403	-1404	-1354	-1416	-1430
Actividad antioxidante	19836	22546	21545	21759	20737	21586	21489
Siringialdehído	-1512	-1733	-1655	-1668	-1589	-1657	-1656
p-hidroxibenzaldehído	-16.86	-34.73	-27.75	-23.52	-21.99	-24.15	-33.22
Ácido protocatéquico	31.61	37.98	36.73	33.97	34.86	36.55	38.07
Ácido Siringico	28.81	35.89	34.61	31.60	32.24	34.33	37.34
L*	1284	1465	1401	1413	1341	1398	1400
Furfural	-23	-0	0	-4	-5	3	9
C*	-424	-478	-457	-463	-442	-459	-456
H*	1829	2062	2002	2009	1931	2017	2030
Ácido p-cumárico	3985	4413	4230	4284	4105	4241	4198
Ácido vainílico	1748	1931	1845	1872	1792	1850	1822
Constante	-1343.53	-1740.46	-1613.32	-1402.12	-1462.90	-1589.69	-1665.84

**Tabla 7:** Funciones de clasificación

De entre las variables participantes, las más discriminantes fueron: actividad antioxidante, IPT, protocatequialdehído, ácido protocatéuico, ácido *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído e hidroximetilfurfural.

La clasificación conseguida fue de un 100% tal y como se puede observar en la figura 9, donde se observa un cierto ordenamiento de las muestras según su edad a lo largo de la componente 2. En dicha componente las variables que obtuvieron un mayor peso fueron ácido siríntrico, siringialdehído, ácido vainílico, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzoico y el índice de polifenoles totales (tabla 8), parámetros todos ellos relacionados de forma directa con el envejecimiento en madera, lo que justificaría dicho ordenamiento.



**Figura 9:** Proyección de los casos en el espacio de las variables canónicas 1 y 2.

	CV1	CV 2	CV 3	CV 4	CV 5	CV 6
IPT	-0.073	0.227	-0.175	-0.191	0.566	-0.004
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	-0.031	0.264	-0.119	0.433	0.132	0.105
Protocatequialdehído	-0.057	0.161	-0.057	0.141	0.612	-0.192
HMF	-0.038	0.047	0.161	0.203	0.382	0.211
<i>b</i> *	-0.003	0.168	0.041	0.348	0.221	-0.354
Poder antioxidante	-0.042	0.162	-0.087	-0.051	0.661	0.236
Siringialdehído	-0.029	0.222	-0.073	0.009	0.145	-0.147
P-hidroxibenzaldehído	-0.039	0.178	-0.050	0.257	0.274	-0.085
Ácido Protocatequico	-0.056	0.182	-0.131	0.121	0.573	0.057
Ácido Siringico	-0.033	0.205	-0.158	0.052	0.281	-0.099
<i>L</i> *	0.031	-0.151	0.066	-0.163	-0.271	-0.202
Furfural	-0.031	0.112	-0.107	0.007	0.370	-0.254
<i>C</i> * (croma)	-0.009	0.186	0.016	0.365	0.277	-0.286
<i>H</i> * (tono)	0.032	-0.179	0.098	-0.288	-0.373	-0.112
Ácido <i>p</i> -cumárico	-0.037	0.229	-0.063	0.303	0.653	0.232
Ácido Vainílico	-0.018	0.214	-0.168	0.149	0.109	0.102

**Tabla 8:** Correlación de las variables con las variables canónicas

### 7.3.2.5.2. Regresión por mínimos cuadrados

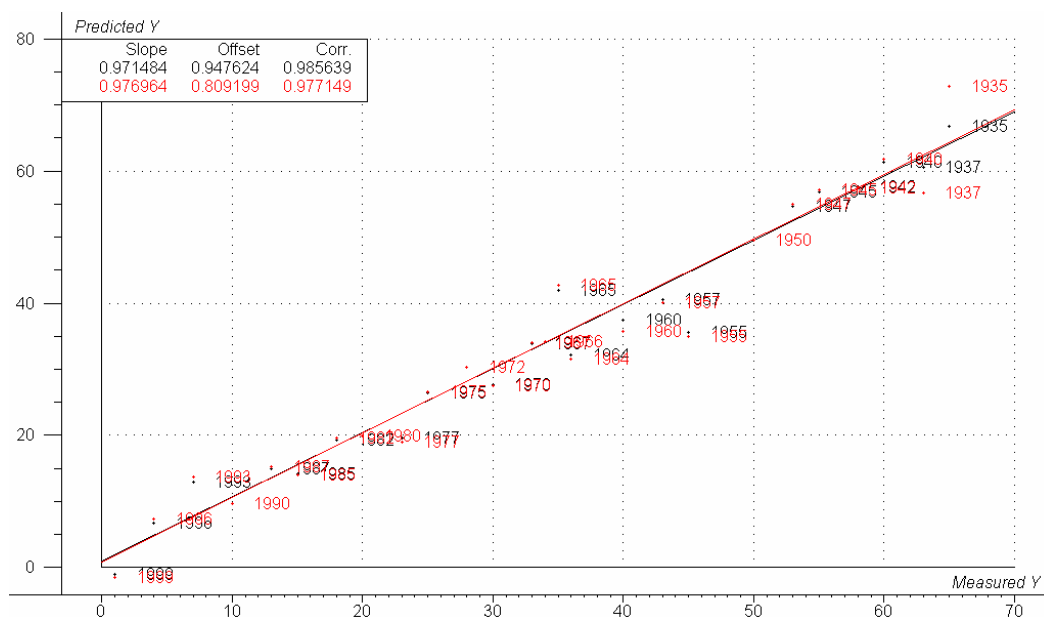
Las variables independientes que consideramos en el PLS fueron al igual que para el anterior conjunto de muestras de brandies: el índice de polifenoles totales, la actividad antioxidante, los parámetros CIELab y los compuestos polifenólicos investigados.

La aplicación de esta regresión con validación cruzada proporcionó una fiabilidad de ajuste del 97.7%, cuyos parámetros se muestran en la tabla 8. También es importante destacar los valores bajos del error cuadrático (4.008 años) que revelan que el modelo tiene una elevada capacidad predictiva y confirma la relación existente entre poder antioxidante e índice de polifenoles totales con los años de envejecimiento.

	Pendiente	Ordenada en el Origen	Coefficiente de Correlación	Error Cuadrático Medio
Calibración	0.971	0.947	0.985	3.166
Validación	0.976	0.809	0.977	4.008

**Tabla 8:** Parámetros de la regresión por mínimos cuadrados parciales para la predicción de años de envejecimiento

En la figura 10 se muestra la representación gráfica de los valores de años de envejecimiento frente a los estimados mediante mínimos cuadrados parciales. La relación  $Y=X$  reflejaría la hipotética coincidencia absoluta entre ambos valores. Se observa la elevada correlación existente, como se pone de manifiesto en los valores de las pendientes (0.97 para calibración y validación).



**Figura 10:** Grado de coincidencia entre los valores medios y los predichos por el modelo de regresión por mínimos cuadrados.

## 7.4. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir diciendo que el poder antioxidante de las muestras estudiadas es un parámetro claramente relacionado con el envejecimiento en bota, y con los polifenoles aportados por la madera durante esta etapa. Dentro de los polifenoles estudiados, los que presentaron una mejor correlación con el poder antioxidante fueron el ácido gálico, ácido sirínico, ácido protocatéquico, ácido vainillina y coniferaldehído para el conjunto de los Brandies y el ácido protocatéquico, protocatequialdehído y ácido sirínico para el conjunto de muestras de los vinos. Cuando se aplicó regresión por mínimos cuadrados a ambos conjuntos de muestras, se obtuvieron dos buenos modelos de predicción del tiempo de envejecimiento, pudiendo confirmar por tanto que el poder antioxidante, el índice de polifenoles totales, parámetros cromáticos y compuestos polifenólicos, se pueden utilizar como parámetros predictivos de la edad de una muestra de vino y Brandy de Jerez.

## 7.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Teissedre, P.L. (1995). Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (4), 890-894.
- [2] Satué-Gracia, M.T., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Frankel, E.N. (1999). Spanish sparkling wines (Cavas) as inhibitors of in vitro human low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (6), 2198-2202.

- [3] **de Quirós, A.R.-B., Lage-Yusty, M.A., López-Hernández, J.** (2009). HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International* 42 (8), pp. 1018-1022
- [4] **Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., Câmara, J.S.** (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105 (1), 204-214.
- [5] **Fernández-Pachón, M.S., Villaño, D., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C.** (2006). Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta*, 563, 101-108.
- [6] **Alonso, Á.M., Guillén, D.A., Barroso, C.G., Puertas, B., García, A.** (2002). Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21), 5832-5836.
- [7] **Hernández, T., Estrella, I., Dueñas, M., De Simón, B.F., Cadahía, E.** (2007). Influence of wood origin in the polyphenolic composition of a Spanish red wine aging in bottle, after storage in barrels of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology*, 224 (6), 695-705.
- [8] **Frangipane, M.T., Santis, D.D., Ceccarelli, A.** (2007). Influence of oak woods of different geographical origins on quality of wines aged in barriques and using oak chips. *Food Chemistry*, 103 (1), 46-54.
- [9] **Cadahía, E., Muñoz, L., De Simón, B.F., García-Vallejo, M.C.** (2001). Changes in low molecular weight phenolic compounds in Spanish, French, and American oak woods during natural seasoning and toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (4), 1790-1798.
- [10] **Schwarz, M., Rodríguez, M., Martínez, C., Bosquet, V., Guillén, D., Barroso, C.G.** (2009) Antioxidant activity of Brandy de Jerez and other aged distillates, and correlation with their polyphenolic content. *Food Chemistry*, 116 (1), 29-33.
- [11] **García Moreno, M.V, Garcia Barroso, C.** (2002). Comparison of the evolution of low molecular weight phenolic compounds in typical Sherry wines: Fino, Amontillado, and Oloroso. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (26), 7556-7563.
- [12] **Tesfaye, W., Morales, M.L., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M.** (2002). Evolution of phenolic compounds during an experimental aging in wood of Sherry vinegar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (24), 7053-7061.
- [13] **Rodríguez Dodero M.C.** (2004). Estudio analítico de la composición polifenólica del brandy de jerez y su relación con la elaboración, envejecimiento, caracterización y calidad. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- [14] **Rodríguez M.C., Guillén D., Schwarz M., Barroso C.G.** (2010). Phenolic compounds and furanic derivatives in the characterization and quality control of Brandy de Jerez. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2), 990-997.
- [15] **Bosso, A., Guaita, M., Panero, L., Borsa, D., Follis, R.** (2009). Influence of two winemaking techniques on polyphenolic composition and color of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60 (3), 379-385.

- [16] **Del Alamo Sanza, M., Escudero, J.A.F., De Castro Torío, R.** (2000). Changes in phenolic compounds and colour parameters of red wine aged with oak chips and in oak barrels. *Food Science and Technology International*, 10 (4), 233-241.
- [17] **del Álamo, M., Nevares, I., Gallego, L., Martín, C., Merino, S.** (2008). Aging markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Analytica Chimica Acta*, 621 (1), 86-99.
- [18] **Recamales, A.F., Hernanz, D., Álvarez, C., González-Miret, M.L., Heredia, F.** (2007). Colour of Amontillado wines aged in two oak barrel types J. *European Food Research and Technology*, 224 (3), 321-327.
- [19] **Singleton, V. L. Rossi, Joseph A.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-58.
- [20] **Schwarz, M., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Barroso, C.G.** (2009). Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez. *Journal of Separation Science*, 32 (11), 1782-1790.
- [21] **Barroso, C.G., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Pérez-Bustamante, J.** (1996). 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. *Journal of Chromatography A* 724 (1-2), 125-129.
- [22] **Alonso A.M., Guillen D., Barroso C.G.** (2003). Development of an electrochemical method for the determination of antioxidant activity. Application to grape-derived products. *European Food Research and Technology*, 216 (5), 445-448.
- [23] **Alonso, Á.M., Castro, R., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Barroso, C.G.** (2004). Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food research international* , 37 (7), 715-721.
- [24] **Quesada Granados J., Villalón Mir M., Lopez Serrana H., López Martínez M.C.** (1996). The influence of added caramel on furanic aldehyde content of matured brandies. *Food Chemistry*, 56 (4), 415-419.
- [25] **J Rodríguez-Bencomo, J.J., Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., González-Huerta, C., González-San José, M.L.** (2008). Importance of chip selection and elaboration process on the aromatic composition of finished wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (13), 5102-5111.



## **8. CONCLUSIONES**





## a) Respecto a la metodología:

1. Se ha desarrollado un método simple y reproducible para el análisis de compuestos fenólicos y derivados furánicos en el Brandy de Jerez mediante UPLC. La validación del método ha dado como resultado unos buenos límites de detección y cuantificación, así como linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión. Comparando con HPLC, el método desarrollado mediante UPLC, ofrece una elevada sensibilidad, precisión y velocidad de análisis para la determinación simultánea de polifenoles en Brandy, proponiendo el UPLC como una herramienta muy útil para el análisis de compuestos relacionados con la calidad del Brandy. Usando el UPLC se permitió acortar el tiempo de análisis casi diez veces comparándolo con el sistema mediante HPLC.
2. Dos vinos de Jerez, Amontillado y Pedro Ximénez, han sido caracterizados mediante HSCCC. Del Amontillado se han caracterizado un total de 26 polifenoles y se han aislado dos de ellos: ácido protocatéquico y tyrosol. Del vino Pedro Ximénez se han identificado un total de 23 compuestos aislándose uno de ellos: hidroximetilfurfural. Podemos confirmar, que el HSCCC, es una técnica idónea para el aislamiento y posterior identificación de compuestos en matrices complejas como es el caso, siendo una excelente herramienta en el futuro para poder aislar nuevos compuestos en el vino de Jerez. De los compuestos polifenólicos estudiados, los que contribuyen en mayor medida a la actividad antioxidante fueron: ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido siríngico, tyrosol y ácido cafeico.

## b) Respecto al envejecimiento:

3. Se ha realizado una caracterización analítica en profundidad durante dos años de un sistema de Solera y Criadera de Brandy de Jerez, analizando polifenoles, parámetros cromáticos y ácidos orgánicos. Se ha demostrado que dichos parámetros son variables discriminantes importantes a la hora de clasificar a los brandies en función de su vejez. Además se ha visto cómo algunos de los parámetros estudiados, como los ácidos orgánicos o los parámetros cromáticos, son variables que podrían servir para diferenciar el origen del envinado en un grupo heterogéneo de muestras, sirviendo por tanto, como parámetros que verifican la autenticidad del Brandy de Jerez.

4. Con virutas tratadas previamente con vino de Jerez, y ultrasonido, se ha optimizado un método de envejecimiento acelerado de Brandy a escala de laboratorio. Los parámetros cromáticos, índice de polifenoles totales y cuantificación de polifenoles individuales han sido estudiados y comparados con aquellas muestras que habían sido envejecidas de forma tradicional. Además las muestras han sido evaluadas sensorialmente mediante un panel de cata de laboratorio. Se ha conseguido en el plazo de un mes, un brandy de características organolépticas similares a un Brandy Solera Reserva envejecido de forma tradicional en barrica.
5. Con objeto de determinar las variedades de uva más apropiadas para la elaboración del Brandy de Jerez, y poder conseguir así la Denominación de Origen, 10 destilados de diferentes variedades de uvas, todas ellas cultivadas en la zona, fueron sometidas a envejecimiento durante un mes, mediante el método previamente optimizado. Las muestras fueron caracterizadas analítica y sensorialmente. Las variedades Jaén Blanco y Moscatel, fueron las que demostraron un mayor potencial para ser utilizadas con esta finalidad.
6. Se estudió la evolución del poder antioxidante, del contenido polifenólico y de parámetros cromáticos en un conjunto de muestras de vinos de Jerez envejecidos mediante sistema estático y para un grupo de muestras de Brandies envejecidas mediante sistema de Solera y Criaderas. A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir que el poder antioxidante es un parámetro claramente relacionado con el envejecimiento en madera de las muestras, y con los polifenoles aportados por la madera durante esta etapa. Dentro de los polifenoles estudiados, los que obtuvieron una mejor correlación con el poder antioxidante fueron: ácido protocatéquico, protocatequialdehído y ácido siríngico para las muestras vínicas y el ácido gálico, ácido protocatéquico, vainillina, ácido vainílico, ácido siríngico y coniferaldehído para las muestras de Brandies. Además, se demostró, que los parámetros estudiados (actividad antioxidante, color, IPT y compuestos polifenólicos) pueden utilizarse como indicadores de la edad del producto enológico objeto de estudio.

## **9. ENGLISH SUMMARY**



## **Study of new strategies for characterisation and optimisation of the ageing systems for Brandy and Sherry wine de Jerez**

1. Justification and objectives
2. Development and validation of UPLC method for monitoring phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez.
3. Analytical characterisation of a *solera* and *criadera* system for Brandy de Jerez.
4. Development of an accelerated ageing test for the Brandy de Jerez. Potential of different varieties of grapes for the distillation of *holandas* destined for the elaboration of Brandy de Jerez.
5. Evolution of the antioxidant activity, polyphenolic content and chromatic parameters of old Sherry wines.
6. Application of High- Speed Countercurrent Chromatography for the Isolation of Polyphenols from Sherry wine.
7. Conclusions

## 1. JUSTIFICATION AND OBJECTIVES

The wines and brandies of the area of Jerez, in Spain, undergo an ageing stage in oak casks, following the traditional system of *criaderas* and *soleras*, which translates in significant changes in the organoleptic characteristics of the initial product. It is during the ageing stage when the several biologic, enzymatic, and physicochemical transformations take place. Among these transformations, the following are highlighted: the evolution of the content in polyphenols together with significant modifications in the content in volatile compounds, as well as other specific modifications of each product.

All of these changes are going to be favoured by the components supplied by the wood of the wineskin and by the moderate oxygenation experienced by the product thanks to the micropores which are present in it. The active role of wood in the elaboration of wines and brandies from Andalusia is a known and proven fact from quite long ago, being the spreading process of extractable compounds one of the main responsible factors of the changes suffered by the aged drinks.

Although the Consejo Regulador (Supervisory Council) for the Sherry wines allows in certain wines (as will be detailed below) the ageing to take place by *añadas* (static ageing), the traditional system in the area is the dynamic system of *solera* and *crianza*, a particular ageing system used in Jerez which implies:

- Maintaining the characteristics of the wine throughout the ageing process, as it eliminates the oscillations which take place between the different *añadas*. This phenomenon is very interesting for commercial purposes, as it maintains a homogeneous quality of the wines throughout the years. In fact, if we compare the evolution of a wine aged by means of this system with the evolution of the same wine which has undergone an *añada* system, we can see clear differences as regards composition and homogeneity of both wines.
- It also activates the physical-chemical ageing, as it homogenises the concentration gradients which take place within the wineskin due to the selective permeability phenomenon which takes place in the walls of the wineskin and which periodically supplies small amounts of air to the wine, activating the oxidant ageing processes of wines.

In the case of the Brandy de Jerez, the same ageing system is maintained, though there are other factors which considerably affect the final product. Thus, the regulations of the specific nomenclature “Brandy de Jerez” rule that the brandies of such designation must be aged in casks which have been previously used to age Sherry wines. This practice endows the brandies which are aged in these casks some organoleptic characteristics which are typical of the Sherry wines, as the Fino sherry, Oloroso, Pedro Ximénez, etc.

The ageing state is, without any doubt, the definitive stage in the elaboration of the Sherry wines; the longest one from the temporal point of view and during which the organoleptic characteristics which are going to produce the wide typology of Sherry wines are going to take shape. The same happens with the Brandy de Jerez, being its ageing a key stage in its elaboration. Due to all this, this thesis presents the following objectives:

1. Review of the analytical methodology to search for the most appropriate methods for the characterisation of the Brandy de Jerez and Sherry wines. In this sense, we aim to find faster and more reliable methods than those which have been used in our laboratory. Preparation and validation of the new selected methods.
2. Characterisation of an ageing system by means of *soleras* and *criaderas* of Brandy de Jerez, in order to: on the one hand, select those analytical parameters which act as discrimination parameters when classifying our samples according to their age, and on the other hand, determine the influence of the “wining” (steeping in wine) of the wineskins on the quality of the product.
3. Development and adjustment of an alternative accelerated ageing model with medium toast oak shavings so as to accelerate the ageing processes maintaining the quality, having as a result a test which allows us to explore the possibility of using distillates of other varieties of grapes than the ones which are normally used (*Airén* and *Palomino*) for their ageing as Brandy de Jerez.



4. Creation of a sensorial analysis panel trained for the analysis of brandy which allows us to evaluate the quality of the brandies which are obtained in the different accelerated ageing trials comparing them with those which have been aged by the traditional system.
5. Application of the accelerated ageing method which has been optimised to *holandas*\* from different varieties of grapes, and exploration in this way of the possibility of using distillates of other varieties of grapes than the normally used ones (*Airén* and *Palomino*) for their ageing as Brandy de Jerez.
6. Study of the behaviour of certain analytical parameters (polyphenols, antioxidant capacity, and colour) related to the ageing process of the Sherry wine and *Brandy de Jerez*.
7. Use of countercurrent chromatography for the separation of two typical Sherry wines: Amontillado and Pedro Ximénez, thus being able to obtain simple fractions which allow us to identify a larger number of polyphenolic compounds and to be able to isolate any of them. Besides, the antioxidant capacity of the obtained fractions will be evaluated.

\* *Holandas*: spirits from wine of a low proof distilled at around 40% vol.

## **2. Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez.**

Brandy and other aged distillates are a rich source of polyphenols. For brandies, contact with wood during ageing makes an important contribution to their polyphenols content. This paper describes the use of a previously-devised ultra performance liquid chromatography (UPLC) method to study the polyphenols content of Brandy de Jerez. UPLC is a new technique in liquid chromatography offering several potential advantages, especially the reduction of time. Analyses of Brandy performed by high performance liquid chromatography (HPLC) were repeated by UPLC. A special UPLC analytical column (Acquity UPLC BEH C18 column, 100 x 2.1 mm), with a particle size of 1.7  $\mu\text{m}$ , forms part of this system. Using the UPLC system enabled the time needed for analysis to be reduced to one tenth of the time needed in the conventional HPLC system. In conclusion, the separation factor results of the UPLC were compared to those obtained using HPLC methods; this demonstrated that simple, high efficiency UPLC gradients are viable and advantageous substitutes for traditional analysis of polyphenols in Brandy by HPLC.

Brandy de Jerez is aged in wooden casks following the traditional dynamic system (Soleras and Criaderas), and sometimes the static system (Añadas) is also applied. During the ageing period, slow physicochemical changes involving both the brandy and the wood of the cask take place [1-4]. As a result of some of these reactions, the polyphenolic content of brandy increases considerably during ageing [2,5]. One of the differentiating characteristics of Brandy de Jerez is that the casks in which it is aged have previously contained Sherry wine of one or other type: fino, oloroso, Pedro Ximénez, etc. This process is known as the “wining” of the casks, and it constitutes another route whereby polyphenols are incorporated into Brandy de Jerez. The role of polyphenolic compounds in creating the flavour and aroma of the brandy has been fully and clearly proven by many authors [6,7].

Because of the increase in counterfeit products and consumer demands for protection, food industry professionals need to be able to guarantee the authenticity of their products. Consequently, the characterisation of Brandy de Jerez has acquired considerable commercial interest because this makes it possible to differentiate a particular product analytically from all other similar products on the market, thus protecting its authenticity [8].

Several methods have been described for the determination of phenolic compounds. Panosyan *et al.*, have suggested a new method using high-performance capillary electrophoresis [9]. To date, HPLC has been the main tool for the analysis of polyphenols in spirits [10-12].

Ultra performance liquid chromatography (UPLC) is based on available reversed phase chromatographic media with a 1.7  $\mu\text{m}$  particle size, together with a liquid system that can operate such columns at much higher pressures [13-17]. In comparison with the conventional HPLC method, UPLC offers many advantages including reduced run-time and less solvent consumption [18-21].

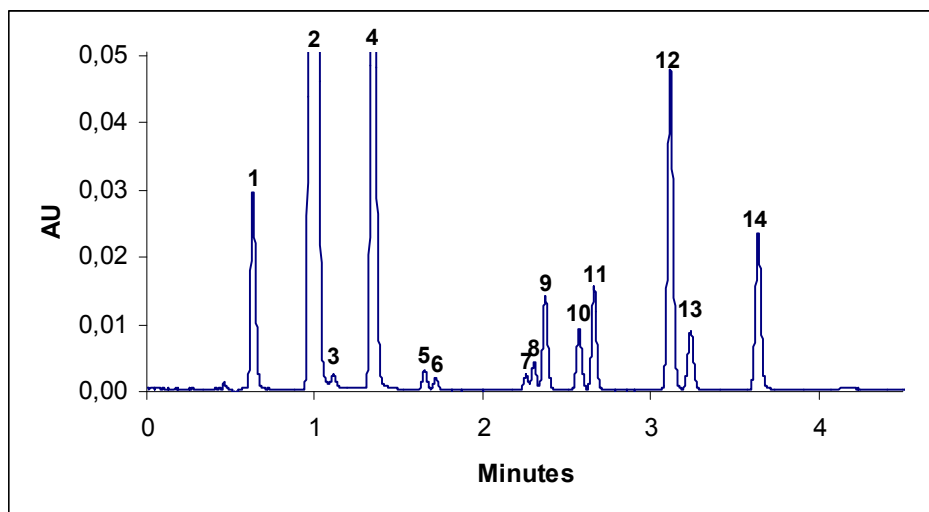
In this chapter, a rapid and reproducible UPLC method was developed for the simultaneous determination of significant polyphenols and furanic derivatives in Brandy. The phenolic compounds determined are gallic acid, protocatechuic acid, protocatechualdehyde, *p*-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, syringic acid, vanillin, *p*-coumaric acid, and syringaldehyde) and the furanic derivatives are 5-hydroxymethylfurfural, furfural, and methylfurfural. The UPLC method was developed on the basis of the HPLC method [22].

In these studies, two different C18 columns, both from Waters, were tested. One was an Acquity UPLC BEH 50x2.1 mm, with 1.7  $\mu\text{m}$  particle size, and the other an Acquity UPLC BEH 100x2.1 mm with 1.7  $\mu\text{m}$  particle size. The shorter column (50 mm in length) proved insufficient to obtain a good chromatographic separation. Therefore the column of 100 mm length was chosen.

In order to improve the resolution obtained, an alternative method was tested using acetonitrile instead of methanol as an organic modifier of the mobile phase. The results show that elution with acetonitrile is beneficial for the separation. In the chromatogram obtained with acetonitrile, more resolved peaks can be found, and there is better separation of the compounds studied; hence acetonitrile was selected for the separation.

For the optimization of the elution gradient, the starting point was the method previously developed by the group [22] with the aid of Acquity UPLC performance calculation software from Waters. It was necessary to make minor changes to the gradient, as well as to the temperature of

the column, to improve the separation and get a higher resolution. Several different temperatures in the range from 25 to 50 °C were assayed, and the best separation for the 14 compounds studied was obtained at 47 °C. (Fig. 1)



**Figure1:** UPLC chromatogram of mixed standards. Detection wavelength was set at 280nm. 1: gallic acid, 2: 5-hydroxymethylfurfural, 3: protocatechuic acid, 4: furfural, 5: protocatechualdehyde, 6: p-hydroxybenzoic acid, 7: caffeic acid, 8: vanillic acid, 9: p-hydroxybenzaldehyde, 10: methylfurfural, 11: syringic acid, 12: vanillin, 13: p-coumaric acid and 14: syringaldehyde.

Validation of the analytical methods was based on the following parameters: detection and quantification limits, analytical sensitivity, precision and accuracy. These parameters were calculated for each analyte from standard solutions used to obtain the corresponding calibration curves, using the UPLC method developed.

The precision of this method was evaluated as the standard deviation (SD) of replicated measurements of one sample of Brandy. Both intra- and inter-day repeatability of the analytical method were assessed on two parameters: retention time and peak area repeatability. For the intra-day variability test, the Brandy sample was analysed with five replicates being performed within 1 day, while for inter-day variability test, Brandy was analysed with five replicates being performed on 3 consecutive days. Recovery was used to evaluate the accuracy of the method, and was calculated by comparison with the results obtained in the analysis of added samples of three concentration levels.

By comparing the data obtained and chromatograms generated from the UPLC and HPLC analyses [22], the advantages of the UPLC method can be summarised as follows:

With UPLC the running time (6.5 min) was about ten times shorter than that with HPLC (60min). The combination of the shorter running time with a smaller flow rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup> reduced the solvent consumption to only 4.55 mL, whereas solvent usage for a single run in HPLC was 60 mL.

In view of the results presented in table 1, 11 of the 14 compounds present a lower LOD in UPLC than in HPLC, and two have a very similar LOD (*p*-hydroxybenzaldehyde and vanillin). Only for 5-hydroxymethylfurfural is the LOD considerably higher (0.399 in UPLC and 0.158 in HPLC); this however is more than sufficient taking into account that brandies have a high concentration of HMF (table 5). For the LOQ, it presents the same behaviour.

Compounds	LOD (mg L <sup>-1</sup> )		LOQ (mg L <sup>-1</sup> )		AS		t <sub>R</sub> RSD % (intra day)		t <sub>R</sub> RSD % (inter day)		Area RSD % (intra day)		Area RSD % (inter day)	
	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
Gallic acid	0.754	0.178	2.514	0.571	0.254	0.163	0.1	0.2	2.5	0.6	4.8	3.1	5.7	6.2
5-HMF	0.158	0.399	0.526	1.811	0.053	0.592	0.1	0.1	1.2	0.4	3.3	4.8	4.1	3.9
Protocatechuic acid	0.065	0.049	0.216	0.164	0.029	0.071	0.5	0.2	2.7	0.5	6.2	4.7	7.7	4.4
Furfural	0.197	0.094	0.657	0.313	0.066	0.105	0.3	0.1	0.9	0.3	1.6	1.6	3.6	3.3
Protocatechualdehyde	0.023	0.011	0.077	0.033	0.019	0.016	0.3	0.1	2.5	0.9	5.2	4.4	8.1	4.9
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.048	0.009	0.163	0.031	0.021	0.009	0.2	0.2	1.3	0.8	4.6	4.8	7.5	6.1
Caffeic acid	0.028	0.011	0.094	0.049	0.095	0.015	0.3	0.2	1.9	0.6	5.4	6.4	7.6	6.9
Vanillic acid	0.019	0.017	0.044	0.058	0.063	0.019	0.3	0.2	1.6	0.6	5.5	5.1	3.6	4.8
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	0.013	0.019	0.067	0.064	0.045	0.021	0.3	0.1	1.5	0.4	7.5	3.4	7.7	3.8
Methylfurfural	0.153	0.012	0.509	0.041	0.085	0.012	0.3	0.1	0.7	0.4	5.1	7.1	6.2	8.8
Syringic acid	0.093	0.049	0.311	0.163	0.035	0.031	0.3	0.1	1.2	0.5	2.1	1.7	2.3	2.4
Vanillin	0.055	0.056	0.183	0.232	0.018	0.076	0.3	0.1	0.9	0.3	5.6	3.9	5.5	5.8
<i>p</i> -Coumaric acid	0.028	0.017	0.092	0.058	0.093	0.019	0.4	0.1	0.2	0.2	1.1	2.2	1.3	2.5
Syringaldehyde	0.133	0.067	0.443	0.225	0.049	0.071	0.3	0.08	0.7	0.2	1.4	0.7	8.1	3.7

**Table 1:** Comparison between HPLC and UPLC methods

In respect of repeatability, RSD in terms of retention time (inter and intra day) was better in UPLC than in HPLC. For RSD in terms of Area, the same can be said for 8 of the compounds. Finally we can confirm that the UPLC is a powerful tool for the analysis of polyphenols compounds in Brandy.

## References

- [1] Canas, S., Leandro, M. C., Spranger, M. I., Belchior, A. P., *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 5023.
- [2] Viriot, C., Scalbert, A., Lapiere, C., Moutounet, M., *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41 1872.
- [3] Mosedale, J.R., Puech, J.-L., *Trends Food Sci. Technol.* 1998, 9, 95.
- [4] Martínez Montero, C., Rodríguez Dodero, M.D.C., Guillén Sánchez, D.A., García Barroso, C., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1058.

- [5] Rodríguez Madrera, R, Blanco Gomis, D, Mangas Alonso JJ, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7969.
- [6] Caldeira, I., Belchior, A.P., Clímaco, M.C., Bruno De Sousa, R., *Anal. Chim. Acta.* 2002, 458, 55.
- [7] Caldeira, I., Mateus, A.M., Belchior, A.P., *Anal. Chim. Acta.* 2006, 563, 264.
- [8] Savchuk, S.A., Kolesov, G.M., *J. Anal. Chem.* 2005, 60, 752.
- [9] Panosyan, A.G., Mamikonyan, G., Torosyan, M., Abramyan, A., Oganessian, A., Gabrielyan, E.S., Grigoryants, A., Mkhitarian, S., Lapin, B.V., *J. Anal. Chem.* 2002, 57, 356.
- [10] De Aquino, FWB, Rodrigues, S, Do Nascimento, RF, Casimiro, ARS, *Food Chem.* 2006, 98, 569.
- [11] Canas S., Belchoir A.P., Spranger M.I., Bruno-De-Sousa R., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 496.
- [12] Barroso, C.G., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Pérez-Bustamante, *J. Chromatogr. A*, 1996, 724, 125.
- [13] Schwartz M.E., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2005, 28, 1253.
- [14] Nováková, L., Matysová, L., Solich, P., *Talanta.* 2006, 68, 908.
- [15] Yang, F.Q., Guan, J., Li, S.P., *Talanta.* 2007, 73, 269.
- [16] Wang, X., Zhao, T., Gao, X., Dan, M., Zhou, M., Jia, W., *Anal. Chim. Acta.* 2007, 594, 265.
- [17] Nováková, L., Solichová, D., Pavlovičová, S., Solich, P., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 2433.
- [18] Guan, J., Lai, C.M., Li, S.P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 44, 996.
- [19] Liu, M., Li, Y., Chou, G., Cheng, X., Zhang, M., Wang, Z., 2007 *J. Chromatogr. A.* 2007, 1157, 51.
- [20] Zhang, Y., Jiao, J., Cai, Z., Zhang, Y., Ren, Y., *J. Chromatogr. A.* 2007, 1142, 194.
- [21] Thompson, J.W., Mellors, J.S., Eschelbach, J.W., Jorgenson, J.W. *LC-GC*, 2006, 24, 16.

### **3. Analytical characterisation of a Brandy de Jerez during its ageing**

Brandy de Jerez is differentiated from other brandies by its distinctive and unique organoleptic characteristics that are derived basically from its traditional system of production, from the characteristics of the wooden cask in which it is aged and, naturally, also from climatic characteristics of the geographic area where it is exclusively made. According to the Regulations of the Brandy de Jerez Specific Denomination, there are three quality categories of Brandy de Jerez: Brandy de Jerez Solera (aged for a minimum of six months), Brandy Solera Reserva (aged for a minimum of one year), and Brandy Solera Gran Reserva (this is aged for the longest period of time, more than three years). With a view to ensuring its quality, in the present study an ageing solera of Brandy de Jerez has been characterised analytically. The samples have been obtained in a winery of the production zone over a two year period, and the following analytical parameters have been monitored: colour, index of total polyphenols, short-chain organic acids, and the analysis of particular polyphenolic compounds. In this chapter this set of samples has been characterised analytically, to monitor the evolution of particular physico-chemical parameters over a period of two years. Subsequently, the data have been treated statistically with the object of devising a model that would enable the samples to be classified into the different commercial classes, according to their mean time of ageing.

Many previous studies have related the polyphenol content of wine [1-3] and brandy [4-6] with the ageing process, due fundamentally to the wood of the cask giving up these compounds to the distillate contained. Colour has also been utilised on repeated occasions as a marker of age in wine [7, 8]. Although organic acids do not have a direct relationship with the ageing process, in the case of Brandy de Jerez they play an important role since their presence is due, in large part, to the previous wining of the brandy cask. Such wining is an essential condition for the ageing of this Brandy, according to the ruling of the Supervisory Board for the specific nomenclature of Brandy de Jerez. Organic acids have also been utilised in various studies as parameters, together with other indicators, of the age of enological products [9,10].

The fact that the casks are wined previously with a sweet wine, of the Pedro Ximénez variety, together with the methods of production used for this particular wine, make this brandy a product of very high quality. Consequently it is important that it should be well-characterised in order to

protect its authenticity and to be able to prevent future fraud. In this study this set of samples has been characterised analytically, to monitor the evolution of particular physico-chemical parameters over a period of two years. Subsequently, the data have been treated statistically with the object of devising a model that would enable the samples to be classified into the different commercial classes, according to their mean time of ageing.

The correlation between polyphenolic compounds and the ageing process has been fully and clearly proven by many authors [1-3]. With respect to their origins, many of the polyphenols studied are known to be extracted from the wood of the cask during the ageing process, as occurs with gallic, protocatechuic and vanillic acids [1], while others have their origin in the wood that has previously been "wined" with Sherry wine, thus absorbing polyphenols that are subsequently taken up by the brandy, like *p*-coumaric acid. For their part, the furanic aldehydes have a different provenance: on the one hand, the furfurals are already present in the original distillate, as a consequence of the heating undergone by the aromatic compounds in the process of distillation [11-13]; the furanic aldehydes are present in the brandy as a result of extraction from the wood [14-15]; and lastly, the presence of hydroxymethylfurfural may be due to the permitted practice of adding caramel once the brandy has been aged [16]. The addition of caramel is a customary practice before the final bottling, in order to rectify the colour of the product. This is not the case for our samples, since the samples under study have been analysed immediately after sampling, without any addition having been made. Further, the hydroxymethyl furfural in this particular case was incorporated in the brandy by another route: the wining of the casks. As previously stated, the casks had been previously wined with a sweet wine made from sun-dried raisins of the Pedro Ximénez grape variety; as a result of the high temperatures supported by the grapes during their pasification, they acquire high levels of hydroxymethyl furfural [17]. With respect to the temporal evolution of the compounds, observing the evolution of the compounds, a slight increase over the course of time is detected, although in general there is little evolution. This seems to indicate that the system is in a phase of equilibrium. The solera and criaderas ageing systems are characterised, at first, by a significant and increasing acquisition by the brandy of all the compounds; then after several years have passed, a phase of stability is reached [24]; the system studied would be in this phase at the time of sampling.



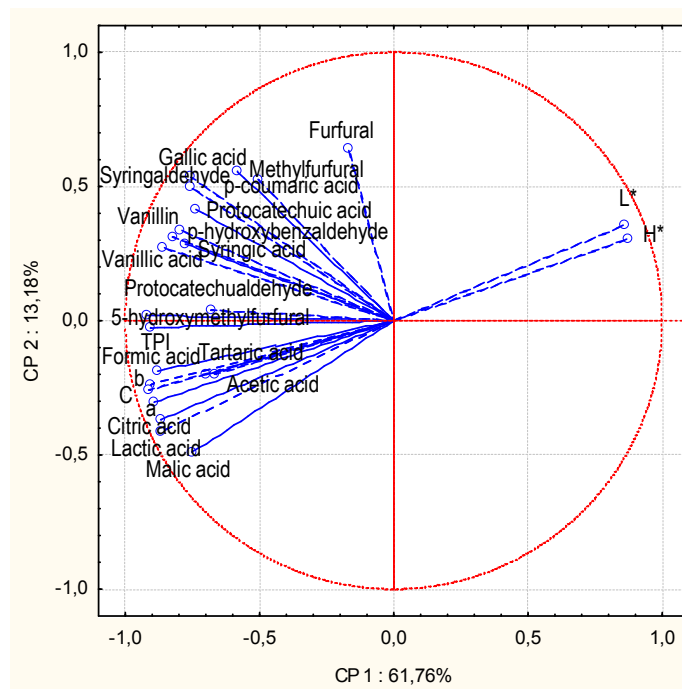
Of the organic acids studied, tartaric, lactic and acetic acids presented the highest concentrations. Acetic and lactic acids are present in the original distillate. When those contributed by the previous wining of the cask are added to these, this could explain the high concentrations found. In the case of tartaric acid, which has a majority presence in Sherry wines [9], this acid is acquired exclusively by extraction from the cask, originating from the wining, since this acid is not present in the oak wood or in the original distillate.

In accordance with the values of the chromatic parameters the samples aged for longer periods of time, corresponding to those of the solera and first criaderas, present a darker colour (lower values of the  $L^*$  luminosity and  $H^*$  tone parameters) with a more marked yellow-brown tonality (higher values of  $a^*$  and  $b^*$ ).

A statistical study of the set of samples analysed was conducted. As stated previously, concerning their mean time of ageing, the brandies corresponding to the 8th Criadera belong to the category of Solera brandies, those of the 6th and 7th Criaderas belong to the Solera Reserva category, and the rest of the scales correspond to Solera Gran Reserva brandies.

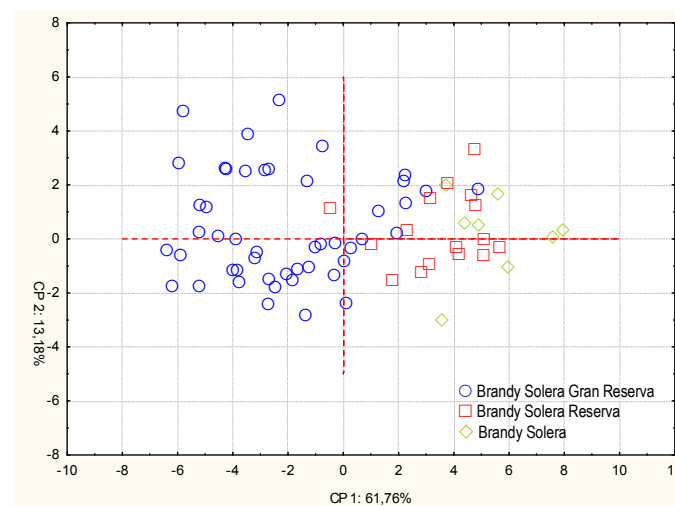
First, variance analysis was used to investigate the possibility of differentiating the different commercial categories of brandies on the basis of the parameters studied. According to the data obtained, all the variables, except for furfural, presented significant differences between the different types of Brandy. The fact that furfural did not do so may be because its presence in brandy is due not only to the ageing in wood but also to its presence in the raw material of the brandy, the grape distillate; for this reason furfural cannot be utilized as a marker of ageing.

In Figure 1 it can be seen that most of the variables are associated with component 1. Given that the correlation between polyphenols and ageing is very well known [1-6], and that both the colour [7] and the organic acids [9] have been utilized previously as markers of ageing, we can assume that the dimension of component 1 is associated with the length of time of ageing. On the other hand, furfural again presents a rather different behaviour, representing the greatest weight in component 2; according to the hypothesis put forward previously, this component would be related to the nature of the distillates used in the system of ageing.



**Figure 1:** Principal component analysis. Projection of the variables on the factor plane

On analysing figure 2, in which the samples are projected onto the plane of the principal components, a ranking within component 1, related to the ageing, can be observed.



**Figure 2:** Principal component analysis. Projection of the cases on the factor plane

The possibility of differentiating analytically the commercial categories of Brandy de Jerez has been studied, utilising the multivariate statistical technique of obtaining linear discriminant

functions from the parameters studied. With the application of Linear discriminant Analysis, the variables extracted as significant variables in decreasing order of discriminant capacity were:  $a^*$ ,  $b^*$ , citric acid, citric malic and total phenolic content. The classification for the Solera Gran Reserva was 97.95% correct; for the Solera Reserva was 81.5% correct; and for the Brandies belonging to the Solera group was 100% correct. This is presented visually in figure 3, where it can be seen that there is a clear differentiation between the three groups.

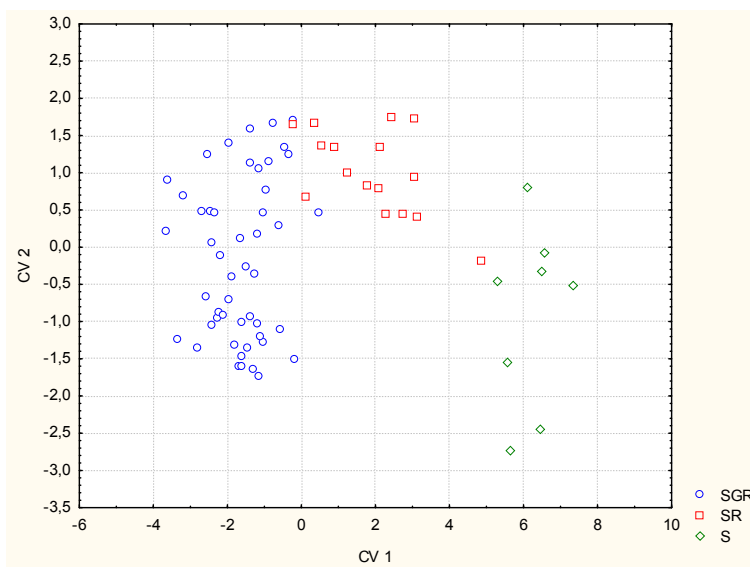


Figure 3. Linear Discriminant Analysis. Projection of the cases on the canonical plane

## References

- [1] Cadahía E., De Simón B.F., Vallejo R., Sanz M., Broto M., *Am. J. Enol. Vitic.* 2007, 58, 163.
- [2] García Moreno M.V, García Barroso C., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 7556.
- [3] Hernández, T., Estrella, I., Dueñas, M., De Simón, B.F., Cadahía, E., *Eur. Food Res. Technol.* 2007, 224,, 695.
- [4] Schwarz, M., Rodríguez, M.C., Martínez, C., Bosquet, V., Guillén, D.A., Barroso, C.G. *Food Chem.* 2009, 116, 29.
- [5] Canas, S., Casanova, V., Pedro Belchior, A., *J. Food Comp. Anal.* 2008, 21, 626.
- [6] Barroso, C.G., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Pérez-Bustamante, *J. Chromatogr. A*, 1996, 724, 125.
- [7] García-Puente Rivas, E., Alcalde-Eon, C. Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, M.T. *Anal. Chim. Acta.* 2006, 563, 215.
- [8] del Álamo, M., Nevares, I., Gallego, L., Martín, C., Merino, S., *Anal. Chim. Acta.* 2008, 621, 86.
- [9] Guillén, D.A., Palma, M., Natera, R., Romero, R., Barroso, C.G. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 2412.
- [10] Lamikanra, O., *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 935.
- [11] Onishi, M. , Guymon, J.F., Crowell, E.A. *Am J. Enol. Vitic.* 1977, 28, 152.
- [12] Jeuring, H.J. , Kupperts, F.J., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1980, 63, 1215.

- [13] Rodríguez Madrera, R., Blanco Gomis, D., Mangas Alonso, J.J., *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7969.
- [14] Caldeira, I., Clímaco, M.C., Bruno De Sousa, R., Belchior, A.P., *J. Food Eng.* 2006, 76, 202.
- [15] Rodríguez-Bencomo, J.J., Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., González-Huerta, C., González-San José, M.L., *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 5102.
- [16] Quesada Granados, J., Villalón Mir, M., López, G., Serrana, H. López Martínez, M.C., *Food Chem.* 1996, 56, 415.
- [17] Karadeniz, F., Durst, R.W., Wrolstad, R.E., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 5343.

#### **4. Development of an accelerated ageing test for the Brandy de Jerez. Potential of different varieties of grapes for the distillation of holandas destined for the elaboration of Brandy de Jerez.**

The Brandy de Jerez presents its own special organoleptic properties, mainly due to the elaboration system of such brandy. The use of the typical ageing system of soleras and criaderas, together with the compulsory use of wineskins "wined" with Sherry wines endow it with a marked personality. The need of the companies to carry out trials in order to find a diversity of products, certified by the Specific Designation of Origin, is being slowed down by the fact that, at least, 3 years of ageing and a large volume of wine spirit are necessary to establish a solera which meets the requirements of the current regulations. Due to this fact, it is very interesting to have an alternative ageing system which allows to shorten the ageing time and the necessary volume of wine spirit and which produces a similar product to the one obtained by means of the traditional system, being able in this way to evaluate the feasibility of the new product.

The use of oak shavings to accelerate the ageing process is a widely used practice in the oenology field for wines, and there are several works which study their influence on different parameters just as the polyphenolic content, colour, and the sensorial characteristics [1-5]. Monedero et al [6] proposed an alternative accelerated ageing method for the Oloroso Sherry wine. For the case of the Sherry Vinegar, several laboratory studies have been carried out, studying the influence of the addition of shavings as a proposal of accelerated ageing in the volatile content, polyphenolic content, and in the organoleptic profile [7-11], and interesting results have been obtained. Recently, Duran et al. [12] carried out a comparison study between the samples of Sherry Vinegar which had been aged by means of a traditional system of solera and criadera and those which had been aged in an accelerated way by means of wood shavings and microoxygenation with very satisfactory results. For the case of spirits, the bibliography is scarce, though there are some researches regarding rum [13,14].

On the other hand, the wine spirits used for the elaboration of Brandy de Jerez are mainly obtained from wines produced from the airén type of grape, which comes from the vineyards located in the region of La Mancha (central Spain). The reason for the use of this variety has been the fact that it is the most widely used variety of grape in Spain (around 500,000 ha) and in

some way, a use was found for the surplus of wine which took place in such area. However, this can be a limitation for the quality of the distillates, and, as a result, of the brandy which is elaborated with them, as the wine which is used is not the best one for a quality distillate, but the cheapest one. It is progressively becoming clearer that, in order to increase the quality of the brandy, it is necessary to use wine holandas of a high quality. It also entails a limitation when achieving a product classified as "Designation of Origin". The Designation of Origin is a qualification used to legally protect certain foodstuffs which are produced within a certain region as regards the producers from other areas which want to take advantage of the good name of the original ones during a long time of production or cultivation. For that purpose, it is necessary that the grape used for the wine spirit comes from the area, and not from *Castila La Mancha*, as had happened until now. Besides, the varieties of grapes are suffering the consequences due to the change of the weather of these latest years, losing sometimes much of a grape harvest due to different environmental conditions. Due to this fact, it is necessary to search for a possible alternative to the airén grape variety which can, on the one hand, improve the quality of the brandy, and on the other hand, allow the produced brandy to be eligible for a "Designation of Origin". For that purpose, an accelerated ageing has been implemented with the method optimised in the previous chapter to distillates obtained from wines from different varieties of grapes (*Airén, Colombard, Corredera, Doradilla, Garrido Fino, Jaén Blanco, Moscatel de Málaga, Palomino Fino, Ugni Blanc, and Zalema*) which have been selected due to their analytical and sensorial characteristics, so that it is possible to evaluate their feasibility as Brandy de Jerez, so as to develop new products within their typology, as well as to search for alternatives for the possible surpluses which may take place in the specific Designation of Origin.

In the following chapter, two objectives are then proposed:

- Obtaining an alternative ageing test with medium toasted oak shavings which allows us to obtain, in a short period of time, a product of a similar quality to the one obtained by means of the traditional ageing system. For that purpose, we have carried out a laboratory experiment with different conditions of amount of wood shaving and extraction method, comparing it, both analytical and sensorial, with a brandy which had been aged by means of the traditional system.

- Assess the feasibility of different varieties of grapes by ageing them by means of the test designed on the previous section, being thus able to find alternatives to the Airén variety. The aged holandas were evaluated from both, the analytical and the sensorial points of view.

#### 4.1 Development of an accelerated ageing test for brandy

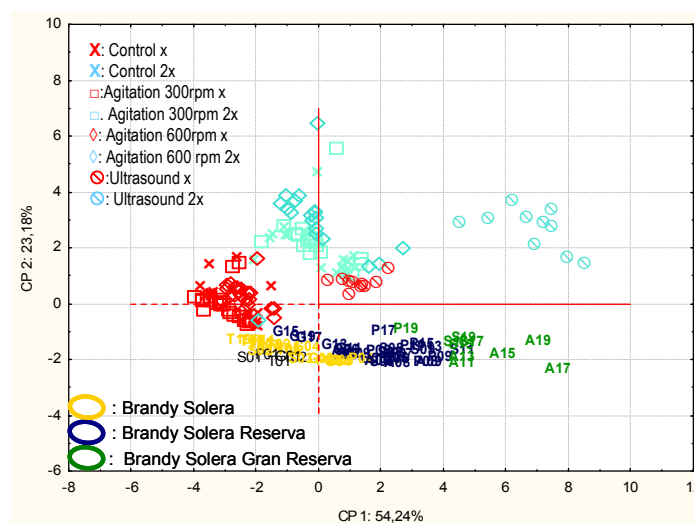
This work has included the aim to develop and prepare an alternative accelerated ageing system with medium toast oak shavings so as to have a test which allows us to explore the possibility of using distillates of other varieties of grapes than the usual ones (airén and palomino) for their ageing as Brandy de Jerez. A series of experiences were prepared in the laboratory, using different operational conditions, such as the amount of wood shaving and the extraction method, comparing them in analytical and sensorial terms with a brandy which had been aged by the traditional system. In this way, and in order to emulate and accelerate the natural ageing process in oak casks, an alternative accelerated ageing procedure for the Brandy de Jerez has been proposed in this chapter. For the control of the process, the polyphenolic components have been monitored by the method which was previously adjusted, using UPLC-DAD, colour measurements by means of parameters *CIELab*, index of total polyphenols, together with the sensorial analysis carried out by a panel of expert tasters. Afterwards, these results were compared to the ones from the brandies which had been aged in a traditional way.

The trials were carried out in 150 ml test tubes with wine spirit and oak wood shavings in different amounts. In order to dose the amount of shavings to be used, we begun from the relationship surface/volume of a wineskin from Jerez ( $64 \text{ cm}^2/\text{L}$ ), trying to use multiples of such relationship in the developed experiences. The wine spirit used for this experience was supplied by a winery from the area. The reference samples with which the obtained results were compared were a series of samples of brandies from a pilot experience carried out by our group in the past in collaboration with the specific Designation of Origin of Brandy de Jerez. In this experience, the system consisted of 12 American oak casks from Jerez (3 casks per each scale, formed by one solera and three criaderas, steeped with oloroso Sherry wine). During 5 years, a sampling was carried out every three months, analysing the different parameters [15-17].

Different trials were implemented, according to different criteria: extraction method, amount of wood shavings, and the “wining” of the shavings. The first trial aimed at selecting the most effective extraction method:

- static (control),
- with agitation at different speeds (at 300rpm and at 600 rpm),
- with ultrasound.

The amounts of oak shavings which were used were  $x$  and  $2x$ , being  $x$  the necessary amount to obtain an equivalent surface/volume relationship to the one of the casks from Jerez. The length of the trials was variable, being of 4 months for the control trials (without agitation or ultrasound) and for the agitation trial, and of 1 month for the ultrasound trial. The series of experiences were sampled twice a week, carrying out the corresponding analyses on them to compare them afterwards to the reference samples. Figure 1 shows the results from the analysis of the principal components of these first data. Based on the differentiation and ordering of the reference samples of the system of soleras and criaderas on the axis of the Principal Component 1 (PC1), we can conclude that it is closely related to the age of the wine spirit, in a growing direction to the right. As can be seen, the group of samples from ultrasound with an  $x$  amount of shaving presents in one month similar characteristics to the samples of Solera Reserva, whereas the samples from ultrasound with a  $2x$  amount are similar to those of the oldest brandies (Solera Gran Reserva). Considering these results, it is possible to conclude that the best option from these preliminary trials was the use of ultrasounds, as it proved to be more efficient.



**Figure 1:** Analysis of principal components. Wood shaving “wining” trial



The second series of experiences was designed using oak shaving amounts of  $x$ ,  $2x$ ,  $3x$ , and  $4x$ , and adding a new operational variable, which was the fact of whether they had been previously “wined” or not. Starting from the base that one of the characteristics in the elaboration of the Brandy de Jerez is the use of wine steeped casks, we thought that the “wining” of the oak shavings needed to be an essential variable to take into account. When comparing the results of the analyses carried out to the different samples which had been extracted from the different trials with the reference samples, we observed that the most appropriate amounts of oak shavings were those with  $2x$  and  $3x$ . Sensorial-wise, they were the preferred ones, and also the most similar ones with a spirit of the *solera reserva* category system which worked as reference, although most of the judges detected a negative attribute described as “closed” and/or “green”. This led us to conclude that the used wood shavings were not dry enough, adding organoleptic characteristics which are typical of non dried wood. As a result, in the following trial, the focus was moved to the “wining” of the wood shavings, using different “wining” times and subjecting them to a drying time so as to confirm the posed hypothesis.

Thus, the third trial was aimed at testing different conditions of the “wining” of the wood shavings. For such purpose, we tested wine spirits with a  $2x$  and  $3x$  amount of shavings “wined” in two different ways:

- 9gr of wood shavings with 80ml Oloroso Sherry wine during 1 hour in ultrasound bath, then 24 hours in maceration with the Oloroso wine and subsequent drying with heat cabinet during 10 hours. Thus, the nomenclature  $2x$  1HUS and  $3x$  1HUS indicates that they are samples which have been aged with a  $2x$  and  $3x$  amount of shavings, respectively, steeped in wine in this way.
- 9gr of wood shavings with 80ml Oloroso Sherry wine during 4h in ultrasound bath, then 24 hours in maceration with the Oloroso Wine and subsequent drying with heat cabinet during 10 hours. The nomenclature  $2x$  4HUS and  $3x$  4HUS, indicates that they are samples which have been aged with a  $2x$  and  $3x$  the amount of shavings, respectively, steeped in wine in this way.

Once the analytical determinations were carried out to the samples which were obtained from this trial, the details were analysed, comparing them with those of the reference brandies, obtaining a

good degree of similarity between the trial samples and the reference ones. Afterwards, it was decided to subject these samples to a sensorial evaluation to be able to reach a better choice.

The generation of aromatic descriptors through the qualitative evaluation of several naturally aged samples and the subsequent analysis of the appearance frequency allowed to define the following most significant attributes: aromatic intensity, fruity, vinous, alcoholic, dairy, sweet, wood, vanilla, toast, spices, chemical, wetness, and animal. Scales of 9 points with the following intensities were used: none, weak, medium, high, and very high, with their intermediate points. Besides, a general impression with the following values was included: bad, mediocre, acceptable, good, and very good.

The multi-option analysis by means of Principal Components of the sensorial data extracts 5 components which explain 73% of the variance. The interpretation of the first components, according to the weight of the variables (Table 1) could be as follows:

- PC1: sweet and vanilla, characteristic of a slight ageing aroma. Due to this, the hypothesis of its correlation with the reactions slowly triggered between the compounds extracted from the oak and with participation of the oxygen arises.
- PC2: herbaceous, chemical, and wetness, negative notes.
- PC4: aromatic intensity, wood, toast, and spices, notes which are associated to a highly modernized character.

The general impression is positively related to PC1 and inversely to PC2

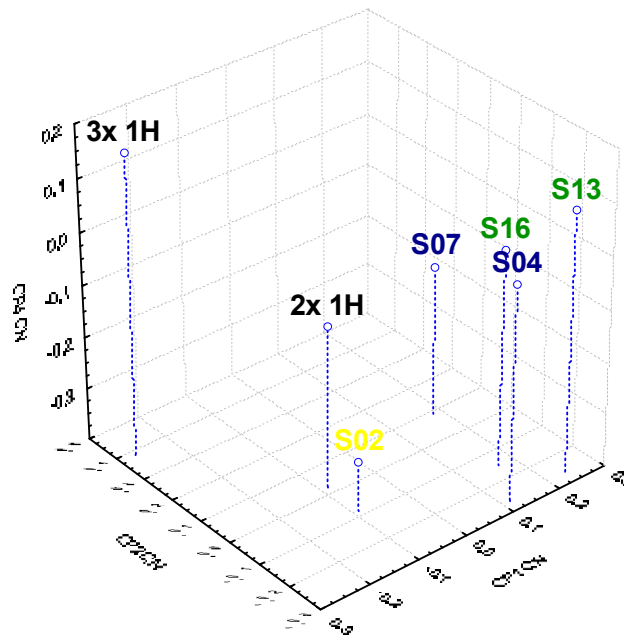
**Table 1:** Weight of the principal components in the sensorial analysis

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5
<b>Aromatic intensity</b>	0.140	-0.109	0.211	<b>0.766</b>	0.091
<b>Fruity</b>	0.015	0.119	<b>0.919</b>	0.123	0.149
<b>Herbaceous</b>	-0.088	<b>0.756</b>	0.173	0.073	0.016
<b>Vinous</b>	0.155	0.194	0.161	0.228	<b>0.743</b>
<b>Alcoholic</b>	-0.109	-0.028	0.027	0.486	<b>0.699</b>
<b>Dairy</b>	0.669	0.379	-0.013	0.123	0.358
<b>Sweet</b>	<b>0.739</b>	-0.169	0.248	0.346	0.021
<b>Wood</b>	0.423	0.219	-0.231	<b>0.725</b>	-0.067
<b>Vanilla</b>	<b>0.726</b>	-0.145	-0.162	0.422	-0.115
<b>Toast</b>	0.304	0.186	-0.149	<b>0.729</b>	0.172
<b>Spices</b>	-0.041	0.168	0.125	<b>0.735</b>	0.161
<b>Chemical</b>	0.27494	<b>0.736</b>	0.044	-0.035	0.367
<b>Wetness</b>	-0.061	<b>0.812</b>	0.076	0.215	-0.268
<b>Animal</b>	0.093	0.614	-0.231	0.431	0.319

<b>General Impression</b>	0.652	-0.591	0.281	0.369	-0.071
<b>Expl. Var</b>	2.011	2.872	1.268	3.127	1.589
<b>Prp.Totl</b>	0.134	0.191	0.084	0.208	0.105

The average of the values of the components for each sample in the new space is represented on Figure 2, from which some conclusions can be drawn:

- The wine spirits of the solera are ordered along the PC1 according to their average ageing time. Trial 2x1H is placed over the youngest spirit (S02: belonging to Brandy Solera), and trial 3x1H, in lower values.
- Regarding the PC2, just the 3x1H trial presents high values, far from the rest of the samples, including those of the accelerated trial 2x1H.
- Category PC4, related to the aromatic intensity mainly due to the extraction processes of the wood, presents the highest values for the accelerated ageing sample with a higher amount of oak (3x1H). Trial 2x1H is similar to the levels of Solera Reserva (S04, S07) and Solera Gran Reserva (S13, S16), whereas the brandy which has been aged for a smaller amount of time reaches the lowest values.



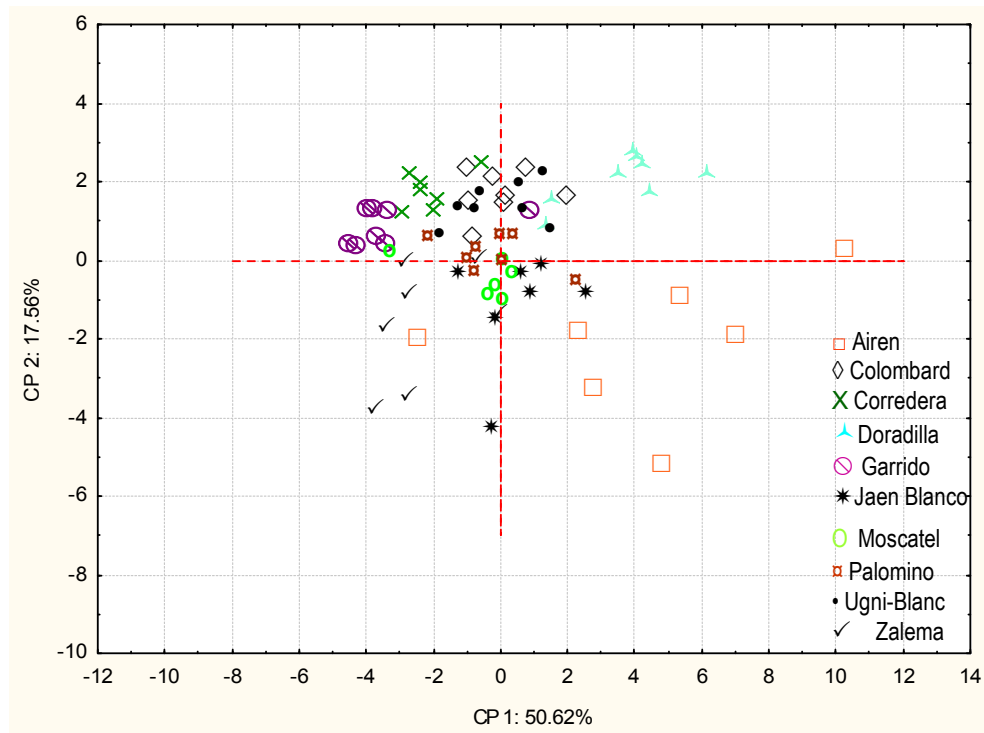
**Figure 2:** Situation of the samples in the space of the Principal Components

It can be concluded that one of the samples obtained through the accelerated ageing by means of wood shavings (2x1H: 2x amount of wood, “wined” during 1 hour with ultrasound, 24 hours in maceration and subsequent drying in heat cabinet during 10 hours) achieved in 1 month sensorial characteristics and acceptability which are similar to those of brandies whose average ageing time was between 6 and 18 months.

#### 4.2. Application of the optimised accelerated ageing method to holandas of different varieties of grapes

In this second part of this chapter, holandas of 10 different varieties of grapes (airén, colombar, corredera, doradilla, garrido fino, Jaén blanco, moscatel de Málaga, palomino fino, ugni blanc, and zalema) which had been aged by means of the test which was adjusted in the first part of the chapter were analysed. They were evaluated, both from the analytical and sensorial points of view and were compared to the reference brandies which had been aged in the traditional way used in the first part of the chapter. These samples were supplied by the Rancho de la Merced (research centre of Jerez de la Frontera), coming from previous researches. All of them came from the wine harvest of year 2006. All these aged holandas underwent the same analyses as those mentioned on the previous section: quantification of polyphenolic compounds by means of UPLC, establishment of index of total polyphenols by means of Folin-Ciocalteu, and analysis of chromatic parameters.

The aged holandas from different varieties of grapes were subjected to an analysis of their principal components with the set of studied parameters in order to study any possible differences in their behaviour. Such as is shown in Figure 3, the holandas of the airén variety are located on the right area of the graph, somewhat further away from the rest of varieties, being varieties *Jaén Blanco* and *Moscatel* similar in behaviour.



**Figure 3:** Analysis of the principal components: projection of the cases

The holandas which had undergone the accelerated ageing process were sensorially analysed, and the descriptive evaluation of each of them was carried out in duplicate. A factorial analysis was carried out on the non aged holandas (marked in orange) and on those which had been aged with the accelerated system (marked in red), extracting 2 factors which explain 67% of the total variance of the details.

Figure 4 represents the projection of the variables on the plane. As can be seen, factor 1 contains information on the ageing, as it contains variables such as oak, vanilla, toast, and spices with high positive values, contrary to variables vinous and alcoholic which are located on the negative axis. Factor 2 on the other hand tends to relate to quality, after observing the significant contribution of descriptors such as aromatic intensity and fruity character, together with the general impression, as compared to the negative factors of wetness and animal. Figure 5 shows holandas without ageing (left side, yellow samples), and with accelerated ageing (right side, brown).

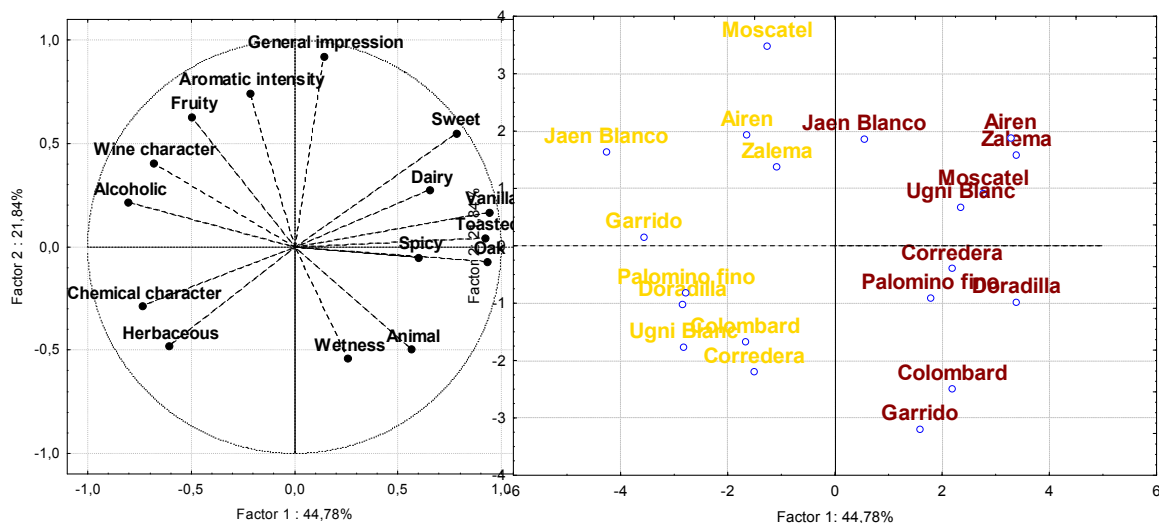


Figure 4 and 5: Analysis of principal components. Projection of the variables. Projection of the cases.

Thus, after analysing the sensorial analyses and the analytical ones, the holandas which proved to be most suitable to become an alternative to the variety of grape airén were: Jaén blanco and Moscatel.

## References

- [1] Del Álamo, M., Nevares, I., *Anal. Chim. Acta.* 2006, 563, 255.
- [2] Del Álamo, M., Fernández, J.A., De Castro, R., *Food Sci. Tech. Int.* 2004, 10, 233.
- [3] Del Álamo, M., Nevares, I., Cárcel, L.M., Navas, L. *Anal. Chim. Acta* 2004, 513, 229.
- [4] Monedero, L., Olalla, M., Quesada, J.J., López-García, H., López, M.C., *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 1754.
- [5] Monedero, L., Olalla, M., Villalón, M., López-García, H., López, M.C., *Food Chem.* 2000, 69, 47.
- [6] Gutierrez, V.L., *J. Food Sci.* 2002, 67, 2415.
- [7] Morales, M.L., Tesfaye, W., García-Parrilla, M.C., Casas, J.A., Troncoso, A.M., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3173.
- [8] Morales, M.L. Benítez, B. Troncoso, A.M., *Food Chem.* 2004, 88, 305.
- [9] Morales, M.L. Benítez, B., Tesfaye, W., Callejón, R.M., Villano, D., Fernández-Pachón, M.S., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M., *J. Food Sci.* 2008, 71, 238.
- [10] Tesfaye, W., Morales, M.L. Benítez, B., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M., *Anal. Chim. Acta* 2004, 513, 239.
- [11] Tesfaye, W., Morales, M.L., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 7053.
- [12] Enriqué Duran. *Doctoral thesis.* University of Cádiz, Spain.
- [13] Quesada Granados J., Merelo Guervos J.J., Oliveras Lopez M.J., Gonzalez Penalver J., Olalla Herrera M., Blanca Herrera R., Lopez Martinez M.C. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 1470.
- [14] Blanco Carvajal, I., Giménez Martínez, R., González, M.D., Vazquez, M.A. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 2000, 19,251.

## **5. Evolution of the antioxidant activity, polyphenolic content and chromatic parameters of Brandy de Jerez and old Sherry wines**

For many oenological products, the ageing process is one of the most important ones during its elaboration process. These are long and expensive processes which affect the final price of the product. Due to this fact, the industry increasingly demands a deep characterisation of different analytical parameters which allow us to ensure the authenticity of the product, preventing in this way any kind of fraud. This chapter deals with a monitoring which has been carried out of different analytical parameters used on a set of aged samples and which consists of wine years from 1935 and 1999. The analysed parameters have been: colour, antioxidant capacity, polyphenols, and index of total polyphenols. In the same way, we have observed the possible correlation among antioxidant capacity, polyphenols, and years of ageing. Besides, the set of samples has been statistically treated, successfully obtaining a method which allows us to classify an unknown sample depending on its years of ageing.

Many works have been published regarding the relationship between the consumption of antioxidants and the reduction of the incident of certain cardiovascular diseases and cancer [1,2]. The antioxidant activity present in wine is, to a great extent, due to the polyphenolic compounds which are present in it [3-6]. Such polyphenolic compounds are supplied not only from the raw material, the grape, but also from the wood during its ageing process, which is affected by several factors, such as the type of wood [7,8], or its toasting [9]. Due to this supply, the polyphenolic compounds increase progressively their concentration along this ageing process [10], due to which it would be predictable to be able to establish a direct correlation between the antioxidant capacity and the ageing time in wood. However, the concentration of polyphenolic compounds is affected not just by its ageing in wood, but depends on several factors, as the variety of grape which has been used [11] or on the elaboration process of each wine [12]. Due to this and to the fact that not all polyphenolic compounds contain the same antioxidant capacity [13] such antioxidant capacity will vary depending on different factors.

The evolution of low molecular weight polyphenols in oenological products of Jerez during its ageing stage has been studied by several authors: Moreno *et al.* [14] studied the evolution during one year in three different types of Sherry wine which had been aged by means of the dynamic system of *solera* and *criadera*, observing the differences among them; Tesfaye *et al.*, [15] studied

for two years the evolution of polyphenols in aged Sherry Vinegars, finding a considerable increase in the concentration of most of the compounds along the studied period of time.

On the other hand, many works have studied the evolution of the colour of wines during its ageing [10,16], using it in some cases as an indicative parameter of the age of the studied oenological product [17]. Within the studies on the colour of the Sherry wines, the one by Recamales *et al.* [18] for Amontillado Sherry wine, using colour as an indicative parameter of the wood in which the wine has been aged, is worth being mentioned.

In this Chapter, the evolution of colour, polyphenols, antioxidant capacity, and the relationship between polyphenols and antioxidant capacity in Brandy de Jerez and very old sherry wine were studied.

### 5.1 Brandy de Jerez

The experimental ageing system set up in the Jerez Centre of Viticulture and Enology for the analytical monitoring of brandy ageing consisted of 15 casks of 500 l capacity each. Twelve of the casks were used to age brandy according to the dynamic system of “Solera and Criaderas” traditionally used in the Denomination of Origin area, in groups of three casks for each ageing scale. The Solera scale, designated S, was the oldest; the First Criadera, the next oldest; the Second Criadera, the next; and the Third Criadera, the youngest. The other three casks held the same new distillate but for static ageing, according to the system of Añadas. All of the casks had previously contained sherry wine for at least 3 years, as established in the regulations for the manufacture of Brandy de Jerez.

The four scales contained distillate with a 40% v/v graduation. Programmed decantings every 3 months involved first drawing off one-fourth (125 l) of the total volume of brandy held in each of the casks of the oldest Solera scale. Then, a similar proportion of the volume held in the First Criadera casks was drawn off; these amounts (from the First Criadera casks) were then mixed together, divided into three parts, and used to refill the three Solera casks to their original volume. This procedure of partially refilling older casks with younger brandy drawn off the preceding scale is repeated for each of the ageing scales of the system. In the final decanting, the youngest scale



(the Third Criadera in this system) is replenished with new distillate from the distillery. The periodic partial extraction of brandy and consequent replenishing is known as “sacas y rocíos”. Sampling of each scale was carried out every 3 months, taking advantage of the operations of “sacas y rocíos”. Small sample volumes (20 ml) were obtained from the product after the mixing of the partial volumes drawn off the three casks belonging to the same scale, which thus constitutes a representative mean of the whole scale. A total of 76 samples were analysed during the 5 years of the study [19,20].

Fig. 1. shows the evolution of the antioxidant activity at successive numbers of “sacas y rocíos”. Points are experimental data, and lines were drawn using the moving average method. Young distillates showed no antioxidant activity; activity increases in line with time spent in contact with the wood. This is a logical finding because it is believed that the process of maturing in oak cask is characterised by the diffusion of compounds from within the wood. The profile of the antioxidant activity curve in the dynamic system is affected by several variables: the content of the cask in compounds that can be extracted from it; the dilution effect of mixing with younger distillates; the difference in the extractive power of the distillates (the lower the compound concentration, the greater the extractive power), and the different extraction kinetics of the various compounds. The initial rise in the antioxidant activity is produced by the predominance of the extraction phenomenon over the dilution effects produced by the addition of younger distillate.

This situation changes after a certain number of decantings, when it stabilises and then decreases slightly. From the comparison between scales, it is concluded that the highest antioxidant activity for decanting number beyond 10, when a clear divergence is observed, corresponds to the Solera, followed by the First Criadera and Second Criadera, with the Third Criadera having the lowest value. The explanation for this is that, in the dynamic ageing system, the Solera is the scale containing the brandy that has spent the most time in the ageing system and, therefore, has been able to extract the largest amounts of compounds from the casks. These data clearly indicate the exhaustion shown by the Third Criadera: when the decanting number increases above 10, antioxidant activity decreases progressively. This will therefore affect the antioxidant activity of the oldest scale (Solera). To maintain the levels of antioxidant compounds in the Solera scale, and in the final product, we suggest the replacement of the casks of the youngest Criadera with new casks. In the static ageing system (Añadas), the antioxidant activity

increases rapidly after decanting number 13, and beyond 15 it is higher than those of the Solera, the last stage in the dynamic system.

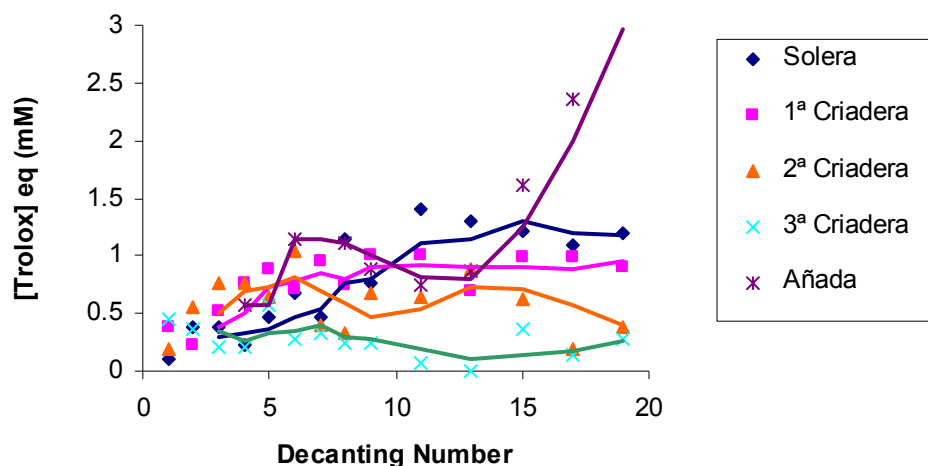


Figure 1: Evolution of the antioxidant activity in the experimental ageing system of sherry Brandy

Fig. 2 shows the evolution of total phenolic content, measured as Folin–Ciocalteu Index (FCI). It can be seen that the curves for dynamic and static systems are similar to those of antioxidant activity, so the relationship between these two variables was studied.

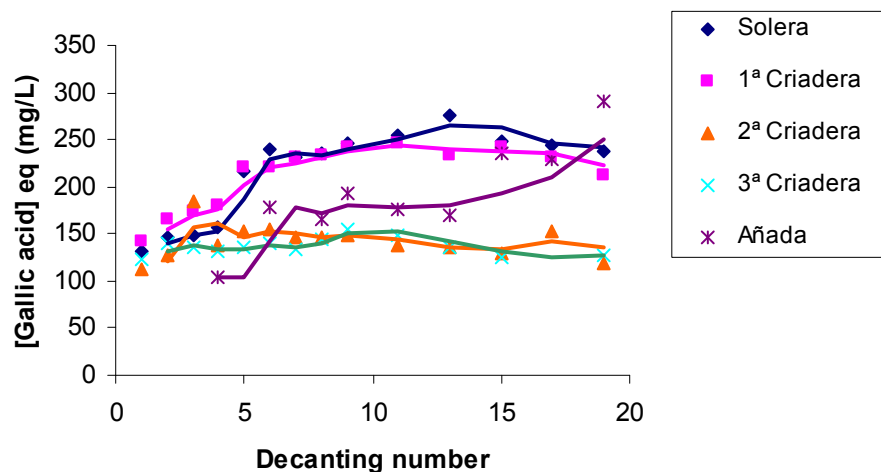
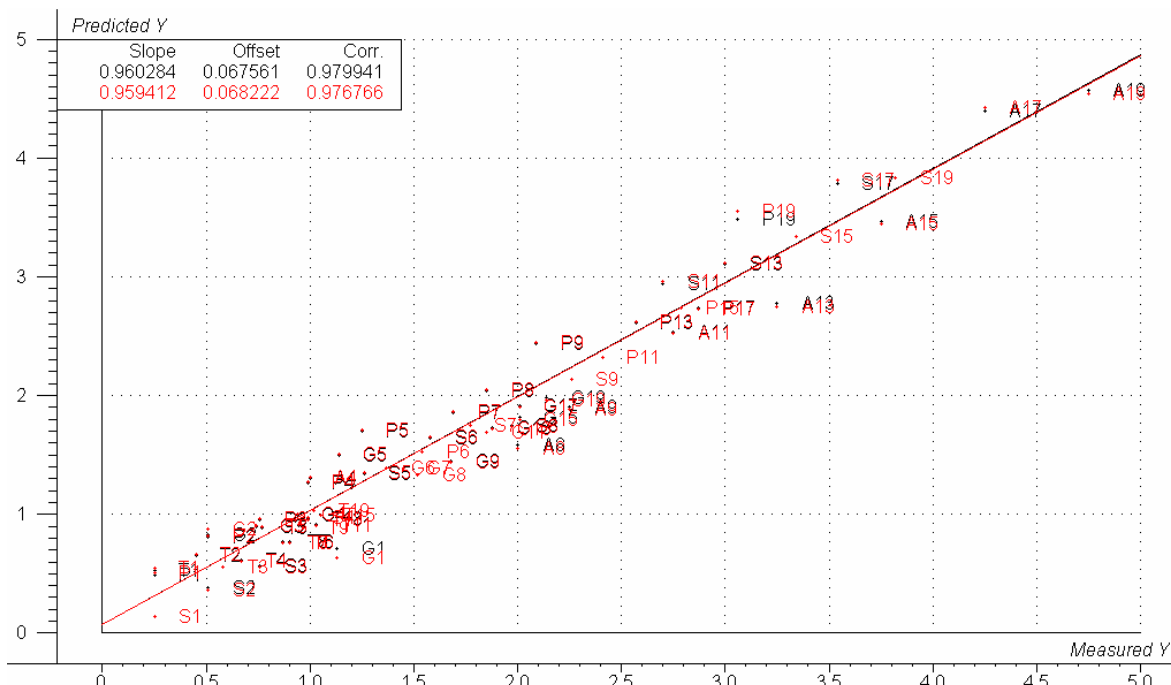


Figure 2: Evolution of Folin-Ciocalteu Index in the experimental ageing system of sherry Brandy

The regression models for Solera and Añada samples give coefficients of 0.71 and 0.79 respectively, confirming the role of the phenolic compounds in the antioxidant activity of aged distillates.

To apply the regression model (Partial least squares: PLS), all of the variables (antioxidant activity, polyphenolic content and chromatic parameters) were processed; the results obtained is shown in Figure 3, obtaining a very good regression model.



**Figure 3.** Regression line drawn against the prediction obtained in the calibration model using PLS.

## 5.2 Sherry wine

The analysed samples are considered to be very valuable, as some of them are part of very scarce and very old samples, which have been aged by means of a static system of *añadas* from 1935-1999.

The compounds which are present in a higher concentration in the most aged samples are furanic aldehydes (hydroxymethylfurfural and furfural), protocatechuic acid, tyrosol, p-coumaric acid, and syringic aldehyde. Furanic aldehydes, especially, hydroxymethylfurfural, are the main compounds of the different oenological products of the area of Jerez, in wines [14], brandies [21] and also in vinegars [15]. The presence of this furanic compounds is due to two main facts: the addition of caramel [22] or the ageing in wood [23]. As the analysed samples do not contain any rectification of colour by the addition of caramel, the presence of the furfural aldehydes in our samples will be due to the ageing process in wood.

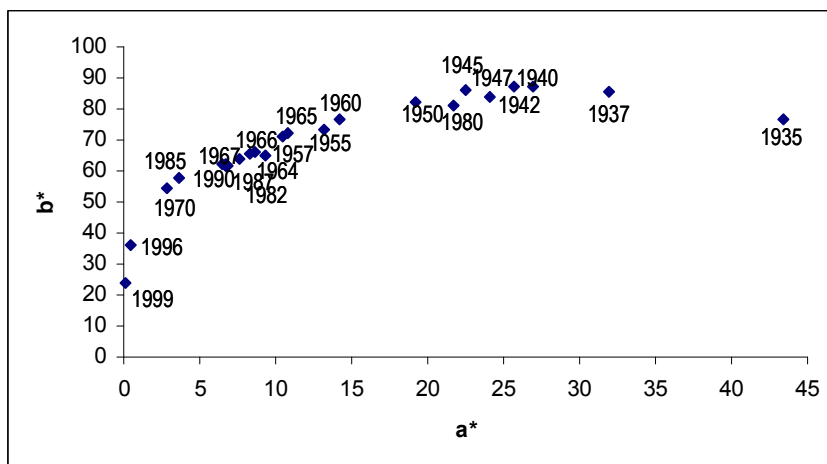
The index of total polyphenols and the antioxidant capacity were measured for all samples, finding a good correlation  $r^2 = 0,8181$  which confirms, as a result, the high influence of the polyphenols with the antioxidant capacity. However, as some other authors have pointed out [13], not all polyphenols have the same influence in the antioxidant capacity. As a result, we considered it to be interesting to study the individual correlation of the studied polyphenols with the antioxidant capacity of the samples. Table 1 contains the result of this study (we omitted the furanic aldehydes due to their low correlation with the antioxidant capacity). Just as can be seen on that table, compounds protocatechuic acid, protocatechualdehyde, syringic acid, vanillin, and *p*-coumaric acid were the ones showing higher correlations ( $r^2 > 0.7$ ). These results prove to correspond to the ones stated by Alonso *et al.* [13], who also obtained a good correlation for these same compounds (except for the protocatechualdehyde) in Sherry vinegars which had been aged with wood.

Compounds	R <sup>2</sup>
Protocatechuic acid	0.854
Protocatechualdehyde	0.804
<i>p</i> OHbenzoic acid	0.645
Tyrosol	0.649
Vanillic acid	0.645
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	0.645
Syringic acid	0.821
Vanillin	0.701
<i>p</i> -coumaric acid	0.775
Syringaldehyde	0.556

**Table 1:** Individual correlation of the polyphenols with the antioxidant capacity

We can state that, regarding the antioxidant capacity related to the ageing years, there is an increasing evolution as the samples belongs to an oldest harvest year, being clearer from year 1950 onwards, that is to say, when the samples are really old ones. Besides, we can see that the most aged samples present an extraordinary antioxidant capacity, and taking into account that the studied wines are produced from white grapes, whose polyphenolic content and antioxidant capacity is lower than that of the black grape, we can assume that the high antioxidant capacity of these samples is due to the polyphenols provided during the long ageing process in wood, being thus able to clearly relate the antioxidant capacity with the ageing in wood.

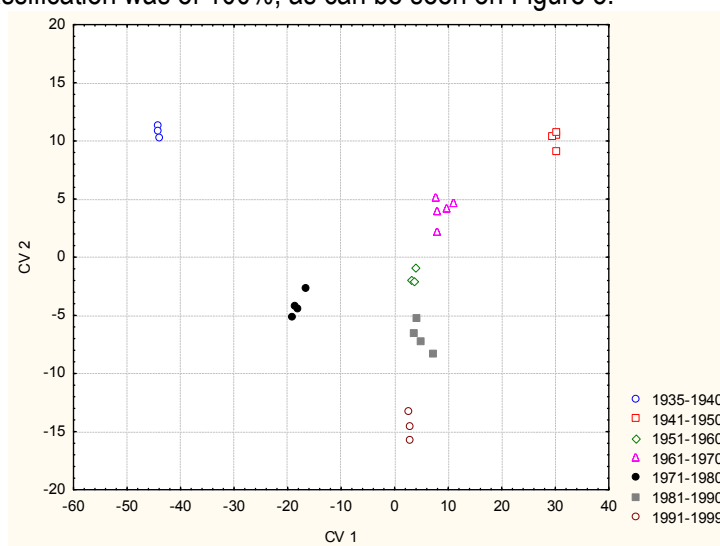
As regards colour, in Figure 4, we can see the projection of variables CIELab  $a^*$  as compared to  $b^*$ , observing that there is a certain order according to the age of the samples.



**Figure 4:** Projection of the chromatic variables  $a^*$ -  $b^*$

According to the ageing years, the samples were grouped in seven different groups, classified according to the decade in which the samples were aged. A statistical analysis of the studied samples was carried out. In the first place, the possibility of differentiating the pre-established groups based on these compounds was studied by means of the variance analysis. All of the sample groups showed statistically significant differences.

In order to obtain the classification equations which would allow to contain an unknown sample in one of the aforementioned groups according to its average ageing time, we carried out a discriminating linear analysis. From among the participating variables, the most discriminating ones were: total phenolic content, syringaldehyde, antioxidant activity, *p*-hydroxybenzoic, HMF. The achieved classification was of 100%, as can be seen on Figure 5.



**Figure 5:** Linear Discriminant Analysis. Projection of the cases on the canonical plane

## References

- [1] Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Teissedre, P.L.. *J. Agric Food Chem* 1995, 43, 890.
- [2] Satue-Gracia, M. T., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventos, R.M., Frankel E.N *J Agric Food Chem.* 1999, 47, 2198.
- [3] de Quirós, A.R.-B., Lage-Yusty, M.A., López-Hernández, M., *J. Food Research International.* 2009, 42, 1018.
- [4] Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., Câmara, J.S. *Food Chem.* 2007, 105, 204.
- [5] Fernández-Pachón, M.S., Villaño, D., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C., *Anal. Chim. Acta.* 2006, 563, 101.
- [6] Alonso, Á.M., Guillén, D.A., Barroso, C.G., Puertas, B., García, A., *J Agric Food Chem* 2002, 50, 5832.
- [7] Hernández, T., Estrella, I., Dueñas, M., De Simón, B.F., Cadahía, E., *Europ. Food Research and Technolog.* 2007, 224, 695.
- [8] Frangipane, M.T., Santis, D.D., Ceccarelli, A., *Food Chem.* 2007, 103, 46.
- [9] Cadahía, E., Muñoz, L., De Simón, B.F., García-Vallejo, M.C. *J Agric Food Chem*, 2001, 49 (4), 1790.
- [10] Del Alamo Sanza, M., Escudero, J.A.F., De Castro Torío, R. *Food Sci. Tech. Int.* 2004, 10, 233.
- [11] Bosso, A., Guaita, M., Panero, L., Borsa, D., Follis, R. *Am. J. Enol. Vitic.*, 2009, 60, 379.
- [12] Ortega, T., De La Hera, E., Carretero, M.E., Gómez-Serranillos, P., Naval, M.V., Villar, A.M., Prodanov, M., Vacas, V.b, Arroyo, T., Hernández, T., Estrella, I., *European Food Research and Technology.* 2008, 227, 1641.
- [13] Alonso, Á.M., Castro R., Rodríguez M.C., Guillén, D.A., Barroso, C.G., *Food research international*, 2004, 37, 715.
- [14] García Moreno M.V, García Barroso C., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 7556.
- [15] Tesfaye, W., Morales, M.L., García-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M., *J Agric Food Chem.* 2002, 50, 7053.
- [16] Garcia-Puente Rivas E., Alcalde-Eon C., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C., Escribano-Bailon M.T., *Anal. Chim. Acta*, 2006, 563, 215.
- [17] Del Álamo, M., Nevares, I., Gallego, L., Martín, C., Merino, S., *Anal. Chim. Acta.* 2008, 621, 86.
- [18] Recamales, A.F., Hernanz, D., Álvarez, C., González-Miret, M.L., Heredia, F. J. *European Food Research and Technology*, 2007, 224, 321.
- [19] Rodríguez M.C., Guillén D., Schwarz M., Barroso C.G. *J Agric Food Chem.* 2010 58 (2), 990-997.
- [20] Schwarz, M., Rodríguez, M.C., Martínez, C., Bosquet, V., Guillén, D.A., Barroso, C.G. *Food Chem.* 2009, 116, 29.
- [21] Schwarz, M., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Barroso, C.G., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 1782.
- [22] Quesada Granados, J., Villalón Mir, M., López, G., Serrana, H., López Martínez, M.C., *Food Chem.* 1996, 56, 415.
- [23] Rodríguez-Bencomo, J.J., Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., González-Huerta, C., González-San José, *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 5102.

## 6. Application of High- Speed Countercurrent Chromatography for the Isolation of Polyphenols from sherry wine

Due to the particular elaboration of the Sherry wines, they present a very complex matrix. Due to this, we tried to identify new compounds which had not yet been studied by means of new techniques. The two wines which were finally analysed were: Amontillado Sherry wine coming from scale Solera and a sweet Pedro Ximénez Sherry wine also from that scale.

Amontillado Sherry wine, a generous wine of the area of Jerez, lies between Fino and Oloroso wines according to its elaboration. It begins with a biological ageing, just as happens with Fino Sherry, to then, let the yeast die, allowing the wine to oxidise, acquiring its characteristic colour, undergoing as well an oxidising ageing. These two types of ageing, together with the traditional ageing system of *soleras* and *criaderas*, will endow the wine with the series of organoleptic characteristics which have become a hallmark of its identity. The studies on the polyphenolic content of this wine are still scarce, though we can find in the bibliography some works. García *et al.* [1] studied a Solera of Amontillado, analysing the differences with Oloroso and Fino, identifying up to a total of 17 low molecular weight polyphenols. Estrella *et al.* [2] carried out a similar study, also identifying a similar number of compounds. Other analyses, as the study on volatile compounds [3], or the study on its chromatic parameters [4], have also been conducted for Amontillado Sherry wine.

As regards Pedro Ximénez, it presents an added difficulty, as its high sugar content makes its matrix to be much more complex. Due to this complexity, it is a highly interesting wine. From among the Sherry wines, it is the one with the highest antioxidant capacity. As regards the studies which have been conducted regarding this wine, we must point out the one by Serratosa *et al.* [5], where they extract the polyphenolic content of a Pedro Ximénez must, passing it through a C18 cartridge, to thus identify a total of 10 polyphenolic compounds, which include benzoic acids, cinnamic derivatives, and flavonols. Peinado *et al.* [6] studied the antioxidant capacity of different polyphenolic fractions of a PX must which had been achieved by means of extraction in solid stage. Márquez *et al.* [7] studied the content in volatile compounds in sweet wines from Andalusia, a group which contained Pedro Ximénez.

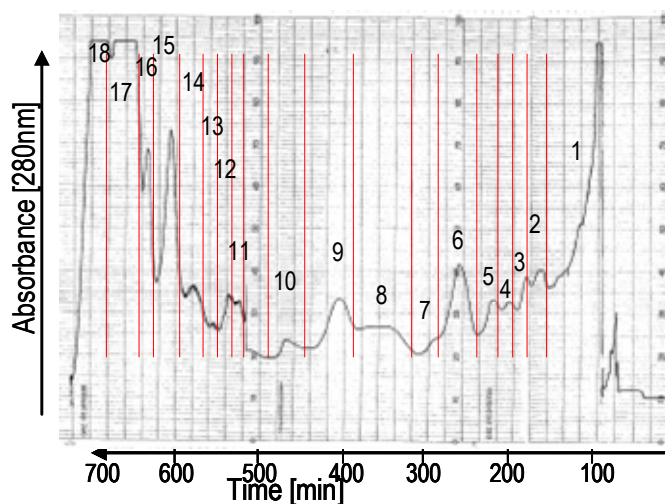
Counter current chromatography is a chromatographic liquid-liquid technique which is widely used for the preparative isolation of natural products due to its soft separation conditions and its high performance for the extraction of highly pure compounds [8-11]. Besides, it has been used in many cases for the isolation and identification of polyphenolic compounds in wines. [12-15]

The objective of this chapter is the fractioning of the two afore mentioned wines by means of HSCCC in order to obtain simpler fractions which allow us to identify a larger number of polyphenolic compounds, being thus able to isolate some of them. Besides, the antioxidant activity of the obtained fractions will be evaluated. 14 litres of Amontillado wine and 6L of Pedro Ximénez wine diluted with water (1:4) were loaded onto an Amberlite column [Amberlite XAD7 (Fluka) 1kg, column dimensions: 100cmx 7cm] to eliminate protein, organic acids, residual sugars, and ions. The flow rate was 1 drop/s. The Amberlite column was conditioned with 2L of methanol and then 2L of water. The diluted sample was loaded and cleaned with 3L of water and then, eluted with 2L of mixture (methanol/acetic acid: 19:1). The extract was concentrated with a rotary evaporator under vacuum. This extract was fractionated with a CCC-100 high-speed countercurrent chromatograph equipped with three coils connected in series.

For the fractioning of the Amontillado wine, three different systems of solvents were used:

- MTBE/n-butanol/Acetonitrile/water (1,1/3/1,1/5+0,1%TFA)
- Hexano/Ethyl Acetate/Etanol/water (1/5/1/5)
- MTBE/ n-Butanol/ Acetonitrile/ water (2/2/15)

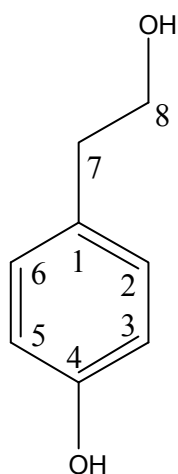
Figure 1 shows the excellent fractioning which was achieved through the third system, obtaining a total amount of 18 fractions.



**Figure 1:** XAD7 Extract Amontillado chromatogram obtained by HSCCC with the third system

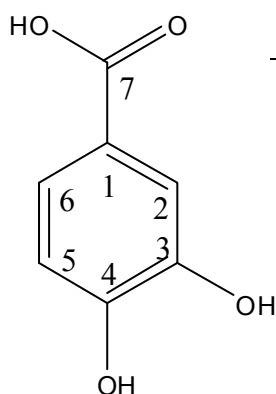


With these three systems, it was possible to identify 26 compounds by means of HPLC-DAD-MS. It was possible to isolate two compounds, purifying them by means of semi-preparative HPLC and eluting its subsequent chemical structure by means of NMR, the two isolated compounds were protocatechuic acid and tyrosol. (Table 1 and 2 respectively)



Position	<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>13</sup> C (ppm)	DEPT
1	-	131	q
2	6,8 d (J=8,5 Hz)	130	CH
3	6,5 d (J=8,5 Hz)	116	CH
4	-	156	q
5	6,5 d (J=8,5 Hz)	116	CH
6	6,8 d (J=8,5 Hz)	130	CH
7	2,6 t (J= 7,2 Hz)	40	CH <sub>2</sub>
8	3,5 t (J=7,2 Hz)	65	CH <sub>2</sub>

Table 1: NMR Results of Tyrosol

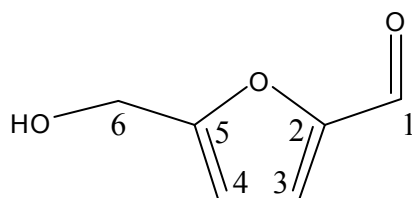


Position	<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>13</sup> C (ppm)	DEPT
1	-	123,9	q
2	7,3 m	115	CH
3	-	146	q
4	-	151	q
5	6,7 m	117	CH
6	7,3 m	123,1	CH
7	-	170	q

Table 2: NMR Results of protocatechuic acid

For the fractioning of Pedro Ximénez wine, besides the aforementioned XAD7 extract, an XAD2 extract, obtained in the same way as the XAD7, was used. Both were fractioned by means of the

following system of solvents: MTBE/n-butanol/Acetonitrile/water (1,1/3/1,1/5+0,1%TFA). It was possible to identify a total of 23 compounds, isolating one of them: hydroxymethylfurfural (Table3).



Position	<sup>1</sup> H (ppm)	<sup>13</sup> C (ppm)	DEPT
1	9,4 s	179	CH
2	-	154	q
3	7,3 d (J=3,6 Hz)	125	CH
4	6,5 d (J=3,6 Hz)	111	CH
5	-	163	q
6	4,4 s	57,6	CH <sub>2</sub>

**Table 3:** NMR Results of hydroxymethylfurfural

## References

- [1] García Moreno M.V, García Barroso C., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 7556.
- [2] Estrella, M.I., Hernández, M.T., Olano, A. *Food Chem.* 1986, 20, 137.
- [3] Zea, L., Moyano, L., Medina, M. *Europ. Food Res. and Techn.* 2008, 227,1687.
- [4] Recamales, A.F., Hernanz, D., Álvarez, C., González-Miret, M.L., Heredia, F.J. *Europ. Food Res. and Techn.* 2007, 224, 321.
- [5] Serratosa, M.P., Lopez-Toledano, A., Merida, J., Medina, M. *J Agric Food Chem* 56, 2810.
- [6] Peinado, J., Lopez de Lerma, N., Moreno, J., Peinado, R.A. *Food Chem.* 2009, 114, 1050.
- [7] Márquez, R., Castro, R., Natera, R., García-Barroso, C. *Europ. Food Res. and Techn.* 2008, 226,1479.
- [8] Hillebrand S., Schwarz M., Winterhalter P. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7331.
- [9] Eichhorn S., Winterhalter P. *Food Res. International*, 2005, 38, 943.
- [10] Hillebrand, S., Montilla, E.C., Köhler, N., Winterhalter, P. *Agro Food Industry Hi-Tech* 2009, 20, 52.
- [11] Qiu F., Luo J., Yao S., Ma L., Kong L. *J. of Sep. Sci.*, 2009, 32, 2146.
- [12] Salas E., Duenas M., Schwarz M., Winterhalter P., Cheynier V., Fulcrand H. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 4536.
- [13] Degenhardt A., Hofmann S., Knapp H., Winterhalter P. *J Agric Food Chem*, 2000, 48, 5812.
- [14] Noguer M., Cerezo A.B., Rentzsch M., Winterhalter P., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. *J Agric Food Chem*, 2008, 56, 8879.
- [15] Baderschneider B., Winterhalter P. *J Agric Food Chem*, 2001, 49, 2788

## 7. CONCLUSIONS

1) A rapid, simple and reproducible UPLC method was developed for the analysis of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez.

The method has been demonstrated to perform well with regard to limits of detection and quantification, linearity, sensitivity, accuracy, and precision.

Compared with HPLC, the developed UPLC method offers higher sensitivity, precision, and speed of analysis for the simultaneous determination of polyphenols in Brandy, which suggests that UPLC is a powerful tool for the analysis of components related to quality in Brandy. Using the UPLC system enables the analysis to be performed in one tenth of the time required for the conventional system.

2) The analytical characterisation of a system of soleras and criaderas for Brandy de Jerez in a period of two years has been carried out. Because the process of ageing is one of the most important stages in the elaboration of Brandy de Jerez, and since it is the stage during which its special characteristics are to a large extent acquired, the characterisation of different analytical parameters and their monitoring for a period of two years of ageing in a solera system must be considered to be extremely valuable. It has been demonstrated that the studied parameters, polyphenols, chromatic parameters, and organic acids are important discriminating variables for the purpose of classifying brandies in function of their true age.

3) An accelerated ageing method for brandy in a laboratory has been optimised with wood shavings previously steeped in wine. The chromatic parameters, the index of total polyphenols and the quantification of polyphenols have been studied and compared to the rest of samples which had been aged by the traditional method. Besides, the samples have been analysed from the sensorial point of view by a previously trained tasting panel. Within a month, a brandy of similar organoleptic characteristics as those of a traditionally aged brandy during 2 years in casks has been achieved.

4) Until now, the largest amount of grapes obtained for the elaboration of Brandy de Jerez came from Castile la Mancha. Currently, many wineries are interested in achieving a variety which can be grown in the area of Jerez, thus being eligible for a Designation of Origin. With this purpose,

10 distillates from different varieties of grapes, all of them grown in the area of Jerez, were subjected to ageing during one month by the previously optimised method shown in chapter 3. The samples underwent analytical and sensorial analyses. Varieties Jaén blanco and Moscatel, were the ones which showed a higher potential to be used with this purpose.

5) The evolution of the antioxidant capacity, of the polyphenolic content and of chromatic parameters was studied on a set of samples of Sherry wines which had been aged through the static system, comprising harvest years between 1935-1999. Based on the obtained results, we can conclude that the antioxidant capacity is a parameter which is clearly related to the ageing in wood of the samples and to the polyphenols provided by the wood during such stage. Within the studied polyphenols, the ones which obtained a better correlation with the antioxidant capacity were protocatechuic acid, protocatechialdehyde, and siringic acid. The samples also showed differences in the chromatic parameters according to the number of ageing year years. Besides, a statistical model was achieved through LDA to allow us to classify unknown samples according to their ageing time. The obtained classification among the different groups was 100%.

6) Two Sherry wines, Amontillado and Pedro Ximénez, have been characterised by means of HSCCC. In the Amontillado, 26 polyphenols have been characterised, and two of them have been isolated, protocatechuic acid and tyrosol. In the Pedro Ximénez wine, 23 compounds have been identified, being one of them isolated, hydroxymethylfurfural. We can then confirm that HSCCC is a perfect technique for the identification and isolation of compounds in complex matrices as in this case, being an excellent tool in the future to be able to isolate new compounds in the Sherry wine



## **10. ARTICULOS DERIVADOS DE LA TESIS**



Mónica Schwarz  
M. Carmen Rodríguez  
Dominico A. Guillén  
Carmelo G. Barroso

Centro Andaluz de  
Investigaciones Vitivinícolas,  
Universidad de Cádiz, Campus  
Rio San Pedro, Puerto Real, Cádiz,  
Spain

## Original Paper

# Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in *Brandy de Jerez*

Brandy and other aged distillates are a rich source of polyphenols. For brandies, contact with wood during ageing makes an important contribution to their polyphenols content. This paper describes the use of a previously devised ultra performance LC (UPLC) method to study the polyphenols content of *Brandy de Jerez*. UPLC is a new technique in LC offering several potential advantages, especially the reduction of time. Analyses of brandy performed by HPLC were repeated by UPLC. A special UPLC analytical column (Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column, 100 × 2.1 mm), with a particle size of 1.7 μm, forms part of this system. Using the UPLC system enabled the time needed for analysis to be reduced to one tenth of the time needed in the conventional HPLC system. In conclusion, the separation factor results of the UPLC were compared to those obtained using HPLC methods; this demonstrated that simple, high efficiency UPLC gradients are viable and advantageous substitutes for traditional analysis of polyphenols in brandy by HPLC. The method enabled 14 phenolic compounds to be identified and determined in 33 different commercial brandies, and this allowed them to be differentiated in function of quality.

**Keywords:** *Brandy de Jerez* / Furanic derivatives / High performance liquid chromatography / Phenolic compounds / Ultra performance liquid chromatography

Received: December 4, 2008; revised: March 9, 2009; accepted: March 11, 2009

DOI 10.1002/jssc.200800706

## 1 Introduction

*Brandy de Jerez* is aged in wooden casks following the traditional dynamic system (*Soleras and Criaderas*), and sometimes the static system (*Añadas*) is also applied. During the ageing period, slow physicochemical changes involving both the brandy and the wood of the cask take place [1–4]. As a result of some of these reactions, the polyphenolic content of brandy increases considerably during ageing [2, 5]. One of the differentiating characteristics of *Brandy de Jerez* is that the casks in which it is aged have previously contained Sherry wine of one or other type: *fino*, *oloroso*, *Pedro Ximénez*, etc. This process is known as the “winning” of the casks, and it constitutes another route whereby polyphenols are incorporated into *Brandy de Jerez*. The role of polyphenolic compounds in creating the flavour and aroma of the brandy has been fully and clearly proven by many authors [6, 7].

Because of the increase in counterfeit products and consumer demands for protection, food industry profes-

sionals need to be able to guarantee the authenticity of their products. Consequently, the characterisation of *Brandy de Jerez* has acquired considerable commercial interest because this makes it possible to differentiate a particular product analytically from all other similar products on the market, thus protecting its authenticity [8].

Furthermore, it is now widely accepted that antioxidants play a crucial role in the prevention of many diseases, thanks to their capacity for capturing, de-activating or repairing the damage caused by the free radicals that are implicated in various diseases. These protective health effects derived from the consumption of several foods and drinks have been attributed to their content in polyphenols [9, 10]. Thus, from a nutritional standpoint, analysis of polyphenols in brandy also has significance.

For all these reasons, the analysis of polyphenols in *Brandy de Jerez* is becoming increasingly important.

Several methods have been described for the determination of phenolic compounds. Panosyan *et al.* have suggested a new method using HPCE [11]. Upto now, HPLC has been the main tool for the analysis of polyphenols in spirits [12–14].

UPLC is based on available RP chromatographic media with a 1.7 μm particle size, together with a liquid system

**Correspondence:** Dr. Dominico A. Guillén, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Cádiz, República Saharui s/n, 11510-Puerto Real, Cádiz, Spain  
**E-mail:** dominico.guillen@uca.es  
**Fax:** +34-956-016460



that can operate such columns at much higher pressures [15–19]. In comparison with the conventional HPLC method, UPLC offers many advantages including reduced run-time and less solvent consumption [20–23].

In this paper, a rapid and reproducible UPLC method was developed for the simultaneous determination of significant polyphenols and furanic derivatives in brandy. The phenolic compounds determined are gallic acid, protocatechuic acid, protocatechualdehyde, *p*-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, syringic acid, vanillin, *p*-coumaric acid and syringaldehyde) and the furanic derivatives are 5-hydroxymethylfurfural, furfural and methylfurfural. The UPLC method was developed on the basis of the HPLC method [14].

## 2 Experimental

### 2.1 Chemicals and reagents

HPLC-grade ACN and methanol from Panreac (Barcelona, Spain) and acetic acid from Merck (Darmstadt, Germany) were used for HPLC and UPLC analysis. De-ionised water was purified using a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). The reference standards were from Fluka (Buchs, Switzerland), Merck (Darmstadt, Germany), and Sigma (St. Louis, MO, USA). The working standard solutions for linear calibration were dissolved in a brandy-like model solution, prepared with ethanol (Panreac) (40% v/v) and purified water. Seven different calibration levels were prepared and each injection was performed in triplicate.

### 2.2 Samples

We studied three types of *Brandy de Jerez*: *Solera* (S, aged in oak casks for a minimum of 6 months), *Solera Reserva* (SR, aged for a minimum of 1 year) and *Solera Gran Reserva* (SGR, aged for a minimum of 3 years). These brandy samples were supplied by the “Consejo Regulador de la Denominación Específica Brandy de Jerez”.

### 2.3 HPLC analysis

The various HPLC analyses were performed using a Waters (Milford, MA, USA) system consisting of a model 616 pump, a 510 pump, a model 717 autosampler, and a model 996 photo-diode array detector. The separation of the polyphenols was conducted in a LiChrospher RP-C<sub>18</sub> column (Merck) 250 × 4 mm/ID with particle size of 5 μm. The chromatographic conditions for the brandies were: 1 mL/min flow rate; 50 μL injection volume; and eluents: A (5% methanol, 2% acetic acid, 93% water) and B (90% methanol, 2% acetic acid, 8% water). The gradient was as follows: 0 min 100% A, 20 min 90% A (curve 7),

60 min 25% A (curve 6). The column was re-equilibrated before the next injection. Prior to their injection in the HPLC, the samples were filtered through a membrane of 22 μm pore size (Millipore).

### 2.4 UPLC analysis

These analyses were performed on Waters Acquity UPLC system coupled with a photodiode array detection method. An Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (100 × 2.1 mm/ID, with 1.7 μm particle size), also from Waters, was used. The column temperature was maintained at 47°C. The binary system phases were: A (3% ACN, 2% acetic acid, 95% water) and B (85% ACN, 2% acetic acid, 13% water), with a flow rate of 0.7 mL/min, giving a maximum back pressure of 10 400 psi, which is within the capabilities of the UPLC. The injection volume was 2.5 μL. The 6.5 min gradient was as follows: 0 min, 100% A, 3 min, 90% A (curve 6), 4 min, 90% A, 6.5 min, 25% A (curve 6). Finally, the column was washed with 100% B for 3 min and equilibrated with 100% A for 3 min. All the samples were filtered through 0.22 μm nylon filters from Scharlab (Barcelona, Spain).

The identification of each compound was carried out by comparing retention times and UV–Vis spectra of the peaks in wine with those previously obtained by the injection of standards.

### 2.5 Data treatment

For each compound, one-way ANOVA was initially used to determine significant differences between the three groups of samples. Principal component analysis was employed to study differentiation on the basis of ageing of the three qualities of brandy. Finally, a linear discriminant analysis (LDA) was performed to obtain the equations that would enable a particular sample to be classified to one of the three commercial groups studied. The Statistica 7.0 program (Tulsa, Oklahoma, USA) was used for all these analyses.

## 3 Results and discussion

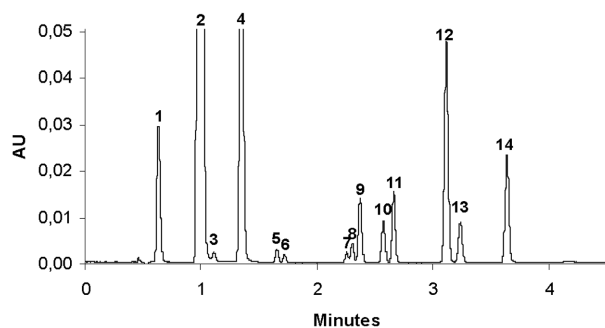
### 3.1 Optimisation of UPLC conditions

In these studies, two different C<sub>18</sub> columns, both from Waters, were tested. One was an Acquity UPLC BEH 50 × 2.1 mm, with 1.7 μm particle size, and the other an Acquity UPLC BEH 100 × 2.1 mm with 1.7 μm particle size. The shorter column (50 mm in length) proved insufficient to obtain a good chromatographic separation. Therefore, the column of 100 mm length was chosen.

In order to improve the resolution obtained, an alternative method was tested using ACN instead of methanol as an organic modifier of the mobile phase. The results

**Table 1.** Chromatography parameters for HPLC and UPLC.

Compounds	Standard solution (mg/L)	$t_R$		$K$		$\alpha$		$R_s$	
		UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC
Gallic acid	1.851	0.637	6.10	0.498	1.85	–	–	–	–
5-Hydroxymethylfurfural	11.78	1.000	8.90	1.353	2.30	2.715	1.658	9.1	2.6
Protocatechuic acid	0.187	1.120	11.91	1.636	3.81	1.201	1.426	1.9	3.1
Furfural	1.663	1.359	15.64	2.198	5.44	1.343	1.371	6.8	4.9
Protocatechualdehyde	0.086	1.668	16.95	2.924	7.45	1.330	1.094	8.8	1.9
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.164	1.736	20.31	3.084	8.16	1.054	1.222	2.2	5.3
Caffeic acid	0.101	2.273	31.00	4.348	15.76	1.409	1.041	15.3	2.1
Vanillic acid	0.302	2.321	29.84	4.461	15.13	1.026	1.144	1.4	7.8
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	0.147	2.389	26.31	4.621	13.22	1.035	1.325	2.7	13.3
Methylfurfural	0.205	2.591	32.02	5.096	16.31	1.102	1.034	5.7	1.8
Syringic acid	0.705	2.678	37.50	5.300	19.27	1.040	1.181	2.4	10.9
Vanillin	1.774	3.134	38.75	6.374	19.95	1.202	1.035	11.4	2.7
<i>p</i> -Coumaric acid	0.288	3.253	46.16	6.655	23.95	1.044	1.025	2.9	4.4
Syringaldehyde	1.774	3.655	45.04	7.601	23.35	1.1421	1.171	10.1	13.9



**Figure 1.** UPLC chromatogram of mixed standards. Detection wavelength was set at 280 nm. 1: Gallic acid, 2: 5-hydroxymethylfurfural, 3: protocatechuic acid, 4: furfural, 5: protocatechualdehyde, 6: *p*-hydroxybenzoic acid, 7: caffeic acid, 8: vanillic acid, 9: *p*-hydroxybenzaldehyde, 10: methylfurfural, 11: syringic acid, 12: vanillin, 13: *p*-coumaric acid, and 14: syringaldehyde.

show that elution with ACN is beneficial for the separation. In the chromatogram obtained with ACN, more resolved peaks can be found, and there is better separation of the compounds studied; hence ACN was selected for the separation.

For the optimisation of the elution gradient, the starting point was the method previously developed by the group [14] with the aid of Acquity UPLC performance calculation software from Waters. It was necessary to make minor changes to the gradient, as well as to the temperature of the column, to improve the separation and get a higher resolution. Several different temperatures in the range from 25 to 50°C were assayed, and the best separation for the 14 compounds studied was obtained at 47°C. (Fig. 1)

The retention time ( $t_R$ ), retention factor ( $k$ ), and separation factor ( $\alpha$ ) for each of the species under UPLC and HPLC method are presented in Table 1. In general terms,

both methods presented a good resolution and separation factor.

Peak capacity is a performance measure mainly used for gradients separations. Different definitions of peak capacity have been suggested for gradient separation [24, 25]. In the current work, peak capacity was calculated by the following equation

$$n = 1 + 1 t_g / w_b \quad (1)$$

where  $n$  is the number of peaks,  $t_g$  the gradient time and  $w_b$  is the mean peak width at the baseline value. Results revealed a better peak capacity for UPLC than for HPLC, with 118 and 95, respectively.

Matrix effects were assessed by the addition of reference standards in the same concentration as the calibration curve in a brandy sample. Results showed no matrix effect.

### 3.2 Validation of the method developed

Validation of the analytical methods was based on the following parameters: detection and quantification limits, analytical sensitivity, precision and accuracy.

Analytical sensitivity (AS), detection and quantification limits (LOD and LOQ, respectively) were calculated using an ALAMIN program [26–28].

These parameters were calculated for each analyte from standard solutions used to obtain the corresponding calibration curves, using the UPLC method developed (Table 2).

The precision of this method was evaluated as the SD of replicated measurements of one sample of brandy. Both intra- and inter-day repeatability of the analytical method were assessed on two parameters: retention time and peak area repeatability. For the intra-day variability test, the brandy sample was analysed with five replicates

**Table 2.** Calibration data of 14 investigated polyphenols

Compounds	Detection wavelength (nm)	Test range (mg/L)	Regression equation	R <sup>2</sup>	AS	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Gallic acid	271	0.018–18.57	Y = 6427.8x + 1024.5	0.999	0.163	0.178	0.574
5-Hydroxymethylfurfural	283.5	1.178–117.81	Y = 18541x + 6435.9	0.999	0.592	0.399	1.391
Protocatechuic acid	280	0.093–3.74	Y = 3830x + 3.725	0.998	0.071	0.049	0.164
Furfural	276.5	0.131–13.17	Y = 0723x + 1036.4	0.999	0.105	0.094	0.313
Protocatechualdehyde	280	0.043–0.86	Y = 10855x + 50.47	0.999	0.016	0.011	0.033
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	255	0.082–1.64	Y = 15546x + 42.256	1.000	0.009	0.009	0.031
Caffeic acid	324	0.051–1.08	Y = 12984x + 113.21	0.998	0.015	0.011	0.049
Vanillic acid	261	0.15–3.02	Y = 10272x + 136.2	0.999	0.019	0.017	0.057
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	283.5	0.029–2.95	Y = 6907x + 429.41	0.999	0.021	0.019	0.062
Methylfurfural	292	0.10–1.64	Y = 20651x + 283.79	0.999	0.012	0.012	0.041
Syringic acid	274.3	0.07–7.05	Y = 7527.6x + 129.72	0.999	0.031	0.049	0.166
Vanillin	310	0.17–17.19	Y = 9137x + 457.79	0.999	0.076	0.056	0.189
<i>p</i> -Coumaric acid	310	0.02–2.88	Y = 18733x + 140.82	0.999	0.019	0.017	0.058
Syringaldehyde	308	0.177–17.74	Y = 9954.3x + 523.83	0.999	0.071	0.067	0.225

**Table 3.** Retention time ( $t_R$ ) repeatability, area repeatability and recovery of 14 investigated polyphenols

Compounds	Intra-day $n = 5$		Inter-day $n = 15$		Recovery Mean <sup>a)</sup> ± SD
	$t_R \pm SD$	Area ± SD	$t_R \pm SD$	Area ± SD	
Gallic acid	0.637 ± 0.001	4852 ± 136.99	0.631 ± 0.003	4826 ± 300.98	97.31 ± 0.01
5-Hydroxymethylfurfural	0.996 ± 0.001	71321 ± 3426.1	0.981 ± 0.004	71245 ± 2877.1	98.99 ± 0.004
Protocatechuic acid	1.120 ± 0.002	2171 ± 95.89	1.105 ± 0.006	2161 ± 108.1	103.18 ± 2.51
Furfural	1.354 ± 0.002	14507 ± 236.04	1.336 ± 0.003	13962 ± 461.5	97.86 ± 0.205
Protocatechualdehyde	1.668 ± 0.001	1675 ± 83.8	1.657 ± 0.015	1601 ± 79.3	97.87 ± 1.022
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	1.736 ± 0.004	948 ± 28.28	1.727 ± 0.014	1009 ± 62.3	95.31 ± 1.004
Caffeic acid	2.277 ± 0.005	1576 ± 106.3	2.261 ± 0.013	1640 ± 114.1	98.39 ± 0.015
Vanillic acid	2.321 ± 0.005	2236 ± 113.1	2.311 ± 0.013	2257 ± 108.5	98.31 ± 0.008
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	2.379 ± 0.003	4445 ± 151.47	2.369 ± 0.013	4333 ± 168.3	98.83 ± 0.007
Methylfurfural	2.579 ± 0.005	1167 ± 122.1	2.568 ± 0.014	1097 ± 96.8	98.57 ± 0.009
Syringic acid	2.678 ± 0.004	6723 ± 119.21	2.658 ± 0.013	6523 ± 162.8	96.99 ± 0.004
Vanillin	3.134 ± 0.003	5013 ± 124.3	3.147 ± 0.009	4806 ± 282.9	98.14 ± 0.029
<i>p</i> -Coumaric acid	3.253 ± 0.003	11867 ± 265.2	3.239 ± 0.007	11762 ± 302.3	97.08 ± 0.005
Syringaldehyde	3.655 ± 0.003	6190 ± 48.5	3.655 ± 0.007	6048 ± 229.38	97.64 ± 0.345

<sup>a)</sup> Mean value for three different concentrations.

being performed within 1 day, while for inter-day variability test, brandy was analysed with five replicates being performed on three consecutive days. Recovery was used to evaluate the accuracy of the method, and was calculated by comparison with the results obtained in the analysis of added samples of three concentration levels. The results for Precision and Recovery are given in Table 3.

### 3.3 Comparison between HPLC and UPLC

By comparing the data obtained and chromatograms generated from the UPLC and HPLC analyses [14], the advantages of the UPLC method can be summarised as follows

With UPLC the running time (6.5 min) was about ten times shorter than that with HPLC (60 min) (Fig. 2). The combination of the shorter running time with a smaller flow rate of 0.7 mL/min reduced the solvent consumption to only 4.55 mL, whereas solvent usage for a single run in HPLC was 60 mL.

In view of the results presented in Table 4, 11 of the 14 compounds present a lower LOD in UPLC than in HPLC, and two have a very similar LOD (*p*-hydroxybenzaldehyde and vanillin). Only for 5-hydroxymethylfurfural is the LOD considerably higher (0.399 in UPLC and 0.158 in HPLC); this however is more than sufficient taking into account that brandies have a high concentration of HMF (Table 5). For the LOQ, it presents the same behaviour.

In respect of repeatability, RSD in terms of retention time (inter- and intra-day) was better in UPLC than in

**Table 4.** Comparison between HPLC and UPLC methods

Compounds	LOD (mg/L)		LOQ (mg/L)		AS		$t_R$ RSD% (intra-day)		$t_R$ RSD% (inter-day)		Area RSD% (intra-day)		Area RSD% (inter-day)	
	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC	HPLC	UPLC
Gallic acid	0.754	0.178	2.514	0.571	0.254	0.163	0.1	0.2	2.5	0.6	4.8	3.1	5.7	6.2
5-Hydroxymethylfurfural	0.158	0.399	0.526	1.811	0.053	0.592	0.1	0.1	1.2	0.4	3.3	4.8	4.1	3.9
Protocatechuic acid	0.065	0.049	0.216	0.164	0.029	0.071	0.5	0.2	2.7	0.5	6.2	4.7	7.7	4.4
Furfural	0.197	0.094	0.657	0.313	0.066	0.105	0.3	0.1	0.9	0.3	1.6	1.6	3.6	3.3
Protocatechualdehyde	0.023	0.011	0.077	0.033	0.019	0.016	0.3	0.1	2.5	0.9	5.2	4.4	8.1	4.9
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.048	0.009	0.163	0.031	0.021	0.009	0.2	0.2	1.3	0.8	4.6	4.8	7.5	6.1
Caffeic acid	0.028	0.011	0.094	0.049	0.095	0.015	0.3	0.2	1.9	0.6	5.4	6.4	7.6	6.9
Vanillic acid	0.019	0.017	0.044	0.058	0.063	0.019	0.3	0.2	1.6	0.6	5.5	5.1	3.6	4.8
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	0.013	0.019	0.067	0.064	0.045	0.021	0.3	0.1	1.5	0.4	7.5	3.4	7.7	3.8
Methylfurfural	0.153	0.012	0.509	0.041	0.085	0.012	0.3	0.1	0.7	0.4	5.1	7.1	6.2	8.8
Syringic acid	0.093	0.049	0.311	0.163	0.035	0.031	0.3	0.1	1.2	0.5	2.1	1.7	2.3	2.4
Vanillin	0.055	0.056	0.183	0.232	0.018	0.076	0.3	0.1	0.9	0.3	5.6	3.9	5.5	5.8
<i>p</i> -Coumaric acid	0.028	0.017	0.092	0.058	0.093	0.019	0.4	0.1	0.2	0.2	1.1	2.2	1.3	2.5
Syringaldehyde	0.133	0.067	0.443	0.225	0.049	0.071	0.3	0.08	0.7	0.2	1.4	0.7	8.1	3.7

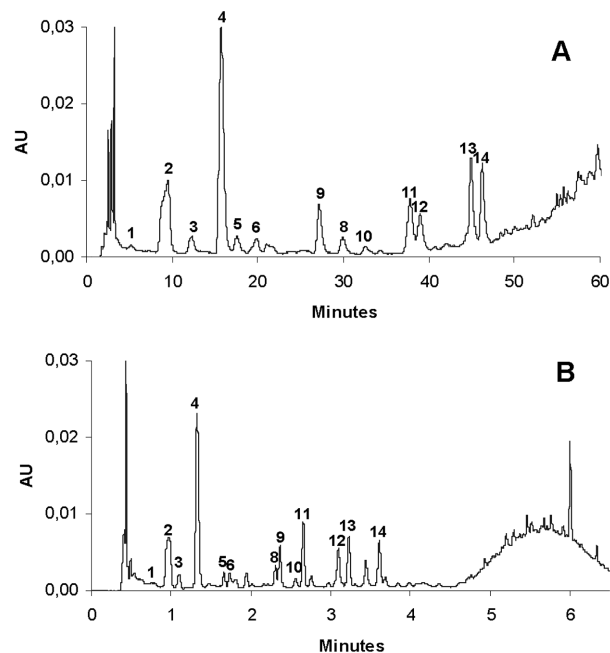
HPLC. For RSD in terms of area, the same can be said for eight of the compounds.

Finally, we can confirm that the UPLC method is sufficiently selective and sensitive to be applied directly to brandy.

### 3.4 Application to the analysis of real samples and statistical analyses

According to the Regulations of the Specific Denomination “Brandy de Jerez”, there are three categories of Brandy de Jerez: *Brandy de Jerez Solera* (aged on average for one year), *Brandy Solera Reserva* (aged on average for three years) and *Brandy Solera Gran Reserva* (this is aged for the longest period of time, on average ten years). In this stage of the work, we analysed 33 samples of different brandies, eleven of each of the three categories.

The typical chromatograms of the brandies are shown in Fig. 3. As expected, the greatest concentration of polyphenols is found in the brandies which had undergone the longest ageing process, whereas the brandies which had a shorter ageing present a smaller concentration of polyphenols. This is logical, as it is common knowledge that polyphenols are closely linked to processes taking place over the length of ageing [2–5], many of these originate from the extraction of compounds from the wood (vanillin, syringaldehyde, protocatechualdehyde), some are due to oxidative ageing (vanillic acid, syringic acid, protocatechuic acid) and others have their origin in the wood that has previously been “wined” with Sherry wine, thus absorbing polyphenols that are subsequently taken up by the brandy, like *p*-coumaric acid and caffeic acid. The samples of brandies were quantified using the calibration curves of the analytes. Table 5 summarises the results.



**Figure 2.** Chromatograms of brandy with HPLC (A) and UPLC (B). Detection wavelength was set at 280 nm. Labels 1–14 are the same as for Fig. 1.

A statistical study was carried out of the total set of samples. First, by an analysis of the variance, the possibility of differentiating between the different commercial categories of brandy on the basis of these compounds was investigated. As can be observed in Table 6, all the compounds except caffeic acid present statistically significant differences between the groups of brandies with different average periods of ageing. The exception could be because caffeic acid is not a compound extracted from the wood itself but, from our experience, is incorporated in the brandy via the prior “wining” of the cask.

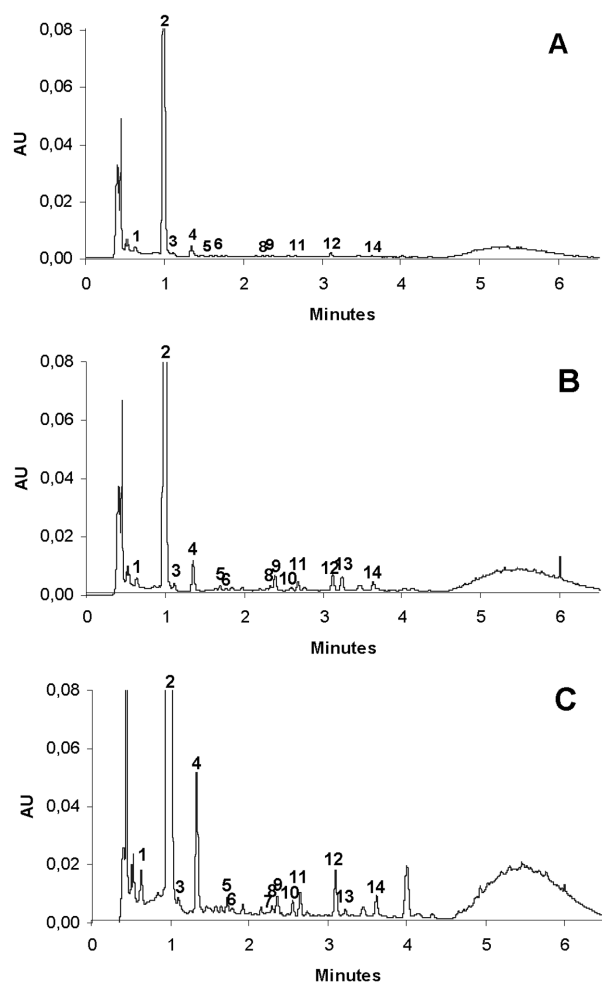
**Table 5.** Content of investigated compounds in *Brandy Solera* (S) (Table 5a), *Solera Reserva* (SR) (Table 5b) and *Solera Gran Reserva* (SGR) (Table 5c). N.D.: not detected.

Compounds	S1 (mg/L)	S2 (mg/L)	S3 (mg/L)	S4 (mg/L)	S5 (mg/L)	S6 (mg/L)	S7 (mg/L)	S8 (mg/L)	S9 (mg/L)	S10 (mg/L)	S11 (mg/L)
a											
Gallic acid	1.747	1.118	5.412	N.D	N.D	N.D	2.582	0.774	0.744	N.D	N.D
5-Hydroxymethylfurfural	13.482	32.266	48.211	13.824	12.184	12.095	41.173	17.54	13.946	12.24	6.907
Protocatechuic acid	0.761	N.D	N.D	0.404	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.365	N.D
Furfural	0.317	0.468	0.375	1.826	0.523	0.629	0.865	N.D	1.326	0.427	0.335
Protocatechualdehyde	0.131	N.D	N.D	0.131	N.D	N.D	N.D	0.132	N.D	0.251	N.D
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	N.D	N.D	N.D	0.167	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Caffeic acid	0.077	N.D	N.D	0.187	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Vanillic acid	0.261	N.D	N.D	0.341	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	0.067	N.D	N.D	0.319	N.D	0.105	0.101	N.D	0.108	0.103	N.D
Methylfurfural	0.093	0.068	0.062	0.165	N.D	0.206	N.D	N.D	N.D	0.215	N.D
Syringic acid	0.138	0.173	N.D	0.721	N.D	0.272	N.D	N.D	N.D	0.355	N.D
Vanillin	0.271	0.129	N.D	1.391	0.365	0.688	N.D	0.468	2.708	N.D	0.673
<i>p</i> -Coumaric acid	N.D	N.D	N.D	0.519	N.D	0.033	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Syringaldehyde	0.192	N.D	N.D	1.176	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
b											
Gallic acid	1.508	1.169	1.47	0.689	3.823	1.918	0.689	0.858	0.973	1.811	3.226
5-Hydroxymethylfurfural	25.481	5.733	28.24	12.941	18.665	38.805	2.544	13.309	6.464	12.548	19.519
Protocatechuic acid	1.397	0.493	N.D	0.352	1.355	2.218	0.511	N.D	0.323	0.531	0.641
Furfural	1.071	1.426	0.31	1.171	4.021	5.035	3.772	0.986	2.796	1.612	1.332
Protocatechualdehyde	0.231	0.063	N.D	0.065	0.467	0.402	0.131	N.D	0.124	0.111	0.167
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.235	0.105	0.045	0.123	0.277	0.331	0.167	N.D	0.142	0.128	0.098
Caffeic acid	0.123	N.D	N.D	N.D	0.222	0.123	N.D	N.D	N.D	0.188	N.D
Vanillic acid	0.601	0.423	0.052	0.303	0.691	1.109	0.558	0.202	0.392	0.245	0.319
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	0.609	0.267	0.117	0.172	0.525	0.538	0.297	0.106	0.282	0.206	0.108
Methylfurfural	0.148	0.267	0.084	N.D	0.499	0.474	0.209	0.102	0.109	0.196	0.181
Syringic acid	0.828	0.095	0.252	0.542	1.392	2.063	0.826	0.459	0.788	0.546	0.602
Vanillin	1.188	0.741	0.436	0.885	1.705	3.067	2.828	2.58	4.293	0.609	0.717
<i>p</i> -Coumaric acid	0.844	0.575	0.113	0.037	0.488	0.273	0.115	N.D	0.249	0.188	0.035
Syringaldehyde	1.126	0.261	0.477	0.919	2.351	2.739	1.576	0.815	1.308	1.114	1.085
c											
Gallic acid	10.911	5.702	7.402	6.018	3.876	2.084	N.D	N.D	2.064	3.717	0.982
5-Hydroxymethylfurfural	31.217	18.874	19.428	17.654	87.093	48.621	31.335	40.341	37.541	64.975	16.434
Protocatechuic acid	3.347	1.071	3.595	1.128	1.811	1.705	3.247	3.519	0.873	1.674	2.338
Furfural	3.905	3.975	4.681	6.771	7.965	11.897	7.606	9.528	4.496	6.981	7.857
Protocatechualdehyde	0.322	0.165	0.678	0.487	0.354	0.573	0.365	0.232	0.206	0.476	0.439
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.599	0.263	0.469	0.183	0.265	0.058	0.461	0.441	0.167	0.281	0.209
Caffeic acid	0.668	0.301	0.231	0.121	0.129	0.109	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Vanillic acid	1.963	0.221	1.317	1.093	0.737	1.759	1.698	1.431	0.812	1.197	1.244
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	1.056	0.371	0.729	0.253	0.476	0.884	0.487	0.941	0.302	0.677	0.202
Methylfurfural	0.288	0.311	0.651	0.502	1.008	0.919	0.388	0.791	0.658	1.052	0.626
Syringic acid	4.095	2.884	2.081	2.698	1.478	3.515	2.585	1.111	1.339	2.618	2.396
Vanillin	4.761	2.375	3.295	2.229	2.363	3.263	3.314	2.197	1.555	2.415	1.498
<i>p</i> -Coumaric acid	0.458	0.248	0.329	0.052	0.254	1.318	0.171	0.285	0.044	0.631	0.061
Syringaldehyde	7.177	5.541	2.778	5.212	2.333	6.355	4.371	4.094	2.099	4.125	3.805

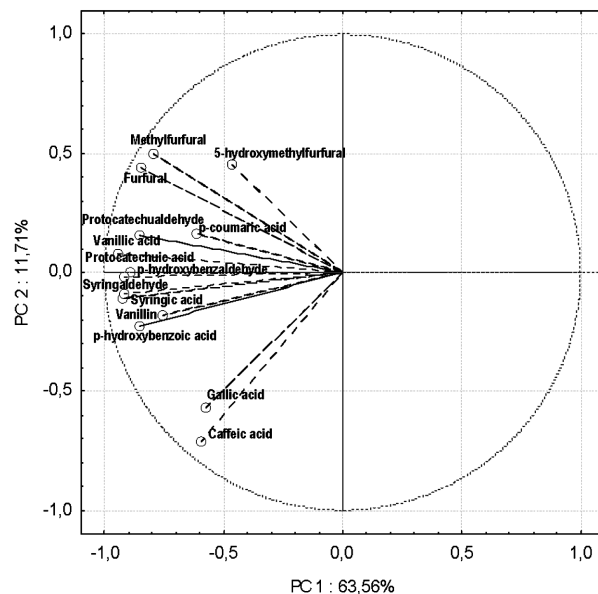
A principal component analysis was carried out. The first three principal components explain 82.12% of the total variance, although the first component, which alone explains 62%, contributes most.

As can be observed in Fig. 4, most of the variables are associated with the first component. Since the relationship between the polyphenol content and ageing is well-

known [29, 30], we think that the dimension of the first component corresponds to the period of ageing. The finding that gallic acid has a weaker correlation with component 1 than the rest of the polyphenols leads us to believe that, in the acquisition of gallic acid by the brandy, there are other mechanisms involved in addition to the extraction from the wood, probably the wining of the cask.



**Figure 3.** Typical chromatograms of *Brandy Solera* (A), *Solera Reserva* (B), and *Solera Gran Reserva* (C). Detection wavelength was set at 280 nm. Labels 1–14 are the same as for Fig. 1.



**Figure 4.** Principal component analysis. Projection of the variables on the factor plane.

Further, it is seen that the furanic derivatives, particularly hydroxymethyl furfural, are also more weakly associated with component 1. The presence in the brandy of furanic derivatives is not only due to the ageing in wood but also to other circumstances, such as their presence in the raw material (in the initial raw spirits or hollands) and the various practices permitted in the production of the brandy such as the addition of caramel colouring [31]. This would explain their weaker correlation with component 1.

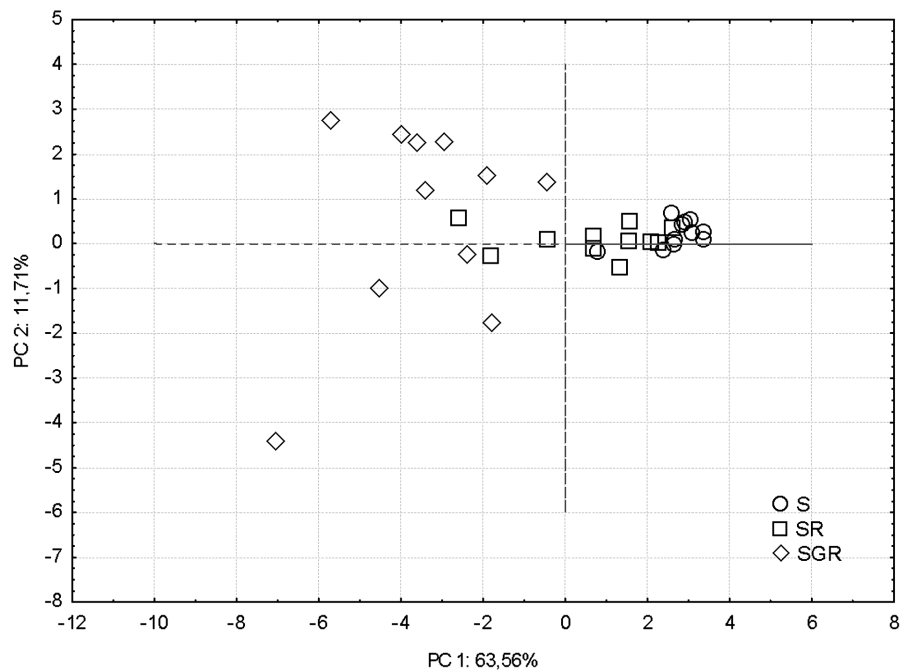
In the PCA (Fig. 5), it can be seen that the samples are ranked in function of their age, which, as previously commented, is associated with component 1.

An LDA was performed to obtain the equations of classification that would permit an unknown sample to be

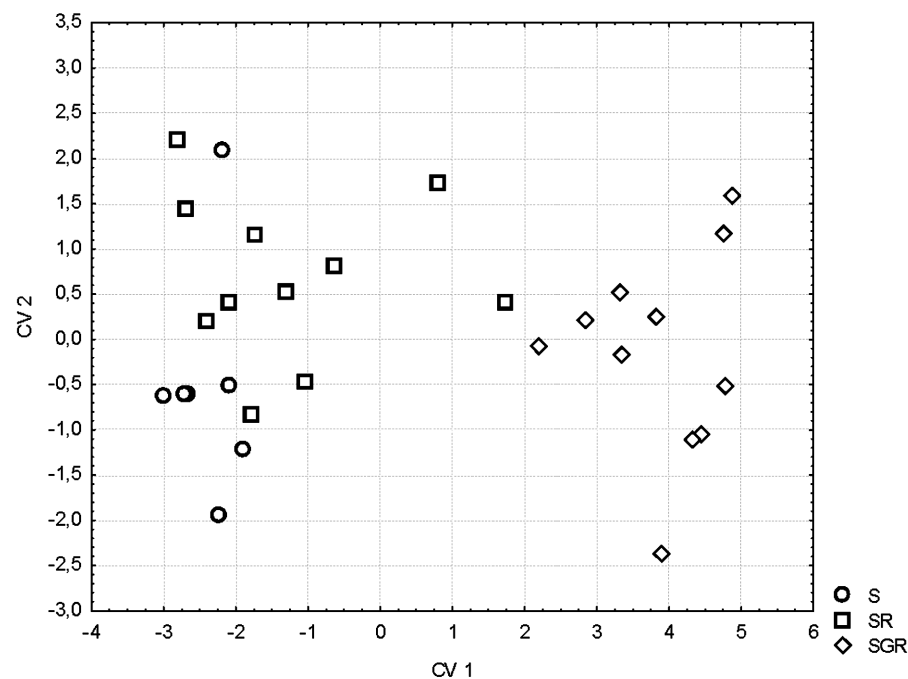
**Table 6.** Analysis of the variance for each compound

Compounds (mg/L)	Average S	Average SR	Average SGR	<i>p</i> -Value
Gallic acid	1.125	3.886	3.886	0.017446
5-Hydroxymethylfurfural	16.749	20.321	37.592	0.01214
Protocatechuic acid	0.13909	0.711	2.2098	0.000001
Furfural	0.6446	2.1392	6.8783	0.000
Protocatechualdehyde	0.0586	0.16009	0.3906	0.000011
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.01582	0.15009	0.3087	0.000006
Caffeic acid	0.024	0.0596	0.1417	0.11
Vanillic acid	0.0547	0.445	1.2247	0.00000
<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	0.073	0.293	0.579	0.000015
Methylfurfural	0.0735	0.2062	0.654	0.000000
Syringic acid	0.1508	0.763	2.4363	0.000000
Vanillin	0.6084	1.7317	2.6604	0.000257
<i>p</i> -Coumaric acid	0.0501	0.2651	0.35009	0.045640
Syringaldehyde	0.1245	1.2519	4.3536	0.000000

*p*-Values < 0.005 show statistically significant differences.



**Figure 5.** Principal component analysis. Projection of the cases on the factor plane.



**Figure 6.** Linear discriminant analysis. Projection of the cases on the canonical plane.

**Table 7.** Discriminant analysis: Classification functions

	S	SR	SGR
Syringaldehyde	0.18755	1.07992	5.9783
Methylfurfural	2.56306	9.03204	33.1050
<i>p</i> -Coumaric acid	-0.38035	-0.50110	-14.5196
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.95844	19.45117	10.4364
Protocatechuic acid	0.02175	-1.77428	0.6869
Constant	-1.20377	-3.46865	-24.7660

assigned to its commercial category (S, SR, SGR); the classification functions are shown in Table 7.

From among the participating variables the most discriminant were syringaldehyde, methylfurfural and *p*-coumaric acid. Syringaldehyde is directly related to the time of ageing [28, 32]; therefore it would be logical for this to be one of the variables that discriminates in the model. As has been seen previously, methylfurfural is present in the initial raw spirit, which could indicate

**Table 8.** Discriminant analysis: Classification matrix of analysed brandies.

	Percent	S	SR	SGR
S	90.9	10	1	0
SR	72.7	2	8	1
SGR	100.0	0	0	11
Total	87.9	12	9	12

that the quality of the hollands may be different in function of the final product required, thus explaining its contribution to the discriminant model. *p*-Coumaric acid is a compound derived from the wining of the casks, so its availability is limited since its level in the brandy is affected by the volume of product passing through the solera over a particular length of time [33]. It can be seen, therefore, that each of these three compounds may be associated with the quality of the brandies in different ways.

In Table 8, it can be seen that the accuracy of the classification is 90% for the *Solera*, 72% for the *Solera Reserva* and 100% for the *Solera Gran Reserva*. This is also clearly shown graphically in Fig. 6, where the separation between the three groups of samples is good, and very good in the case of the Gran Reservas.

#### 4 Concluding remarks

In this paper, a rapid, simple and reproducible UPLC method is proposed for the analysis of phenolic compounds and furanic derivatives in sherry brandy.

The method has been demonstrated to perform well with regard to limits of detection and quantification, linearity, sensitivity, accuracy and precision.

Compared with HPLC, the UPLC method developed offers higher sensitivity, precision and speed of analysis for the simultaneous determination of polyphenols in brandy, which suggests that UPLC is a powerful tool for the analysis of components related to quality in brandy. Using the UPLC system enables the analysis to be performed in one tenth of the time required for the conventional system.

*We are grateful to the "Consejo Regulador de la Denominación Específica Brandy de Jerez" for providing the samples. This study was supported by the Junta de Andalucía, (P05-AGR-00767), (Plan Nacional de Tecnología de Alimentos, Project: RTA2006-00036-C02-02).*

*The authors declared no conflict of interest*

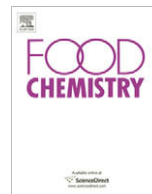
#### 5 References

- [1] Canas, S., Leandro, M. C., Spranger, M. I., Belchior, A. P., *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 5023–5030.

- [2] Viriot, C., Scalbert, A., Lapiere, C., Moutounet, M., *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 1872–1879.
- [3] Mosedale, J. R., Puech, J.-L., *Trends Food Sci. Technol.* 1998, 9, 95–101.
- [4] Martínez Montero, C., Rodríguez Doderó, M. D. C., Guillén Sánchez, D. A., García Barroso, C., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1058–1064.
- [5] Rodríguez Madrera, R., Blanco Gomis, D., Mangas Alonso, J. J., *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7969–7973.
- [6] Caldeira, I., Belchior, A. P., Clímaco, M. C., Bruno De Sousa, R., *Anal. Chim. Acta* 2002, 458, 55–62.
- [7] Caldeira, I., Mateus, A. M., Belchior, A. P., *Anal. Chim. Acta* 2006, 563, 264–273.
- [8] Savchuk, S. A., Kolesov, G. M., *J. Anal. Chem.* 2005, 60, 752–771.
- [9] Kuroda, Y., Hara, Y., *Mutat. Res.* 1999, 436, 69–97.
- [10] López, M., Martínez, F., Del Valle, C., Orte, C., Miró, M., *J. Chromatogr. A* 2001, 922, 359–363.
- [11] Panosyan, A. G., Mamikonyan, G., Torosyan, M., Abramyan, A., Oganesyan, A., Gabrielyan, E. S., Grigoryants, A., Mkhitarayan, S., Lapin, B. V., *J. Anal. Chem.* 2002, 57, 356–361.
- [12] De Aquino, F. W. B., Rodrigues, S., Do Nascimento, R. F., Casimiro, A. R. S., *Food Chem.* 2006, 98, 569–574.
- [13] Canas, S., Belchior, A. P., Spranger, M. I., Bruno-De-Sousa, R., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 496–502.
- [14] Barroso, C. G., Rodríguez, M. C., Guillén, D. A., Pérez-Bustamante, J., *Chromatogr. A* 1996, 724, 125–129.
- [15] Swartz, M. E., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2005, 28, 1253–1263.
- [16] Nováková, L., Matysová, L., Solich, P., *Talanta* 2006, 68, 908–918.
- [17] Yang, F. Q., Guan, J., Li, S. P., *Talanta* 2007, 73, 269–273.
- [18] Wang, X., Zhao, T., Gao, X., Dan, M., Zhou, M., Jia, W., *Anal. Chim. Acta* 2007, 594, 265–273.
- [19] Nováková, L., Solichová, D., Pavlovicová, S., Solich, P., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 2433–2443.
- [20] Guan, J., Lai, C. M., Li, S. P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 44, 996–1000.
- [21] Liu, M., Li, Y., Chou, G., Cheng, X., Zhang, M., Wang, Z., *J. Chromatogr. A* 2007, 1157, 51–55.
- [22] Zhang, Y., Jiao, J., Cai, Z., Zhang, Y., Ren, Y., *J. Chromatogr. A* 2007, 1142, 194–198.
- [23] Thompson, J. W., Mellors, J. S., Eschelbach, J. W., Jorgenson, J. W., *LC-GC* 2006, 24, 16–20.
- [24] Neue, U. D., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 107–130.
- [25] Petersson, P., Frank, A., Heaton, J., Euerby, M. R., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 2346–2357.
- [26] García Campana, A. M., Cuadros Rodríguez, L., Alés Barrero, F., Román Ceba, M., Sierra Fernández, J. L., *Trends Anal. Chem.* 1997, 16, 381–385.
- [27] Guerrero, E. D., Chinnici, F., Natali, N., Marín, R. N., Riponi, C., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 3030–3036.
- [28] Barbero, G. F., Liazid, A., Palma, M., Barroso, C. G., *Food Chem.* 2008, 107, 1276–1282.
- [29] García Moreno, M. V., García Barroso, C., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 7556–7563.
- [30] Hernández, T., Estrella, I., Dueñas, M., De Simón, B. F., Cadahía, E., *Eur. Food Res. Technol.* 2007, 224, 695–705.
- [31] Quesada Granados, J., Villalón Mir, M., Lopez Serrana, H., López Martínez, M. C., *Food Chem.* 1996, 56, 415–419.
- [32] Fabios, M., Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., Medina, M., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 2155–2159.
- [33] Rodríguez Doderó, M.C., *Analytical study of phenolic composition of sherry brandy and its relation to the elaboration process, ageing, characterisation and quality*, Ed. Bell & Howell, 2005.







## Antioxidant activity of Brandy de Jerez and other aged distillates, and correlation with their polyphenolic content

Mónica Schwarz, MCarmen Rodríguez \*, Cristina Martínez, Virginia Bosquet, Dominico Guillén, Carmelo García Barroso

Grupo de Investigación Químico-Analítica del Vino y Productos Vitivinícolas, Dpto. Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Campus de Puerto Real, Avda. República Saharaui s/n.11510 Puerto Real, Cádiz, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 September 2008

Received in revised form 30 December 2008

Accepted 29 January 2009

#### Keywords:

Antioxidant activity

Brandy

Sherry

Brandy de Jerez

Aged distillates

### ABSTRACT

The antioxidant activities (AA) of commercial sherry brandies (Solera, Solera Reserva and Solera Gran Reserva) and samples obtained from an experimental ageing system were measured. In the dynamic ageing system, the data show that the casks containing the youngest distillate become exhausted over time. For experimental and commercial brandies, antioxidant activity and polyphenolic content both increase with increasing age, so the correlation between the two parameters was analysed. It is concluded that there is a significant relationship between them; however, it seems that some non-phenolic compounds could also contribute to the antioxidant activity. The results revealed certain differences between commercial and experimental sherry brandies, and these differences could be due to the addition of caramel colouring. Several other commercial aged distillates of various different geographical origins (Cognacs, Armagnacs, and Spanish, French and South African brandies) were studied, and their antioxidant power was compared with that of the three categories of Brandy de Jerez. It was found that Solera Gran Reserva sherry brandies show the highest antioxidant activity of all the products considered.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Reactive oxygen species, including free radicals, such as superoxide anion radicals, hydroxyl radicals, and non-free-radical species, such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and singlet oxygen, play a key role in the oxidation process that can damage cells. This process is considered to be one of the initial development stages of many chronic diseases, such as cancer, cardiovascular disease, atherosclerosis, and diabetes (Abdi & Ali, 1999; Abe & Berk, 1998; Lefer & Grandeur, 2000). Over the last decade, considerable experimental evidence has confirmed the importance for health of following a diet rich in antioxidants, which can protect the organism against the damage caused by these radicals. Some of these antioxidants are well known, such as vitamins (particularly vitamins E and C) and carotenoids, including β-carotene. A healthy diet should provide an adequate and continuous supply of these antioxidants. Other antioxidants, like ubiquinols and antioxidant thiols, are produced in small amounts by the organism, but the levels of many of them can be increased by dietary supplements (Rice-Evans & Packer, 1998). For these reasons, there is an increasing interest in characterising foods and drinks in terms of antioxidant potential; numerous methods have been developed with this aim.

In plants like rosemary, thyme, clove and ginger, the antioxidant activity is attributed to the natural presence of phenolic compounds. Most of the natural antioxidants come from plants. These compounds are polyphenols, which are found in all parts of the plant (roots, bark, stem, leaves, fruits, flowers, etc.). Some of them can form complexes with metals, although their main antioxidant activity is based on their chain-breaking and free radical-scavenging activities. Important antioxidant properties of flavanols, a common type of polyphenol, have been widely studied (Alonso, Domínguez, Guillén, & Barroso, 2002; Arnous, Makris, & Kefalas, 2001; Brenna & Pagliarini, 2001; De Beer, Joubert, Gelderblom, & Manley, 2005).

In recent years considerable attention has been paid to wine and its derivatives as a source of polyphenols. In particular, the relationship between the consumption of wine and the prevention of cardiovascular diseases, certain cancers, and other diseases (the French paradox) has been widely studied (Renaud & De Lorgeril, 1992; Tomera, 1999).

The considerable increase in the antioxidant activity of aged distilled beverages during ageing in barrel has been attributed to contact between the distillate and the wood (Da Porto, Calligaris, Celotti, & Nicoli, 2000; Goldberg, Hoffman, Yang, & Soleas, 1999). The best correlation between antiradical activity and the chemical composition of Cognac has been observed for ellagitannins, which are extracted from wood mainly in the first year of ageing

\* Corresponding author. Fax: +34 956 016460.

E-mail address: [maricarmen.dodero@uca.es](mailto:maricarmen.dodero@uca.es) (M. Rodríguez).

(Da Porto et al., 2000). As reported by Goldberg et al. (1999), the antioxidant activity of distillates studied presents values that are intermediate between the corresponding red and white wines. The highest values of total antioxidant activity were found in Armagnacs, Cognacs and bourbon whiskeys, which also possessed the highest contents in phenolic compounds. Rum, vodka, gin and other distillates had negative values of antioxidant activity, which was consistent with the low concentrations of phenolic compounds in these beverages. From these results, the authors concluded that the ageing process increases the content of phenolics and thus the antioxidant activity of distillates.

After the initial fermentation and distillation processes, “Brandy de Jerez” does not reach its organoleptic equilibrium until it has been aged in American oak (*Quercus alba*) casks (Quiros & Carrascal, 1992). “Brandy de Jerez” is aged by the traditional dynamic system (“Solera and Criaderas”), and sometimes additionally by the static system (“Añadas”). During the ageing period, slow physico-chemical changes involving both brandy and wood take place (Mosedale & Puech, 1998). These changes result in the radical modification of the product, producing well-known changes in colour, taste and flavour. This evolution comprises changes in the composition and concentration of compounds related to the sensorial characteristics of the brandy.

In this work, the antioxidant activities of brandies from an experimental system, “Brandies de Jerez” and other commercial distillates, were measured and correlated with the total polyphenolic content of these beverages.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Folin–Ciocalteu reagent (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) and sodium carbonate (Panreac, Barcelona, Spain) were employed for the measurement of the Folin–Ciocalteu total polyphenolic index. The calibration curve was constructed using gallic acid (Merck, Darmstadt, Germany).

In the electrolytic system for the measurement of the antioxidant activity, a saturated solution of  $Zn(CH_3COO)_2$  (Panreac) and a solution of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Sigma–Aldrich) in a phosphate buffer medium (pH 6) were used. 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), supplied by Sigma–Aldrich, was dissolved in methanol of HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain) and used to construct the calibration curve (0–25 mM).

### 2.2. Samples

The experimental ageing system set up in the Jerez Centre of Viticulture and Enology for the analytical monitoring of brandy ageing consisted of 15 casks of 500 l capacity each. Twelve of the casks were used to age brandy according to the dynamic system of “Solera and Criaderas” traditionally used in the Denomination of Origin area, in groups of three casks for each ageing scale. The Solera scale, designated S, was the oldest; the First Criadera, the next oldest; the Second Criadera, the next; and the Third Criadera, the youngest. The other three casks held the same new distillate but for static ageing, according to the system of Añadas. All of the casks had previously contained sherry wine for at least 3 years, as established in the regulations for the manufacture of Brandy de Jerez.

The four scales contained distillate with a 40% v/v graduation. Programmed decantings every 3 months involved first drawing off one-fourth (125 l) of the total volume of brandy held in each of the casks of the oldest Solera scale. Then, a similar proportion

of the volume held in the First Criadera casks was drawn off; these amounts (from the First Criadera casks) were then mixed together, divided into three parts, and used to refill the three Solera casks to their original volume. This procedure of partially refilling older casks with younger brandy drawn off the preceding scale is repeated for each of the ageing scales of the system. In the final decanting, the youngest scale (the Third Criadera in this system) is replenished with new distillate from the distillery. The periodic partial extraction of brandy and consequent replenishing is known as “sacas y rocíos”. Sampling of each scale was carried out every 3 months, taking advantage of the operations of “sacas y rocíos”. Small sample volumes (20 ml) were obtained from the product after the mixing of the partial volumes drawn off the three casks belonging to the same scale, which thus constitutes a representative mean of the whole scale. A total of 76 samples (4 scales  $\times$  19 “sacas y rocíos”) were analysed during the 5 years of the study.

The three casks used for the Añadas were filled with the same new distillate at the same time as the casks of the dynamic system. The only product drawn off from these static system casks was that needed for sampling (20 ml every 3 months). A total of 19 samples were obtained by mixing the aliquots from the three casks of the static system in every sampling.

64 commercial sherry brandies were studied: 21 Solera (S), 18 Solera Reserva (SR) and 25 Solera Gran Reserva (SGR). The sampling covered the products of all of the companies registered with the Regulatory Commission of the Specific Denomination of “Brandy de Jerez”.

Distillates of different geographical origin included 12 Spanish brandies without a Denomination of Origin (D.O.), 4 South African brandies, 11 Cognacs, 4 Armagnacs, and 4 French distillates without a D.O.

Aromatic macerations and infusions analysed were made from raisins, prunes, oak wood fibres (toasted – T, and not toasted – A and C), sheaths of vanilla, shells of nut, and pericarp of almonds. Colouring caramels analysed were made from glucose, sucrose and grape must.

All samples were supplied by the Regulatory Commission of the Specific Denomination of “Brandy de Jerez”.

### 2.3. Measurement of the total phenolic content

Total phenols were determined using the Folin–Ciocalteu reagent. The reaction mixture contained 250  $\mu$ l of sample, 1250  $\mu$ l of Folin–Ciocalteu reagent and 5 ml of 20% sodium carbonate. Dilutions were carried out in duplicate, and the absorbance was measured at 750 nm. The calibration curve was prepared with gallic acid solutions ranging from 0 to 1500 mg/l, and the results are given as gallic acid equivalents (GAE).

### 2.4. Measurement of the antioxidant activity

Most of the methods used for determining antioxidant activity are based on the study of a reaction in which a free radical is generated and how this reaction is inhibited by the addition of the compound or sample whose antioxidant power is being measured. The method used in this work (Alonso, Guillén, & Barroso, 2003) has been developed and validated by the research group from a previous design (electrochemical test of accelerated browning) taken as a template. The method used here is based on the electrochemical oxidation of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). This is a compound which, when oxidised, generates a coloured cation-radical, easily detectable by visible spectrophotometry. When an antioxidant compound or sample is added to the solution, the oxidation of the ABTS is delayed, and the reaction consumes a greater quantity of electrical current,

which is related to the degree of antioxidant activity of the sample added.

The device (Fig. 1) consists of an 80 ml beaker (cathode) inside which a 30 ml filtering crucible, pore size 4 (anode) is set. A flat platinum electrode (30 × 60 mm) is introduced in the cathode and a cylindrical platinum mesh (22 × 22 mm) is introduced in the anode. To facilitate contact between the electrodes and the solutions, they are kept in continuous agitation by a magnetic agitator fitted to each cell. The feed source used (FAC-307C from Pro-max) allows the working conditions to be set in constant intensity mode. The reaction was monitored using a UV–Vis transmission probe coupled to a PC 2000 miniaturized spectrophotometer from Oceans Optics, Inc. (Eerbeek, The Netherlands) with a DH-2000 halogen–deuterium light source from Top Sensor System (Eerbeek, The Netherlands).

The test consists of the oxidation, by means of the electrolytic system described, of a solution of ABTS (50 μM), to which the sample to be tested is added. Sample volumes were adjusted in the range 0.5–2 ml, to optimise the analysis times. To start the experiment, a constant intensity of 2 mA is applied, and the absorbance at 414 and 734 nm (the two wavelengths at which ABTS<sup>+</sup> presents its maximum principal values) is continuously recorded. As response function, the coulombs consumed in the oxidation of the sample added are measured. This quantity of coulombs is then compared to a calibration curve prepared with solutions of known concentrations of Trolox.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Experimental ageing system

Fig. 2 shows the evolution of the antioxidant activity at successive numbers of "sacas y rocíos". Points are experimental data, and lines were drawn using the moving average method. Young distillates showed no antioxidant activity; activity increases in line with time spent in contact with the wood. This is a logical finding because it is believed that the process of maturing in oak cask is characterised by the diffusion of compounds from within the wood.

The profile of the antioxidant activity curve in the dynamic system is affected by several variables: the content of the cask in compounds that can be extracted from it; the dilution effect of mixing with younger distillates; the difference in the extractive power of the distillates (the lower the compound concentration, the greater the extractive power), and the different extraction kinetics of the various compounds. The initial rise in the antioxidant activity is produced by the predominance of the extraction phenomenon over the dilution effects produced by the addition of younger distillate.

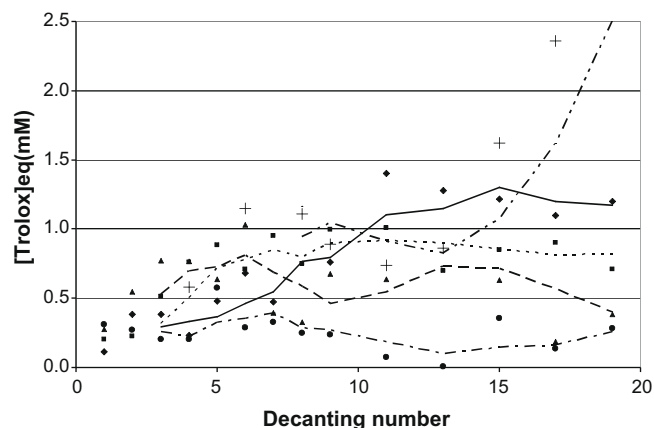


Fig. 2. Evolution of the antioxidant activity (as [Trolox] mM) in the experimental ageing system of sherry brandy. ♦ — Solera; ■ - - - - First Criadera; ▲ - - - - Second Criadera; ● - - - - Third Criadera; + - - - - Añada.

This situation changes after a certain number of decantings, when it stabilises and then decreases slightly.

From the comparison between scales, it is concluded that the highest antioxidant activity for decanting number beyond 10, when a clear divergence is observed, corresponds to the Solera, followed by the First Criadera and Second Criadera, with the Third Criadera having the lowest value. The explanation for this is that, in the dynamic ageing system, the Solera is the scale containing the brandy that has spent the most time in the ageing system and, therefore, has been able to extract the largest amounts of compounds from the casks. These data clearly indicate the exhaustion shown by the Third Criadera: when the decanting number increases above 10, antioxidant activity decreases progressively. This will therefore affect the antioxidant activity of the oldest scale (Solera). To maintain the levels of antioxidant compounds in the Solera scale, and in the final product, we suggest the replacement of the casks of the youngest Criadera with new casks. In the static ageing system (Añadas), the antioxidant activity increases rapidly after decanting number 13, and beyond 15 it is higher than those of the Solera, the last stage in the dynamic system.

Fig. 3 shows the evolution of total phenolic content, measured as Folin–Ciocalteu Index (FCI). It can be seen that the curves for dynamic and static systems are similar to those of antioxidant activity, so the relationship between these two variables was studied. The regression models for Solera and Añada samples give coefficients of 0.71 and 0.79 respectively, confirming the role of the phenolic compounds in the antioxidant activity of aged distillates.

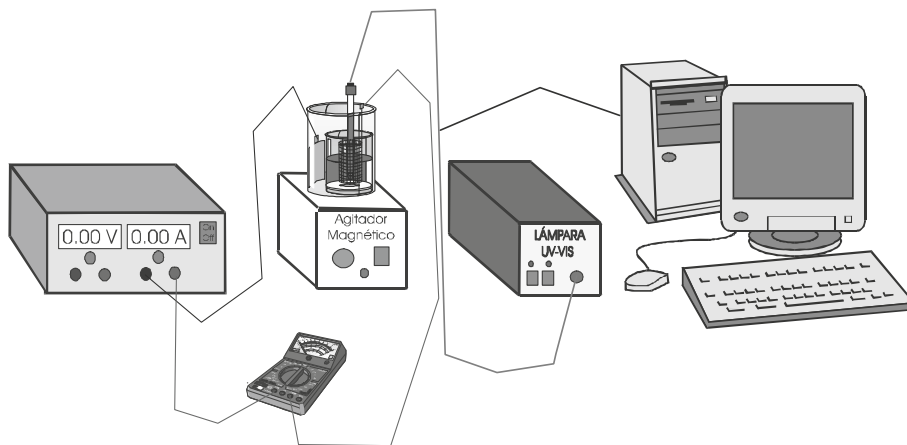
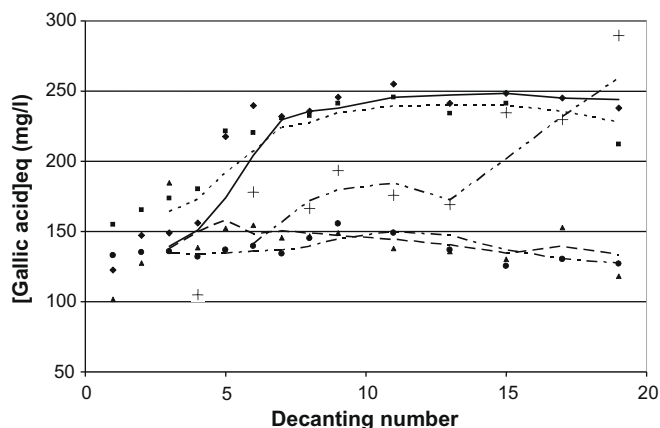


Fig. 1. Diagram of the device used for the measurement of antioxidant activity.



**Fig. 3.** Evolution of the total phenolic content (as mg/l of gallic acid) in the experimental ageing system of Sherry brandy. ◆ — Solera; ■ - - - First Criadera; ▲ - - - Second Criadera; ● - - - Third Criadera; + - - - Añada.

### 3.2. Commercial sherry brandies

Averages values of antioxidant activity of sherry brandies corresponding to the three commercial qualities are presented in Table 1, which also summarises the experimental system data. The average time of ageing of the samples from the experimental system was calculated considering the number of decantings in a year, the total system volume, the volume of each decanting, and the number of scales. This allowed us to classify 17 samples as Solera (aged for more than 6 months), 44 as Solera Reserva (aged for more than 1 year), and 8 as Solera Gran Reserva (aged for more than 3 years).

In general, the Solera Gran Reserva brandies possess a higher antioxidant activity and total polyphenolic content than the Solera Reserva brandies, and these in turn show higher values than Solera brandies, for both experimental and commercial brandies. It can therefore be concluded that antioxidant activity and polyphenolic content both increase with increasing age. To confirm this observation, a study was done to detect any significant difference between the three groups; a Kruskal–Wallis test was applied, because data of antioxidant activity showed a non-normal distribution and a different variance within the groups. It was concluded that a significant difference exists for both experimental ( $p < 0.0056$ ) and commercial ( $p < 0.0055$ ) samples, although this difference is exclusively attributable to the S-SGR distance. The least and the most aged samples are separated into their respective groups, while most brandies of the SR category are situated between these two groups. The explanation for this overlapping between categories is that commercial brandies are classified on the basis of minimum average times of ageing, according to the official definitions of Sol-

**Table 2**

Antioxidant activity ( $[Trolox]_{eq}$ ) of alcoholic extracts and caramel colourings. DL: Limit of detection.

Extract	Addition (in 40% ethanol)	$[Trolox]_{eq}$ (mM)
Prune	8 ml/l	<DL
	20 ml/l	0.33
Almond	4 ml/l	<DL
	10 ml/l	0.19
Nut	8 ml/l	<DL
	120 ml/l	<DL
Oak A	2 ml/l	<DL
	5 ml/l	0.24
Oak C	2 ml/l	0.21
	5 ml/l	1.45
Oak T	2 ml/l	<DL
	5 ml/l	0.04
Raisin	8 ml/l	<DL
	20 ml/l	<DL
Vanilla	1 ml/l	<DL
	2.5 ml/l	0.13
Must caramel 1	6.62 g/l	<DL
Must caramel 3	5.64 g/l	0.08
Glucose caramel 3	5.84 g/l	0.89
Sucrose caramel 1	5.05 g/l	0.20

era, Solera Reserva and Solera Gran Reserva brandies (for instance, a Solera Reserva brandy may be included in the Solera category because it has been aged for at least 6 months); this could partially explain the higher variation coefficients in commercial brandies. Moreover, as the dynamic ageing system involves the dilution with younger distillates, and oak casks tend to become exhausted of their compounds over time, decanting numbers (ageing time) beyond a certain value do not relate to a higher concentration in compounds extracted. This finding is clear in brandies with medium ageing, with a significant dilution factor and an extractive capacity that is rather limited.

In addition, the results revealed certain differences between brandies from the experimental system and commercial brandies. These differences could be attributable to the addition of several substances (macerations, infusions and caramel colourings), which had been made to the commercial brandies after the ageing and before bottling and which contribute to the distinctive properties of “Brandy de Jerez”, whereas these substances had not been added to the brandies from the experimental system. Table 2 summarises the results for the antioxidant activity of these alcoholic extracts, macerations and caramel colourings. As can be observed, at usual addition concentrations, most of the extracts except oak C (0.21 mM Trolox) show no antioxidant activity. These concentrations can be modified by each producer, so the effect of higher additions on the antioxidant activity of aged brandies was studied. Extracts of prune, almond, oak A, oak C and vanilla showed a higher AA, but it is not clear that this can explain the higher values of commercial samples. In the case of caramels, used to adjust the final colour of the commercial brandy, glucose caramel showed the

**Table 1**  
Statistics of antioxidant activity ( $[Trolox]_{eq}$ ) and total phenolic index ( $[Gallic\ acid]_{eq}$ ) of sherry brandies. Commercial and experimental samples are classified according to categories: Solera (S), Solera Reserva (SR) and Solera Gran Reserva (SGR).

	Experimental ageing system				Commercial sherry brandies			
	Average	Min	Max	Variation coefficient (%)	Average	Min	Max	Variation coefficient (%)
AA: $[Trolox]_{eq}$ (mM)								
S	0.39	0.01	0.77	58.1	0.61	0.04	2.58	127.2
SR	0.66	0.07	1.40	49.8	2.00	0.02	7.49	97.0
SGR	0.89	0.51	1.22	32.7	2.23	0.09	9.95	118.7
TPI: $[Gallic\ acid]_{eq}$ (mg/l)								
S	145.3	127.3	184.6	11.6	277.9	199.0	384.6	19.5
SR	190.9	117.9	255.1	25.3	486.6	265.1	1334.6	54.1
SGR	204.3	173.4	248.4	14.3	517.7	319.6	709.6	21.1

**Table 3**Statistics of antioxidant activity ( $[\text{Trolox}]_{\text{eq}}$ ) and total phenolic index ( $[\text{Gallic acid}]_{\text{eq}}$ ) of aged spirits of different geographical origins.

	AA: $[\text{Trolox}]_{\text{eq}}$ (mM)				TPI: $[\text{Gallic acid}]_{\text{eq}}$ (mg/l)			
	Average	Min	Max	Variation coefficient (%)	Average	Min	Max	Variation coefficient (%)
Armagnacs	1.17	0.65	1.17	35.2	309.7	246.8	356.8	14.9
Cognacs	2.16	0.70	4.89	44.1	378.4	256.2	457.3	16.6
Spanish brandies	1.94	0.28	5.17	91.2	550.8	301.2	954.0	38.3
French brandies	0.70	0.31	1.09	78.3	277.1	231.2	322.9	16.5
South African brandies	0.90	0.16	1.85	96.7	308.7	214.0	447.9	28.5

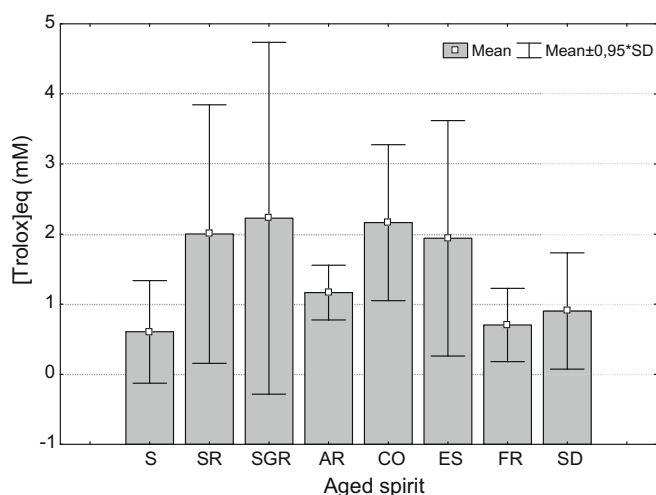
highest AA, over the sucrose type, whereas must caramels analysed presented very low values.

A correlation analysis was made between the two parameters for all the commercial brandies, and it was confirmed the polyphenolic content and antioxidant activity are closely correlated ( $r = 0.82$ ). The phenolic contents possess a lower coefficient of variation than AA for all the samples, so this seems to indicate that there are non-phenolic compounds contributing to the antioxidant activity. Several studies have found that Maillard reaction products (MRPs) known as melanoidins (soluble high molecular weight fraction, >10 kDa) show high antioxidant activity. As glucose caramels possess a deeper colour and because manufacturers prefer these over other types, this could also account for the high AA of commercial brandies, but this finding needs further investigation.

### 3.3. Aged distillates of other geographical origins

Table 3 summarises the results obtained with aged distillates of different geographical origins. Cognacs possess the highest AA, very similar to those of Solera Gran Reserva Sherry brandies (non-significant difference,  $p$ -value = 0.1406). At lower levels of AA, in decreasing order, Spanish brandies, Armagnacs, and South African brandies show no significant difference from Solera Reserva Sherry brandies; finally, French brandies show values close to those of Solera Sherry brandies. Fig. 4 shows these comparisons.

The correlation coefficient obtained for antioxidant activity and total phenolic index for these other aged spirits was 0.76. As can be seen, the relationship between the two variables is similar to that for the sherry brandy samples, as well as the lower variation coefficients of total phenolic content compared with antioxidant activity. Again, non-phenolic compounds seem to contribute to the antioxidant activity of the samples.



**Fig. 4.** Antioxidant activities of sherry brandies and aged spirits of various different geographical origins. S: Solera sherry brandies; SR: Solera Reserva sherry brandies; SGR: Solera Gran Reserva sherry brandies; ES: Other Spanish brandies; AR: Armagnacs; CO: Cognacs; FR: Other French brandies; SD: South African brandies.

## 4. Conclusions

The antioxidant activity of “Brandy de Jerez” has been studied, using both commercial and experimental samples. It is concluded that this activity is correlated with the total phenolic content. The results also suggest there is an additional contribution to antioxidant activity that could be related to the addition of caramel colouring, but this finding needs further investigation. Several other aged distillates of various different geographical origins were also studied, and their antioxidant power was compared with that of the three categories of “Brandy de Jerez”; it was found that Solera Gran Reserva shows the highest antioxidant activity of all the products considered.

## Acknowledgement

This study has been supported by the *Junta de Andalucía* (P05-AGR-00767), National Resources and Food Technology Plan, Project Ref. RTA2006-00036-C02-02.

## References

- Abdi, S., & Ali, A. (1999). Role of ROS modified human DNA in the pathogenesis and etiology of cancer. *Cancer Letters*, 142, 1–9.
- Abe, J., & Berk, B. C. (1998). Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 8, 59–64.
- Alonso, A. M., Domínguez, C., Guillén, D. A., & Barroso, C. G. (2002). Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3112–3115.
- Alonso, A. M., Guillén, D. A., & Barroso, C. G. (2003). Development of an electrochemical method for the determination of antioxidant activity. Application to grape-derived products. *European Food Research and Technology*, 216, 445–448.
- Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2001). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5736–5742.
- Brenna, O., & Pagliarini, E. (2001). Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4841–4844.
- Da Porto, C., Calligaris, S., Celotti, E., & Nicoli, M. C. (2000). Antiradical properties of commercial Cognacs assessed by the DPPH• test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4241–4245.
- De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W. C. A., & Manley, M. (2005). Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines and selected phenolic compounds: In vitro inhibition of microsomal lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 90, 569–577.
- Goldberg, D. M., Hoffman, B., Yang, J., & Soleas, G. J. (1999). Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3978–3985.
- Lefter, D. J., & Grander, D. N. (2000). Oxidative stress and cardiac disease. *The American Journal of Medicine*, 109, 315–323.
- Mosedal, J. R., & Puech, J. L. (1998). Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 95–101.
- Quiros, J. M., & Carrascal, V. (1992). Ageing Brandy de Jerez by the Solera system. In *Proceedings of the First symposium scientifique international de Cognac*. (pp. 603–609). Cognac, France.
- Renard, S., & De Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339, 1523–1526.
- Rice-Evans, C., & Packer, L. (1998). *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker.
- Tomera, J. F. (1999). Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 129–138.



## Phenolic Compounds and Furanic Derivatives in the Characterization and Quality Control of *Brandy de Jerez*

M. C. RODRÍGUEZ DODERO,\* D. A. GUILLÉN SÁNCHEZ, M. SCHWARZ RODRÍGUEZ, AND  
C. GARCÍA BARROSO

Grupo de Investigación Químico-Analítica del Vino y Productos Agroalimentarios,  
Universidad de Cádiz, Dpto. Química Analítica, Facultad de Ciencias, Campus de Puerto Real,  
Avda. República Saharaui s/n. 11510 Puerto Real, Cádiz, Spain

This article shows the results obtained in the study of the extraction profiles from oak wood to distillate of several compounds, low molecular weight phenolics, and furanic derivatives, and the relationship of their contents with those found in commercial sherry brandies and other aged distillates of different geographical origin, in order to research the utility of these analytical variables for explaining the highly specific character of *Brandy de Jerez*. Using multivariate statistic techniques, the aging system (static by *añadas*, or dynamic, well known as *Soleras y Criaderas*) has been confirmed as having a great influence on the analytical profile of aged distillates (discrimination is up to 100%). Differences between commercial brandies and those aged experimentally of equivalent average age have also been confirmed. The *Solera Gran Reserva Brandies de Jerez* show a clear differentiation from the rest of the distillates of different origin (discrimination is up to 80%), indicating their highly specific character.

**KEYWORDS:** Sherry; brandy; polyphenols; furanic derivatives; spirits

### INTRODUCTION

After the initial fermentation and distillation processes, *Brandy de Jerez* does not reach its organoleptic equilibrium until it has been aged in casks of American oak (*Quercus alba*). *Brandy de Jerez* is aged according to the traditional dynamic system known as *Soleras y Criaderas* and sometimes, additionally, by the static system known as *Añadas* (1).

During the aging period, slow physicochemical changes involving both brandy and wood take place. These changes result in radical modifications of the product, producing well-known changes in color, taste, and flavor. In this evolution, there are changes in both the composition and concentration of many compounds related to the sensorial characteristics of the brandy (2). For distillates aged in oak wood, there are descriptions in the literature of processes of direct extraction of wood components or degradation products of macromolecules of the wood, as well as reactions between the components of the distillate itself and/or those originating from the oak wood (polymerizations, esterifications, acetalizations, and hydrolysis), in addition to major oxidation processes (3–6).

In the *Soleras y Criaderas* aging system, the extraction processes are influenced by several variables: the contents of compounds in the casks, the dilution effect of mixing with younger distillates, the difference in the extractive power of the distillates (since the lower compound concentrations in the younger scales involve a greater extractive power from the casks), the different extraction kinetics of each compound, the extraction of compounds from the wine previously contained in the casks, and the

degradation compounds derived from chemical reactions such as oxidations.

Another differentiating characteristic of *Brandy de Jerez* is that the casks in which it is aged have previously contained sherry wine. This prior procedure is known as the *wining* of the casks. Butts which have previously been soaked in sherry wine give a particular personality which can be clearly appreciated in its organoleptic characteristics. The characteristics of each *Brandy de Jerez* will vary according to the type of sherry which the oak-wood casks have previously contained. They may have contained *Finos* or *Manzanillas* (straw colored and totally dry), *Amontillados* (dry but darker in color), dry or sweet *Olorosos* (darker still in color), or sweet wines such as *Pedro Ximenez* (very dark and sweet). In this way, the brandy takes on characteristics of color, bouquet, and taste from the wines which the casks have previously held, partially due to the extraction of compounds such as sugars, organic acids, furanic derivatives, and polyphenols from the wine into the cask to the distillate.

As a result, the content of brandy in some compounds, particularly phenols of low molecular weight and furanic derivatives, increases considerably during aging. Thus, although some furans and phenols as phenyl ethanol can already be found in a fresh distillate of wine (7, 8), it is considered that the maturation of the brandy in oak casks is the major factor responsible for its final polyphenolic and furaldehyde content (9).

With respect to the final product, several authors have studied the polyphenolic content of commercial spirits aged in wood (10–16), although there have been few analytical studies on *Brandy de Jerez* (12–19).

Because of the increase in counterfeit products and consumer demands for protection against fraud, producer companies and

\*Corresponding author. Fax: +34-956-016460. E-mail: maricarmen.dodero@uca.es.



**Table 1.** Analytical Parameters for the Identification and Calibration of the Compounds under Study

compound	calibration range (mg/L)	detection system	quantitation wavelengths (nm) <sup>a</sup>	retention time (min)
gallic acid	0.1–30	ultraviolet absorption	271.7	6.2
hydroxymethylfuraldehyde	0.37–372	ultraviolet absorption	283.5	10.5
furaldehyde	0.02–31	ultraviolet absorption	276.5	15.0
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	0.01–1	ultraviolet absorption	283.5	28.3
vanillic acid	0.04–3	ultraviolet absorption	261.0	30.3
methylfuraldehyde	0.02–5.4	ultraviolet absorption	291.5	30.7
caffeic acid	0.01–0.76	ultraviolet absorption	324.1	32.4
syringic acid	0.01–12	ultraviolet absorption	274.3	34.8
vanillin	0.04–12	ultraviolet absorption	281.2	35.4
syringaldehyde	0.03–9	ultraviolet absorption	308.5	38.4
<i>p</i> -coumaric acid	0.01–3	ultraviolet absorption	310.0	39.8
coniferaldehyde	0.01–1.6	ultraviolet absorption	343.2	43.1
sinapaldehyde	0.02–5	ultraviolet absorption	344.4	44.2
aesculetin	0.003–5.4	fluorescence emission	351/453	31.1
umbelliferon	(0.078–8) × 10 <sup>-3</sup>	fluorescence emission	329/455	39.1
scopoletin	0.003–2.5	fluorescence emission	347/457	40.8

<sup>a</sup> Shown are the maximum absorption wavelengths for the compounds quantified by UV and the maximum excitation and emission wavelength (ex/em) for those detected by fluorescence.

other professionals of the food and drinks industry need effective means for guaranteeing the authenticity of their products. Consequently, the reliable and objective characterization of *Brandy de Jerez* seems to be interesting as this makes it possible to differentiate a particular product analytically from all other similar products on the market, thus confirming its authenticity.

The aim of this study is to define both the extraction curves from the cask to the distillate during the aging process and the final contents of phenolic compounds and furanic derivatives, on the one hand to make a comparison between static and dynamic systems and on the other hand to describe and explain the differences from those contents in the commercial brandies.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** The ethanol (Merck, Darmstadt, Germany), methanol (Panreac, Barcelona, Spain), and acetic acid (Scharlau, Barcelona, Spain) used were of HPLC grade. Water was supplied by a Milli-Q water purifier system from Millipore (Bedford, MA, USA).

Furaldehyde, hydroxymethylfuraldehyde, coniferaldehyde, sinapaldehyde, and aesculetin were from Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Syringic acid was from Eastman Kodak (Rochester, NY) and gallic and *p*-coumaric acids from Merck (Darmstadt, Germany). Methylfuraldehyde, *p*-hydroxybenzaldehyde, vanillin, syringaldehyde, umbelliferon, scopoletin, and vanillic and caffeic acids were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Compound standards were dissolved in a model solution consisting of 40% (v/v) ethanol in water.

**Analytical Instrumentation.** The analysis was performed by HPLC using a Waters (Milford, MA, USA) chromatographic system (two 510 pumps, PCM module, 717 automatic injector, 996 photodiode array detector, 474 fluorimetric detector, and Millennium 2010 software) using an RP-18 LiChrospher column, 250 × 4 mm, 5 μm (Merck, Darmstadt, Germany).

**Methodology.** An elution gradient was used according to the method proposed by the authors (20). Briefly, two solvents were used: solvent A (5% methanol and 2% acetic acid in water) and solvent B (90% methanol and 2% acetic acid in water). The solvents were filtered through a 0.45 μm filter and degassed with He bubbling. The initial conditions were flow-rate at 1 mL/min and 100% A, reaching 90:10 (A/B) in 20 min, and 25:75 (A/B) in 60 min, the column being re-equilibrated between injections. The compounds were identified by matching the retention times and spectra (absorption UV–visible, 240–390 nm) of the standards. Comparison between data from external calibration and those obtained from the standard addition method revealed that there were no significant differences (at a significance level of 0.05) between the slopes of the calibration curves obtained using the two methods; therefore, quantification was done by external calibration using peak areas. Compounds were quantified at

their own maximum absorbance wavelength to maximize sensitivity. With respect to compounds with fluorescent properties, excitation and emission spectra were recorded and maximum wavelengths used in order to obtain the best signals. **Table 1** shows the compounds identified and quantified.

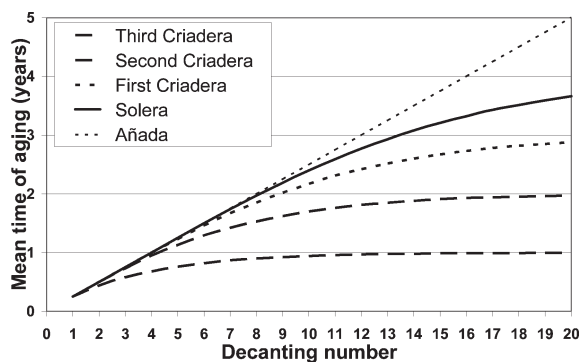
A volume of 50 μL of the samples, previously filtered through nylon filters of 0.45 μm (Scharlab, Barcelona, Spain), was injected in all of the cases. *Statistica* software v. 4.5 (StatSoft, Inc. 1993) was used for the treatment of results.

**Samples.** Three types of samples were studied. First of all, an experimental aging system was set up in Jerez Viticulture and Enology Centre for the analytical monitoring of brandy aging. It consisted of 15 American oak casks of 500 L capacity each, medium toasting. Twelve of the casks were used to age brandy according to the dynamic system of *Soleras y Criaderas* (traditionally used in the denomination of origin area), in groups of three casks for each aging scale. These are differentiated according to their mean time of aging: The *Solera* scale, designated S, was the oldest; the first *criadera* (F), the next oldest; the second *criadera* (C), the next; and the third *criadera* (T), the youngest. The other three casks held the same new distillate but for static aging according to the system of *Añadas* (A). All of the casks had previously contained sherry wine type *Oloroso* for at least 3 years, as established in the regulations for the manufacture of *Brandy de Jerez*.

The four scales contained distillate with a 40% v/v graduation. Programmed decantings every 3 months involved first drawing off one-fourth (125 L) of the total volume of brandy held in each of the casks of the oldest *Solera* scale. Then, a similar proportion of the volume held in the first *criadera* casks was drawn off; these amounts (from the first *criadera* casks) were then mixed together, divided into three parts, and used to refill the three *Solera* casks to their original volume. This procedure of partially refilling older casks with younger brandy drawn off the preceding scale is repeated through all of the aging scales of the system. In the final decanting, the youngest scale (the third *criadera* in this system) is refilled with new distillate from the distillery, supplied by the Regulatory Commission for the Specific Denomination of *Brandy de Jerez*.

Sampling was carried out every 3 months in the dynamic system, taking advantage of the operations of drawing-off and refilling. Small sample volumes (20 mL) were obtained from the product after the mixing of the partial volumes drawn off the three casks belonging to the same scale, which thus constitutes a representative average of the whole scale.

The three casks used for the *Añadas* were filled with the same new distillate and at the same time as the casks of the dynamic system. The only product drawn off from these static system casks was that needed for sampling (20 mL). In the static system, the sample was drawn directly from the casks with a pipe. Finally, the sample was obtained by mixing the aliquots from the three casks of the static system. A similar arrangement but on a larger scale was used for the drawing-off and refilling operations in the dynamic system. Experimental aging was carried out for 5 years (or 20 decantings).



**Figure 1.** Evolution of the mean time of aging in the experimental system of dynamic aging by *Soleras y Criaderas*. (— — —) Third Criadera; (— · —) second Criadera; (· · ·) first Criadera; (————) Solera; (- - -) Añada.

An average time of aging arises as a consequence of the drawing-off and refilling operations in the dynamic system and indicates the average time that all of the brandy contained in a certain cask has been aged. It can be assessed for each sample using sampling dates and the calculation formula (21). To calculate this parameter, the number of decantings in a year, the total system volume, the volume of each decanting, and the number of scales were the variables considered. The graph relating the average time of aging and the decanting number for each of the four aging scales (Figure 1) reveals their aging aims: 4 years for the *Solera* scale, 3 years for the first *Criadera*, 2 years for the second, and 1 year for the third *Criadera*.

In a second part, the study covered a total of 64 commercial samples of *Brandy de Jerez*, of which 21 were of the *Brandy de Jerez Solera* (S) type, 18 were of the *Brandy de Jerez Solera Reserva* (SR) type, and 25 were of the *Brandy de Jerez Solera Gran Reserva* (SGR) type. The sampling represented brandies of 100% of the producers registered with the Regulatory Council and a coverage of all products sold approaching 90%. The authenticity of the commercial brandies used in this study was guaranteed by the Regulatory Council for the Specific Denomination of *Brandy de Jerez*.

Finally, another 35 commercial bottled brandies were included in the study, all acquired in the market; of these, 12 are from different regions of Spain without quality denomination, 19 are French products (11 Cognacs, 4 Armagnacs, and 4 without quality denomination), and 4 are from South Africa.

**Statistical Studies.** External calibrations were obtained using ALAMIN (22), which is a DOS program that establishes the performance characteristics of the analytical method from the calibration data set. ANOVA and multivariate analysis of data included principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA) performed using the statistical computer package Statistica 7.0 (Tulsa, OK, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Pilot Scale Systems of Dynamic and Static Aging.** From the extraction curves given as Figure 2 several points can be made. The initial rise in the concentrations (common to all of the compounds studied) is produced by the predominance of the extraction phenomenon over the dilution effect resulting from the addition of the younger distillate. This situation changes after a certain number of decantings, and the concentrations tend to stabilize and/or decrease slightly.

At the date of termination of the experiment (5 years), the third and second scales have entered the phase of apparent exhaustion of the wood for most of the compounds. This phase is defined as the state in which the supply from the wood is not capable of compensating for the dilutions of the drawing-off/refilling operations. The explanation for this exhaustion is that the third *Criadera* is refilled with new distillate with a greater extractive power than those aged because it is not saturated in compounds

from the casks. However, the first scale and the *Solera* scale have stabilized their content in most of the polyphenols. As can be observed, the decanting at which stabilization is reached is more advanced for the scales of greater age.

In compounds such as caffeic and *p*-coumaric acids, very intense initial extractions take place, followed by a sharp decline; therefore, we hypothesized about these compounds originating mainly from the wine previously held by the cask: the operation of wining the casks facilitates the occlusion of these species in the pores of the wood or their coprecipitation with tartaric acid in forms that are not chemically bound, which promote a rapid extraction kinetic.

Some other compounds derived from the thermal degradation of wood (hydroxymethylfuraldehyde, furaldehyde, coniferaldehyde, and sinapaldehyde) show a great difference among the scales at decanting number one. This fact could be due to these compounds being very affected by the toasting intensity of casks (23, 24), which is carried out in a traditional way that involves some variation.

It can also be observed that, over the passage of time, the scales tend to be ranked from higher to lower levels of concentration, in the direction S, F, C, and T, and that this relative classification coincides with that of the average periods of aging, the evolution of which is shown in Figure 1. Finally, the syringic compounds (acid and aldehyde), together with furaldehyde and gallic acid, are of most importance quantitatively.

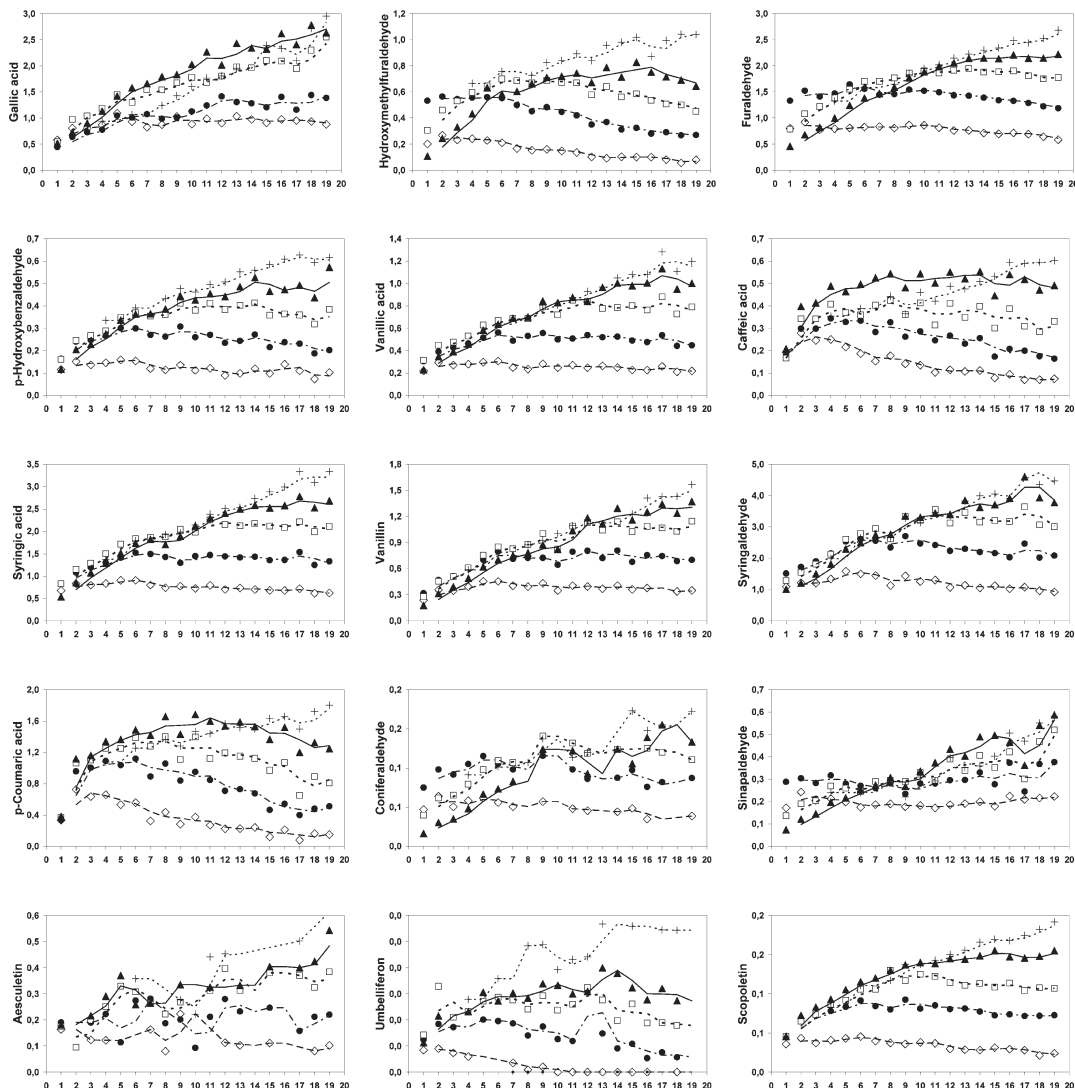
As a summary of the extraction curves, the maximum contents reached in each scale, together with the decanting number, are given in Table 2. As can be seen, the contents of the analyzed compounds in the distillate increase with mean time of aging.

With respect to the brandy aged according to the static system of *Añadas*, increasing contents for most of the compounds are observed over the entire course of the experiment, although the kinetic is slower in the samples from the later decantings. When this evolution is compared with that of the *Solera* scale (S), an overlap becomes evident, which is more or less pronounced according to the compound; this can be seen until approximately the end of the third year (decanting number 12), when the concentrations in the *Añada* exceed those of the *Solera* scale. This continuous growth in the concentration of compounds from the *Añada* could allow producers to obtain brandies with a character of greater age than those from the dynamic system, in which the concentrations in the brandy stabilize at a particular point in time.

Since the samples of the same average age extracted from the *Solera* scale and the *Añada* system presented similar concentrations, a study was conducted to determine if they could be differentiated statistically. Samples extracted from *Solera* and *Añada* were classified according to the commercial category that would correspond to them in the function of its average time of aging: a minimum of 1 year for the *Solera Reserva* (SR) and 3 years for the *Solera Gran Reserva* (SGR). The LDA shows a 100% differentiation for the samples of age corresponding to both the SR and the SGR, with syringic and gallic acids selected as the variables with the best power of discrimination; these results confirm the findings reported by some authors (25).

Therefore, significant differences have been observed in the composition of brandies of equivalent age, between those aged by the *Añadas* system and others aged by the *Soleras y Criaderas* system; therefore, the influence of the type of aging system on the profiles of the distillates is confirmed. The existence of such differences could be relevant for setting quality standards.

One interesting aspect of the system of *Soleras y Criaderas* is that the final brandy tends to become homogenized in character due to the periodical mixing operations performed during the



**Figure 2.** Time evolution curves of the compounds under study during the assay of experimental aging by *Añadas* and *Soleras y Criaderas*: (—◇—) Third Criadera; (—●—) second Criadera; (—□—) first Criadera; (—▲—) Solera; (—+—) *Añada*. X-Axis is the decanting number. Y-Axis is the concentration of each compound expressed in mg/L.

**Table 2.** Maximum Contents (mg/L) of the Compounds Analyzed in the Experimental Aging Assay<sup>a</sup>

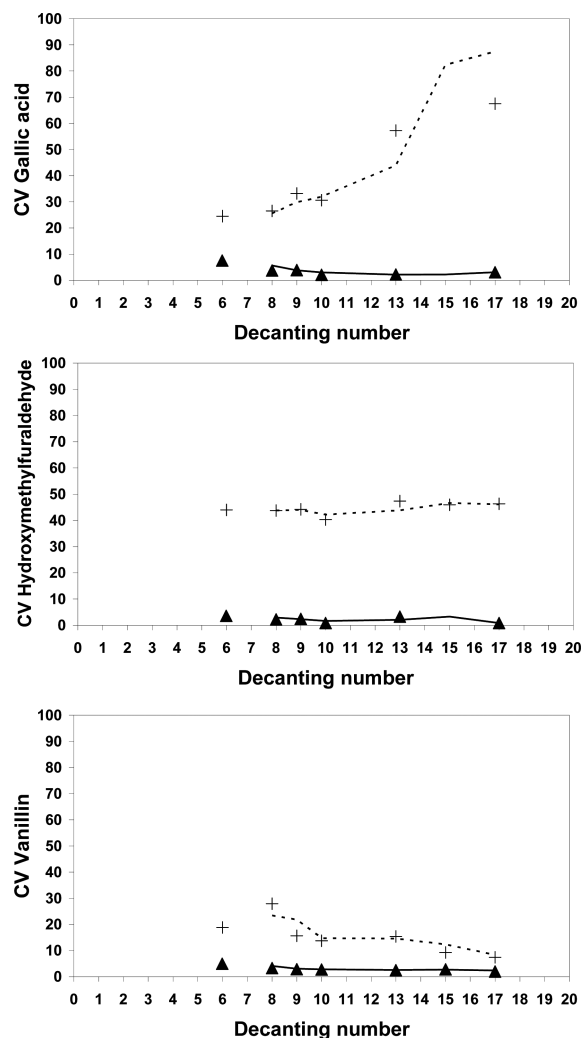
	third <i>Criadera</i>	second <i>Criadera</i>	first <i>Criadera</i>	<i>Solera</i>	<i>Añada</i>
gallic acid	1.09 (5)	1.44 (12)	2.55 (19)	2.78 (18)	2.95 (19)
hydroxymethylfuraldehyde	0.27 (2)	0.56 (5)	0.70 (6)	0.83 (15)	1.04 (19)
furaldehyde	0.92 (2)	1.64 (5)	1.95 (13)	2.22 (19)	2.68 (19)
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	0.16 (5)	0.31 (9)	0.41 (14)	0.57 (19)	0.63 (17)
vanillic acid	0.31 (6)	0.56 (9)	0.88 (17)	1.13 (17)	1.28 (17)
caffeic acid	0.28 (2)	0.34 (4)	0.43 (8)	0.55 (14)	0.60 (16)
syringic acid	0.91 (6)	1.54 (11)	2.26 (11)	2.78 (17)	3.34 (19)
vanillin	0.46 (6)	0.81 (14)	1.15 (19)	1.37 (19)	1.57 (19)
syringaldehyde	1.59 (5)	2.71 (9)	3.65 (17)	4.61 (17)	5.12 (17)
<i>p</i> -coumaric acid	0.73 (2)	1.12 (6)	1.40 (8)	1.69 (10)	1.80 (19)
coniferaldehyde	0.06 (5)	0.12 (9)	0.14 (9)	0.16 (17)	0.17 (19)
sinapaldehyde	0.24 (2)	0.38 (19)	0.52 (19)	0.59 (19)	0.58 (19)
aesculetin	0.22 (9)	0.28 (7)	0.40 (12)	0.54 (19)	0.61 (18)
umbelliferon × 10 <sup>3</sup>	0.45 (2)	0.10 (5)	0.16 (12)	0.20 (13)	0.28 (13)
scopoletin	0.05 (6)	0.09 (9)	0.13 (8)	0.16 (19)	0.19 (19)

<sup>a</sup> In parentheses are the decanting numbers in which each scale reached the maximum value.

successive decantings and refillings. To confirm this, in some decantings, samples were taken individually from the three casks of both *Solera* scale and *Añada*. By way of example, **Figure 3** shows the graphs of evolution of the coefficients of variation

between the casks for gallic acid, hydroxymethylfuraldehyde, and vanillin. As can be observed, the variability is always greater between the casks that constitute the *Añada* than between those that constitute the *Solera*, which also presents a tendency to

diminish. In contrast, the variability in the *Añada* does not follow a clear trend for all of the compounds: some, like gallic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, or scopoletin, increase; some, like hydroxymethylfuraldehyde, syringaldehyde, or coniferaldehyde



**Figure 3.** Time evolution of the coefficients of variation (CV) of the concentrations between casks of the same aging scale. (—▲—) Solera; (- + -) Añada.

**Table 3.** Statistics of the Compounds in the Commercial *Brandies de Jerez*<sup>a</sup>

	Solera				Solera Reserva				Solera Gran Reserva				p-value
	mean	min	max	SD	mean	min	max	SD	mean	min	max	SD	
gallic acid	0.72	0.00	2.76	0.80	2.71	0.00	7.48	2.43	4.26	0.00	9.22	2.59	0.26
hydroxymethylfuraldehyde	18.04	1.97	53.67	10.79	42.82	5.36	149.18	41.50	58.12	15.65	191.09	41.01	0.40
furaldehyde	0.49	0.19	1.27	0.26	1.66	0.44	3.62	0.99	3.19	0.27	7.91	1.79	0.18
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	0.07	0.00	0.19	0.07	0.23	0.00	0.66	0.18	0.43	0.14	0.98	0.27	0.52
vanillic acid	0.11	0.00	0.31	0.11	0.49	0.02	1.71	0.45	1.30	0.39	2.83	0.70	0.11
methylfuraldehyde	0.11	0.00	0.25	0.05	0.15	0.00	0.36	0.08	0.24	0.00	0.52	0.13	0.77
syringic acid	0.20	0.00	0.63	0.23	1.17	0.00	4.42	1.12	2.78	0.70	7.22	1.72	0.21
vanillin	0.86	0.00	4.07	1.01	2.45	0.46	5.94	1.80	2.66	0.67	5.80	1.48	0.30
syringaldehyde	0.38	0.00	1.26	0.46	2.20	0.20	10.59	2.51	4.59	0.84	10.77	2.61	0.26
<i>p</i> -coumaric acid	0.08	0.00	0.55	0.14	0.21	0.00	1.17	0.29	0.46	0.00	2.00	0.52	0.45
coniferaldehyde	0.06	0.00	0.20	0.06	0.12	0.00	0.48	0.14	0.18	0.05	0.35	0.08	0.66
sinapaldehyde	0.04	0.00	0.19	0.06	0.07	0.00	0.51	0.12	0.12	0.00	0.39	0.11	0.71
aesculetin	0.15	0.00	1.11	0.25	0.75	0.00	2.10	0.71	2.32	0.51	9.17	2.29	0.75
umbelliferon × 10 <sup>3</sup>	0.20	0.00	3.18	1.10	0.36	0.00	2.08	0.71	1.08	0.06	2.62	0.82	0.39
scopoletin	0.01	0.00	0.06	0.02	0.06	0.01	0.19	0.06	0.20	0.02	2.36	0.47	0.18

<sup>a</sup> Values are in mg/L.

stay constant; and others, like vanillin, furaldehyde, or vanillic syringic, caffeic acid, or *p*-coumaric acids decrease.

Last, it was considered of interest to study the possibility of discriminating between the samples according to the commercial category that would correspond to the sample as a function of its average time of aging: a minimum of 6 months for the *Solera* (S), 1 year for the *Solera Reserva* (SR), and 3 years for the *Solera Gran Reserva* (SGR). Thus, using the variables previously selected by PCA, a global classification of 91% is obtained by application of LDA, with the following identified as the most discriminant variables, in this order: sinapaldehyde, *p*-coumaric acid, gallic acid, vanillin, and syringaldehyde.

**Commercial Brandies de Jerez.** Table 3 gives the mean values for each of the species by commercial categories and also for the samples as a whole. The mean values show increases passing from the S to the SR group and from the SR to the SGR group, although the high variability (SD) within each group does not allow the statistical differentiation of the types with any of the compounds ( $p > 0.05$  in all of the cases). It should be recalled in this context that the typification of the brandies is based on the criterion of a minimum time of aging. Quantitatively, the most important species are hydroxymethylfuraldehyde, followed by gallic acid, furaldehyde, and the benzoic aldehydes syringaldehyde and vanillin.

Finally, a study was made of the possibility of differentiating in a multivariate way the commercial types of *Brandy de Jerez*, which would be of interest to producers for quality control. The LDA selects the following as the most significant compounds, in decreasing order of discriminant capacity: vanillic acid, furaldehyde, scopoletin, syringaldehyde, vanillin, *p*-coumaric acid, hydroxymethylfuraldehyde, and *p*-hydroxybenzaldehyde. It was observed that the SR samples, with a correct classification of about 57%, overlap with the S and SGR categories. The reason for this overlapping is that the average times characterizing the different categories of *Brandy de Jerez* are minimum times, and this would also explain the greater dispersion seen for the SGR group, which is aged the longest.

**Aged Distillates of Different Geographic Origins.** The mean values for each species are given in Table 4, and several findings can be reported from their analysis in comparison with the contents in the commercial *Brandies de Jerez* (Table 3). For almost all of the compounds, the lowest contents are found in the French brandies, whereas the highest concentrations are seen in either Cognacs or SGR, according to the species. For most of the compounds, the S brandies present lower concentrations than

**Table 4.** Statistics of the Compounds in the Distillates of Different Geographic Origin<sup>a</sup>

	Spanish brandies				South African brandies				French brandies			
	mean	min	max	SD	mean	min	max	SD	mean	min	max	SD
gallic acid	5.04	0.00	29.11	8.94	1.04	0.00	2.07	1.47	0.00	0.00	0.00	
hydroxymethylfuraldehyde	26.83	11.17	64.78	17.35	18.86	1.00	30.99	13.00	24.87	11.13	55.42	20.74
furaldehyde	2.84	0.25	15.24	4.36	5.15	2.22	8.52	2.90	1.18	0.77	1.28	0.51
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	0.19	0.00	0.75	0.21	0.13	0.00	0.29	0.12	0.01	0.00	0.03	0.01
vanillic acid	0.50	0.00	1.95	0.54	0.47	0.13	0.87	0.33	0.06	0.00	0.10	0.04
methylfuraldehyde	0.26	0.06	0.70	0.19	0.24	0.13	0.32	0.10	0.10	0.07	0.10	0.01
syringic acid	1.20	0.07	3.94	1.19	1.15	0.35	1.92	0.76	0.06	0.00	0.14	0.07
vanillin	2.87	0.03	10.30	3.56	1.07	0.51	1.65	0.53	0.05	0.00	0.07	0.03
syringaldehyde	2.48	0.10	8.20	2.51	1.97	0.59	3.30	1.33	0.23	0.19	0.26	0.03
<i>p</i> -coumaric acid	0.18	0.00	0.47	0.18	0.02	0.00	0.07	0.04	0.00	0.00	0.00	
coniferaldehyde	0.27	0.00	0.49	0.28	0.17	0.08	0.29	0.10	0.02	0.00	0.05	0.02
sinapaldehyde	0.28	0.00	1.03	0.30	0.11	0.00	0.29	0.13	0.08	0.03	0.21	0.08
aesculetin	1.02	0.00	4.51	1.36	0.91	0.20	2.20	0.89	0.05	0.00	0.09	0.04
umbelliferon × 10 <sup>3</sup>	0.89	0.00	4.00	1.36	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	
scopoletin	0.07	0.00	0.17	0.07	0.04	0.01	0.08	0.03	0.01	0.00	0.01	0.00

	Cognacs				Armagnacs			
	mean	min	max	SD	mean	min	max	SD
gallic acid	5.74	3.27	7.91	1.45	5.86	3.08	7.61	1.97
hydroxymethylfuraldehyde	15.91	9.78	24.03	4.54	26.51	7.89	43.05	17.56
furaldehyde	8.68	5.34	14.62	3.11	10.58	2.32	34.05	15.66
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	0.05	0.00	0.13	0.05	0.03	0.00	0.07	0.03
vanillic acid	0.29	0.00	0.81	0.22	0.28	0.20	0.39	0.08
methylfuraldehyde	0.39	0.14	1.01	0.31	0.15	0.12	0.18	0.03
syringic acid	0.86	0.00	2.24	0.65	0.80	0.43	1.34	0.40
vanillin	0.60	0.23	1.59	0.38	0.54	0.44	0.77	0.15
syringaldehyde	1.62	0.48	5.48	1.47	1.13	0.85	1.82	0.46
<i>p</i> -coumaric acid	0.00	0.00	0.00		0.02	0.00	0.07	0.04
coniferaldehyde	0.36	0.03	1.29	0.44	0.13	0.06	0.21	0.07
sinapaldehyde	0.72	0.04	3.91	1.15	0.31	0.20	0.49	0.13
aesculetin	0.67	0.10	1.75	0.43	0.77	0.55	1.06	0.21
umbelliferon × 10 <sup>3</sup>	0.62	0.00	1.00	0.52	0.75	0.00	1.00	0.50
scopoletin	0.03	0.01	0.06	0.01	0.03	0.03	0.04	0.00

<sup>a</sup> Values are in mg/L.**Table 5.** Comparison of the Mean Contents (mg/L) of the Compounds in the Commercial *Brandies de Jerez* against the Distillates Aged in the Experimental System of *Soleras y Criaderas*, of Equivalent Age to the Respective Commercial Categories

	<i>Solera</i>		<i>Solera Reserva</i>		<i>Solera Gran Reserva</i>	
	experimental	comercial	experimental	comercial	experimental	comercial
gallic acid	0.91	0.72	1.44	2.71	2.51	4.26
hydroxymethylfuraldehyde	0.34	18.04	0.45	42.82	0.70	58.12
furaldehyde	1.01	0.49	1.44	1.66	2.11	3.19
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	0.20	0.07	0.29	0.23	0.48	0.43
vanillic acid	0.37	0.11	0.58	0.49	0.98	1.30
caffeic acid	0.29	0.00	0.30	0.00	0.48	0.00
syringic acid	1.01	0.20	1.55	1.17	2.54	2.78
vanillin	0.45	0.86	0.77	2.45	1.24	2.66
syringaldehyde	1.57	0.38	2.45	0.38	2.45	2.20
<i>p</i> -coumaric acid	0.82	0.08	0.89	0.21	1.32	0.46
coniferaldehyde	0.06	0.06	0.09	0.12	0.13	0.18
sinapaldehyde	0.21	0.04	0.29	0.07	0.48	0.12
aesculetin	0.10	0.15	0.24	0.75	0.39	2.32
umbelliferon × 10 <sup>3</sup>	0.07	0.21	0.09	0.36	0.16	1.1
scopoletin	0.06	0.01	0.09	0.06	0.14	0.20

the other distillates (except for the French brandies), while the concentrations found in the SR are similar to those of the other Spanish brandies. These values are more widely dispersed, probably due to the differences of their geographic origin within the Spanish territory.

**Joint Analysis of the Samples.** The comparison by categories of the mean contents in commercial brandies with those of

the samples from the pilot aging system of equivalent average age reported in the first part of this article is summarized in **Table 5**. There are few qualitative differences. Caffeic acid was not detected in the commercial *Brandies de Jerez*, whereas 2-methylfuraldehyde gave a signal. Some of the compounds (hydroxymethylfuraldehyde, vanillin, umbelliferon, and aesculetin) are found at much higher concentrations in the commercial brandies

**Table 6.** LDA of Commercial *Brandies de Jerez* and Aged Distillates of Different Geographic Origin<sup>a</sup>

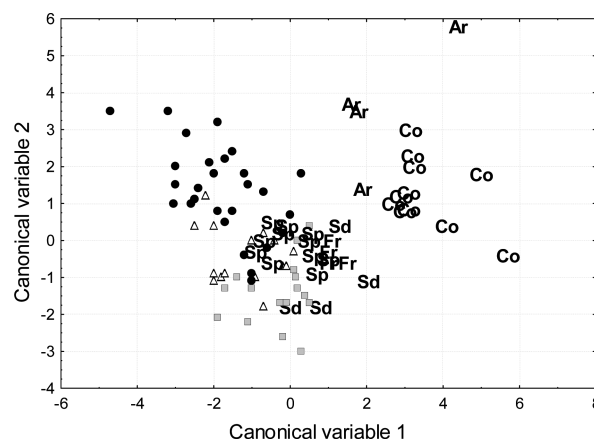
	% correct classification	South African brandies	French brandies	Armagnacs	Spanish brandies	Cognacs	S	SR	SGR
South African brandies	100.0	4	0	0	0	0	0	0	0
French brandies	0.00	0	0	0	0	0	4	0	0
Armagnacs	75.0	0	0	3	0	1	0	0	0
Spanish brandies	58.3	0	0	0	7	1	4	0	0
Cognacs	90.9	1	0	0	0	10	0	0	0
<i>Solera</i>	85.7	0	0	0	1	0	18	2	0
<i>Solera Reserva</i>	58.8	0	0	0	0	0	6	10	1
<i>Solera Gran Reserva</i>	80.0	0	0	0	0	0	3	2	20
total	73.5	5	0	3	8	12	35	14	21

<sup>a</sup> Classification matrix.

than in the distillates from the aging assay, such that the quantities present in the commercial type S already exceed those present in the distillate aged for an average time of more than 3 years. Hydroxymethylfuraldehyde is found in caramel coloring, and vanilla is the principal component of the aromatic extract of vanilla pods; the addition of both of these products is authorized (*quantum Satis* dose) in the final phase of production of *Brandy de Jerez*, as part of the strategy for the definition of this type of brandy.

For their part, the quantities of *p*-coumaric and caffeic acids are clearly lower in the commercial samples, in all three categories; this could reflect the evolution patterns of rapid extraction until exhaustion, characteristic of the origin of these compounds in cask wining, which was put forward as a hypothesis. Similarly, these cask wining operations typical of Jerez, which have been taken as a guideline by brandy producers in the rest of the peninsula, could explain the differences in the concentrations of caffeic and *p*-coumaric acid already described between the Spanish brandies and the rest of the distillates. With respect to the rest of the species, their relative contents vary according to the category. Among the *Soleras*, in general the concentrations are higher in the commercial brandies; while in the *Solera Gran Reserva* group, brandies aged experimentally present the highest values. The *Solera Reserva* brandies, however, are different in not presenting a clear tendency in this respect. However, the variability in the length of the useful life of casks in each winery could affect the profiles of phenolic and furfural compounds of the *Brandies of Jerez* on the market.

In addition, the classification obtained by LDA that is given in **Table 6** and presented graphically in **Figure 4** shows a Spanish brandy partially overlapped by the *Soleras of Jerez*. The identity of three of these samples that overlap, represented by a code during the course of the study, reveals a production process in which aging is performed by *Soleras y Criaderas*, which could be an explanation for the statistical similarity described. Among the Spanish brandies, the one that is classified as Cognac is the only one that shows an aging pattern in accordance with the tendencies of this French denomination of origin. The French brandies without denomination of origin are also found to show coincidences with the *Solera Brandies de Jerez*. The reason for this coincidence is that, when a brandy is introduced into the aging system, whether static or dynamic, a minimum time is required for it to acquire its own characteristics. The South African products are classified in a group of their own, but located in the area close to the *Solera* brandies. Armagnacs and Cognacs present a very good differentiation, both from the rest and from each other, even given the dispersion within each group. With respect to those of Jerez, the overlapping of the SR with the S and SGR groups, discussed above, is repeated; this makes it difficult to differentiate completely between the commercial categories. It should, however, be noted that the SR and SGR types, together, can be differentiated completely from the rest of



**Figure 4.** LDA of commercial *Brandies de Jerez* and aged distillates of different geographic origin. Projection of the samples in terms of the canonical variables. Sd, South African brandy; Fr, French brandy; Ar, Armagnac; Co, Cognac; Sp, Spanish brandy; shaded square, *Brandy de Jerez Solera*;  $\Delta$ , *Brandy de Jerez Solera Reserva*;  $\bullet$ , *Brandy de Jerez Solera Gran Reserva*.

the aged distillates, thus pointing to the distinctive and exclusive character of these brandies.

If an imaginary horizontal line is traced that intercepts the second canonical variable by the origin, the set of samples are divided into two subgroups, the upper one of which includes the French denominations of origin, the *Solera Gran Reserva* and some of the *Solera Reserva* brandies; a correlation with quality can, therefore, be attributed to this function. Among the most discriminant variables, the statistical technique selects vanillic acid, coniferaldehyde, sinapaldehyde, and furaldehyde; this last compound is identified in the base distillate, which suggests that it could be considered a characteristic that marks the quality of the distillates used in the production of *Brandy de Jerez*.

In conclusion, a similarity is observed between the *Solera Brandies de Jerez* and some of the other Spanish brandies aged according to the system of *Soleras y Criaderas*, and with the French brandies without denomination of origin. The SR and SGR *Brandies de Jerez* similarly show a clear differentiation from the rest of the distillates of different origin, indicating their highly specific character.

#### ABBREVIATIONS USED

S scale, *Solera* scale; F, first *Criadera*; C, second *Criadera*; T, third *Criadera*; A, *Añada*; S brandy, brandy *Solera*; SR brandy, brandy *Solera Reserva*; SGR, brandy *Solera Gran Reserva*; Sp, Spanish brandy; Sd, South African brandy; Fr, French brandy; Ar, Armagnac; Co, Cognac; PCA, principal component analysis; LDA, linear discriminant analysis.

## ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to the Regulatory Council for the Specific Denomination of *Brandy de Jerez* for providing the samples.

## LITERATURE CITED

- (1) Reglamento de la Denominación Específica Brandy de Jerez. Orden 1989/1303. *BOE n° 142 de 5 de junio 1989*.
- (2) Serrano, J. Sensory analysis of sherry brandy. *Brandy de Jerez* **1995**, 6 (14), 10–11.
- (3) Litchev, V. Influence of oxidation processes on the development of the taste and flavour of wine distillates. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, 40 (1), 31–35.
- (4) Onishi, M. J.; Guymon, J. F.; Crowell, A. Changes in some volatile constituents of brandy during aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **1977**, 28, 192–198.
- (5) Nishimura, K.; Ohnishi, M.; Masuda, M.; Koga, K.; Matsuyama, R. Reactions of Wood Components during Maturation. In *Flavour of Distilled Beverages: Origin and Development*; Piggott, J. R., Ed.; Ellis Horwood Ltd., Chichester, U.K., 1983.
- (6) Martínez, C.; Rodríguez, M. C.; Guillén, D. A.; Barroso, C. G. Sugar contents of Brandy de Jerez during its aging. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1058–1064.
- (7) Peña y Lillo, M.; Agosin, E.; Belancic, A.; Latrille, E. Chemical markers for tracking the sensory contribution of production stages in Muscat wine distillates. *J. Food Sci.* **2005**, 70 (7), s432–s441.
- (8) Nykänen, L. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.* **1986**, 37 (1), 84–96.
- (9) Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Role of simple lignin phenolics in spirits (brandies and cognacs) aged in oak wood. *R. Res. Dev. Agric. Food Chem.* **1999**, 3 (1), 423–433.
- (10) Puech, J. H.; Rabier, P.; Segur, M. C.; Bertrand, A. Les composés issus du bois de chene dans les V.S.O.P. d'Armagnac analyse et degustation. *1er Symposium International sur les Eaux-de-Vie Traditionnelles d'Origine Viticole*, Bordeaux, France, **1990**.
- (11) Cantagrel, R.; Vidal, J. P. Connaissance Analytique des spiritueux, possibilités de caractérisation de leur origine. *XX Congreso mundial de la Viña y el Vino and 72a Asamblea general de la O.I.V.*, Madrid, La Rioja, España, **1992**.
- (12) Goldberg, D. M.; Hoffman, B.; Yang, J.; Soleas, G. J. Phenolic constituents, furans and total antioxidant status of distilled spirits. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3978–3985.
- (13) Rodríguez, R.; Blanco, D.; Mangas, J. Characterization of cider brandy on the basis of aging time. *J. Food Science* **2003**, 68 (6), 1958–1961.
- (14) Mangas, J.; Rodríguez, R.; Moreno, J.; Suárez, B.; Blanco, D. Furanic and phenolic composition of cider brandy. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45 (10), 4076–4079.
- (15) Canas, S.; Casanova, V.; Belchior, A. P. Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *J. Food Comp. Anal.* **2008**, 21, 626–633.
- (16) Piggott, J. R.; Conner, J. M. Whisky, Whiskey and Bourbon. Composition and Analysis of Whisky. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 6178–6183; Caballero, B., Ed. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B782R-4B4YJ1Y-11V/2/2b6ba5cc762dd5c3278c3c65811f32d2>.
- (17) Hitos, P.; Pons, A.; Hinojosa, M. I. M.; Lomborolero, J.; Camacho, S.; Dopena, P. Étude sur la caractérisation analytique du. *Brandy de Jerez. Bulletin de l'O. I. V* **1995**, 775–776, 745–760.
- (18) Schwarz, M.; Rodríguez, M. C.; Guillén, D. A.; Barroso, C. G. Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in *Brandy de Jerez*. *J. Sep. Sci.* **2009**, 32, 1782–1790.
- (19) Delgado, T.; Gómez-Cordovés, C.; Villarroya, B. Relationships between phenolic compounds of low molecular weight as indicators of the aging conditions and quality of brandies. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, 41 (4), 342–345.
- (20) Barroso, C. G.; Rodríguez, M. C.; Guillén, D. A.; Pérez-Bustamante, J. A. 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, 125–129.
- (21) Quirós, J. M.; Carrascal, V. Ageing *Brandy de Jerez* by the Solera system. *1er Symposium Cientifique International de Cognac*, Cognac, France, **1992**.
- (22) García, A. M.; Cuadros, L.; Alés, F.; Román, M. ALAMIN: a chemometric program to check analytical method performance and to assess the trueness by standard addition methodology. *Trends Anal. Chem.* **1997**, 16, 381–385.
- (23) Artajona, J.; Barbero, E.; Llobet, M.; Marco, J.; Parente, F. Influence du bousinage de la barrique sur les qualités organoleptiques des brandies vieillis en futs de chene. *1er Symposium International sur les Eaux-de-Vie Traditionnelles d'Origine Viticole*, Bordeaux, France, **1991**.
- (24) Trillo, L. M.; Álvarez, M. L.; Pinedo, J. M.; Casas, J. A.; Maiquez, E. G. Evolución de la composición química de los aguardientes vínicos durante el proceso de envejecimiento mediante el sistema de criaderas y soleras. *GIE Conference*, El Puerto de Santa María, Cádiz, Spain, **1997**.
- (25) Grandal, M.; Díez, J.; Gómez, J.; Perdigonés, F. Evolución de la composición del *Brandy de Jerez* en el sistema de solera. *GIE Conference*, El Puerto de Santa María, Cádiz, Spain, **1997**.

---

Received for review August 23, 2009. Revised manuscript received November 16, 2009. Accepted November 21, 2009. This study has been supported by Spanish Government (National Resources and Food Technology Plan, Project ref. RTA2006-00036-C02-02).