

**Estudo da composición fenólica da
caste Albariño (*Vitis vinifera*, L.) na
Denominación de Orixe Rías Baixas**

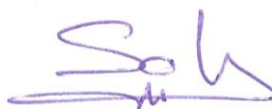
Universidade de Vigo



Sol Ángel Zamuz Castro
Tese de Doutoramento, 2013

**Estudo da composición fenólica da caste
Albariño (*Vitis vinifera*, L.) na
Denominación de Orixe Rías Baixas**

Memoria para optar ao título de
Doutora pola Universidade de Vigo,
presentada por:



Sol Ángel Zamuz Castro

Pontevedra, 14 de decembro de 2012

ANTÓN MASA VÁZQUEZ, Científico Titular do CSIC e responsábel do grupo de Viticultura I na Misión Biolóxica de Galiza,

CERTIFICO:

Que a presente Tese de Doutoramento, titulada “**Estudo da composición fenólica da caste Albariño (*Vitis vinifera*, L.) na Denominación de Orixe Rías Baixas**”, que presenta Dna. Sol Ángel Zamuz Castro para optar ao Grao de Doutora pola Universidade de Vigo, foi realizada baixo a miña dirección na Misión Biolóxica de Galicia (CSIC), e estando concluída, autorizo a súa presentación para que poida ser avaliada polo Tribunal correspondente.

E para que conste, asino en Pontevedra, a 14 de decembro de 2012.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Sol Ángel Zamuz Castro', written over a horizontal line.

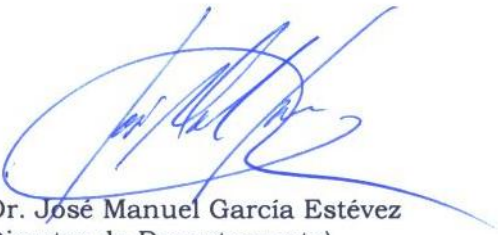
CARMEN SIEIRO VÁZQUEZ, Catedrática de Microbioloxía do Departamento de Bioloxía Funcional e Ciencias da Saúde da Universidade de Vigo

CERTIFICO:

Que Dna Sol Ángel Zamuz Castro realizou o traballo titulado “**Estudo da composición fenólica da caste Albariño (*Vitis vinifera*, L.) na Denominación de Orixe Rías Baixas**” na Misión Biolóxica de Galicia (CSIC), baixo a dirección do Dr. Antón Masa Vázquez, e que estando concluído, en calidade de Titora, autorizo a súa presentación como Tese de Doutoramento na Universidade de Vigo.

E para que conste, asino en Vigo, a 14 de decembro de 2012


Fdo. Dra. Carmen Sieiro Vázquez


VºBº: Dr. José Manuel García Estévez
(Director do Departamento)

O traballo de investigación recollido nesta Memoria foi realizado durante catro anos no grupo de Viticultura do Departamento de Recursos Fitoxenéticos da Misión Biolóxica de Galicia (CSIC) coa colaboración das adegas, que facilitaron de forma desinteresada os seus mostos, e grazas á financiación da Xunta de Galicia concedida a través dos proxectos PGIDIT06RAG018E, 07MRU016403PR e PGIDIT07TAL020E.

Os resultados acadados ao longo destes anos, teñen dado lugar aos seguintes traballos de investigación:

Capítulos de libros:

Zamuz S., Vilanova M. e Masa A. (2009). Determinación de la composición fenólica en mostos de Albariño de la Denominación de Origen Rías Baixas. En: Nuevos horizontes en la viticultura y enología (Eds. E. Falqué e col.), Servizo de publicacións da Universidade de Vigo, Ourense (España), 499-502.

Zamuz S. e Masa A. (2009). Composición estilbénica de uvas de las variedades Mencía y Albariño (*Vitis vinifera*, L.). En: Actualizaciones en investigación vitivinícola. Red GIENOL, Xerez (España), 295-298.

Contribución a congresos e xornadas:

Zamuz S., Vilanova M. e Masa A. Póster: Determinación de la composición fenólica en *Vitis vinifera* cv Albariño en la Denominación de Origen Rías Baixas. X Congreso Nacional de Investigación Enológica (GIENOL 09), Ourense (España), xuño 2009.

Zamuz S., Vilanova M. e Masa A. Póster: Characterization of 4-O- β -D-glucoside of *p*-coumaric acid in musts of cv Albariño (*Vitis vinifera* L.). XXVIII Simposium Internacional en Cromatografía (ISC 2010). Valencia (España), setembro 2010.

Masa A. e Zamuz, S. Ponencia: El papel de los compuestos fenólicos en la caracterización de las variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) cultivadas en Galicia. Seminario sobre Biodiversidade Vexetal no Sistema Agroforestal Atlántico (AGROFOR 2010). Pontevedra (España), outubro 2010.

Zamuz S., Magán M., Vilanova M. e Masa A. Póster: Composición estilbénica de mostos de la variedad Albariño (*Vitis vinifera* L.). Seminario sobre Biodiversidade Vexetal no Sistema Agroforestal Atlántico (AGROFOR 2010). Pontevedra (España), outubro 2010.

Zamuz S., Lorenzo A., Graña M.J., Magán M., Vilanova M. e Masa A. Póster: Los flavonoles como marcadores de la biodiversidad en cultivares blancos de vid (*Vitis vinifera* L.) cultivados en Galicia. Seminario sobre Biodiversidade Vexetal no Sistema Agroforestal Atlántico (AGROFOR 2010). Pontevedra (España), outubro 2010.

Zamuz S. e Masa A. Póster: Composición estilbénica de uvas de las variedades Mencía y Albariño (*Vitis vinifera*, L.). XI Congreso Nacional de Investigación Enológica (GIENOL 011), Xerez (España), xuño 2011.

Masa, A. e Zamuz S. Ponencia: Papel dos compostos fenólicos na protección da vide fronte a enfermidades de orixe fúnxica. Xornadas “Actualización na problemática fitosanitaria do viñedo (USC). Ribadumia-Pontevedra (España), setembro 2011.

Zamuz, S. e Masa, A. Póster: Characterization of dihydroquercetin-3-O-xyloside in musts of cv. Albariño (*Vitis Vinifera* L.). XII Reunión científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines, Tarragona (España), novembro 2012.

Por fin!!! Chegou o momento de AGRADECER a todas aquelas persoas que dunha maneira ou doutra fixeron posíbel que estea neste punto, e nunca pensei que me ía custar tanto facelo de xeito que non pareza un 'protocolo' a seguir, senón que se vexa que é totalmente sincero:

En primeiro lugar, e ante todo, agradecer ao meu director de Tese todo o esforzo que fixo para que este traballo saíra adiante, e non só ao Dr. Masa por aceptar a dirección deste traballo, polo seu tempo adicado e por todo o que me ensinou durante estes anos; senón tamén a ANTÓN, simplemente por ser como es!!! por estar ao meu carón nos peores momentos e ser o meu pano de bágoas, por toda a paciencia que tiveches comigo, por todos os ánimos que me deches sempre, por transmitirme moito máis que 'coñecementos científicos', e tamén polos bos momentos -que tamén os houbo-... en resumo, por ser AMIGO; senón fora por tí, nunca houbera chegado este momento. MOITÍSIMAS GRAZAS!!!!!!!!!!!!!!!

E como non, á Dra. Carmen Sieiro por aceptar ser a Titora deste traballo de Investigación e pola túa amizade.

Non podo pasar sen agradecer ao Dr. Federico Pomar todo o seu tempo adicado, por estar dispoñíbel sempre que o necesitei para solucionar calquera problemíña e/ou resolver calquera dúbida e pola túa amizade. Grazas Fede!

Entre algúns dos compañeiros da Misión Biolóxica de Galicia, quero destacar o meu agradecemento a Dorí, pola súa paciencia, o seu aguante e a súa amizade; por todos os bos e os malos momentos que compartimos. E non me esquezo de Enrique, tanto pola súa amizade como por compartír comigo o seu coñecemento. Grazas. Ademais, agradecer a amizade e o tempo compartido coas compañeiras Adelaida, Melanía e Raquel, e aos momentíños de cháchara con Lucía.

Un agradecemento moi especial -e sen que se enfade ninguén- para Olaía, Óscar e Genín, por estar aí sempre pero sobre todo estes dous últimos anos, pola vosa amizade, por aguantarme o inaguantábel, polos vosos consellos e a vosa paciencia, por escoitarme e deixarme chorar ao voso carón; pero tamén, por eses momentos maravillosos que pasamos xuntos, polas risas que nos temos botado, polos días de festa e de alegría, GRACIÑAS!!! A Olaía, ademais, polo debuxo que vai na encadernación e polos seus consellos de deseño. E non ían ser menos Belén e Abel e Jorge e Feli, tan importantes tamén para mín!!! Grazas tamén a Carmen, Tareixa, Nacho, Tere e Pili pola vosa amizade e polos bos momentos que pasamos todos xuntos, a Benito pola súa axuda, e á APDR por permitirme participar no desenvolvemento dos seus proxectos e en especial á xunta directiva por todo o seu apoio.

Para rematar, GRAZAS a miña familia; aos meus irmáns Jorge, Xavi e Merce, que a pesar das nosas diferenzas e os nosos enfados, sempre podo contar con eles para o que sexa, animando en todo momento, e dando ese empurronciño que todos necesitamos nalgún momento, e a Luz por ser unha persoa tan estupenda e estar ao lado de alguén tan importante para mín; á "abu", polo maravillosa e especial que é e por todo o seu cariño; e ás dúas alegrías da casa, os meus sobriños Leo e Marta, os meus dous amores. E sobre todo, GRAZAS aos meus pais por todo o que me deron e me ensinaron, por todo o que loitaron para que os meus soños se fixeran realidade e polo seu amor incondicional; á miña nai por ser tan forte e ser un exemplo a seguir, e ao meu pai que sempre me entendeu, me apoiou nas miñas decisións e -a pesar de que non cumprín co prometido- confiaba en que este momento chegaría.

GRACIÑAS A TODAS E TODOS!!!!!!!!!!!!!!!

Din que Galiza é o país dos mil ríos; non serán tantos os ríos nin tampouco tantos os viños, pero a súa enorme diversidade podería sorprender ao viaxeiro que, coa copa na man, fose percorrendo as nosas bisbarras. Habería de ver que cada paisaxe, cada microclima, dá viños diferentes. Bebería así o celme das nosas terras, porque o viño é a paisaxe mesma agochada na copa.

Galicia: O país dos mil viños (Moya, 2004)

A meu pai

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMO

INTRODUCCIÓN.....	1
1. O sector vitivinícola galego.....	1
2. A caste Albariño.....	16
3. Composición bioquímica dos mostos. Os compostos de natureza fenólica.....	21
Compostos non flavonoides.....	24
Ácidos hidroxibenzoicos.....	24
Ácidos hidroxicinámicos.....	25
Estilbenos.....	28
Compostos flavonoides.....	29
Antocianos.....	30
Flavonas e flavonois.....	33
Flavans.....	37
Outros flavonois.....	40
Biosíntese dos compostos fenólicos na vide.....	41
Papel dos compostos fenólicos na vide.....	44
Propiedades organolépticas.....	44
Funcións fisiolóxicas nas plantas.....	46
Beneficios para a saúde.....	49
Marcadores quimiotaxonómicos.....	52
OBXECTIVOS.....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	61
1. Material vexetal.....	63
2. Preparación dos extractos vexetais.....	63
3. Cromatografía líquida con detector de diodos (HPLC- DAD).....	65
4. Recollida de fraccións.....	66

5. Espectrometría de absorción ultravioleta-visíbel dos compostos fenólicos.....	68
6. Cromatografía preparativa de papel (PC).....	69
7. Cromatografía líquida con detector de masas-masas (LC/ESI-MS-MS).....	70
8. Hidrólise dos compostos fenólicos.....	71
9. Cuantificación dos compostos fenólicos.....	73
RESULTADOS E DISCUSIÓN.....	75
1. Análise química dos mostos.....	77
2. Análise dos mostos mediante HPLC-DAD.....	78
3. Separación e identificación dos compostos fenólicos.....	87
Recollida de fraccións de HPLC e análise mediante espectrometría UV-vis	87
Separación mediante cromatografía preparativa en papel (PC).....	165
Separación mediante HPLC e análise con detector de diodos (DAD) e masas-masas (ESI-MS/MS)	167
4. Estudo da composición fenólica dos mostos nas tres subzonas da D.O. Rías Baixas.....	241
CONCLUSIÓNS.....	253
BIBLIOGRAFÍA.....	259

ABREVIATURAS

2-OH-benzoico	ácido 2-hidroxibenzoico
3-OH-benzoico	ácido 3-hidroxibenzoico
4-OH-benzoico	ácido 4-hidroxibenzoico
4-gluc do cafeico	4-glucósido do ácido cafeico
4-gluc <i>p</i>-coumárico	4- <i>O</i> -β-D-glucósido do ácido <i>p</i> -coumárico
AHC	derivado hidroxicinámico
alc	alcohol
Bz	derivado benzoico
c-	<i>cis</i> -
desc	desconhecido
dhK	dihidrokaempferol
dhN	dihidronaringenina
dhQ	dihidroquercetina
diglic	diglicósido
di-OH-benzald	3,4-dihidroxibenzaldehido
galact	galactósido
glic	glicósido
gluc	glucósido
glucur	glucurónido
Isorh	isorhamnetina
K	kaemperol
MeOH	metanol
N	naringenina
Q	quercetina
rham	rhamnósido
rut	rutinósido
t-	<i>trans</i> -
tri-OH-benzoico	ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico
xil	xilósido

RESUMO

Recollemos nesta Memoria o traballo realizado durante catro anos co obxectivo de estudar a composición fenólica dos mostos elaborados coa caste Albariño procedentes de tres subzonas da Denominación de Orixe Rías Baixas (Condado do Tea, O Rosal e Val do Salnés), facendo fincapé nos aspectos metodolóxicos que require un proceso de separación de compostos fenólicos en mostras moi complexas, nas que coexisten un elevado número de compostos con estruturas químicas moi diferentes. Neste sentido, a utilización combinada de diversas técnicas cromatográficas tanto analíticas coma preparativas (PC, HPLC-DAD) e espectrofotométricas (UV-vis, LC/ESI-MS-MS), xunto coa realización de hidrólises (ácidas, alcalinas e enzimáticas), foi fundamental para levar a cabo o illamento e a identificación dos compostos fenólicos presentes nos mostos: derivados benzoicos e hidroxicinámicos, estilbenos, flavonóis, flavan-3-óis e flavanoides.

A combinación das técnicas citadas permitiu illar un total de 121 compostos fenólicos dos que tan só 12 non puideron ser identificados; para 51 dos 109 compostos identificados, esta identificación foi total, mentres que os 58 restantes foron só parcialmente identificados. Debemos resaltar que temos identificado 10 compostos nunca antes citados en mostos, dos que a phloridzina (dihidronaringenín-2'-*O*-glucósido), o quercetín-3-*O*-xilósido, o kaempferol-3-*O*-xilósido e dous diglicósidos da quercetina tampouco se tiñan atopado con anterioridade en *Vitis vinifera* e outros 3 (o 4-*O*- β -D-glucósido do ácido *p*-coumárico, o dihidroquercetín-3-*O*-xilósido e a dihidroquercetina) só tiñan sido identificados en viños. Dos outros dous restantes, o hexósido da naringenina foi identificado recentemente en uvas brancas, e o (-)-epicatequínalato só tiña sido atopado en sementes. Por outra banda, este traballo tamén nos permitiu confirmar a natureza duns compostos que son produtos da transformación das formas isoméricas *cis* dos estilbenos pola acción da luz UV, e que nalgún caso foran erróneamente identificados como *cis*-resveratrol. Indicar tamén, que temos atopado nos nosos mostos un elevado

número de compostos fenólicos potencialmente bioactivos, dos que podemos destacar os 14 estilbenos, os 15 dihidroflavonois e os 18 derivados hidroxicinámicos.

As diferenzas na composición fenólica atopadas entre os mostos analizados, foron só cuantitativas, debendo sinalar que os procedentes da subzona do Rosal presentaron sempre os contidos máis elevados en compostos fenólicos totais.

Ao noso entender, este estudo supón a contribución máis completa feita ata hoxe sobre a composición fenólica dos mostos elaborados coa caste galega Albariño, non só polo importante número de compostos separados e identificados, senón tamén polo feito de que –a diferenza doutros estudos anteriores- non se ten limitado a un determinado grupo de derivados fenólicos.

INTRODUCCIÓN

1. O SECTOR VITIVINÍCOLA GALEGO.

Se algún cultivo ten rachado co esquema clásico de aplicación xeral á agricultura galega, caracterizado tradicionalmente pola existencia dun policultivo de subsistencia que se xustifica entre outras cousas pola pervivencia dun esaxerado minifundismo, é o da vide. En efecto, o *“comer con fartura e vender o que sobra”* co que Castelao describía a situación dunha agricultura na que o obxectivo primordial non era a comercialización dos produtos obtidos senón o autoabastecemento dos campesiños, non é na actualidade de aplicación ao sector vitivinícola galego, que experimentou unha indubidábel evolución nos últimos tempos.

Con todo, esta evolución foi máis patente no sector da enoloxía, no que as técnicas modernas adquiríronse a un ritmo acelerado e de forma xeral no sector, mentres que a viticultura permaneceu en boa parte ancorada no pasado dificultando a reconversión varietal que, cando se produciu, fíxoo a ritmos desiguais nas diversas zonas produtoras, existindo mesmo algunhas nas que este proceso de reconversión mantense aínda nun estado incipiente. En calquera caso, non se poden negar os avances neste terreo, e son moitas as castes tradicionais que recuperaron –ou que están a piques de facelo– o papel preponderante que tiveron en tempos pasados. Así, entre as castes brancas, debemos sinalar sen dúbida a enorme expansión que sufriu o cultivo do Albariño e, en menor medida, o do Godello, pero tamén o lento pero esperanzador incremento en superficie cultivada dalgunha outra branca (Treixadura, Caíño branco,...) e os intentos por recuperar algunha das máis afamadas tintas (Caíño tinto, Espadeiro, Merenzao, Albarello, Sousón, ...), por máis que neste caso sexa a caste foránea Mencía a que maior preponderancia ten adquirido.

“O camiño percorrido polos viños galegos nos últimos lustros soamente se pode cualificar de espectacular: en quince anos pasouse dos viños sen etiqueta e remisos a viaxar, a uns viños modernos, elegantes, presentes en todos os

mercados do mundo, ben vestidos, magnificamente elaborados e segurísimos desde o punto de vista alimentario e da súa tipicidade varietal. O raro hai algúns anos era atopar unha etiqueta galega na carta de viños dos grandes restaurantes de fóra de Galiza, hoxe o excepcional é que non haxa unhas cantas”. Así expresaba Cristino Álvarez a principios do actual século (2004) a innegábel evolución do sector vitivinícola galego nos últimos anos.

De acordo cos datos recollidos no “Avance Anuario de Estadística 2011” (M.A.R.M., 2012), no ano 2010 o cultivo da vide na Galiza ocupaba unha superficie total próxima ás 25500 ha cunha produción de 144093 toneladas de uva que no 100 % dos casos é destinada á vinificación. En canto á superficie de cultivo, a vide só é superada polo millo (81706 ha), e encóntrase no terceiro lugar despois deste cereal (2617325 t) e da pataca (498651 t) no que fai á produción.

Se temos en conta agora os datos ofrecidos pola Consellería de Medio Rural e do Mar da Xunta de Galicia (<http://www.medioruralemor.xunta.es>) para aquelas zonas de produción vitivinícola amparadas baixo as cinco Denominacións de Orixe existentes na Comunidade Autónoma galega (Rías Baixas, Ribeiro, Ribeira Sacra, Valdeorras e Monterrei) poderemos observar que no ano 2010 o cultivo da vide ocupaba unha superficie total de algo máis das 9500 ha cunha produción de case 58000 t de uva, uns datos que, evidentemente, teñen a súa tradución en cifras económicas e reflicten o enorme peso que o sector vitivinícola ten na economía galega; con case 18.000 viticultores rexistrados e cunha produción de aproximadamente 55 millóns de botellas anuais de viños de calidade, o sector vitivinícola galego ten alcanzado xa uns 152 millóns de euros de facturación e unhas cifras nada desprezábais no que á exportación se refire.

En calquera caso, o sector vitivinícola galego –e a súa propia evolución- dista moito de seren uniforme; moi ao contrario, a viticultura galega vén caracterizada pola complexidade que lle proporcionan tanto a diversidade climática existente coma a dos solos de cultivo sobre os que se asenta. E xunto

ao clima e o solo –e en estreita relación con ámbolos dous factores- débese considerar tamén o relevo como un factor determinante da localización da vide, por máis que neste caso a influencia se poida intuír máis indirecta. En efecto, e como consecuencia do accidentado relevo galego e o sinuoso curso dos ríos, vanse debuxando sobre as ladeiras infinidade de enclaves mesoclimáticos, con diferentes orientacións e posibilidades de iluminación, coexistindo tipoloxías climáticas atlánticas nas maiores altitudes e mediterráneas no fondo dos vales, con maior temperatura e menor humidade relativa, condicións que, de acordo con Hernáez-Mañas e Rodríguez (2006), provocan un descenso no potencial de calidade. Así pois, como resultado desta interacción entre clima, solo e relevo e sen esquecer que moitas das dificultades que estes tres factores poidan impoñer na viña son superadas pola acción humana, quen de modificar determinadas situacións adaptándoas as súas necesidades, poderíanse considerar na nosa xeografía vitivinícola ao menos tres viticulturas diferenciadas, de condicionamentos peculiares (Hernáez-Mañas, 2004). Cara ao occidente, a tipoloxía climática atlántica, aínda que temperada por certa aridez estival, asenta sobre un substrato de granito, con temperaturas e humidades relativas moderadas, garantía dun envexábel ritmo de maduración; non debemos esquecer que é precisamente a moderación das temperaturas durante as últimas fases da maduración a que permite reter bos niveis de acidez e producir, polo tanto, viños de excelente equilibrio e cun potencial aromático intenso e diferenciado. No centro e sur, a ecotonía climática atlántico-mediterránea incide tamén nalgúns casos sobre depósitos aluviais non consolidados, mentres que na zona oriental, os vales presentan compoñentes mediterráneos máis acentuados e solos que se articulan sobre substratos lousentos. Non resulta fortuíto, xa que logo, que cada unha destas áreas posúa viños cunhas características diferenciais.

Con todo, a existencia desta diversidade de viños, non obedece unicamente á variabilidade edafoclimática nin á presenza de numerosas pequenas adegas, resultado da pervivencia –non sempre residual- do minifundismo galego. Existe un factor moi importante, a enorme riqueza de castes ancestrais que os viticultores galegos herdaron dos seus antergos e que deron lugar a que no

proceso de reconstrución do viñado se mantivese unha alta diversidade xenética.

En efecto, a personalidade e a orixinalidade dos viños galegos descansan sobre un perfecto engarzamento entre o labor secular dos viticultores, a existencia dun complexo varietal propio e exclusivo do NO peninsular e os condicionantes ecoclimáticos do medio. Neste sentido, o complexo varietal tradicional, constituído por un mínimo dunhas sesenta castes de uvas (na colección que a Xunta de Galicia ten na Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia, EVEGA, recóllense 110 castes cultivadas na Galiza, por máis que se poida tratar nalgún caso de homonimias e sinonimias ou mesmo de cultivares foráneos e/ou de escasa implantación no noso viñado), ten as súas orixes nun material xenético de tipoloxía claramente atlántica, con producións de acios en xeral pequenos ou medianos, acentuada fertilidade dos netos e produción de raspón comparativamente elevadas, o que implica en moitos casos rendementos reducidos na conversión uva-mosto (Hernández-Mañas, 2004).

Porén, esta situación vitivinícola tradicional que viñemos caracterizando pola súa enorme complexidade e pola especificidade das diferentes zonas de tradición produtora, sufriu distintos avatares ao longo do tempo. Limitado na actualidade a aquelas zonas que polas súas favorábeis condicións climáticas e edafolóxicas resultan especialmente útiles para o seu cultivo, a vide en Galiza sufriu unha notábel evolución desde o medievo, no que se cultivaba en zonas francamente desfavorábeis nas que o seu cultivo foi progresivamente a menos desde o s. XVIII e nas que non pasa de ser unha anécdota na actualidade.

A mediados do s. XIX, no que segundo distintos autores cultivábanse en Galiza máis de 120 castes, queda practicamente configurado o mapa vitivinícola actual no que a súa distribución xeográfica se refire. Na segunda metade deste século, debido ao ataque das pragas do oídio (*Uncinula necator*) e do mildeu (*Plasmopara viticola*), o viñado galego sofre importantes perdas que posteriormente, entre 1882 e 1910, vense agravadas pola invasión filoxérica

(*Dactylospheera vitifoliae*) que arrasa viñedos enteiros (Yglesias, 1983; Barrios e col., 1998).

O clima húmido e de temperaturas suaves de Galiza, moi favorábel para o desenvolvemento do oídio (enfermidade criptogámica orixinaria de América do Norte), facilitou a progresión desta praga con elevada rapidez. No 1853 causa verdadeiros estragos nas provincias de Ourense e Pontevedra, e nuns cinco anos afecta de forma importante a case todos os viñedos de Galiza. As principais consecuencias da “crise do oídio” foron o aumento dos custos de produción (e, polo tanto, o dos seus viños) e a desaparición de case todo o viñado do Norte de Galiza, con excepción da pequena comarca de Betanzos. No 1885 chega a Galiza o mildeu (tamén enfermidade criptogámica), que tiña aparecido en Francia no 1878 polo que o seu tratamento a base de sulfato de cobre, cal e auga (o chamado “caldo bordelés”) era xa coñecido e permitiu unha loita rápida que evitou perdas tan elevadas como no caso do oídio; en calquera caso, si se produciron mermas nas colleitas con certa periodicidade. A terceira gran crise, a aparición da filoxera (insecto ampelófago que ataca ás raíces e ao sistema foliar e contra o que non se encontrou ningún tratamento eficaz), ten lugar en Galiza en 1882, no que aparecen os primeiros casos nos vales ourensás de Riós e Vilardevós, na fronteira con Portugal, desde onde se estendeu en poucos anos á Pobra de Trives e Valdeorras. A finais do século XIX a maior parte do viñado galego estaba fortemente filoxerado (Vidal, 1996).

Sen lugar a dúbidas, a chegada da filoxera, pódese considerar fundamental na evolución posterior do cultivo da vide en Europa. Como xa adiantamos, non foi posíbel combater ao insecto por métodos químicos, o que obrigou á busca de plantas máis ou menos resistentes ao ataque. Dunha banda, aproveitando as características das plantas das vides de orixe americano (*Vitis riparia*, *Vitis rupestris*,...) que presentan certo grao de resistencia ao insecto, buscáronse híbridos entre estas e as de *Vitis vinifera* coa esperanza de conseguir exemplares que foran resistentes á filoxera e ao mesmo tempo tiveran as excelentes características de produción e calidade do froito da vide europea. Xorden así, as plantas denominadas híbridos produtores directos. Por outra

banda, tratando de aproveitar a técnica do enxerto, coa que se poderían obter “novas plantas” con raíces americanas (resistentes por tanto á filoxera) e parte aérea de vide europea, que mantería a calidade dos seus froitos. E xunto aos híbridos produtores directos –que, se ben é certo, proporcionaban rendementos altos, producían viños dunha calidade inferior ao das viníferas- e á realización de enxertos, a introdución de viníferas foráneas como a Garnacha tintureira (denominada Alicante nalgunhas zonas de Galiza) e a Palomino fino (bautizada na nosa viticultura como Xerez), foi unha constante na reconstrución do noso viñado tras as crises.

A reconstrución do viñado tras o ataque da filoxera supuxo un cambio en certa medida revolucionario na viticultura europea, non só pola aparición dos híbridos produtores directos e o incremento no intercambio do material vexetal entre as distintas zonas de produción, senón tamén porque favoreceu a proliferación de viveiros de plantas nai de viníferas e portaenxertos, a busca de castes resistentes, e o uso xeneralizado de técnicas como o enxerto, cuestións todas elas que modificaron profundamente a viticultura tradicional (Vidal, 1996).

Unha vez superadas estas crises o viñado galego empeza a recuperarse de forma lenta e continuada ata que a finais da década de 1920 chega un estancamento do que non se sairá ata os anos setenta, nos que comeza unha nova época de esplendor para os nosos viños. É a partir deste momento cando principia o renacemento da viticultura na Galiza, coa recuperación de castes tradicionais que, como o Godello, estaban practicamente desaparecidas, o que supuxo unha importante transformación no sector vitivinícola galego. Na actualidade, esta transformación resulta evidente en comparación con situacións pretéritas; recuperouse e potenciouse un importante número de castes tradicionais, transformouse a adega e modernizáronse as técnicas de elaboración de viños, avanzándose moito tamén no eido do marketing e da comercialización. E neste proceso de reestruturación e reconversión do noso viñado, o regulamento CEE 1493/1999, do 17 de maio de 1999, e a Orde da Consellería de Agricultura, Gandería e Política Agroalimentaria do 5 de

setembro de 2000, supuxeron un importante marco de apoio normativo e económico, en concordancia co “Plan de Calidade dos Viños Galegos” elaborado en 1986 pola Xunta de Galicia, que establecía como liñas fundamentais a recuperación de castes ancestrais e a elaboración de viños de alta calidade que nas súas características organolépticas reflectisen as singularidades procedentes dunha tipoloxía climática atlantizada (Hernández-Mañas e Rodríguez, 2006).

A diversidade de climas e solos e a relativa especificidade do material vexetal das que viñemos falando –que dán lugar á coexistencia na nosa Viticultura de diversas zonas vitícolas que en determinados casos poden incluír a varias rexións mesoclimáticas- achegan, xunto á acción humana e a tradición, características específicas aos viños de calidade elaborados en cada unha destas zonas. E é precisamente a protección legal dos viños dunha determinada zona, das súas características particulares e a autenticidade do material vexetal co que foron elaborados, un dos obxectivos perseguidos coa creación das Denominacións de Orixe (D.O.), que garanten ao tempo os dereitos do consumidor.



Figura 1. Mapa das cinco DOs existentes na Galiza.

Existen na actualidade na Galiza (figura 1) cinco Denominacións de Orixe (Ribeiro, Valdeorras, Rías Baixas, Monterrei e Ribeira Sacra) xunto con outras tres zonas produtoras de viño acollidas baixo a denominación Viños da Terra

(Barbanza e Iria, Val do Miño-Ourense e Betanzos). Faremos un repaso, por máis que de forma resumida, das peculiaridades máis salientábeis de cada unha delas, incidindo logo con maior fondura na D.O. Rías Baixas, por ser esta a D.O. da que proceden os mostos de Albariño empregados no noso estudo.

A zona de produción da D.O. Ribeiro está situada na parte occidental da provincia de Ourense, nas ladeiras dos ríos Miño, Avia e Arnoia, e comprende os concellos de Ribadavia, Arnoia, Castrelo de Miño, Carballeda de Avia, Leiro, Cenlle, Beade, Punxín, Cortegada e varias parroquias dos de Carballiño, Boborás, Ourense, Toén e San Amaro. De acordo co seu regulamento (B.O.E., 2009b) a elaboración dos viños brancos protexidos terá que se facer coas castes Treixadura, Palomino, Torrontés, Godello, Macabeo, Albillo, Loureiro e Albariño, mentres que os tintos terán que ser elaborados en base aos Caiños (tinto, bravo e longo), Garnacha tintureira, Ferrón, Sousón, Mencía, Tempranillo e Brancellao; non fai unha clasificación este regulamento entre castes preferentes e autorizadas, aínda que destaca á caste branca Treixadura e aos Caiños como as principais dentro da Denominación de Orixe.

A D.O. Valdeorras ocupa gran parte da conca dos ríos Sil e Xares nas localidades do Barco de Valdeorras, A Rúa, Vilamartín de Valdeorras, O Bolo, Carballeda de Valdeorras, Larouco, Petín e Rubiá, situadas todas elas ao nordeste da provincia de Ourense. Son as brancas Godello, Loureiro, Treixadura, Dona branca (Moza fresca), Albariño, Torrontés e Lado, e as tintas Mencía, Tempranillo (Araúxa), Brancellao, Merenzao (María Ordoña ou Bastardo), Sousón, Caiño tinto, Espadeiro e Ferrón as castes consideradas como preferentes nesta D.O., mentres que Palomino (Xerez) entre as brancas e Garnacha tintureira, Gran negro e Mouratón entre as tintas, son consideradas como castes autorizadas (D.O.G., 2009).

A zona de produción da D.O. Ribeira Sacra sitúase nas provincias de Ourense e Lugo, e inclúe cinco subzonas: Amandi que comprende distintas parroquias dos concellos de Sober e Monforte de Lemos; Chantada que inclúe varias parroquias de Portomarín, Taboada, Chantada, Carballedo e A Peroxa; Quiroga-

Bibei con presenza nalgunhas parroquias de Monforte de Lemos, Pobra de Brollón, Quiroga, Ribas de Sil, A Pobra de Trives, Manzaneda e San Xoán de Río; Ribeiras do Miño que abarca parroquias de Paradela, O Saviñao, Pantón, Sober e Monforte de Lemos; e Ribeiras do Sil que se estende por distintas parroquias de A Teixeira, Parada de Sil, Castro Caldelas e Nogueira de Ramuín. Loureira, Treixadura, Godello, Dona Branca, Albariño e Torrontés son as castes brancas consideradas preferentes nesta D.O., mentres que Mencía, Brancellao, Merenzao, Sousón, Caíño tinto e Tempranillo teñen preferencia entre as tintas, para as que, ademais, se autorizan as castes Garnacha tintureira e Mouratón tamén coñecida como Negreda (B.O.E., 2010).

A D.O. Monterrei, toda ela situada na comarca ourensá de Verín, está constituída por dúas subzonas, o Val de Monterrei e a Ladeira de Monterrei, que en ámbolos dous casos engloban diferentes parroquias e lugares dos concellos de Castrelo do Val, Monterrei, Oímbra e Verín; ademais, a subzona Ladeira de Monterrei abrangue o concello de Vilardevós e algunha parroquia do concello de Riós. Entre as castes consideradas preferentes están as brancas Godello (chamado localmente Verdello), Dona Branca (Moza fresca) e Treixadura e as tintas Mencía e Merenzao (María Ordoña ou Bastardo). Como castes autorizadas, as brancas Albariño, Caíño branco, Loureiro e Branca de Monterrei e as tintas Tempranillo (Araúxa), Caíño tinto e Sousón (B.O.E., 2009c).

A D.O. Rías Baixas esténdese por un conxunto de zonas das provincias de Pontevedra e A Coruña con características físicas particulares en cada caso, pero tamén con numerosos trazos comúns a todas elas que -en certa medida- identifican á Denominación. Trátase de terras baixas, con altitude polo xeral inferior a 300 m, próximas ao mar na meirande parte dos casos e asociadas aos tramos inferiores dos cursos fluviais do Miño (e os seus afluentes Tea, Louro e Chabriña) nas subzonas meridionais (Condado do Tea e O Rosal), do Oitavén na subzona de Soutomaior, do Umia que atravesa o Val do Salnés, e do Ulla que da orixe á subzona Ribeira do Ulla, a única subzona da D.O. que non se sitúa enteiramente en terras pontevedresas. En todos os casos son zonas con

características climáticas de influencia atlántica (figura 2) –con temperaturas suaves e precipitacións elevadas e ben repartidas- que experimentan un descenso hídrico nos meses de verán; esta influencia atlántica das Rías Baixas maniféstase na atenuación das temperaturas extremas, con escasos días excesivamente calorosos e con apenas risco de que se produzan xeadas. O importante aporte de choiva que recibe toda a D.O. e o descenso do aporte hídrico que se produce no verán, leva á seca dos solos máis delgados e areosos, e facilita a maduración dos froitos ao elevarse a temperatura do solo (Zamuz e col., 2009). Estes climas frescos, de influencia atlántica, nos que, segundo indican Hernáez-Mañas e Rodríguez (2006), as maiores temperaturas e humidades relativas durante o proceso de maduración das uvas retrasan a combustión respiratoria dos acios, con mellor retención da acidez e expresións aromáticas máis potentes, sutís e delicadas, foron revalorizados para a viticultura cos traballos pioneiros de Wagner en 1976, que entran en contradición coa crenza de que as zonas con climas mediterráneos son as depositarias dos maiores potenciais de calidade. De feito, son moitas as zonas vitícolas europeas que se asentan sobre compoñentes atlantizados, por máis que nesta viticultura o risco de ataques fúnxicos sexa elevado e a pesar da esixencia dunha coidadosa selección das castes a implantar, que terán que ser de ciclo vexetativo curto.



Figura 2. Mapa da clasificación climática (UNESCO).

Polo que as características xeolóxicas se refire, e agás para os viñedos da subzona Ribeira do Ulla, que se sitúan en solos desenvolvidos sobre xistos, a vide na D.O. Rías Baixas aséntase maioritariamente sobre materiais graníticos e sedimentos (Rodríguez, 1993; Rodríguez-Lovelle e col., 1994). En xeral, os solos, tradicionalmente asociados a cultivos de horta, teñen un elevado contido en materia orgánica (Fontela, 1989; Lema, 1991; Rodríguez-Lovelle e col., 1994), o que diferencia á zona das Rías Baixas das zonas vitivinícolas do interior.

O sistema tradicional da estrutura das plantacións é o emparrado, que –no que a viticultura da Península Ibérica se refire– é exclusivo desta zona e do norte de Portugal, e que recorda en boa medida ao comportamento natural da *Vitis vinifera* como unha liana rubideira apoiada nas árbores, un sistema que comparte hoxe espazo con outros sistemas de condución. En xeral, a produción diríxese cara aos viños monovarietais de Albariño, sen dúbida os máis coñecidos no mercado, pero existen excelentes plurivarietais nos que o Albariño se acompaña dalgunha outra caste preferente na D.O. (Treixadura, Loureiro e Caiño branco) ou, de forma máis anecdótica, dalgunha das castes brancas autorizadas (Torrontés e Godello). Os tintos teñen aquí escasa relevancia e elabóranse en base ás castes preferentes (Caiño tinto, Espadeiro, Loureira e Sousón) e/ou ás autorizadas Mencía, Pedral e Brancellao (B.O.E., 2009a).

De entre todas as existentes en Galiza, a D.O. Rías Baixas é, sen dúbida, a que maior crecemento ten experimentado nos últimos tempos, e así, de acordo cos datos facilitados polo seu Consello Regulador (www.doriasbaixas.com), desde o ano 1988 no que se recoñece a denominación, pasouse de 955 a 6.617 viticultores e de 30 a 181 adegas. E, evidentemente, esta evolución veu da man dun aumento da superficie de viñado inscrito, que pasou das 584 ha iniciais ás 3.969 ha actuais (figura 3) e que supuxo pasar dos 2.400.000 kg de uva obtida no ano 1988 aos case 42.000.000 kg que se producen na actualidade (figura 4), un aumento da produción que ten a súa lóxica tradución nos datos de viño elaborado, que pasa dos 15.600 HL aos 286.998 HL da colleita do ano 2011, e

na evolución espectacular do volume de vendas que supuxo neste período un incremento superior ao 500 % das vendas totais.

A observación das figuras 3 e 4 permite confirmar a existencia desta tendencia xeral claramente ascendente tanto para a superficie de cultivo como para a produción de uva, por máis que para este último parámetro –pola existencia de situacións climáticas adversas- existan lixeiras caídas ao longo do período considerado, máis patentes nos anos 1998, 2000 e 2007.

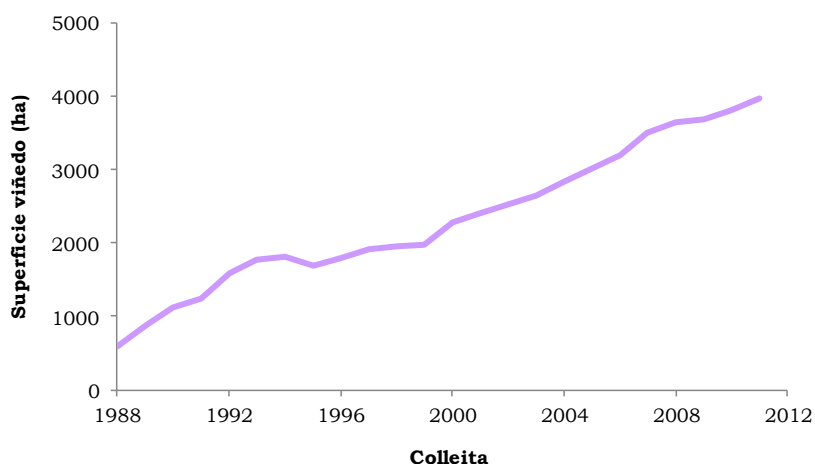


Figura 3. Evolución da superficie do viñedo na D.O. Rías Baixas.

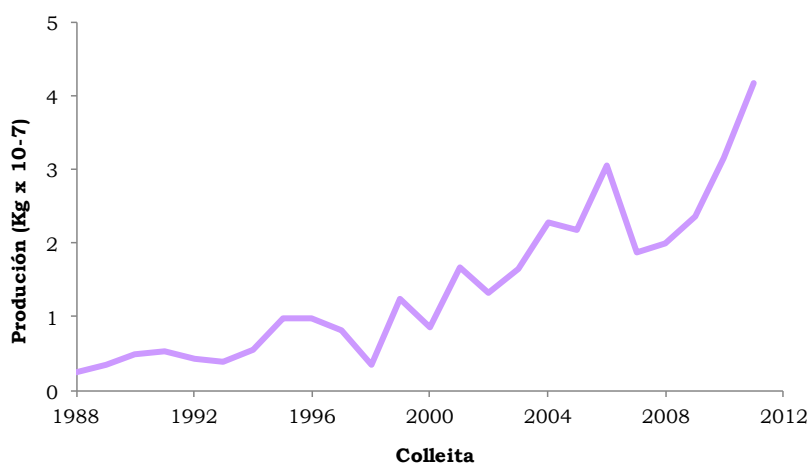


Figura 4. Evolución da produción de uva na D.O. Rías Baixas.

Outro dato significativo na evolución da D.O. Rías Baixas, que en boa medida avala este crecemento do que vimos falando, é o da ampliación da zona de produción experimentada nos últimos 15 anos, nos que ás tres subzonas existentes no momento do seu recoñecemento como Denominación (Val do Salnés, Condado do Tea e O Rosal) incorpóranse a de Soutomaior no 1996 e a da Ribeira do Ulla no ano 2000.

Na figura 5 sitúanse de forma esquemática as cinco subzonas da D.O. que nos ocupa, todas elas (como toda Galiza), plenamente integradas na gran rexión Atlántica delimitada pola liña Wagner, que establece a separación entre as zonas mediterráneas e templado-atlánticas e que comeza ao sur de Porto, segue polo Val do Douro subindo cara ao leste por Valladolid, Burgos e Logroño, e remonta os Pirineos polo País Vasco francés ata Cahors zigzagueando polo centro de Europa ata chegar a Ucraína onde se xunta coa liña límite setentrional do cultivo da vide (Hidalgo, 2004).

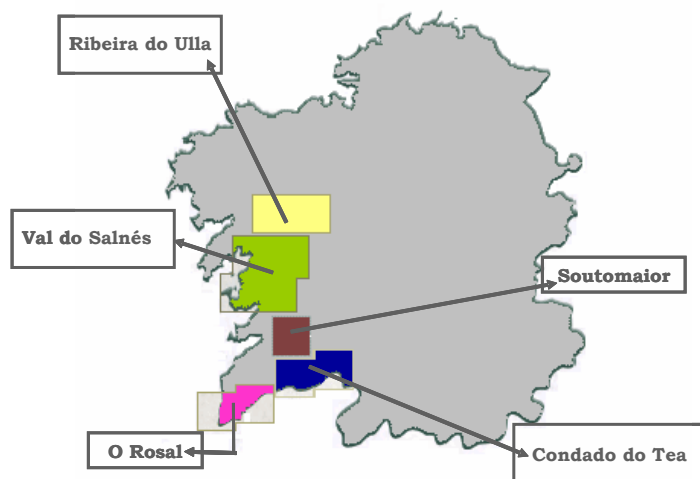


Figura 5. Mapa das cinco subzonas da D.O. Rías Baixas.

Se consideramos agora os datos porcentuais de superficie de cultivo e de produción de uva correspondentes ao ano 2011 agrupados por subzonas (figura

6), queda patente a preponderancia –no que a estes parámetros se refire– das tres subzonas inicialmente recoñecidas na D.O. Ría Baixas.

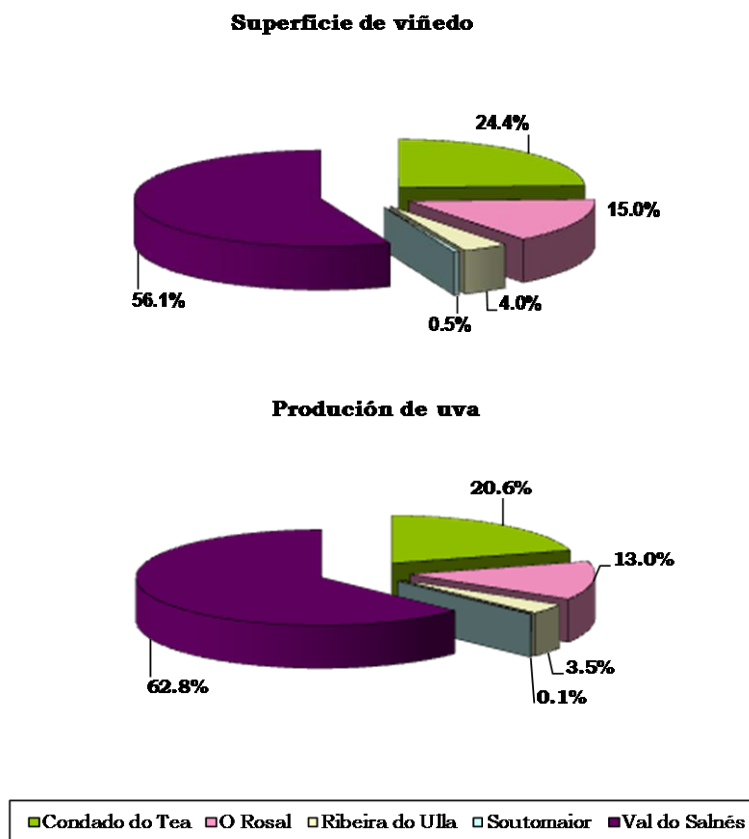


Figura 6. Datos de superficie de viñedo e produción de uva na D.O. Rías Baixas no 2011.

Esta importancia relativa das subzonas do Val do Salnés, Condado do Tea e O Rosal fronte ás outras dúas subzonas (Soutomaior e Ribeira do Ulla), que tamén se reflicte no número de viticultores e adegas, inclinounos a recoller as mostras empregadas no noso estudo nestas tres subzonas, que imos describir brevemente a continuación.

A subzona do Val do Salnés está localizada ao noroeste da provincia de Pontevedra, na zona baixa do val do río Umia, comprende os concellos de

Cambados, Meaño, Sanxenxo, Ribadumia, Meis, Vilanova de Arousa, A Illa de Arousa, Portas, Caldas de Reis, Vilagarcía de Arousa, Barro e O Grove (B.O.E., 2009a). Trátase dunha ampla chaira onde –a pesar de que a rocha nai é case exclusivamente de tipo granítico- existe unha grande variedade edáfica. Os solos sobre os que se asenta o viñado son polo xeral máis fértiles que nas outras subzonas, cun elevado contido en materia orgánica e máis fondos. Climaticamente esta subzona atópase baixo un dominio oceánico, cunha tendencia á aridez estival moi pouco marcada xa que non existen meses de seca absoluta. As precipitacións son elevadas (1.500 mm) e as temperaturas medias anuais sitúanse arredor dos 14 °C, con invernos moi suaves (10 °C) e veráns nos que se poden acadar os 20 °C (Santos, 1992; Enciclopedia Galega Universal, 2002c).

A subzona do Condado do Tea está localizada ao surlleste da provincia de Pontevedra, estendéndose pola marxe dereita do río Miño e adecuándose perfectamente ao val do río Tea, cunha superficie de 235 km² (Santos, 1992). Inclúe os concellos de Salvaterra do Miño, As Neves, Arbo, Crecente, Salceda de Caselas e Pontearreas e algunhas parroquias dos concellos da Cañiza, Tui e Mos (B.O.E., 2009a). Bordeando a comarca, agás polo sur, existen diversas elevacións sobre rochas hercinianas graníticas e metamórficas de tipo xistoso. Estas condicións topográficas e morfolóxicas favoreceron a formación de terrazas nas marxes dos ríos que circulan polo centro da comarca, mentres que nos vales aparecen frecuentes acumulacións de materiais non consolidados de tipo area, arxila ou grava. Esta subzona pódese encadrar no dominio climático oceánico húmido, cunhas variacións térmicas estacionais e diúrnas febles e precipitacións abondosas. A temperatura presenta valores moi suaves sen que haxa invernos fríos nin veráns excesivamente calorosos. A temperatura media anual sitúase entre os 14 e os 15 °C baixando nas áreas máis montañosas ata os 12 °C, mentres que os valores de precipitación oscilan entre os 1.200 e 1.500 mm. Malia ser un clima húmido, está presente a aridez estival nos meses de xullo e agosto cun déficit hídrico que se sitúa entre os 200 e os 400 mm (Enciclopedia Galega Universal, 2002b).

A subzona do Rosal está localizada ao suroeste da provincia de Pontevedra, no Baixo Miño, e inclúe os concellos do Rosal, Tomiño e A Garda e algunhas parroquias dos de Tui e Gondomar (B.O.E., 2009a), cunha extensión duns 150 km². Trátase dun continuo coa subzona do Condado do Tea coa que realmente forma unha unidade desde o punto de vista xeográfico na comarca do Baixo Miño. Nesta subzona o clima tamén é oceánico húmido con tendencia á aridez estival –con temperaturas suaves arredor dos 15 °C de media anual e precipitacións importantes, próximas aos 1.500 mm concentradas no outono e inverno- e con fenómenos de inversión térmica e frecuentes néboas, trazos climáticos característicos do interior rexional (Enciclopedia Galega Universal, 2002a). Os solos ácidos e probes en nutrientes caracterízanse pola abundancia de gravas e grandes cantos rodados acompañados de arxilas e areas asociadas a rochas graníticas, gneises e xistos (Santos, 1992).

2. A CASTE ALBARIÑO.

Polo que fai ao conxunto varietal cultivado en cada unha das tres subzonas, e tal e como se pode observar na táboa 1 elaborada a partir dos datos do Consello Regulador (www.doriasbaixas.com), aínda que existen diferenzas na porcentaxe de produción para cada caste branca segundo a zona de que se trate, pódese falar dunha clara uniformidade varietal.

Táboa 1. Porcentaxe relativo da produción de cada caste nas tres subzonas da D.O. no ano 2011.

	Val do Salnés	Condado do Tea	O Rosal
Albariño	99,98	82,70	94,71
Treixadura	0,01	2,31	4,16
Loureiro	0,01	7,81	0,78
Outras brancas	0,00	7,17	0,36

Hai que salientar, neste sentido, a inexistencia de Caiño branco e outras castes brancas (e a existencia testemuñal da Treixadura e Loureiro) na subzona do Val do Salnés e a absoluta preponderancia do Albariño en todas e cada unha das

subzonas, unha preponderancia que non parece que vaia perder se temos en conta a evolución da produción desta caste na D.O. nos últimos anos (figura 7).

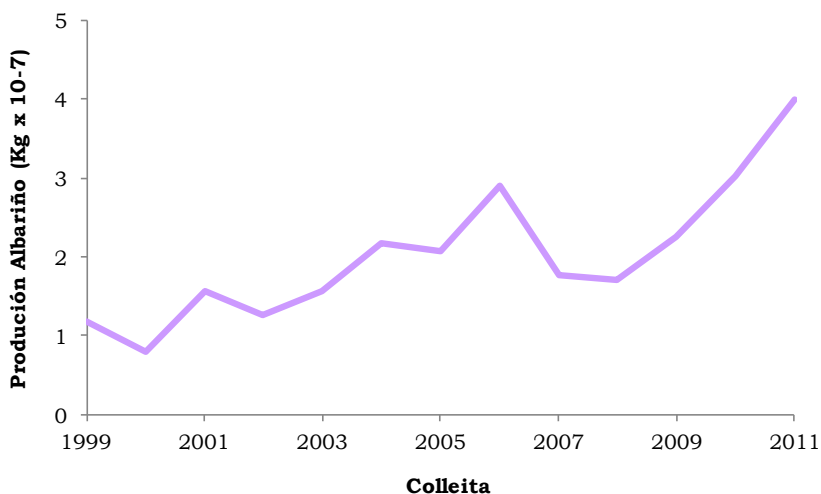


Figura 7. Evolución da produción da uva Albariño na D.O. Rías Baixas.

Sinalar ademais que a produción de uva Albariño no Val do Salnés supuxo no ano 2011 o 65,37 % da produción total na D.O. fronte ao 19,90 % e o 11,09 % que corresponden, respectivamente, ás subzonas do Condado do Tea e O Rosal e o absolutamente anecdótico da produción desta caste nas outras dúas subzonas (Ribeira do Ulla e Soutomaior).

A caste Albariño vén sendo considerada, xunto coa Treixadura e o Godello, unha das castes atlánticas máis antigas, orixinais e tradicionais da Galiza (Martínez-Chantada e col., 1999), sen que se poñan de acordo os distintos autores sobre a súa orixe para a que existen diversas hipóteses (Del Caño Abad, 1984, 1991). Debemos destacar aquí o recente traballo de Díaz-Losada e col. (2012) que fan un exhaustivo estudo molecular do material xenético existente na colección da EVEGA (Leiro-Ourense) e chegan á conclusión de que as castes galegas teñen dúas orixes; un grupo asentado na parte máis occidental da Galiza e no que inclúen ao Albariño e á maior parte das castes

consideradas tradicionais, que ten os seus ancestros nas castes francesas e que tería chegado a Galiza a través do seu cultivo nos mosteiros logo da reconquista no século X, e un segundo grupo (asentado na parte oriental da Galiza) que tería a súa orixe nas castes procedentes de Castela e do sur de España. A hibridación entre os xenotipos introducidos, e a posterior selección polos labregos galegos, daría lugar á enorme variabilidade existente hoxe por adaptación ás condicións climáticas locais. Describe Oliveira (2000) o Albariño como unha caste de acio pequeno, alado e frecuentemente duplo polo desenvolvemento da á, con compactidade media e pedúnculo curto; cun bago de tamaño medio, con forma esférica, coa pel de cor verde-amarela que adquire unha tonalidade dourada a medida que aumenta o tempo da exposición ao sol, e a polpa incolora. De acordo con Fajardo (1984), trátase dun cultivar moi sensíbel ao oídio e algo menos ao mildeo e á botrite.

Considerada de sempre dentro do grupo de viníferas brancas potencialmente produtoras de viños de calidade, dá lugar a viños monovarietais caracterizados pola súa cor amarela con tonalidades verdes ou douradas, con aromas froiteiros que recordan á mazá, aínda que existen pequenos matices entre os Albariños das distintas subzonas, debido principalmente ás diferenzas climáticas, de orografía e solo. Así, de acordo con Vilanova e Vilariño (2006), o Albariño do Val do Salnés é máis floral e os aromas son máis vexetais (mazá verde), ten maior estrutura en boca e maior acidez; o Albariño da zona do Rosal é máis redondo en boca, ten aromas a froita de óso (albaricoque, melocotón) pero tamén ten algúns matices florais, menor acidez e maior grao alcohólico. Son viños, en xeral, frescos e suaves, con suficiente corpo e grao alcohólico e boa persistencia en boca.

En consonancia coa súa importancia na Galiza e na D.O. Rías Baixas, a zona de maior cultivo desta caste branca, o Albariño é tamén unha das castes galegas máis estudada. Son moitos, en efecto, os traballos nos que este cultivar é protagonista; moitos e abordados con enfoques e obxectivos ben distintos. Sen pretender facer un repaso exhaustivo, citaremos en primeiro lugar os traballos monográficos de Del Caño Abad (1984, 1991) e Fajardo (1984) nos

que se describen, con evidente propósito divulgativo, desde as principais características morfolóxicas da caste, as labores empregadas no seu cultivo (marcos de plantación, abonado e fertilización, sistemas de poda e condución,...) e as enfermidades e tratamentos fitosanitarios, ata os métodos de vinificación, a lexislación e o estudo económico da implantación do cultivo e da elaboración do viño Albariño. Os sistemas de condución do Albariño foron obxecto tamén dos traballos de Vázquez e col. (2008) que poñen de manifesto que o cultivo en espaldeira presenta mellores taxas de xermolación e fertilidade e que, neste sistema de condución, os bagos amosan maior maduración cunha composición máis equilibrada que no emparrado. Adica Fajardo (1984) un capítulo do seu libro ao estudo dos portaenxertos de máis ampla utilización para esta caste, un aspecto que abordan con maior rigor científico Masa (1985, 1988), ao considerar a afinidade bioquímica enxerto-patrón en función da composición proteica e isoenzimática da vinífera e das súas zonas de cultivo, e Cabaleiro e García-Berrios (1994) que estudan o comportamento de distintos clons de Albariño enxertados en dous patróns americanos diferentes.

Tamén a caracterización da caste foi obxecto de numerosos estudos, acometidos desde ópticas diferentes e empregando distintas metodoloxías. Pódense citar entre outros os traballos levados a cabo por Pérez-Fernández e col. (1993), Freijanes e Alonso (1997), Loureiro (1993, 1999), Martínez, (2002), Martínez e col. (1994) e Boso e col. (2004, 2005), que en todos os casos utilizan métodos baseados na descrición de caracteres ampelográficos e/ou agronómicos, dependentes en exceso de factores ambientais como clima, solo, labores de cultivo e mesmo o estado sanitario das plantas (Wolfe, 1976). Por esta razón, foron moitos os autores que dirixiron os seus esforzos cara á busca doutros marcadores con menor dependencia de factores externos, e así, debemos citar os traballos de Vidal (1996), Vidal e col. (1998, 1999a,b), Loureiro e col. (1998) e Vilanova e col. (2009) que caracterizan a caste Albariño empregando marcadores isoenzimáticos e/ou moleculares, ou os de Dopico-García e col. (2007) e Masa e col. (2007) que empregan como marcadores taxonómicos os flavonoides das uvas, compostos que foron utilizados tamén por Andrade e col. (2001) para a caracterización dos viños da caste Albariño. E

debemos considerar, así mesmo, aqueles traballos que caracterizan ao Albariño en función da súa composición aromática, por máis que a meirande parte deles estean dirixidos á caracterización dos viños. Destacaremos os de Carballeira-Lois e col. (2001) e Diéguez e col. (2003) que estudan os compostos aromáticos nas uvas do Albariño e outras castes brancas; os do grupo liderado por Oliveira (Oliveira, 2000; Oliveira e col., 2004, 2006, 2008a,b; e Genisheva e Oliveira, 2009) na Universidade de Minho (Braga – Portugal) que analizan os aromas varietais e fermentativos para a caracterización das principais castes da rexión demarcada “Vinhos Verdes”, concluíndo entre outras cousas que os alcohois C_6 compórtanse como marcadores varietais e da orixe dos viños; os de Versini e col. (1994) e Vilanova e Sieiro (2006), que analizan os terpenos libres e ligados nos viños Albariño; e os de Zamuz e Vilanova (2006a,b), Vilanova e col. (2007) e Falqué e col. (2008), que describen a composición aromática en viños e mostos procedentes de diferentes zonas de cultivo analizando o efecto do “terroir” na composición volátil do Albariño. Dentro deste mesmo apartado, citaremos tamén a Vilanova e Vilariño (2006), Zamuz e col. (2006, 2007a) e Vilanova e col. (2008) que estudan, desde o punto de vista da análise sensorial, os viños da caste Albariño e a influencia da súa orixe xeográfica sobre a composición aromática.

Paralelamente, e co obxectivo de fomentar a calidade e o bo estado sanitario do material vexetal e garantir así a identidade e a personalidade dos caldos con el elaborados, desenvolvéronse distintas liñas de investigación dirixidas á selección clonal e sanitaria do Albariño. A inexistencia dunha política agrícola clara neste sentido, que levou aos viticultores e viveiristas a facer (no principio da década dos 80 do pasado século) unha selección de material vexetal de forma descontrolada para a realización de novas plantacións de Albariño (Benayas, 1992), xustificaba de cheo esta orientación dos esforzos investigadores. Citaremos os traballos de Ballester e col. (1988) e Ferro (1989) por seren pioneiros nesta disciplina; os de Cabaleiro (1995) que aborda a incidencia do virus do enrolado da vide na caste Albariño, e os de Zamuz e col. (2007b) que estudan, en función de distintos parámetros enolóxicos (contido en azucre, acidez total, grao alcohólico, ...) os viños elaborados con distintos clons

da caste que nos ocupa. Debemos salientar en calquera caso, o programa de selección clonal do Albariño desenvolvido desde finais dos anos 80 cando, por iniciativa dunha empresa privada, o Consello Regulador da D.O. Rías Baixas e a Consellería de Agricultura da Xunta de Galicia, acométese unha exhaustiva prospección en campo, tarefa que sería retomada no ano 2000 pola Estación Experimental de Viticultura e Enoloxía de Ribadumia dependente da EVEGA no marco do proxecto VIN-302 (2002-2005): “Selección clonal de Albariño, Caiño tinto e Loureiro”. A realización deste programa de selección posibilitou que poidamos dispoñer xa de 11 clons de Albariño certificados sanitariamente e doutros 6 que na actualidade están en proceso de certificación (datos facilitados por I. Orriols, director da EVEGA).

3. COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DOS MOSTOS. OS COMPOSTOS DE NATUREZA FENÓLICA.

De forma xeral pódese dicir que os mostos están constituídos por multitude de moléculas procedentes da uva e susceptíbeis de seren transformadas no proceso de vinificación. Unha parte moi importante da composición dos mostos é auga, que se acumula de forma continuada na uva ao longo do proceso de maduración. E, xunto á auga, a uva contén dun 15 a un 25 % de azucres, glucosa e frutosa fundamentalmente (practicamente nunha relación 1:1 no momento da madurez comercial) pero tamén sacarosa, xilosa, arabinosa, rafinosa, melobiosa, maltosa e galactosa, por máis que os catro últimos aparezan só como trazas. Debemos considerar tamén a presenza de varios ácidos orgánicos procedentes da uva (tartárico, málico e cítrico), de substancias nitroxenadas, tanto en forma mineral (nitróxeno amoniacal) como orgánicos, entre os que destacan aminoácidos, péptidos e proteínas; de diversas pectinas, gomas e mucílagos (que forman parte da parede celular); de vitaminas e lípidos (en maior ou menor proporción dependendo de que se teñan eliminado ou non as sementes no proceso de elaboración do mosto); de sales, tanto derivadas de ácidos minerais (fosfatos, sulfatos, cloruros e sulfitos) como orgánicos (tartratos

e malatos fundamentalmente); de substancias aromáticas e volátiles; e de compostos fenólicos (Peynaud, 1993; Blouin e Guimberteau, 2004; Flanzky, 2000).

E son os compostos fenólicos o principal obxecto do noso traballo, polo que imos afondar no seu estudo, abordando en primeiro lugar a descrición desta importante familia de compostos e na estrutura química dos diferentes grupos que se engloban baixo esta denominación xeral; indicaremos logo os principais papeis que estes compoñentes de natureza fenólica xogan nos mostos e nos viños, pois non se debe esquecer que a conversión en viños a través dos procesos fermentativos é o destino final dos mostos e centra, xa que logo, boa parte do noso interese no estudo da composición fenólica dos mostos da caste Albariño.

Estes compostos, coñecidos tamén de forma xeral como polifenóis, son compoñentes do metabolismo secundario, e aínda que están presentes tanto no mundo vexetal como no animal, a maioría deles son de orixe vexetal. En xeral son compostos solúbeis en auga, en alcohois e/ou en solucións hidroalcohólicas, que poden estar localizados como formas libres nas vacuolas celulares ou formando parte das paredes celulares. Pola súa estrutura química, poderíanse definir como substancias que posúen un anel aromático que contén ao menos un grupo hidroxilo, incluíndo derivados funcionais (ésteres, glicósidos,...). O composto fenólico máis sinxelo sería polo tanto o fenol (figura 8), un produto natural que presenta un so grupo OH no seu único anel

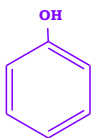


Figura 8. Fenol

aromático. A partir desta estrutura constrúese toda unha serie de compostos de maior complexidade. Foron descritos varios milleiros de polifenóis no reino vexetal, a maioría deles presentes nos froitos e que, desde o punto de vista da súa clasificación, pódense agrupar en distintas categorías.

Debemos considerar en primeiro lugar dous grandes grupos de compoñentes fenólicos, os flavonoides e os non flavonoides, que se diferencian polo número de átomos de carbono constitutivos e pola estrutura do seu esqueleto básico, que mentres para os flavonoides é do tipo $C_6-C_3-C_6$, pode presentar para os non

flavonoides distintas estruturas dependendo do tipo de composto de que se trate: C₆ para os fenóis simples, C₆-C₁, C₆-C₂, C₆-C₃, para os ácidos benzoicos, ácidos fenilacéticos e ácidos hidroxicinámicos respectivamente e, por achegar algún exemplo máis, C₆-C₂-C₆, para os derivados estilbénicos.

Da importancia destes compostos dá unha clara idea a extensa bibliografía que podemos encontrar a partir dos anos 50, nos que se produce unha grande “explosión” no coñecemento dos produtos naturais desde o punto de vista químico, bioquímico e mesmo xenético grazas á aparición de novas tecnoloxías e sobre todo ao descubrimento da Cromatografía de Papel no ano 1944 (Swain, 1985). Ademais dos traballos que iremos citando ao longo do noso estudo, debemos citar aquí, entre outras, as obras de Singleton e Esau (1969), Harborne (1984, 1989), Van Sumere e Lea (1985) e Macheix e col. (1990), que estudan distintos aspectos dos polifenóis e nos que basearemos moitas das nosas afirmacións de carácter xeral sobre estes compostos.

Con relación a outras froitos comestíbeis, as uvas son relativamente ricas en compostos de natureza fenólica que –evidentemente– van contribuír nas características dos mostos e dos viños que a partir deles se elaboren. A uva contén (Adams, 2006) especialmente, compostos non flavonoides na polpa, e flavonoides na pel, nas sementes e no raspón, de modo que as transformacións tecnolóxicas que se realicen tanto na obtención do mosto como durante a transformación deste en viño van condicionar a extracción dos citados compostos e a súa concentración no produto final. En calquera caso, non podemos obviar que durante a vinificación van existir procesos de difusión entre as partes sólidas e o mosto, e así, nos viños, xunto aos compostos fenólicos que proceden directamente da uva, atópanse outros polifenóis, ben sexa por transformación dos preexistentes na uva ou ben pola formación “de novo” no proceso fermentativo; ademais, no caso dos viños de garda que permanecen por un tempo en barrica, aparecerán novos compostos fenólicos que proveñen da madeira (Peynaud, 1993; Cheynier e col., 2000).

COMPOSTOS NON FLAVONOIDES

Ácidos hidroxibenzoicos

Como xa indicamos, posúen unha estrutura xeral do tipo C₆-C₁ derivada directamente do ácido benzoico (figura 9), sendo nas Anxiospermas o *p*-hidroxibenzoico, o vanílico, o siríngico e o protocatéquico os catro ácidos con distribución universal, e o ácido gálico, outro dos máis comúns. Ademais, os ácidos benzoicos están frecuentemente presentes en forma ligada constituíndo estruturas complexas como os taninos hidrolizábeis ou moléculas sinxelas por combinación con azucres ou ácidos orgánicos.

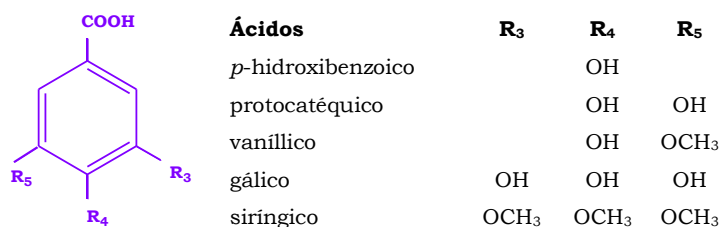


Figura 9. Ácidos benzoicos

Todos estes compostos están presentes nas uvas, debéndose salientar –en todo caso– a presenza do ácido siríngico por ter este composto unha distribución máis limitada no resto dos froitos; de feito, considerouse durante bastante tempo exclusivo da vide. Así, Macheix e col. no ano 1990, asumen con rotundidade a aseveración de Ribereau-Gayón (1963) cando din que o froito de *Vitis* é o único que posúe este ácido, algo que hoxe en día xa non se sostén (Salta e col., 2010).

Pola súa banda, o ácido gálico encóntrase tanto na súa forma libre como combinado coa (-)-epicatequina formando o epicatequín-galato, constituinte dos bagos non maduros, e contribúe tamén á formación de taninos condensados.

Desde o punto de vista cuantitativo, e se exceptuamos certos froitos da familia Rosaceae como a mora, o contido en ácidos hidroxibenzoicos é relativamente baixo nos froitos.

Ácidos hidroxicinámicos

Estes compostos xogan un papel moi importante entre os polifenois dos froitos, tanto pola súa abundancia como pola súa diversidade; derivan do ácido cinámico e están presentes fundamentalmente como formas combinadas de catro moléculas básicas, os ácidos *p*-coumárico, cafeico, ferúlico e sinápico (figura 10).

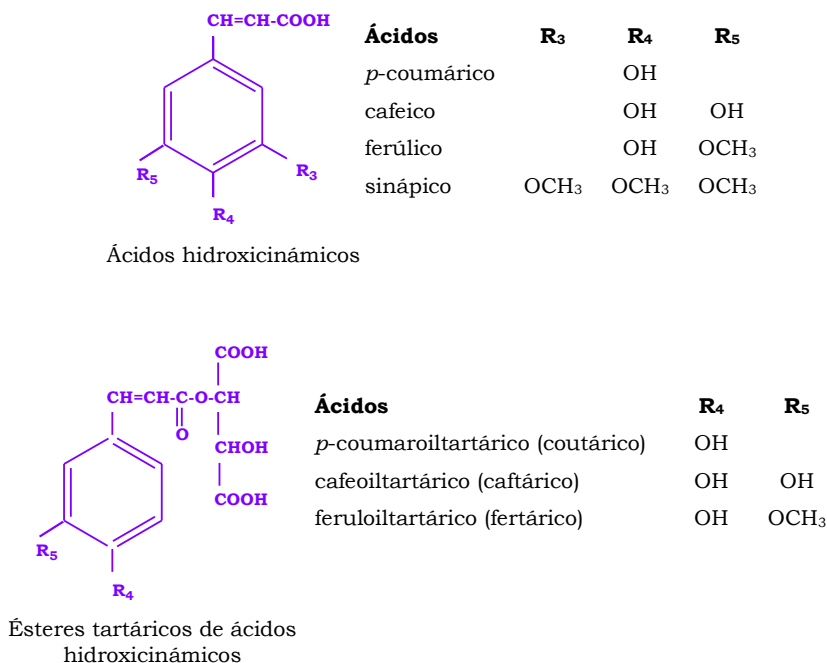


Figura 10. Derivados hidroxicinámicos.

A presenza dun dobre enlace na cadea lateral fai posíbel a coexistencia dos isómeros *cis* e *trans*, sendo esta última a forma máis estábel e na que -xa que logo- aparecen principalmente; a interconversión destas dúas formas isoméricas pode ocorrer *in situ* e é responsábel de certas respostas fisiolóxicas

das plantas. As formas libres destes ácidos raramente están presentes nos froitos, nos que só se acumulan en situacións especiais, debido a alteracións fisiolóxicas ou pola acción de microorganismos (que provocan a súa degradación enzimática), anaerobiose e substitución dalgún precursor metabólico. De acordo con Macheix e col. (1990), tamén se poden producir hidrólises no transcurso de certas manipulacións tecnolóxicas como a conxelación, a conservación a baixas temperaturas, a esterilización e/ou nos procesos de vinificación.

Polo que fai aos derivados hidroxicinámicos ligados, podemos falar –entre outros- de ésteres con diferentes ácidos (fundamentalmente quínico, siquímico e tartárico, pero tamén outros como o málico, presentes en pequenas concentración nas vaiñas da familia Fabaceae e como trazas nas peras), de derivados ligados a azucres, de derivados aminados, de derivados acilados con diferentes flavonoides, e da existencia de unións coa lignina, suberina e cutina. Ao contrario do que sucede cos siquímicos, os derivados quínicos son, polo xeral, abundantes na meirande parte dos froitos, aínda que nalgún caso –no xénero *Vitis* entre outros- están ausentes (Ong e Nagel, 1978; Ribereau-Gayon, 1965); pola súa banda, os ésteres tartáricos vense limitados aos froitos de certas especies de *Vitis*, polo que adquiren para nós un elevado interese.

A presenza dos ésteres tartáricos en *Vitis vinifera* quedou demostrada no ano 1965, no que os describiu Ribereau-Gayón, pero seguiron existindo certas discrepancias sobre a presenza ou non do ácido cafeoilquínico (clorogénico) nas uvas e nos seus produtos derivados, e así Singleton no 1980 aseguraba aínda a súa existencia. Varios derivados ligados a azucres (fundamentalmente á glucosa) foron identificados en numerosos froitos, e poden aparecer tanto en forma de ésteres como de glicósidos, mentres que as hidroxicinamoilamidas son frecuentes nos vexetais pero moito menos nos froitos. Contrariamente ao que sucede coas hidroxicinamoilamidas, os derivados acilados de flavonoides están amplamente representados nos froitos, de forma particular os correspondentes aos antocianos. Nas uvas, un material vexetal estudado profusamente, existen derivados antociánicos acilados, tanto co ácido *p*-coumárico como co cafeico,

aínda que neste último caso, de forma menos abundante. Os ácidos hidroxicinámicos, e particularmente o *p*-coumárico e o ferúlico, forman parte da estrutura dos diferentes polímeros que conforman as paredes celulares, ben como precursores directos dos monómeros da lignina, ben esterificados coa propia lignina ou cos polisacáridos da parede celular. Ademais, tamén poden estar unidos covalentemente a compoñentes da cutina e da suberina (Macheix e col., 1990).

De entre os derivados hidroxicinámicos presentes nos froitos, os cafeoilados son os máis abundantes, ao igual que ocorre nos mostos de *V. vinifera* nos que, como media e de acordo con Singleton e col. (1986), supoñen o 84 % do total destes compostos no caso das castes tintas e o 87 % no das brancas; séguenlle en abundancia, os derivados *p*-coumaroilados que, porén, poden ser predominantes en certos *Citrus* e nalgúns castes de framboesa e piña. Na meirande parte das castes de *V. vinifera* as proporcións deste ácido atópanse entre o 3 e o 25 % do total dos derivados hidroxicinámicos, podendo pasar do 60 % nas peles de certas castes tintas. Polo que fai aos derivados feruloilados, dicir que supoñen unha pequena porcentaxe do total dos derivados hidroxicinámicos dos froitos, aínda que en certos casos (como no pemento e na caste branca Clairette no momento da maduración) poden superar o 50 %. O ácido sinápico –o hidroxicinámico correspondente do ácido siríngico- citado por Shahidi e Chandrasekara (2010) na laranxa, nalgúns cereais como a avena e centeo e en distintos froitos secos, semella ter unha presenza escasa en froitos, polo que debemos destacar a súa presenza nos do xénero *Vitis* (Ribereau-Gayón (1963).

Xa por último, e aínda que por non estar presentes no xénero *Vitis* limitarémonos a citar a súa existencia no mundo dos produtos naturais de orixe fenólica, nomear ás coumarinas, lactonas derivadas dos ácidos *o*-hidroxicinámicos por ciclación e peche do anel entre os grupos *o*-hidroxi e carboxi, que teñen especial interese nas familias Rutaceae (esencialmente no xénero *Citrus*) e Umbelliferaceae.

Estilbenos

Son compostos fenólicos que conteñen dous aneis aromáticos separados por un enlace eteno (1,2-difeniletenos) e que derivan do ácido cinámico pola ruta metabólica do ácido siquímico. A súa importancia vén dada polo seu papel como fitoalexinas na defensa fronte aos ataques de microorganismos de orixe fúnxica, e pola súa actividade antioxidante e capacidade de eliminación de radicais libres, o que lle confire marcados efectos beneficiosos sobre a saúde. É precisamente pola importancia destes derivados fenólicos, que existe unha elevada produción científica en torno aos estilbenos e ao seu papel biolóxico, que será citada en boa medida ao longo do noso estudo; convén citar aquí, en calquera caso, os traballos do grupo liderado por P. Langcake e R. J. Pryce (Langcake e Pryce, 1976; 1977a,b) por ser pioneiros na investigación neste eido, e a revisión sobre a bioquímica dos estilbenos publicada por J. Gorham no ano 1995, tal vez un dos poucos traballos sitemáticos sobre este extenso grupo de compostos.

Os estilbenos (figura 11) poden estar presentes nos froitos nas dúas formas isoméricas *cis* e *trans*, sendo esta última a forma predominante. O resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) e os seus derivados (tanto glicósidos como oligómeros) foron identificados en diferentes plantas e alimentos, pero a fonte potencial máis importante destes compostos para os humanos son as uvas e os seus produtos derivados (Moreno e col., 2008; Guerrero e col., 2010a).

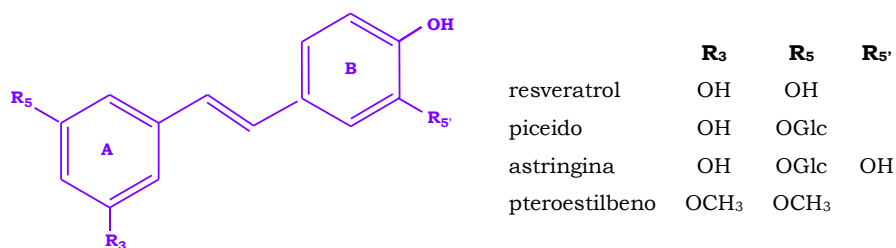


Figura 11. Estilbenos.

Segundo Ali e col. (2010), os estilbenos presentes na vide inclúen diferentes compostos como o *trans*- e *cis*-resveratrol e os seus derivados glucosilados no carbono 3 (*trans*- e *cis*- piceido); as ϵ -, α -, β - e δ -viniferinas (dímeros e trímeros do resveratrol, respectivamente); o piceatanol, tamén chamado astringinina (3,3',4,5'-tertrahidroxiestilbeno) e o seu glucósido en posición 3 (astringina); o pteroestilbeno (3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno) e o pallidol, un dímero do resveratrol.

Aínda que en xeral admítese que a presenza destes compostos na uva ocorre soamente como consecuencia da exposición a estreses bióticos e abióticos (infeccións fúnxicas, radiación UV, humidade, etc), existen evidencias tanto bioquímicas como transcricionais de que estes compostos tamén se acumulan en ausencia dos citados estímulos (Gatto e col., 2008).

Nos bagos, os estilbenos encóntranse, na meirande parte dos casos, nas súas formas glucosiladas e están localizados principalmente nas peles, aínda que tamén se atopan nas sementes e nos pedúnculos. O estilbeno máis importante nas uvas é o resveratrol, que na súa forma isomérica *trans* localízase nas peles e nunca na polpa; polo que fai ao isómero *cis*, dicir que en xeral admítese que non existe de forma natural nas uvas, e que a súa presenza é sempre inducida pola radiación UV. En viños, foron detectados ámbolos dous isómeros, considerándose tamén que a presenza do *cis*-resveratrol é tamén debida á isomerización fotoquímica da forma *trans* durante o proceso de vinificación. De acordo con Sun e col. (2006) e Moreno e col. (2008), tanto a concentración como a actividade biolóxica é menor na forma *cis* que na forma *trans*.

COMPOSTOS FLAVONOIDES

Os flavonoides son compostos que –como xa adiantamos- posúen un esqueleto base C₁₅ (C₆-C₃-C₆), diferenciándose os distintos grupos no nivel de oxidación do anel pirano central; no caso das chalconas este anel central está aberto. Nos vexetais son extremadamente numerosos e variados, sendo as tres clases máis

amplamente estendidas e cuantitativamente dominantes nos froitos, os antocianos, os flavonóis e os flavan-3-óis, estes últimos tanto nas súas formas monoméricas como nas condensadas (taninos). As flavonas, flavanonas, flavanonois ou dihidroflavonois, chalconas e dihidrochalconas, son menos abundantes, agás en certos casos como no xénero *Citrus*. Algúns destes compostos, nomeadamente as flavanonas e os dihidroflavonois, son intermediarios nas rutas da biosíntese doutros flavonoides. Xa por último, debemos considerar outras clases de compostos fenólicos que, como os isoflavonoides que só se encontraron en grupos específicos de vexetais, raramente aparecen nos froitos.

Antes de entrar a describir cada unha das clases de flavonoides que temos citado, debemos dicir que, con seguridade, estamos a falar do grupo de compostos fenólicos sobre os que máis se ten investigado, debendo citar algún dos autores que maior contribución teñen feito ao seu coñecemento. Diremos en primeiro lugar que non se entendería a investigación no eido dos flavonoides sen as contribucións do Prof. J.B. Harborne ao longo dos últimos 60 anos nos que xunto a un extensísimo número de publicacións, ten elaborado importantísimos traballos de revisión que resulta obrigado citar. Sen pretender ser exhaustivos, citaremos algunha das súas contribucións máis importantes neste terreo: *Comparative Biochemistry of the Flavonoids* (1967), *The Flavonoids* (1975), *The Flavonoids. Advances in Research* (1982), *The Flavonoids. Advances in Research since 1980* (1988) e *The Flavonoids. Advances in Research since 1986* (1994). Pero tampouco podemos deixar de citar a K.R. Markham, T.J. Mabry, H. Mabry, B.A. Bohm ou a G. Mazza, neste último caso cunha especial dedicación ao estudo dos antocianos, eido no que tamén debemos resaltar o traballo desenvolvido por C.F. Timberlake e P. Bridle.

Antocianos

Son os pigmentos que proporcionan as cores vermella, violeta e azul na meirande parte dos froitos, aínda que nalgúns casos –como no tomate e no pemento vermello- a cor é responsabilidade dos carotenoides. Químicamente

son derivados do 2-fenilbenzopirilio, que posúe carácter catiónico e que é chamado tamén flavilio. As diferentes substitucións con hidroxilos ou metoxilos dan lugar segundo Mazza e Miniati (1993) a un total de 17 antocianidinas (aglicóns), das que seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina e malvidina) aparecen con maior frecuencia na natureza e contribúen de forma xeral á pigmentación dos órganos das plantas, sendo ademais as únicas con presenza nos froitos. Na figura 12 móstranse estas seis antocianidinas cos seus correspondentes patróns de substitución.

Os pigmentos antociánicos aparecen sempre na natureza como formas glicosiladas, chamadas antocianinas, podéndose producir a liberación dos aglicóns mediante hidrólise. Segundo Macheix e co. (1990), nos froitos, como noutras partes das plantas, a formación de monoglucósidos ten lugar case sempre na posición 3 e nela están implicados cinco azucres (glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa e rhamnosa). Neste caso, a glucosa, a galactosa e a arabinosa poden combinarse coas 6 antocianidinas, mentres que a xilosa só se une á cianidina (cianidín-3-xilósido na mazá e na mora), e a rhamnosa á pelargonidina (pelargonidín-3-rhamnósido no litchi).

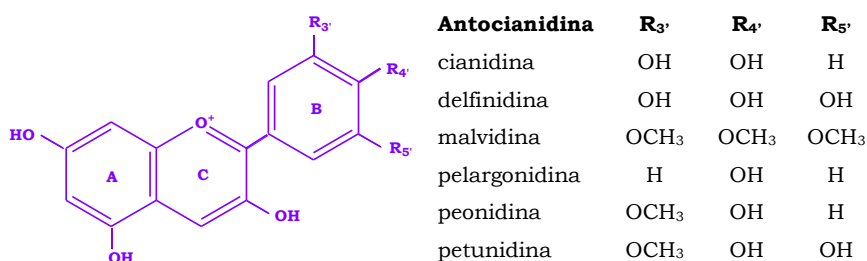


Figura 12. Antocianos.

No caso dos diglicósidos, as dúas moléculas de azucre poden estar unidas en dous grupos hidroxilo diferentes, maioritariamente nas posicións 3 e 5 aínda que de forma máis rara se poden dar tamén nas posicións 3 e 7, ou soamente nun grupo hidroxilo; neste último caso, a glicosilación prodúcese sempre na

posición 3. Hai que facer notar que nos froitos, e en todos os casos, o azucre implicado na formación dos 3,5- e 3,7-diglicósidos é sempre a glucosa, mentres que nos 3-diglicósidos os azucres máis comúns son a rutinosa (6-*O*- α -L-rhamnosil-D-glucosa), a sambubiosa (2-*O*- β -D-xilosil-D-glucosa), a soforosa (2-*O*- β -D-glucosil-D-glucosa) e a gentiobiosa (6-*O*- β -D-glucosil-D-glucosa). Aínda que se coñecen 3,5-diglicósidos para os 6 aglicóns (Macheix e col., 1990), as referencias para os 3,7-diglicósidos son máis escasas e só para algunhas das antocianidinas (Mazza e Miniati, 1993). Polo que fai aos triglicósidos dicir que son pouco abundantes, e teñen unha distribución escasa nos froitos. A glicosilación semella conferir estabilidade e solubilidade ao aglicón, sen que sexa a natureza dos azucres a que teña maior efecto, senón máis ben a súa posición na molécula (Timberlake e Bridle, 1980).

En moitos casos, as formas glicosiladas dos antocianos atópanse aciladas por esterificación cun ácido (normalmente os ácidos *p*-coumárico, cafeico, ferúlico e sinápico e máis raramente acético, *p*-hidroxibenzoico e malónico) sobre un grupo hidroxilo do azucre, xeralmente no hidroxilo na posición 6 cando se trata da glucosa e no da posición 4 cando se trata de rhamnosa, estando o grupo acilo unido ao azucre en posición 3. Este fenómeno de acilación parece estar relacionado coa estabilización dos antocianos no medio ácido do medio celular.

Sen entrar en excesivas puntualizacións, xa que os compostos de natureza antociánica non son obxecto do noso estudo, debemos indicar que moi probabelmente a característica máis significativa dos antocianos é a de ser susceptíbeis de experimentar transformacións estruturais cos cambios de pH, que se traducen en modificacións da cor. Así, os antocianos dan coloración vermella en disolucións ácidas decrecendo a intensidade da cor a medida que aumenta o pH. As disolucións neutras ou alcalinas teñen cores violetas ou azuis que desaparecen a medida que pasa o tempo. Esta propiedade vén dada pola existencia nas antocianinas cando están en medio ácido ou neutro dun equilibrio entre catro estruturas (o catión flavilio AH⁺, a base quinoidal, a

pseudobase carbinol e a chalcona), un proceso descrito por multitude de autores entre os que debemos citar a Mazza e Miniati (1993).

Nas uvas, os antocianos localízanse nas peles e representan unha parte importante –tanto a nivel cuantitativo como cualitativo– dos flavonoides das castes tintas, atopándose tamén na polpa das castes tintureiras (Cheynier e col., 2000). A acumulación destes compostos na pel das uvas tintas coincide coa expresión do xene que codifica a enzima UDP glucosa-flavonoide 3-O-glucosil transferasa (UFGT) implicada na etapa final da biosíntese dos antocianos que, no caso das castes brancas, non se expresa (Boss e col., 1996a, b).

Aínda que na meirande parte dos froitos (90%) o aglicón máis común é a cianidina, seguida da delfinidina, peonidina, pelargonidina e, finalmente, petunidina e malvidina, que en moitos casos están ausentes, nas uvas e nalgún outro froito, a situación é ben diferente. Ata hai pouco, afirmábase que na *V. vinifera*, na que a malvidina é maioritaria e a cianidina presenta unha concentración en xeral baixa, non existían derivados antociánicos da pelargonidina, algo que semella desmentido polos traballos de Castillo-Muñoz e col. (2009a) que atopan o pelargonidín-3-glucósido e os seus derivados acetilados e *p*-coumaroilados na Garnacha tintureira. Por outra banda, debemos indicar que, a pesar de que xa no ano 1995 foi confirmada a existencia de 3,5-diglucósidos na *V. vinifera* (Baldi e col., 1995), aínda hoxe unha maioría de autores seguen afirmando que a presenza destes derivados na vide está reservada exclusivamente ás *Vitis non viníferas*. Ademais, para as seis formas monoglucosiladas existen os derivados acilados cos ácidos *p*-coumárico (3-*p*-coumaroil-glucósidos) e acético (3-acetil-glucósidos), existindo só para tres delas (malvidina, peonidina e petunidina) as formas aciladas co ácido cafeico.

Flavonas e Flavonois

Tendo en conta que ámbalas dúas clases de compostos teñen unha relación química moi achegada, ímolos considerar xuntos nun so apartado. Tanto

flavonas como flavonóis son compostos flavonoideos cunha estrutura que se caracteriza pola existencia dunha cadea insaturada 3-C cun dobre enlace entre o C₂ e o C₃, e que se diferencian pola inexistencia no caso das flavonas do grupo hidroxilo en posición 3 característico dos flavonóis. Así pois, estes últimos pódense considerar 3-hidroxi-flavonas (figura 13). En ámbolos dous casos a súa cor varía do branco ao amarelo. Na natureza existe un número moi elevado destes compostos, unha realidade que queda reflectida na revisión realizada por Wollenweber (1994) na que, considerando só os derivados hidroxilados e os metilados, recóllense unhas 300 flavonas e 380 flavonóis. Unha inmensa maioría destes flavonóis aparecen como formas trihidroxiladas nas posicións 3, 5 e 7. Porén, a pesar do grande número de flavonas identificadas nos vexetais, estes compostos non son comúns nin moito menos predominantes nos froitos, agás para os do xénero *Citrus* que presentan varias flavonas polimetoxiladas; por outra banda, os glucósidos da apigenina (flavona análoga ao flavonol kaempferol) e da luteolina (análoga á quercetina) –as dúas flavonas máis amplamente distribuídas no mundo vexetal- a penas existen nos froitos (Macheix e col., 1990; Bohm, 1998) e están ausentes nos do xénero *Vitis*, por máis que Hmamouchi e col. (1996) teñan identificado os correspondentes 7-glucósidos de ámbolos dous aglicóns nas follas de *V. vinifera*.

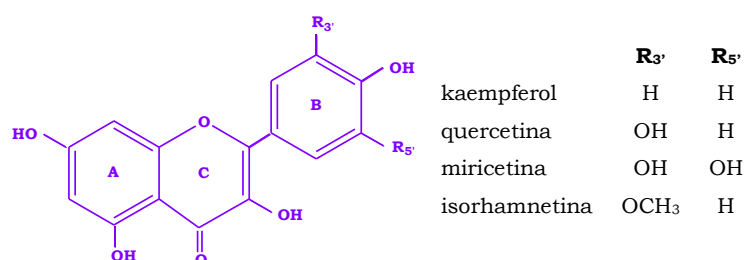


Figura 13. Flavonóis.

Maior relevancia adquiren os flavonóis pola súa abundancia en froitos, nos que aparecen principalmente como formas glicosiladas de catro aglicóns: quercetina, kaempferol, miricetina e isorhamnetina (3'-metileter da quercetina).

Polo que fai á súa distribución, a quercetina está presente en todos os froitos e o kaempferol nun 80 % deles, sendo a miricetina e a isorhamnetina menos comúns.

Considerando o elevado número de glicósidos de flavonóis que se coñecen no reino vexetal, resulta relativamente escaso o número destes compostos que se teñen atopado en froitos, nos que debemos resaltar a abundancia relativa dos glicósidos da miricetina e o baixo número dos correspondentes á isorhamnetina, o que contrasta cos resultados obtidos para estes derivados no resto dos órganos vexetais. De forma xeral, os azucres implicados na glicosilación dos flavonóis son a glucosa, a galactosa, a rhamnosa, a arabinosa, a xilosa e o ácido glucurónido, por máis que nos froitos non se teñen atopado os derivados glicosilados con xilosa e arabinosa. A glucosa, a galactosa, a xilosa e o ácido glucurónido normalmente están unidos aos aglicóns por enlaces β , mentres que a arabinosa e a rhamnosa están unidos por enlaces α . A glicosilación dos flavonóis ten lugar preferentemente no grupo hidroxilo da posición 3, sendo predominantes os 3-O-monoglicósidos tanto en froitos como noutros órganos das plantas. En función do azucre nestas formas monoglicosiladas, a orde de abundancia para estes derivados é a seguinte: glucósidos, galactósidos, rhamnósidos e glucurónidos. En todos os casos os glucósidos e galactósidos da quercetina e do kaempferol son os monoglicósidos máis abundantes, debendo resaltar que todas as formas monoglicosiladas da quercetina e do kaempferol se distribúen cunha frecuencia similar agás no caso dos rhamnósidos, no que existe unha evidente preponderancia do derivado da quercetina (Macheix e col., 1990). Ao considerar as formas diglicosídicas hai que diferenciar entre aquelas que teñen os dous azucres no mesmo carbono (sempre en posición 3) e as que están glicosiladas en carbonos diferentes, para os que as posicións máis favorábeis son 3, 7 e 4', máis rara a posición 5 e aínda máis estrañas as que teñen lugar nas posicións 6, 8, 2', 3' e 5'. As glicosilacións duplas que se dan con maior frecuencia ocorren nas posicións 3 e 7 ou 3 e 4'. En calquera caso, os flavonóis diglicósidos máis comúns son os 3-rutinósidos, cunha molécula de rhamnosa e outra de glucosa unidas por un enlace 1 \rightarrow 6

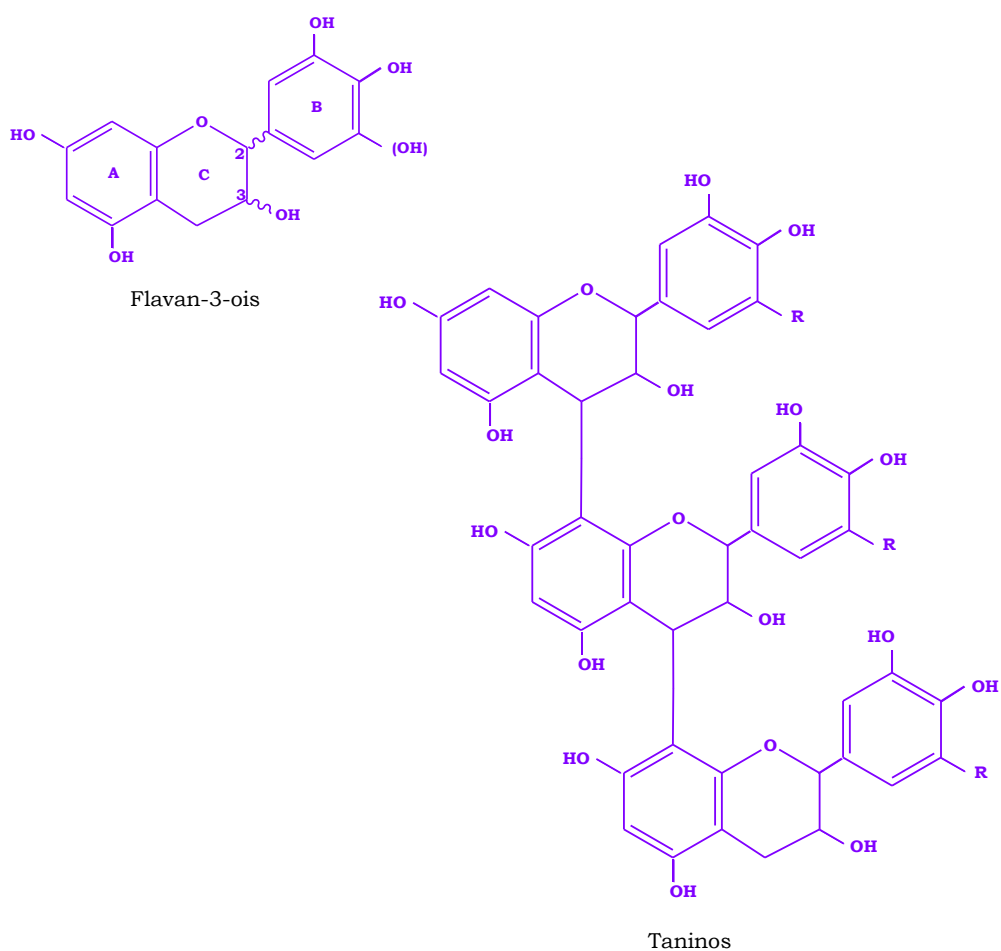
(rutinosa), sendo os 3-rutinósidos da quercetina e do kaempferol os que aparecen con maior frecuencia. No caso dos triglicósidos, e falando sempre dos froitos, dicir que –ao igual que sucedía para os antocianos– cóñécense poucos e son poucas tamén as especies nas que foron identificados. De acordo con Macheix e col. (1990), nos froitos é raro encontrar derivados acilados dos flavonóis.

Nas uvas os flavonóis atópanse nas peles, e nas castes tintas están presentes de modo simultáneo derivados dos catro aglicóns, por máis que, dependendo da caste, a isorhamnetina –que aínda que se pensaba que era exclusiva das castes tintas, tamén se atopou nas brancas– poida aparecer en cantidades traza (Mattivi e col., 2006; Rodríguez-Montelegre e col., 2006; Castillo-Muñoz e col., 2010). O aglicón que si semella ser específico das castes tintas é a miricetina, que porén foi descrita en uvas e viños brancos de *Vitis rotundifolia* (Talcott e Lee, 2002; Pastrana-Bonilla e col., 2003). Ademais destes flavonóis frecuentes na *Vitis vinifera*, Castillo-Muñoz e col. (2009b) identificaron en uvas de castes tintas a laricitrina e a siringetina, derivados monometoxilado e dimetoxilado da miricetina, respectivamente. Se nos detemos agora no estudo dos azucres presentes nos flavonóis, dicir que nas uvas non se atoparon nunca derivados monoglicosilados coa xilosa nin coa arabinosa, existindo tanto para a quercetina como para o kaempferol formas glicosiladas cos outros catro azucres (glucosa, galactosa, rhamnosa e ácido glucurónico) e coa rutinosa, e os galactósidos, glucósidos e galacturónidos da isorhamnetina, miricetina, laricitrina e siringetina (Castillo-Muñoz e col., 2009b; 2010). Xunto aos 3-rutinósidos xa mencionados, téñense identificado tamén o 3-glucosil-galactósido e o 3-glucosil-xilósido da quercetina. Debemos indicar neste punto que, no que fai a *Vitis vinifera*, só se teñen atopado formas glicosiladas en posición 3, mentres que nas *Vitis* americanas existen tamén formas 3,5-diglicosiladas.

Aínda que nos viños pódense atopar o kaempferol, a quercetina, a miricetina e a isorhamnetina como aglicóns libres, nas uvas os flavonóis aparecen exclusivamente como formas glicosiladas (Cheynier e col., 2000).

Flavans

Son flavonoides caracterizados por unha cadea 3-C saturada entre os carbonos C_2 e C_3 (figura 14), existindo na natureza os flavan-3-óis e os flavan-3-4-dióis (leucoantocianidinas). Os flavan-3-4-dióis son frecuentes na madeira e na codia das árbores aparecendo nos froitos de forma ocasional, ao contrario do que ocorre cos flavan-3-óis (as unidades monoméricas dos taninos condensados tamén chamadas proantocianidinas) que teñen moita importancia nos froitos.

**Figura 14.** Flavans.

Os principais monómeros flavan-3-óis son a (+)-catequina e a (-)-epicatequina (dous *o*-difenois hidroxilados no anel B en posicións 3' e 4') e a (+)-galocatequina e a (-)-epigalocatequina, dúas formas trihidroxiladas nas posicións 3', 4' e 5'. De forma contraria ao que sucedía para os antocianos e os flavonóis, nos froitos encóntranse polo xeral máis formas libres que glicosiladas ou esterificadas, agás para o caso do éster (-)-epicatequín-3-*O*-galato presente en varias castes de *Vitis vinifera*. A importancia destes compostos radica na súa participación xunto co ácido clorogénico nos procesos de empardecemento dos froitos, xa que son substratos naturais das polifenoxidasas; o seu contido, de acordo con Macheix e col. (1990), varía considerabelmente entre as diferentes especies e castes.

E adquiren un especial interese as formas poliméricas dos flavan-3-óis, os denominados taninos, que en función da súa estrutura véñense clasificando como taninos hidrolizábeis e taninos non hidrolizábeis ou condensados. Posúen un gran número de grupos hidroxilo que lle proporcionan a capacidade de unirse de forma reversíbel con outras macromoléculas naturais como polisacáridos e proteínas, e con outros metabolitos (Ferreira e col., 2006). De acordo con estes autores, os taninos hidrolizábeis son polifenois complexos que, baixo condicións hidrolíticas (ácidos, bases, enzimas hidrolíticos), poden degradarse en fragmentos máis sinxelos, principalmente azucres e algúns ácidos fenólicos. Son poliésteres formados en base á esterificación cos ácidos gálico e/ou elágico e os seus derivados con D-glucosa ou –nalgún caso- co ácido quínico, con algún glicósido ou con outros poliois. Clasifícanse en función dos produtos da súa hidrólise, podéndose falar de galotaninos, que liberan o ácido gálico e elagitaninos que liberan o ácido elágico. Por outra banda, os taninos condensados (protoantocianidinas) posúen a estrutura xeral de flavan-3-óis con distintos graos de polimerización e nos que os enlaces flavan teñen lugar, na meirande parte dos casos, entre o carbono 4 e os carbonos 8 ou 6. As proantocianidinas oligoméricas máis simples son as diméricas, formadas por unidades de (+)-catequina e/ou (-)-epicatequina; son as denominadas proantocianidinas B-1, B-2, B-3 e B-4, normalmente formas non glicosiladas aínda que pode existir –en situacións excepcionais- glicosilación na unidade da

(-)-epicatequina. Pola súa banda, Foo (1981) indica que, dos cinco grupos nos que se poden clasificar as formas poliméricas, só tres están nos froitos: as proantociandinas de clase A que conteñen fundamentalmente procianidinas (derivadas da (+)-catequina e da (-)-epicatequina) con monómeros cunha alta proporción de formas *cis* (tipo epicatequina); as de clase C que son menos comúns e presentan igual proporción de unidades de procianidinas e prodelfinidinas (derivadas da (+)-galocatequina e da (-)-epigalocatequina) que están tanto en configuración *cis* como *trans*; e as de clase D que conteñen principalmente prodelfinidina con configuración *cis* (que só se encontraron en froitos do xénero *Ribes*).

Nas uvas, a fracción dos taninos pode chegar a ser o 25 % dos polifenóis totais, sendo maior a proporción das formas poliméricas que os flavan-3-óis monoméricos e as procianidinas diméricas; nestes froitos aparecen as catro formas monoméricas xa citadas ((+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina e (-)-epigalocatequina) ademais do éster galato da (-)-epicatequina, sendo a (+)-catequina máis abundante que a (-)-epicatequina, con valores medios do 79% en peles e 50% en sementes. En calquera caso, de acordo con Singleton e Trousdale (1983), existen castes brancas nas que é maior o contido en (-)-epicatequina que en (+)-catequina. Outros compostos como o 3-galato de (+)-catequina e o 3-galato de galocatequina parecen ser específicos de algunhas castes (Cheynier e col., 2000). As sementes son particularmente ricas en taninos condensados, estando as procianidinas oligoméricas representadas polos catro dímeros B-1, B-2, B-3 e B-4, sendo os dous primeiros os máis abundantes. As formas triméricas máis probábeis son a C-1 e a C-2, e non se teñen atopado formas tetraméricas. Dentro das formas poliméricas pódense diferenciar dous subgrupos, as procianidinas que se encontran nas sementes e nas peles, e as prodelfinidinas que se localizan só nas peles (Cheynier e col., 2000; Rigaud e col., 1996).

O contido de flavan-3-óis e oligómeros de procianidinas nas uvas pode variar coa caste, co grao de maduración e coa situación da uva no acio, estando sempre en maior cantidade as procianidinas que as formas monoméricas. Por

outra banda, os valores obtidos para estes compostos tamén son maiores nas sementes, aparecendo en cantidades trazas na polpa (Bourzeix e col., 1986). Tamén se poden dar variacións nas proporcións relativas das formas poliméricas sendo, de forma xeral, a procianidina B-1 máis abundante, aínda que certas castes presentan unha predominancia de formas B-2 e outras contidos equivalentes de B-1 e B-4. O grao de condensación tamén é diferente dependendo da parte do bago que se considere e así, pódese afirmar que nas peles están as formas con alto grao de condensación e nas sementes as pouco condensadas. A fracción polimérica está formada por unha mestura de unidades de procianidina e prodelfinidina cunha proporción relativamente alta (do 15 ao 20%) desta última, predominando as formas *cis* (aproximadamente o 92%), e como grupos terminais das cadeas a (-)-epicatequina, (+)-catequina, (-)-epigallocatequina ou (-)-epicatequín-3-*O*-galato en proporcións aproximadas de 37:37:21:5 (Macheix e col., 1990).

Outros flavonoides

Dentro do grande grupo dos compostos flavonoideos, e xunto ás familias que vimos de describir (antocianos, flavonas, flavonois e flavan-3-ois) inclúense tamén outras clases de compostos como as flavanonas (dihidroflavonas), os flavanonois (dihidroflavonois), as chalconas, as dihidrochalconas e os considerados flavonoides minoritarios (nos que se veñen considerando os C-glicosilflavonoides, as auronas, os isoflavonoides, os biflavonoides e os neoflavonoides). Tendo en conta a escasa presenza da meirande parte destes compostos no xénero *Vitis* obxecto do noso estudo imos facer tan só unha pequena revisión dos dihidroflavonois, que teñen sido identificados en uvas e viños e que, de acordo con Grayer (1989) posúen propiedades farmacolóxicas e biolóxicas de interese.

Os dihidroflavonois presentan unha estrutura $C_6-C_3-C_6$ na que a cadea 3-C está saturada; teñen un átomo de osíxeno na posición 4 e un grupo hidroxilo na posición 3 (3-hidroxiflavanonas) que os diferencia das flavanonas (figura 15).

Tanto as flavanonas como os dihidroflavonois están amplamente distribuídos no reino vexetal, pero son pouco abundantes nos froitos.

Os dihidroflavonois son o maior subgrupo dos compostos flavanoides identificado en *Vitis*, sendo o dihidroquercetín-3-*O*-rhamnósido (astilbina) e o dihidrokaempferol-3-*O*-rhamnósido (engeletina) os primeiros en ser identificados na pel de uvas brancas (Trousdale e Singleton, 1983). Ademais destes dous dihidroflavonois, Baderschneider e Winterhalter (2001) en viños Riesling e Masa e col. (2007) en peles de castes brancas galegas identificaron outros derivados pertencentes a este grupo de compostos.

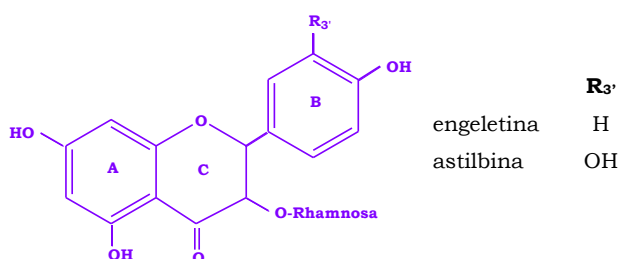


Figura 15. Dihidroflavonois.

BIOSÍNTESE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NA VIDE

A biosíntese dos compostos fenólicos presentes na uva, tal e como se pode ver na figura 16, comeza co aminoácido fenilalanina, produto da ruta do siquimato que tamén é responsábel da síntese da tirosina e o triptófano, outros aminácidos aromáticos (Adams, 2006). Esta é unha diferenza con respecto a aqueles que teñen a súa orixe nos lévedos, que teñen no ácido acético o seu precursor inicial.

Aínda que por regra xeral a biosíntese e acumulación dos compostos fenólicos na uva vai aumentando a medida que progresa a maduración, existen diferenzas nestes procesos dependendo do grupo de compostos de que se trate; así, os polifenois simples (derivados hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos) son

acumulados nas vacuolas das células, de forma máis abundante nas células da hipoderme, xunto cos taninos e os antocianos, que nas do mesocarpo da polpa, algo que resulta máis evidente no caso dos ésteres dos ácidos hidroxicinámicos (Adams, 2006; Ali e col., 2010). A biosíntese dos ácidos hidroxicinámicos comeza no inicio do desenvolvemento da uva e aumenta lixeiramente desde o pintado ata a maduración, de modo que a súa concentración diminúe durante a maduración en proporción ao crecemento do bago (Adams, 2006).

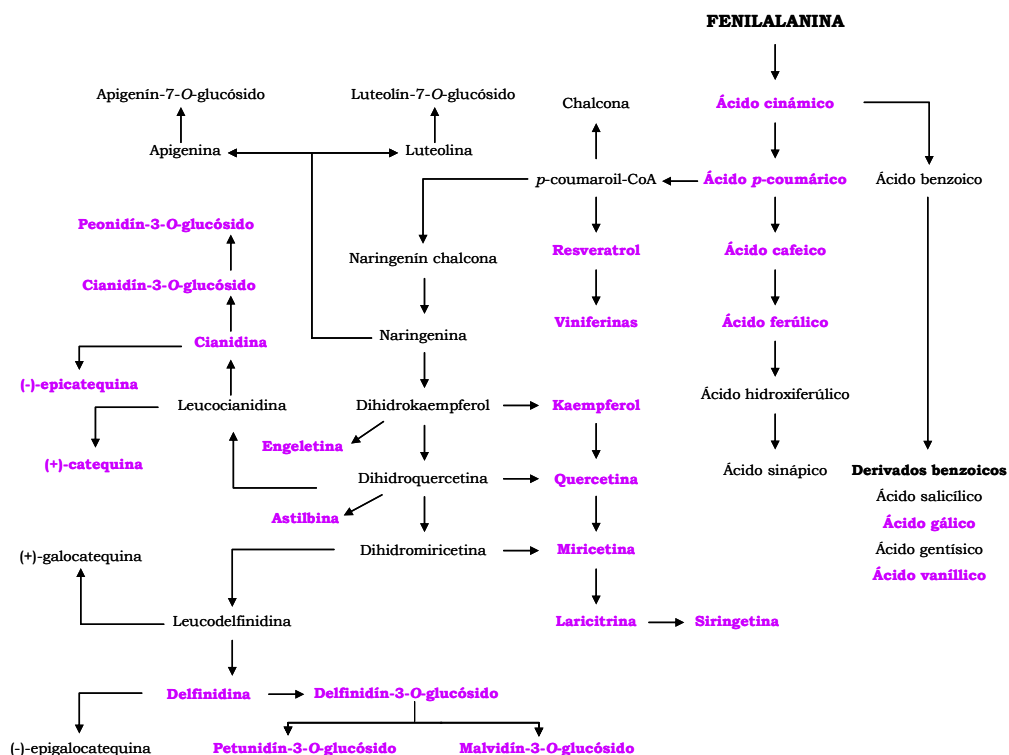


Figura 16. Esquema da biosíntese dos compostos fenólicos (tomada de Ali e col., 2010).

Pola súa banda, a acumulación de antocianos nas peles das uvas tintas comeza no pintado e aumenta progresivamente ao longo da maduración, podendo sufrir unha diminución ocasional ao final da mesma, un fenómeno que é máis marcado nos climas cálidos (Kennedy e col., 2002; Alí e col., 2010). Neste proceso de acumulación, os glucósidos dos antocianos dihidroxilados (cianidina

e peonidina) son os primeiros en acumularse, seguidos logo polos antocianos trihidroxilados baseados na delfinidina, petunidina e malvidina (Downey e col., 2006). Como indicamos con anterioridade, a acumulación dos antocianos na pel das uvas tintas coincide coa expresión do xene que codifica unha enzima da etapa final na biosíntese dos antocianos, a UDP-glucosa:flavonoide 3-O-glucosil transferasa (UFGT), que non se expresa nas castes brancas (Boss e col., 1996a,b; Kobayashi e col., 2002).

A diferenza do que ocorre no caso dos antocianos, a biosíntese dos flavonóis, que tamén se realiza na pel dos bagos, ten lugar en dous períodos, un primeiro arredor da floración e outro que empeza unha ou dúas semanas despois do pintado e que continúa logo durante toda a maduración (Price e col., 1995; Downey e col., 2003b). Dos seis aglicóns que se teñen atopado en uvas (quercetina, kaempferol, isorhamnetina, miricetina, laricitrina e siringetina), só os tres primeiros aparecen nas castes brancas, pois nelas non se expresa o xene que codifica a enzima flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'OH) que actúa na ruta biosintética dos flavonóis para formar a miricetina, da que derivan os outros dous aglicóns (Bogs e col., 2006).

Os taninos atópanse tanto nas sementes como nas peles, tendo lugar o período principal da súa síntese nas sementes inmediatamente despois do callado do froito alcanzando o nivel máis elevado cerca do pintado; ao igual que ocorre cos flavonóis, os niveis máis elevados de taninos nas peles dáse na floración e a súa acumulación continúa desde o callado do froito ata dúas semanas despois do pintado. Os niveis de taninos extraíbeis diminúen, tanto en sementes como en peles, entre o pintado e a maduración (Downey e col., 2006).

O proceso de desenvolvemento do tecido da vide é importante na produción dos estilbenos, de tal xeito que as follas dos extremos superior e inferior das cepas máis vellas teñen menos capacidade de producir resveratrol que as follas situadas na parte media; neste caso, como acontece para os antocianos, os climas cálidos tampouco favorecen a biosíntese (Guerrero e col., 2010b).

PAPEL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NA VIDE

Evidentemente, o interese dos compostos fenólicos vén da man das distintas funcións que desempeñan nos vexetais e polas propiedades que lle proporcionan aos produtos que deles se poidan derivar. Imos abordar neste apartado algunha destas funcións, centrando a nosa atención na contribución que estes metabolitos exercen sobre as características organolépticas de uvas e viños, no papel que xogan na fisioloxía das plantas de vide (nomeadamente no que fai á defensa fronte ás enfermidades, depredadores e outros axentes externos bióticos ou abióticos), na súa importancia como compostos bioactivos na protección da saúde humana e na súa utilidade como marcadores quimiotaxonómicos.

Propiedades organolépticas

Os compostos fenólicos xogan un papel importante na calidade dos viños ao participar nas súas propiedades sensoriais, de modo que contribúen na cor, no gusto e nas sensacións en boca; aínda que nalgún caso poden proceder da madeira ou do metabolismo dos microorganismos, a maioría dos constituíntes fenólicos dos viños proveñen das uvas. Nos viños brancos os compostos máis abundantes son os ácidos hidroxicinámicos e os minoritarios os flavan-3-ois monoméricos, mentres que nos viños tintos os máis importantes son os antocianos e os taninos, participando estes últimos tanto na sensación en boca como na estabilidade da cor ao formar polímeros pigmentados xunto aos antocianos (Kennedy, 2008).

A simple constatación de que estes compostos se poden percibir pola vista, o olfacto, o gusto e mesmo o tacto, dá idea da complexidade da contribución dos compostos fenólicos nas propiedades organolépticas dos viños.

A compoñente visual dos viños vén proporcionada fundamentalmente polos antocianos, os compostos coloreados máis abundantes nas uvas das castes tintas, por máis que –como veremos– tamén outros flavonoides como os

flavonois, responsábeis da cor nos viños brancos, contribúen de forma importante neste particular. Dependendo da súa composición antociánica, a cor dos viños –e a súa estabilidade- varía; neste sentido, pódese afirmar que a glicosilación dos antocianos proporciona estabilidade aos viños e provoca lixeiros cambios desde as tonalidades violetas-vermella ás vermellas-tella. Neste proceso de estabilización das formas coloreadas dos antocianos, teñen ganado moito peso as reaccións entre estas e os ácidos hidroxicinámicos, tal e como indican Sáenz-Navajas e col. (2009), que confirman a formación de novos derivados entre o malvidin-3-*O*-glucósido e os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-coumárico. En calquera caso, os cambios drásticos nesta propiedade dos viños veñen dados pola sensibilidade dos antocianos aos cambios de pH, á decoloración polo sulfito e ás interaccións con outras moléculas relacionadas nos procesos de copigmentación e cos taninos (Creasy e Creasy, 2003). De acordo con estes autores, o proceso da copigmentación consiste na asociación de moléculas de pigmentos con outras, polo xeral non coloreadas, un proceso no que probablemente sexan a (+)-catequina e a quercetina –e posibelmente os seus derivados- os compostos que maior implicación teñan. E tense observado que a unión entre o malvidín-3,5-*O*-diglucósido (ausente nos viños de *Vitis vinífera*) e o quercetín-3-*O*-rhamnósido provoca un maior efecto de copigmentación que cando é o malvidín-3-*O*-glucósido o antociano que participa neste proceso. O pH do viño tamén afecta á cor dos antocianos, e así, a pH ácido, no que os antocianos están na súa forma flavilium son vermellos, perdendo gradualmente a súa cor a medida que aumenta o pH; a pH 4 aparecen as cores malvas-azuis (forma base quinoidal) mentres que a pH neutro predominan as tonalidades amarelas. En calquera caso, no rango de pH do viño (entre 3 e 4) poden xurdir cambios drásticos na cor dependendo de cal sexa o estado de ionización das moléculas que interveñan neste proceso.

Pero os ácidos hidroxicinámicos están implicados tamén nas reaccións de escurecemento de mostos e viños (Simpson, 1982; Singleton e col., 1985; Cheynier e col., 1990) puidéndose observar que os mostos que presentan altas proporcións de ácido *trans*-caftárico (80-90%) respecto ao contido total de

ácidos hidroxicinámicos son máis susceptíbeis a este empardecemento (Romeyer e col., 1983).

E tanto os flavonóis como os flavan-3-óis monoméricos contribúen tamén ao sabor dos viños, aos que lle proporcionan amargor, unha contribución que algúns autores fan extensiva aos fenóis non flavonoideos (Creasy e Creasy, 2003; Rodríguez-Montealegre e col., 2006); pero, ademais, os flavan-3-óis monoméricos participan na compoñente do tacto dos viños ao dar lugar á formación de polímeros fenólicos que –é o caso dos taninos e as proantocianidinas- teñen unha responsabilidade primordial na súa astringencia, particularmente na dos tintos. Normalmente téndese a asociar o amargor cos flavan-3-óis das sementes e a astringencia cos flavan-3-óis das peles (Kennedy e col., 2006), pero hai que ter en conta tamén que na percepción da astringencia están implicados outros parámetros como o etanol, a acidez, a viscosidade, os azucres simples, os polisacáridos e os antocianos.

Funcións fisiolóxicas nas plantas

Xunto ao seu papel nos atributos de calidade de alimentos e bebidas e na cor das plantas e froitos, os metabolitos secundarios –e en particular os compostos fenólicos- xogan un papel fundamental nalgúns procesos fisiolóxicos dos vexetais entre os que se inclúen o da adaptación das plantas ao medioambiente, o relacionado coa resistencia a pragas e enfermidades (incluíndo o seu papel como fitoalexinas), a capacidade de atracción de insectos para a polinización e a construción de relacións simbióticas con microorganismos (Downey e col., 2006; Ali e col., 2010). Ao tratarse de compostos cun marcado amargor e astringencia, tanto os taninos como as formas monoméricas dos flavan-3-óis, parece que xogan un papel disuasorio fronte aos herbívoros (Creasy e Creasy, 2003; Kennedy, 2008).

Unha das funcións máis amplamente citada para os flavonoides é a de actuar como verdadeiros filtros fronte ás radiacións ultravioleta. A evidencia de que as capas epidérmicas dos vexetais, nas que están localizados os flavonoides,

absorben entre o 90 e o 99% da radiación ultravioleta incidente, axuda a soste esta conclusión (Bohm, 1998). En efecto, a natureza cromófora da estrutura en anel destes compostos permítelle a absorción da luz ultravioleta e visíbel e, obviamente, a absorción da luz ultravioleta protexe ás plantas deste tipo de radiación.

Por outra parte, coñécese xa desde hai tempo que algúns flavonoides como as auronas, as chalconas e os antocianos actúan como atraentes dos insectos ou paxaros para a polinización e/ou dispersión das sementes, e mesmo chegouse a establecer unha correlación entre a cor da flor, o tipo de antocianidina presente na mesma, e o polinizador (Saito e Harborne, 1992). Sábese tamén que os antocianos fan que os froitos absorban máis radiación solar, conseguindo que se incremente a actividade enzimática e se alteren algúns factores implicados na composición dos bagos como os ácidos (principalmente causa a redución do ácido málico) e os azucres (incrementando a glucosa e a frutosa) (Creasy e Creasy, 2003). Segundo estes autores, tamén existe unha relación entre o enriquecemento dos bagos pola luz solar e a concentración de flavonoides na pel, unha relación que é tan forte que se chegou a suxerir que o número de compostos derivados da quercetina podería ser empregado como medida da exposición solar dos froitos e mesmo considerarse como un marcador da súa calidade.

Os vexetais, como o resto dos organismos vivos desenvolveron diversos mecanismos para responder aos diferentes estreses aos que se ven sometidos (condicións medioambientais desfavorábeis, deficiencias nutricionais, ataque de patóxenos,...), mecanismos de diferente natureza e que –con seguridade– actúan sinerxicamente. Existen barreiras mecánicas que impiden ou retardan o ataque de patóxenos, pero existen tamén barreiras bioquímicas que teñen efectos semellantes, e os compostos fenólicos participan nesta interacción planta-patóxeno (Macheix e col., 2005). Para Goetz e col (1999) as capas de cutícula e as paredes celulares forman barreiras físicas fronte á penetración das hifas dos microorganismos, mentres que os taninos e outros compostos fenólicos inhiben enzimas fúnxicos implicados na patoxénese.

Un dos mecanismos que resultan máis significativos na protección das plantas fronte ao ataque dos patóxenos é o que implica a biosíntese e acumulación de fitoalexinas, metabolitos secundarios de baixo peso molecular –moitos deles de natureza estilbénica- que posúen actividade antimicrobiana e antifúnxica. Así o indican Favaron e col. (2009) e Pedras e Yaya (2010). Inicialmente foron concibidas como compostos antifúnxicos producidos polos vexetais en resposta ao ataque do fungo (Cruickshank, 1963), pero máis adiante púidose observar que a síntese de derivados estilbénicos pode ser inducida pola radiación con luz ultravioleta, con axentes químicos ou mediante a inoculación con *Botrytis cinérea* ou *Plasmopara viticola* (Langcake, 1981). O *trans*-resveratrol é o principal composto inducido nestes procesos, e sábese que é precursor das viniferinas, que se acumulan nas follas mellorando a resistencia das plantas fronte aos fungos patóxenos; como o resto dos estilbenos ten actividade fronte a varios patóxenos como *Cladosporium cucumerinum*, *Pyricularia oryzae*, *Plasmopara viticola* e *Sphaeropsis sapinea* e, xunto aos seus derivados piceido, pteroestilbeno e as viniferinas ϵ , α , β e δ , é a fitoalexina máis importante na vide podéndose constatar (Pool e col, 1981) a existencia dunha correlación positiva entre a velocidade e a intensidade de síntese de resveratrol e a resistencia das castes de vide fronte ás enfermidades fúnxicas causadas por *Botrytis cinerea* ou *Plasmopara viticola* e mesmo entre a síntese de resveratrol nas follas (inducida por UV) e a superficie foliar non atacada. Un estudo de Adrián e col. (1997) indica que o pteroestilbeno (derivado dimetilado do resveratrol) é cinco veces máis activo que o resveratrol na inhibición da xerminación dos conidios, mentres que Pezet e col. (2004) mostran que a δ -viniferina presenta unha toxicidade contra *Plasmopara viticola* similar á do pteroestilbeno.

De acordo con Goetz e col (1999), varios compostos fenólicos como a (+)-catequina, a galato-epicatequina, os ácidos *trans*-caftárico, *trans* e *cis* coutárico, *trans*-coumárico, o taxifolin-3-*O*-rhamnósido ou o quercetin-3-*O*-glucurónido poden actuar como potentes inhibidores da estilben-oxidasa, unha enzima que pode detoxificar as fitoalexinas de orixe estilbénica destruindo así os mecanismos de defensa da vide e permitindo o crecemento do fungo.

Alí e col (2010), que fan unha excelente revisión do papel que moitos metabolitos con presenza na vide xogan nos procesos de protección das plantas fronte a estreses e moi concretamente no dos derivados estilbénicos en relación coa defensa das plantas fronte a patóxenos de orixe fúnxica, refiren que varios axentes bióticos e abióticos poden activar os mecanismos de defensa nas follas e nos bagos da vide mellorando a resistencia contra enfermidades.

Beneficios para a saúde

Os valores nutricionais e medicinais das uvas coñécense desde fai miles de anos, téndose empregado as follas da vide para cortar hemorraxias, procesos inflamatorios, diarreas e outras dores, as uvas verdes para tratar dores da gorxa, e as pasas para curar os catarros. As uvas maduras utilizáronse para tratar un amplo rango de problemas de saúde, incluíndo cancro, cólera, varíola, náuseas, infeccións de ollos e enfermidades de pel, ril e fígado. Así mesmo, os bagos son considerados como laxantes e diuréticos no caso de problemas circulatorios e gastrointestinais. Na busca de posíbeis responsábeis destas propiedades curativas da vide, foron propostos os compostos de natureza fenólica das uvas por posuír varias propiedades que “a priori” favorecen a saúde; trátase de compostos altamente bioactivos, cunha elevada actividade antioxidante e coa capacidade de eliminar os radicais libres, polo que se lle vén atribuíndo importantes propiedades farmacolóxicas (Manach e col., 2005). De acordo con Katalinić e col., (2010), poden xogar un papel importante na inhibición da carcinoxénese, mutaxénese e enfermidades cardiovasculares. Uchida e col. no 1987 observaron que as procianidinas das sementes das uvas teñen 20 e 50 veces máis eficacia antioxidante que as vitaminas C e E respectivamente, e que posúen unha elevada capacidade para eliminar os radicais superóxidos e hidroxilos.

Desde que no ano 1992 –a raíz do descubrimento do que se ten dado en chamar a “paradoxa francesa”- estudouse de forma sistemática o papel do resveratrol e outros derivados estilbénicos presentes no viño tinto como axentes protectores fronte a enfermidades cardiovasculares, foron moitos os traballos

enfocados cara á busca de compostos bioactivos na vide e o viño, e hoxe xa ninguén discute este efecto protector que os alimentos ricos en compostos fenólicos teñen fronte a estas e outras enfermidades. Kanner e col. (1994) observaron que os compostos fenólicos dos viños tintos inhiben a mioglobina, o citocromo C e o ascorbato férrico, catalizadores da peroxidación lipídica, e conclúen que o ácido gálico, o resveratrol e o ácido tánico exercen unha inhibición na peroxidación lipídica maior que a do α -tocoferol; pola súa banda Cuendet e col. (2000) demostraron que o *trans*-piceido (un derivado glucosilado do *trans*-resveratrol) tamén pode eliminar radicais libres. Tense indicado tamén (Labadie, 1993) que moitos compostos fenólicos poden estar implicados nos procesos relacionados coa resposta inmunitaria.

De acordo con Ali e col. (2010) os compostos fenólicos existentes nas sementes das uvas, como as procianidinas e o resveratrol, posúen fortes propiedades antioxidantes, polo que axudan a neutralizar ou eliminar os radicais libres que contribúen a frear o proceso de envellecemento e ao desenvolvemento de numerosos problemas de saúde, como as enfermidades de corazón e o cancro. Esta elevada capacidade antioxidante fai que xoguen un papel importante na inhibición tanto da oxidación das LDL (lipoproteínas de baixa densidade) como da agregación plaquetaria. Segundo Goldberg e Soleas (2003), as formas *cis* e *trans* do resveratrol e os seus glucósidos teñen esta capacidade de actuar como antioxidantes inhibindo a oxidación das LDL e bloqueando a resposta dos seus receptores unha vez oxidadas. Todo indica que as formas monoméricas dos flavan-3-óis teñen maior capacidade antioxidante que os correspondentes polímeros e que así mesmo a glicosilación fai diminuír esta capacidade antioxidante.

Outro papel que se vén atribuíndo aos compostos fenólicos, e máis concretamente aos flavonoides, é o de intervir no control da arteriosclerose, ao inhibir a enfermidade no inicio do seu desenvolvemento (Folts, 2002), e nos procesos de coagulación do sangue e a trombose; neste sentido, debemos citar o traballo de Kaur e col. (2007) que, mediante estudos "*in vitro*", teñen

demonstrado unha elevada capacidade dos derivados do resveratrol para inhibir a indución de ámbolos dous procesos.

Williamson e Carughi (2010) atribúen ao ácido protocatéuico –o principal catabolito do metabolismo dos antocianos- a responsabilidade dos efectos beneficiosos que estes compostos flavonoides das castes tintas teñen para a saúde humana, mentres que asocian o baixo risco de padecer diabetes do tipo 2 coa inxesta de quercetina e miricetina. Pola súa banda, Chang e Kinghorn (2001) atribúenlle a algúns derivados da quercetina propiedades contra alerxias, hipertensión, artrite e mesmo como anticarcinóxenos.

E tense referido tamén que as procianidinas poden inhibir algunhas enzimas que catalizan a liberación de moitas substancias que, como a histamina, a serín-proteasa, a prostaglandina e os leucotrienos, promoven os procesos inflamatorios (Pearce e col., 1984) e o seu papel como inhibidores da activación da hialuronidasa, unha enzima que ataca diversos tecidos durante estes procesos inflamatorios (Hansen, 1995). Como exemplos de compostos fenólicos que poden actuar como axentes terapéuticos no tratamento de enfermidades inflamatorias podemos citar os ácidos vanílico e ferúlico e o resveratrol e a α -viniferina que, segundo indican Golberg e Soleas (2003), modulan algunhas rutas metabólicas e enzimáticas centrais na resposta inflamatoria.

Saito e col. (1998), probaron a actividade de extractos de sementes de uva na protección contra úlceras de dixestivo en ratas, e observaron que mentres que a (+)-catequina, a procianidina B3 e as procianidinas diméricas e triméricas non presentaban ningunha actividade neste sentido, os tetrámeros, pentámeros e hexámeros destes compostos si tiñan actividade antiúlceras, unha propiedade que achacaron á súa capacidade para unirse ás proteínas presentes nas paredes do estómago.

Aínda que queda moito por facer neste terreo, no que seguen publicándose resultados contraditorios, existen evidencias acerca do papel que os compostos fenólicos –e moi especialmente os flavonoides e o resveratrol e os seus

derivados- teñen na loita contra o cancro e como axentes antivirais. Citaremos aquí os traballos de Bohm (1998), Lednicer e Narayanan (1993), Vanden-Berghe e col. (1993) e Goldberg e Soleas (2003), que proporcionan numerosa información ao respecto, pero debemos citar tamén o traballo de Ali e col. (2010), que indican que algunhas procianidinas das peles e sementes das uvas teñen a propiedade de previr o crecemento das células cancerixenas, atribuíndolles un posíbel papel na antiproliferación e apoptose no carcinoma de próstata, ou o de Schneider e col. (2003), que atribúen ao resveratrol unha potente actividade antimutaxénica e un papel como anticancerixeno. De acordo con estes autores, o resveratrol parece inducir a apoptose, modula o ciclo celular detendo a división celular, e inhibe a indución da transcrición de xenes que codifican para proteínas implicadas na carcinoxénese. Así mesmo, é quen de inibir a iniciación e a progresión dos tumores, e así, nos primeiros estadios actúa como un antioxidante, no segundo estadio media os efectos anti-inflamatorios inhibindo enzimas como a ciclooxixenasa e a hidroxiperoxidasa e finalmente inhibe o desenvolvemento de lesións preneoplásicas. E observan tamén que o 3,5,4'-tri-metoxiestilbeno (un derivado metilado do resveratrol) posúe unha capacidade de inhibición de liñas celulares de cancro de colon 100 veces maior que o resveratrol. E, como xa adiantamos, tamén se ten descrito a actividade antiviral do resveratrol, que pode inibir a replicación do virus do *Herpes simplex* (Goldberg e Soleas, 2003), unha actividade atribuída tamén a algúns flavonoides (entre eles a certos taninos) que, ademais, actúan contra a reversotranscriptasa do HIV (Vanden-Berghe e col., 1993).

Marcadores quimiotaxonómicos

Os compostos fenólicos, e de forma moi particular os flavonoides, foron amplamente empregados desde moito tempo atrás como marcadores taxonómicos na caracterización dos vexetais, xa que reúnen moitas das características que os fan útiles para este propósito. Trátase de compostos cunha ampla distribución no mundo vexetal; os seus patróns tenden a ser específicos para cada especie; son relativamente fáciles de detectar cromatograficamente e de identificar; son suficientemente estábeis e, por

último, a súa biosíntese/acumulación é en gran medida independente da influencia ambiental (Markham, 1989). Neste sentido, o emprego de marcadores de natureza fenólica pode ser unha excelente alternativa na caracterización e clasificación de cultivares de vide (Ferrandino e Guidoni, 2010; Masa e Zamuz, 2010); e, como noutros vexetais, tamén neste caso é o dos flavonoides o grupo de compostos fenólicos utilizado con maior éxito na caracterización de castes, chegándose a establecer que tanto para as castes brancas como para as tintas, o perfil dos flavonoides expresado en función das porcentaxes de cada un deles é un excelente marcador quimiotaxonómico (Ledda e col., 2010). Por esta razón, a utilización dos antocianos no caso das castes tintas e dos flavonoides non antociánicos no caso das castes brancas véñense empregando profusamente con esta finalidade.

De acordo con Mazza e Miniati (1993), a variabilidade existente dentro do grupo dos antocianos debida á diversidade de estruturas e á coexistencia das mesmas nunha mesma planta, permite que estes compostos sirvan para discriminar entre xéneros e especies, de modo que o perfil de antocianos pode ser utilizado en quimiotaxonomía; neste sentido, debemos indicar que o contido en monoglucósido da malvidina e nos ésteres acéticos e cinámicos, xunto coa relación entre os contidos en derivados da malvidina e peonidina, son os parámetros que maior interese teñen despertado desde o punto de vista que nos ocupa. E –como xa indicamos– son moitos os traballos que utilizan a composición antociánica co obxectivo de caracterizar castes tintas de *V. vinifera*; citaremos os de Baldi e col. (1993), Climent e Pardo (1993), Caló e col. (1994), Berente e col. (2000), Revilla e col. (2001), Pomar e col. (2005), Mattivi e col. (2006), Castillo-Muñoz e col. (2009a), Guerrero e col. (2009), He e col. (2010) e Li e col. (2011), e indicaremos que a relación entre os antocianos acetilados e os *p*-coumaroilados tense utilizado para o control da autenticidade de viños tintos (Ali e col., 2010).

En calquera caso, non son os antocianos os únicos flavonoides que teñen importancia na caracterización das castes tintas de vide; en efecto, outros flavonoides son utilizados tamén con este propósito, tal e como reflicten os

traballos levados a cabo por Hmamouchi e col. (1996), que estudan a composición das flavonas e dos flavonóis en follas de vides cultivadas en Marrocos, os de Jin e col. (2009), que fan unha descrición do perfil fenólico de nove castes tintas cultivadas no noroeste de China, e os de Fanzone e col. (2010) que fan a caracterización fenólica dos viños Malbec da provincia arxentina de Mendoza.

Polo que fai ás castes brancas, dicir que en xeral a súa caracterización bioquímica tense baseado na análise e identificación dos flavonóis, non sendo tan extensa a produción científica neste caso como no das castes tintas. Citaremos os traballos de Mattivi e col. (2006), Masa e col. (2007), Masa e Vilanova (2008) e Castillo-Muñoz e col. (2007; 2010), e faremos fincapé en que, de acordo con Masa e col. (2007), os dihidroflavonóis (tamén chamados flavavonols ou 3-hidroxi flavanonas) compórtanse como excelentes marcadores taxonómicos nas castes brancas.

Pero ademais dos flavonoides, tamén os compostos non flavonoideos –e particularmente os derivados hidroxicinámicos– teñen sido utilizados na caracterización de castes de vide. Sábese que a presenza de ésteres tartáricos e a ausencia dos correspondentes quínicos é un carácter específico do xénero *Vitis*, e que a porcentaxe destes compostos pode servir como marcador taxonómico xa que o potencial hidroxicinámico varía segundo as especies (Boursiquot e col., 1986; Cheynier e col., 1989); e sábese tamén que o ácido cafeoil tartárico, non só está presente en todas as castes de *Vitis vinifera*, senón tamén en todas as *Eu vitis*, pero non así en *V. rotundifolia*. Neste sentido, a utilidade dos derivados hidroxicinámicos como marcadores taxonómicos na vide está fóra de toda dúbida, e así o corroboran traballos como os de Macheix e col. (1991) e Caló e col. (1994) que indican que as porcentaxes de ésteres *p*-coumaroil tartáricos e cafeoil tartáricos son específicas das distintas castes de *V. vinifera*. De acordo con Macheix e col. (1990), as castes tintas presentan uns valores medios para estes ésteres superiores aos das brancas, unha situación que se explica porque a perda nestas últimas da capacidade de biosíntese de

antocianos vai acompañada dunha caída no contido total de compostos fenólicos.

E son moitos os traballos que utilizan derivados non flavonoideos na caracterización de castes de vide; citaremos aquí os de Baldi e col. (1993), que realizan una avaliación tanto cualitativa como cuantitativa dos ésteres tartáricos dos ácidos hidroxicinámicos de clons de Sangiovese, Canaiolo e Malvoisie noire, ou os de De la Presa-Owens e col. (1995) que fan a caracterización fenólica dos viños elaborados coas castes Macabeo, Xarel-lo e Parellada e conclúen que non só a relación *trans*-coutárico/*trans*-caftárico senón outros polifenóis destas castes están baixo influencia xenética. Pola súa banda, Rodríguez-Montealegre e col. (2006) fan un estudo da caracterización fenólica nas peles e nas sementes de seis castes brancas (Chardonnay, Sauvignon blanc, Moscatel de grano menudo, Gewürztraminer, Riesling e Viogner) e catro tintas (Cencibel, Cabernet Sauvignon, Merlot e Shiraz) cultivadas en diferentes áreas da rexión de Castilla la Mancha, chegando a diferenciarlas todas elas en función da súa composición fenólica. Pola súa banda, Guerrero e col. (2009) teñen realizado a caracterización de 5 castes (3 autóctonas de Andalucía y 2 comúns a moitas áreas xeográficas) en función de 26 compostos fenólicos, entre eles varios derivados hidroxicinámicos e flavan-3-ois e, así mesmo, Obreque-Slier e col. (2010) observaron claras diferenzas entre as castes Carmenere e Cabernet Sauvignon no que fai á súa composición fenólica e, particularmente, aos flavan-3-ois, que amosan diferentes graos de polimerización dependendo da caste de que se trate.

Xa por último, dicir que aínda que con menor profusión que no caso doutros compostos fenólicos, tamén os derivados estilbénicos foron empregados como marcadores quimiotaxonómicos, e así debemos citar o traballo de Hillis e Ishikura (1968) que encontran diferenzas entre distintas especies vexetais e o de Moreno e col. (2008) que, traballando con castes galegas, observan marcadas diferenzas no contido en resveratrol e derivados entre elas. Pola súa banda, Guerrero e col. (2010a) inducindo a biosíntese de estilbenos mediante a aplicación de luz ultravioleta chegan á conclusión de que a maior ou menor

resposta depende en boa medida da caste de que se trate, o que indubidabelmente fai pensar na posibilidade da utilización desta familia de compostos fenólicos como marcadores taxonómicos na vide.

E como colofón desta introdución, que ao tempo xustifica os obxectivos do noso traballo, debemos indicar que resulta sorprendente que a pesar do enorme interese que os compostos de natureza fenólica teñen nos vexetais e os seus produtos derivados (e particularmente no que fai á uva e ao viño), sexan realmente escasos, cando non inexistentes, os traballos enfocados a coñecer a composición fenólica dos mostos procesados nas adegas, unha realidade que é aínda máis evidente se falamos daqueles elaborados a partir das castes galegas.

OBJECTIVOS

O obxectivo último do noso traballo é contribuír ao coñecemento da caste Albariño e, por extensión, ao da vide, afondando naqueles aspectos nos que os compostos de natureza fenólica xogan un importante papel.

Neste sentido, e dentro do obxectivo xeral adiantado, propoñémonos acadar os seguintes obxectivos parciais:

- 1.- Estudar a composición fenólica dos mostos elaborados coa caste Albariño incidindo na busca de compostos fenólicos nunca antes descritos neste material vexetal.
- 2.- Afondar no coñecemento dos mostos de Albariño procedentes de distintas zonas da D.O. Rías Baixas.
- 3.- Contribuír ao coñecemento daqueles aspectos da mellora da vide e da enoloxía nos que os compostos fenólicos poden ter unha especial incidencia.

E queremos facer fincapé na importancia dos aspectos metodolóxicos deste traballo no que á aplicación de técnicas fundamentais nos procesos de extracción, separación cromatográfica e identificación dos compostos fenólicos se refire, pois, en si mesma, constitúe tamén un importante obxectivo desta Tese de Doutoramento.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL VEXETAL.

Un total de nove mostos foron recollidos noutras tantas adegas da D.O. Rías Baixas, tres en cada unha das principais subzonas (figura 17) da citada denominación (O Condado do Tea, O Rosal e O Val do Salnés). Co obxectivo de garantir a representatividade das mostras utilizadas no noso estudo, elixíronse adegas que posúen viñedos distribuídos ao longo de toda a

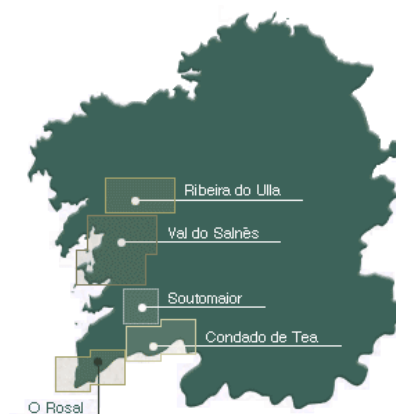


Figura 17. Subzonas da D.O. Rías Baixas

subzona e que elaboran os mostos a partir dunha mestura de uvas de todas as parcelas. A uva foi recollida no momento óptimo de maduración e procesada na propia adega, o que deu lugar a obtención –en cada adega– dun mosto de partida do que se collen alicuotas de 4 L (unha por adega) que serán o material a utilizar no noso traballo. Os mostos foron levados en frío desde as adegas ata a Misión Biolóxica de Galicia (CSIC), onde se lle engadiu SO_2 a razón de 50 mg/L, mediúselle o pH (cun pHmetro Orion 3 STAR de Thermo Scientific), o °Brix mediante refractometría (cun refractómetro de man ATAGO N1) e o índice de maduración expresado como o coeficiente entre a cantidade de azucre e a acidez total (Blouin e Guimberteau, 2004). A determinación da acidez total do mosto, do ácido tartárico e dos azucres redutores, levouse a cabo empregando o sistema Reflectoquant® (Merck). As mostras mantivéronse a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ata o momento da súa análise.

2. PREPARACIÓN DOS EXTRACTOS VEXETAIS.

Para a extracción dos compostos fenólicos seguiuuse o método proposto por Masa e col. (2007) con algunha modificación. Os mostos, unha vez filtrados por papel de filtro Whatman 4, foron sometidos a unha extracción líquido-

líquido (5 veces) en funil de decantación con acetato de etilo (1:1, v/v); as fases orgánicas resultantes mestúranse, sécanse mediante adición de sulfato sódico en exceso, filtranse, concéntranse en rotavapor Büchi ata sequidade e, xa por último, dilúense en metanol/auga (1:1, v/v), quedando xa preparados para a súa posterior análise (figura 18).

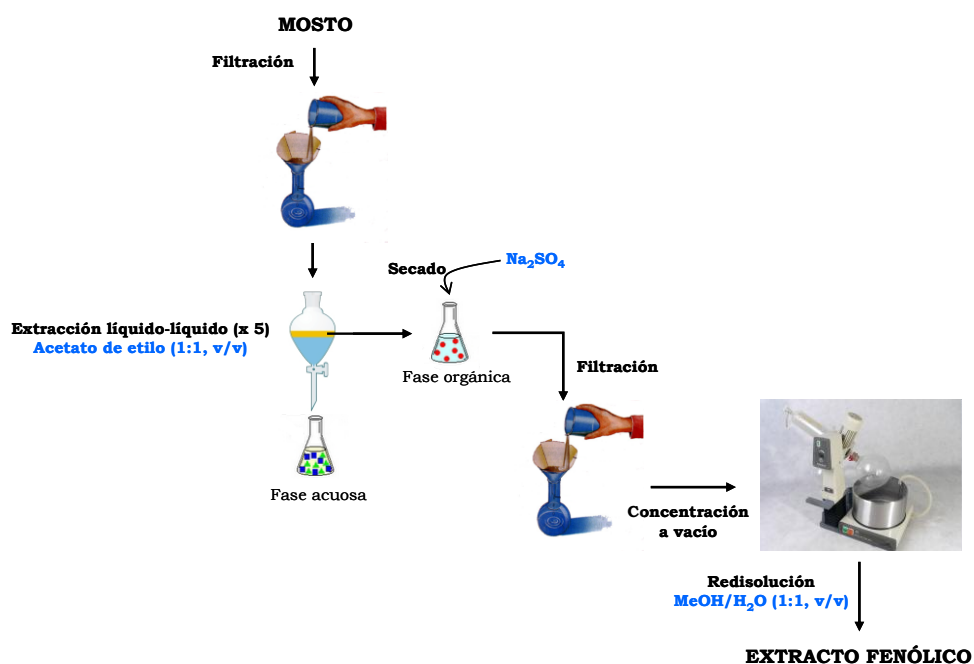


Figura 18. Esquema do proceso de extracción dos compostos fenólicos.

Para as análises mediante HPLC partimos de 50 mL de mosto recolléndose os extractos nun volume final de 1 mL de metanol/auga (1:1, v/v), mentres que para as análises mediante PC preparativa o volume de mosto inicial foi de 1000 mL e os extractos foron recollidos en 5 mL de metanol/auga (1:1, v/v), co que se obteñen extractos cunha concentración catro veces superior neste último caso. Co obxectivo de evitar posíbeis danos na columna e no sistema cromatográfico, previamente á inxección no HPLC, os extractos fenólicos filtranse ao través dun filtro de xiringa Millex-HV de 0,45 μm (Millipore).

3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECTOR DE DIODOS (HPLC-DAD)

Os extractos obtidos foron analizados utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución Waters (Milford, USA) equipado cun módulo de separacións Waters 2690 e un detector de diodos Waters 996. Os espectros foron rexistrados entre 240 e 460 nm, e os cromatogramas obtivéronse a 356 nm (para flavonóis), 305 nm (para os derivados hidroxicinámicos e estilbénicos) e 280 nm (para os derivados benzoicos, flavan-3-óis, flavanoides e outros). A vantaxe dos detectores de diodos fronte aos detectores clásicos de UV/vis é que permiten realizar os cromatogramas a todas as lonxitudes de onda comprendidas dentro dun rango seleccionado, o que asegura que cada pico vai ser rexistrado naquela lonxitude de onda na que presenta o seu máximo de absorción; ademais, posibilita a realización dos espectros UV-vis dos distintos picos cromatográficos separados.

As separacións cromatográficas foron realizadas en HPLC en fase inversa cunha columna C18 Kromasil de Scharlau ($dp= 5 \mu\text{m}$, 300 mm x 4,6 mm d.i.) provista dunha precolumna C18 Nova Pack de Waters. A temperatura do forno foi fixada en 30 °C perante toda a análise e o volume de inxección foi de 20 μL . A fase móbil consistiu nunha mestura de acetonitrilo/ácido acético/auga (35:2:63, v/v/v) como solvente A e ácido acético 2% como solvente B. O fluxo, de 0,8 mL/min, foi constante ao longo de toda a análise e o gradiente lineal variou desde o 25 % de solvente A no seu inicio ata o 100 % de A no minuto 65, volvendo as condicións iniciais en 5 minutos (táboa 2).

Táboa 2. Gradiente empregado para a separación mediante HPLC.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% solvente A	% solvente B	Curva
0	0,8	25	75	6
10	0,8	30	70	6
25	0,8	40	60	6
30	0,8	50	50	6
40	0,8	60	40	6
50	0,8	65	35	6
60	0,8	75	25	6
65	0,8	100	0	6
70	0,8	25	75	6

A cromatografía en fase inversa vén caracterizada polo uso dunha fase estacionaria non polar e dunha fase móbil polar, de tal xeito que a medida que diminúe a polaridade da fase móbil prodúcese unha diminución na retención do soluto. Neste sentido, os compostos elúen en función da súa polaridade, quedando menos retidos aqueles que son máis polares.

A identificación dos distintos picos cromatográficos realizouse en función dos seus tempos de retención e das súas características espectrais en UV-vis obtidos co detector de diodos (DAD); sempre que foi posíbel, comparáronse as características cromatográficas e espectrofotométricas dos distintos picos obtidos coas dos patróns comerciais analizados nas mesmas condicións que as mostras. Cando isto non foi posíbel, a comparación fixose en base aos datos existentes na bibliografía.

Os datos foron procesados mediante o software Empower de Waters e as representacións gráficas foron realizadas empregando o software Sigmaplot 11.0 para Windows de SPSS (Chicago, IL, USA).

4. RECOLLIDA DE FRACCIÓNS.

Dada a complexidade dos cromatogramas correspondentes aos extractos brutos das mostras analizadas, fixose necesario recoller fraccións que, inxectadas de novo no HPLC nunhas condicións cromatográficas máis favorábeis, permitiran unha mellor resolución e identificación dalgúns dos compostos presentes nelas. Previamente, e co obxectivo de facilitar a recollida das distintas fraccións, de forma particular na primeira parte do cromatograma no que entendemos coelúen algúns compostos de baixo peso molecular e elevada polaridade, modificouse o gradiente inicial, atrasando a entrada da fase orgánica e alongando o tempo total de duración da separación cromatográfica ata o minuto 85 no que se volta ás condicións iniciais, tal como se recolle na táboa 3.

Táboa 3. Gradiente empregado para a recollida das diferentes fracción mediante HPLC.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% solvente A	% solvente B	Curva
0	0,8	10	90	6
10	0,8	15	85	6
25	0,8	27	73	6
30	0,8	30	70	6
40	0,8	40	60	6
50	0,8	50	50	6
60	0,8	60	40	6
65	0,8	75	25	6
70	0,8	80	20	6
75	0,8	70	30	6
85	0,8	10	90	6

Coa axuda dun colector de fraccións Waters WFC III, e tras sucesivas inxeccións dos extractos brutos no HPLC (un total de 20 veces), recolléronse 31 fraccións cromatográficas. Cada unha das fraccións recollidas levouse a sequidade en rotavapor, disolveuse con 0,5 mL de metanol/auga (1:1, v/v) e volveuse analizar mediante HPLC-DAD empregando unha columna C18 Nova Pak de Waters (dp= 4 μ m, 150 mm x 3,9 mm d.i.) e a mesma temperatura de análise e fase móbil que no caso das mostras brutas. Co obxectivo de obter unha mellor separación cromatográfica e –xa que logo- poder recoller cada un dos picos de interese, as condicións de fluxo e gradiente foron adaptadas para cada unha das fraccións.

Evidentemente, no proceso de busca do gradiente definitivo para a análise de cada fracción fixose necesario probar, para cada unha delas, diferentes gradientes que permitiran mellorar a súa separación; en calquera caso, e co obxectivo de facilitar a comprensión do texto, non imos explicitar todas as probas realizadas, e limitarémonos a expoñer aqueles utilizados en cada caso, no apartado de resultados e discusión. Así mesmo, e aínda que os distintos compostos separados cromatograficamente en cada fracción foron comparados cun maior número de patróns comerciais, en resultados e discusión presentaremos só aqueles cos que –en función dos seus tempos de retención e das súas características espectrais en DAD- consideramos poden coincidir.

5. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA-VISÍBEL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.

A espectroscopía ultravioleta é unha técnica fundamental cando se trata de analizar a estrutura dun constituínte fenólico descoñecido nun extracto vexetal. En xeral, todos estes compostos posúen un espectro UV en metanol (neutro) con polo menos un máximo na rexión do UV entre 230 e 290 nm que, en presenza de determinados reactivos, sofren importantes desprazamentos ben cara a lonxitudes de onda máis altas (batocrómicos) ou ben cara a lonxitudes de onda máis baixas (hipsocrómicos). Este comportamento permite deducir a que clase ou subclase de compostos fenólicos pertence un composto descoñecido e mesmo se ten grupos OH libres ou ligados, se existen grupos OH veciñais ou adxacentes a grupos carbonilo, ou se o composto fenólico está libre ou glicosilado. Na táboa 4, tomada de Harborne (1989), amósanse os máximos espectrais (en metanol) das principais clases de compostos fenólicos. En relación aos espectros UV dos fenóis libres, as correspondentes formas glicosiladas presentan no seu espectro máximos de absorción a lonxitudes de onda máis curtas que mesmo poden indicar a localización da unión glicosídica. En xeral, a natureza do azucre non ten demasiada incidencia no espectro UV dos compostos fenólicos.

Táboa 4. Máximos de absorbancia (en metanol) dos principais grupos de compostos fenólicos.

Compostos	λ_{\max}(nm)
Fenóis simples	266-295
Ácidos fenólicos	235-305
Ácidos hidroxicinámicos	227-245, 310-332
Estilbenos	300-310, 320-330
Flavonoides	
Isoflavonas	255-265, 310-330
Flavanonas	225sh, 275-290, 310-330
Flavonas, Biflavonas	250-270, 330-350
Flavonois	250-270, 300sh, 350-390
Chalconas	240-260, 365-390
Auronas	240-270, 390-430
Antocianos	267-275, 475-545
Xantonas	230-245, 250-265, 305-330, 340-400

Os espectros foron rexistrados nun espectrofotómetro DU-640 Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) utilizando unha cubeta de cuarzo de 10 mm de paso de luz e un volume de 0,1 mL, e os reactivos modificadores dos espectros preparados e empregados de acordo con Jurd (1957) e Markham (1982) do seguinte xeito:

AlCl₃: solución de AlCl₃ ao 5% en MeOH (6 gotas)

HCl: 50 mL de HCl concentrado en 100 mL de H₂O (3 gotas)

NaOMe: solución de NaOMe ao 5% en MeOH (3 gotas)

NaOH: solución 0,1 N de NaOH (3 gotas)

NaOAc anhidro: engádesse en po ata saturación

H₃BO₃ anhidro: engádeselle en po ata saturación lendo o espectro logo de 5 min.

No caso de supoñer que poidamos estar en presenza dun derivado benzoico, realizaremos os espectros de absorción en metanol, con cloruro de aluminio, con cloruro de aluminio/ácido clorhídrico e con hidróxido sódico, mentres que nos demais supostos utilizaremos metóxido sódico en lugar de hidróxido sódico, medindo ademais os espectros en acetato sódico e con acetato sódico/ácido bórico.

6. CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA DE PAPEL (PC).

Os extractos fenólicos brutos foron separados mediante cromatografía preparativa descendente en papel (Whatman 3 MM, 23 x 57 cm) empregando para elo unha cubeta cromatográfica Shandon Southern (56,5 x 56,5 x 21,5 cm) e auga como fase móbil. No caso da PC o papel actúa ao tempo como fase estacionaria e como soporte; pódese considerar que se trata dun proceso de reparto no que van incidir fundamentalmente dous factores, a temperatura e o equilibrio do papel. Os cromatogramas desenvolvéronse a temperatura ambiente (20 °C) durante 4–5 h e, logo de marcar a fronte cromatográfica,

secáronse en estufa (Selecta 279-B) a 35 °C e foron observados baixo luz ultravioleta a 254 e 365 nm cunha lámpada Vilder Lourmat VL-6LC antes e despois de afumar con vapores de amoníaco; unha vez marcadas as distintas fraccións de interese foron eluídas con metanol/auga (8:2, v/v) de acordo co método posto a punto no noso laboratorio e analizadas en HPLC-DAD e en LC/ESI-MS-MS en condicións de fluxo e gradiente semellantes ás empregadas inicialmente para a separación dos extractos brutos.

7. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECTOR DE MASAS-MASAS (LC/ESI-MS-MS).

A espectrometría de masas é unha técnica analítica capaz de proporcionar con exactitude a relación carga/masa (m/z) dos ións no vacío e, polo tanto, a masa molecular concreta dun composto. O acoplamento do espectrómetro de masas a un cromatógrafo de líquidos fai que esta técnica sexa unha ferramenta poderosa para a determinación de compostos en mesturas complexas; proporciona tanto as masas dos ións moleculares coma as dos fragmentos nos que se divide dependendo da estrutura de cada composto, semellantes as súas pegadas dactilares, que baixo unhas condicións determinadas poden ser comparadas e permiten a súa identificación. A espectrometría de masas con ionización por “electrospray” ou electronebulización (ES/MS) emerxeu coma unha técnica moi poderosa para a caracterización de biomoléculas, sendo a técnica de ionización máis versátil que existe e a que ofrece maiores vantaxes en termos de sensibilidade e capacidade de análise dun gran número de compostos termolábiles, altamente polares e non volátiles.

As análises de espectrometría de masas fixéronse na Unidade de Técnicas Cromatográficas do Servizo de Apoio á Investigación da Universidade da Coruña. O sistema de espectrometría de masas empregado foi un LTQ Orbitrap® Discovery (Thermo-Fisher Scientific) conectado a un cromatógrafo líquido Accela (Thermo-Fisher Scientific) e equipado cunha fonte de ionización

por electronebulización (ESI). Unha vez probadas as distintas formas de ionización, optamos por operar en modo negativo. A separación dos analitos realizouse nunha columna de fase inversa C18 X-Terra de Waters (dp= 5 μ m, 150 mm x 4,6 mm d.i.) e nas mesmas condicións cromatográficas descritas no apartado de HPLC-DAD para os extractos brutos. Neste caso, o fluxo foi de 0,5 mL/min e o volume de inxección 10 μ L. As condicións da fonte de ionización foron: -4,5 kV a voltaxe da fonte, 350 °C a temperatura do capilar, -35 V a voltaxe do capilar e 50 e 10 unidades arbitrarias de N₂ para os gases envolvente e auxiliar, respectivamente. Para a realización das análises de masas en varrido completo, os espectros foron rexistrados no rango de 100 a 1000 m/z e a voltaxe da fonte de fragmentación fixouse en 20 V. Para as análises de MS² a enerxía de colisión normalizada axustouse ao 35 %, e a q de activación a 0,25.

Os datos foron procesados mediante a versión 2.0.7 do software Xcalibur de Thermo-Fisher Scientific e as representacións gráficas foron realizadas empregando o software Sigmaplot 11.0 para Windows de SPSS (Chicago, IL, USA).

8. HIDRÓLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.

Para confirmar, no seu caso, a natureza dos aglicóns e os azucres dos derivados glicosilados e a presenza ou non de radicais ácidos nos nosos compostos, realizáronse hidrólises ácidas, alcalinas e/ou enzimáticas. En efecto, os procesos de hidrólise permiten coñecer a estrutura dos glicósidos ao liberar os aglicóns e os azucres que os compoñen (hidrólises ácidas e/ou enzimáticas) e a dos ésteres acilados, dos que se liberan as funcións aciladas mediante hidrólise alcalina. Así mesmo, permiten deducir a posición dos azucres e os radicais acilados no composto hidrolizado. Para a realización das hidrólises seguimos os métodos propostos por Markham (1982) que describimos de forma resumida de seguido.

No caso das hidrólises ácidas, as mostras disolvéronse en ácido clorhídrico 2N/metanol (1:1, v/v) e sometéronse a refluxo nun baño de María a 100 °C durante o tempo que se estimou necesario que, dependendo da natureza do composto a hidrolizar, oscilou entre os 5–10 min e os 50–60 min. Hai que facer constar que os flavonoides C-glicosilados non son hidrolizados con este tipo de hidrólise. Para a realización das hidrólises alcalinas, a disolución metanólica do composto descoñecido que se pretende hidrolizar mestúrase cunha solución de hidróxido sódico 2 M (1:1, v/v) e, para evitar a oxidación da mostra, mantense a refluxo en baño de María en atmosfera de nitróxeno durante 2–4 h, tempo despois do cal arrefriase con auga xeada e acidúlase con ácido clorhídrico 2 N. A solución acidulada concéntrase a sequidade baixo vacío e redísólvese en auga, extraéndose con éter o ácido liberado. O extracto acuoso contén o glicósido deacilado, que se pode identificar mediante cromatografía fronte a patróns comerciais.

Pola súa banda, a hidrólise enzimática axuda na identificación da natureza do azucre dos glicósidos, xa que pola súa especificidade as enzimas só hidrolizan determinados substratos; en calquera caso, as enzimas comerciais raras veces son puras polo que a súa especificidade é tan só teórica, o que obriga á identificación do azucre logo de realizar a hidrólise. Para a realización das hidrólises enzimáticas, á mostra –disolta en auga– engádeselle unha pequena cantidade da enzima, déixase 15 min a 28 °C e concéntrase a sequidade en rotavapor a vacío, redísólvese completamente en metanol/auga (1:1, v/v) e cromatografiase fronte a patróns comerciais.

En todos os casos, os azucres foron identificados por comparación cromatográfica fronte a patróns comerciais, en PC en papel Whatman 3MM utilizando BBPW (n-butanol/benzeno/piridina/auga, 5:1:3:3 v/v) como fase móbil ou, alternativamente, en TLC en placas de celulosa e ácido acético 15 % como solvente.

No caso da PC, a detección dos azucres foi realizada somerxendo os papeis nunha solución de reactivo de Partridge preparado de acordo con Markham

(1982); para elo, 0,92 mL de anilina e 1,6 g de ácido ftálico disolvéronse en n-butanol/éter/auga (49:49:2, v/v/v). No caso da TLC, as placas foron reveladas mediante pulverización cunha solución de anilina (4 mL)/difenilamina (4 g)/acetona (200 mL)/ácido fosfórico ao 80 % (30 mL). Unha vez secos os cromatogramas, e para poder observar os azucres, é necesario sometelos a temperaturas de 100-120 °C ata que aparezan as manchas (uns 5-30 min). Co reactivo de Partridge todos os azucres dan cores marróns (con tonalidades vermellas nalgún caso), mentres que a solución de anilina, difenilamina, acetona e ácido fosfórico dá cor vermello para frutosa e sacarosa, azul-grisáceo para glucosa e galactosa, azul-verdoso para a arabinosa, verde para a rhamnosa e azul-violeta para o ácido glucurónico.

9. CUANTIFICACIÓN DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.

A cuantificación dos compostos fenólicos atopados nas mostras analizadas levouse a cabo mediante o método do patrón externo, no que unha mostra patrón de concentración e volume coñecidos se analiza separadamente da mostra descoñecida e en idénticas condicións, considerando logo a relación existente entre área e concentración (mg/L).

Na figura 19 preséntanse as curvas de calibrado correspondentes a cada un dos cinco patróns empregados para a cuantificación dos compostos illados neste traballo: o ácido ferúlico para a cuantificación dos derivados hidroxicinámicos, a dihidroquercetina (taxifolín) para a cuantificación dos flavanoides, o quercetín-3-*O*-rutinósido (rutina) para a cuantificación dos flavonoides, o resveratrol para a cuantificación dos estilbenos e o ácido gálico para a dos ácidos benzoicos e o resto de compostos detectados.

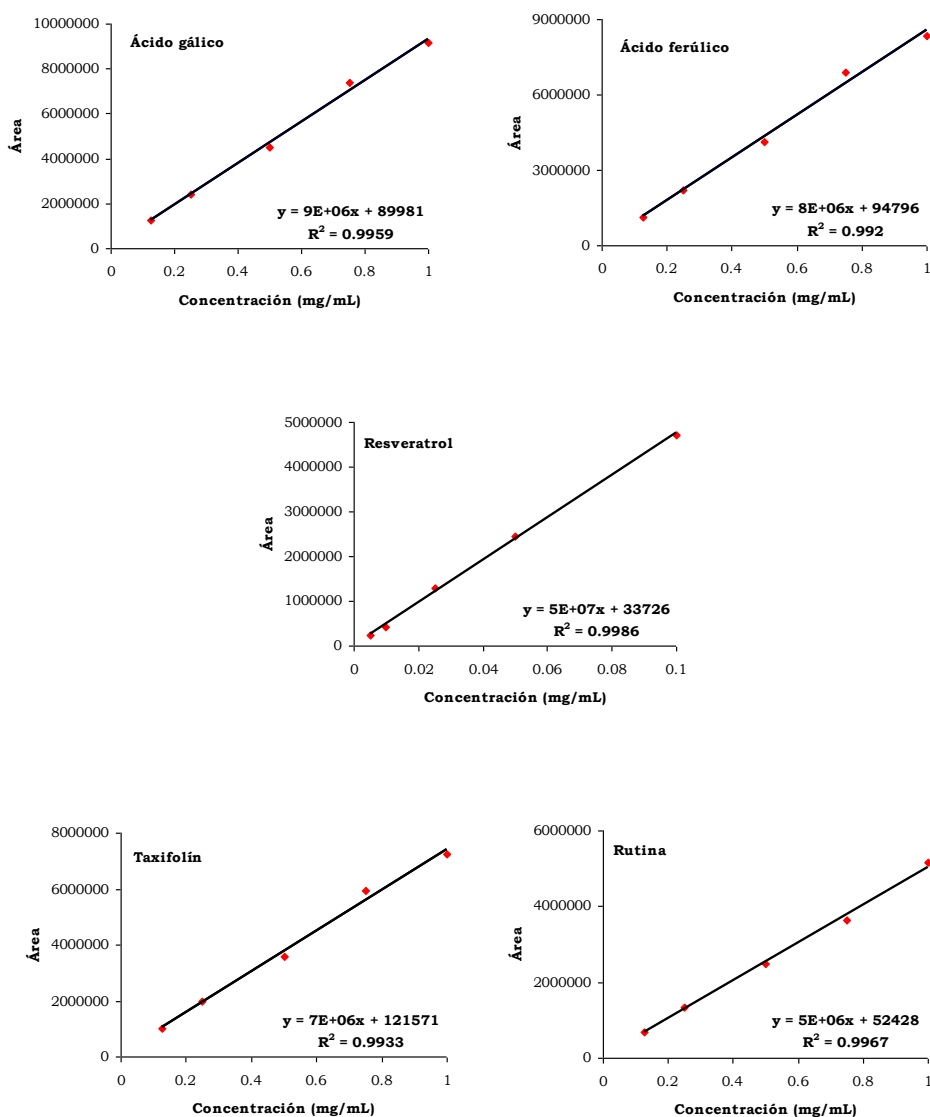


Figura 19. Rectas de regresión empregadas na cuantificación dos compostos fenólicos.

Como se pode observar, o coeficiente de correlación lineal de todas as curvas de calibrado realizadas superou o valor de 0,99 en todos os casos, o que indica a existencia dunha forte correlación entre o valor da absorbancia e a área do pico e, xa que logo, o acertado de aplicar estas curvas para o cálculo das concentracións dos distintos compostos separados.

RESULTADOS E DISCUSIÓN

1. ANÁLISE QUÍMICA DOS MOSTOS.

Tendo en conta que a composición fenólica dos mostos depende en boa medida do estado de maduración da uva coa que se obtiveron e co obxectivo de coñecer a súa homoxeneidade desde este punto de vista, as mostras foron analizadas para os seus parámetros químicos elementais de acordo coa metodoloxía exposta no apartado de material e métodos. Na táboa 5 preséntanse os resultados acadados para os nove mostos estudados, que de acordo coas indicacións do servizo técnico do Consello Regulador da Denominación de Orixe Rías Baixas, pódense considerar dentro da normalidade tanto no que fai aos azucres como á acidez.

Táboa 5. Parámetros químicos dos mostos da caste Albariño.

MOSTRAS	PARÁMETROS						
	°Brix	Ared	Gpot	pH	At	Atart	Imad
M1	20,90	202,20	12,01	3,29	9,10	4,25	22,22
M2	20,30	195,30	11,60	3,22	8,80	3,70	22,19
M3	20,60	198,80	11,81	3,20	7,72	3,50	25,78
M4	20,20	198,20	11,54	3,20	7,80	4,10	25,41
M5	21,60	210,3	12,50	3,26	9,00	4,20	23,37
M6	21,10	201,80	12,15	3,27	8,90	4,20	22,67
M7	21,30	206,80	12,29	3,19	9,70	6,25	21,32
M8	21,80	212,50	12,63	3,08	9,20	4,30	23,10
M9	20,80	203,10	11,96	3,20	9,10	5,10	22,32

Ared: azucres reductores (g/L); Gpot: Grao potencial (% v/v); At: acidez total (g tartárico/L); Atart: acidez tartárica (g/L); Imad: Índice de maduración.

2. ANÁLISE DOS MOSTOS MEDIANTE HPLC-DAD.

Como primeiro paso na identificación da composición fenólica dos nove mostos obxecto de estudo, realizáronse –nas condicións especificadas no apartado 3 de material e métodos- as análises en HPLC-DAD para observar as posibles diferenzas entre eles.

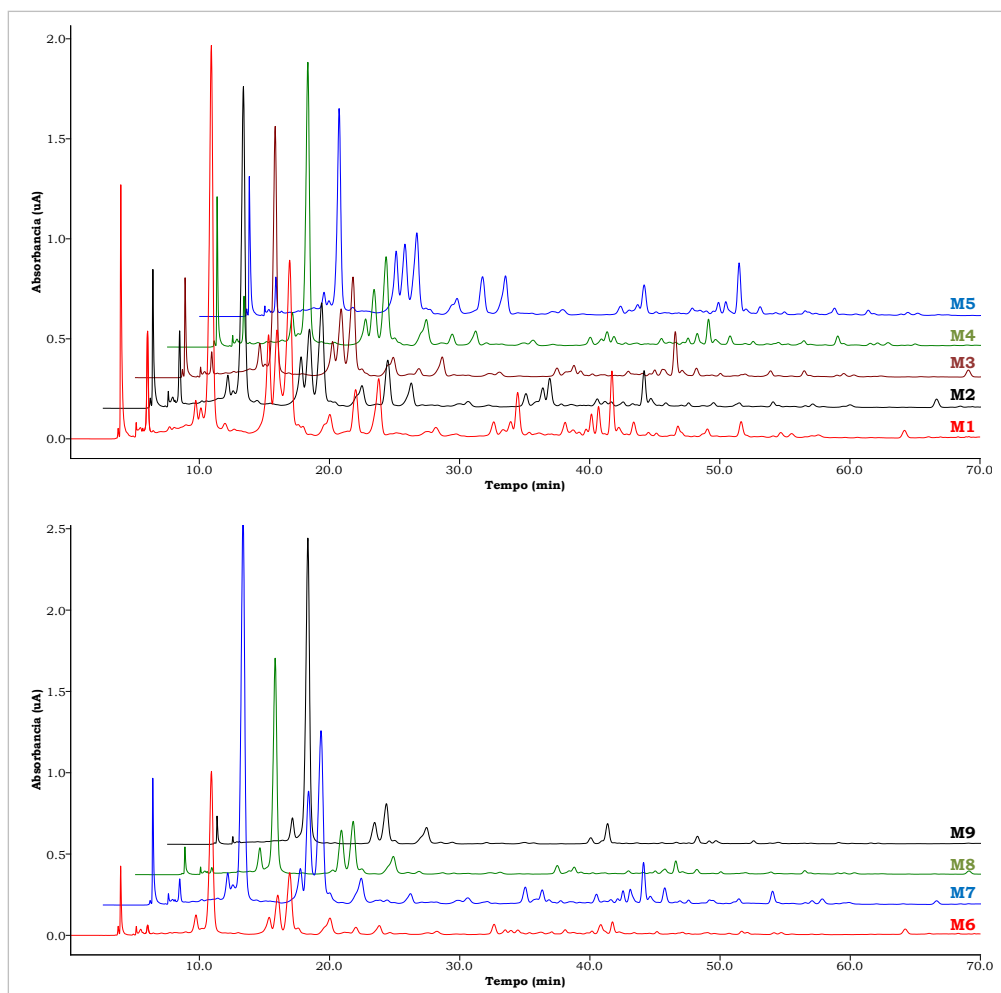


Figura 20. Cromatogramas de HPLC-DAD capturados a 280 nm para os mostos de Albariño estudados.

Nas figuras 20, 21 e 22 amósanse, de forma comparada, os cromatogramas para as distintas mostras estudadas adquiridos respectivamente a 280, 305 e 356 nm.

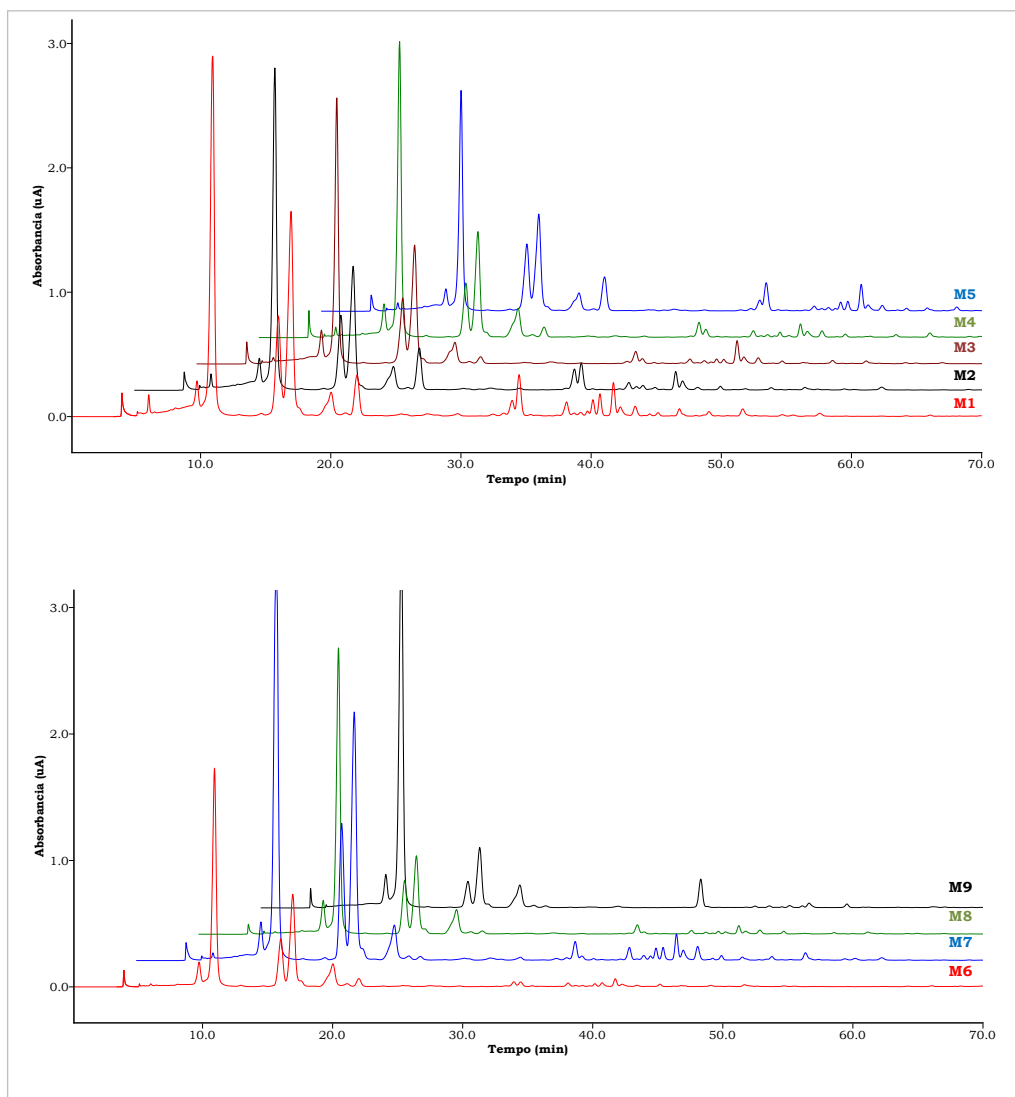


Figura 21. Cromatogramas de HPLC-DAD capturados a 305 nm para os mostos de Albariño estudados.

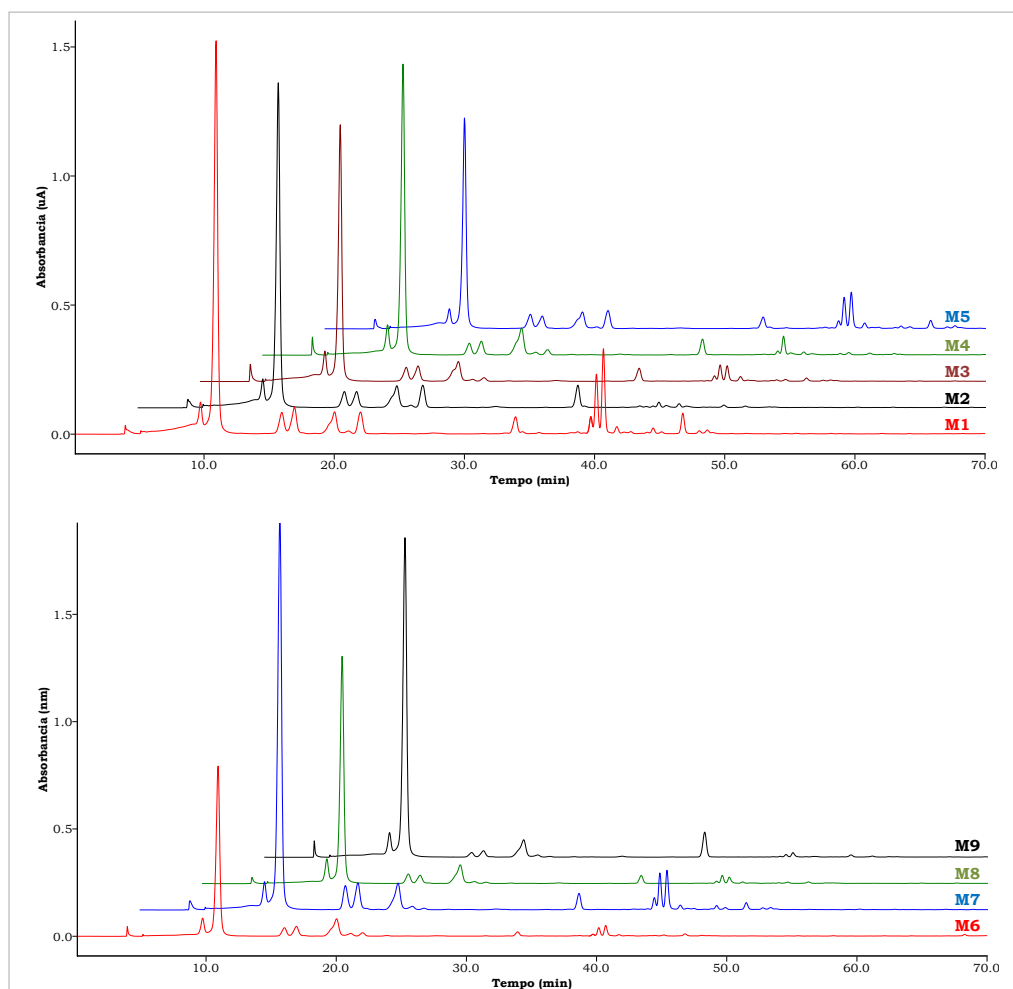


Figura 22. Cromatogramas de HPLC-DAD capturados a 356 nm para os mostos de Albariño estudados.

Nas figuras 23 a 25, preséntanse tres cromatogramas tipo (un para cada unha das lonxitudes de onda seleccionadas) nos que aparecen numerados os picos a considerar nas análises posteriores. Co obxectivo de facilitar a comparación entre as distintas mostras, inmediatamente despois do cromatograma tipo correspondente a cada lonxitude de onda (280, 305 e 356 nm), presentamos unha táboa na que se especifica que compostos puideron ser observados no cromatograma particular de cada unha das mostras estudadas adquirido a esa lonxitude de onda (táboas 6, 7 e 8, respectivamente).

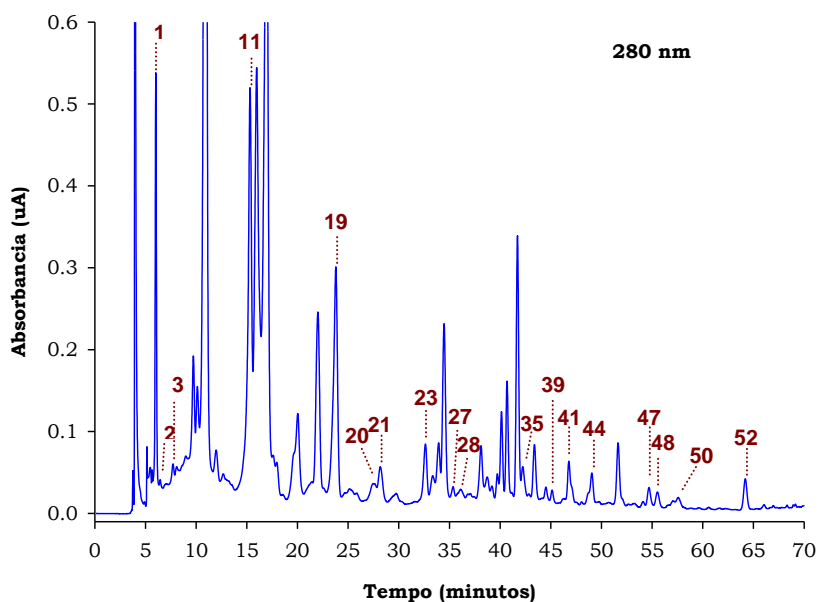


Figura 23. Cromatograma tipo HPLC-DAD para os mostos estudados capturado a 280 nm.

Táboa 6. Picos considerados nos mostos estudados e os seus tempos de retención nos cromatogramas capturados a 280 nm.

Pico	t_R (min)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
1	6,0	x	x	x	x	x	x	x	x	
2	6,5	x	x	x	x	x	x	x	x	
3	7,7	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	8,1	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7	10,1	x	x	x	x	x	x	x	x	
9	12,0	x	x	x	x	x	x	x		
10	12,7	x	x	x	x	x		x		
11	15,3	x	x	x	x	x	x	x	x	x
13	16,2	x			x	x		x		
19	23,8	x	x	x	x	x	x	x	x	
20	27,6	x	x	x	x	x	x	x	x	x
21	28,2	x	x	x	x	x	x	x	x	x
23	32,6	x	x	x	x	x	x	x	x	x
24	33,3	x	x	x	x	x	x	x	x	x
27	35,4	x	x	x	x	x	x	x	x	x
28	36,1	x	x	x		x	x	x	x	x
30	38,7	x	x	x	x	x	x	x	x	x
35	41,7	x	x	x	x	x	x	x	x	x
37	43,4	x	x	x	x	x	x	x	x	
39	45,1	x	x	x	x	x	x	x	x	x
41	47,1	x	x	x	x	x	x	x	x	x
44	49,1	x	x	x	x	x	x	x	x	x
46	54,1	x	x	x	x	x	x	x	x	x
47	54,7	x	x	x	x	x	x	x	x	x
48	55,5	x	x	x	x	x	x	x	x	
50	57,1	x	x	x	x	x	x	x	x	
52	64,2	x	x	x	x	x	x	x	x	x

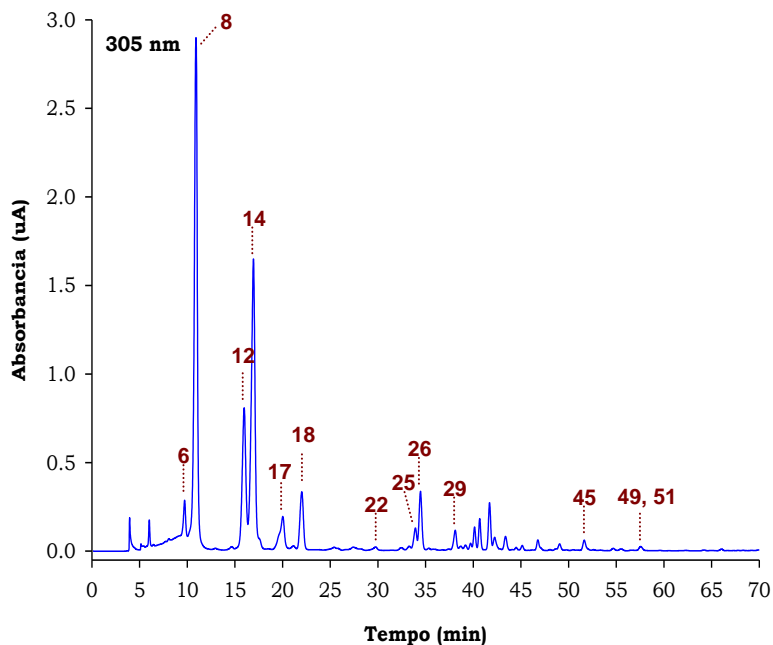


Figura 24. Cromatograma tipo HPLC-DAD para os mostos estudados capturado a 305 nm.

Táboa 7. Picos considerados nos mostos estudados e os seus tempos de retención nos cromatogramas capturados a 305 nm.

Pico	t _R (min)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
5	9,0	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6	9,7	x	x	x	x	x	x	x	x	x
8	10,9	x	x	x	x	x	x	x	x	x
12	16,0	x	x	x	x	x	x	x	x	x
14	16,9	x	x	x	x	x	x	x	x	x
15	17,6	x	x	x	x	x	x	x	x	x
16	19,6	x	x	x	x	x	x	x	x	x
17	20,0	x	x	x	x	x	x	x	x	x
18	22,0	x	x	x	x	x	x	x	x	x
22	29,7	x	x	x	x	x	x	x	x	
25	33,9	x	x	x	x	x	x	x	x	x
26	34,5	x	x	x	x	x	x	x	x	x
29	38,1	x	x	x	x	x	x	x	x	x
31	39,2	x	x	x	x	x	x	x	x	x
36	42,2	x	x	x	x	x	x	x	x	x
45	51,6	x	x	x	x	x	x	x	x	x
49	56,6	x		x	x	x	x	x	x	
51	57,6	x	x	x	x	x	x	x	x	

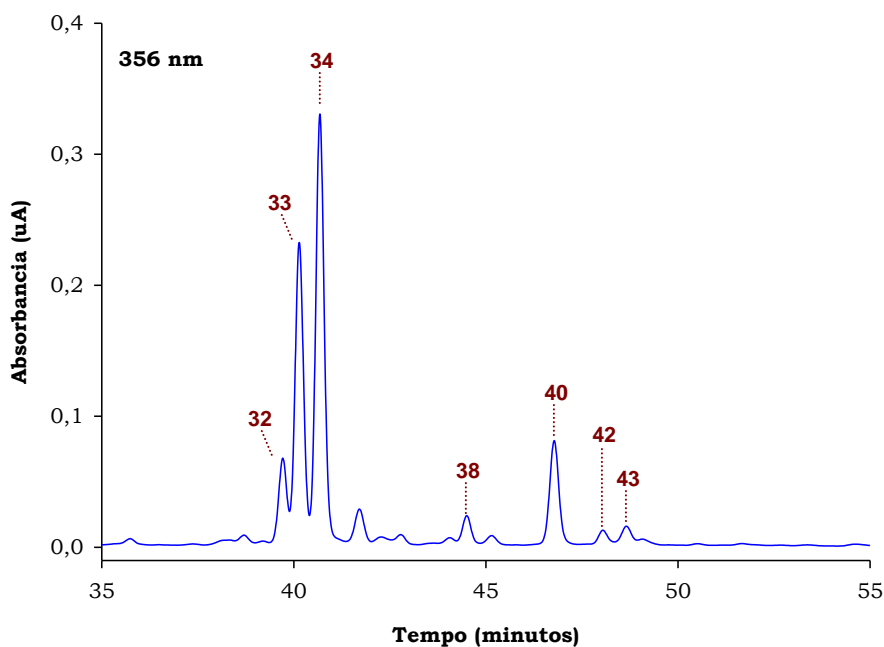


Figura 25. Cromatograma tipo HPLC-DAD para os mostos estudados capturado a 356 nm.

Táboa 8. Picos considerados nos mostos estudados e os seus tempos de retención nos cromatogramas capturados a 356 nm.

Pico	t_R (min)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
32	39,7	x	x	x	x	x	x	x	x	x
33	40,1	x	x	x	x	x	x	x	x	x
34	40,7	x	x	x	x	x	x	x	x	x
38	44,5	x	x	x	x	x	x	x	x	x
40	46,8	x	x	x	x	x	x	x	x	x
42	48,0	x	x	x	x	x	x	x	x	x
43	48,7	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Como compendio, na táboa 9 relacionamos a totalidade dos compostos observados no conxunto dos cromatogramas para as nove mostras, con independencia de cal sexa a lonxitude de onda na que foi observado; neste caso facilítanse non só os seus tempos de retención senón tamén os seus máximos de absorbancia en UV-vis (DAD) e o grupo de compostos ao que “a priori” entendemos pertence.

Táboa 9. Tempos de retención, características espectrais en DAD e familia dos compostos fenólicos separados.

Pico	t _R (min)	λ _{max} (nm)	Familia
1	6,0	271	Bz
2	6,5	254,5; 299,4	Bz
3	7,7	265; 302	Bz
4	8,1	294,7	Bz
5	9,0	296,7 ; 327,9	AHC
6	9,7	301 ; 323,2	AHC
7	10,1	280,4; 325,5	Outros
8	10,9	298 ; 327	AHC
9	12,0	279,3	Flavan-3-ol/Bz
10	12,7	279,3	Flavan-3-ol/Bz
11	15,3	279,3	Flavan-3-ol/Bz
12	16,0	299 ; 310,1	AHC
13	16,2	274; 281,6	Outros
14	16,9	300 ; 312,5	AHC
15	17,6	297,6 ; 308,9	AHC
16	19,6	297,6 ; 326,7	AHC
17	20,0	299,3 ; 327,9	AHC
18	22,0	295,8 ; 323,2	AHC
19	23,8	278,1	Flavan-3-ol
20	27,6	281,6; 326,6	Flavanoide
21	28,2	279,3	Flavan-3-ol
22	29,7	303; 314,3	Estilbeno
23	32,6	271 ; 280,4; 288	Outros
24	33,3	287,6; 340,5	Flavanoide
25	33,9	300,6 ; 329,1	AHC
26	34,5	297,5 ; 308,9	AHC
27	35,4	289,9; 330,9	Flavanoide
28	36,1	272 ; 278,1; 288,6	Outros
29	38,1	305,3; 318,7	Estilbeno
30	38,7	282,8; 323,2	Outros
31	39,2	285 ; 310,1	AHC
32	39,7	255,6; 266 ; 298 ; 354,1	Flavonol
33	40,1	255,6; 266 ; 298 ; 354,1	Flavonol
34	40,7	255,6; 266 ; 298 ; 354,1	Flavonol
35	41,7	289,9; 342	Flavanoide
36	42,2	295,6 ; 314,8	AHC
37	43,4	260,4; 298,2	Bz
38	44,5	265,1; 290 ; 324 ; 348,2	Flavonol
39	45,1	322	Outros
40	46,8	265,1; 291 ; 324 ; 345,8	Flavonol
41	47,1	288,7; 340	Flavanoide
42	48,0	253,3; 266 ; 305 ; 351,8	Flavonol
43	48,7	266,3; 285,9 ; 350	Flavonol
44	49,1	292,3; 340	Flavanoide
45	51,6	285,2	Estilbeno
46	54,1	274,5	Bz/Cinámico
47	54,7	284; 320,6	Flavanoide
48	55,5	258; 299,4	Outros
49	56,6	261,5; 297; 341; 357,7	Estilbeno
50	57,1	280,4	Flavanoide
51	57,6	305,3; 318,2	Estilbeno
52	64,2	263,9	Outros

En negraña móstranse os ombros; outros: compostos aos que non foi posíbel asignar ningún grupo.

Do resultado da comparación dos distintos cromatogramas da que vimos falando, pódese deducir a existencia dunha notábel similitude entre os distintos mostos, e máis se temos en conta que nalgún caso a consideración dalgún pico como ausente pode vir dada pola dificultade de situalo, ben porque poida coeluir con outros compostos ou ben por se atopar por baixo do límite de detección do detector. Non debemos esquecer que algúns destes compostos presentan baixo nivel de absorbancia naquelas mostras nas que si se observan. Neste sentido, podemos afirmar que as diferenzas existentes entre as distintas mostras analizadas resultan ser en todos os casos cuantitativas.

Como queira que o noso obxectivo é estudar a composición fenólica dos mostos de Albariño e non tanto a comparación entre mostos de distintas procedencias, optamos por calcular as concentracións dos compostos observados (táboa 10) nas distintas mostras e abordar de forma minuciosa o noso estudo naquela na que, estando presentes todos os compostos, o seu contido sexa suficiente para seren cuantificados.

Da observación da táboa 10 pódese deducir que é a mostra M1 a que cumpre mellor os criterios de selección propostos, polo que será con esta mostra coa que abordemos os traballos de separación e identificación dos compostos fenólicos presentes nos mostos da caste Albariño. En efecto, e agás para os compostos 2 e 49 que están por baixo do límite de cuantificación en todas as mostras, nesta a práctica totalidade dos compostos illados están presentes en maior concentración que no resto. Hai que facer constar, en calquera caso, que o feito de elixir esta mostra non quita que para a identificación dalgún composto en concreto botemos man daquelas outras que o conteñan en maior concentración que a mostra M1. De forma particular isto ocorrerá para algúns compostos na mostra M7 e, nunha menor medida, para algún outro na M2.

Táboa 10. Concentración (mg/L) dos compostos fenólicos presentes nos nove mostos estudados.

Pico	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
1	9,283	6,638	1,837	4,333	3,082	0,799	2,518	0,451	nd
2	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	nd
3	0,356	0,027	tr	tr	tr	tr	0,074	tr	tr
4	0,123	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,033	tr
5	0,721	1,410	2,081	1,699	1,565	0,772	1,478	0,816	0,870
6	6,970	3,435	4,400	4,609	3,078	4,732	3,726	5,399	8,541
7	4,173	0,508	0,101	tr	1,353	tr	0,347	nd	nd
8	96,998	76,865	56,982	66,885	49,092	48,198	115,901	65,599	101,228
9	1,568	0,256	tr	tr	0,517	tr	tr	nd	nd
10	0,030	tr	tr	0,166	tr	nd	tr	nd	nd
11	28,030	13,346	9,712	7,674	18,186	6,079	12,427	1,011	tr
12	32,709	24,253	21,451	17,404	21,950	14,861	42,108	16,342	8,362
13	6,861	nd	nd	0,510	1,393	nd	1,944	nd	nd
14	59,834	35,516	33,856	29,436	28,136	24,947	73,226	21,098	16,016
15	1,727	0,747	0,209	0,048	0,818	1,984	3,406	0,393	0,799
16	1,792	1,691	2,163	2,844	1,742	1,626	1,672	1,897	1,425
17	6,747	6,864	6,645	8,649	5,653	7,151	10,511	7,054	7,066
18	12,351	13,938	1,448	2,483	9,902	1,799	0,288	0,555	0,452
19	16,731	7,081	5,638	4,163	11,738	3,095	3,482	0,407	nd
20	2,283	0,225	1,202	0,829	1,156	tr	0,704	0,678	tr
21	2,623	0,823	1,199	1,595	1,493	0,620	1,230	0,578	0,174
22	0,860	0,130	tr	0,093	0,032	0,059	0,597	tr	nd
23	3,465	3,051	1,970	1,836	2,120	2,658	4,654	2,351	1,454
24	1,874	1,409	0,762	1,552	1,103	1,176	0,136	tr	tr
25	3,483	4,818	1,230	3,188	2,849	0,880	2,379	0,936	6,077
26	10,957	7,260	0,399	0,069	7,626	1,074	0,194	tr	0,007
27	0,242	0,225	0,231	0,182	0,005	tr	0,270	tr	tr
28	0,475	0,291	tr	nd	tr	0,348	0,286	0,014	0,031
29	2,792	1,146	0,897	1,150	0,878	0,609	1,776	0,469	0,022
30	1,213	0,372	0,129	0,409	0,601	tr	tr	tr	tr
31	0,408	0,253	0,373	0,236	0,464	tr	0,300	0,021	0,103
32	3,503	0,124	0,941	0,593	1,449	0,245	2,918	0,351	tr
33	14,069	1,114	3,657	4,065	7,139	2,112	9,899	2,014	0,476
34	20,408	0,525	3,614	0,325	8,541	2,977	11,077	1,752	1,195
35	14,980	8,504	10,256	5,657	11,856	3,385	11,774	3,413	0,366
36	1,615	2,114	1,123	1,239	0,888	0,625	2,224	0,465	0,758
37	2,493	0,374	1,352	1,608	1,201	0,045	4,030	0,812	nd
38	1,158	tr	tr	0,059	0,290	tr	0,916	tr	tr
39	0,305	0,424	0,291	0,358	0,216	0,286	0,507	0,221	0,520
40	5,240	0,189	0,719	0,316	2,057	0,584	2,053	0,270	0,142
41	0,265	0,660	0,385	0,534	0,258	tr	0,387	0,065	0,306
42	0,560	tr	0,033	tr	0,159	tr	0,309	tr	tr
43	0,873	tr	0,145	0,165	0,529	tr	0,537	tr	tr
44	1,680	1,038	1,479	0,276	1,574	0,263	0,683	0,467	tr
45	3,156	0,876	1,093	1,894	0,911	0,656	2,748	0,674	0,144
46	0,100	0,127	0,173	0,323	0,073	0,301	0,135	0,098	0,007
47	1,271	0,775	0,781	0,551	0,671	0,388	0,870	0,114	tr
48	0,853	tr	0,363	0,630	0,463	tr	1,490	0,240	nd
49	tr	nd	tr	tr	tr	tr	tr	tr	nd
50	0,317	0,101	tr	tr	tr	tr	0,159	tr	nd
51	0,714	0,675	0,142	tr	tr	tr	0,504	tr	nd
52	1,788	1,882	1,639	1,706	1,321	1,375	0,939	0,795	0,698

nd= non detectado; tr= detectado por baixo do límite de cuantificación

3. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.

RECOLLIDA DE FRACCIÓNS DE HPLC E ANÁLISE MEDIANTE ESPECTROMETRÍA UV-vis

Dada a complexidade dos cromatogramas obtidos previamente, e co obxectivo de facilitar a identificación da meirande parte posíbel dos compostos fenólicos presentes na mostra, propuxémonos recoller fraccións que permitiran illar cada un destes compostos; para elo, tratamos de conseguir unha mellor resolución modificando o gradiente cromatográfico de acordo co recollido no apartado 3 de material e métodos. Na figura 26 presentamos o cromatograma adquirido a 280 nm nesas novas condicións.

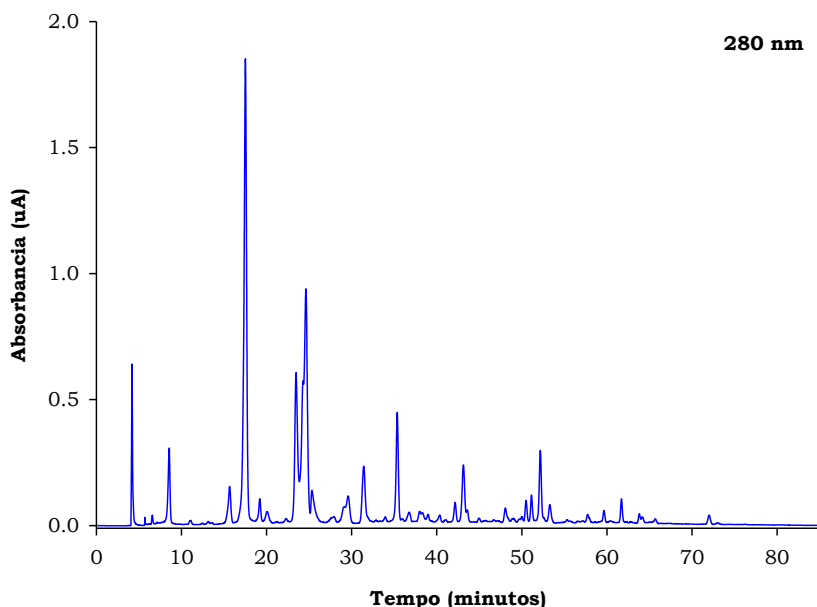


Figura 26. Cromatograma HPLC-DAD capturado a 280 nm do mosto de Albariño.

Na figura 27 e na táboa 11 reflíctense as 31 fraccións recollidas e os picos cromatográficos presentes en cada unha delas, engadíndose –para aqueles que foi posíbel– a súa correspondencia cos picos relacionados na táboa 9.

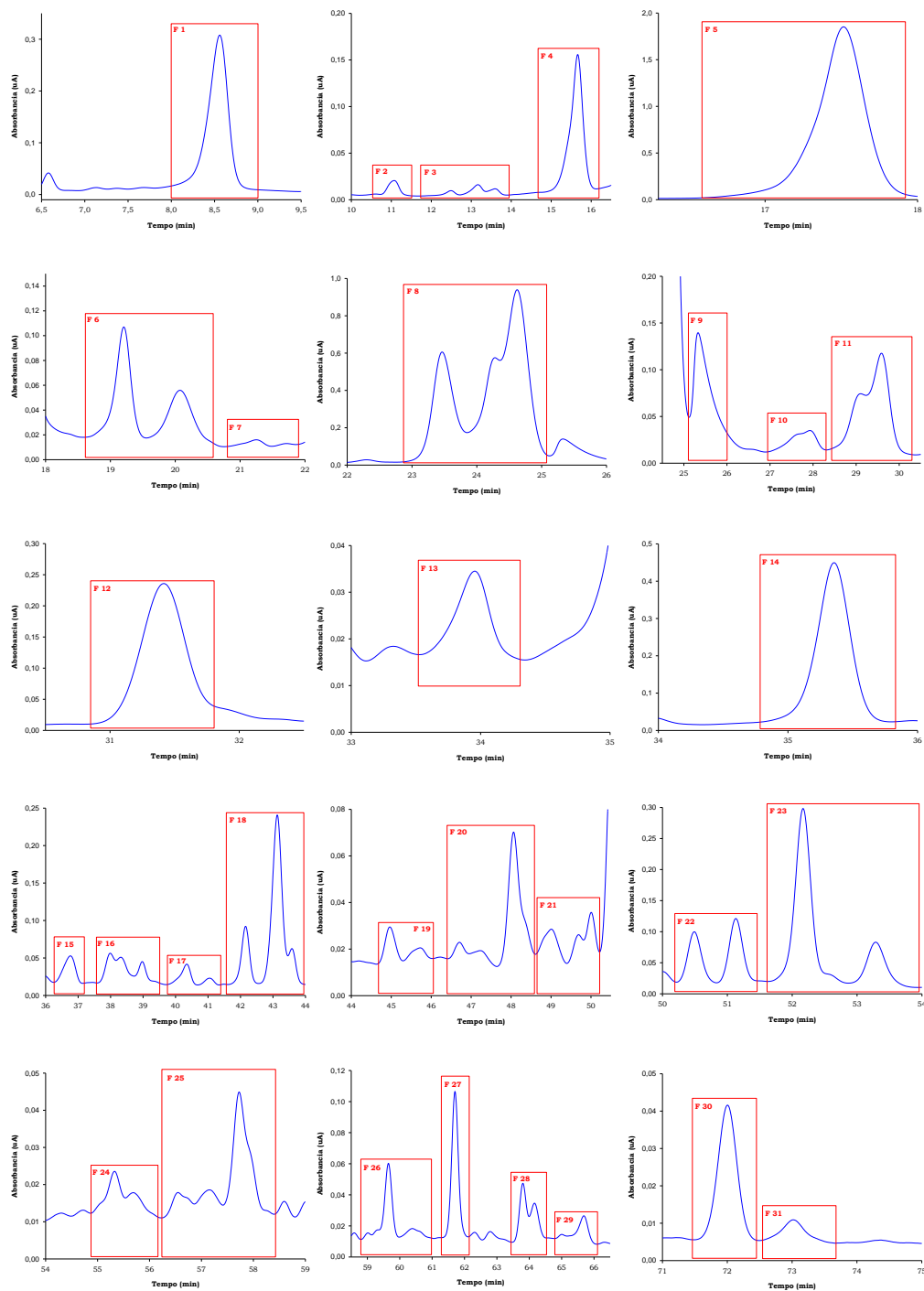


Figura 27. Representación das fraccións cromatográficas recollidas (F1-F31) que inclúen os picos de interese existentes en cada unha delas.

Táboa 11. Fraccións recollidas no HPLC.

Fraccións (t_{Ri} - t_{Rf})	t_R picos (min)	λ_{max} (nm)	n° pico
F1 (7,0-9,0)	8,5	271	1
F2 (10,5-11,5)	11,0	293,5	4
	12,4	255,6; 297	2
F3 (11,7-13,7)	13,1	269,8	
	13,5	260,4; 297	3
F4 (14,6-16,3)	15,6	300 ; 322	6
F5 (16,5-17,8)	17,4	298 ; 327	8
	19,1	279,3	9
F6 (18,3-20,0)	19,5	279,3	10
	20,6	285,2; 325,5	
F7 (21,0-22,0)	21,5	279,3	
F8 (22,3-24,4)	22,8	299 ; 308,9	12
	23,8	300 ; 312,4	14
F9 (24,5-26,0)	24,7	274,5; 280,4	13
	26,8	298 ; 312,4	15
F10 (26,5-27,5)	27,2	268 ; 291,1	
F11 (27,6-29,5)	28,0	298 ; 325,5	16
	28,7	297 ; 326,7	17
F12 (30,8-32,0)	31,4	296 ; 323	18
F13 (33,5-34,4)	34,0	281,6; 301	
F14 (34,6-35,8)	35,4	278,1	19
F15 (36,3-37,3)	36,8	284; 320	
	38,0	281,6; 328	
F16 (37,5-39,8)	38,4	285,2; 337	20
	39,0	279,3	21
F17 (40,0-41,8)	40,4	301,8; 312	22
	41,1	297; 340	24
	42,2	272 ; 279,3; 287,6	23
F18 (42,0-44,0)	43,2	300 ; 308,9	26
	43,6	291,1; 326,7	25+27
	45,0	287,5; 338	
F19 (44,6-46,1)	45,9	272 ; 279,3; 287,6	28
	46,4	276,9	
F20 (46,3-48,8)	46,8	274,5	
	47,3	301,8	
	48,2	305,3; 318,7	29
	49,1	279,3	
F21 (48,9-50,3)	49,8	285,2; 335	30
	50,1	255,6; 265 ; 296 ; 352,9	32
F22 (50,4-51,8)	50,6	255,6; 264 ; 298 ; 354,1	33
	51,3	255,6; 266 ; 299 ; 354,1	34
F23 (51,9-54,0)	52,3	289,9; 341	35
	53,5	260,4; 298,2	37
F24 (54,1-56,4)	55,5	265,1; 289 ; 325 ; 349,4	38
	55,8	269,8	
F25 (56,5-58,8)	56,7	318,4	39
	57,3	279,3	
	57,9	263,9; 290 ; 324 ; 345,8	40
	59,1	254,5; 265 ; 305 ; 354,1	42
F26 (58,9-61,3)	59,8	291,1; 340	41
	60,5	291,1; 339	44
F27 (61,4-62,3)	61,9	285,2	45
F28 (63,5-64,9)	63,9	282,8; 320	47
	64,4	258; 300	48
F29 (65,0-66,3)	65,8	305,3; 319	51
F30 (71,5-72,4)	72,1	263,9	52
F31 (72,5-74,0)	73,1	308,9	

En negraña móstranse os ombros; t_{Ri} = t_R inicial; t_{Rf} = t_R final

Tal e como apuntamos no apartado 4 de material e métodos, todas estas fraccións foron novamente cromatografiadas nas condicións adecuadas para intentar illar, en cada unha delas, aqueles compostos de interese e así poder identificalos mediante outras técnicas (hidrólise e espectrofotometría UV-vis e MS). En primeiro lugar, os picos de interese recollidos individualmente en cada unha destas fraccións foron analizados mediante espectrofotometría UV-vis, observando as modificacións batocrómicas e/ou hipsocrómicas que experimentan os seus espectros tras a adición de diversos axentes modificadores do mesmo.

Como xa indicamos, os distintos grupos de compostos fenólicos presentan un espectro neutro de absorción característico que sofre modificacións batocrómicas e/ou hipsocrómicas en función da estrutura química do composto do que se trate. De acordo con Steck (1967), Méndez e Lojo (1969), Harborne (1989) e Van Sumere (1989), a adición dun álcali (hidróxido potásico ou sódico) provoca a ionización dos grupos fenólicos dando lugar a un desprazamento batocrómico respecto dos espectros en metanol, un desprazamento que non se produce cando os grupos OH están metilados ou enmascarados con outra substitución. Do mesmo xeito, a adición de cloruro de aluminio á solución metanólica, provoca un desprazamento batocrómico importante, resultado da formación de complexos cos dihidroxilos veciñais e cos hidroxilos adxacentes a grupos carbonilo. A adición posterior de ácido clorhídrico provoca a ruptura dos complexos alumínicos e un desprazamento hipsocrómico que será maior ou menor en función da estrutura molecular do composto de que se trate. Neste sentido, hai que indicar que o ácido clorhídrico é quen de romper os complexos alumínicos formados entre os grupos dihidroxilo (OH veciñais) pero non así aqueles existentes entre os grupos hidroxilo e carbonilo adxacentes, polo que o desprazamento hipsocrómico será maior no caso de que se teñan producido previamente ámbolos dous complexos que cando só se teña producido o segundo (Markham, 1982; Ibrahim e Barron, 1989). Máis difícil de explicar é, segundo Méndez e Lojo (1969), a propiedade quelante do ión aluminio con moléculas de ácidos cinámicos que non posúen nin dous grupos OH contiguos nin grupos hidroxilo e carbonilo adxacentes.

Segundo Jurd (1957) os espectros en solucións neutras dos ácidos fenólicos son practicamente iguais aos dos seus ésteres; ademais os ácidos e os ésteres presentan un máximo de absorción na mesma rexión que os fenóis que carecen dun grupo carboxilo. A adición de acetato sódico aos ácidos hidroxibenzoicos provoca un desprazamento hipsocrómico do máximo de absorción principal, un desprazamento que non se produce nos fenóis simples nin nos ésteres destes ácidos. De acordo con Markham (1982) e Ibrahim e Barron (1989), a adición de metóxido sódico ou acetato sódico ten un interese particular no caso dos derivados hidroxicinámicos e dos flavonóis. Así, os ésteres do *p*-coumárico, cafeico e ferúlico amosan desprazamentos batocrómicos de 20-65 nm no seu máximo tras a adición do metóxido sódico debido á presenza dun OH libre en posición 4 ou de grupos 3,4-dihidroxilo. Pola contra, e como sucedía para os hidroxibenzoicos, a adición de acetato sódico dá lugar a un desprazamento hipsocrómico duns 10 nm no máximo principal dos ácidos hidroxicinámicos libres, debido á ionización do grupo carboxilo. Ademais, os ésteres do cafeico (os cafeoil-ésteres) diferéncianse do resto de conxugados por dar desprazamentos batocrómicos en presenza de acetato sódico/ácido bórico.

En calquera caso, se algún grupo foi estudado en profundidade no que fai ao seu comportamento espectrofotométrico, é o dos flavonoides (Mabry, 1969; Markham, 1982, 1989), estendéndose logo a información obtida para estes compostos ao resto dos derivados fenólicos. Segundo estes autores, a maioría das flavonas e flavonóis presentan, no seu espectro neutro, dúas bandas principais de absorción na rexión do UV-vis, unha no rango de absorción entre 320 e 385 nm (banda I) e outra entre 250 e 285 nm (banda II). Aínda que non é estritamente certo, resulta práctico considerar que a banda I correspóndese coa absorción do anel B e a banda II coa do anel A (ver figura 13). En xeral, canto maior sexa o patrón de osixenación da molécula maior será o seu máximo de absorbancia. Así, en ausencia de radicais hidroxilos no anel B a banda I presenta un máximo de absorbancia en 359 nm fronte aos 367, 370 e 374 nm, dos 4'-OH, 3',4'-OH e 3',4',5'-OH respectivamente. A presenza dun OH en posición 3 (existente nos flavonóis e non nas flavonas) resulta de especial interese: a banda I dos flavonóis é sempre 20-30 nm máis alta que a das

flavonas correspondentes. A *O*-metilación, a *O*-glicosilación e a acilación tenden a producir desprazamentos hipsocrómicos. A *C*-glicosilación non ten efectos sobre o espectro.

Como xa indicamos, o cloruro de aluminio forma complexos estábeis cando existen un radical OH e un grupo carbonilo contiguos, e lábiles cando hai dous radicais OH contiguos. O desprazamento batocrómico da banda I vén dado polo efecto combinado de ámbolos dous complexos. A adición de ácido clorhídrico rompe, no seu caso, o complexo lábil e produce un desprazamento hipsocrómico nesta banda, que indica a presenza dun grupo *o*-dihidroxilo no anel B. A adición de metóxido sódico provoca a ionización dos grupos OH, polo que permite detectar a presenza de OH libres nas posicións 3, 7 e 4'. A aparición dunha banda adicional respecto do espectro en metanol (arredor dos 330 nm) indica a existencia dun OH libre en posición 7; o desprazamento batocrómico de 45-65 nm indica a presenza dun OH libre en posición 4', ou ben (cando se produce ao tempo unha diminución da intensidade da absorbancia) dun OH libre en posición 3 xunto ao bloqueo da posición 4' (Markham, 1989). Pola súa banda, a adición de acetato sódico provoca un desprazamento batocrómico (entre 5 e 20 nm) da banda II nas flavonas e flavonóis cun OH libre en posición 7, porén cando as flavonas están substituídas nas posicións 6 e 8 este desprazamento é practicamente impercetíbel. En presenza de acetato sódico/ácido bórico, as flavonas e os flavonóis que conteñen un grupo *o*-dihidroxilo no anel B mostran un desprazamento batocrómico na banda I (Mabry, 1969).

De acordo con Porter e Markham (1972) e Grayer (1989), os espectros UV en metanol das flavanonas, das dihidrochalconas e dos dihidroflavonóis son case idénticos; en todos os casos presentan un pico de absorción principal no rango de 270 a 295 nm (banda II) e un ombro entre 300 e 360 nm (banda I), polo que resulta moi difícil diferenciar entre estes tres grupos de compostos.

A diferenza do que ocorre coas flavonas e os flavonóis, o uso de cloruro de aluminio, cloruro de aluminio/ácido clorhídrico, acetato sódico e acetato

sódico/ácido bórico, non permite unha interpretación sinxela no caso que nos ocupa. En calquera caso, a adición de cloruro de aluminio provoca un desprazamento batocrómico da banda II de 21 a 27 nm se o OH en posición 5 está libre, con independencia de que o OH en posición 7 estea libre ou non, un desprazamento que se mantén ao engadir ácido clorhídrico; cando o OH en posición 5 das flavanonas está ausente ou bloqueado non se produce este desprazamento.

O espectro UV en metóxido sódico de todas as flavanonas e dihidroflavonois con hidroxilación no anel A provoca un desprazamento batocrómico na banda II, que nos dihidroflavonois é maior ou menor dependendo da presenza ou ausencia dun OH libre na posición 5. O espectro dos 5,7-dihidroxi-dihidroflavonois exhibe un desprazamento entre 35 e 40 nm, mentres que nos 7-hidroxi-dihidroflavonois o desprazamento é de 55-60 nm. A presenza ou ausencia dun grupo hidroxilo en posición 7, tanto nas flavanonas como nos dihidroflavonois pode detectarse mediante a adición de acetato sódico polo desprazamento batocrómico da banda II, que non se produce nos derivados glicosilados na posición 7.

Polo xeral, os estilbenos exhiben en metanol unha absorción intensa entre 308 e 336 nm (banda I) e entre 281 e 313 nm (banda II), aínda que moitos deles non amosan un máximo na banda II senón un ombro ou inflexión, e pouco se sabe acerca do seu comportamento espectrofotométrico en presenza dos axentes modificadores dos que vimos falando. Neste sentido debemos citar o traballo de Hillis e Ishikura (1968) que trataremos de seguir na interpretación dos espectros dos derivados estilbénicos.

Máis difícil resulta conseguir datos bibliográficos sobre o comportamento espectrofotométrico dos flavan-3-óis. De feito, Cathey Tsai Su e Singleton (1969) aportan só os espectros en metanol e Porter, unha autoridade no estudo dos taninos, indica que as análises espectrofotométricas con axentes modificadores do espectro son de escaso interese cando se aplican a esta familia de compostos (Porter, 1989).

Unha vez coñecido o comportamento espectrofotométrico xeral de cada un dos grupos de compostos fenólicos considerados, en función do exposto imos interpretar a estrutura química dos compostos presentes en cada unha das fraccións cromatográficas obtidas. Para evitar facer máis tediosa e redundante a exposición, agás cando o consideremos estritamente necesario, non imos recoller no texto a argumentación seguida para a identificación de cada un dos compostos illados.

Para cada fracción amósanse os cromatogramas adquiridos a 280 nm e o gradiente empregado para a súa separación en cada caso. Do mesmo xeito. recóllense nunha táboa as características espectrais dos compostos descoñecidos e –no seu caso– as dos patróns comerciais cos que foron comparados (patróns de referencia). Os resultados acadados móstranse de seguido.

Fracción 1.- Nesta fracción recollemos un só pico, que presenta un máximo de absorbancia a 271 nm e que nas novas condicións cromatográficas ten un tempo de retención de 8,5 min (figura 28); trátase do composto 1 da táboa 9. Ao comparar estes resultados cos existentes na bibliografía (Ginjom e col., 2011) e cos obtidos para os patróns analizados en HPLC-DAD nas mesmas condicións de fluxo e gradiente cromatográfico, comprobamos que coinciden –en efecto– cos do ácido gálico.

As análises en espectrofotometría UV-vis en MeOH e logo de engadirlle hidróxido sódico para modificar o espectro (táboa 12 e figura 29) confirman que se trata do ácido gálico. En efecto, o seu característico máximo de absorbancia en metanol (271 nm) coincide co do ácido gálico comercial. Ao igual que sucedeu co ácido gálico patrón, o noso composto descompúxose ao engadirlle hidróxido sódico para realizar o espectro en medio alcalino, o que coincide co proposto por Van Sumere (1989).

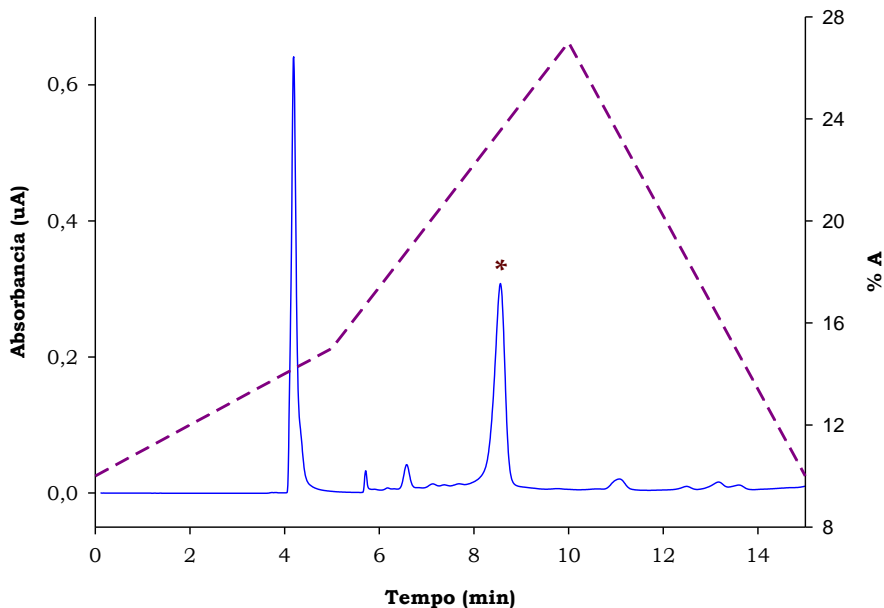


Figura 28. Cromatograma da fracción F1 adquirido a 280 nm.

Táboa 12. Características espectrais do composto descoñecido comparadas coas do ácido gálico patrón.

Composto	λ_{\max}		
	DAD	MeOH	NaOH
Desc ($t_R=8,5$ min)	271	271	d
Gálico	271	269	d

d= inestábel

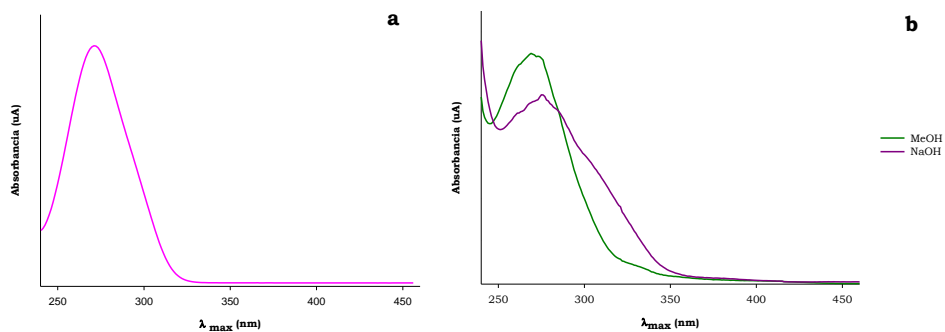


Figura 29. Características espectrais do composto descoñecido en DAD (a) e en MeOH e MeOH+NaOH (b).

Fracción 2.- Recollemos tamén nesta fracción un só pico (figura 30), que polas súas características espectrofotométricas (λ_{\max} 293,5 nm) e cromatográficas (nestas novas condicións cromatográficas presenta un tempo de retención de 4 min) entendemos débese corresponder co pico 4 da táboa 9. Como xa indicamos naquela táboa, o seu máximo en UV-vis en DAD e o tempo de retención fan pensar que se trata dun derivado benzoico; en calquera caso, nin por bibliografía nin mediante a comparación dos nosos resultados cos obtidos con patróns comerciais analizados en HPLC-DAD nas mesmas condicións de fluxo e gradiente cromatográfico, fomos quen de atopar algunha correspondencia entre algún derivado benzoico e o composto descoñecido.

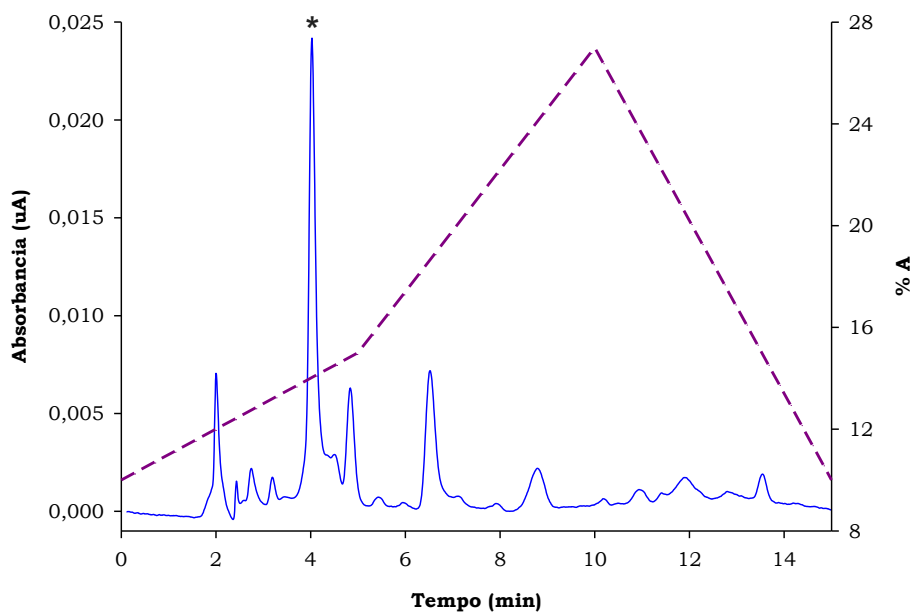


Figura 30. Cromatograma da fracción F2 adquirido a 280 nm.

Na táboa 13 e na figura 31 amósanse os resultados acadados no espectrofotómetro, tanto en metanol (λ_{\max} 288 nm) como en presenza de cloruro de aluminio (λ_{\max} 295, 305 nm) e de cloruro de aluminio/ácido clorhídrico (λ_{\max} 287 nm), que nos fan pensar na posibilidade de que se poida tratar dun derivado glicosilado dalgún ácido hidroxicinámico, ou outro grupo

de compostos fenólicos que teñan características cromatográficas e espectrais semellantes ás destes últimos compostos.

Táboa 13. Características espectrais do composto descoñecido e dos patróns de referencia.

Compostos	λ_{max}			
	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	+HCl
Desc (t _R =4 min)	293,5	288	295; 305	287
3-OH-benzoico	295,8	300	242; 305	305
2-OH-benzoico	301,8	305	314	306
4-gluc <i>p</i> -coumárico	296,2	287	297; 306	287
4- <i>p</i> -coumaroilglucosa	298 ; 312,9	298 ; 312	283 ; 312	275 ; 312
4-gluc do cafeico	295,7	288; 320	288; 320	288; 320
3- <i>p</i> -coumaroil-glucosa	284,4	294 ; 313	294 ; 313	294 ; 313

En negraína móstranse os ombros

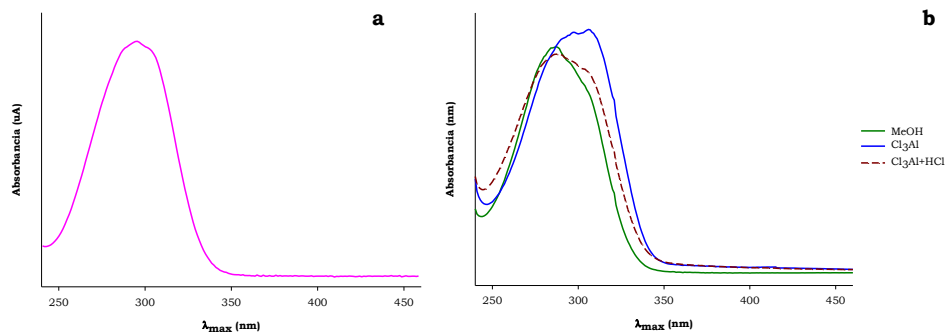


Figura 31. Características espectrais do composto descoñecido en DAD (a) e en MeOH e con modificadores do espectro (b).

É sabido que nos froitos os derivados glicosilados dos ácidos hidroxicinámicos poden estar presentes ben coma ésteres –nos que o azucre está unido ao grupo ácido do derivado fenólico- ou ben en forma de glicósidos, nos que o azucre está unido no anel aromático, e que, de acordo con Reschke e Herrmann (1981) e Ibrahim e Barron (1989), a glicosilación dos grupos hidroxilo en posición 4 dos ácidos hidroxicinámicos provoca unha importante modificación hipsocrómica do seu máximo de absorción en UV-vis con respecto ao correspondente á molécula libre e ao dos seus respectivos ésteres (de 310 a 315 nm para os ésteres do *p*-coumárico, 320-325 nm para os do ferúlico e 330-335 para os do cafeico), circunstancia que concorre no caso que nos ocupa. Tendo en conta esta posibilidade, analizamos nas mesmas condicións cromatográficas de

HPLC-DAD e en UV-vis cos mesmos axentes modificadores de espectros distintos patróns de glicósidos de ácidos hidroxicinámicos, observando unha grande similitude entre o comportamento do composto recollido nesta fracción e o do patrón do 4-O- β -D-glucósido do ácido *p*-coumárico, facilitado polo Dr. J. Méndez do IIAG (CSIC, Santiago de Compostela).

Fracción 3.- Nesta fracción puidemos recoller un total de catro picos, que presentan uns tempos de retención de 4,2, 5,0, 5,6 e 6,7 min (figura 32) e as características espectrais que aparecen recollidas na táboa 14 e na figura 33.

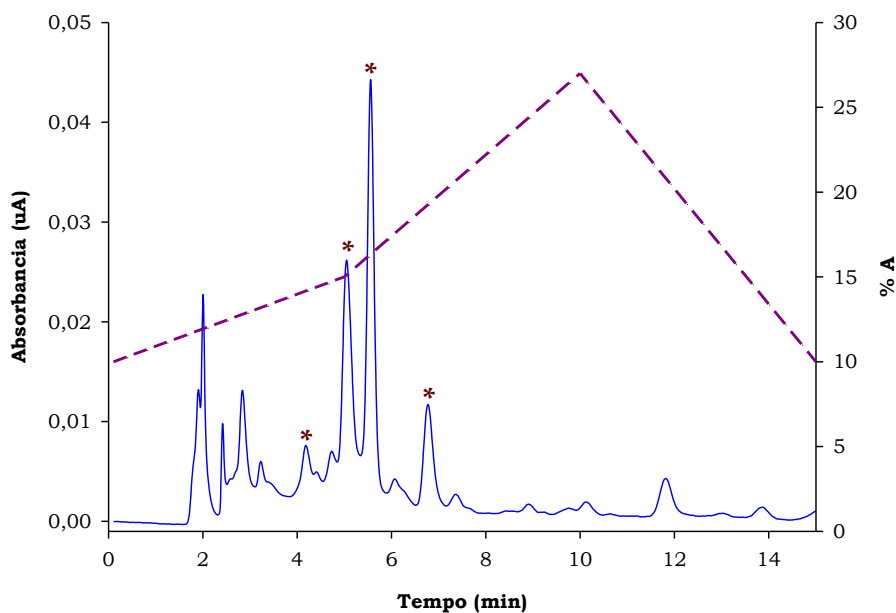


Figura 32. Cromatograma da fracción F3 adquirido a 280 nm.

En función das características espectrais, os compostos recollidos poderían corresponderse con tres derivados benzoicos e, no caso do que presenta un tempo de retención máis alto, cun hidroxicinámico probabelmente derivado do ferúlico ou do caféico e que se corresponde co pico 5 da táboa 9, xa que os derivados do sinápico (que presentan tamén un máximo de absorbancia en 327 nm) nas nosas condicións cromatográficas permanecerían retidos na columna durante máis tempo. Con seguridade, o composto de tempo de retención 4,2

min e dous máximos de absorbancia en 255,6 e 292,3 nm é o mesmo que temos asignado como pico 2 na táboa 9. Os seus espectros neutro (λ_{\max} 260, 294 nm) e en presenza de cloruro de aluminio (λ_{\max} 278, 314 nm), e o desprazamento hipsocrómico deste último tras a adición de ácido clorhídrico (λ_{\max} 258, 294 nm), coinciden con aqueles acadados nas mesmas condicións para o patrón comercial do ácido protocatéuico.

Táboa 14. Características espectrais dos compostos descoñecidos e dos patróns de referencia.

Compostos	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	λ_{\max}			
				+HCl	NaOMe NaOH	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 (t _R =4,2 min)	255,6 292,3	260 294	278 314	258 294	275 303	-	-
Desc 2 (t _R =5,0 min)	255,6 303	259 321	d	-	d	-	-
Desc 3 (t _R =5,6 min)	260,4 296	262	298	294	280	-	-
Desc 4 (t _R =6,7 min)	298 327,9	298 329	261 312 361	306 330	270 377	256 304 351	256 304 351
Protocatéuico	259,2 293,5	261 296	267 309	261 296	277 301	-	-
tri-OH-benzoico	265,1 300	265 302	293	286 320	278 350	-	-
di-OH-benzald	279,3 310,1	283 316	248 295 340	281 313	248 293 350	-	-
Cafeico	297 323,5	292 320	303 338	299 329	257 300 345	294 324	303 338
Ferúlico	295 322	294 321	299 328	295 325	296 326	288 313	288 313
<i>t</i> -caftárico	300 329	297 330	297 360	297 330	270 376	305 350	257 305 350
<i>t</i> -fertárico	298 327	298 325	298 327	298 327	269 375	298 330	298 330

En negra mostráanse os ombros; en cor azul os valores de absorbancia con NaOH; d= inestábel

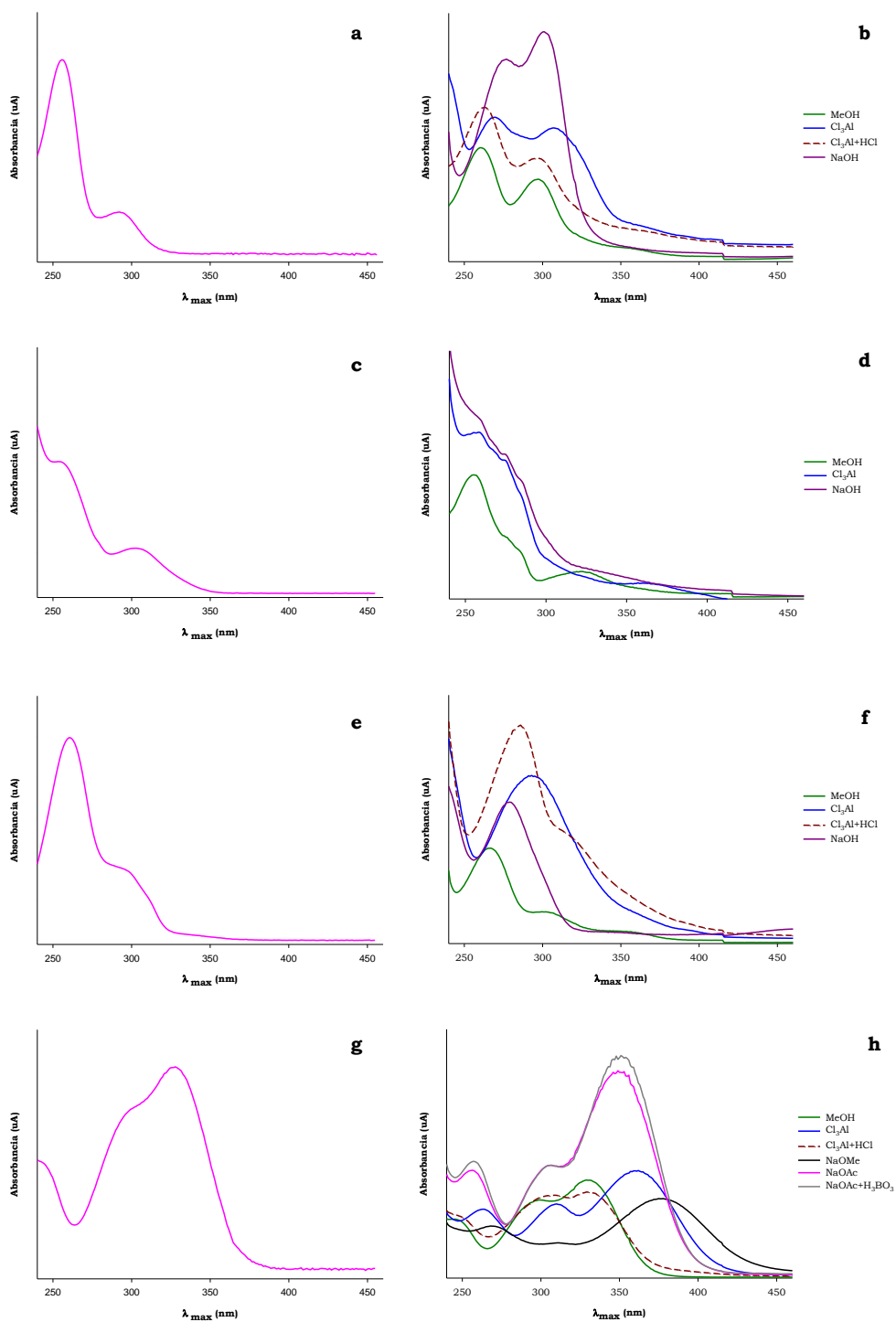


Figura 33. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c, e, g) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d, f, h).

Polo que fai ao composto de tempo de retención 5,0 min e máximos de absorbancia en 255,6 e 303 nm, dicir que non foi posíbel obter máis datos espectrofotométricos que os correspondentes ao seu espectro en metanol (λ_{\max} 259, 321 nm), xa que tanto a adición de cloruro de aluminio como a de hidróxido sódico deu lugar a espectros inestábeis que entendemos indican a descomposición do composto.

O composto de tempo de retención 5,6 min e máximos de absorbancia en 260,4 e 296 nm, unha vez recollido deu un espectro UV-vis pouco definido en metanol, cun único máximo a 262 nm que sofre un desprazamento batocrómico ata 298 nm cando se engade cloruro de aluminio, máximo que se despraza lixeiramente ao engadir ácido clorhídrico (λ_{\max} 294 nm) e que presenta un máximo a 280 nm cando se engade hidróxido sódico; o tempo de retención e o máximo de absorbancia en DAD fannos pensar que se poida tratar do composto asignado como pico 3 na táboa 9.

Por último, o hidroxicinámico de tempo de retención 6,7 min ten un comportamento espectrofotométrico semellante ao do ácido *trans*-caftárico patrón, por máis que non se poida tratar deste composto; en efecto, o *trans*-caftárico cun tempo de retención de 17,5 min nas condicións cromatográficas nas que se recolleron as fraccións, non podería aparecer nesta fracción que, recordaremos, está comprendida entre 11,7 e 13,7 min. De acordo coa bibliografía (Baranowski e Nagel, 1981), o isómero *cis*- deste éster tartárico ten un tempo de retención menor ao da forma *trans*-, o que nos fai pensar que poidamos estar en presenza do ácido *cis*-caftárico.

Fracción 4.- Ao recromatografiar nas novas condicións a fracción recollida entre os minutos 14,6 e 16,3, atopámonos coa presenza de tres picos (figura 34) dos que o maioritario –que se corresponde co único pico existente na fracción 5, na que discutiremos sobre a súa natureza- dificultou a recollida dos outros picos de interese. En efecto, sepáranse nesta fracción un pico cun tempo de retención de 4,6 min e un espectro de absorbancia cun máximo en 322 nm e

un ombro en 300 nm, sen dúbida un derivado hidroxicinámico que podería corresponderse co pico 6 da táboa 9, e outro no minuto 4,9 que presenta dous máximos de absorbancia a 259,2 e 293,5 nm e que podería ser un derivado benzoico; ámbolos dous picos presentan moita menor absorbancia que o pico de tempo de retención 5,4 min (λ_{\max} 302sh, 327 nm).

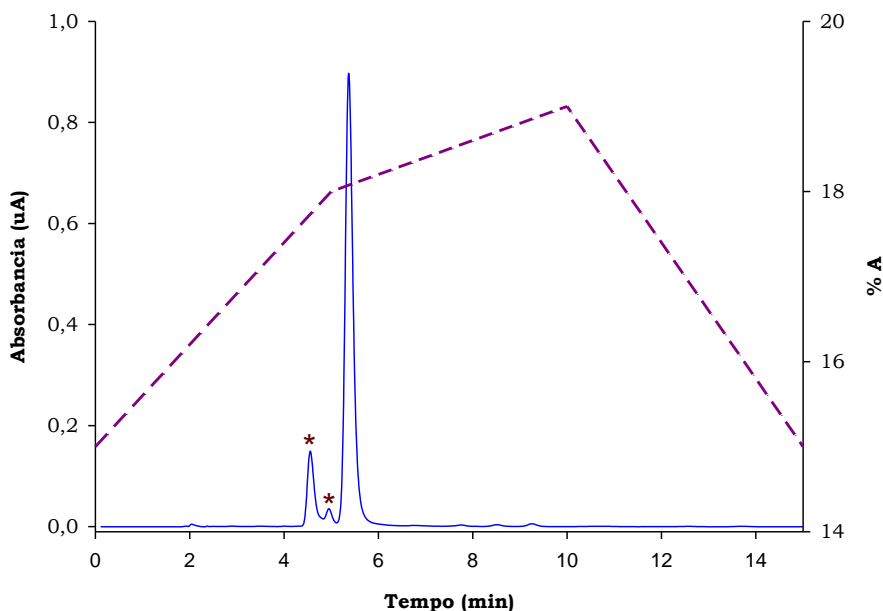


Figura 34. Cromatograma da fracción F4 adquirido a 280 nm.

Táboa 15. Características espectrais dos compostos descoñecidos.

Compostos	λ_{\max}	
	DAD	MeOH
Desc 1 ($t_R=4,6$ min)	300 ; 322	298 ; 327
Desc 2 ($t_R=4,9$ min)	259,2; 293,5	298 ; 327
Desc 3 ($t_R=5,4$ min)	302; 327	298 ; 327

En negraña móstranse os ombros

A dificultade de conseguir unha mellor resolución para estes dous picos xunto coa enorme diferenza en concentración existente entre eles e o pico que consideramos aquí contaminante, impediu recollelos por separado; de feito, ao realizar o espectro en metanol, todos eles presentan un único máximo de

absorbancia a 327 nm e un ombro a 298 nm, uns espectros que realmente entendemos correspóndense co do pico maioritario. Na táboa 15 e na figura 35 amósanse as características espectrais destes compostos.

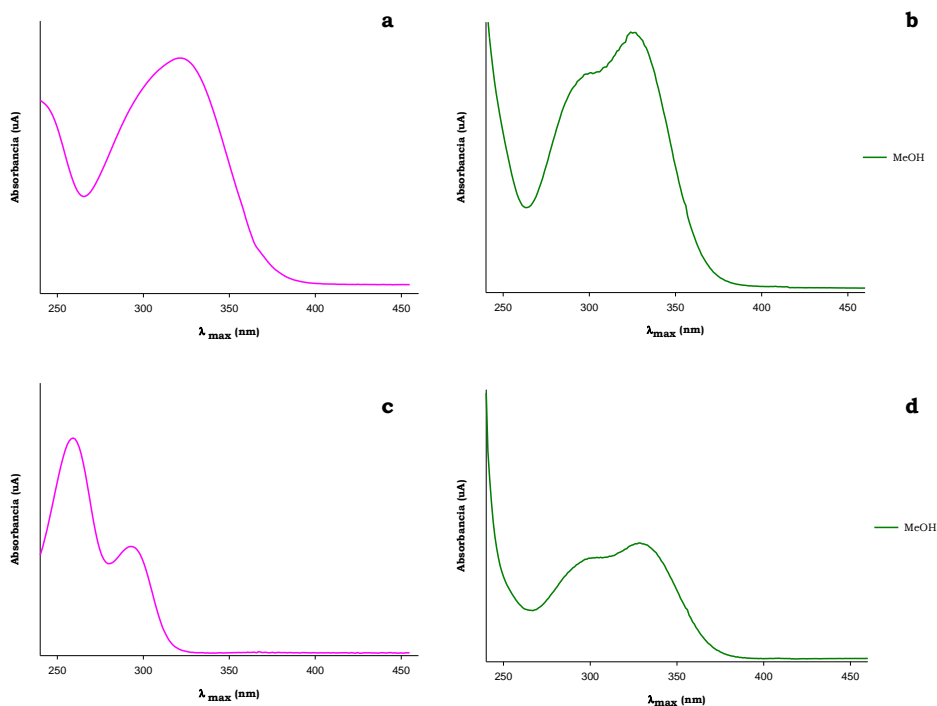


Figura 35. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c) e en MeOH (b, d).

Fracción 5.- Nesta fracción recolleemos un só pico, que presenta un máximo de absorbancia a 326,7 nm e un ombro a 298 nm que nas novas condicións cromatográficas ten un tempo de retención de 4,5 min (figura 36); trátase do pico ao que fixemos alusión ao falar da fracción anterior e que polo seu tempo de retención e o seu espectro en DAD, consideramos se corresponde co pico 8 da táboa 9. Ao comparar estes resultados cos existentes na bibliografía (Baranowski e Nagel, 1981) puidemos observar que coinciden cos do ácido *trans*-caftárico. As análises en espectrofotometría UV-vis en MeOH e con diferentes axentes modificadores do espectro (táboa 16 e figura 37) confirman que, en efecto, pódese tratar deste derivado hidroxicinámico, xa que o seu comportamento coincide co do *trans*-caftárico patrón.

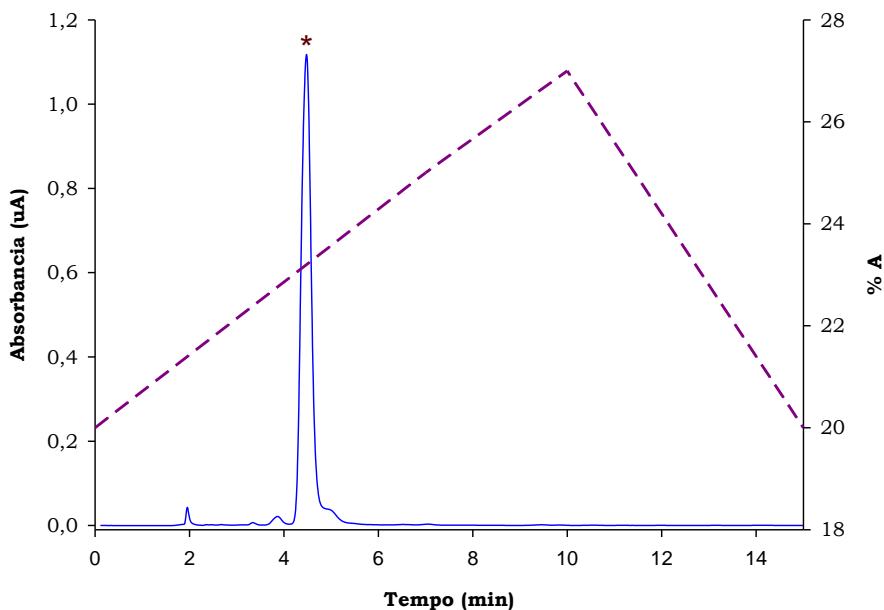


Figura 36. Cromatograma da fracción F5 adquirido a 280 nm.

Táboa 16. Características espectrais do composto descoñecido e dos patróns de referencia.

Compostos	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	λ_{max}			
				+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 ($t_R=4,5$ min)	298	300	300	300	269	301	257
	326,7	333	333	333	378	331	302 350
Cafeico	297	292	303	299	257	294	303
	323,5	320	338	329	300 345	324	338
Ferúlico	295	294	299	295	296	288	288
	322	321	328	325	326	313	313
<i>t</i> -caftárico	300	297	297	297	270	305	257
	329	330	360	330	376	350	305 350
<i>t</i> -fertárico	298	298	298	298	269	298	298
	327	325	327	327	375	330	330

En negraña móstranse os ombros

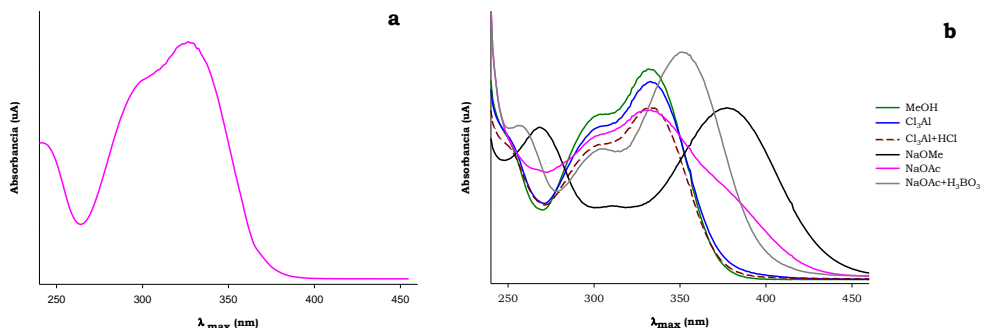


Figura 37. Características espectrais do composto descoñecido en DAD (a) e en MeOH e con modificadores do espectro (b).

Fracción 6.- Tras a nova separación en HPLC desta fracción (figura 38), observamos a presenza de catro picos, con tempos de retención de 4,6, 6,1, 6,9 e 8,0 min respectivamente, podendo afirmar que, polas súas características espectrofotométricas, cun ombro en 298 nm e un máximo en 326,7 nm, o primeiro deles correspóndese co derivado hidroxicinámico recollido xa na fracción anterior; indicar tamén que non fomos quen de recoller o composto de tempo de retención 8,0 min sen contaminación do pico inmediatamente anterior, polo que nesta fracción só imos considerar os picos de tempo de retención 6,1 e 6,9 min (os picos 9 e 10 da táboa 9), que en ámbolos dous casos presentan un máximo de absorbancia a 279,3 nm, que a priori evidencian que estamos en presenza de flavan-3-ois e/ou derivados benzoicos (alcohois vanílicos e/ou isovanílicos). Tal e como se pode observar na táboa 17 e na figura 39, as análises espectrofotométricas con axentes modificadores do espectro parecen indicar que se trata realmente de flavan-3-ois. En efecto, o desprazamento batocrómico de 10 nm que se produce ao engadirlle acetato sódico/ácido bórico –que non se dá no caso dos derivados benzoicos– confirma este suposto e coincide co observado para o patrón comercial da (+)-catequina. Esta é a razón que nos levou a non analizar a modificación do espectro con hidróxido sódico, como facemos no caso dos derivados benzoicos. En calquera caso, debemos deixar claro que ningún destes compostos pode ser a (+)-catequina, que –tal e como puidemos observar no noso laboratorio– nestas condicións cromatográficas presenta un tempo de retención máis alto. Con

moita probabilidade podemos estar diante de dúas procianidinas que, sábese, existen nos froitos da videira (Macheix e col., 1990) e das que non dispoñemos de patróns comerciais nin temos atopado referencias bibliográficas que inclúan datos sobre o seu comportamento espectrofotométrico en presenza de axentes modificadores do espectro.

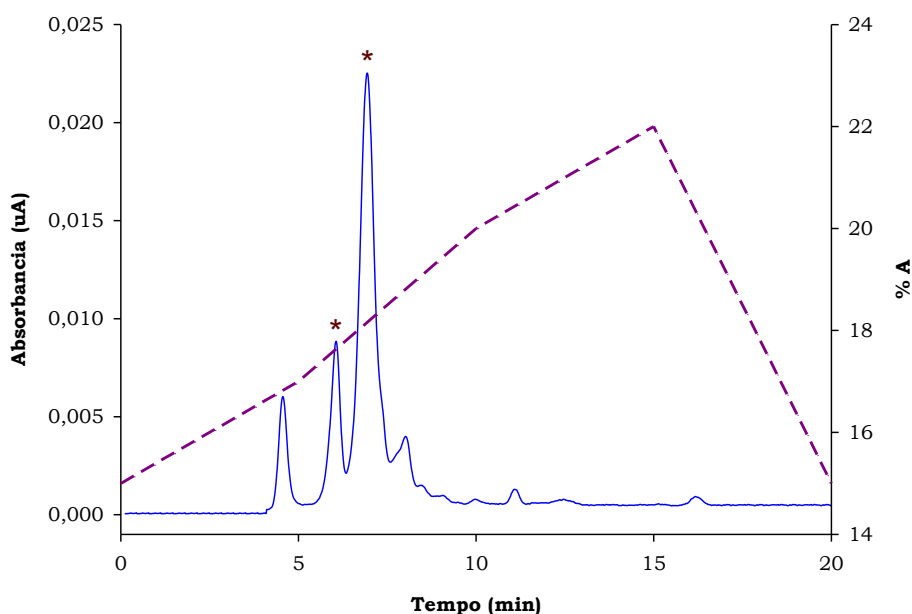


Figura 38. Cromatograma da fracción F6 adquirido a 280 nm.

Táboa 17. Características espectrais dos compostos descoñecidos e dos patróns de referencia.

Compostos	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	λ_{\max}			
				+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 (t _R =6,1 min)	279,3	279	279	278	246; 294	280	288
Desc 2 (t _R =6,9min)	279,3	279	279	278	249; 290	280	287
Alc. vanillico	278,1	280	280	280	251; 294	280	280
Alc. isovanillico	278,1	280	280	280	246; 295	280	280
(+)-catequina	279,3	279	280	279	247; 289	280	290

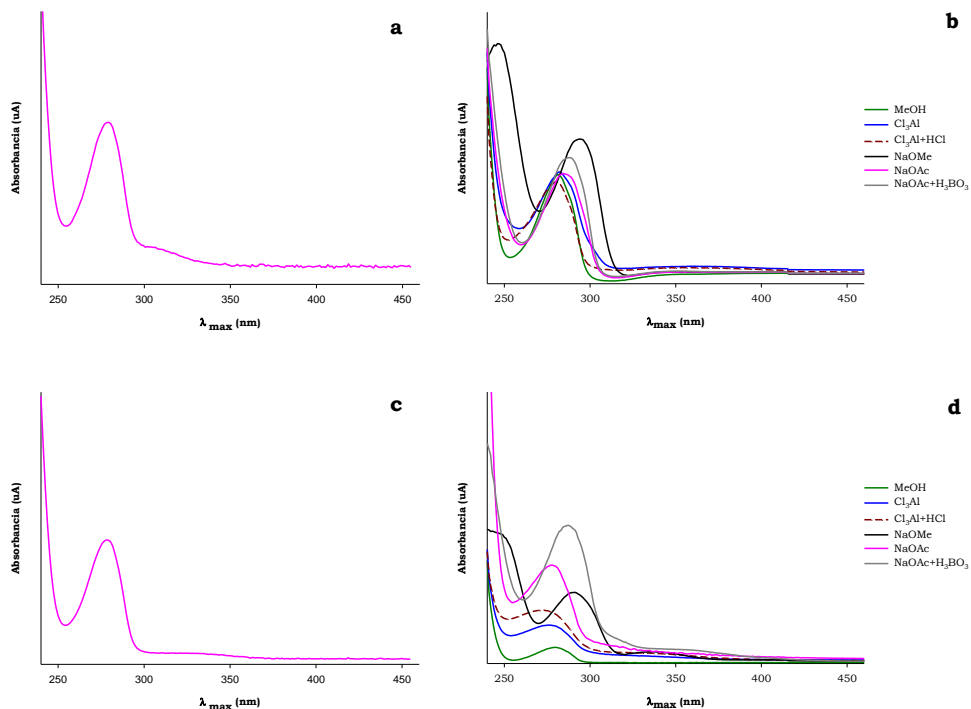


Figura 39. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d).

Fracción 7.- O único pico que aparece ben resolto nesta fracción (figura 40) presenta un tempo de retención de 6,9 min e un espectro UV-vis cun máximo en 279,3 nm (táboa 18 e figura 41), polo que –tal e como dixemos na fracción anterior– podería tratarse dun flavan-3-ol ou, alternativamente, de algún derivado benzoico. En calquera caso, hai que facer constar que unha vez recollido este composto, só puidemos observar que o seu máximo en metanol (en 279 nm) non se modificaba nin en presenza de cloruro de aluminio nin en presenza de cloruro de aluminio/ácido clorhídrico e que, tanto a adición de metóxido sódico coma a de hidróxido sódico ou acetato sódico, provocaba a súa descomposición; non foi posíbel, xa que logo, adiantar máis nada acerca da súa identidade.

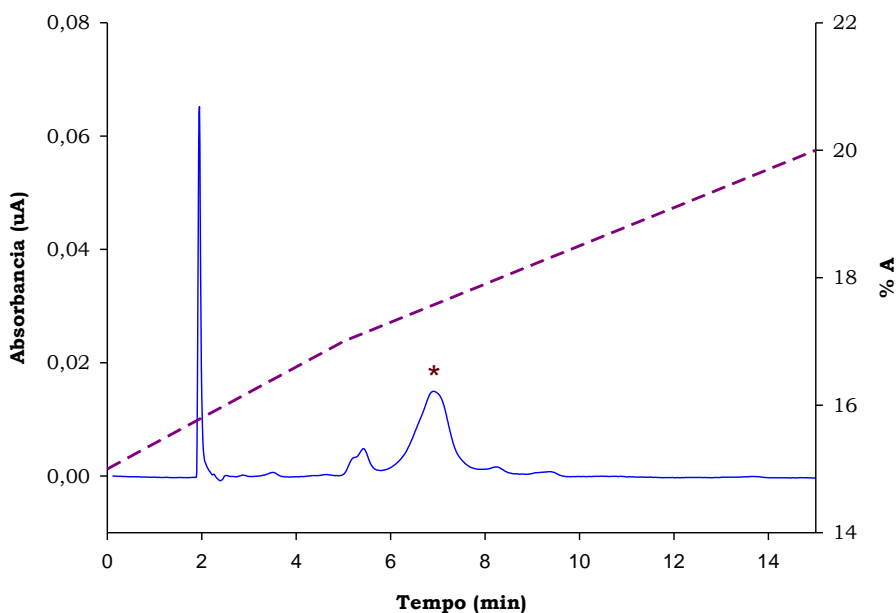


Figura 40. Cromatograma da fracción F7 adquirido a 280 nm.

Táboa 18. Características espectrais do composto descoñecido e dos patróns de referencia.

Compostos	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	λ_{max}			
				+HCl	NaOMe NaOH	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc (t _R =6,9 min)	279,3	279	279	278	d/d	d	-
Alc. vanílico	278,1	280	280	280	251; 294	280	280
Alc. isovanílico	278,1	280	280	280	246; 295	280	280
(+)-catequina	279,3	279	280	279	247; 289	280	290

En cor azul os valores de absorbancia con NaOH; d= inestábel

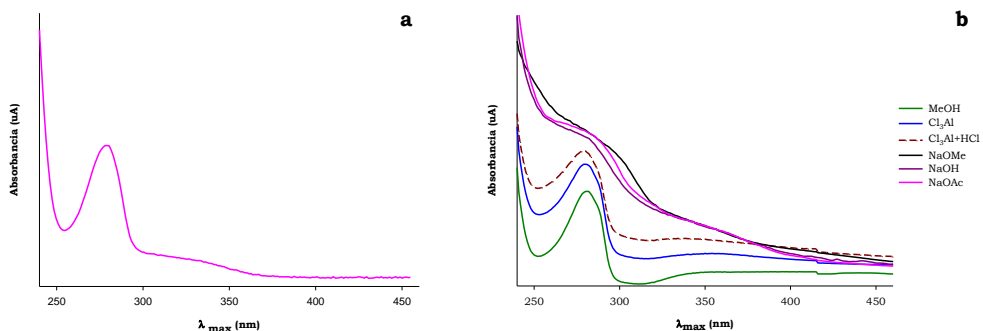


Figura 41. Características espectrais do composto descoñecido en DAD (a) e en MeOH e con modificadores do espectro (b).

Fracción 8.- Tal e como se pode ver na figura 27, esta fracción contiña un mínimo de tres compostos, que naquelas condicións cromatográficas resolvíanse mal. Unha vez modificado o gradiente (figura 42) conseguiuase unha separación que permite a resolución de tres compostos con tempos de retención de 7,7 min (λ_{\max} 298sh, 308,9 nm), 8,5 min (λ_{\max} 299sh, 312,4 nm), e 9,2 min (λ_{\max} 278,1 nm), que fan pensar que estamos diante de dous hidroxicinámicos derivados do ácido *p*-coumárico (que se corresponden cos picos 12 e 14 da táboa 9) e un flavan-3-ol ou derivado benzoico (correspondente ao pico 11 da táboa 9). Os espectros obtidos en metanol para os supostos hidroxicinámicos coinciden cos proporcionados por Baranowski e Nagel (1981) para estes derivados e, como se pode observar na táboa 19 e figura 43, as análises espectrofotométricas con axentes modificadores do espectro semellan confirmar que se trata dos isómeros *cis* e *trans* do éster tartárico do ácido *p*-coumárico (*cis* e *trans*-coutárico, respectivamente).

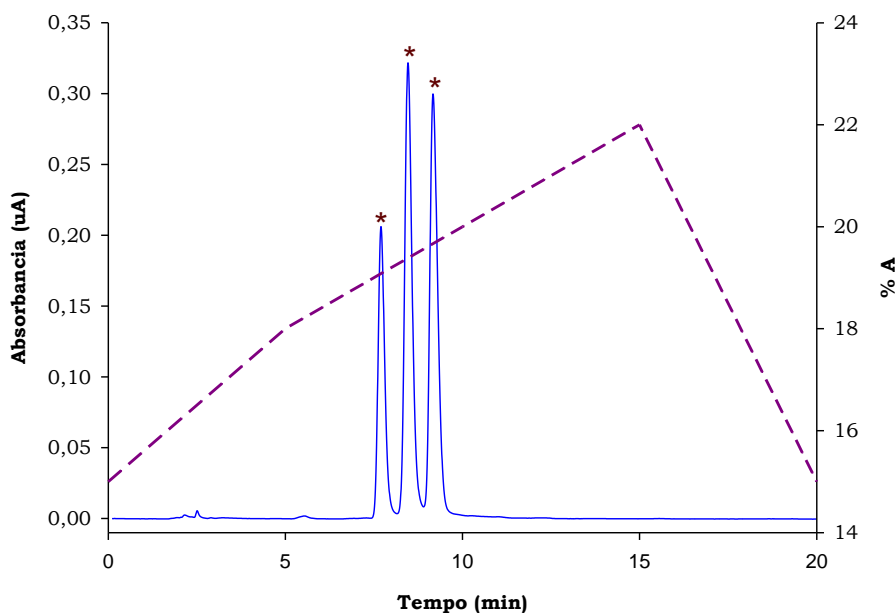


Figura 42. Cromatograma da fracción F8 adquirido a 280 nm.

Polo que fai ao terceiro composto, todo indica que se trata da (+)-catequina, pois o comportamento experimentado cos distintos axentes modificadores do espectro e o tempo de retención coinciden cos do patrón comercial. A existencia dun desprazamento batocrómico de arredor de 10 nm ao engadir acetato sódico/ácido bórico fixo innecesario realizar o espectro en presenza de hidróxido sódico, tal e como indicamos ao tratar da fracción 6. O máximo de absorbancia a 338 nm, que se produce no composto descoñecido cando se pon en presenza de metóxido sódico e que non se observa no caso do patrón, moi ben puidera deberse a unha posíbel contaminación do composto en cuestión.

Táboa 19. Características espectrais dos compostos descoñecidos e dos patróns de referencia.

Compostos	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	λ_{\max}			
				+HCl	NaOMe NaOH	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 ($t_R=7,7$ min)	298 308,9	286 313	278 316	268 314	276 356	285 315	285 315
Desc 2 ($t_R=8,5$ min)	299 312,4	298 314	298 315	300 315	312 360	300 315	298 315
Desc 3 ($t_R=9,2$ min)	278,1	280	281	281	250 291 338?	279	288
Alc. vaníllico	278,1	280	280	280	251 292	280	280
Alc. isovaníllico	278,1	280	280	280	245 290	280	280
(+)-catequina	279,3	279	280	279	247 289	280	290
<i>p</i> -coumárico	298 308,9	298 310	302 315	300 312	309 335	288 314	288 314
<i>t</i> -coutárico	298 313,6	300 314	300 315	302 315	312 360	298 315	298 315

En negra mostráanse os ombros; en cor azul os valores de absorbancia con NaOH

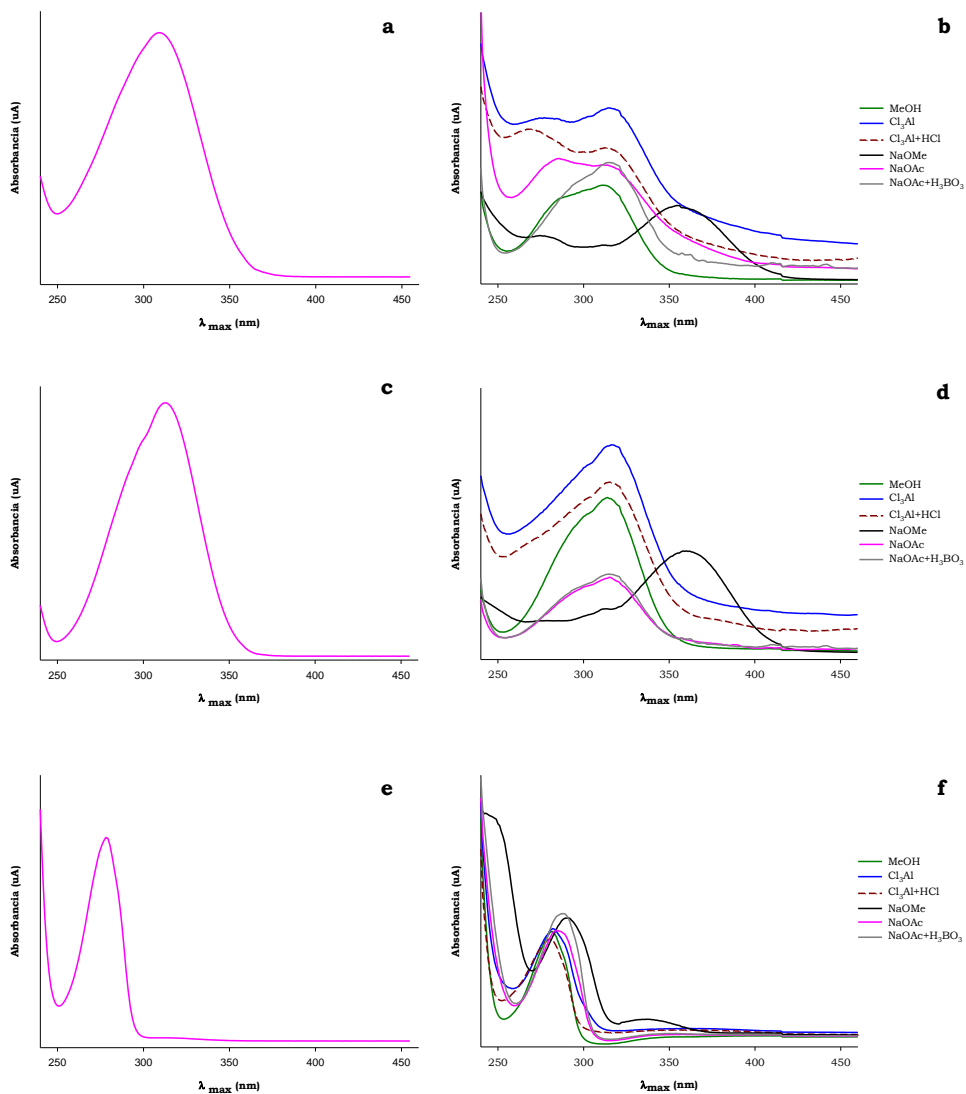


Figura 43. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c, e) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d, f).

Fracción 9.- Pretendíamos separar e recoller nesta fracción o composto que cun espectro de absorbancia con dous máximos a 274,5 e 280,4 nm e un tempo de retención de 25,3 min (figura 27) corresponde ao pico 13 da táboa 9, que naquelas condicións cromatográficas coeluía en gran medida co pico anterior, e que agora, como se pode observar na figura 44 foi posíbel recoller.

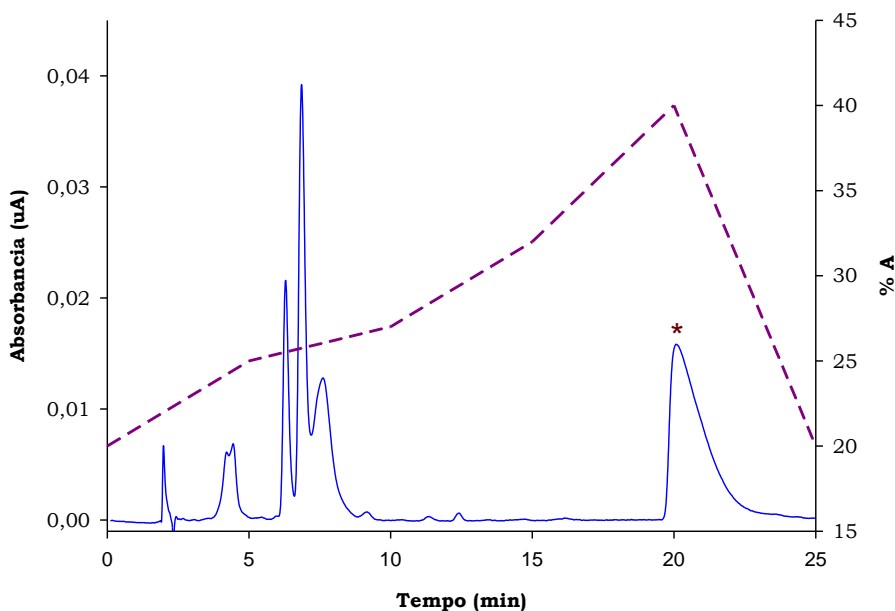


Figura 44. Cromatograma da fracción F9 adquirido a 280 nm.

Táboa 20. Características espectrais do composto descoñecido.

Composto	DAD	λ_{max}		
		MeOH	Cl ₃ Al	+HCl
Desc (t _R =20,5 min)	274,5; 280,4	275; 281	272; 281	268; 281

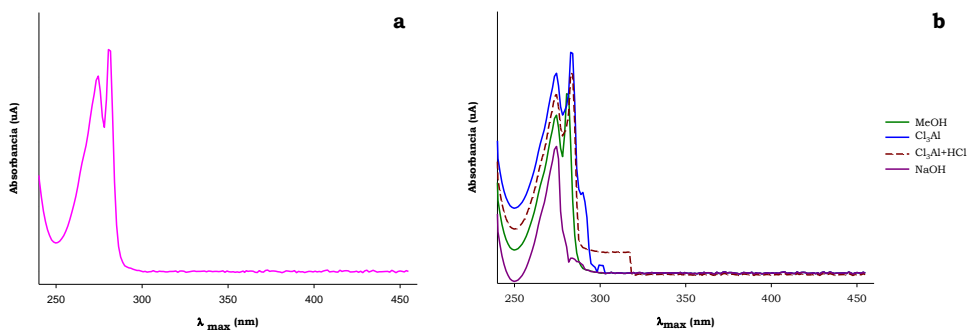


Figura 45. Características espectrais do composto descoñecido en DAD (a) e en MeOH e con modificadores do espectro (b).

Unha vez recollido, o composto foi analizado mediante UV-vis (táboa 20 e figura 45), observando que presenta dous característicos máximos de absorbancia a 275 e 281 nm en metanol, que fan pensar (Harborne, 1989) que se poida tratar

dun fenol simple ou dun derivado benzoico, e que apenas se modifican cando se lle engade cloruro de aluminio (λ_{max} 272, 281 nm) e cloruro de aluminio/ácido clorhídrico (λ_{max} 268, 281 nm); contrariamente, o seu espectro sofre unha importante modificación cando se engade hidróxido sódico. En efecto, a adición deste axente modificador do espectro, provoca a desaparición do máximo de 281 nm, un comportamento espectrofotométrico que non coincide co de ningún dos patróns comerciais dispoñíbeis no noso laboratorio nin cos datos bibliográficos aos que podemos acceder. Non podemos, xa que logo, concretar máis nada acerca da súa identidade.

Fracción 10.- Recolléronse nesta fracción dous compostos de tempos de retención 4,4 e 4,9 min e máximos de absorbancia en DAD de 291,1 e 278,1 nm, respectivamente, que fan pensar nun derivado benzoico e outro que puidera ser un benzoico ou un flavan-3-ol.

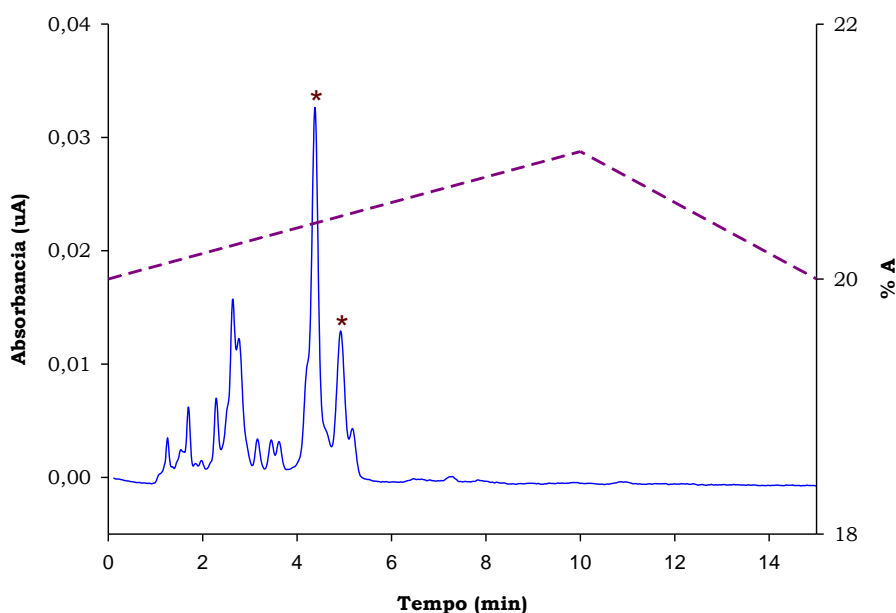


Figura 46. Cromatograma da fracción F10 adquirido a 280 nm.

Non resultou doado conseguir unha boa separación entre ámbolos dous compostos (figura 46), polo que é moi posíbel que en ningún dos casos teñamos recollido os compostos suficientemente puros.

Táboa 21. Características espectrais dos compostos descoñecidos.

Compostos	DAD	MeOH	λ_{max}				
			Cl ₃ Al	+HCl	NaOMe NaOH	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 (t _R =4,5 min)	291,1	280; 312?	d	-	d	d	-
Desc 2 (t _R =4,9 min)	278,1	280	280	280	d/d	280	d
Alc. vanílico	278,1	280	280	280	251;292	280	280
Alc. isovanílico	278,1	280	280	280	245; 290	280	280
(+)-catequina	279,3	279	280	279	247; 289	280	290

En cor azul os valores de absorbancia con NaOH; d= inestábel

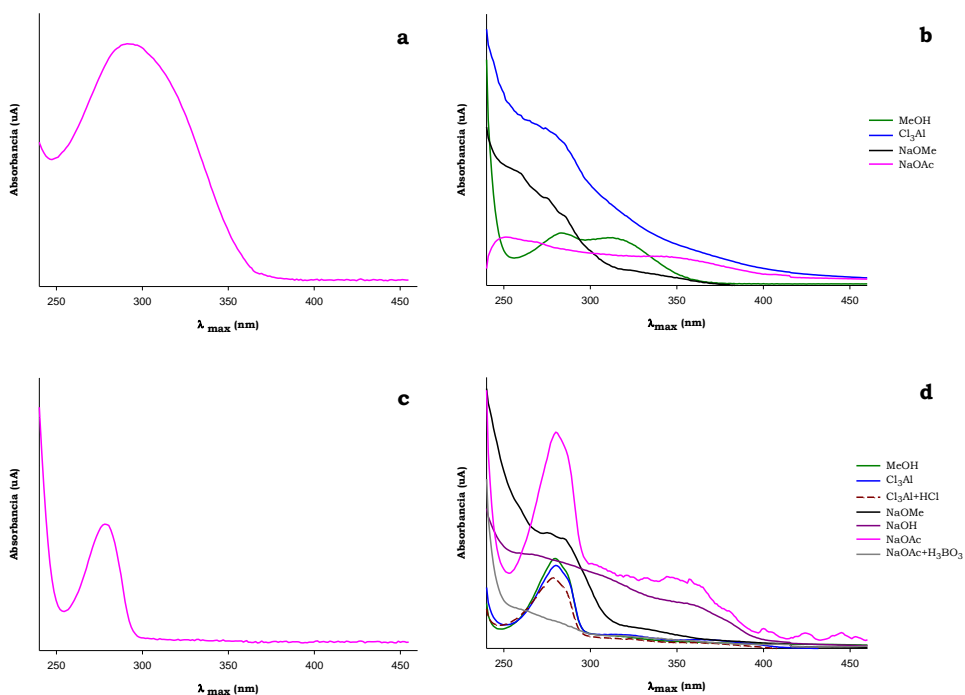


Figura 47. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d).

En calquera caso, o espectro en metanol do composto de tempo de retención máis baixo presenta un máximo de absorbancia en 280 nm e outro posíbel en 312 nm, fronte ao único máximo en DAD (λ_{max} 291,1 nm), o que reforza a idea de que non se trata dun único composto. Polo que fai ao segundo composto, dicir que amosa un máximo en metanol a 280 nm que si coincide co observado en DAD.

En ámbolos dous casos a adición de metóxido sódico provoca a descomposición do composto (táboa 21 e figura 47), descomposición que tamén se produciu para o composto de tempo de retención 4,9 min ao engadirlle hidróxido sódico e acetato sódico/ácido bórico. Para o composto de tempo de retención 4,4 min indicar que se descompuxo tanto con cloruro de aluminio como con acetato sódico. As características espectrofotométricas obtidas para este composto, impiden dicir nada acerca da súa natureza.

O espectro UV-vis en metanol do segundo composto –que non se modifica con cloruro de aluminio nin ao engadirlle ácido clorhídrico- e o feito de que se descompoña en medio alcalino, impiden resolver a dúbida de si se trata dun flavan-3-ol ou dun derivado benzoico (Porter, 1989; Van Sumere, 1989).

Fracción 11.- Neste caso foron tres os compostos recollidos (figura 48): un primeiro con tempo de retención 4,1 min e un único máximo de absorbancia en 279,3 nm que fai pensar (unha vez máis) que se poida tratar dun flavan-3-ol; un segundo que con seguridade é un derivado hidroxicinámico e moi probabelmente, tanto polo seu tempo de retención (4,6 min) como polo seu espectro en DAD (λ_{\max} 300sh, 326,7 nm), un éster tartárico do ácido ferúlico (Baranowski e Nagel, 1981) que podería corresponderse co pico 16 ou 17 da táboa 9; e un terceiro de tempo de retención 5,2 min e un máximo de absorbancia en 276,9 nm, que puidera ser un flavan-3-ol esterificado co ácido gálico. En efecto, estes compostos (Porter, 1989) presentan un máximo de absorbancia en metanol a unha lonxitude de onda menor que no caso dos non esterificados.

Tal e como se pode observar na táboa 22 e na figura 49, as análises espectrofotométricas realizadas para o composto descoñecido 1 non permiten concretar máis que a súa pertenza ao grupo dos flavan-3-ois, e moi probabelmente que se poida tratar dalgunha procianidina, grupo de compostos dos que non dispoñemos de patróns comerciais.

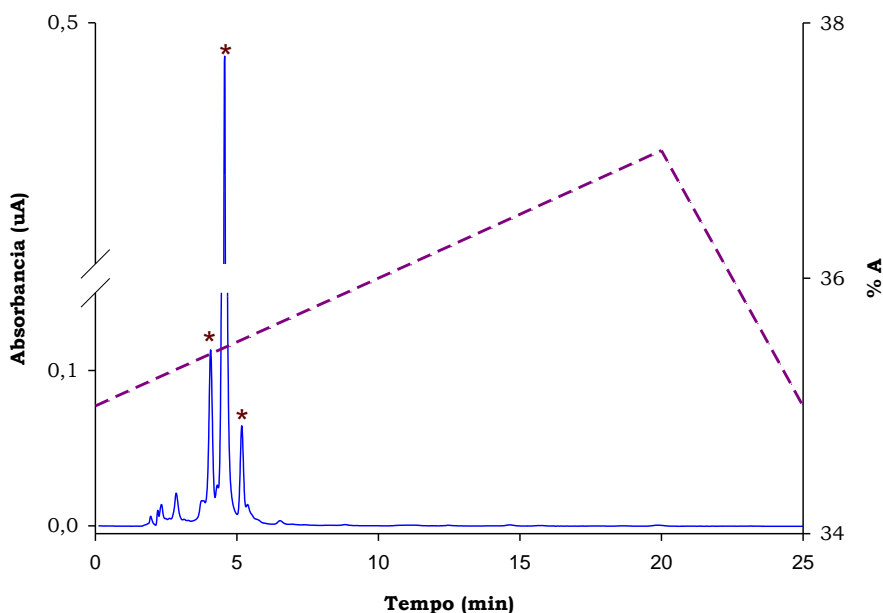


Figura 48. Cromatograma da fracción F11 adquirido a 280 nm.

Táboa 22. Características espectrais dos compostos descoñecidos e patróns de referencia.

Compostos	λ_{\max}						
	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 (t _R =4,1 min)	279,3	280	280	279	243 292	280	288
Desc 2 (t _R =4,6 min)	300 326,7	298 325	299 324	298 325	d	d	-
Desc 3 (t _R =5,2 min)	276,9	294 324	292	280	245 300 322	279 289	292
(-)-epicatequina	278,1	280	281 286	280	249 294	281 288	290
(+)-catequina	279,3	279	280	279	247 289	280	290
(-)-epicatequingalato	276,9	279	293	279	244 301 324	280 288	294
Ferúlico	298 322	299 323	298 326	298 324	304 347	286 310	286 312
t-fertárico	298 327	298 325	298 327	298 327	269 375	298 330	298 330

En negra mostranse os ombros; d= inestábel

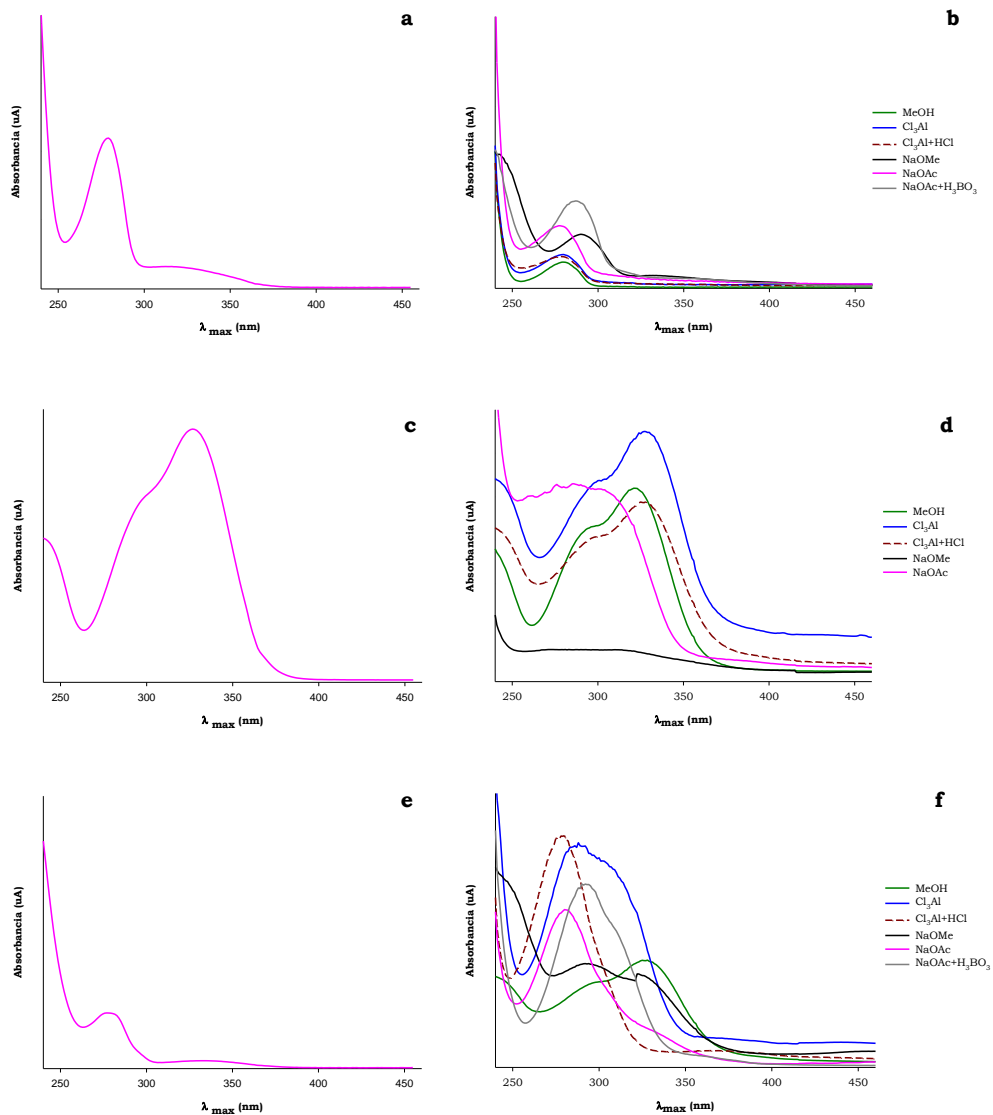


Figura 49. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c, e) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d, f).

No caso do composto descoñecido 2, as análises espectrofotométricas en metanol e tras a adición de cloruro de aluminio e cloruro de aluminio/ácido clorhídrico parecen indicar que estamos en presenza do ácido ferúlico, por máis que o tempo de retención do patrón comercial non coincida co deste composto; puidera tratarse, de acordo con Baranowski e Nagel (1981), dalgún isómero do

éster tartárico do ácido ferúlico (*cis* ou *trans*-fertárico). Como queira que tanto a adición de metóxido sódico coma a de acetato sódico provocaron a aparición de espectros inestábeis, non resultou posíbel obter máis información sobre a natureza deste composto. O terceiro composto presenta un comportamento en UV-vis moi semellante ao do (-)-epicatequíngalato comercial, por máis que o seu espectro en metanol presente un máximo de absorbancia a 324 nm en lugar de a 279 nm. Ao noso entender, esta circunstancia vén dada pola máis que posíbel contaminación co composto anterior, de tempo de retención 4,6 min e absolutamente maioritario fronte ao composto que nos ocupa.

Fracción 12.- O composto de tempo de retención 7,6 min recollido nesta fracción (figura 50), que se corresponde co pico 18 da táboa 9, presenta unhas características cromatográficas e espectrofotométricas en DAD (λ_{\max} 297sh, 323 nm) semellantes ás do patrón comercial do ácido cafeico.

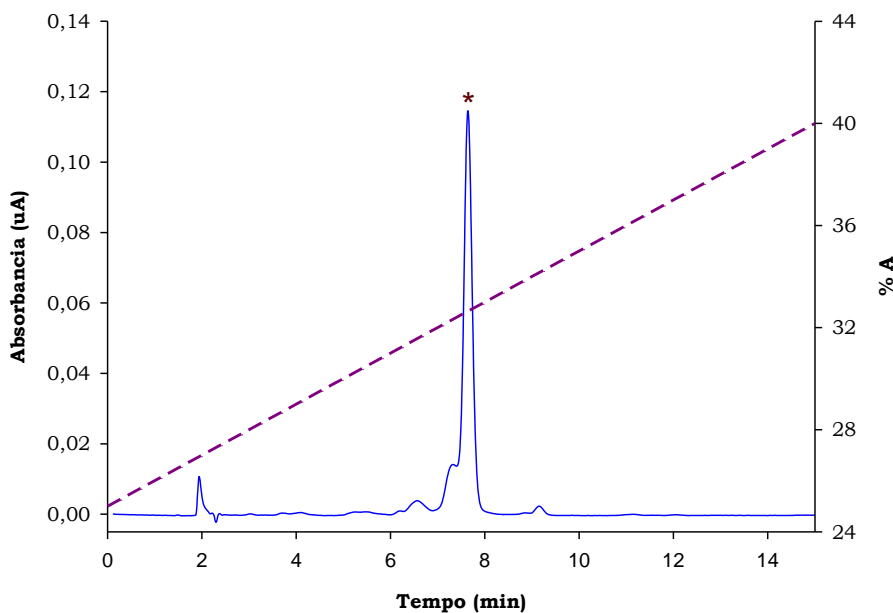


Figura 50. Cromatograma da fracción F12 adquirido a 280 nm.

A realización das análises en UV-vis en metanol (λ_{\max} 289sh, 324 nm), cloruro de aluminio (λ_{\max} 314sh, 361 nm), cloruro de aluminio/ácido clorhídrico (λ_{\max}

249, 325 nm), metóxido sódico (λ_{\max} 248, 302sh, 344 nm), acetato sódico (λ_{\max} 287, 315 nm) e acetato sódico/ácido bórico (λ_{\max} 247, 295sh, 334 nm) permitiu confirmar que, en efecto, se trata deste ácido hidroxicinámico (táboa 23 e figura 51).

Táboa 23. Características espectrais do composto descoñecido e do ácido cafeico comercial.

Compostos	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	λ_{\max}			
				+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc (t _R =7,6 min)	297	289	312	250	303	286	286
	323	324	361	326	345	310	312
Cafeico	298	298	314	249	304	286	286
	323,3	326	361	325	347	310	312

En negraña móstranse os ombros

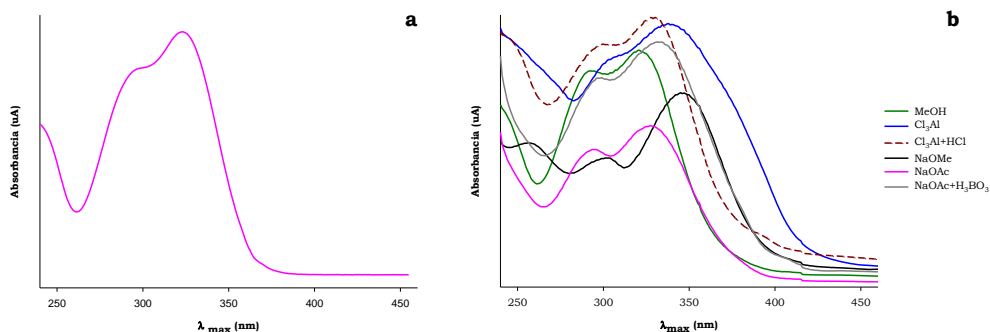


Figura 51. Características espectrais do composto descoñecido en DAD (a) e en MeOH e con modificadores do espectro (b).

Fracción 13.- O composto que pretendiamos recoller nesta fracción (figura 52), que presenta un tempo de retención de 6,1 min e un espectro cun máximo de absorbancia en 329,1 nm e un ombro a 292 nm (figura 53), podería corresponderse con algún derivado hidroxicinámico; porén, e a pesar dos numerosos intentos por conseguir recollelo e analízalo mediante espectrometría UV-vis, non foi posíbel tan sequera obter un espectro en metanol suficientemente estábel, o que imposibilitou calquera análise posterior.

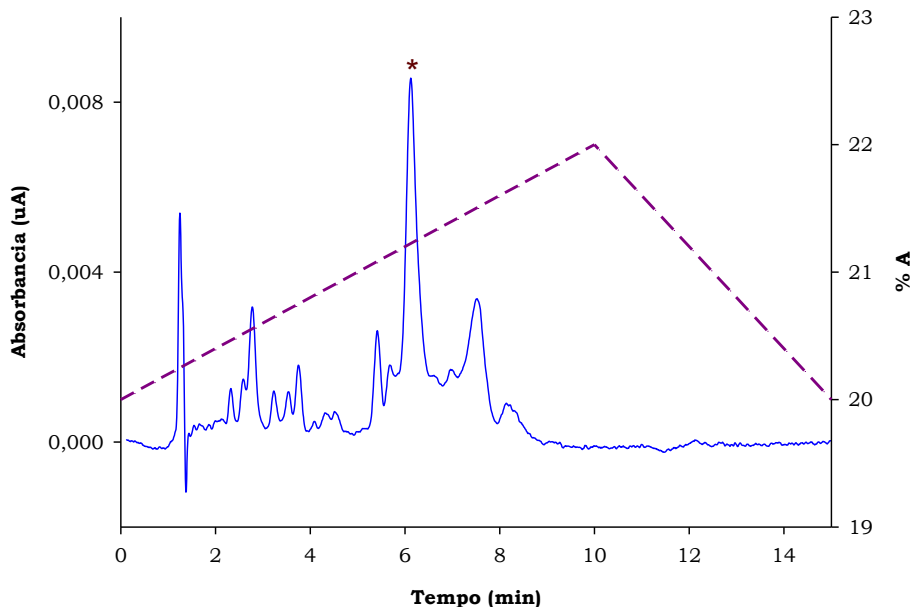


Figura 52. Cromatograma da fracción F13 adquirido a 280 nm.

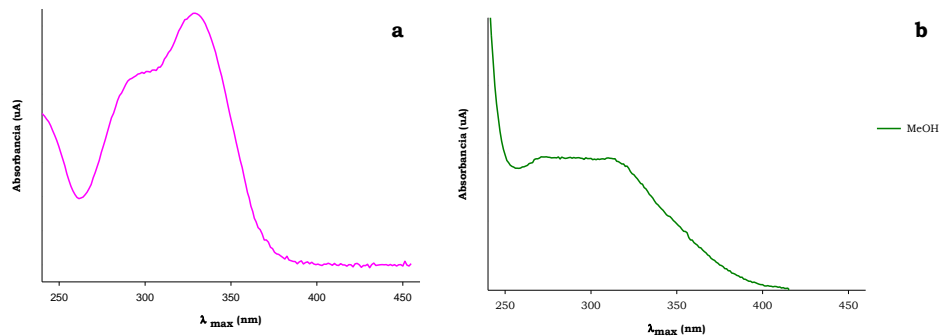


Figura 53. Características espectrais do composto descoñecido en DAD (a) e en MeOH (b).

Fracción 14.- O composto de tempo de retención 8,9 min recollido nesta fracción (figura 54) correspóndese co pico 19 da táboa 9 e presenta unhas características cromatográficas e espectrofotométricas en DAD (λ_{\max} 278,1 nm) semellantes ás do patrón comercial da (-)-epicatequina.

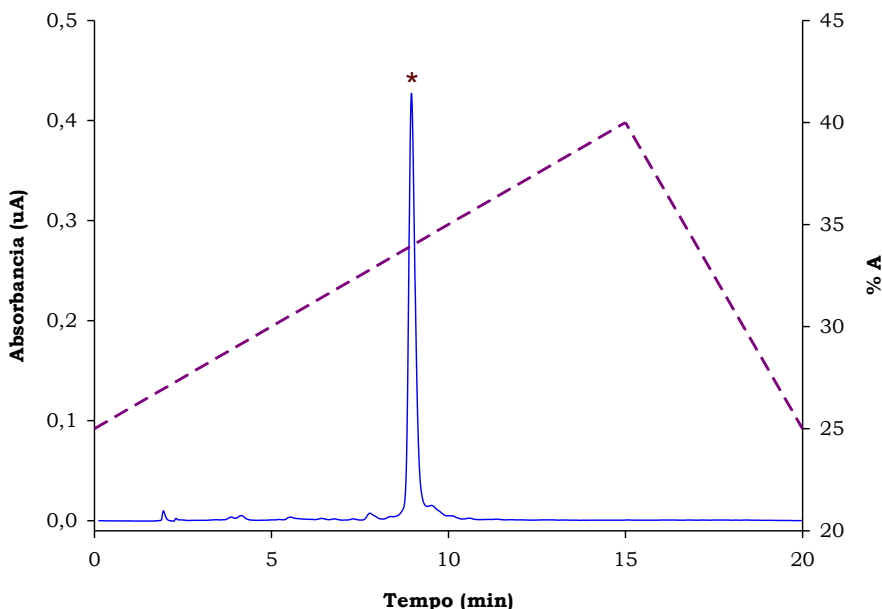


Figura 54. Cromatograma da fracción F14 adquirido a 280 nm.

Táboa 24. Características espectrais do composto descoñecido e do patrón da (-)-epicatequina.

Compostos	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	λ_{\max}			
				+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc (tr=8,9 min)	278,1	278	278	279	248; 295	280 ; 289	290
(-)-epicatequina	788,1	278	278	280	249; 294	281 ; 288	290

En negraña móstranse os ombros

Tal e como se amosa na táboa 24 e na figura 55, as análises en UV-vis en metanol (λ_{\max} 278 nm), cloruro de aluminio (λ_{\max} 278 nm), cloruro de aluminio/ácido clorhídrico (λ_{\max} 280 nm), metóxido sódico (λ_{\max} 249, 294 nm), acetato sódico (λ_{\max} 281sh, 288 nm) e acetato sódico/ácido bórico (λ_{\max} 290 nm) permitiron confirmar que, en efecto, se trata deste flavan-3-ol.

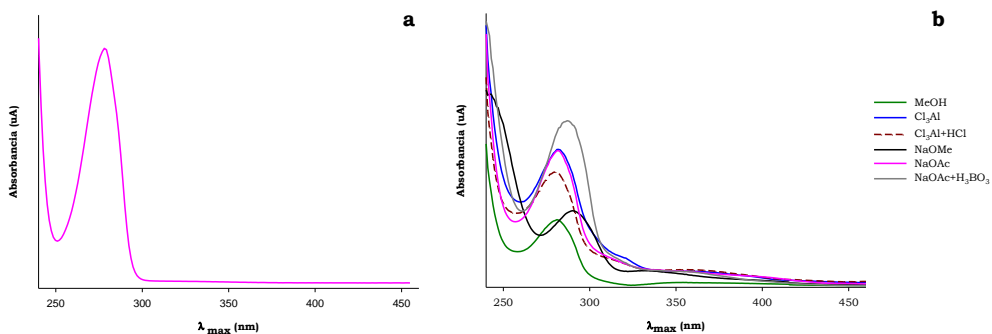


Figura 55. Características espectrais do composto descoñecido en DAD (a) e en MeOH e con modificadores do espectro (b).

Fracción 15 + 16.- Como queira que resultou imposible recoller estas dúas fraccións por separado, decidimos analizalas conxuntamente, coma se dunha soa se tratara.

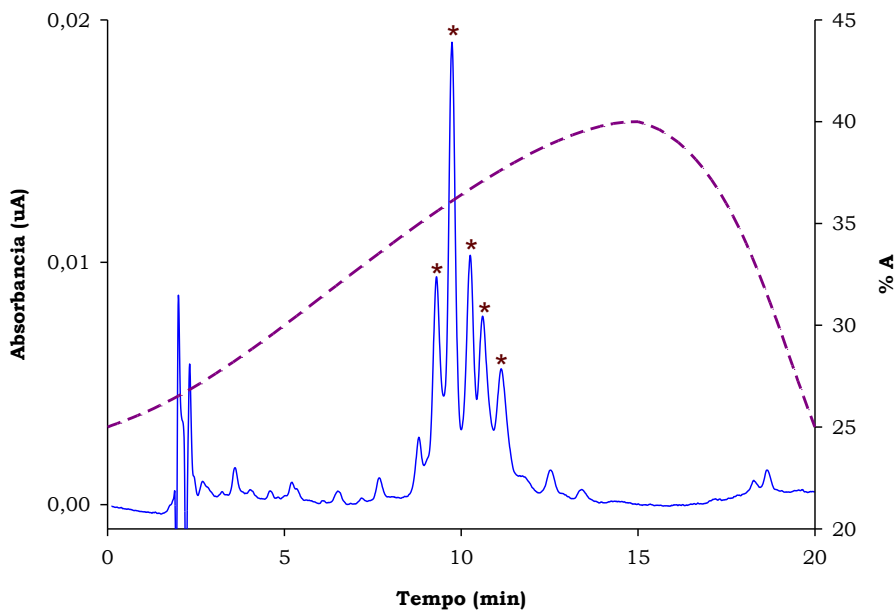


Figura 56. Cromatograma da fracción F15+16 adquirido a 280 nm.

Pretendemos recoller así un total de cinco compostos, que presentan tempos de retención de 9,3, 9,7, 10,2, 10,6 e 11,1 min. Indicar que, por moitos intentos que se fixeron, non foi posíbel conseguir unha mellor separación que a que se

mostra na figura 56, o que fixo practicamente imposible obter todos os compostos coa pureza desexada e a súa posterior análise en UV-vis; de feito só para o segundo composto foi posible obter un espectro en metanol suficientemente claro (λ_{\max} 280 nm).

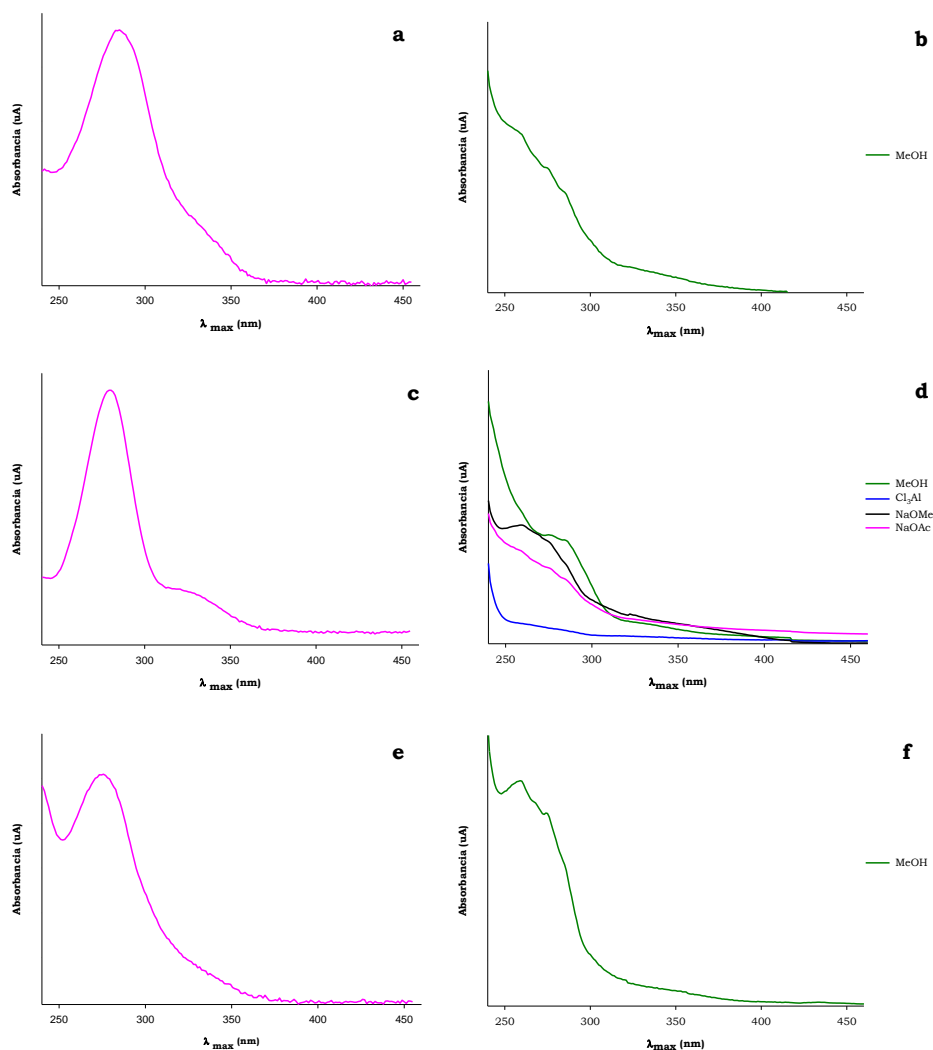


Figura 57. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c, e) e en MeOH e con axentes modificadores (b, d, f).

En función do espectro en DAD e de acordo con Mabry (1969), podemos afirmar que o primeiro composto (figura 57) podería corresponderse cun flavanoide. En

efecto, o seu máximo de absorbancia en 285,2 nm e a presenza dun ombro en 334 nm son moi característicos deste grupo de compostos fenólicos.

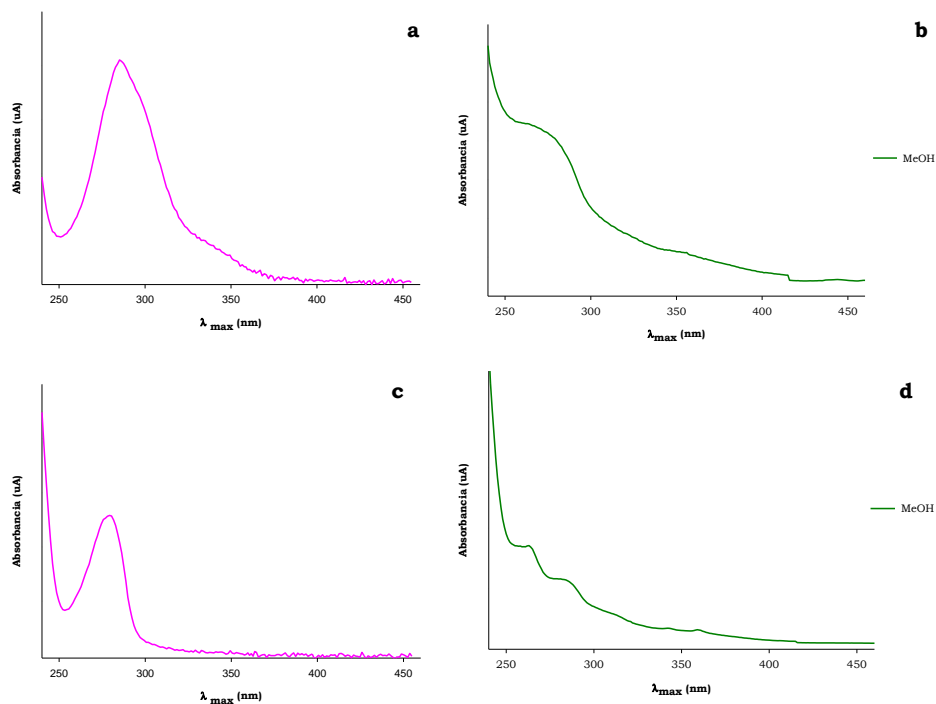


Figura 58. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c) e en MeOH (b, d).

Polo que fai aos picos segundo e quinto (o 21 da táboa 9), que en ámbolos dous casos presentan un máximo de absorbancia en 279,3 nm (figuras 57 e 58, respectivamente), correspóndense probabelmente con dous flavan-3-óis; o ombro que aparece a 330 nm no pico de tempo de retención 9,7 min pode deberse a algunha contaminación procedente dos compostos contiguos; de feito, tal e como xa indicamos, presenta un único máximo en metanol a 280 nm que parece confirmar este particular. O pico cuarto correspóndese co 20 da táboa 9, e ten un espectro de absorción en DAD cun máximo en 285,2 nm e un ombro en 340 nm que –ao igual que sucedía co pico primeiro– podería corresponderse cun flavanoide. Nada podemos adiantar sobre a identidade do terceiro composto, que presenta un máximo de absorbancia a 275,7 nm en

DAD e que, en todo caso e de acordo con Harborne (1989), podería facer pensar nun derivado benzoico.

Fracción 17.- O noso obxectivo nesta fracción era recoller dous picos, un que presentaba un espectro de absorción en DAD con dous máximos en 301,8 e 312 nm e que intuíamos puidera ser un estilbeno (que se correspondería co pico 22 da táboa 9), e outro que cun máximo en 297 nm podería ser o pico 24 desa mesma táboa.

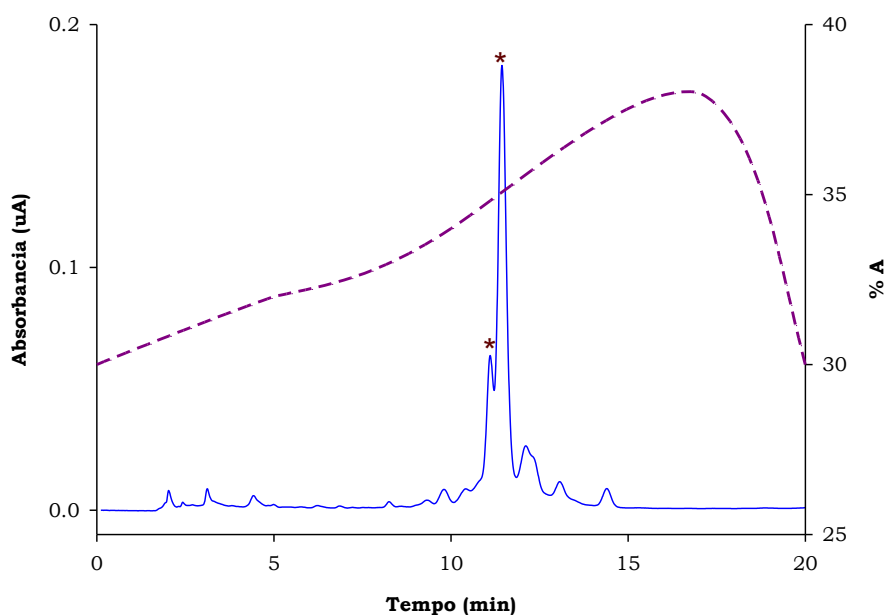


Figura 59. Cromatograma da fracción F17 adquirido a 280 nm.

A realidade é que nestas novas condicións cromatográficas (figura 59) recollemos este último composto (tempo de retención 11,1 min) e outro cun espectro de absorción que presenta un ombro en 272 nm e dous máximos en 279,3 e 287,6 nm e tempo de retención 11,4 min, que se corresponde co pico 23 da táboa 9, e que agardabamos recoller na fracción 18. Os seus espectros en metanol (táboa 25 e figura 60) inclínanos a pensar que estamos en presenza dun flavanoide (moi probabelmente un dihidroflavonol de acordo co expresado

por Mabry no ano 1969) e dunha mestura de, cando menos, dous compostos que coelúen nas nosas condicións cromatográficas.

Táboa 25. Características espectrais dos compostos descoñecidos e dos patróns de referencia.

Compostos	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	λ _{max}				
				HCl	NaOMe	NaOAc	H ₃ BO ₃	
Desc 1 (t _R =11,1 min)	297	289	289	275?	291	287	289	
		340	312	312	327	337	343	
Desc 2 (t _R =11,4 min)	272	274	274	274	242	279	281	
		279,3	280	280	296	285	287	
		287,6				293		
Taxifolín	291,1	290	313	313	245	292	291	
		340	343	381	381	327	327	336
Astilbina	289,9	292	288	281	273	292	290	
		340	340	313	313	327	328	340
Engeletina	292,7	292	271	264	271	287	289	
		340	339	313	314	325	329	336
				366				

En negraña móstranse os ombros

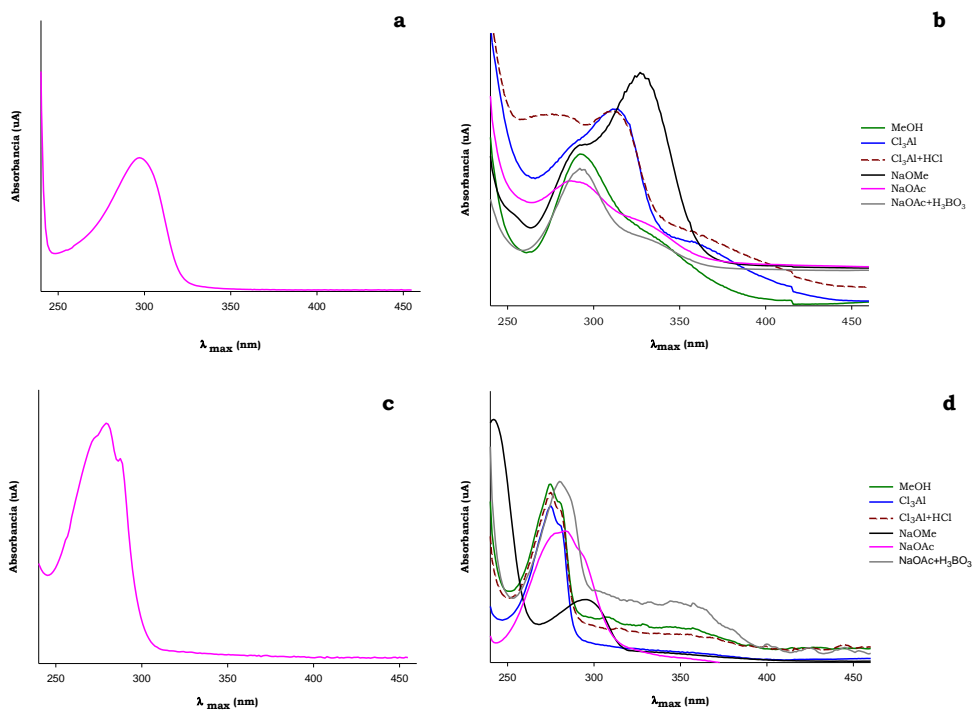


Figura 60. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d).

En efecto, o máximo de absorbancia en 289 nm e o ombro en 340 nm que caracteriza ao primeiro deles e as modificacións do seu espectro ao engadirle cloruro de aluminio, cloruro de aluminio/ácido clorhídrico, metóxido sódico, acetato sódico e acetato sódico/ácido bórico, son semellantes ás dos dihidroflavonois comerciais cos que se compararon. Así mesmo, e polo que fai ao segundo pico, que presenta un espectro neutro cun máximo de absorbancia en 282 nm e que só sofre modificacións cando se lle engade metóxido sódico, non é posíbel adiantar ningunha conclusión sobre a súa identidade; en función dos dous máximos que presenta en DAD podemos pensar que se pode tratar dunha mestura dun flavan-3-ol (responsábel do máximo de absorción en 279 nm) e un flavanoide ao que correspondería o máximo en 287,6 nm.

Fracción 18.- Dos cinco picos cromatográficos que se resolven nas novas condicións cromatográficas nesta fracción (figura 61), o primeiro deles corresponde ao segundo pico da fracción anterior do que xa falamos. Dos outros catro, con tempos de retención 12,3, 13,0, 13,6 e 14,3 min e espectros de absorción en DAD que se mostran na táboa 26 e figura 62, o primeiro entendemos que é un ácido hidroxicinámico que se corresponde co pico 26 da táboa 9 e todo indica que poida tratarse do ácido *p*-coumárico, mentres que o segundo semella ser o flavanoide correspondente ao pico 27 da táboa 9, un posíbel dihidroflavonol. O terceiro e o cuarto compostos puideran ser derivados benzoicos en ámbolos dous casos, por máis que o último deles, polas mesmas razóns xa indicadas cando falamos do pico recollido na fracción 2 (ver páxinas 96 e 97), puidera ser tamén un derivado glicosilado dalgún ácido hidroxicinámico. Os espectros en metanol e con distintos axentes modificadores (táboa 26 e figura 62) permiten confirmar a presenza do ácido *p*-coumárico pero non resolven as dúbidas sobre a natureza do flavanoide. En efecto, os cambios que se producen no espectro deste composto ao engadirle os distintos axentes modificadores, non coinciden con aqueles que sofren os patróns comerciais dos dihidroflavonois dos que dispoñemos no noso laboratorio.

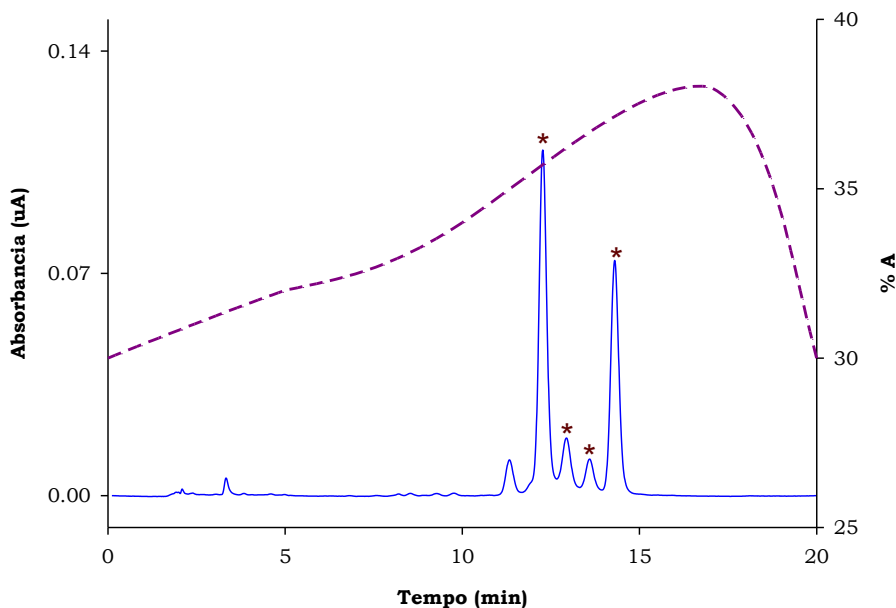


Figura 61. Cromatograma da fracción F18 adquirido a 280 nm.

Non podemos chegar a ningunha conclusión clara acerca da identidade do composto de tempo de retención 13,6 min que polo seu espectro en DAD (cun máximo de absorbancia en 275,7 nm) –e de acordo con Van Sumere (1989)- puidera ser un derivado benzoico; presenta un espectro neutro cun máximo de absorbancia en 284 nm que se descompón ao engadirlle cloruro de aluminio. Os espectros alcalinos, tanto con metóxido sódico (λ_{\max} 291 nm) como con hidróxido sódico (λ_{\max} 293 nm), e os realizados con acetato sódico e acetato sódico/ácido bórico (λ_{\max} 287 nm en ámbolos dous casos) non axudan tampouco á hora da súa identificación (táboa 26 e figura 62). Polo que fai ao composto de tempo de retención 14,3 dicir que o seu máximo de absorbancia en metanol (λ_{\max} 295 nm) sofre un pequeno desprazamento batocrómico despois de engadir cloruro de aluminio (λ_{\max} 298 nm), que se recupera con cloruro de aluminio/ácido clorhídrico (λ_{\max} 294 nm). A ausencia do segundo máximo de absorción en cloruro de aluminio, que se produce no caso dos glicósidos dos ácidos hidroxicinámicos arredor dos 310 nm, inclinounos a

pensar que se trata máis ben dun hidroxibenzoico. De feito, é moito máis próximo ao do ácido 3-hidroxibenzoico comercial que ao dos patróns dos glucósidos dos ácidos hidroxicinámicos cos que o temos comparado, por máis que con hidróxido sódico non presente ningún desprazamento do máximo de absorbancia (táboa 26 e figura 62).

Táboa 26. Características espectrais dos compostos descoñecidos e dos patróns de referencia.

Compostos	λ_{\max}						
	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	+HCl	NaOMe NaOH	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 (t _R =12,3 min)	300 308,9	299 309	303 315	300 312	308 334	289 314	288 314
Desc 2 (t _R =13,0 min)	289,9 340	293 345	295 348	276 298 354	293 351	293 351	293 351
Desc 3 (t _R =13,6 min)	275,7	284	d	-	291 293	287	287
Desc 4 (t _R =14,3 min)	294,7	295	298	294	295	-	-
Taxifolín	291,1 340	290 343	313 381	313 381	245 327	292 327	291 336
Astilbina	289,9 340	292 340	288 313	281 313	273 327	292 328	290 340
Engeletina	292,7 340	292 339	271 313 366	264 314	271 325	287 329	289 336
<i>p</i> -coumárico	298 308,9	298 310	302 315	300 312	309 335	288 314	288 314
Siringaldehido	307,7	307	267 307	267 309	256 289 370	-	-
Siringico	275,5	276	278	280	303	-	-
3-OH-benzoico	295,8	298	305	302	311	-	-
4-gluc do cafeico	295,7	288 320	288 320	288 320	-	-	-
4-gluc <i>p</i> -coumárico	296,2	287	297 306	287	-	-	-

En negra mostráanse os ombros; en cor azul os valores de absorbancia con NaOH

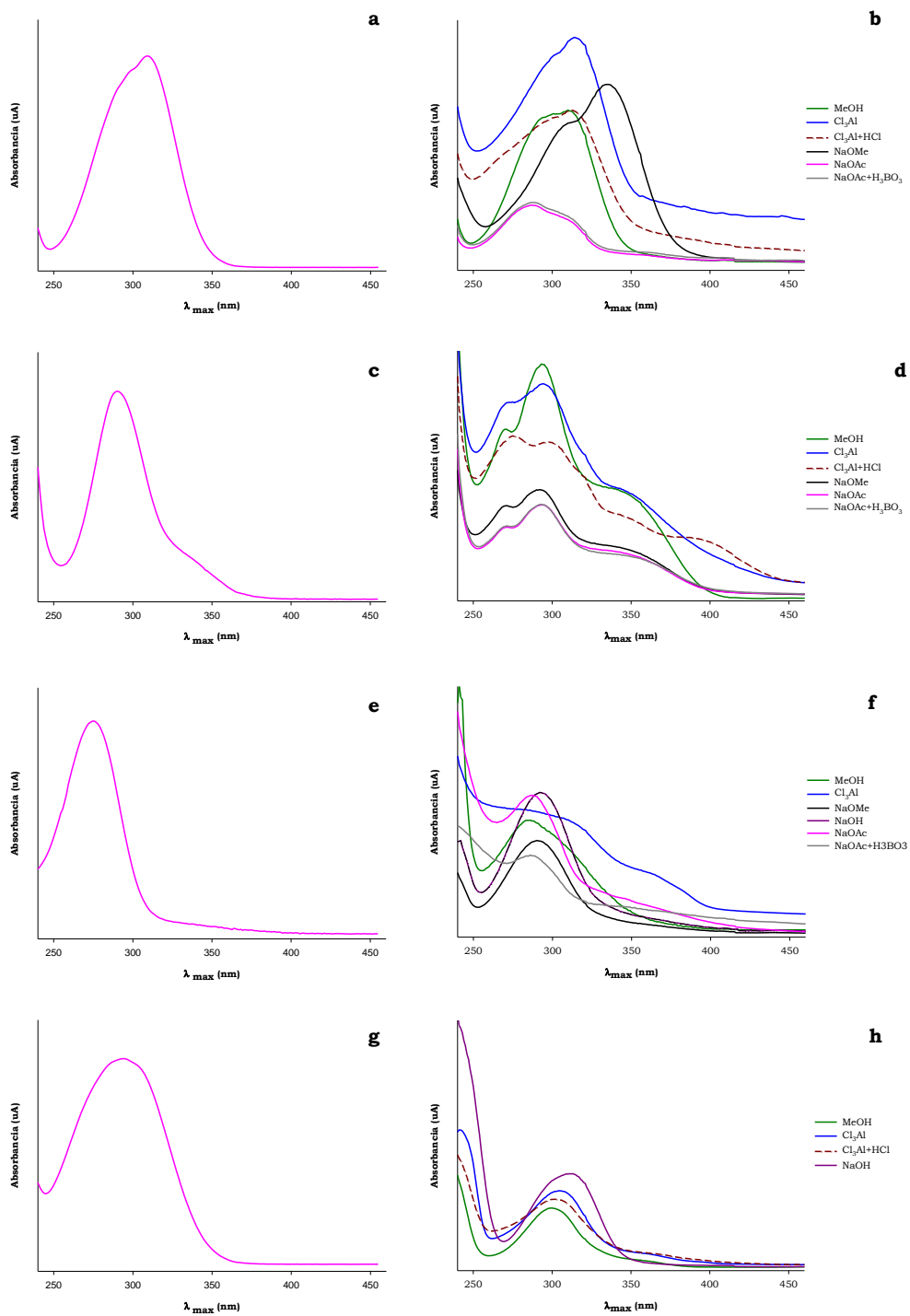


Figura 62. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c, e, g) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d, f, h).

Fracción 19.- Recolléronse nesta fracción tres compostos (figura 63): un primeiro con tempo de retención 14,4 min (que se corresponde co pico 28 da táboa 9) que posúe un espectro en DAD que se caracteriza por presentar un ombro en 272 nm e dous máximos de absorbancia en 279,3 e 287,6 nm, moi parecido ao do composto de tempo de retención de 11,4 min atopado na fracción 17; os outros dous compostos, con tempos de retención de 15,3 e 17 min, presentaron uns espectros en DAD moi semellantes, cun máximo de absorbancia en 287,5 nm e un ombro en 335 nm no primeiro caso e un máximo de absorbancia en 286,4 nm e un ombro en 338 nm no segundo, que nos fan pensar na posibilidade de que sexan dous flavanoides (Mabry, 1969; Markham, 1982). O primeiro dos compostos, de tempo de retención 14,4 min, presenta un espectro en metanol (λ_{\max} 277, 283 nm) que non se modifica con cloruro de aluminio nin con cloruro de aluminio/ácido clorhídrico (táboa 27 e figura 64), un comportamento moi semellante ao xa observado para o segundo composto da fracción 17 (táboa 25 e figura 60); o mesmo ocorre coas modificacións que se observan con metóxido sódico, acetato sódico e acetato sódico/ácido bórico. Como sucedía naquel caso, estes resultados non permiten adiantar ningunha conclusión sobre a identidade deste composto. O segundo composto presentou un espectro neutro cun máximo de absorbancia en 290 nm e un ombro en 340 nm, un espectro que se modifica dun xeito moi semellante ao dos dihidroflavonoides comerciais cos que se compararon, o que permite afirmar que se trata dun composto deste grupo.

Pola súa banda, o terceiro dos compostos presentou un máximo de absorbancia en metanol a 286 nm e un ombro a 340 nm que permite afirmar que se trata tamén dun flavanoide, aínda que non poidamos asegurar que sexa un dihidroflavonol; a adición de distintos axentes modificadores (cloruro de aluminio, metóxido sódico e acetato sódico) produce espectros de absorción pouco estábeis que dificilmente permiten adiantar máis sobre a identidade deste composto.

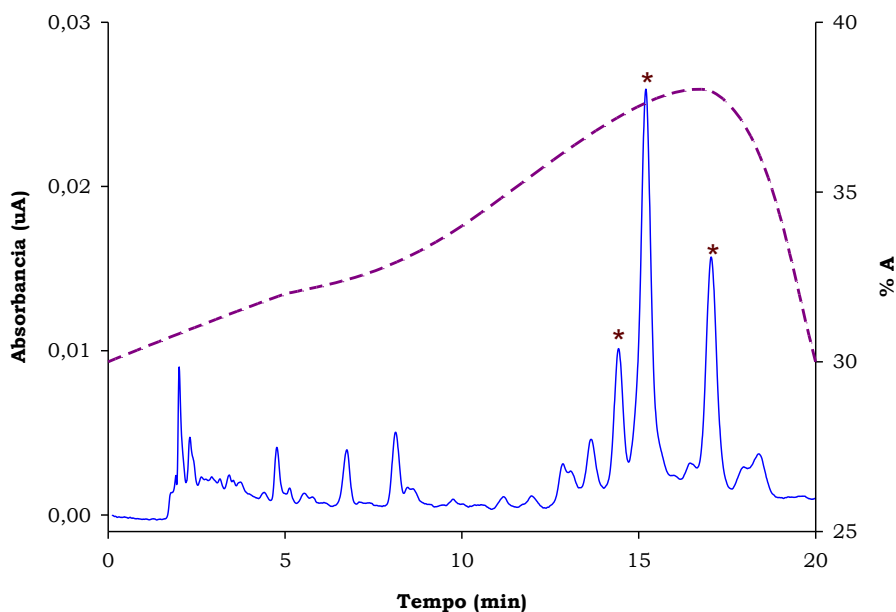


Figura 63. Cromatograma da fracción F19 adquirido a 280 nm.

Táboa 27. Características espectrais dos compostos descoñecidos e dos patróns de referencia.

Compostos	λ_{\max}						
	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 (t _R =14,4 min)	272 279,3 287,6	277 283	277 283	277 283	242 296	277 283 291	286
Desc 2 (t _R =15,3 min)	287,5 335	292 340	272 317	268 317	327	281 329	293 338
Desc 3 (t _R =17,0 min)	286,7 338	286 340	d	-	d	d	-
Taxifolín	291,1 340	290 343	313 381	313 381	245 327	292 327	291 336
Astilbina	289,9 340	292 340	288 313	281 313	273 327	292 328	290 340
Engeletina	292,7 340	292 339	271 313 366	264 314	271 325	287 329	289 336

En negraña móstranse os ombros;

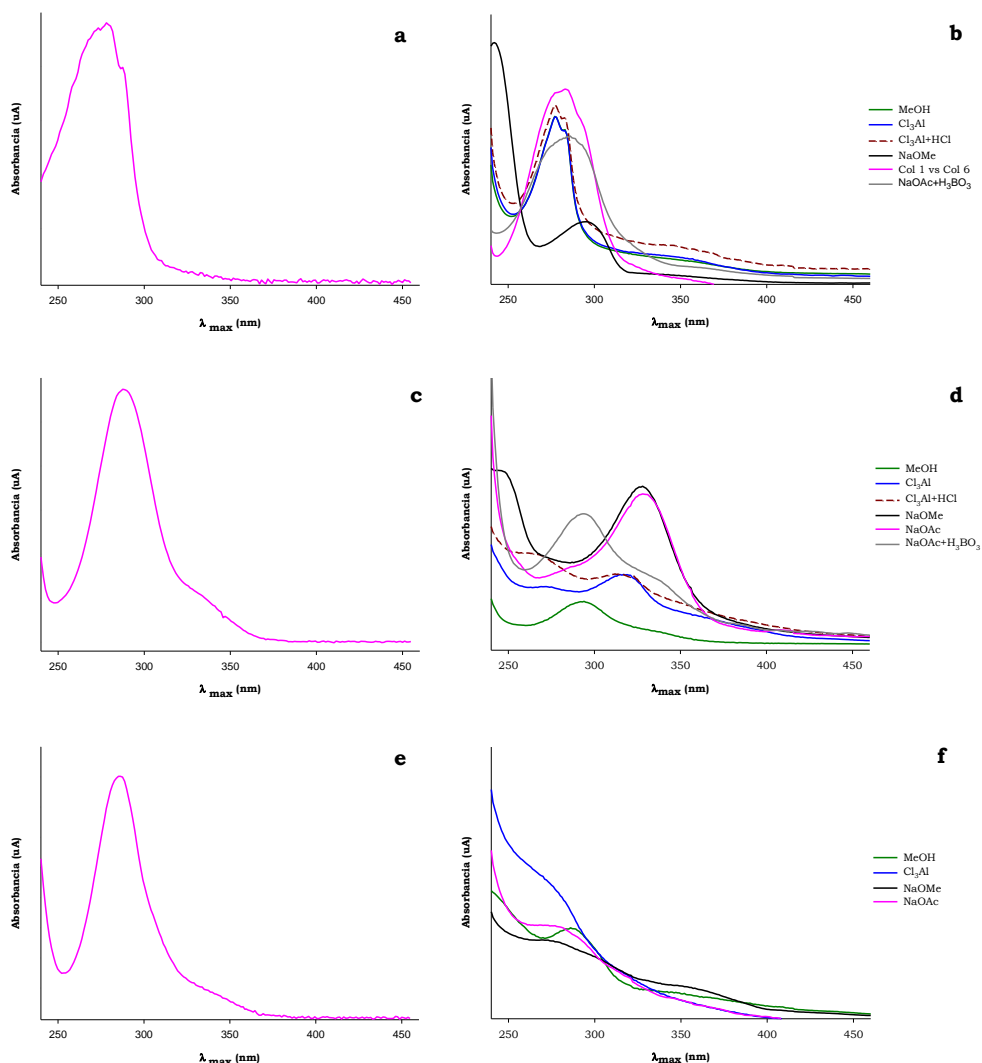


Figura 64. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c, e) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d, f).

Fracción 20.- Nesta fracción intentamos recoller un total de catro picos, que presentan os tempos de retención de 10,4, 12,1, 13,3 e 14,1 min (figura 65) e as características espectrais que aparecen na táboa 28 e na figura 66; en función destas características podemos afirmar que o composto con menor tempo de retención podería ser un hidroxicinámico (probabelmente derivado do ácido *p*-coumárico) mentres que o de tempo de retención máis alto, podería ser

un estilbena, o mesmo que temos asignado como pico 29 na táboa 9. E pouco podemos dicir dos compostos segundo e terceiro.

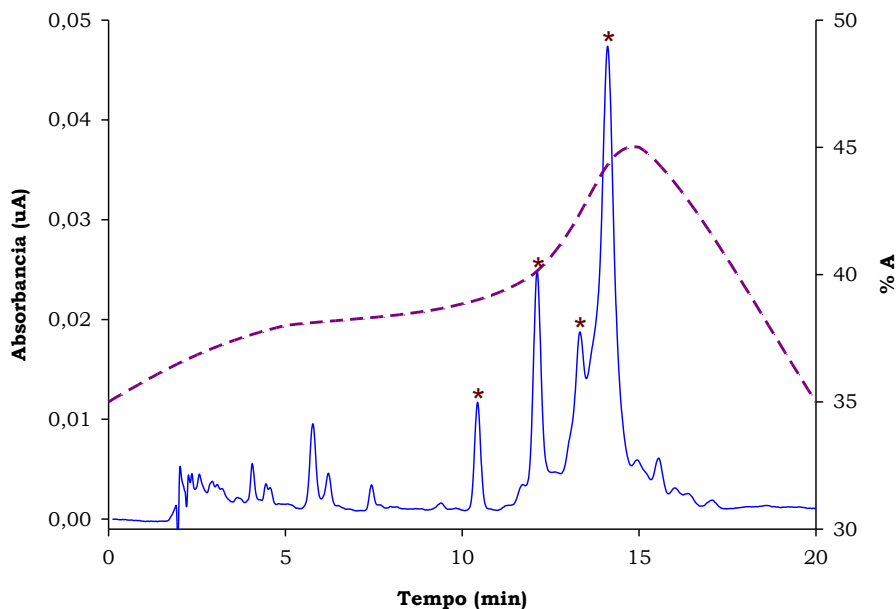


Figura 65. Cromatograma da fracción F20 adquirido a 280 nm.

Táboa 28. Características espectrais dos compostos descoñecidos e dos patróns de referencia..

Compostos	λ_{\max}						
	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 (t _R =10,4 min)	298 310	296 312	277 312	272 312	359	296 312	298 314
Desc 2 (t _R =12,1 min)	278,1 308	-					
Desc 3 (t _R =13,3 min)	293,5 322	298 312	d	-	d	d	-
Desc 4 (t _R =14,1 min)	305,3 319	305 318	-	-	-	-	-
<i>p</i> -coumárico	298 308,9	298 310	302 315	300 312	309 335	288 314	288 314
<i>t</i> -coutárico	298 313,6	300 314	300 315	302 315	312 360	298 315	298 315

En negraña móstranse os ombros; d= inestábel

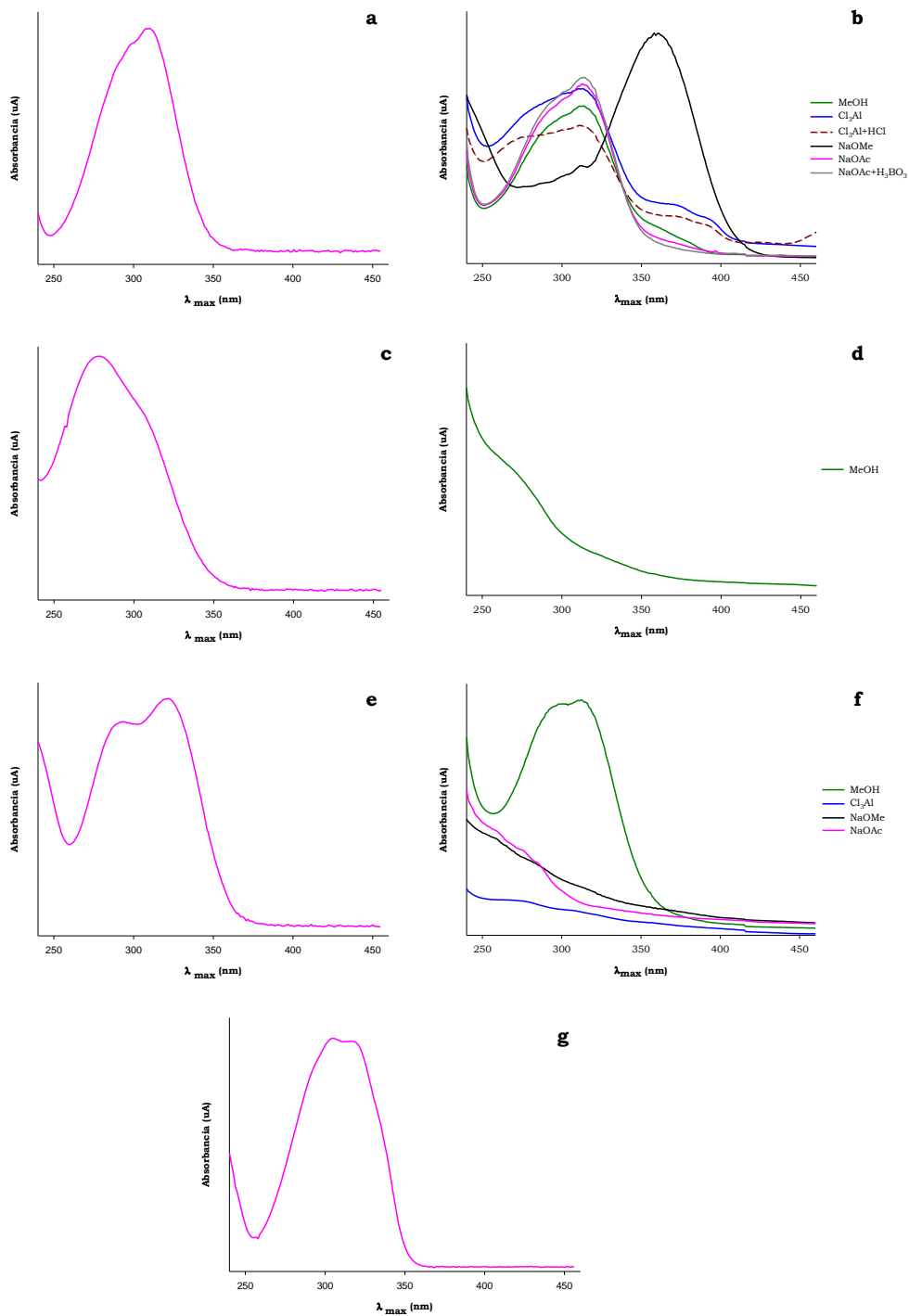


Figura 66. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c, e, g) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d, f).

O espectro en metanol do primeiro composto, o probábel hidroxicinámico (λ_{\max} 296sh; 312 nm), só sofre modificacións co metóxido sódico, que provoca un importante desprazamento batocrómico (47 nm), comportamento que coincide co do *t*-coutárico que –como vimos– ten un tempo de retención moito menor.

A imposibilidade de conseguir unha mellor separación, lévanos a pensar que os compostos 2 e 3 foron recollidos xuntos; os seus espectros en DAD (λ_{\max} 278, 308sh nm e λ_{\max} 293, 322 nm, respectivamente) non semellan corresponderse con espectros de compostos puros. O descoñecido 2 nin sequera deu un espectro claro en metanol (cun posíbel ombro arredor dos 280 nm), mentres que o espectro neutro do descoñecido 3 ten dous máximos de absorbancia en 293 e 312 nm pero tamén se descompón ao engadir os axentes modificadores do espectro. En canto ao composto de tempo de retención 14,1 min, dicir que o seu espectro en metanol (λ_{\max} 305, 318 nm) deixa claro que se trata dun isómero *trans* dun estilbeno; podemos adiantar que estamos en presenza dun derivado do resveratrol pero en ningún caso se pode tratar deste composto. En efecto, o tempo de retención do *trans*-resveratrol comercial –o único estilbeno patrón do que dispoñemos– nestas condicións de análise é máis alto; neste sentido, e de acordo cos datos proporcionados por Hillis e Ishikura (1968), Pezet e col. (2003), González-Barrio (2006) e Guerrero e col. (2010a), intuimos que debe ser un estilbeno glicosilado.

Fracción 21.– Nesta fracción pretendiamos recoller seis compostos con tempos de retención de 5,7, 6,1, 6,8, 7,1, 10,3 e 11,3 min (figura 67) e coas características espectrofotométricas en DAD que reflectimos na táboa 29 e nas figuras 68 e 69. Tendo en conta as diferenzas atopadas entre os seus espectros en DAD e os correspondentes en metanol, e a mala resolución cromatográfica desta fracción, o primeiro e o cuarto compostos poderían ser unha mestura de varios compostos. Polos seus tempos de retención e os espectros en DAD foron considerados inicialmente como o pico 30 da táboa 9 (un descoñecido con dous máximos de absorbancia a 282,8 e 323,2 nm) e o 31, un derivado

hidroxicinámico cun máximo de absorbancia a 310,1 nm e un ombro a 285 nm.

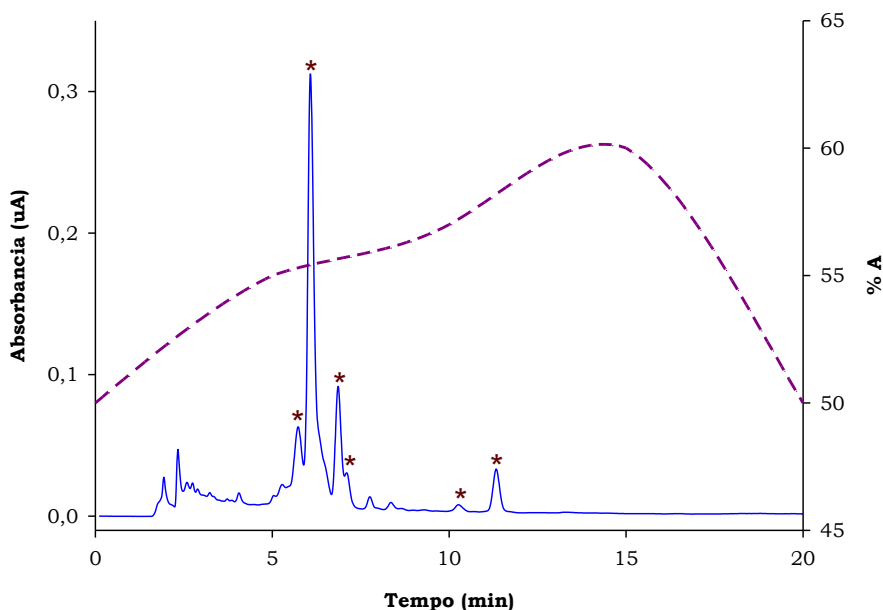


Figura 67. Cromatograma da fracción F21 adquirido a 280 nm.

Polo que fai aos compostos con tempos de retención 6,1 min (o pico 32 da táboa 9) e 10,3 min debemos indicar que, en función do seu espectro en UV-vis (λ_{\max} 256, 300sh, 355 e λ_{\max} 258, 268sh, 297sh, 358, respectivamente), trátase en ámbolos dous casos de flavonoides glicosilados derivados da quercetina (táboa 29 e figuras 68 e 69); en efecto, o desprazamento hipsocrómico que sofren os seus máximos de absorbancia en metanol respecto ao do aglicón (λ_{\max} 256, 300sh, 367) así o indican (Markham, 1982). Esta afirmación vese ratificada no caso do composto de tempo de retención 6,1 min polo desprazamento producido tras a adición de cloruro de aluminio (λ_{\max} 275, 305sh, 428) e cloruro de aluminio/ácido clorhídrico (λ_{\max} 268, 303sh, 360, 395). Debemos facer constar que para o composto de tempo de retención 10,3 min só foi posíbel obter o espectro neutro xa que tanto ao engadir cloruro de aluminio como metóxido sódico e acetato sódico produciuse un espectro inestábel.

Táboa 29. Características espectrais dos compostos descoñecidos e dos patróns de referencia.

Compostos	λ_{\max}						
	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 (t _R =5,7 min)	282,8 320	277	-	-	-	-	-
Desc 2 (t _R =6,1 min)	255,6 265,1 292,1 352,9	256 300 355	275 305 428	268 303 360 395	271 329 410	271 325 369	263 303 375
Desc 3 (t _R =6,8 min)	289,9 327	290 340	317 372	267 312	248 327	292 329	294 336
Desc 4(t _R =7,1 min)	299 313,6	280	-	-	-	-	-
Desc 5 (t _R =10,3 min)	255,6; 266 354,1	258 268 297 358	d	-	d	d	-
Desc 6 (t _R =11,3 min)	285,2	285	d	-	d	d	-
Q-galact	256 265 300 354,6	258 300 355	274 306 427	268 304 360 396	272 328 410	271 325 369	262 303 376
Q-gluc	256 265 299 353,4	258 269 295 357	274 304 357 415	270 302 357 398	274 322 409	259 269 300 359	263 298 380
Q-rham	256 262 300 348,6	257 267 302 357	272 415	268 301 345 399	273 327 404	261 304 352	262 302 367
Q-glucur	256 265 300 354,6	258 269 357	272 306 360 410	268 300 358 400	275 330 408	267 327 371	264 376
Q-rut	255,6 267 292 354,1	258 268 297 358	276 304 338 431	269 300 356 398	270 321 410	270 371	264 299 380
Taxifolin	291,1 340	290 343	313 381	313 381	245 327	292 327	291 336
Astilbina	289,9 340	292 340	288 313	281 313	273 327	292 328	290 340
Engeletina	292,7 340	292 339	271 313 366	264 314	271 325	287 329	289 336

En negra mostrañense os ombros; d=instábel

Que se trata de glicósidos en posición 3 é unha obviedade, xa que na vide é esta a única posición na que existe glicosilación nos flavonóis (Singleton e Esau, 1969). Poderíase tratar tamén de derivados 3-O-glicosilados da isorhamnetina (un derivado metilado en posición 3' da quercetina) que presentan na meirande parte dos casos espectros de absorción semellantes aos correspondentes da quercetina, pero que se reteñen máis tempo na columna nas análises cromatográficas en fase inversa.

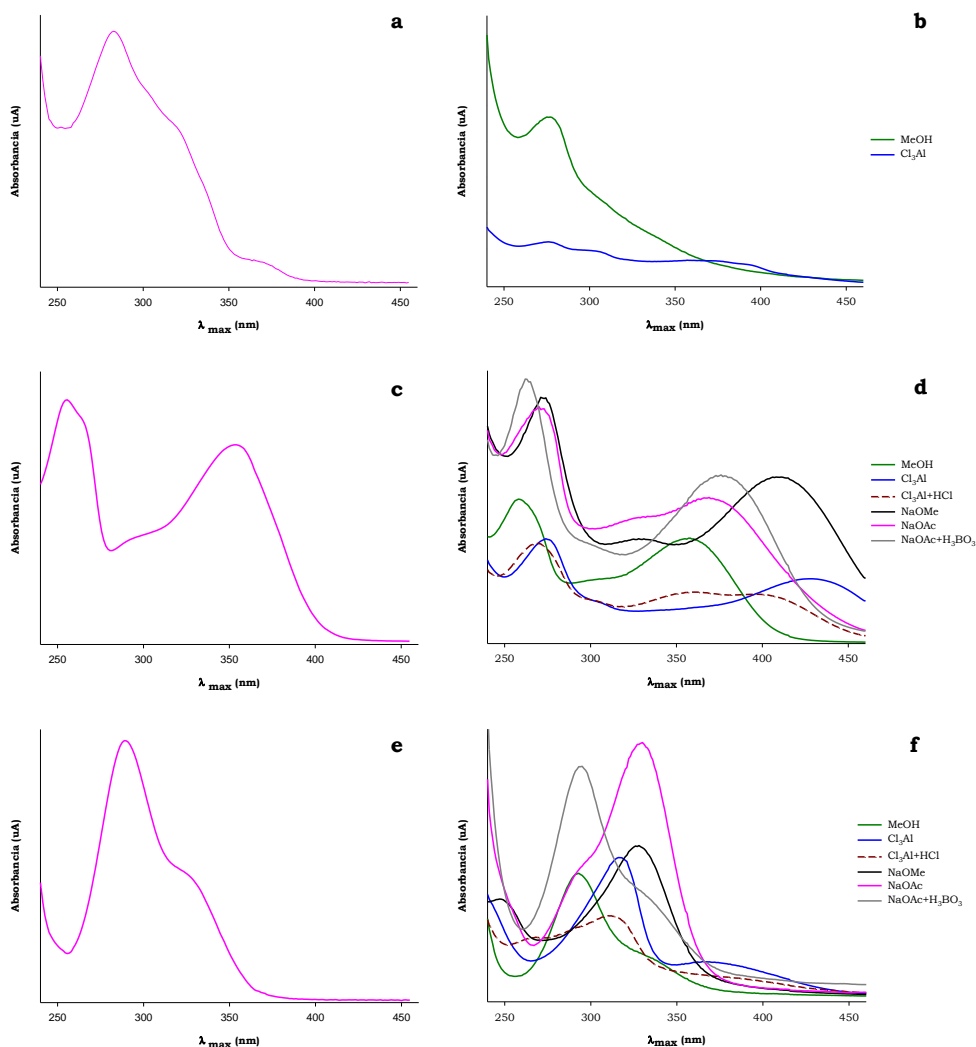


Figura 68. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c, e) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d, f).

O composto de tempo de retención 6,8 min presentou un espectro neutro cun máximo de absorbancia en 285 nm e un ombro en 312 nm, que fai pensar nun flavanoide (táboa 29 e figura 68); con cloruro de aluminio e cloruro de aluminio/ácido clorhídrico modifica o seu espectro dun xeito semellante a como o fan os dihidroflavonois cos que se compararon, polo que podemos afirmar que se pode tratar dalgún composto deste grupo.

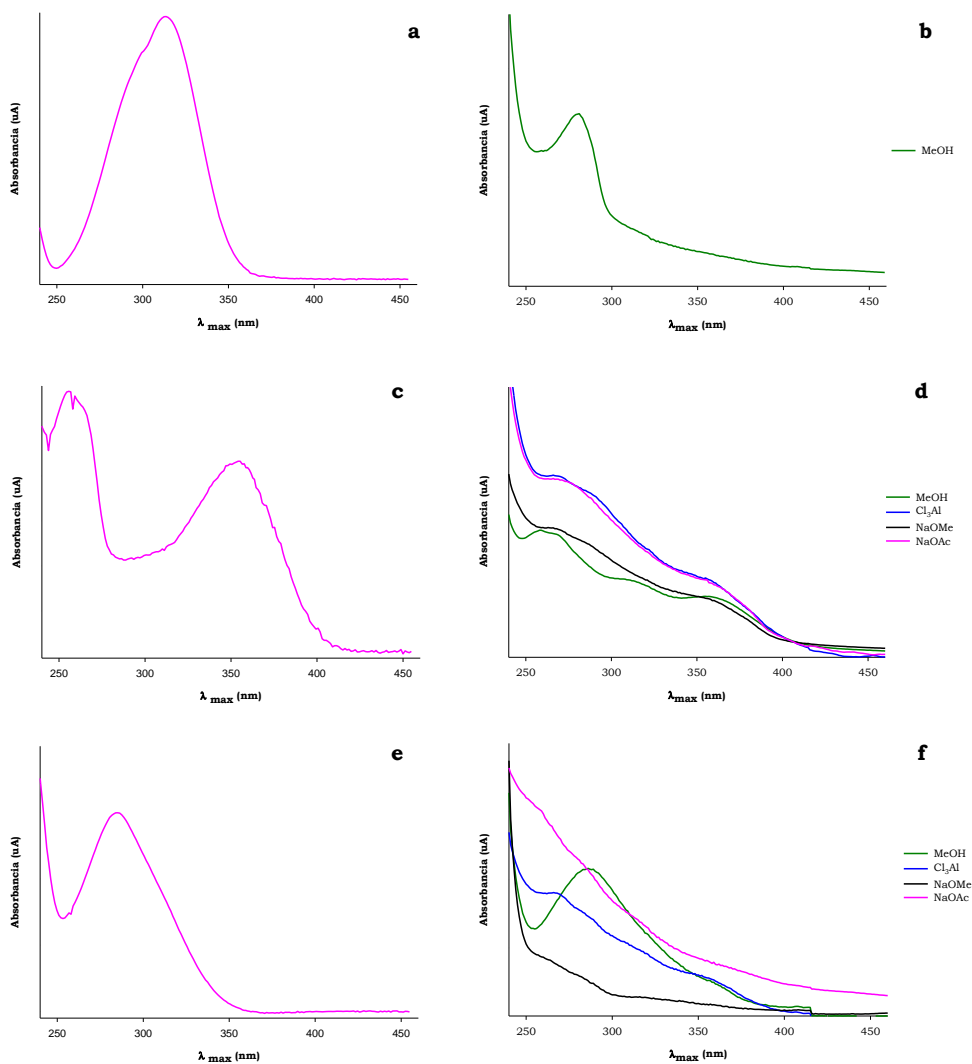


Figura 69. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c, e) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d,f).

O espectro de absorción en DAD do último composto, de tempo de retención 11,3 min e cun máximo en 285 nm (que se mantén en metanol e sofre a súa descomposición ao engadirle cloruro de aluminio, metóxido sódico e acetato sódico), é moi característico das formas isoméricas *cis* dos derivados estilbénicos, polo que a priori asignamos este composto a este grupo (táboa 29 e figura 69).

Fracción 22.- Con seguridade, os dous compostos recollidos nesta fracción con tempos de retención 4,5 e 4,7 min (figura 70), son dous flavonoides derivados da quercetina e glicosilados en posición 3 (Markham, 1982; 1989), e así o confirman os resultados espectrofotométricos obtidos para ámbolos dous tanto en DAD como en UV-vis en metanol e cando se lle engaden distintos axentes modificadores do espectro (táboa 30 e figura 71). Estes compostos correspóndense cos picos 33 e 34 da táboa 9, respectivamente.

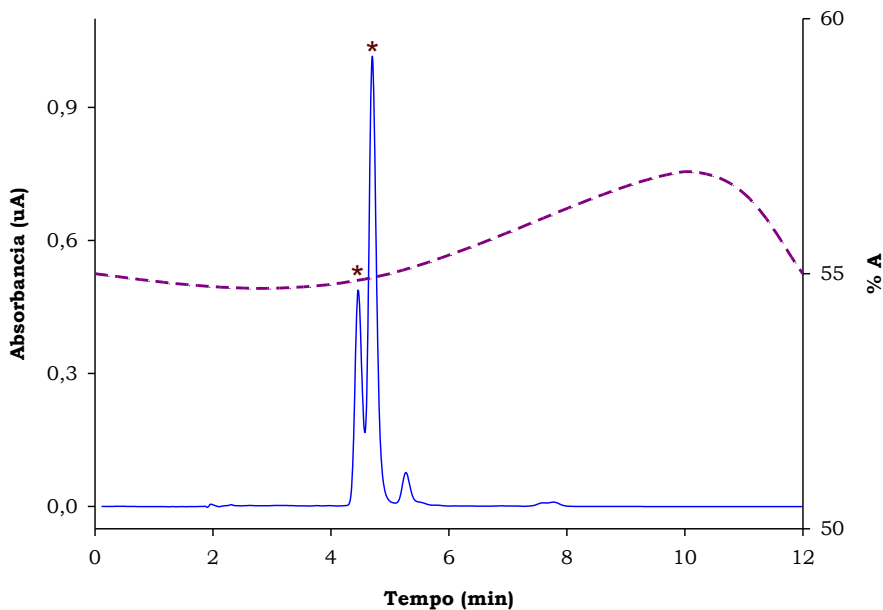


Figura 70. Cromatograma da fracción F22 adquirido a 280 nm.

Táboa 30. Características espectrais dos compostos descoñecidos e dos patróns de referencia.

Compostos	λ_{\max}						
	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 (t _R =4,5 min)	255,6	258	272	268	275	266	264
	266	268	305	300	330	328	376
	293,5	356	361	357	408	370	
	354,1		410	400			
Desc 2 (t _R =4,7 min)	255,6	257	274	270	274	259	263
	266	270	305	300	323	270	298
	293,5	295	358	357	409	300	380
	352,9	357	415	397		360	
Q-galact	256	258	274	268	272	271	262
	265	300	306	304	328	325	303
	300	355	427	360	410	369	376
	354,6			396			
Q-gluc	256	258	274	270	274	259	263
	265	269	304	302	322	269	298
	299	295	357	357	409	300	380
	353,4	357	415	398		359	
Q-rham	256	257	272	268	273	261	262
	262	267	415	301	327	304	302
	300	302		345	404	352	367
	348,6	357		399			
Q-glucur	256	258	272	268	275	267	264
	265	269	306	300	330	327	376
	300	357	360	358	408	371	
	354,6		410	400			
Q-rut	255,6	258	276	269	270	270	264
	267	268	304	300	321	371	299
	292	297	338	356	410		380
	354,1	358	431	398			

En negra mostra os ombros

Como xa adiantamos na discusión da fracción anterior, o comportamento espectrofotométrico dos derivados da isorhamnetina é moi semellante ao dos derivados da quercetina (Markham, 1982), pero teñen tempos de retención máis altos nestas condicións cromatográficas. Tendo en conta os tempos de retención dos patróns comerciais dos derivados glicosilados da quercetina, podemos intuír que se trata de dous dos seguintes compostos: quercetín-3-O-glucósido, quercetín-3-O-galactósido ou quercetín-3-O-glucurónido, que en moitas ocasións coelúen; só a realización das hidrólises e a identificación dos azucres liberados permitirá identificalos plenamente.

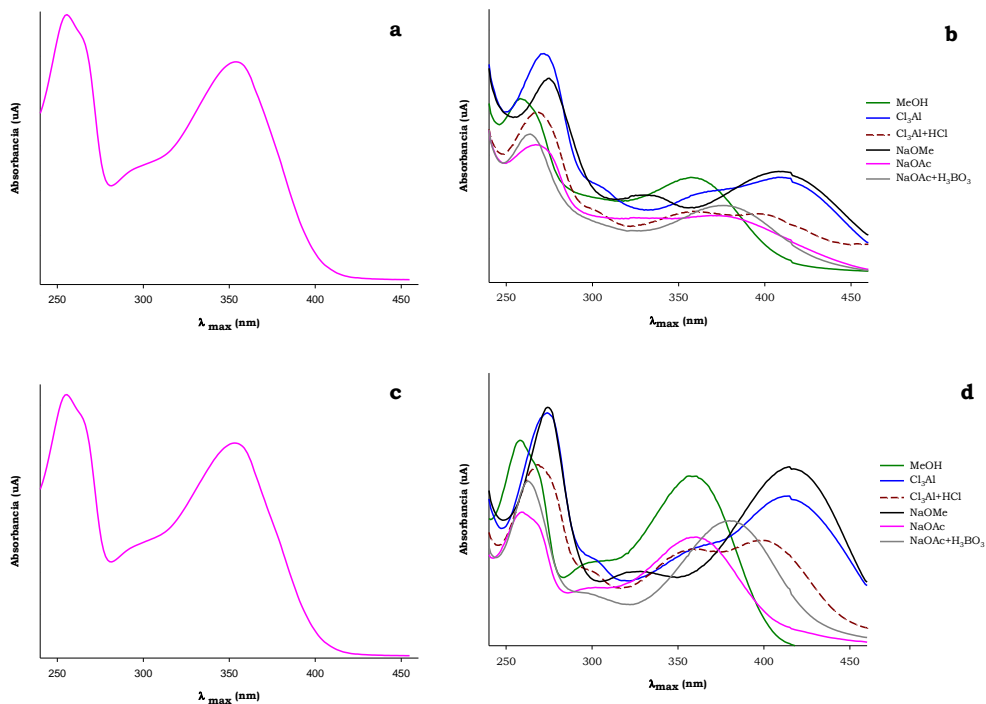


Figura 71. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d).

Fracción 23.- Nesta fracción recolleemos dous compostos (figura 72), o primeiro deles (que se corresponde co pico 35 da táboa 9) cun tempo de retención de 5,4 min e un espectro de absorción en DAD cun máximo en 289,9 nm e un ombro en 340 nm, espectro que vimos relacionando co dos dihidroflavonois. O segundo, cun tempo de retención de 6,2 e un espectro de absorción en DAD con dous máximos de absorción en 260,4 e 298,2 nm, pensamos que se poida tratar dun derivado benzoico e corresponderse co pico 37 da táboa 9. Tras realizar os espectros en UV-vis en metanol e con axentes modificadores (táboa 31 e figura 73) podemos confirmar a presenza do dihidroquercetin-3-O-rhamnósido (astilbina) e dun derivado do ácido vanílico, probabelmente un éster metílico. Indicar, ademais, que o vanílico metil-éster comercial co que se comparou, presenta nestas condicións cromatográficas un tempo de retención moi próximo ao do composto descoñecido.

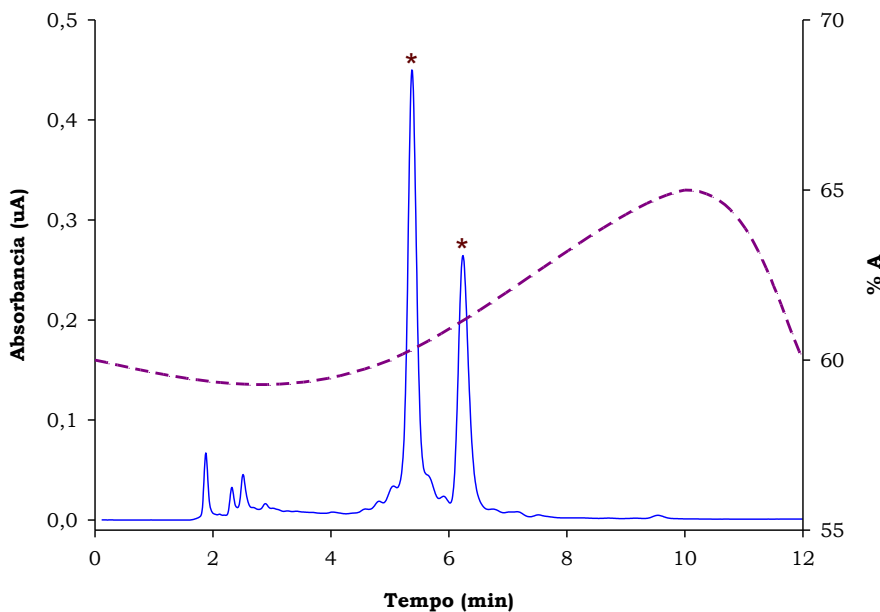


Figura 72. Cromatograma da fracción F23 adquirido a 280 nm.

Táboa 31. Características espectrais dos compostos descoñecidos e dos patróns de referencia.

Compostos	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	λ_{\max}			
				+HCl	NaOM NaOH	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 (t _R =5,4 min)	289,9	288	289	280	272	292	290
	335	340	313	312	327	327	340
Desc 2 (t _R =6,2 min)	260,4	262	262	262	285	-	-
	298,2	297	297	297	313	-	-
Taxifolín	291,1	290	313	313	245	292	291
	340	343	381	381	327	327	336
Astilbina	289,9	292	288	281	273	292	290
	340	340	313	313	327	328	340
Engeletina	292,7	292	271	264	271	287	289
	340	339	313 366	314	325	329	336
Vanillico metil-éster	261,5	263	263	263	286	-	-
	292,3	294	294	294	315	-	-

En negraña móstranse os ombros; en cor azul os valores de absorbancia con NaOH

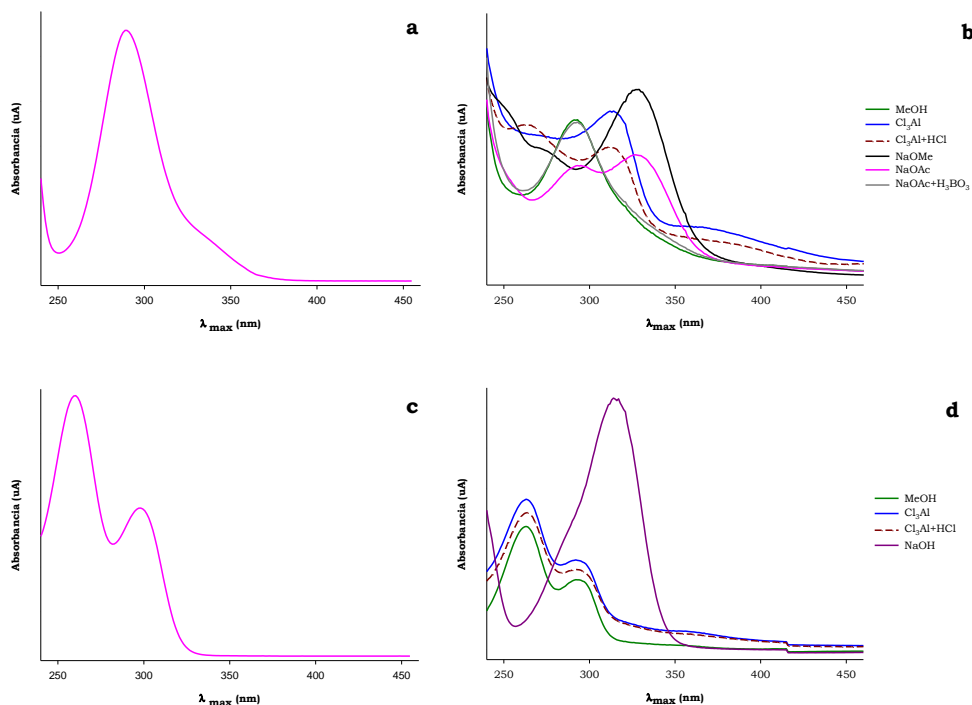


Figura 73. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d).

Fracción 24.- O composto recollido nesta fracción con tempo de retención 6 min (figura 74), tamén é un flavonol (que se corresponde co pico 38 da táboa 9), pero neste caso, e así o confirman os resultados espectrofotométricos obtidos tanto en DAD como en UV-vis en metanol e ao engadirlle distintos axentes modificadores do espectro (táboa 32 e figura 75), trátase dun glicosido en posición 3 do kaempferol. En efecto, o seu espectro en metanol con dous máximos de absorbancia en 265 e 343 nm indica que estamos en presenza dun derivado glicosilado do kaempferol; como xa indicamos para os derivados glicosilados da quercetina, a glicosilación provoca tamén neste caso un desprazamento hipsocrómico respecto do máximo a 366 nm que presenta o aglicón. Os cambios provocados pola adición dos diferentes axentes modificadores do espectro confirman este particular (Markham, 1982; 1989).

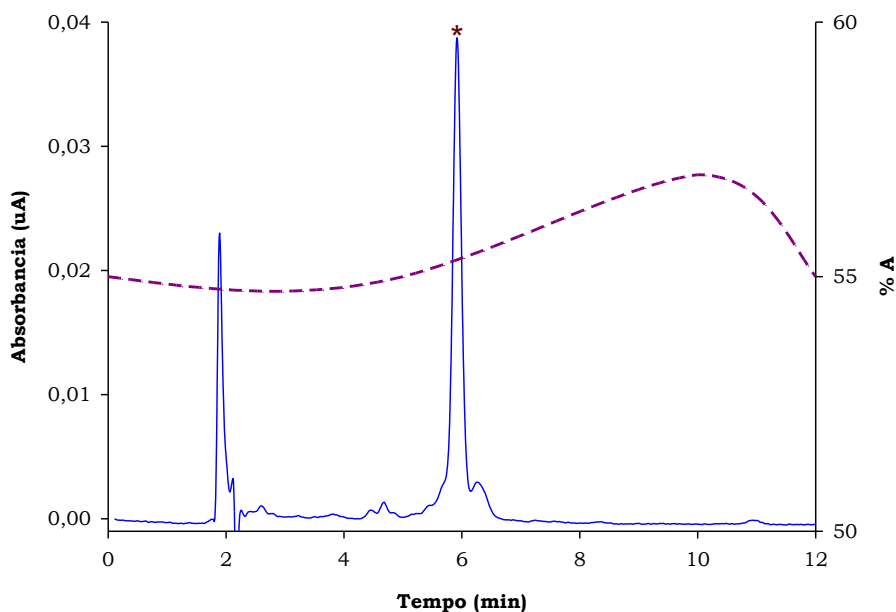


Figura 74. Cromatograma da fracción F24 adquirido a 280 nm.

Táboa 32. Características espectrais do composto descoñecido e dos patróns de referencia.

Compostos	λ_{\max}						
	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc (t _R =6,0 min)	265,1	265	272	270	275	275	268
	289,3	300	300	300	325	305	302
	344,6	343	350	343	402	375	352
			395	395			
K-gluc	265,1	267	276	274	276	275	268
	295	298	303	301	326	305	302
	347	351	348	345	402	367	352
			397	393			
K-rham	264,5	267	275	273	274	272	266
	297	345	302	300	327	305	350
	342,6		346	340	390	362	
			395	395			
K-rut	265,4	267	275	270	276	275	268
	303	301	301	302	326	306	302
	347,4	353	351	343	402	375	352
			395	394			

En negraína móstranse os ombros

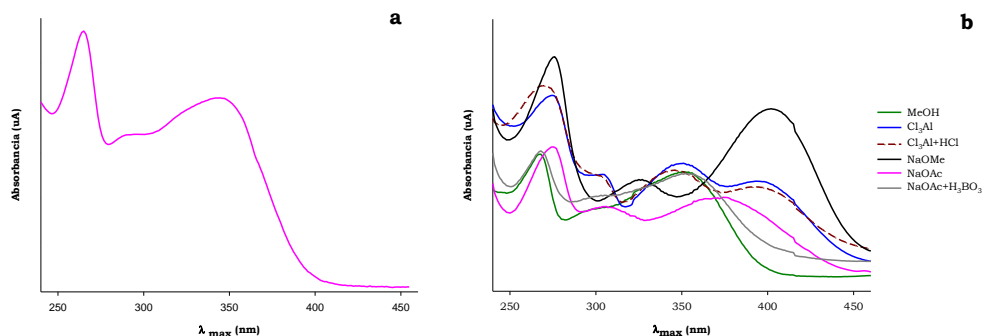


Figura 75. Características espectrais do composto descoñecido en DAD (a) e en MeOH e con modificadores do espectro (b).

Fracción 25.- Dos catro compostos que intentamos recoller nesta fracción (figura 76) con tempos de retención 19,4, 20, 20,8 e 21,4 min e coas características espectrofotométricas reflectidas na táboa 33 e figura 77, só o último deles permitiu facer algunha análise posterior; de feito, a pouca cantidade e a escasa resolución cromatográfica conseguida para o resto dos compostos, fixo imposible obter espectros en metanol suficientemente definidos. En calquera caso, e baseando as nosas afirmacións nos datos de DAD, debemos indicar que os tres primeiros compostos poderían ser, respectivamente, un ácido hidroxicinámico –o ácido *o*-coumárico polo seu tempo de retención-, un posíbel dihidroflavonol e un flavonol derivado glicosilado do kaempferol. Polo que fai ao último composto, dicir que tamén é un flavonol (que se corresponde co pico 40 da táboa 9), e que, de acordo cos datos proporcionados por Markham (1989) e tal e como confirman os resultados espectrofotométricos obtidos tanto en DAD como en UV-vis en metanol e ao engadirlle distintos axentes modificadores do espectro (táboa 33 e figura 77), trátase, unha vez máis, dun derivado glicosilado do kaempferol en posición 3.

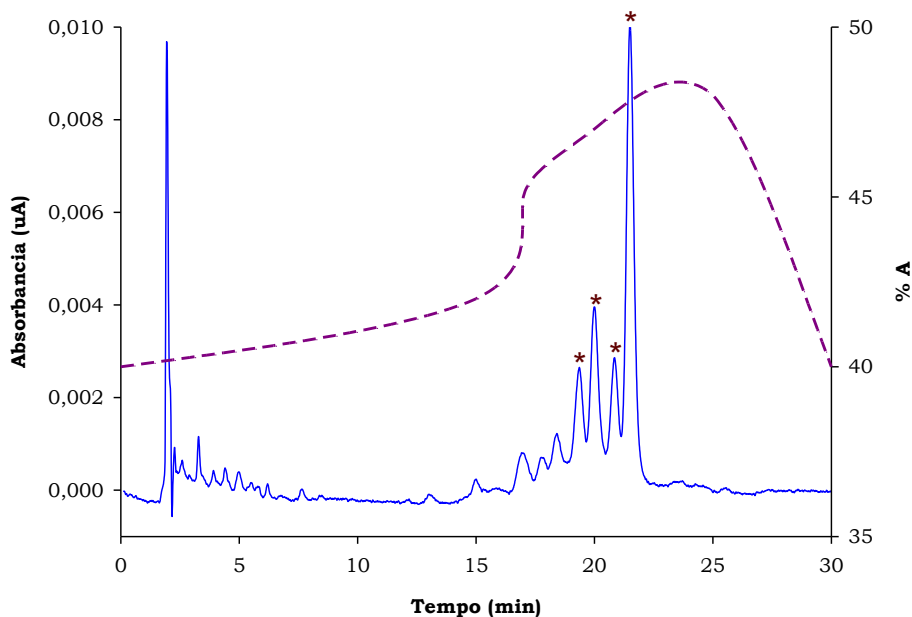


Figura 76. Cromatograma da fracción F25 adquirido a 280 nm.

Táboa 33. Características espectrais dos compostos descoñecidos e de distintos patróns.

Compostos	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	λ_{max} +HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1(<i>t_R</i> =19,4 min)	273 318,4	-	-	-	-	-	-
Desc 2(<i>t_R</i> =20,0 min)	292,3	-	-	-	-	-	-
Desc 3(<i>t_R</i> =20,8 min)	261,5 344,6	-	-	-	-	-	-
Desc 4(<i>t_R</i> =21,4 min)	265,1 289,7 345,8	267 298	276 303 348 397	274 301 345 393	276 326 402	275 305 367	268 302 352
K-gluc	265,1 295 347	267 298 351	276 303 348 397	274 301 345 393	276 326 402	275 305 367	268 302 352
K-rham	264,5 297 342,6	267 345	275 302 346 395	273 300 340 395	274 327 390	272 305 362	266 350
K-rut	265,4 303 347,4	267 301 353	275 301 351 395	270 302 343 394	276 326 402	275 306 375	268 302 352

En negraña móstranse os ombros

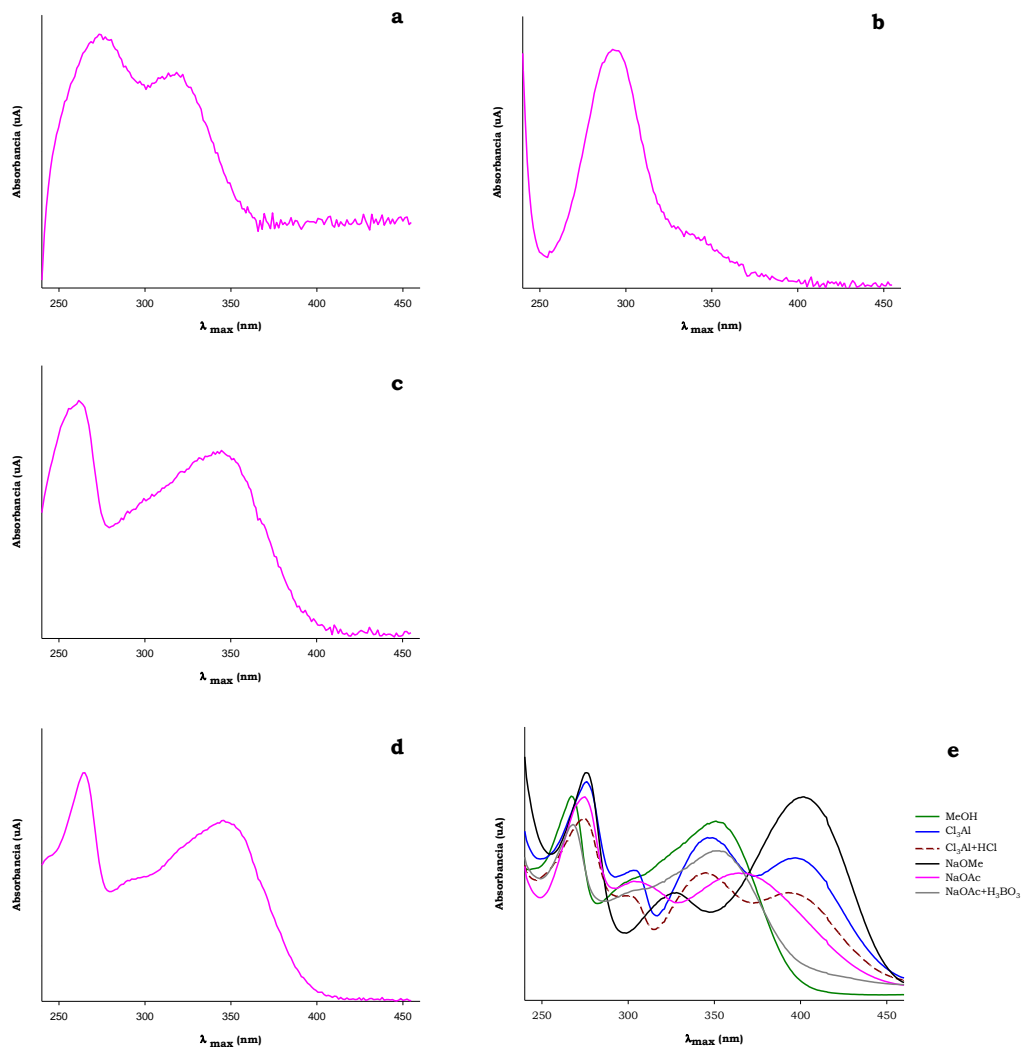


Figura 77. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, b, c, d) e en MeOH e con modificadores do espectro (e).

Fracción 26.- Nas novas condicións cromatográficas, nesta fracción, na que pretendiamos recoller tres compostos, aparecen catro picos (figura 78) que, dada a mala resolución cromatográfica e a escasa cantidade na que tres deles aparecen en relación co composto maioritario (de tempo de retención 4,8 min), non foi posíbel conseguir recoller coa pureza desexada en todos os casos.

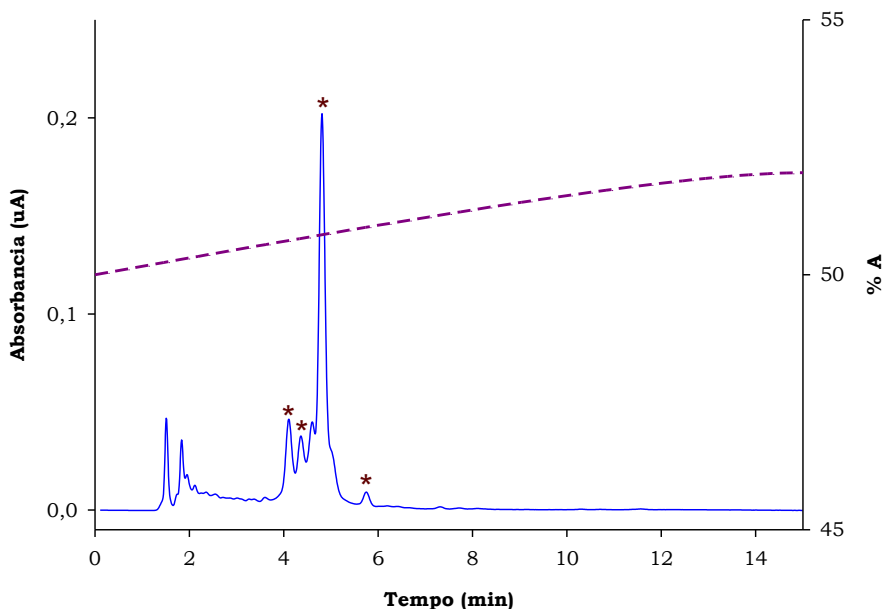


Figura 78. Cromatograma da fracción F26 adquirido a 280 nm.

Tendo en consideración tanto os espectros de absorción en DAD coma os obtidos en UV-vis en metanol e –cando foi posíbel- tras a adición dos axentes modificadores do espectro (táboa 34 e figura 79) podemos afirmar que os dous primeiros compostos de tempos de retención 4,1 e 4,4 min son dous flavonoides, derivados do kaempferol no primeiro dos casos e da quercetina no segundo, que se podería tratar do composto 42 da táboa 9. Todo fai pensar que o primeiro deles é contaminación do último pico da fracción anterior que coelúe neste caso cun composto que ten un máximo de absorbancia en 281,6 nm. Non debemos descartar tampouco que o segundo composto sexa un glicósido da isorhamnetina, pois estes derivados presentan un espectro en DAD (λ_{max} 254, 265sh, 300sh, 353 nm no caso do glucósido e do rutinósido) só lixeiramente diferente ao da meirande parte dos derivados glicosilados da quercetina (Markham, 1989). O espectro neutro do noso composto e o seu comportamento despois de engadir axentes modificadores do espectro son semellantes aos observados nos derivados glicosilados da isorhamnetina comerciais cos que se comparou; ademais, o seu tempo de retención coincide co do patrón do isorhamnetín-3-O-glucósido.

Táboa 34. Características espectrais dos compostos descoñecidos e dos patróns de referencia.

Compostos	λ_{\max}						
	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1(t _R =4,1 min)	267,9	265	265	265	d	d	-
	281,6?	287	347	343			
	341	349					
Desc 2(t _R =4,4 min)	254,5	256	270	270	273	275	256
	266,5	269	279	279	329	323	269
	287,9	359	304	304	414	415	358
	352,6		359	359			
			401	401			
Desc 3(t _R =4,8 min)	291,1	288	272	265	272	287	289
	340		313	314	326	329	335
			365				
Desc 4(t _R =5,7 min)	289,9	288	274	272	273	289	287
	335	339	312	312	325	340	338
			365				
Isorh-rut	254	256	270	268	273	275	256
	265	259	277	277	327	325	259
	300	299	302	302	415	373	299
	354,1	358	360	355			360
			403	401			
Isorh-gluc	254,5	253	270	270	273	275	256
	265	270	305	304	330	323	270
	300	358	360	358	414	415	358
	353		400	401			
K-gluc	265,1	267	276	274	276	275	268
	295	298	303	301	326	305	302
	347	351	348	345	402	367	352
			397	393			
K-rham	264,5	267	275	273	274	272	266
	297	345	302	300	327	305	350
	342,6		346	340	390	362	
			395	395			
K-rut	265,4	267	275	270	276	275	268
	303	301	301	302	326	306	302
	347,4	353	351	343	402	375	352
			395	394			
Taxifolin	291,1	290	313	313	245	292	291
	340	343	381	381	327	327	336
Astilbina	289,9	292	288	281	273	292	290
	340	340	313	313	327	328	340
Engeletina	292,7	292	271	264	271	287	289
	340	339	313	314	325	329	336
			366				

En negraña móstranse os ombros

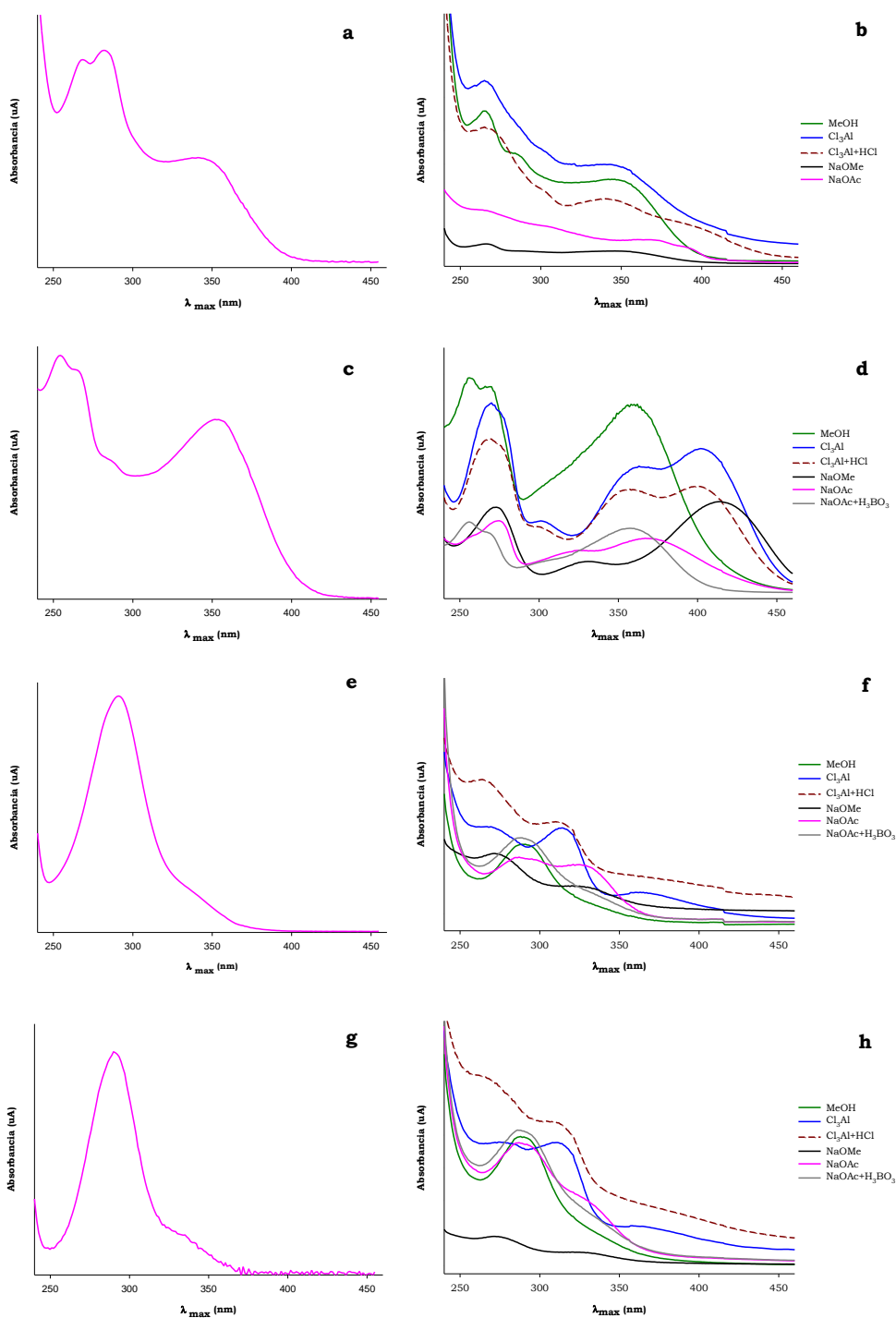


Figura 79. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c, e, g) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d, f, h).

Polo que fai aos compostos de tempo de retención 4,8 (que se corresponde co pico 41 da táboa 9) e 5,7 min, dicir que en ámbolos dous casos trátase de dihidroflavonóis (táboa 34 e figura 79). Os seus espectros en DAD, cun máximo de absorbancia arredor de 290 nm (291,1 e 289,9 nm, respectivamente) e un ombro en 340 nm no primeiro caso e en 335 nm no segundo, así o indican. Os datos espectrofotométricos obtidos para estes dous compostos tanto en metanol como unha vez que se engadiron distintos axentes modificadores do espectro, confirman este particular e permiten adiantar que estamos en presenza do dihidrokaempferol-3-*O*-rhamnósido (engeletina) –que xunto coa astilbina é un dos dihidroflavonóis maioritarios na vide (Masa e col., 2007)- e doutro dihidroflavonol do que non podemos concluír nada máis acerca da súa identidade.

Fracción 27.- Como se pode observar na figura 80, aparecen nesta fracción dous picos claramente resoltos con tempos de retención de 3,0 e 5,3 min.

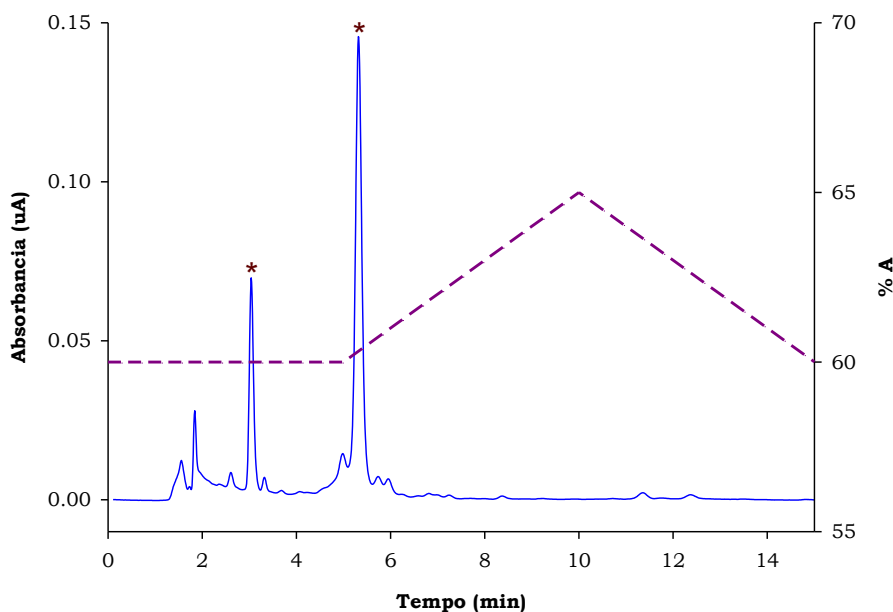


Figura 80. Cromatograma da fracción F27 adquirido a 280 nm.

As súas características espectrais en DAD corresponden a dous derivados estilbénicos (figura 81); o primeiro deles, con máximos de absorbancia en 306 e 318,4 nm, sería unha forma *trans*-, mentres que o segundo, que presenta un único máximo de absorbancia en 285,2 nm, sería unha forma *cis*-. Unha vez máis, ao non dispor de ningún outro patrón comercial que o do *trans*-resveratrol (que ten un tempo de retención máis alto que o noso composto) non podemos comparar os nosos resultados en UV-vis con ningún patrón. Diremos, iso si, que de acordo cos datos de Hillis e Ishikura (1968), Pezet e col. (2003), González-Barrio e col. (2006) e Guerrero e col. (2010a), podemos afirmar que o composto de tempo de retención 5,3 min debe ser o *cis*-piceido (que se corresponde co pico 45 da táboa 9) e que o de tempo de retención 3,0 min pode ser un isómero *trans*- dun derivado, probabelmente glicosilado, do resveratrol.

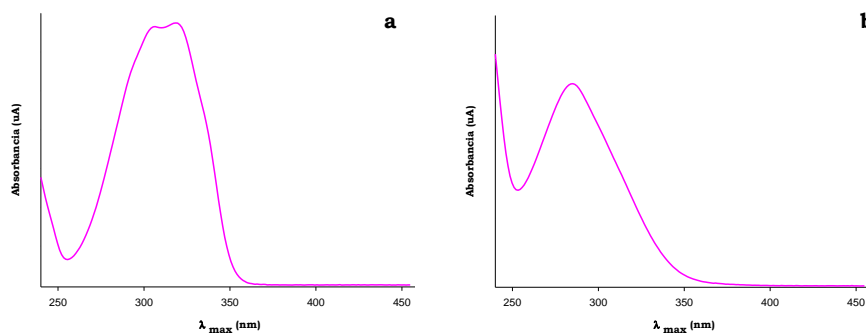


Figura 81. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, b).

Fracción 28.- Dos tres compostos recollidos nesta fracción (figura 82), os dous primeiros correspóndense cos picos 47 e 48 da táboa 9, un flavanoide con tempo de retención de 6,0 min e espectro en DAD cun máximo de absorbancia en 282,8 nm e un ombro en 330 nm, e un composto do que non coñecemos o grupo de compostos fenólicos ao que pode pertencer e que presenta un tempo de retención de 6,7 min e un espectro de absorbancia cun máximo en 258 nm e un ombro en 298 nm. Pola súa banda, o terceiro composto, cun tempo de retención en 8,3 min, presenta dous máximos de absorbancia en 276,9 e 309,2 nm (táboa 35 e figura 83). O composto de tempo de retención de 6,0 min presentou en metanol un espectro cun máximo de absorbancia en 278 nm que

só presenta un lixeirísimo desprazamento hipsocrómico con metóxido sódico, o que podería indicar a inexistencia de OH libres tanto na posición 5 como na 7 (Mabry, 1969; Grayer, 1989).

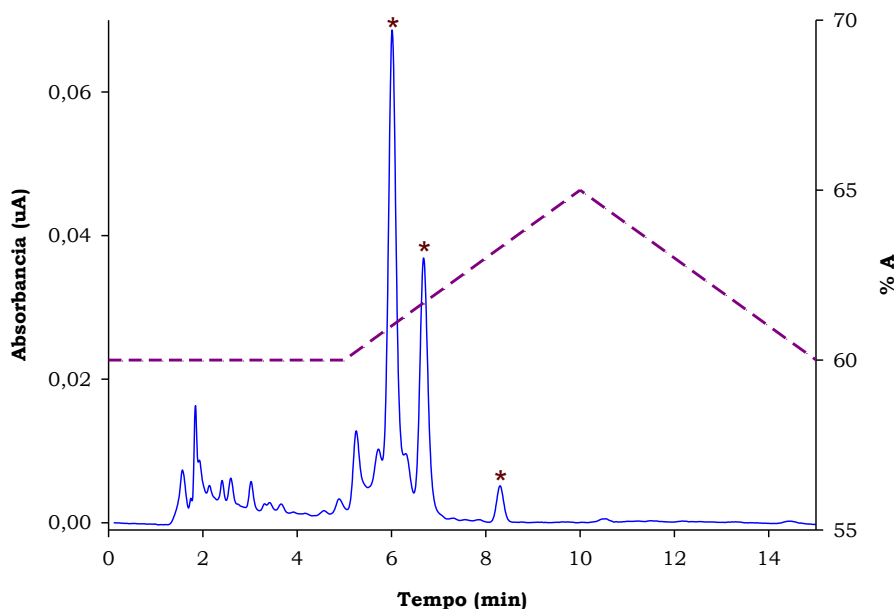


Figura 82. Cromatograma da fracción F28 adquirido a 280 nm.

Táboa 35. Características espectrais dos compostos descoñecidos.

Compostos	DAD	λ_{\max}					
		MeOH	Cl ₃ Al	+HCl	NaOMe NaOH	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1(<i>t_R</i> =6,0 min)	282,8; 330	278	280	280	274	277	278
Desc 2(<i>t_R</i> =6,7 min)	258; 298	260; 302	273	273	273	-	-
Desc 3(<i>t_R</i> =8,3 min)	276,9; 309,2						

En negra se mostran os ombros; en cor azul os valores de absorbancia con NaOH.

O segundo composto, de tempo de retención 6,7 min, presenta un espectro en metanol cun máximo de absorbancia en 260 nm e un ombro en 302 nm; a adición de cloruro de aluminio provoca un desprazamento batocrómico de 13 nm que non se modifica con ácido clorhídrico, curiosamente o mesmo desprazamento que provoca a adición de hidróxido sódico. Polo que fai ao terceiro composto dicir que só foi posíbel obter un espectro pouco definido en

metanol, polo que non podemos adiantar máis nada sobre a súa identidade (táboa 35 e figura 83). Con todo, intuimos que en ámbolos dous casos se debe tratar de derivados benzoicos (Van Sumere, 1989).

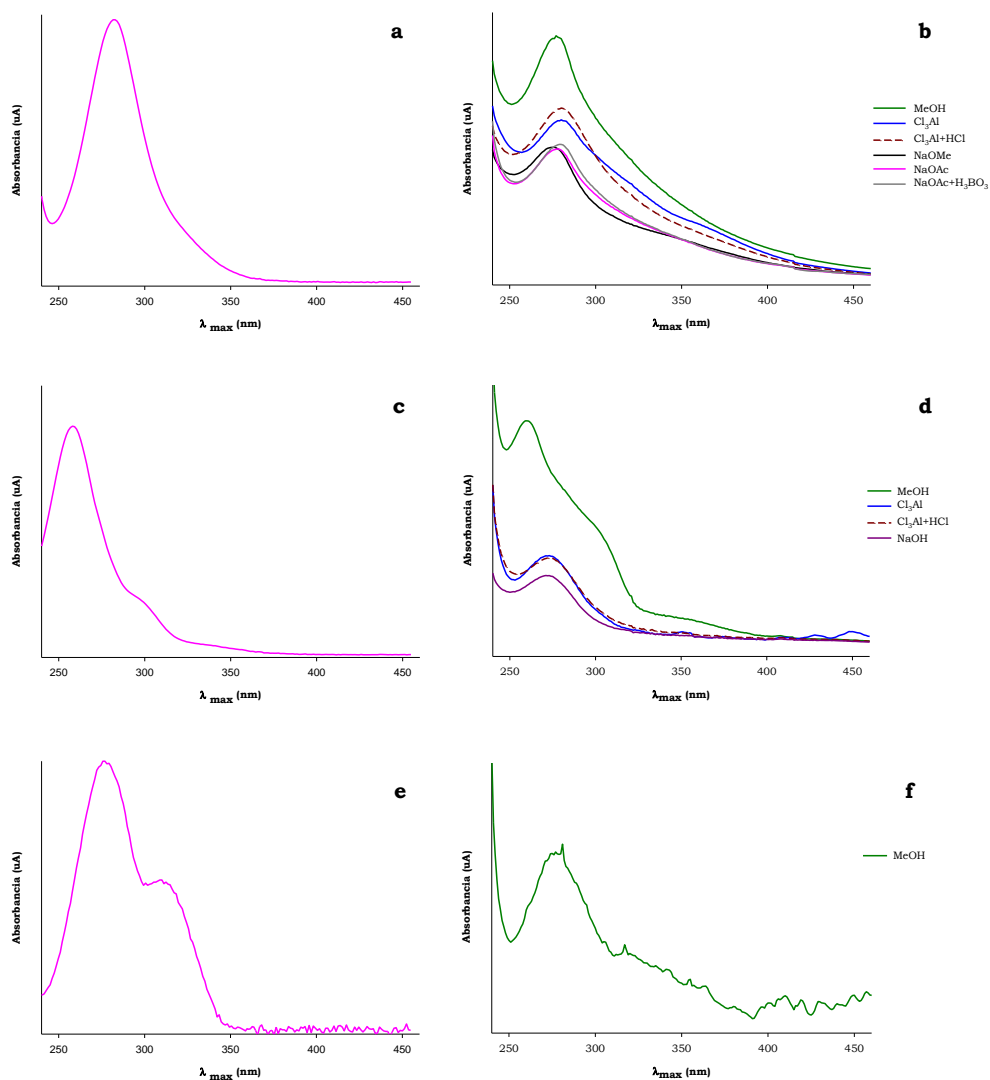


Figura 83. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c, e) e en MeOH e con modificadores do espectro (b, d, f).

Fracción 29.- Pretendiamos recoller nesta fracción o pico 51 da táboa 9, un estilbeno con dous máximos de absorbancia no seu espectro de absorción en DAD en 305,3 e 319 nm e que polo seu tempo de retención entendiamos podía ser o *trans*-resveratrol. Unha vez recromatografiada esta fracción en distintas condicións cromatográficas, temos atopado varios picos (figura 84).

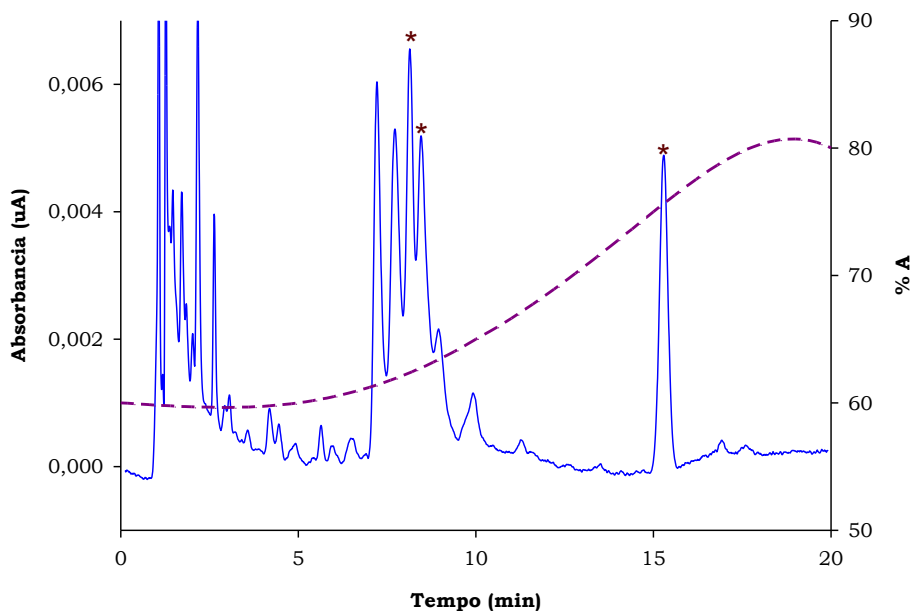


Figura 84. Cromatograma da fracción F29 adquirido a 280 nm.

Táboa 36. Características espectrais dos compostos descoñecidos e dos patróns de referencia.

Compostos	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	λ_{max}			
				+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1(<i>t_R</i> =8,1 min)	305,3 319	307 321	307 321	d	323 344	307 321	307 321
Desc 2(<i>t_R</i> =8,5 min)	260 284 341 357	-	-	-	-	-	-
Desc 3(<i>t_R</i> =15,3 min)	285,0	287	287 363	266	276 315	285	287
<i>t</i> -resveratrol	305 318	305 318	307 321	305 320	318 340	305 318	305 318
<i>c</i> -resveratrol	285,0	285	285 360	265	275 313	285	285

En negra mostráanse os ombros

Polos seus espectros en DAD podemos indicar que os dous primeiros, de tempo de retención 7,2 e 7,7 min, son os dous últimos da fracción anterior, e non foron recollidos nesta ocasión. Dos outros tres, que si foron recollidos, só foi posíbel obter espectros cunha certa estabilidade para os de tempo de retención 8,1 e 15,3 min.

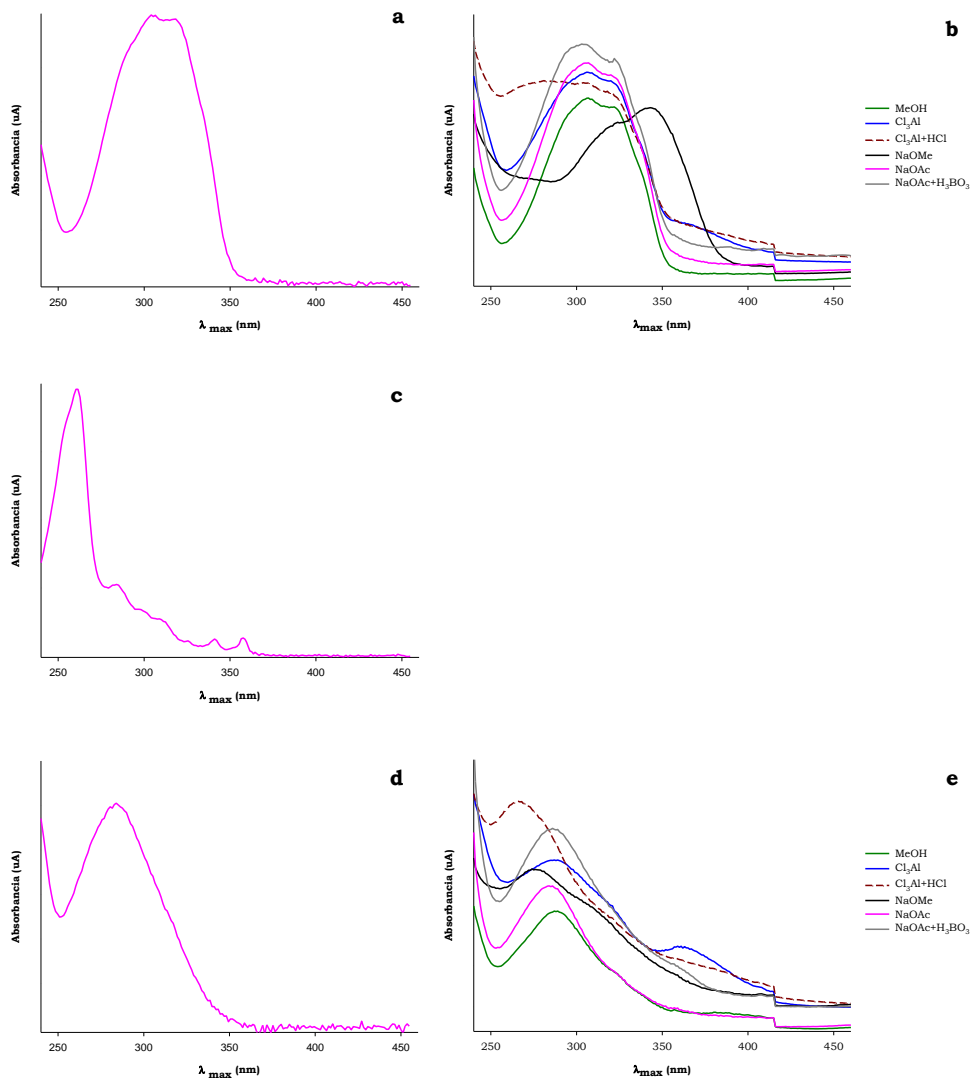


Figura 85. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c, d) e en MeOH e con modificadores do espectro (b,e).

Na táboa 36 e figura 85 amósanse as características espectrais tanto en DAD como en metanol e logo da adición dos axentes modificadores do espectro para estes dous; hai que facer constar que o patrón *cis*-resveratrol obtívose mediante exposición do *trans*-resveratrol á radiación UV a 365 nm.

Baseándonos nos resultados espectrofotométricos acadados (Hillis e Ishikura, 1968) podemos indicar que o composto de tempo de retención 8,1 min é a forma *trans*- do resveratrol, e que o composto de tempo de retención 15,3 min é o isómero *cis*- dun estilbeno (λ_{max} 284 nm), probabelmente do propio resveratrol (táboa 36). Por outra banda, o composto de tempo de retención 8,5 min, presenta un espectro con catro máximos de absorbancia en 261,5, 284,9, 341 e 357,7 nm, e todo indica que se trata dun composto que –de acordo co recollido na bibliografía- fórmase a partir do *trans*-resveratrol pola acción da radiación UV. En efecto, diversos autores teñen referido a presenza deste composto en mostras de uvas ou viños. Nun principio, Siemann e Creasy (1992) identificaron este composto como a forma *cis*- do resveratrol, que obtiñan mediante exposición do isómero *trans*- á radiación UV. Este mesmo composto é detectado en viños por Roggero (1996), aínda que neste caso non o identifica como o isómero *cis*- do resveratrol e simplemente fala dun composto fluorescente descoñecido. Máis adiante, López-Hernández e os seus colaboradores (2007) estudian os cambios que se producen a partir do *trans*-resveratrol pola acción da luz UV de lonxitude de onda longa (a 360 nm) e observan que o composto en cuestión é o resultado da transformación do *cis*-resveratrol, forma isomérica que –á súa vez- é o resultado da acción da luz UV sobre o *trans*-resveratrol.

Co obxectivo de estudar o proceso de transformación do *trans*-resveratrol pola acción da luz UV e de comprobar si efectivamente este composto do que vimos falando é un produto desta transformación, unha disolución metanólica de *trans*-resveratrol (0,075 mg/mL) foi sometida de forma progresiva a distintos tempos de exposición á radiación dunha lámpada de luz UV de onda longa (365 nm) situada a unha distancia de 3,5 cm. Previamente comprobamos a pureza

da citada disolución mediante HPLC-DAD, considerando o cromatograma resultante coma o cromatograma de tempo cero do experimento. Os tempos de exposición foron de 5, 15, 20, 30 e 60 min, e os resultados aparecen recollidos na táboa 37 na que figuran as áreas dos picos correspondentes aos tres compostos obxecto do estudo (*trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol e o descoñecido) que, evidentemente, dan idea da concentración de cada un destes compostos ao longo do experimento.

Como podemos ver, a concentración do *trans*-resveratrol vai diminuindo na mostra a medida que aumenta o tempo de exposición á radiación UV, o que coincide coa aparición da forma isomérica *cis*-; así, aos 5 min de exposición podemos observar xa unha importante concentración deste isómero, que sofre logo (a partir do minuto 15) unha progresiva e continuada diminución da concentración que coincide coa aparición do composto descoñecido. Así pois, semella demostrado que este composto descoñecido, de tempo de retención 8,5, é o produto da transformación do *cis*-resveratrol pola acción da luz UV.

Táboa 37. Áreas dos produtos da transformación do do *trans*-resveratrol tras a exposición á UV.

Tempo exposición (min)	<i>t</i>-resveratrol	<i>c</i>-resveratrol	estilbenoide
0	1211594	-	-
5	89797	311522	-
15	64365	222633	24172
20	57368	192264	49514
30	34916	119671	47588
60	15348	64792	42629

Na figura 86 representamos de forma comparada os cromatogramas obtidos e nos que se observa a existencia doutros compostos intermediarios no proceso da transformación do *trans*-resveratrol, compostos que non imos considerar na discusión por non estar presentes nas nosas mostras. A aparición destes outros compostos intermediarios, xustifica a relación entre os valores de área acadados para os tres compostos de interese e a diminución que experimenta o composto descoñecido a partir dos 20 minutos de exposición.

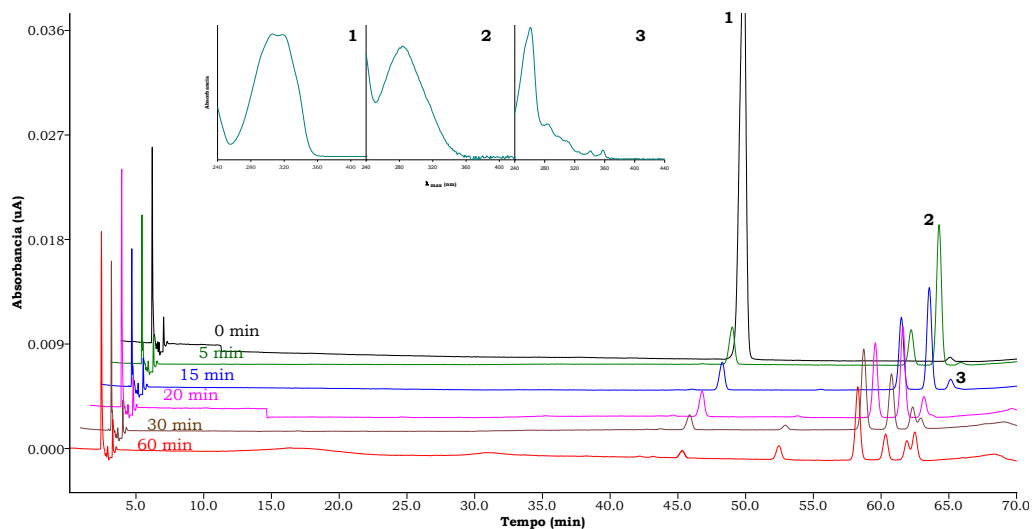


Figura 86. Cromatogramas da transformación do *trans*-resveratrol tras a exposición á UV adquiridos a 305 nm.

Fracción 30.- Son dous os compostos recollidos nesta fracción (figura 87), con tempos de retención 12,1 e 15,7 min respectivamente.

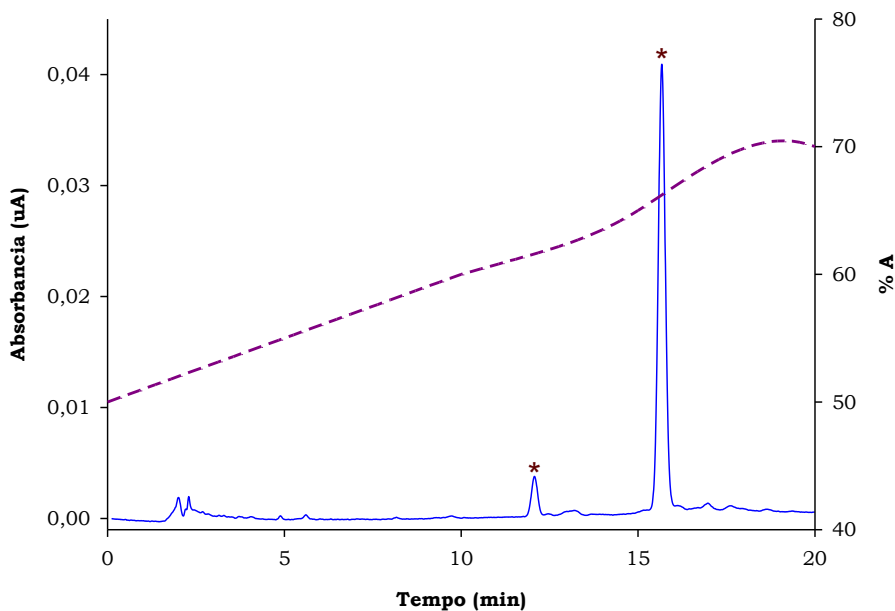


Figura 87. Cromatograma da fracción F30 adquirido a 280 nm.

Ámbolos dous compostos presentaron uns espectros de absorción en DAD semellantes (figura 88), con máximos en 265,1 e 262,7 nm, respectivamente, sendo o último deles o pico 52 da táboa 9. Os espectros en metanol (con máximos de absorbancia en 257 nm para o primeiro e en 268 nm no caso do segundo) e logo de engadirlle distintos axentes modificadores do espectro non permiten máis que falar de dous posíbeis derivados benzoicos.

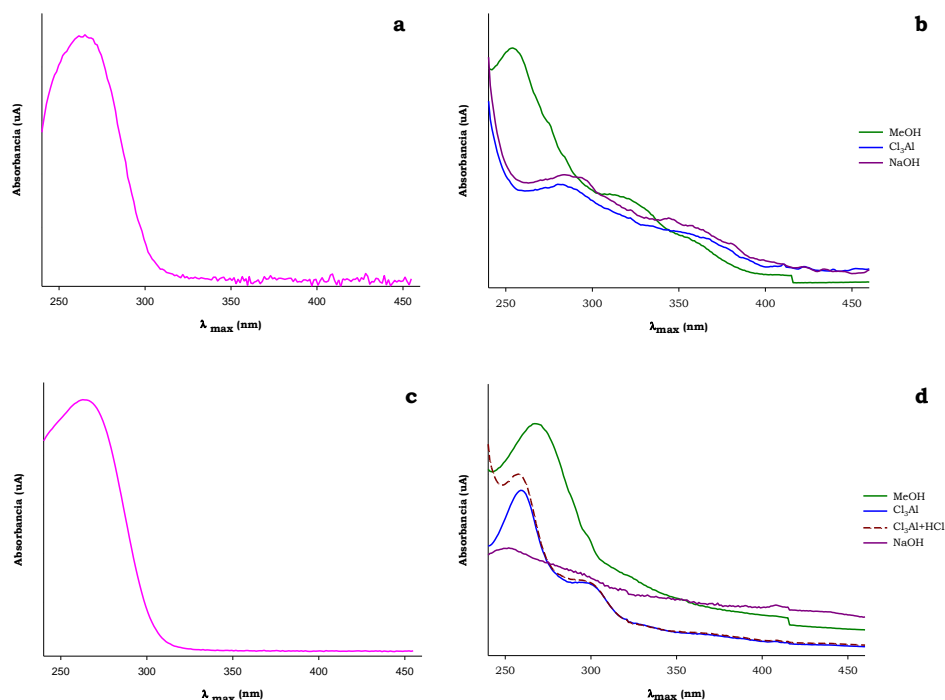


Figura 88. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c) e en MeOH e con modificadores do espectro (b,d).

Fracción 31.- Dos tres compostos recollidos nesta fracción (figura 89), con tempos de retención 15,7, 17 e 17,7 min, o primeiro semella ser o último da fracción anterior, e os outros dous, que presentan uns espectros de absorción en DAD con máximos en 287,5 e 308,9 nm, respectivamente, presentaron uns

máximos de absorbancia en metanol en 277 nm no primeiro caso e de 283 nm no segundo (táboa 38 e figura 90).

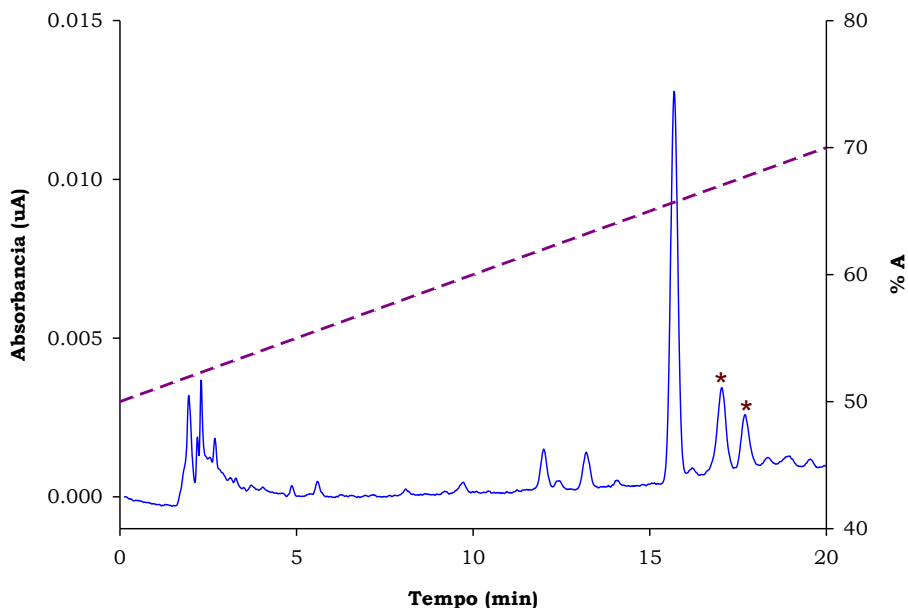


Figura 89. Cromatograma da fracción F31 adquirido a 280 nm.

Táboa 38. Características espectrais dos compostos descoñecidos.

Compostos	λ_{max}						
	DAD	MeOH	Cl ₃ Al	+HCl	NaOMe	NaOAc	+H ₃ BO ₃
Desc 1 (t _R =17,0 min)	287,5	277	277	277	d	d	-
Desc 2 (t _R =17,7 min)	308,9	283	283	283	d	d	-

Tal e como se pode observar na táboa 38 e na figura 90, en ningún dos casos os máximos de absorbancia do espectro neutro foron modificados en presenza de cloruro de aluminio e cloruro de aluminio/ácido clorhídrico, non sendo posíbel, ademais, conseguir espectros suficientemente definidos tras a adición de metóxido sódico nin cando se engadiu acetato sódico, que provocaron en ámbolos dous casos e para os dous compostos a súa descomposición. Estes resultados non permiten concluír nada acerca da identidade destes dous compostos.

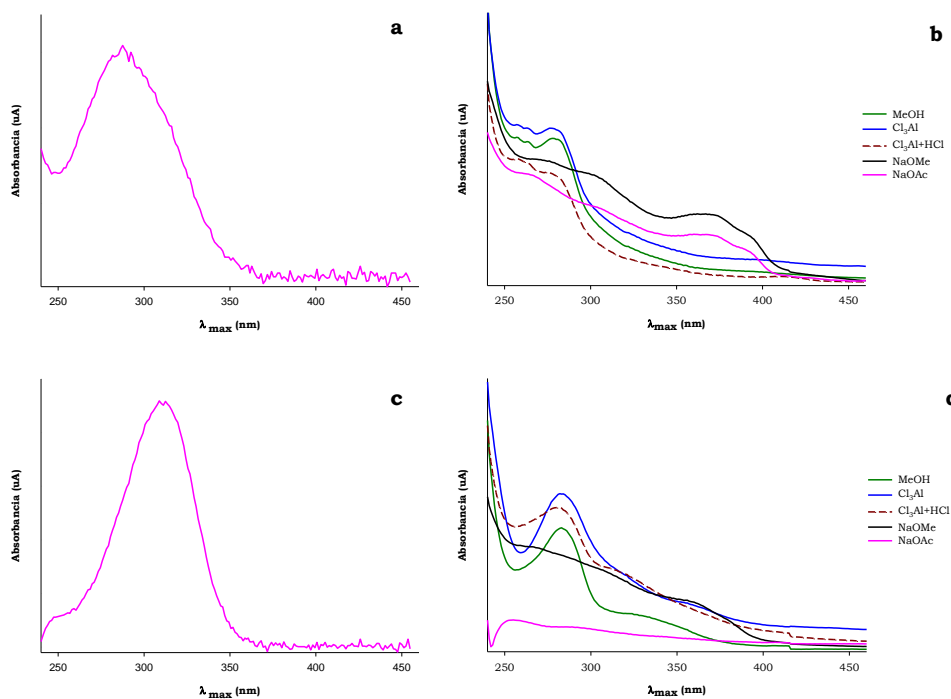


Figura 90. Características espectrais dos compostos descoñecidos en DAD (a, c) e en MeOH e con modificadores do espectro (b,d).

Como resumo dos resultados obtidos na análise das 31 fraccións recollidas, podemos indicar que foi posíbel separar un total de 73 compostos dos que 62 foron identificados total (17) ou parcialmente (45); deles 14 son derivados benzoicos (entre outros o ácido gálico, o ácido protocatéquico e o vanílicco metil-éster), 12 son derivados hidroxicinánicos (entre eles o 4-*O*- β -D-glucósido do ácido *p*-coumárico, o *cis*- e *trans*-caftárico, o *cis*- e *trans*-coutárico, o ácido cafeico e o ácido *p*-coumárico), 9 glicósidos de flavonoides (4 derivados da quercetina, 4 do kaempferol e 1 da isorhamnetina), 8 flavan-3-óis entre os que están a (+)-catequina e a (-)-epicatequina, 12 flavanoides dos que 9 son dihidroflavonoides (a astilbina e a engeletina, entre outros) e 7 derivados estilbénicos, entre os que están o *cis*-piceido e o *cis*- e *trans*-resveratrol.

Resulta evidente que unha das nosas principais limitacións foi a escasa cantidade de mostra que, para a maioría dos compostos, conseguimos recoller

coa metodoloxía empregada; son, en efecto, moitas as ocasións nas que non resulta posíbel obter tan sequera espectros de absorción UV-vis cunha mínima estabilidade que permita a identificación fiábel do composto en cuestión. E foron moitos os casos nos que non puidemos obter espectros claros cos axentes modificadores, unha circunstancia que atribuímos á formación de aductos coa fase móbil. Requírese, ao noso entender, botar man dalgunha metodoloxía preparativa que permita resolver estes problemas. Optamos nun primeiro momento pola separación cromatográfica en HPLC semipreparativa cunha columna XTerra Prep MS C18 (5 μ m x 10 x 150 mm), observando que, aínda que conseguimos traballar cun maior volume de mostra en cada análise, debido ás características analíticas da nosa equipa cromatográfica, a perda de resolución que se produce na separación impide a mellora dos resultados. Así as cousas, probamos a utilizar a PC preparativa, que si ben é certo é unha metodoloxía antiga, tennos dado moi bos resultados en traballos anteriores de identificación de compostos fenólicos en mostras de uva de diferentes castes (Pomar e col., 2005; Masa e col., 2007; Masa e Vilanova, 2008).

SEPARACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA EN PAPEL (PC)

Seguindo a metodoloxía descrita no apartado de material e métodos, empregamos a cromatografía preparativa descendente en papel para tratar de separar algún dos compostos que, ben pola súa baixa concentración ou ben porque poidan coeluir xunto con algún outro, non foi posíbel recoller e/ou identificar nas fraccións de HPLC separadas previamente. Convén sinalar que aínda que o comportamento cromatográfico das nosas mostras en PC en auga non vai ser o mesmo que o obtido previamente en HPLC, é de agardar que nas bandas de factor de retención (R_f) máis baixos estean aqueles compostos que presentaban tempos de retención máis altos en HPLC e, así mesmo, que os compostos de tempos de retención máis baixos en HPLC estean presentes nas bandas de R_f máis altos en PC. Nestas condicións foi posíbel separar e analizar un total de 8 bandas que presentaron as características cromatográficas (R_f) e o comportamento en UV e UV+NH₃ que se recollen na táboa 39.

Táboa 39. Características cromatográficas das bandas recollidas mediante PC.

Nº de banda	R _f	UV	+ NH ₃
I	0 – 6	violeta	azul brillante
II	7 – 18	absorbente	amarelo+verde
III	20 – 28	violeta	azul
IV	28 – 35	absorbente	amarelo
V	35 – 39	violeta	azul
VI	40 – 46	absorbente	absorbente
VII	49 – 56	violeta	azul
VIII	59 – 69	azul brillante	verde

Como é sabido, na meirande parte dos casos, os compostos fenólicos non son detectábeis no visíbel polo que se fai necesaria a observación dos cromatogramas baixo a luz UV. Resulta de gran interese observar tamén os cromatogramas despois de sometelos a vapores de amoníaco, xa que provocan a ionización de certos radicais das moléculas dando lugar a modificacións nas cores, características de cada un dos distintos grupos de compostos fenólicos (Steck, 1967; Harborne, 1984; Gorham, 1995; Bohm, 1998). De acordo con estes autores, os compostos absorbentes en UV deberán ser flavonoides, tanto flavonoides derivados da quercetina e isorhamnetina (que cambian a amarelo cos vapores de amoníaco, bandas II e IV) ou do kaempferol (que dan cor verde ao expoñelos aos vapores deste reactivo, banda II), como flavanoides, que incrementan a súa absorbancia baixo a acción do amoníaco, un comportamento moi característico dos dihidroflavonoides (banda VI). O resto dos compostos serán derivados benzoicos, hidroxicinámicos ou estilbénicos; debemos indicar que o cambio de azul a verde observado na banda VIII é moi característicos dalgúns hidroxicinámicos (particularmente daqueles derivados dos ácidos ferúlico e cafeico), mentres que a intensa fluorescencia azul baixo os vapores de amoníaco (banda I) pódese atribuír aos estilbenos. As distintas bandas foron eluídas con metanol/auga (8:2, v/v) e o volume recollido foi concentrado no rotavapor e empregado para a separación e identificación dos compostos fenólicos mediante HPLC-DAD e LC/ESI-MS-MS.

SEPARACIÓN MEDIANTE HPLC E ANÁLISE CON DETECTOR DE DIODOS (DAD) E MASAS-MASAS (ESI-MS/MS)

A separación en HPLC dos compostos presentes en cada unha das bandas procedentes da PC preparativa, realizouse cunha columna C18 X-Terra de Waters ($dp= 5 \mu\text{m}$, $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm d.i.}$), nas mesmas condicións utilizadas previamente na análise dos extractos brutos (apartado 3 de material e métodos) e co gradiente da táboa 2. Para cada banda preséntase un cromatograma, capturado naquela lonxitude de onda na que os compostos maioritarios absorben con maior intensidade. Cando foi necesario, recolléronse os picos e fixéronse as correspondentes hidrólises (apartado 8 de material e métodos).

Banda I

En base aos espectros en DAD, pódese afirmar que os compostos observados nesta banda (figura 91) son, maioritariamente, de natureza estilbénica, podéndose constatar ademais a presenza dun derivado benzoico (pico 7) e a dous posíbeis derivados hidroxicinámicos (picos 1 e 9).

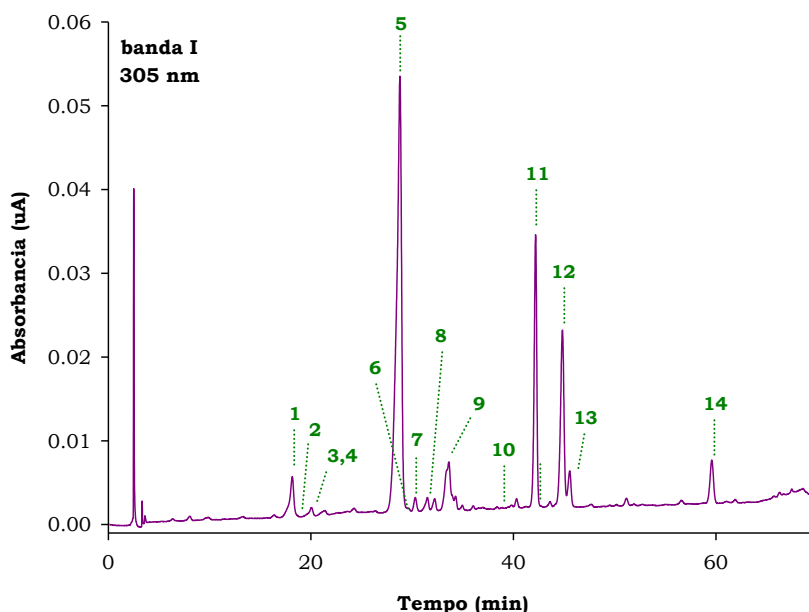


Figura 91. Cromatograma HPLC-DAD da banda I capturado a 305 nm.

Composto 1 (t_R 18,2 min)

Presenta un espectro en DAD cun máximo de absorción en 323,6 nm e un ombro en 303,6 nm, o que nos leva a pensar que se puidera tratar dun derivado hidroxicinámico (Mozetič e col., 2006), un suposto que non se viu referendado tras as análises de masas acadados en ESI-MS (figura 92). De acordo con estas análises, este composto presenta un ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 405 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 243 m/z; ademais, a perda dun fragmento de 162 uma fainos pensar que se trate dun composto glicosilado. Ao comparar estes resultados cos acadados por Carando e col. (1999) e Guerrero e col. (2010a), podemos confirmar que se trata da astringina, un glucósido do piceatannol, na súa forma isomérica *trans* segundo se pode deducir do seu espectro en DAD (Hillis e Ishikura, 1968). Indicar que, ademais do ión pseudomolecular a 405 m/z que é o maioritario, atopamos o seu aducto co ácido acético a 465 m/z cunha abundancia relativa do 33 % e outro ión a 441 m/z cunha abundancia relativa do 88 %.

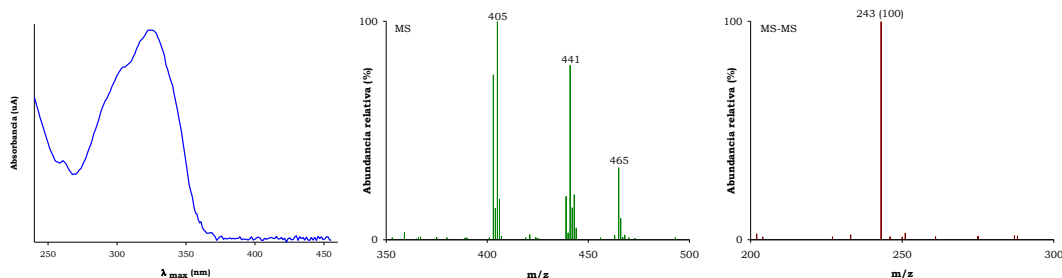


Figura 92. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 1 da banda I.

Composto 2 (t_R 18,5 min)

O espectro en DAD para este composto, con catro máximos de absorción en 260,7, 297,4, 330,7 e 397,5 nm (figura 93) indica que se trata dun composto que se forma pola acción da radiación UV a partir dos estilbenos, tal e como xa explicamos con anterioridade (páxina 159); en calquera caso, non foi posíbel obter ningún ión pseudomolecular en ESI-MS que axude na súa identificación.

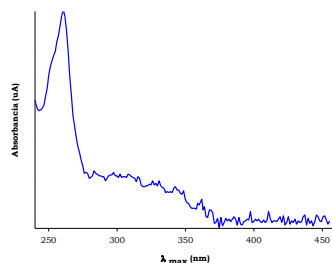


Figura 93. Espectro de DAD do composto 2 da banda I.

Composto 3 (tr 19,7 min)

Os datos dos espectros de masas acadados en ESI-MS (figura 94) para este composto coinciden cos obtidos para o composto 1, cun ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 405 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 243 m/z; o seu espectro en DAD, cun máximo de absorción en 285 nm indican os que neste caso estamos ante a *cis*-astringina (Hillis e Ishikura, 1968; Carando e col., 1999; Guerrero e col., 2010a). Neste caso, ademais do ión pseudomolecular maioritario, a 405 m/z, atopamos outro ión a 441 m/z cunha abundancia relativa do 32 %.

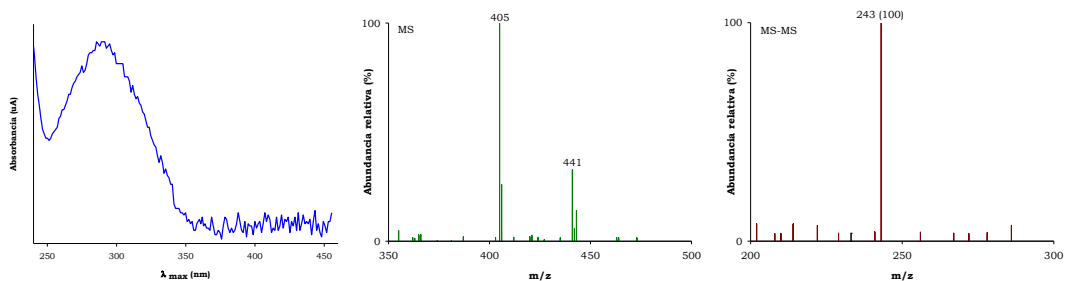


Figura 94. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 3 da banda I.

Composto 4 (tr 20,0 min)

A presenza de dous máximos de absorción en DAD en 305,7 e 318,9 nm indica que se trata dun *trans*-estilbeno (Hillis e Ishikura, 1968), e o seu espectro de

masas en ESI-MS (figura 95), cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 389 m/z , indica a existencia dun azucre de 180 uma na molécula, o que faría pensar que se trata do *trans*-piceido (Waterhouse e Lamuela-Raventóns, 1994; Vian e col., 2005; Sun e col., 2007), por máis que non coincidan os tempos de retención de un e outro (Ribeiro de Lima e col., 1999). Todo fai pensar, xa que logo, que se trata doutra forma glicosilada do *trans*-resveratrol de igual peso molecular, aínda que non foi posíbel confirmar a súa identidade ao non poder obterse ións de fragmentación MS/MS. Dicir, en calquera caso, que Pawlus e col. (2012) na súa revisión sobre estilbenos en viño e no xénero *Vitis*, citan dous glucósidos do *trans*-resveratrol, o resveratrol-2-C-glucósido (descrito por Baderschneider e Winterhalter no ano 2000) e o resveratrolósido (coa glucosa en posición 4') que foi descrito en cultivos de células en suspensión de *Vitis vinifera* L. por Waffo-Têguo e col. no ano 1998 e Krisa e col. no 1999.

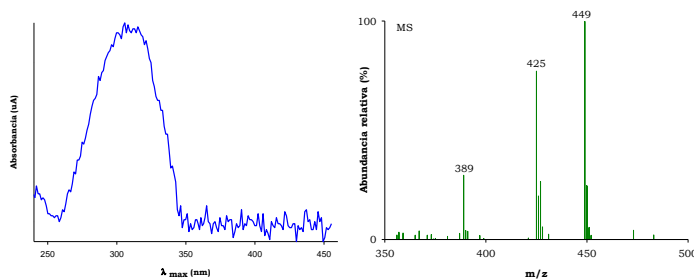


Figura 95. Espectros de DAD e ESI-MS do composto 4 da banda I.

Para este composto o seu ión pseudomolecular ten unha abundancia relativa de só o 28 %, sendo o ión maioritario o seu aducto co ácido acético (a 449 m/z); tamén aparece outro ión a 425 m/z cunha abundancia relativa do 77 %.

Composto 5 (t_R 28,8 min)

A comparación das características cromatográficas e espectrais en DAD (λ_{max} 308 e 318,9 nm) e en ESI-MS ($[M-H]^-$ a 389 m/z , ión MS/MS a 227 m/z) acadadas para este composto (figura 96) coas proporcionadas na bibliografía (Vian e col., 2005; Sun e col., 2007) permítenos indicar que estamos en presenza do *trans*-piceido. Indicar neste caso que ao observar o espectro de

masas deste composto, ademais do ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 389 m/z existe outro a 449 m/z , que entendemos correspóndese cun aducto resultado da interacción entre o ácido acético da fase móbil e o composto estilbénico ($[M(390)+CH_3COOH-H]^-$). Tal e como sucede para o composto anterior, tampouco o ión pseudomolecular deste composto (cunha abundancia relativa do 42 %) é o maioritario, senón o seu aducto co ácido acético (a 449 m/z); indicar que aparece outro ión a 425 m/z que ten unha abundancia relativa do 43 %.

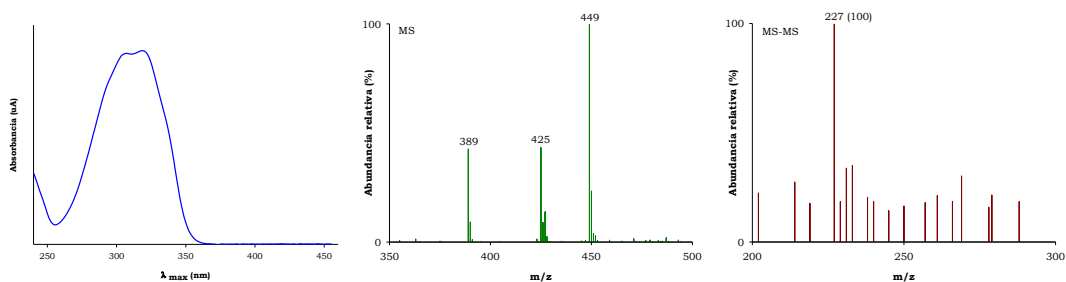


Figura 96. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 5 da banda I.

Composto 6 (tr 29,5 min)

Trátase dun composto semellante ao composto 2 xa descrito, cun espectro en DAD con catro máximos de absorción en 260,7, 297,4, 330,7 e 397,5 nm (figura 97), que –como xa indicamos– fórmase a partir dos isómeros *cis* dos estilbenos pola acción da radiación UV; como naquel caso, non foi posíbel obter ningún ión pseudomolecular en ESI-MS.

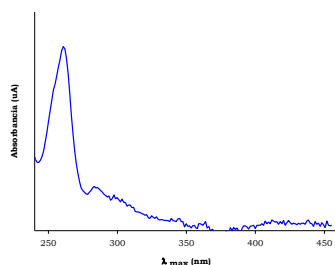


Figura 97. Espectro de DAD do composto 6 da banda I.

Composto 7 (tr 30,3 min)

O seu espectro en DAD presenta dous máximos de absorción en 253,6 e 363,8 nm e un ombro en 307,5 nm, un espectro que é moi característico do ácido eláxico; a observación dos espectros de masas acadados en ESI-MS (figura 98) cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 301 m/z e dous ións de fragmentación MS/MS a 137 e 198 m/z, con abundancias relativas do 100 e 7 % respectivamente, permite confirmar que nos encontramos en presenza deste ácido benzoico. En efecto, de acordo con Lee e col. (2005), o ácido eláxico presenta unha masa de 302 uma e o mesmo patrón de fragmentación que o composto descoñecido. Ademais, estes resultados coinciden cos acadados para o ácido eláxico comercial analizado por nós nas mesmas condicións que a mostra.

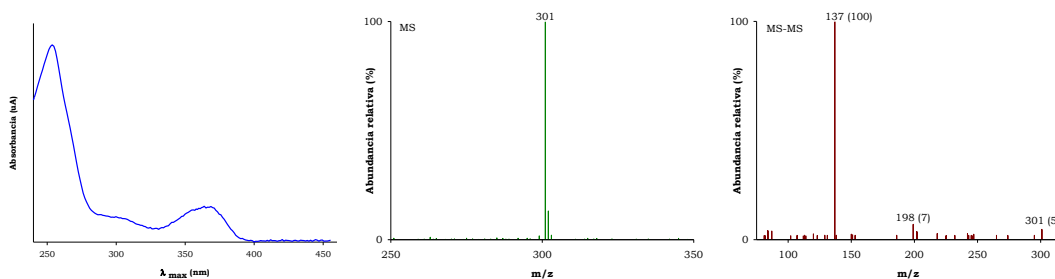


Figura 98. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 7 da banda I.

Composto 8 (tr 31,5 min)

Todo indica que nos atopamos diante dunha nova forma *trans* dun estilbeno; cun espectro en DAD con dous máximos de absorción a 305 e 317,6 nm e un espectro de masas en ESI-MS cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 405 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 243 m/z (figura 99), coincide cos datos acadados para o composto 1, a *trans*-astringina, por máis que presente un tempo de retención máis elevado. Como sucedía co piceido para o composto 4, trátase dunha forma glicosilada de similar masa molecular á da astringina.

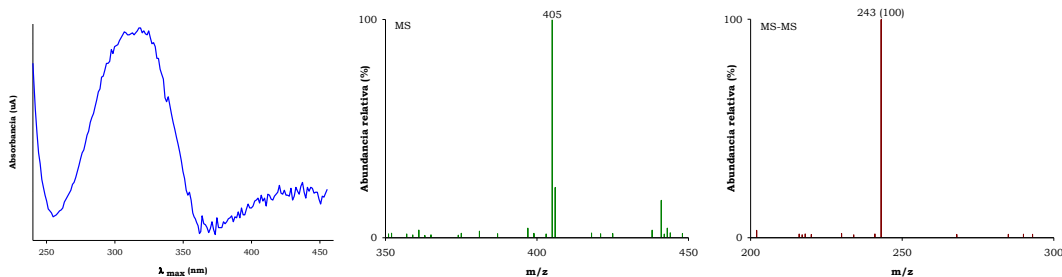


Figura 99. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 8 da banda I.

Composto 9 (tr 33,6 min)

Aínda que non foi posíbel obter ningún ión pseudomolecular en ESI-MS para este composto, o seu espectro en DAD, cun máximo de absorción en 324,8 nm e un ombro en 303,2 nm (figura 100), permite pensar que estamos diante dun derivado hidroxicinámico (Mozetič e col., 2006); en calquera caso, non se pode descartar a posibilidade de que se trate doutro estilbeno tal e como sucedía co composto 1. En efecto, os datos proporcionados por Guerrero e col. (2010a) indican que algunhas viniferinas presentan tamén este tipo de espectros en DAD.

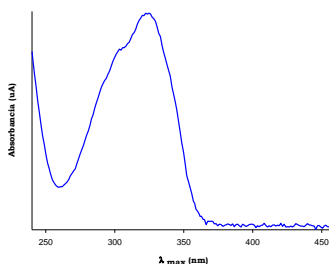


Figura 100. Espectro de DAD do composto 9 da banda I.

Composto 10 (tr 37,0 min)

Do mesmo xeito que sucedía para os compostos 2 e 6, este composto presenta un espectro en DAD con catro máximos de absorción en 260,7, 297,4, 330,7 e 397,5 nm (figura 101) e tampouco foi posíbel neste caso obter ningún ión

pseudomolecular en ESI-MS; unha vez máis estamos en presenza dun composto que se forma a partir dos estilbenos pola acción da radiación UV.

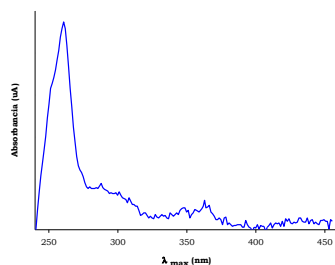


Figura 101. Espectro de DAD do composto 10 da banda I.

Composto 11 (tr 42,2 min)

As características cromatográficas e espectrais tanto en DAD (λ_{\max} 285,5 nm) como en ESI-MS ($[M-H]^-$ a 389 m/z, ión MS/MS a 227 m/z) acadadas para este composto (figura 102) coinciden coas atopadas na bibliografía (Vian e col., 2005; Sun e col., 2007) para o *cis*-piceido. Xunto ao seu ión pseudomolecular que é o maioritario, aparece outro ión a 425 m/z cunha abundancia relativa do 35 %.

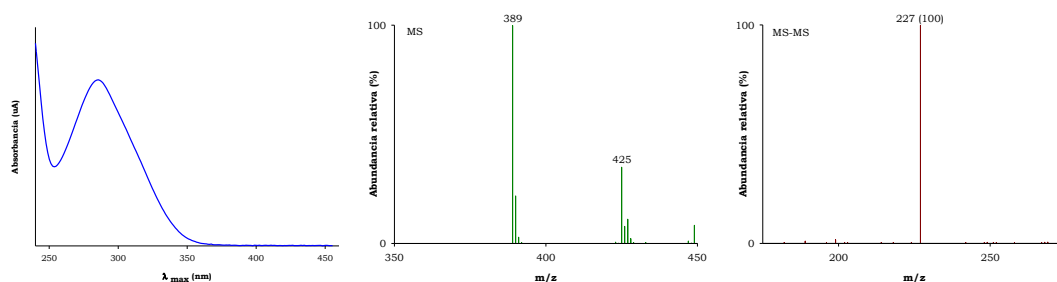


Figura 102. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 11 da banda I.

Composto 12 (tr 44,8 min)

Trátase unha vez máis dunha forma isómerica *trans* dun estilbeno, con dous máximos de absorción a 305,7 e 317,6 nm en DAD e cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 227 m/z que dá un ión de fragmentación MS/MS a 185 m/z cunha

abundancia relativa do 22 % (figura 103). Tanto pola coincidencia destes resultados cos atopados na bibliografía (Vian e col., 2005; Guerrero e col., 2010a) como cos acadados no noso laboratorio para o *trans*-resveratrol comercial, podemos afirmar que estamos ante este estilbeno.

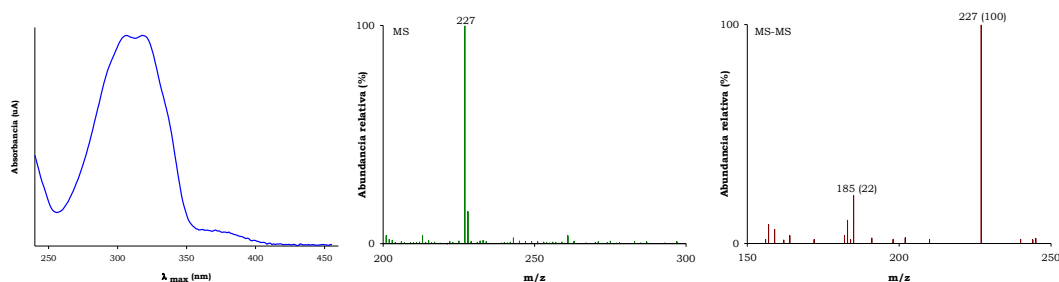


Figura 103. Espectros DAD e ESI-MS do composto 12 da banda I.

Composto 13 (t_R 45,6 min)

Ao igual que sucedía para os compostos 2, 6 e 10, estamos diante dun composto de natureza estilbénica cun espectro en DAD caracterizado pola presenza de catro máximos de absorción en 261,9, 285,4, 341,4 e 358 nm (figura 104) e que –como avanzamos nas ocasións anteriores– é produto da transformación dos estilbenos pola acción da radiación UV. A diferenza do que ocorría nos casos anteriores, neste caso obtivemos tres ións pseudomoleculares $[M-H]^-$, sendo o maioritario o de 447 m/z; as abundancias relativas para os ións de 423 e 387 m/z foron do 81 e do 33 % respectivamente. Debemos indicar que o ión de fragmentación MS/MS a 225 m/z aparece ao romper o $[M-H]^-$ 423 m/z.

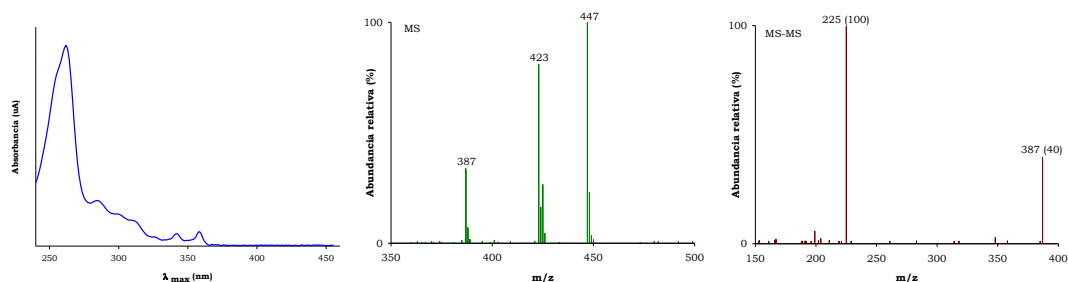


Figura 104. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 13 da banda I.

Composto 14 (t_R 59,6 min)

O seu espectro en DAD, cun máximo de absorción a 285,5 nm, e a presenza dun ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 227 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 185 m/z cunha abundancia relativa do 21 % (figura 105) parece indicar que se trata do *cis*-resveratrol; neste sentido, indicaremos que estes resultados coinciden cos acadados para o *cis*-resveratrol patrón –que obtivemos despois de expoñer o *trans*-resveratrol comercial 5 minutos á acción da luz UV- e mesmo con aqueles atopados na bibliografía (Vian e col., 2005; Guerrero e col., 2010a).

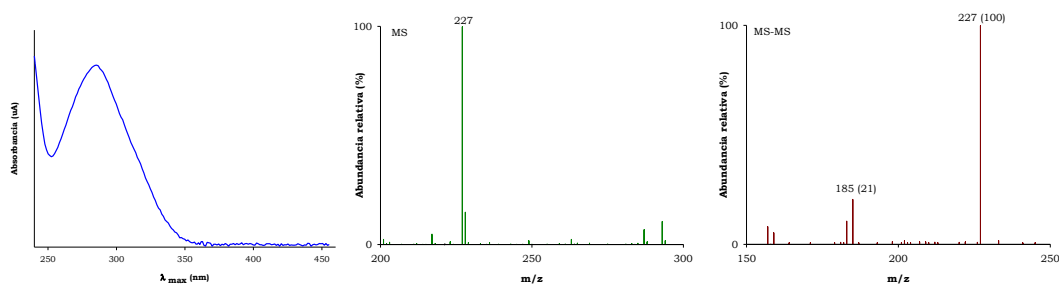


Figura 105. Espectros de DAD e ESI-MS do composto 14 da banda I.

Xa por último, indicar que xunto a estes 14 compostos descritos, no cromatograma obtido en LC/ESI-MS-MS, no tempo de retención de 39,5 min, temos observado un ión pseudomolecular maioritario [M-H]⁻ a 389 m/z, que vai acompañado doutro ión a 425 m/z que posúe unha abundancia relativa do 26 % (figura 106 e táboa 40). En calquera caso, a inexistencia de espectro en DAD e de ións de fragmentación MS/MS impide concretar máis sobre a natureza deste composto.

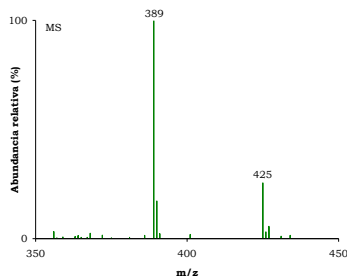


Figura 106. Espectro de ESI-MS do composto de t_R 39,5 min da banda I.

Na táboa 40 recóllense os datos espectrofotométricos e cromatográficos de tódolos compostos illados nesta primeira banda cromatográfica.

Táboa 40. Características cromatográficas e espectrais en DAD e MS dos compostos fenólicos illados na banda I.

Nº	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	Composto
1	18,2	303,6 ; 323,6	<u>405</u> /441/465	243	<i>t</i> -astringina
2	18,5	260,7; 297,4; 330,7; 397,5	-	-	Estilbenoide
3	19,7	285	<u>405</u> /441	243	<i>c</i> -astringina
4	20,0	305,7; 317	389/425/449	-	<i>t</i> -etilbeno
5	28,8	308; 318,9	389/425/449	227	<i>t</i> -piceido
6	29,5	260,7; 297,4; 330,7; 397,5	-	-	Estilbenoide
7	30,3	253,6; 307,5 ; 363,8	301	301/198/137	Elágico
8	31,5	305; 317,6	405	243	<i>t</i> -etilbeno
9	33,6	303,2 ; 324,8	-	-	AHC
10	37,0	260,7; 297,4; 330,7; 397,5	-	-	Estilbenoide
	39,5		389/425	-	Desc
11	42,2	285,5	<u>389</u> /425	227	<i>c</i> -piceido
12	44,8	305,7; 317,6	227	185	<i>t</i> -resveratrol
13	45,6	261,9; 284,5; 341,4; 358	387/ <u>423</u> /447	387/225	Estilbenoide
14	59,6	285,5	227	185	<i>c</i> -resveratrol

En negraña móstranse os ombros; subliñado amósase o ión pseudomolecular que se fragmenta; o número de pico fai referencia aos 14 compostos illados en HPLC-DAD.

Banda II

Na figura 107 amósase o cromatograma de HPLC-DAD desta banda.

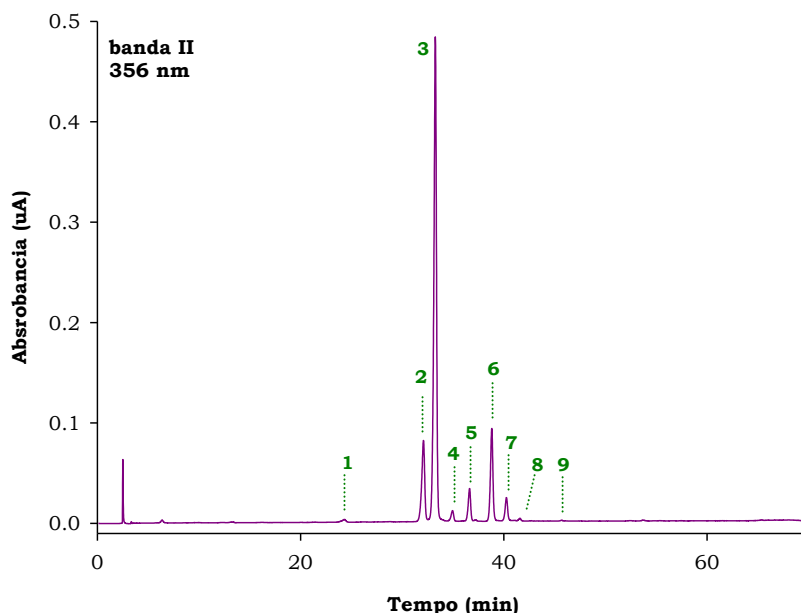


Figura 107. Cromatograma HPLC-DAD da banda II capturado a 356 nm.

Da observación dos espectros en DAD dos 9 compostos que conseguimos illar nesta banda, podemos deducir que en todos os casos se trata de flavonoides, e que en principio semellan ser derivados glicosilados da quercetina e/ou do kaempferol.

Composto 1 (tr 24,3 min)

Este composto presenta un espectro en DAD con dous máximos de absorción a 261,9 e 354,6 nm e un ombro a 300 nm, que –ao noso entender– non permite determinar con certeza a súa natureza.

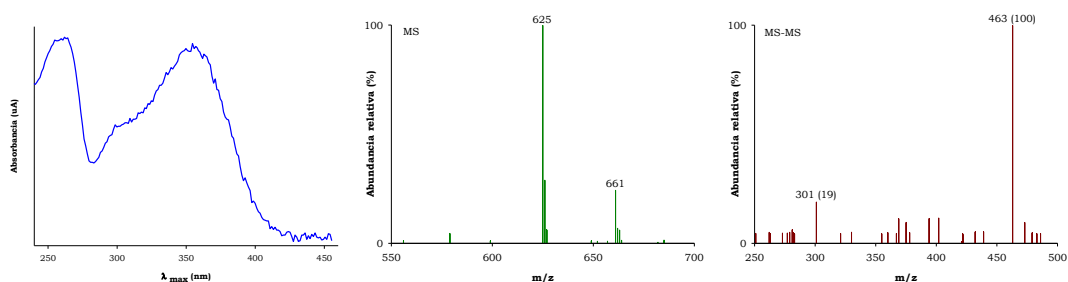


Figura 108. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 1 da banda II.

O espectro de masas acadado en ESI-MS (figura 108), indicanos a presenza dun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 625 m/z e ións de fragmentación MS/MS a 463 m/z (maioritario) e a 301 m/z (cunha abundancia relativa do 19 %), o que fai pensar que estamos diante dun derivado da quercetina, xa que o ión de fragmentación MS/MS a 301 m/z coincide co ión pseudomolecular $[M-H]^-$ deste aglicón (Hollecker e col., 2009). Ademais, a existencia doutro ión de fragmentación MS/MS a 463 m/z, que coincide co ión pseudomolecular $[M-H]^-$ dos derivados glucosil e galactosil da quercetina, xunto coa perda dun fragmento de 162 uma, fainos pensar que se poida tratar dun derivado diglicosilado deste flavonol. Debemos indicar aquí que non se trata do quercetín-3-O-rutinósido (ata o que nos sabemos, o único diglicósido coñecido na *Vitis vinifera* L.) pois este composto posúe unha masa molecular de 610 uma (Castillo-Muñoz e col., 2009b); neste sentido, trataríase dun composto illado por

primeira vez nunha caste desta especie, por máis que non poidamos identificar a natureza dos azucres, que en todo caso deben de ser dúas hexosas de masa molecular 180 una en ámbolos dous casos. Debemos facer constar, xa por último, que xunto ao ión pseudomolecular maioritario, aparece outro ión a 661 m/z cunha abundancia relativa do 24 % que descoñecemos a que pode corresponder.

Composto 2 (tr 32,1 min)

O espectro en DAD deste flavonol indícanos que estamos diante dun derivado glicosilado da quercetina caracterizado por posuír dous máximos de absorción en 256 e 353,4 nm e dous ombros en 266 e 294 nm. O seu espectro de masas indica a presenza dun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 463 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 301 m/z (figura 109) que, ao comparar cos resultados acadados por Castillo-Muñoz e col. (2009b) e cos atopados por nós para diferentes derivados comerciais da quercetina, coincide co do glucósido ou galactósido deste aglicón. Tanto o seu tempo de retención como os resultados acadados tras a realización da hidrólise ácida, indican que neste caso estamos ante o quercetín-3-O-galactósido.

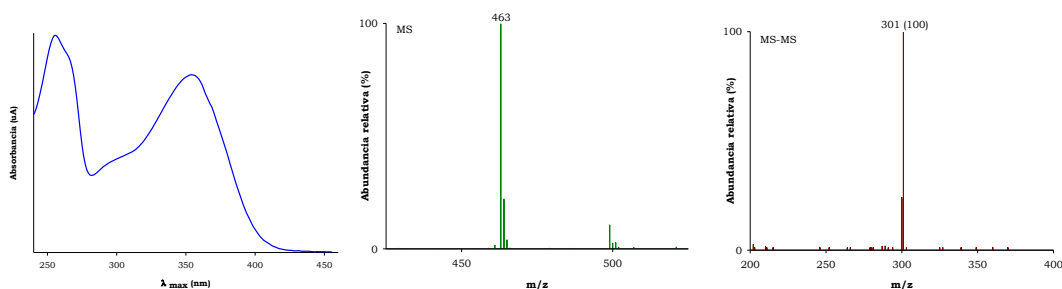


Figura 109. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 2 da banda II.

Composto 3 (tr 33,3 min)

As características espectrais (figura 110) tanto en DAD (λ_{\max} 256, 266sh, 294sh, 353,4 nm) como en ESI-MS ($[M-H]^-$ a 463 m/z e ión MS/MS a 301 m/z) correspondentes a este composto, coinciden coas do composto 2, pero neste

caso tanto o seu tempo de retención como os resultados acadados tras as hidrólises ácida e enzimática (con β -glucosidasa) indican que o azucre unido ao aglicón é a glucosa, polo que estamos ante o quercetín-3-*O*-glucósido.

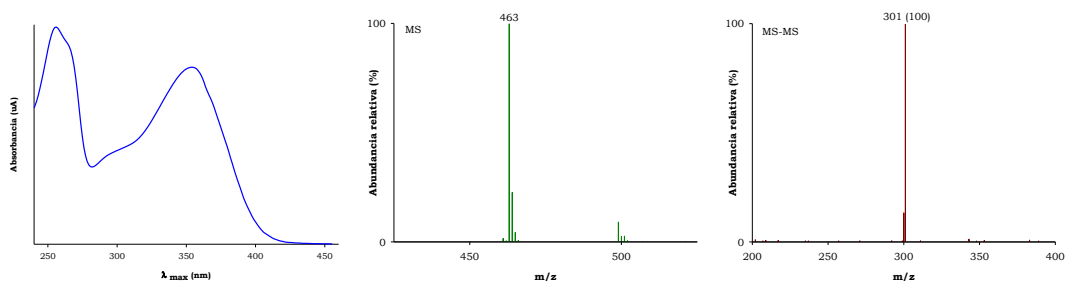


Figura 110. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 3 da banda II.

Composto 4 (*t_R* 35,0 min)

Tamén neste caso estamos diante dun derivado glicosilado da quercetina, cun espectro en DAD caracterizado pola presenza de dous máximos de absorción en 256 e 353,4 nm e dous ombros en 267 e 293 nm. A presenza en ESI-MS dun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 433 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 301 m/z (figura 111) fai pensar que se puidera tratar do quercetín-3-*O*-xilósido ou ben do quercetín-3-*O*-arabinósido, dous compostos que según Macheix e col. (1990) non existen na videira; de acordo cos tempos de retención aportados por Qing e col. (2012) para estes dous compostos no xénero *Rosa* e os resultados acadados despois da hidrólise ácida do noso descoñecido, podemos afirmar que estamos diante da primeira cita dun xilósido da quercetina en *Vitis vinifera*.

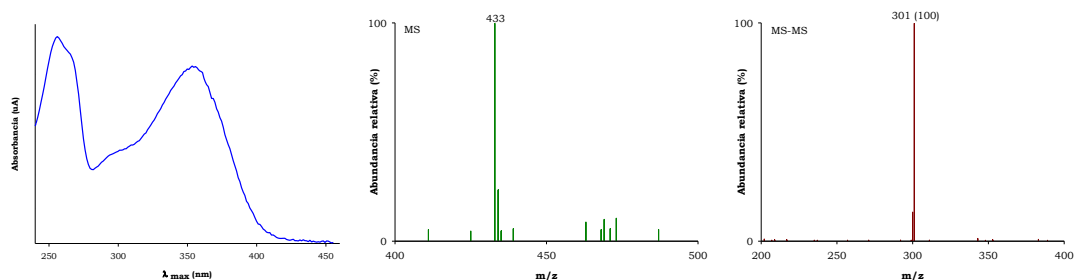


Figura 111. Espectros de DAD e ESI-MS do composto 4 da banda II.

Composto 5 (tr 36,6 min)

Neste caso o espectro en DAD, con dous máximos de absorción en 265,4 e 347 nm e un ombro en 293 nm, indica que este flavonol é un derivado glicosilado do kaempferol, pero o seu espectro de masas, cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 447 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 285 m/z (figura 112), non permite diferenciar si se trata do glucosil ou do galactosil-kaempferol. Ao comparar estes resultados cos acadados por nós para os patróns comerciais destes dous derivados do kaempferol e cos datos atopados na bibliografía (Castillo-Muñoz e col., 2009b), podemos afirmar que se trata do kaempferol-3-O-galactósido, un resultado que se viu confirmado pola identificación da galactosa logo da realización da hidrólise ácida do composto. A presenza no patrón de fragmentación MS/MS de dous ións a 284 e 285 m/z cunha abundancia relativa do 72 e 51 % respectivamente, e no que o ión pseudomolecular é o maioritario, indícanos que a enerxía de fragmentación empregada no ESI/MS-MS non foi suficiente para romper todos os ións $[M-H]^-$.

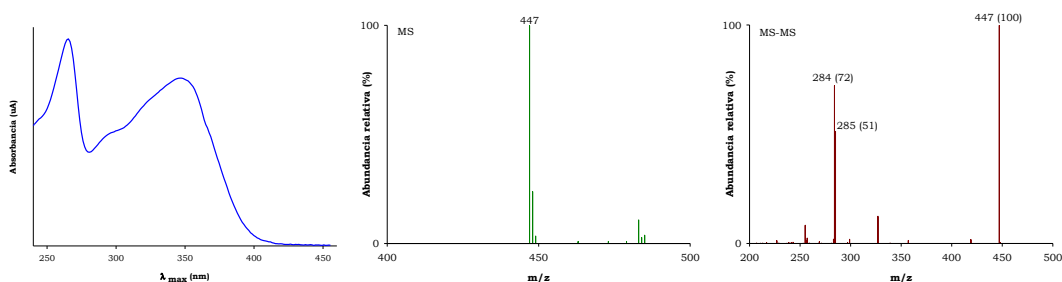


Figura 112. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 5 da banda II.

Composto 6 (tr 38,8 min)

O espectro en DAD, con dous máximos de absorbancia en 265,4 e 347,4 nm e un ombro en 294 nm e o seu espectro de masas que, como no caso do anterior composto, presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 447 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 285 m/z (figura 113), indican con claridade que estamos diante do kaempferol-3-O-glucósido; en efecto, tanto o seu tempo de retención como as súas características espectrais en DAD e masas coinciden cos

do patrón comercial e cos resultados atopados na bibliografía (Castillo-Muñoz e col., 2009b). En todo caso, a realización da hidrólise enzimática con β -glucosidasa permitiu confirmar a natureza do azucre.

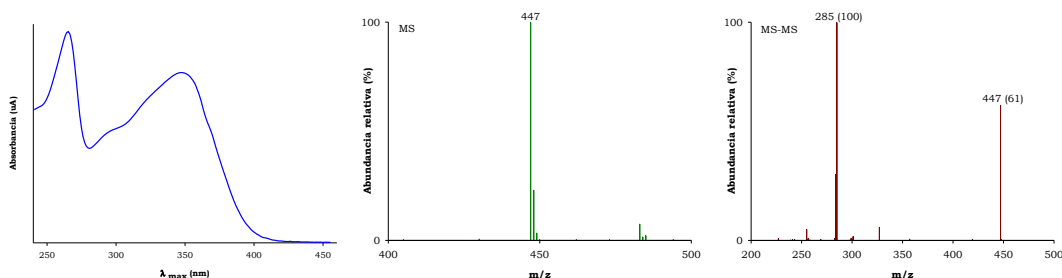


Figura 113. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 6 da banda II.

Como no caso do composto anterior, a presenza dun ión de fragmentación MS/MS a 447 m/z cunha abundancia relativa do 61 % indícanos que a enerxía de fragmentación empregada non foi suficiente para romper todos os $[M-H]^-$.

Composto 7 (t_R 40,3 min)

A existencia dun espectro en DAD con dous máximos de absorbancia en 254,8 e 354,6 nm e dous ombros en 267 e 293 nm fíxonos pensar que estamos ante outro derivado glicosilado da quercetina, pero o seu espectro de masas cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 477 m/z e ións de fragmentación MS/MS a 315/314 m/z cunha abundancia relativa do 23 e 100% respectivamente (figura 114), fainos descartar esta posibilidade; en efecto, e aínda que o quercetín-3-*O*-glucurónido ten unha masa molecular de 478 uma, presentaría un ión de fragmentación MS/MS a 301 m/z (Castillo-Muñoz e col., 2009b). De acordo con estes mesmos autores, o espectro de masas obtido para o noso composto podería corresponder a un derivado glicosilado da isorhamnetina, ben fose o galactósido ou ben o glucósido. A comparación destes resultados cos acadados por nós para os patróns comerciais e cos datos bibliográficos permite afirmar que se trata do isorhamnetín-3-*O*-glucósido, un resultado que tamén neste caso se viu confirmado pola identificación da isorhamnetina e da glucosa logo da

realización da hidrólise enzimática do composto. Debemos indicar tamén a presenza dun ión de fragmentación MS/MS a 357 m/z cunha abundancia relativa do 27 %.

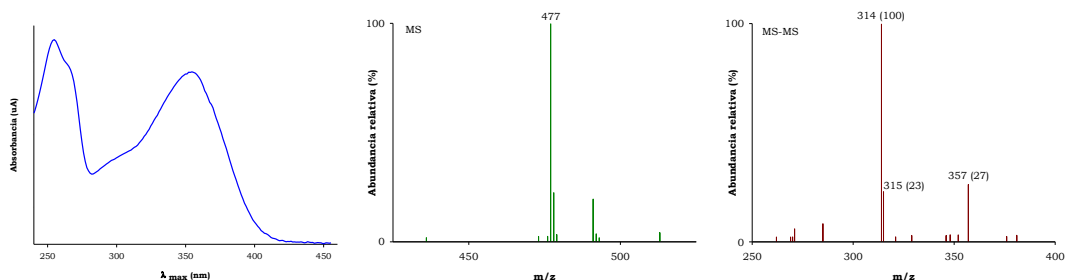


Figura 114. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 7 da banda II.

Composto 8 (t_R 41,6 min)

Trátase dun derivado glicosilado do kaempferol, cun espectro en DAD con dous máximos de absorbancia en 265,4 e 347,4 nm e un ombro en 294,5 nm; o seu espectro de masas que presenta un ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 417 m/z, e un ión de fragmentación MS/MS a 285 m/z (figura 115), coincide cos datos proporcionados por Qing e col. (2012) para o kaempferol-3-*O*-xilósido e o kaempferol-3-*O*-arabinósido no xénero *Rosa*. Aínda que non foi posíbel realizar a hidrólise deste composto, da comparación do seu tempo de retención co obtido por estes autores para estes compostos, podemos deducir que se trata do kaempferol-3-*O*-xilósido e, tal e como indicamos para o xilósido da quercetina, estaríamos diante da primeira cita deste composto en *Vitis vinifera*.

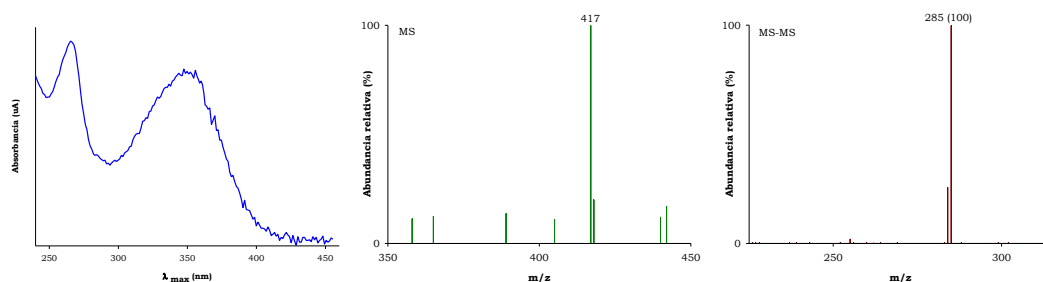


Figura 115. Espectros de DAD e ESI-MS do composto 8 da banda II.

Composto 9 (tr 45,7 min)

Este último composto da banda II é tamén un derivado glicosilado do kaempferol, cun espectro en DAD con dous máximos de absorbancia a 264,2 e a 342,6 nm e un ombro a 293 nm; posúe un espectro de masas en ESI-MS cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 431 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 285 m/z (figura 116), que coincide só co do kaempferol-3-O-rhamnósido (Qing e col., 2012). Como sucedeu para o composto anterior, tampouco foi posíbel hidrolizar este composto. Xunto ao ión molecular maioritario, aparece o seu aducto co ácido acético (491 m/z), cunha abundancia relativa do 38 %, e outro ión a 467 m/z cunha abundancia relativa do 32 %.

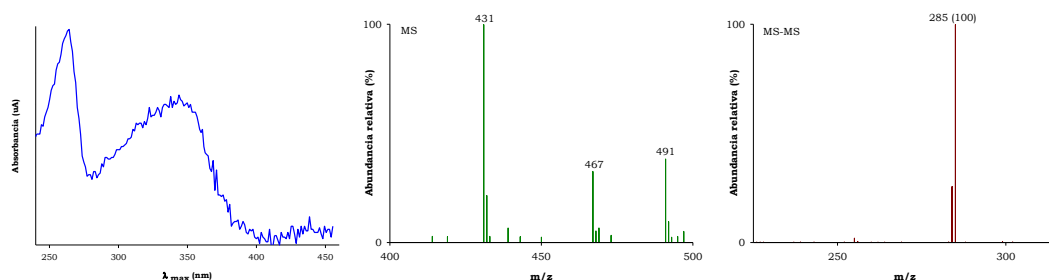


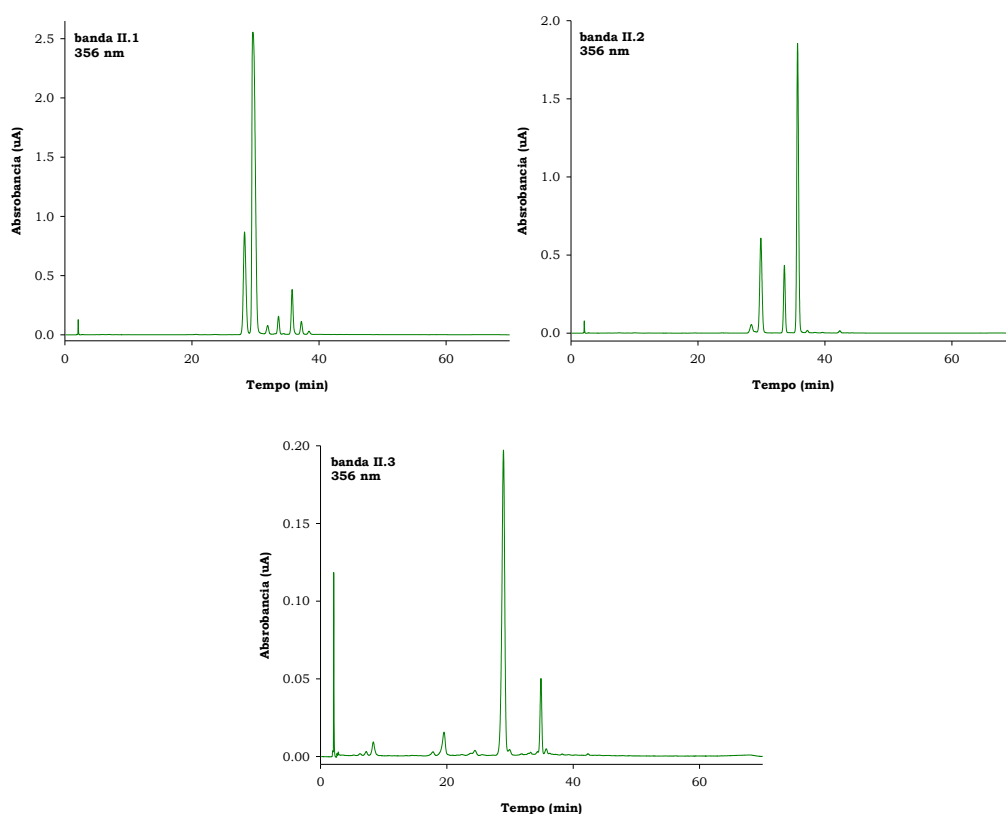
Figura 116. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 9 da banda II.

Os resultados acadados con anterioridade polo noso grupo de investigación en uvas brancas de castes galegas (Masa e col., 2007; Masa e Vilanova, 2008) e os existentes na bibliografía (Cheynier e Rigaud, 1986; Amico e col., 2004; Castillo-Muñoz e col., 2009b; Gómez-Alonso e col., 2007; Castillo-Muñoz e col., 2010; Perestrelo e col., 2012), nos que se describe a presenza dun maior número de flavonoides glicosilados en uvas, fixéronnos sospeitar a posíbel coelución dalgún deles nas nosas análises cromatográficas, o que nos levou a recromatografiar en papel a banda II que vimos de analizar; esta nova cromatografía preparativa (realizada nas mesmas condicións empregadas para a mostra bruta) fixo posíbel separar e analizar tres bandas que presentaron as características cromatográficas (R_f) e o comportamento en UV e UV+NH₃ que se recollen na táboa 41.

Táboa 41. Características cromatográficas das bandas recollidas mediante PC ao recromatografiar a banda II.

Nº de banda	R _f	UV	+ NH ₃
II.1	4,8-13,9	Absorbente	Amarelo
II.2	13,9-19,6	Absorbente	Verde
II.3	20,2-27,8	Absorbente	Amarelo

Estas novas bandas foron eluidas con metanol/auga (8:2, v/v), o volume recollido foi concentrado no rotavapor e empregado para a separación e identificación dos compostos fenólicos mediante HPLC-DAD e LC/ESI-MS-MS. Na figura 117 amósanse os cromatogramas de HPLC-DAD obtidos para cada unha delas.

**Figura 117.** Cromatogramas HPLC-DAD das bandas obtidas ao recromatografiar a banda II capturado a 356 nm.

Banda II.1

O estudo desta primeira banda permite observar a presenza, xunto a 8 dos 9 flavonoides dos que temos falado, dun novo derivado glicosilado da quercetina cun tempo de retención de 33,3 min, que presenta un espectro en UV-vis con dous máximos de absorción a 256 e 353,4 nm e dous ombros a 266 e 293,5 nm, e un espectro de masas cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 477 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 301 m/z (figura 118) que coinciden cos do quercetín-3-*O*-glucurónido (Castillo-Muñoz e col., 2009b), previamente atopado por nós en uvas da caste Albariño (Masa e col., 2007). Todo fai pensar que este composto podería ter coeluído na banda II xunto co quercetín-3-*O*-glucósido.

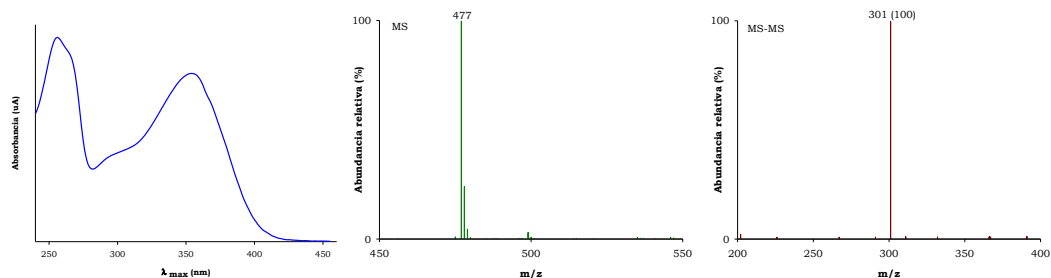


Figura 118. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto de t_R 33,3 min da banda II.1.

Banda II.2

Nesta nova banda observamos 6 dos flavonoides inicialmente atopados na banda II (os compostos 2, 3, 5, 6, 7 e 9), o quercetín-3-*O*-glucurónido detectado na banda II.1 e, ademais, tres novos compostos de tempos de retención en 38,4, 39,3 e 40,2 min que pasamos a describir.

Composto de t_R 38,4 min

Presenta un espectro en DAD tipo quercetina con dous máximos de absorción a 254,8 e 353 nm e dous ombros a 263,2 e 292,5 nm e un espectro en masas cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 447 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 301 ms/z (figura 119) que nos indica que, sen dúbida, estamos ante o

quercetín-3-*O*-rhamnósido (Hollecker e col., 2009). Porén, no patrón de fragmentación MS-MS observamos que o ión pseudomolecular ten unha abundancia relativa de só o 42 %, sendo máis abundante outro ión, a 285 m/z, característico dos derivados glicosilados do kaempferol, o que nos fai pensar que o quercetín-3-*O*-rhamnósido coelúe con algún derivado deste flavonol.

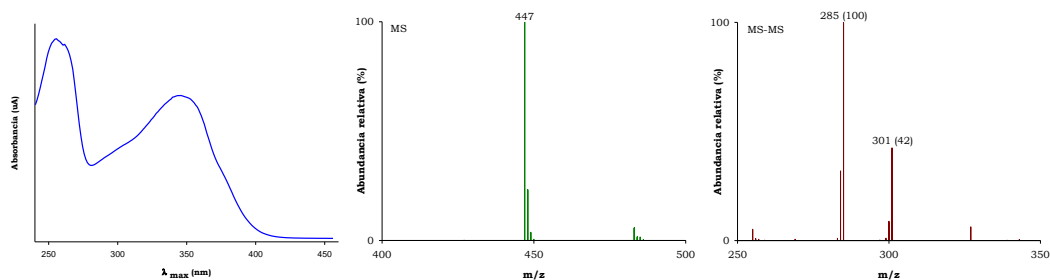


Figura 119. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto de t_R 38,4 min da banda II.2.

Composto de t_R 39,3 min

Aínda que da observación do espectro en DAD (λ_{\max} 253,4, 266sh, 298sh, 353 nm) poderíamos deducir que este composto é un derivado glicosilado da quercetina, tal e como xa explicamos para o composto 7 da banda II, o seu espectro de masas, cun ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 477 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 315 m/z (figura 120), indica con claridade que se trata dun derivado da isorhamnetina.

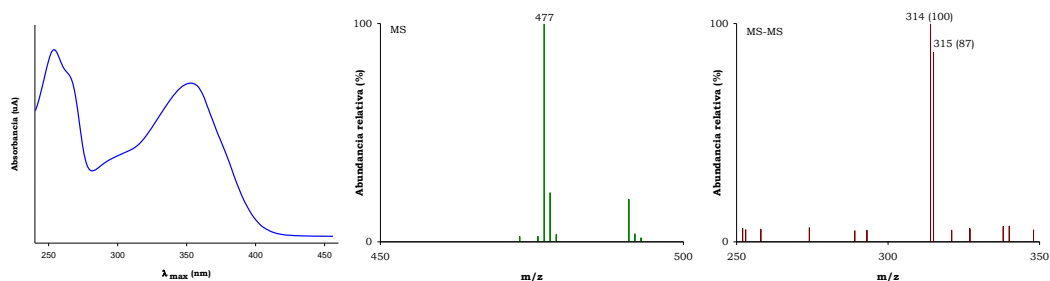


Figura 120. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto de t_R 39,3 min da banda II.2.

Neste caso, ten que estar glicosilado coa galactosa, pois a outra posibilidade de glicosilación (coa glucosa) non sería posíbel, xa que o isorhamnetín-3-*O*-

glucósido (o propio composto 7 do que vimos falando) ten un tempo de retención superior ao do composto que nos ocupa. Trátase, xa que logo, do isorhamnetín-3-*O*-galactósido.

Composto de t_R 40,2 min

O terceiro dos novos flavonoides atopados nesta banda ten un espectro en DAD moi semellante ao dos dous compostos anteriores, con dous máximos de absorción de 256 e 353,4 nm e dous ombros de 260 e 291 nm; a existencia no seu espectro de masas dun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 491 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 315 m/z cunha abundancia relativa do 58 % (figura 121), indícanos -unha vez máis- que se trata dun derivado da isorhamnetina, e máis concretamente do isorhamnetín-3-*O*-glucurónido (Castillo-Muñoz e col., 2009b). Tal e como se pode deducir polos tempos de retención de ámbolos dous compostos, o glucurónido da isorhamnetina (40,2 min) coeluía na banda II coa forma glucosilada deste aglicón (40,3 min). A presenza dun ión de fragmentación MS/MS maioritario a 301 m/z ten -ao noso entender- dúas posibles interpretacións; pódese deber á coelución do isorhamnetín-3-*O*-glucurónido con algún derivado glicosilado da quercetina ou ben ser o resultado da perda do grupo metilo que diferencia isorhamnetina e quercetina.

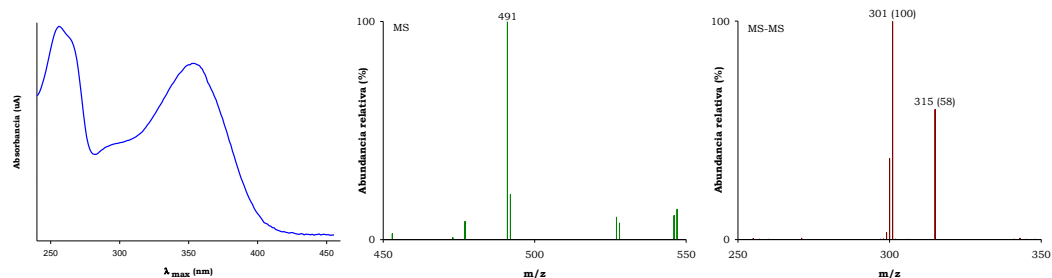


Figura 121. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto de t_R 40,2 min da banda II.2.

Banda II.3

Polo que fai a esta banda, indicar que dos 9 flavonoides inicialmente atopados na banda II, só están presentes os compostos 1, 2, 3 e 6 xunto ao quercetín-3-*O*-

glucurónido (presente nas bandas II.1 e II.2) e o quercetín-3-*O*-rhamnósido, illado na banda II.2. E como ocorría na banda II.2, son tamén tres os novos flavonoides atopados nesta banda con tempos de retención de 13,7, 32,1 e 36,6 min, respectivamente.

Composto de t_R 13,7 min

Este primeiro composto posúe un espectro en DAD con dous máximos de absorción a 254,8 e 349,8 nm e dous ombros a 265,8 e 295 nm e un espectro en masas cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 625 m/z e ións de fragmentación MS/MS a 463 e 301 m/z (figura 122) que presentan abundancias relativas do 100 e 22 %, respectivamente. Seguindo o mesmo razoamento que xa fixemos para a o composto 1 da banda II (de características espectrais semellantes), entendemos que podería tratarse dun novo derivado diglicosilado da quercetina, derivado que, polo que sabemos, nunca antes ten sido atopado na vide. Xunto ao ión pseudomolecular aparece outro ión a 808 m/z cunha abundancia relativa do 38 %.

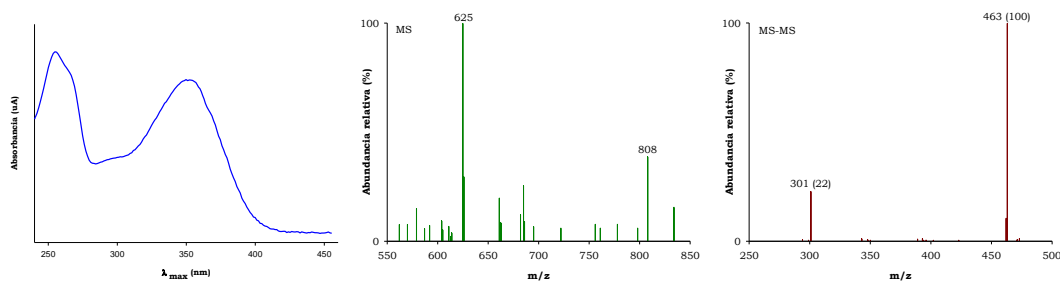


Figura 122. Espectros DAD, ESI-MS e MS² do composto de t_R 13,7 min da banda II.3.

Composto de t_R 32,1 min

O seu espectro en DAD, que presenta dous máximos de absorción en 256 e 353,4 nm e dous ombros en 267 e 297 nm, podería corresponder tanto a un glicosido da quercetina como da isorhamnetina, pero a presenza (figura 123) dun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 609 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a

301 m/z –ámbolos dous cunha abundancia relativa do 100 %-, descarta por completo que se poida tratar dun derivado deste último aglicón; en efecto, estamos en presenza do quercetín-3-*O*-rutínósido que, de acordo con Castillo-Muñoz e col. (2009b) presenta estas mesmas características espectrais. Xunto ao ión pseudomolecular atopamos outro ión a 645 m/z cunha abundancia relativa do 11 %, e xunto ao ión de fragmentación MS/MS aparece outro ión a 343 m/z cunha abundancia relativa do 17 %. Debemos indicar que, de acordo con Qing e col. (2012), os derivados coumaroilados en posición 6 do azucre dos quercetín-3-*O*-glucósidos e galactósidos atopados en exemplares de *Rosa chinensis* presentan tamén un ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 609 m/z. O resultado negativo da hidrólise alcalina para o noso composto indicou, como era previsto pois -ata o que sabemos- non existen quercetín-3-*O*-(6''-coumaroil)-glucósidos na *Vitis vinifera* L., que non se trata dun derivado coumarilado.

Xa por último, dicir que o noso composto semella coeluír co quercetín-3-*O*-galactósido; en efecto, a presenza dun novo ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 463 m/z cando realizamos un varrido sobre o pico de tempo de retención 32,1 min do que vimos falando, así o parece indicar.

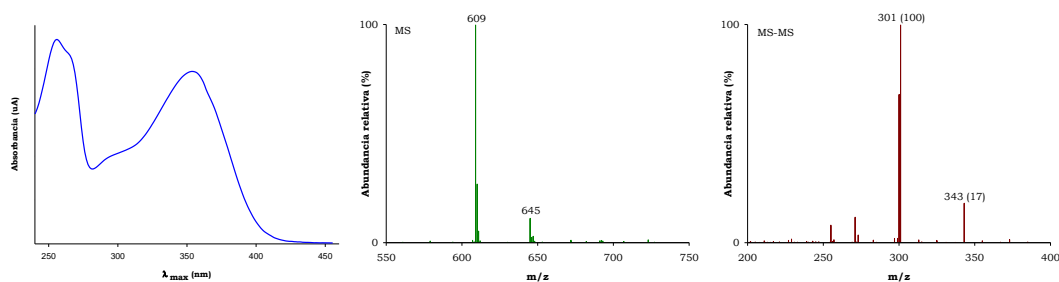


Figura 123. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto de t_R 32,1 min da banda II.3.

Composto de t_R 36,6 min

Trátase sen dúbida dun derivado glicosilado do kaempferol. En efecto, o seu espectro en DAD, con dous máximos de absorción en 265,4 e 346,2 nm e un ombro en 294,5 nm, é característico deste tipo de compostos; o seu espectro de

masas, cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 593 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 285 m/z (figura 124), confirma que se trata do kaempferol-3-*O*-rutinosido (Simirgiotis e Schmeda-Hirschmann, 2010).

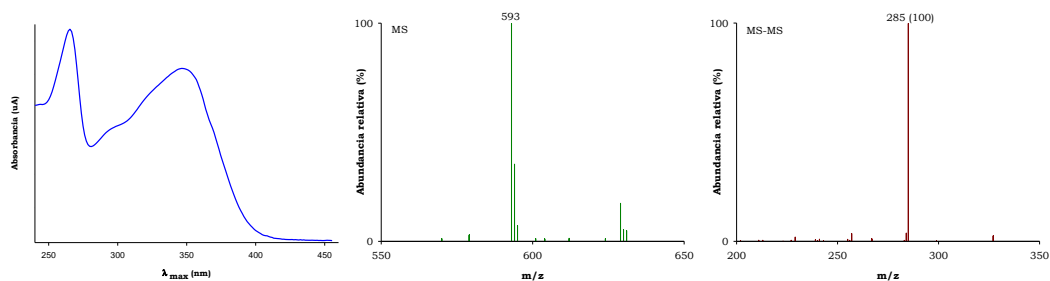


Figura 124. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto de t_R 36,6 min da banda II.3.

Seguindo a mesma argumentación empregada na discusión correspondente ao composto anterior, tamén neste caso cabe pensar na posibilidade de que se puidera tratar do kaempferol-3-*O*-(6''-coumaroil)-glicósido pois, como o noso composto, presenta tamén un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 593 m/z (Qing e col., 2012). Tal e como ocorreu daquela, tamén nesta ocasión foi negativo o resultado da hidrólise alcalina, o que indica que tampouco se trata dun derivado coumarilado, unha circunstancia esperábel se temos en conta que, como xa indicamos ao facer referencia á inexistencia do quercetín-3-*O*-(6''-coumaroil)-glicósido, non existen este tipo de derivados na *Vitis vinifera* L.

Ao igual que sucedía no caso do quercetín-3-*O*-rutinosido, xunto ao kaempferol-3-*O*-rutinosido semella coeluír o kaempferol-3-*O*-galactósido.

A modo de resumo da análise desta segunda banda cromatográfica, na táboa 42 recóllense os datos espectrofotométricos e cromatográficos dos 16 compostos illados definitivamente nesta banda. Debemos lembrar aquí que só 9 destes 16 compostos tiñan sido observados na separación cromatográfica inicial mediante HPLC-DAD. Co obxectivo de facer máis visíbel a procedencia de cada un dos compostos illados e identificados, especificase, no seu caso, en que sub-banda teñen aparecido aqueles compostos que non se tiñan observado inicialmente.

Táboa 42. Características cromatográficas e espectrais en DAD, ESI-MS e MS² dos compostos fenólicos illados na banda II.

Nº	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	Composto	Sub-banda
	13,7	254,8; 265,8 ; 295 ;349,8	808/ <u>625</u>	463/301	Q-diglic	3
1	24,3	261,9; 300 ;354,6	661/ <u>625</u>	463/301	Q-diglic	3
	32,1	256; 267 ; 297 ;353,4	<u>645</u> /609	343/301	Q-rut	
2	32,1	256; 266 ; 294 ;353,4	463	301	Q-galact	1, 2, 3
	33,3	256; 266 ; 293,5 ;353,4	477	301	Q-glucur	
3	33,3	256; 266 ; 294 ;353,4	463	301	Q-gluc	
4	35,0	256; 267 ; 293 ;353,4	433	301	Q-xil	
5	36,6	265,4; 294,5 ;346,2	593	285	K-rut	3
	36,6	265,4; 293 ; 347;434,5	447	447/284/255	K-galact	
	38,4	254,8; 263,2 ; 292,5 ;353	447	301/285	Q-rham	
6	38,8	265,4; 294 ;347,4	447	447/285	K-gluc	2
	39,3	253,4; 266 ; 298 ;353	477	315/314	Isorh-galact	
7	40,2	256; 260 ; 291 ;353,4	491	315/301	Isorh-glucur	2
	40,3	254,8; 267 ; 293 ;354,6	477	357/315/314	Isorh-gluc	
8	41,6	265,4; 294,5 ;347,4	417	285	K-xil	
9	45,7	264,2; 293 ; 320 ;342,6	491/467/ <u>431</u>	285	K-rham	

En negraña amósanse os ombros; subliñado amósase o ión pseudomolecular que se fragmenta; o número de pico fai referencia aos 9 compostos illados en HPLC-DAD.

Xa por último, debemos salientar que dos 16 compostos illados nesta banda, un total de 4 (os dous diglicósidos da quercetina, o quercetin-3-*O*-xilósido e o kaempferol-3-*O*-xilósido) non tiñan sido identificados con anterioridade en castes de vide.

Banda III

Dous dos 17 compostos presentes nesta banda (figura 125) foron previamente illados e identificados como o quercetín-3-*O*-glucurónido e o kaempferol-3-*O*-glucósido na banda anteriormente descrita, polo que obviaremos a discusión sobre a súa identidade neste apartado. Trátase dos compostos 14 e 16, dous flavonoides con tempos de retención de 33,3 e 38,8 min.

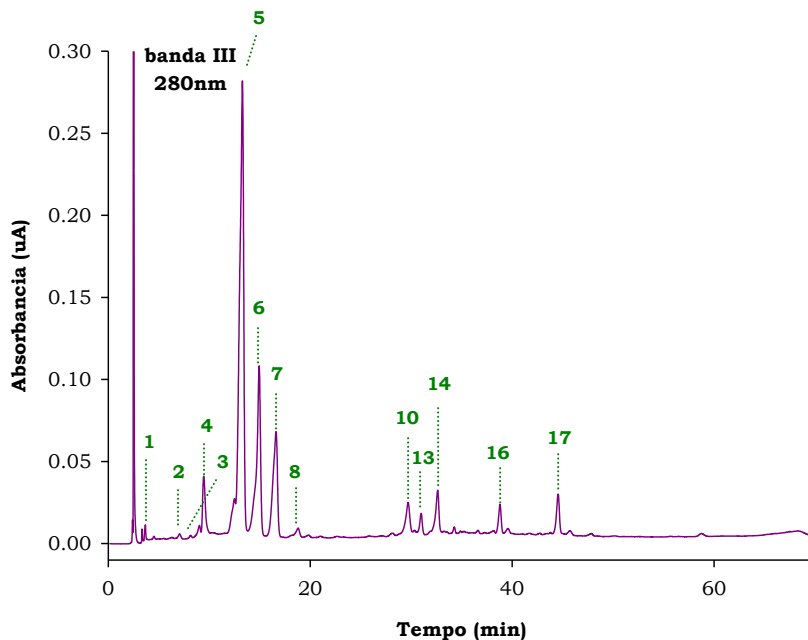


Figura 125. Cromatograma HPLC-DAD da banda III capturado a 280 nm.

Compostos 1 e 2 (t_R 4,5 e 7,1 min)

Non foi posíbel obter ningún ión pseudomolecular en ESI-MS para estes dous compostos, o que impediu afondar sobre a súa natureza química.

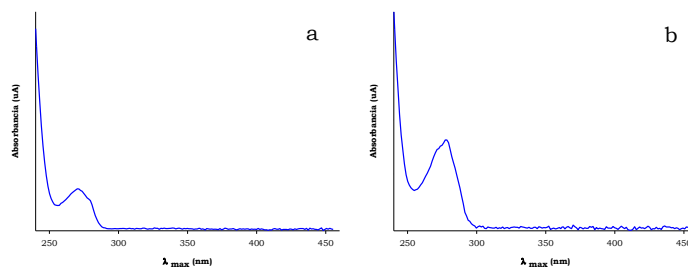


Figura 126. Espectro de DAD dos composto 1 (a) e 2 (b) da banda III.

En calquera caso, polos seus espectros en DAD, cun máximo de absorción en 270,2 nm e un ombro en 279 nm no caso do composto 1, e cun máximo de

absorción a 278,4 nm e un ombro en 271 nm no do composto 2 (figura 126), poderíamos pensar que estamos diante de dous derivados benzoicos (ou mesmo dun benzoico e un flavan-3-ol, respectivamente).

Composto 3 (tr 8,2 min)

Tanto o seu espectro en DAD, que amosa un único máximo de absorción a 279,6 nm, coma o seu espectro de ESI-MS cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 577 m/z e catro ións de fragmentación MS/MS a 451/425/407/289 con abundancias relativas do 100, 80, 31 e 44 % respectivamente (figura 127), fan pensar na posibilidade de que se trate dun flavan-3-ol, e moi probabelmente dunha procianidina. Ao comparar estes resultados cos datos proporcionados por Hollecker e col. (2009) e Regos e col. (2009), podemos afirmar que se trata dunha procianidina dimérica, por máis que non poidamos concretar de cal delas se trata.

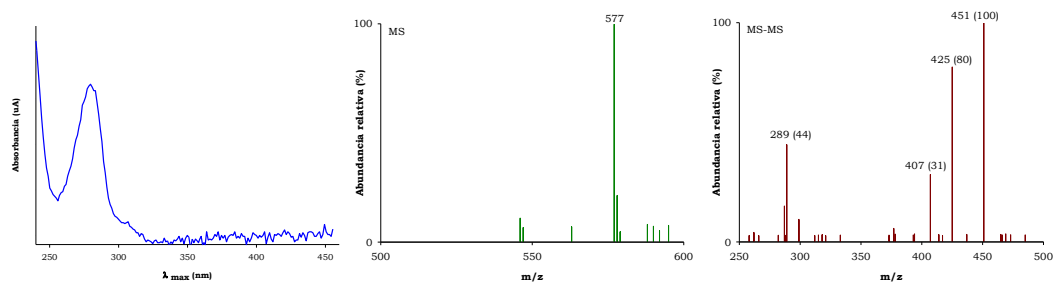


Figura 127. Espectros de DAD e ESI-MS do composto 3 da banda III.

Composto 4 (tr 9,5 min)

Non foi posíbel identificar este composto que presenta un espectro en DAD con dous máximos de absorción a 274,4 e 281,8 nm semellante ao dalgún fenol simple (entre eles o do iso-timol). O seu espectro de masas en ESI-MS presenta dous ións pseudomoleculares $[M-H]^-$ a 137 e 289 m/z con abundancias relativas do 100 e 87 % (figura 128) o que nos fai pensar na presenza de dous compostos que coelúen, un derivado benzoico e un flavan-3-ol. Non se obtivo

ningún ión de fragmentación en masas polo que resulta imposible poder achegar ningún dato máis acerca da natureza deste composto.

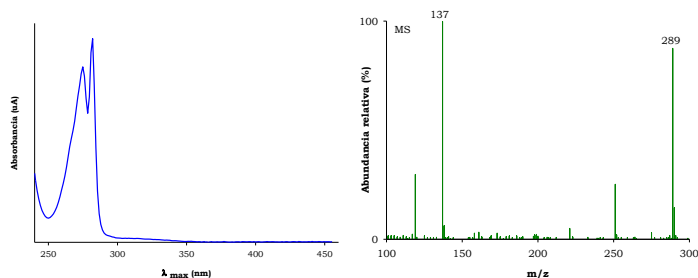


Figura 128. Espectros de DAD e ESI-MS do composto 4 da banda III.

Composto 5 (tr 13,3 min)

O seu espectro en DAD, cun máximo de absorción a 323,4 nm e un ombro a 295 nm correspóndese co dos derivados hidroxicinámicos e, probablemente cos do ácido cafeico ou ferúlico (Mozetič e col., 2006). O seu espectro de masas presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 179 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 135 m/z (figura 129) polo que se trata, sen dúbida, do ácido cafeico (Hollecker e col., 2009; Ginjom e col., 2011; Mane e col., 2011).

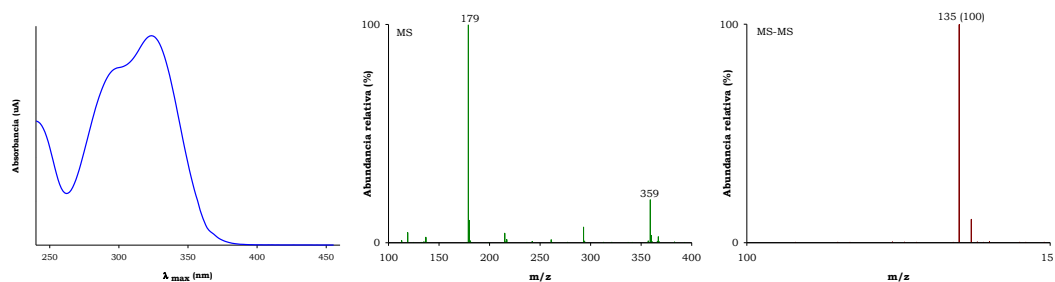


Figura 129. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 5 da banda III.

Aínda que no cromatograma de HPLC-DAD só temos observado un pico, ao estudar o cromatograma de LC/ESI-MS-MS vemos a presenza de dous ións pseudomoleculares $[M-H]^-$ a 179 m/z con tempos de retención de 12,7 e 13,3 min e con ións de fragmentación a 135 m/z nestes mesmos tempos, o que nos

indica que estamos diante dos isómeros *cis* (o primeiro deles) e *trans* (o segundo) deste ácido hidroxicinámico (Maier e col., 2006). Xunto ao ión pseudomolecular do ácido *trans*-cafeico aparece outro ión cunha abundancia relativa do 20 % a 359 m/z, que se corresponde co seu ión [2M-H]⁻.

Composto 6 (t_R 14,9 min)

Do mesmo xeito que ocorría para o composto 3, tanto o máximo de absorción a 279,6 nm do espectro en DAD coma o seu espectro de ESI-MS, no que se observan dous ións pseudomoleculares [M-H]⁻ a 579 e 289 m/z con abundancias relativas do 49 e 100 % respectivamente (figura 130), fan pensar que estamos diante dunha procianidina.

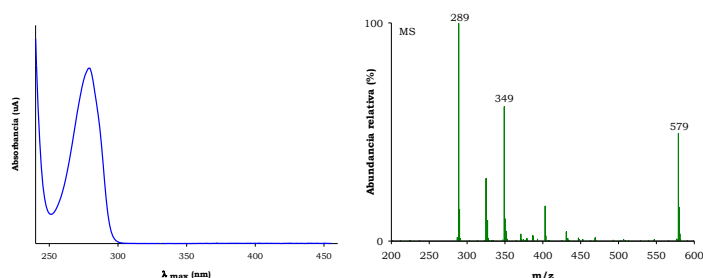


Figura 130. Espectros de DAD e ESI-MS do composto 6 da banda III.

Como queira que tampouco neste caso fomos quen de obter os ións de fragmentación MS/MS do composto, non podemos afondar na súa identidade. Indicaremos, iso si, a presenza do aducto co ácido acético do ión de 289 m/z (a 349 m/z), cunha abundancia relativa do 60 %.

Composto 7 (t_R 16,6 min)

Nin as características cromatográficas deste composto nin os seus espectros (figura 131) en DAD (λ_{max} 306,9 nm) ou en LC/ESI-MS-MS ([M-H]⁻ a 389 m/z e ión MS-MS a 269 m/z) nos permiten achegar ningún dato acerca da súa identidade.

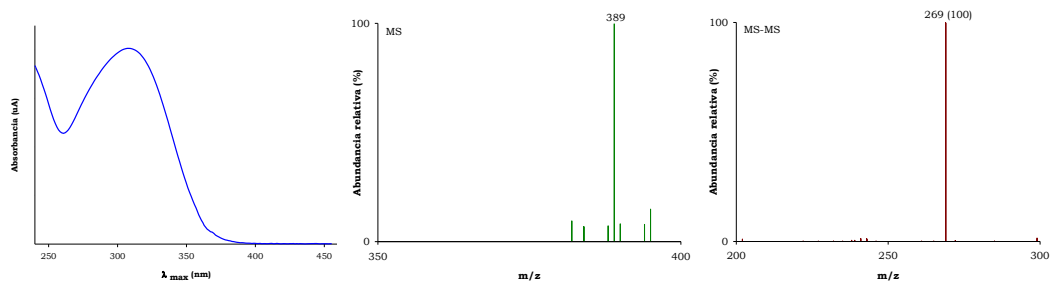


Figura 131. Espectros de DAD e ESI-MS do composto 7 da banda III.

Composto 8 (tr 18,8 min)

O seu espectro en DAD presenta un máximo de absorción en 279,6 nm, moi característico dos flavan-3-óis e dalgún derivado hidroxibenzoico; en calquera caso, estes últimos compostos deben eluír –nestas condicións cromatográficas– con anterioridade a este tempo de retención. Ademais, a presenza dun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 289 m/z no seu espectro de masas e de dous ións de fragmentación MS/MS a 245 e 205 m/z cunhas abundancias relativas do 59 e 23 % (figura 132), confirman que se trata dun flavan-3-ol monomérico (Hollecker e col., 2009; Mane e col., 2011).

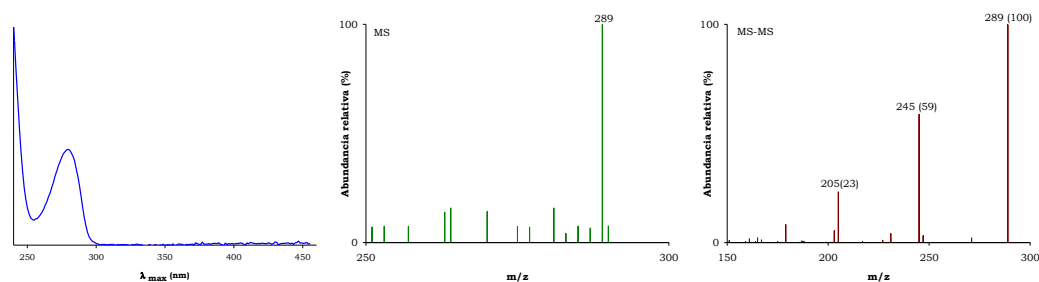


Figura 132. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 8 da banda III.

Tanto a (+)-catequina como a (-)-epicatequina presentan o mesmo patrón de fragmentación, pero en función dos datos cromatográficos e espectrométricos (DAD e ESI-MS) obtidos para este composto e para os patróns comerciais destes dous compostos, podemos confirmar que se trata da (-)-epicatequina.

Composto 9 (t_R 27,7 min)

O espectro de absorción deste composto, cun máximo en 286 nm e un ombro en 340 nm, é moi característico dos flavanoides, e o seu espectro de masas cun ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 303 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 285 m/z (figura 133) indica, con claridade, que estamos diante da dihidroquercetina (Baderschneider e Winterhalter, 2001; Regos e col., 2009; Perestrelo e col., 2012).

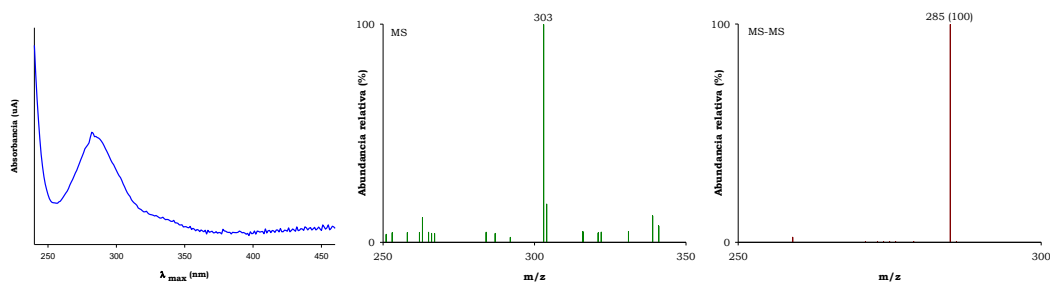


Figura 133. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 9 da banda III.

Composto 10 (t_R 29,7 min)

Probabelmente poidamos estar diante dun flavan-3-ol, por máis que no seu espectro de DAD, xunto ao característico máximo de absorción para estes compostos (neste caso en 282 nm), se poida observar tamén un ombro en 334 nm, máis propio dos flavanoides.

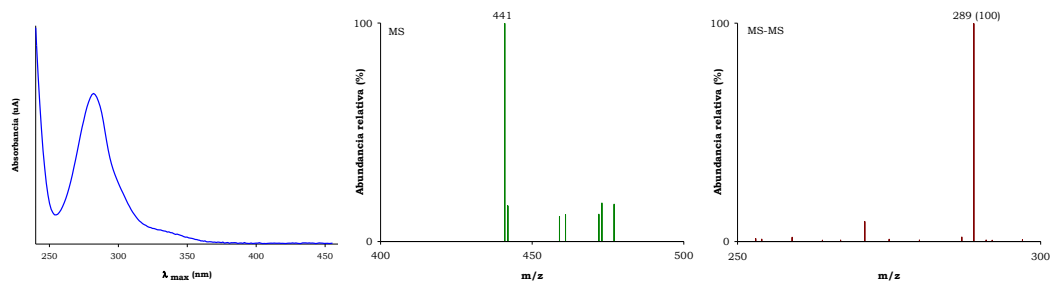


Figura 134. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 10 da banda III.

O seu espectro de masas mostra un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 441 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 289 m/z (figura 134) que, de acordo con Hollecker e col. (2009), corresponde ao do (-)-epicatequíngalato.

Sorprende a presenza deste composto nas nosas mostras, xa que, segundo Adams (2006), a diferenza entre os taninos das peles e os das sementes vén dada polo seu tamaño (maiores os das peles) e pola natureza da súa subunidade, a (-)-epigallocatequina no caso das peles e a (-)-epicatequíngalato no caso das sementes.

Composto 11 (t_R 30,3 min)

Neste caso, o seu espectro en DAD, cun máximo de absorción en 282 nm e un ombro en 324 nm, faínos pensar que estamos diante dun flavanoide aínda que non poderíamos descartar que se trate doutro flavan-3-ol similar ao composto anterior.

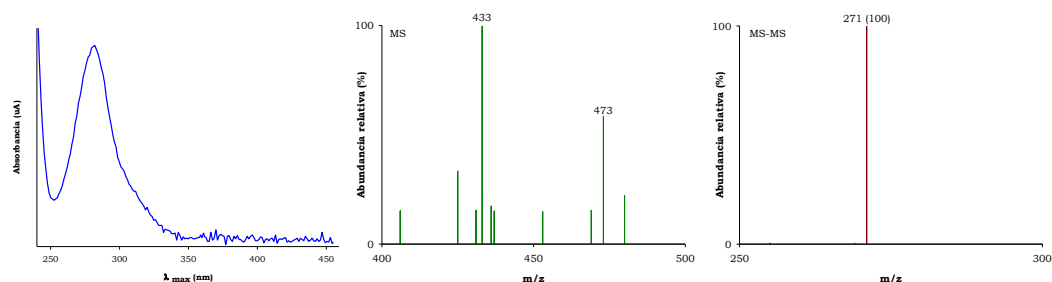


Figura 135. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 11 da banda III.

O seu espectro de masas, cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ maioritario a 433 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 271 m/z (figura 136), faínos pensar que se poida tratar dalgún derivado glicosilado da naringenina (Sánchez-Rabareda e col., 2004; Vallverdú-Queralt e col., 2010; Perestrelo e col., 2012). Xunto ao ión pseudomolecular aparece outro ión a 473 m/z cunha abundancia relativa do 57 %, que posteriormente non dá ningún ión de fragmentación.

Debemos subliñar que nunca antes se tiña atopado en castes galegas, ningún derivado da naringenina, e mesmo que só existe unha cita de derivados desta flavanona para castes brancas de *Vitis vinifera* L.; en efecto, e ata o que nós sabemos, só se ten atopado –e moi recentemente- un derivado da naringenina glicosilado cunha hexosa na caste branca Sercial (Perestrelo e col., 2012).

Compostos 12, 13 e 15 (t_R 30,7, 31,0 e 34,3 min)

A razón que nos leva a abordar de forma conxunta a análise dos resultados acadados para estes tres compostos é que, en todos os casos, presentan espectros en DAD típicos dos flavan-3-óis, cun máximo de absorción en 277 nm para o composto 12 e 279,6 nm para os outros dous, e todos eles teñen tamén o mesmo espectro de masas, cun ión pseudomolecular $M-H]^-$ a 591 m/z e o mesmo patrón de fragmentación MS/MS con catro ións a 547/439/301/289 m/z (figura 136).

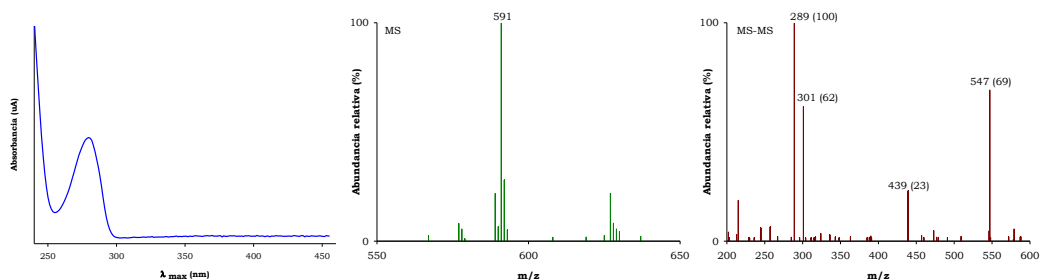


Figura 136. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 13 da banda III.

De acordo cos datos atopados na bibliografía (Romani e col., 2012), debemos pensar na presenza de elagitaninos, xa que o fragmento de MS-MS a 301 m/z podería corresponder ao ácido eláxico. O ión de fragmentación maioritario para estes tres compostos foi o que aparece a 289 m/z seguido do que está a 301 m/z con abundancias relativas entre o 60 e o 65 %; pola súa banda, os ións a 547 e 439 m/z presentaron abundancias relativas entre o 35 e 45 % e 23 e 32 %, respectivamente.

Composto 17 (tr 44,6 min)

O espectro en DAD deste composto, cun máximo de absorción en 284,4 nm e un ombro en 328 nm, é característico do grupo dos flavanoides e, así mesmo, o seu espectro de masas, cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 435 m/z (cunha abundancia relativa do 44 %) permitiría soste a hipótese de que se puidera tratar dun dihidroflavonol pois, en efecto, a masa molecular dos arabinósidos e dos xilósidos da dihidroquercetina é de 436 uma, de acordo cos datos aportados por Badershneider e Winterhalter (2001). Xunto ao ión pseudomolecular aparece o seu aducto co ácido acético a 495 m/z que, ademais, é o maioritario.

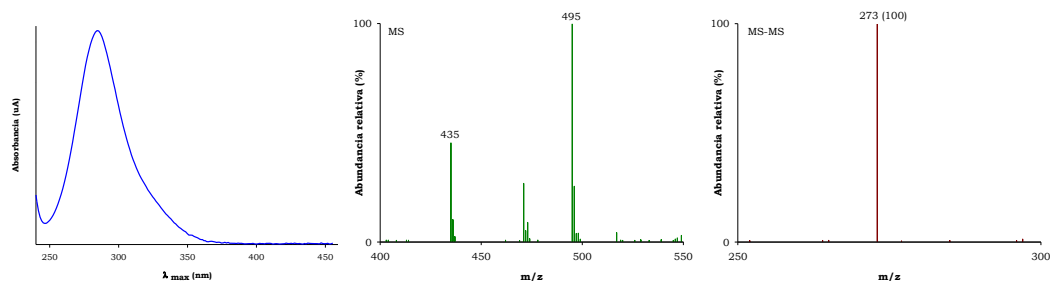


Figura 137. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 17 da banda III.

En calquera caso, a existencia dun ión de fragmentación MS/MS a 273 m/z (figura 137), entendemos bota por terra esta posibilidade, pois de ser certa aquela hipótese, o ión de fragmentación debera ser a 303 m/z.

Este espectro de masas coincide co observado por Sánchez-Rabaneda e col. (2004) para o phloretín-2-*O*-glucósido (dihidronaringenín-2'-*O*-glucósido, tamén chamado phloredzin), una dihidrochalcona que ten sido relacionada coa resistencia ao estrés mecánico nos vexetais (Macheix e col., 1990) e que, de acordo con Sánchez-Rabaneda e col. (2004), é característica das mazás.

Ata o que nós sabemos, este composto nunca antes foi atopado na vide, e sería tamén a primeira cita da existencia de dihidrochalconas neste material vexetal.

Tal e como vimos facendo para as bandas anteriores, na táboa 43 recollemos, de xeito resumido, as características espectrofotométricas e cromatográficas da totalidade dos compostos illados na banda III. Neste sentido, debemos facer constar que ademais dos 17 compostos atopados inicialmente no cromatograma de HPLC-DAD para esta banda, puidemos illar e identificar un composto máis, o ácido *cis*-cafeico, que –segundo o criterio establecido con anterioridade– figura na táboa sen número de orde.

Debemos resaltar aquí, polo novidoso, que 2 dos 18 compostos illados nesta banda (os dous derivados da naringenina) non tiñan sido citados con anterioridade no xénero *Vitis*.

Táboa 43. Características cromatográficas e espectrais en DAD e MS dos compostos fenólicos illados na banda III.

Nº	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	Composto
1	4,5	270,2; 279	-	-	Bz
2	7,1	271 ; 278,4	-	-	Bz
3	8,2	279,6	577	451/425/407/289	Procianidina
4	9,5	274,4; 281,8	289		Desc
	12,7	-	179	135	c-cafeico
5	13,3	295 ; 323,6	359/ <u>179</u>	135	t-cafeico
6	14,9	279,6	579/349/289	-	Procianidina
7	16,6	306,9	389	269	Desc
8	18,8	279,6	289	245/205	(-)-epicatequina
9	27,7	286; 340	303	285	dhQ
10	29,7	282; 334	441	289	(-)-epicatequíngalato
11	30,3	282; 324	433	271	N-hexósido
12	30,7	277	591	547/439/301/289	Elagitanino
13	31,0	279,6	591	547/439/301/289	Elagitanino
14	33,3	256; 266 ; 293 ; 353,4	477	301	Q-glucur
15	34,3	279,6	591	547/439/301/289	Elagitanino
16	38,8	265,4; 294 ; 347,4	447	301/285	K-gluc
17	44,6	284,4; 328	495/435	273	dhN-gluc

En negraña amósanse os ombros; subliñado amósase o ión pseudomolecular que se fragmenta; o número de pico fai referencia aos 17 compostos illados en HPLC-DAD.

Banda IV

Ademais dos tres compostos que observamos no cromatograma de HPLC-DAD desta banda (figura 138), dos que o maioritario (composto 2) é o quercetín-3-O-glucurónido illado e identificado previamente na banda II, no proceso de estudo do cromatograma correspondente a LC/ESI-MS-MS puidéronse observar outros dous compostos con tempos de retención de 29,7 e 47,0 min.

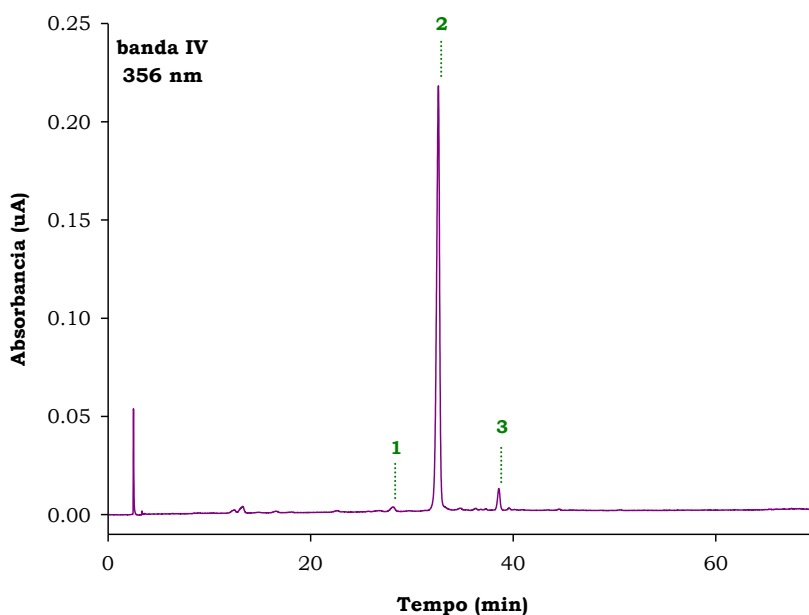


Figura 138. Cromatograma HPLC-DAD da banda IV capturado a 356 nm.

Composto 1 (t_R 28,1 min)

Tal e como ocorría para o composto 5 da banda III, o espectro en DAD deste composto, cun máximo de absorción a 323 nm e un ombro a 295 nm, coincide tanto co do ácido cafeico coma co do ácido ferúlico (Mozetič e col., 2006).

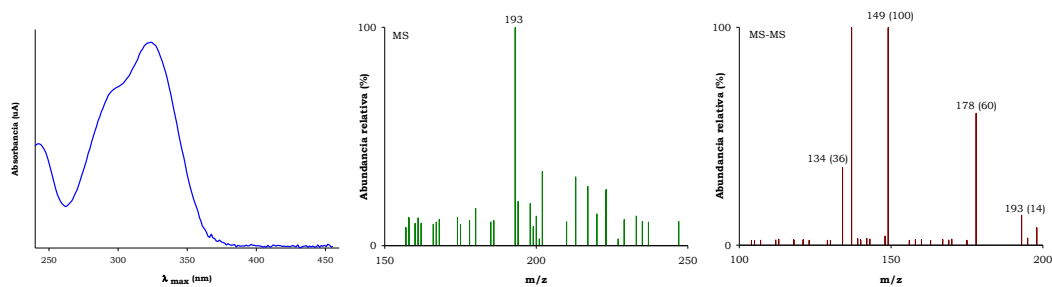


Figura 139. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 1 da banda IV.

O seu espectro de masas (figura 139) presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 193 m/z e tres ións de fragmentación MS/MS a 178, 149 e 134 m/z con

abundancias relativas do 60, 100 e 36 %, o que nos indica que estamos diante do ácido ferúlico (Hollecker e col., 2009; Mane e col., 2011). Do mesmo xeito que ocorría na banda III, ao estudar o cromatograma de LC/ESI-MS-MS observamos a presenza de dous ións pseudomoleculares $[M-H]^-$ a 179 m/z con tempos de retención de 28,1 e 29,7 min e con ións de fragmentación MS/MS para o segundo deles a 149 e 134 m/z (con abundancias relativas do 100 e 134 %); tamén neste caso estamos diante dos isómeros *cis* (o primeiro deles) e *trans* (o segundo) deste ácido hidroxicinámico (Maier e col., 2006).

Composto 3 (tr 38,6 min)

O seu espectro en DAD, con dous máximos de absorbancia en 265,4 e 347,4 nm e un ombro en 299 nm correspóndese co dun derivado glicosilado do kaempferol, unha circunstancia que se viu corroborada unha vez que se obtivo o seu espectro de masas; a presenza dun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 461 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 285 m/z (figura 140), indican con claridade que estamos diante do kaempferol-3-*O*-glucurónido. Ademais, tanto o seu tempo de retención como as súas características espectrais en DAD e masas coinciden cos do patrón comercial e mesmo cos resultados atopados na bibliografía (Mane e col., 2011).

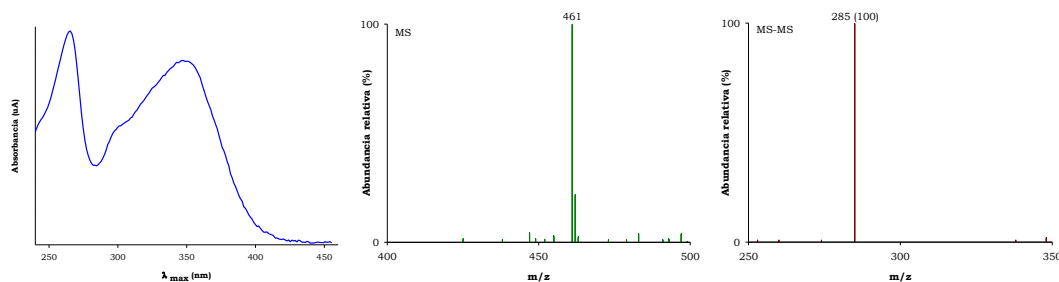


Figura 140. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 3 da banda IV.

Xa por último, indicar que xunto a estes catro compostos que vimos de analizar, no cromatograma obtido en LC-/ESI-MS/MS, e ademais do composto de tempo de retención de 29,7 min xa descrito cando falamos do composto 1, tempo de retención de 28,1, no minuto 47,0 temos observado un ión pseudomolecular

[M-H]⁻ a 591 m/z cun patrón de fragmentación ESI-MS-MS con ións a 547, 439, 301 e 289 m/z con abundancias relativas do 98, 30, 71 e 100 % (figura 141), que –como sucedía no caso dos compostos observados na banda III con semellantes características espectrais- fainos pensar que se poida tratar doutro elagitanino (Romani e col., 2012).

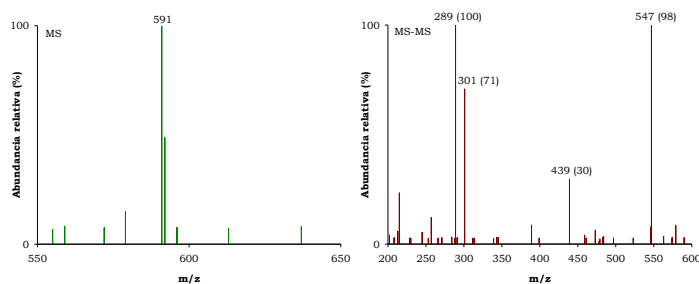


Figura 141. Espectros de ESI-MS e MS² do composto t_R 47,0 min da banda IV.

Os datos cromatográficos e espectrofotométricos obtidos para todos e cada un dos compostos illados nesta banda IV, amósanse na táboa 44, na que figuran os tres compostos illados previamente a partir do cromatograma de HPLC-DAD xunto cos outros dous illados durante a análise desta banda mediante LC/ESI-MS-MS, o ácido *trans*-ferúlico e un elagitanino.

Táboa 44. Características cromatográficas e espectrais en DAD e MS dos compostos fenólicos illados na banda IV.

Nº	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	Composto
1	28,1	295; 323	193	193/178/149/134	<i>c</i> -ferúlico
	29,7	-	193	149/134	<i>t</i> -ferúlico
2	33,3	256; 266; 294; 353,4	477	301	Q-glucur
3	38,6	265,4; 299; 347,4	461	285	K-glucur
	47,0	-	591	547/439/301/289	Elagitanino

En negraña amósanse os ombros; o número de pico fai referencia aos compostos illados en HPLC-DAD.

Banda V

Tal e como se pode observar no cromatograma presentado na figura 142, foron nove os compostos illados nesta banda; o composto 5, de tempo de retención 18,8 min, é a (-)-epicatequina, illada e identificada previamente na banda III.

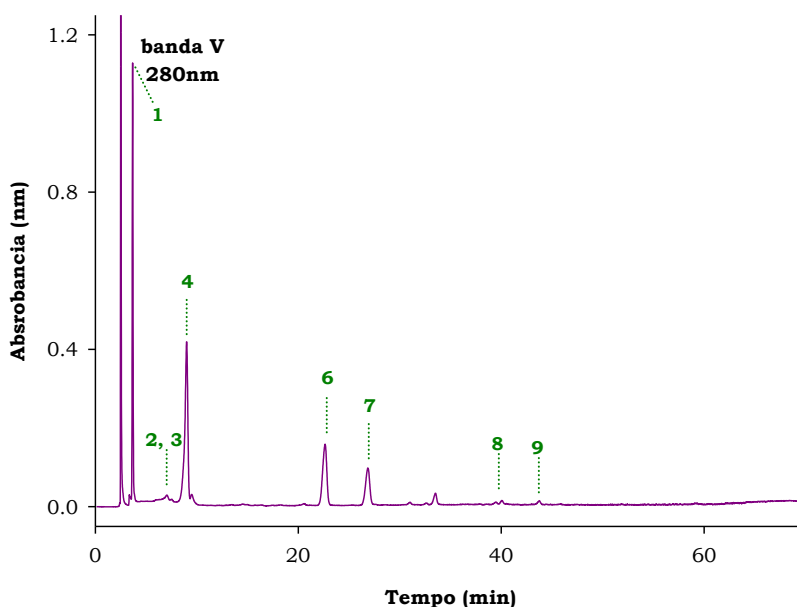


Figura 142. Cromatograma HPLC-DAD da banda V capturado a 280 nm.

Composto 1 (t_R 3,7 min)

Tanto o seu espectro en DAD, cun máximo de absorción a 271,3 nm, como o seu espectro de masas, cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 169 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 125 m/z (figura 143), permiten deducir que se trata do ácido gálico, feito que se confirma tanto polos datos bibliográficos consultados (Lee e col., 2005) como por comparación dos resultados acadados para este composto con aqueles obtidos por nós para o ácido gálico comercial.

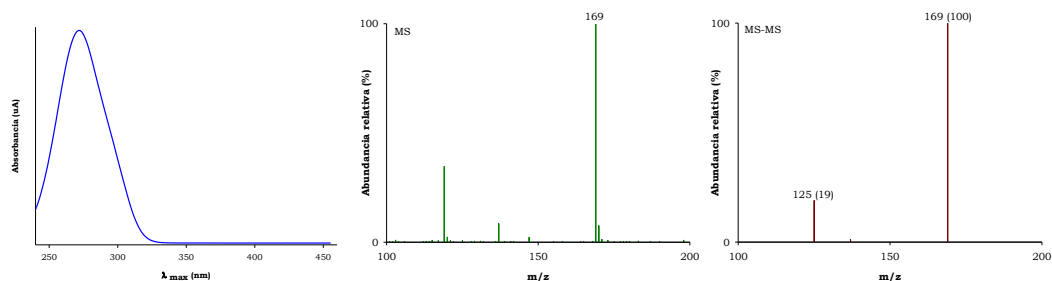


Figura 143. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 1 da banda V.

Que o ión de fragmentación teña unha abundancia relativa de só un 19 %, xunto coa presenza como maioritario do ión pseudomolecular sen romper, indica que a enerxía empregada na obtención dos ións de fragmentación non foi suficiente para romper a totalidade dos ións.

Compostos 2 e 3 (tr 7,0 e 7,5 min)

Ámbolos dous compostos presentan un espectro en DAD característico dos flavan-3-óis, cun máximo de absorción en 279,6, e uns espectros de masas con ións pseudomoleculares $[M-H]^-$ a 579 (con abundancias relativas do 18 e 28 % respectivamente) e 289 m/z (maioritario para os dous compostos), o que nos fai pensar que estamos diante de dúas procianidinas. Xunto a estes ións obsérvase outro a 349 m/z cunha abundancia relativa do 40 %. Só foi posíbel obter os ións de fragmentación MS/MS para o composto 3, obtendo fragmentos a 469 e 289 m/z con abundancias relativas do 50 e 100 % (figura 144), o que confirma a identidade deste composto como unha procianidina (Hollecker e col., 2009).

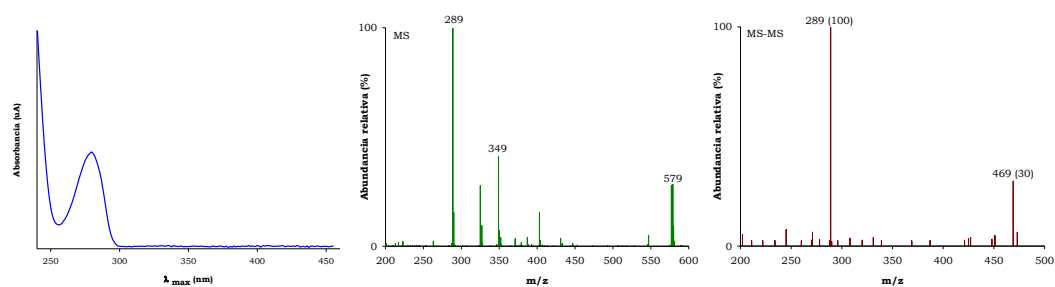


Figura 144. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 3 da banda V.

Composto 4 (tr 9,0 min)

O seu espectro en DAD presenta un máximo de absorción en 279,6 nm, moi característico –como xa indicamos– dos flavan-3-óis e dalgúns derivados hidroxibenzoicos que nestas condicións cromatográficas eluirían nun tempo de retención similar ao deste composto. A presenza dun ión pseudomolecular $[M-$

$\text{H}]^-$ a 289 m/z e dous ións de fragmentación MS/MS a 245 e 205 m/z no seu espectro de masas, con abundancias relativas do 53 e 38 % (figura 145), confirman que se trata dun flavan-3-ol monomérico (Hollecker e col., 2009; Mane e col., 2011) que se podería corresponder tanto coa (+)-catequina como coa (-)-epicatequina, pois ámbolos dous compostos presentan o mesmo patrón de fragmentación.

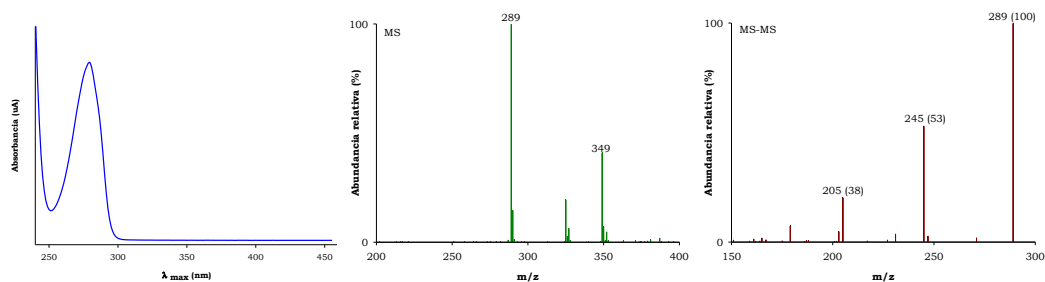


Figura 145. Espectros de DAD, ESI-MS e MS^2 do composto 4 da banda V.

Unha vez comparados os datos cromatográficos e espectrométricos (DAD e ESI-MS) obtidos para este composto cos acadados para os patróns comerciais destes dous compostos, podemos confirmar que se trata da (+)-catequina. Indicar que –no mesmo tempo de retención– no cromatograma de LC/ESI-MS observamos outro ión pseudomolecular a 349 m/z cunha abundancia relativa do 40 % que corresponde ao seu aducto co ácido acético.

Composto 6 (tr 22,6 min)

O espectro en DAD deste composto, cun máximo de absorción a 309,3 nm e un ombro a 298 nm fainos pensar que estamos en presenza dun derivado hidroxicinámico, e moi probabelmente que se trate do ácido *p*-coumárico. Unha vez que obtivemos o seu espectro de masas, puidemos confirmar este particular; en efecto, a presenza dun ión pseudomolecular $[\text{M-H}]^-$ a 163 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 119 m/z (figura 146), coincide cos datos proporcionados por Buiarelli e col. (2010) para este composto.

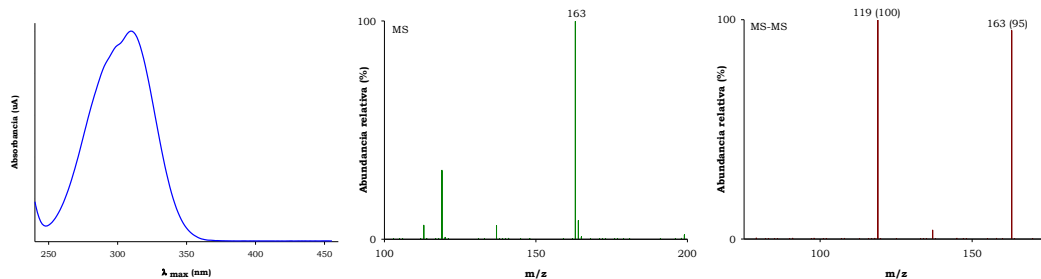


Figura 146. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 6 da banda V.

Composto 7 (*t_R* 26,9 min)

Aínda que o seu máximo de absorción en 295 nm en DAD fai pensar na posibilidade de que se trate dun derivado benzoico, o seu espectro de masas, semellante ao do composto anterior, cun ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 163 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 119 m/z (figura 147), indica que debe ser outro isómero do ácido *p*-coumárico.

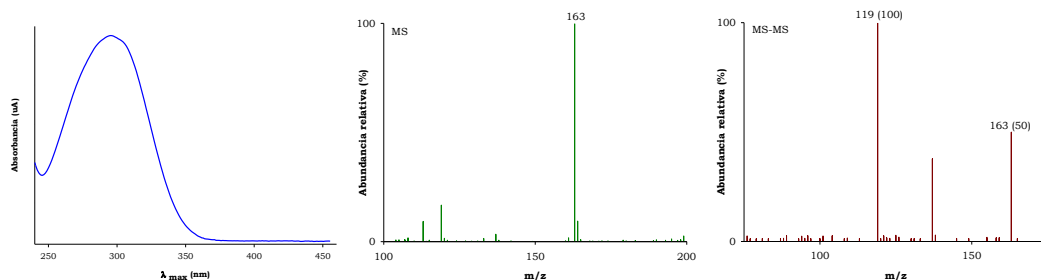


Figura 147. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 7 da banda V.

Neste sentido, e seguindo a Maier e col. (2006), debemos supoñer que estamos en presenza do isómero *trans* do ácido *p*-coumárico, pois, de acordo con estes autores, os isómeros *cis* dos derivados hidroxicinámicos elúen, nas nosas condicións cromatográficas, antes que os correspondentes *trans*. Xa que logo, podemos confirmar tamén que o composto 6 (de tempo de retención 22,6 min) sería o isómero *cis* deste mesmo ácido hidroxicinámico.

Composto 8 (tr 39,7 min)

Unha vez máis, estamos diante dun composto que posúe un espectro en DAD característico dos flavan-3-ois, cun máximo de absorción en 282 nm; neste caso o seu espectro de masas presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 575 m/z e ións de fragmentación MS/MS a 449 e 423 m/z (figura 148) que teñen unhas abundancias relativas do 100 e 63 %, respectivamente.

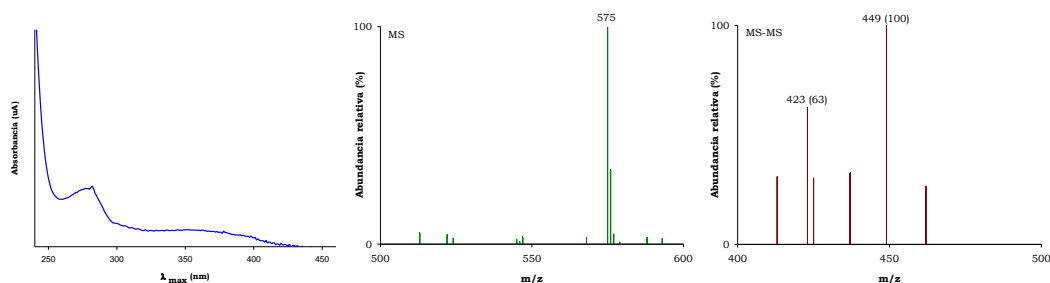


Figura 148. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 8 da banda V.

Estas características espectrais indicannos que se trata dunha procianidina e, concretamente, de acordo cos datos proporcionados por Mane e col. (2011), da procianidina A2.

Composto 9 (tr 43,8 min)

O último composto correspondente a esta banda posúe unhas características semellantes ás dalgún dos compostos estudados con anterioridade nas bandas II e III; presenta un espectro en DAD cun máximo de absorción en 279,6 nm moi característico dos flavan-3-ois e un espectro de masas cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 591 m/z cun patrón de fragmentación ESI-MS-MS con ións a 547, 439, 301 e 289 m/z con abundancias relativas do 51, 30, 66 e 100 %, respectivamente (figura 149), o que –como no caso dos compostos das bandas anteriores- nos fai pensar na posibilidade de que se trate dalgún outro tanino esterificado co ácido eláxico (Romani e col., 2012).

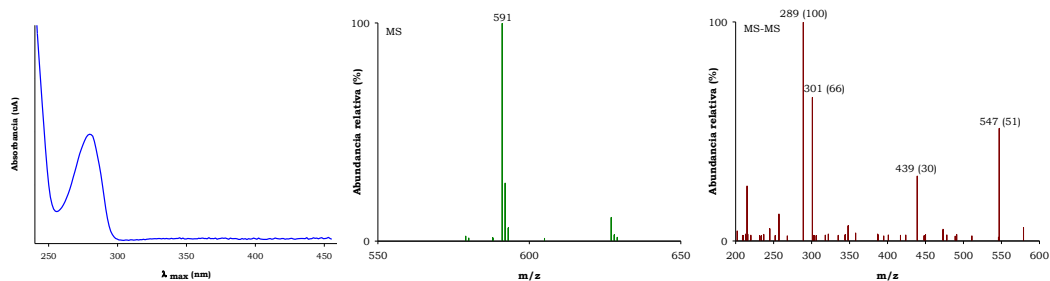


Figura 149. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 9 da banda V.

Como compendio da análise dos compostos illados nesta banda V, na táboa 45 recóllense os seus datos cromatográficos e espectrofotométricos.

Táboa 45. Características cromatográficas e espectrais en DAD e MS dos compostos fenólicos illados na banda V.

Nº	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] (m/z)	MS/MS (m/z)	Composto
1	3,7	271,3	169	125	Gálico
2	7,0	279,6	579/349/289	-	Procianidina
3	7,5	279,6	579/349/289	453/427/405/289	Procianidina
4	9,0	279,6	349/289	469/289	(+)-catequina
5	18,8	279,6	289	245/205	(-)-epicatequina
6	22,6	298; 309,3	163	119	<i>t-p</i> -coumárico
7	26,9	295	163	119	<i>c-p</i> -coumárico
8	39,7	282	575	449/423	Procianidina A2
9	43,8	279,6	591	547/439/301/289	Elagitanino

En negraña amósanse os ombros; subliñado amósase o ión pseudomolecular que se fragmenta

Banda VI

Os compostos presentes nesta banda (figura 150) son maioritariamente derivados flavanoideos; en efecto, dos 22 compostos illados, 12 resultaron ser dihidroflavonois, aínda que tamén se puideron observar algúns ácidos benzoicos, algúns flavan-3-ois e o *cis*-piceido que, hai que lembrar, foi illado e identificado previamente (composto 11 da banda I); do mesmo xeito, tamén o composto de tempo de retención 9,5 min foi illado con anterioridade na banda III (composto 5) por máis que neste caso –e como xa avanzamos– non foi posíbel conseguir datos concluíntes acerca da súa identidade.

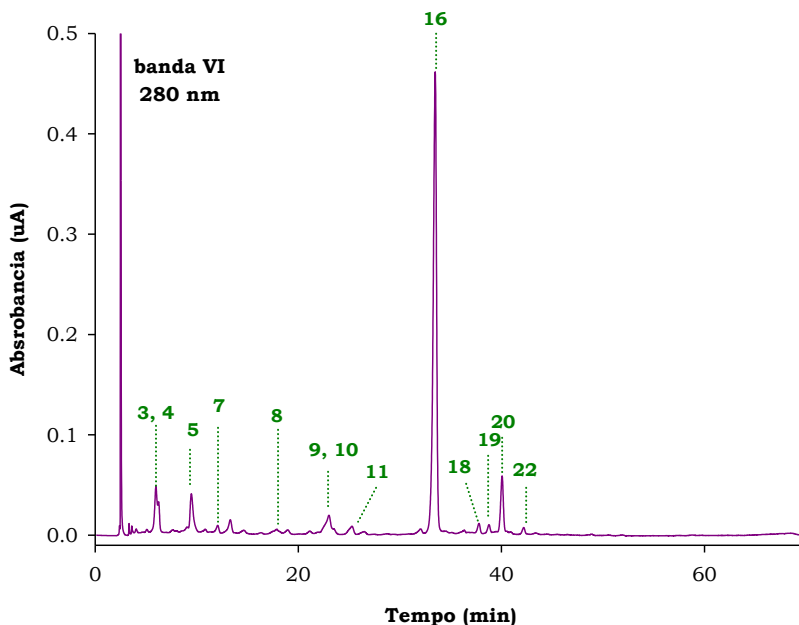


Figura 150. Cromatograma HPLC-DAD da banda VI capturado a 280 nm.

Dada a enorme similitude entre as características espectrais dos flavanoides observados nesta banda (tanto en DAD como en ESI-MS), temos considerado conveniente analizalos de xeito agrupado de acordo con estas características. Así, analizaremos os flavanoides en catro apartados que incluirán, en cada caso, aqueles compostos que presentan un mesmo ión pseudomolecular $[M-H]^-$ nas correspondentes análises de ESI-MS. Para o resto dos compostos presentes nesta banda, seguiremos o mesmo criterio utilizado ata aquí, analizándoos individualizadamente.

Composto 1 (t_R 4,0 min)

Tanto o espectro en DAD deste composto, cun máximo de absorción en 279,6 nm, como o de masas, cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 577 m/z e ións de fragmentación a 451, 425, 407 e 289 m/z (figura 151) con abundancias relativas do 57, 100, 45 e 30 % respectivamente, indican que estamos diante dunha procianidina dimérica (Hollecker e col., 2009; Regos e col., 2009), por máis que non poidamos concretar de que procianidina se trata.

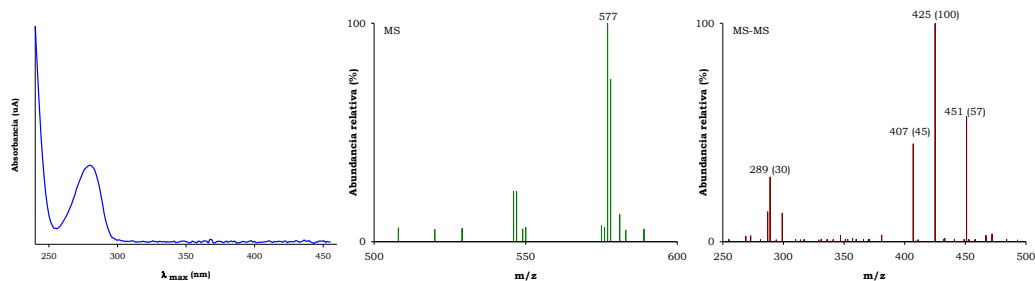


Figura 151. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 1 da banda VI.

Composto 2 (tr 5,1 min)

Este composto ten un espectro en DAD con dous máximos de absorción en 257,2 e 289,1 nm e un espectro de masas cun ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 153 m/z e un ión de fragmentación a 109 m/z (figura 152) cunha abundancia relativa do 85 %. Tanto estes resultados espectrométricos como os cromatográficos, coinciden cos proporcionados por Hollecker e col. (2009) para o ácido protocatéquico, e cos obtidos por nós para o patrón comercial deste ácido benzoico.

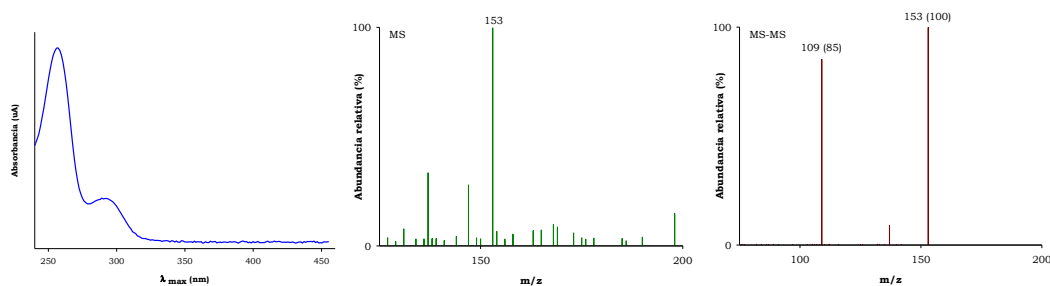


Figura 152. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 2 da banda VI.

Composto 3 (tr 6,0 min)

Ao considerar o espectro en DAD deste composto, cun máximo de absorbancia a 279,6 nm (figura 153), puideramos pensar que estamos ante un flavan-3-ol ou algún derivado benzoico que, como o alcohol vaníllico e o isovaníllico, presentan espectros UV-vis con estas mesmas características. A observación do

cromatograma obtido mediante LC/ESI-MS, non permite tampouco discernir a identidade deste composto, pois ao analizar o citado cromatograma, non observamos ningún ión pseudomolecular para este tempo de retención; é na fragmentación posterior en ESI-MS/MS do ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 349 m/z cando temos observado que no minuto 6,0 do cromatograma existe un ión de fragmentación MS/MS a 289 m/z , o que nos fai pensar na posíbel existencia dun flavan-3-ol neste tempo de retención. Ao noso entender, este ión a 289 m/z é o verdadeiro ión pseudomolecular do composto que nos ocupa, e achacamos a inexistencia de fragmentación á formación previa dun aducto co ácido acético da fase móbil.

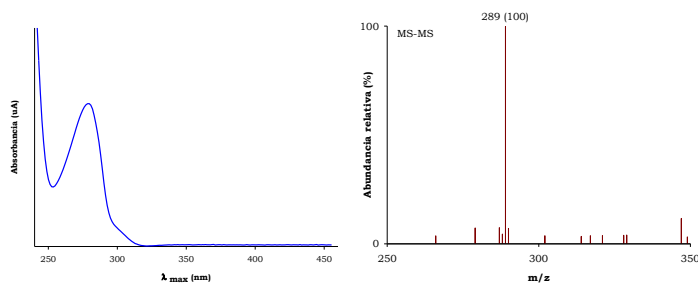


Figura 153. Espectros de DAD e MS² do composto 3 da banda VI.

Composto 4 (tr 6,2 min)

Neste caso, o espectro en DAD, presenta dous máximos de absorbancia a 259,5 e 293,8 nm o que nos indica que estamos ante un derivado benzoico (figura 154). Estas características espectrais e o seu tempo de retención fannos pensar que se poida tratar do aldehido do protocatéuico, e máis se temos en conta que os resultados acadados en HPLC-DAD para este composto coinciden cos do patrón comercial analizado nas mesmas condicións cromatográficas.

Do mesmo xeito que sucedía para o composto anterior, ao analizar os espectros de masas non observamos ningún ión pseudomolecular neste tempo de retención, e só cando se fragmenta o ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 153 m/z do ácido protocatéuico (que aparecía no tempo de retención 5,1 min) observamos que, xunto ao ión de fragmentación MS/MS a 109 m/z deste ácido, aparece

outro de igual valor (109 m/z) en 6,2 min cunha abundancia relativa do 32 %. Estes resultados descartan que se poida tratar do aldehido do protocatéquico, circunstancia que se viu confirmada mediante a análise en LC/ESI-MS do patrón comercial deste derivado benzoico. En efecto, este patrón presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 137 m/z inexistente no espectro de masas do composto que nos ocupa.

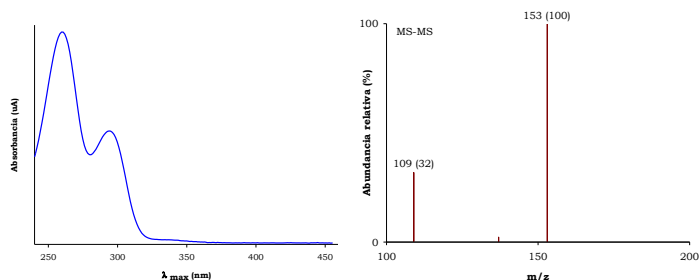


Figura 154. Espectros de DAD e MS² do composto 4 da banda VI.

Composto 6 (tr 10,8 min)

Como sucedía para o composto 1, tanto o seu espectro en DAD, cun máximo de absorción en 278,4 nm, como o de masas, cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 577 m/z e ións de fragmentación a 451, 425, 407 e 289 m/z (figura 155) con abundancias relativas do 55, 100, 10 e 25 %, indican que estamos diante dunha procianidina dimérica (Hollecker e col., 2009; Regos e col., 2009), por máis que –como naquel caso– tampouco sexamos quen de concretar máis sobre a súa estrutura.

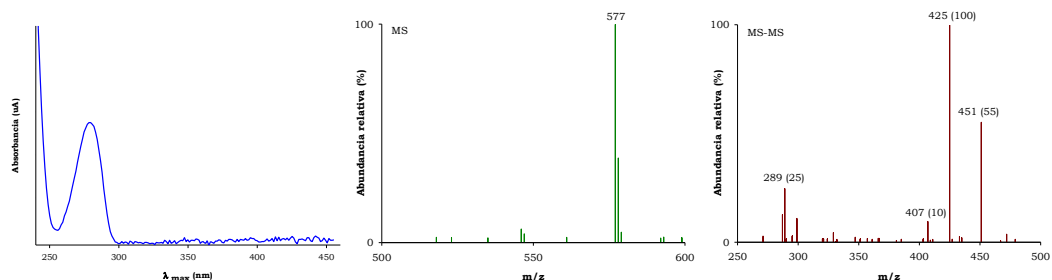


Figura 155. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 6 da banda VI.

Composto 7 (t_R 12,1 min)

De acordo co seu máximo de absorbancia en 279,6 nm cabe pensar que se poida tratar dun flavan-3-ol ou dalgún derivado benzoico, pero o seu espectro de masas, cun ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 435 m/z e ións de fragmentación a 289 e 271 m/z con abundancias relativas do 39 e 20 % (figura 156) non nos permite coñecer a identidade deste composto. Unha vez máis, e cunha abundancia relativa do 24 %, aparece o aducto a 495 m/z do ión pseudomolecular co ácido acético.

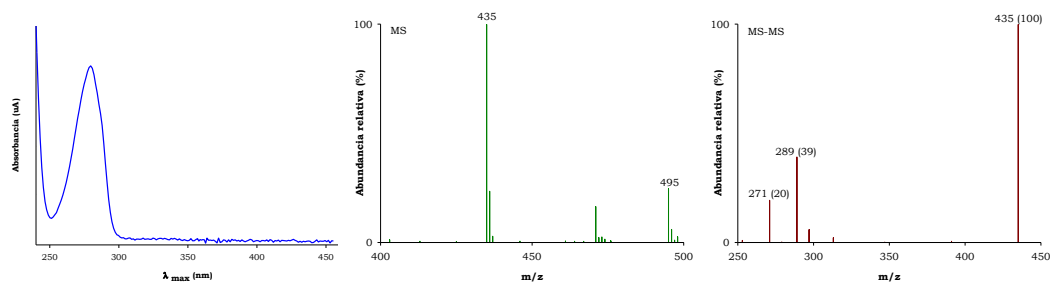


Figura 156. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 7 da banda VI.

Compostos 8, 13, 15, 16, 17 e 18 (t_R 17,9, 28,7, 32,0, 33,5, 36,5 e 37,8 min)

Todos estes compostos presentan un espectro en DAD característico dos flavanoides, cun máximo de absorción no rango de 286 a 298 nm e un ombro arredor de 340 nm; ademais, todos eles presentan un espectro de masas cun ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 449 m/z (figura 157).

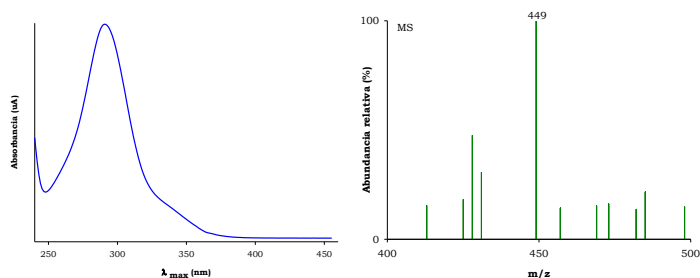


Figura 157. Espectros de DAD e ESI-MS do composto 8 da banda VI.

A análise mediante MS/MS deste ión pseudomolecular permite observar que os dous primeiros compostos dan (figura 158) un ión de fragmentación a 287 m/z (269 m/z no segundo deles por perda dunha molécula de H₂O) que parece indicar a presenza de dous derivados glicosilados do dihidrokaempferol que, segundo Baderschneider e Winterhalter (2001), deberían ser, respectivamente, o dihidrokaempferol-3-O-galactósido e o dihidrokaempferol-3-O-glucósido.

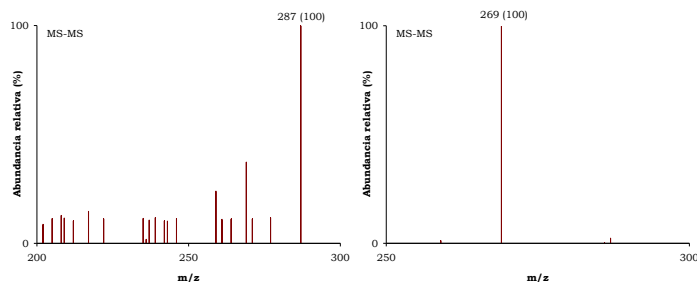


Figura 158. Espectros de MS² dos compostos 8 e 13 da banda VI.

Os outros catro compostos (15, 16, 17 e 18) presentaron un patrón de fragmentación en MS/MS con dous ións a 303 e 285 m/z (figura 159) que, de acordo con Baderschneider e Winterhalter (2001), coincide co dos derivados glicosilados da dihidroquercetina; debemos facer constar en calquera caso, que o ión de fragmentación MS/MS a 285 m/z é o resultado da perda dunha molécula de H₂O no ión de 303 m/z.

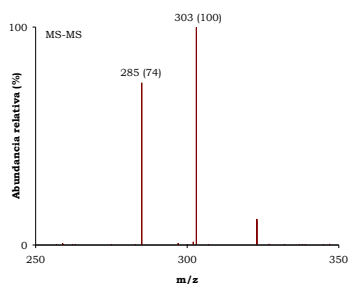


Figura 159. Espectros de MS² do composto 16 da banda VI.

Por comparación destes resultados cromatográficos e espectrométricos (DAD e ESI-MS) cos obtidos no noso laboratorio para o patrón do dihidroquercetina-3-O-

rhamnósido (astilbina), o composto 16 do noso cromatograma, de tempo de retención 33,5 min, correspóndese con este dihidroflavonol, un dos maioritarios nas castes de vide xunto co dihidrokaempferol-3-*O*-rhamnósido (engeletina). Polo que fai aos outros tres compostos (15, 17 e 18), dicir que poderían ser outros rhamnósidos glicosilados nunha posición diferente á posición 3 da molécula; neste sentido, indicar que do mesmo xeito que Baderschneider e Winterhalter (2001) teñen descrito a presenza do dihidroquercetin-3-*O*-glucósido e do dihidroquercetin-3'-*O*-glucósido en viños brancos elaborados coa caste Riesling, poderían existir tamén rhamnósidos substituídos en posicións diferentes á 3, concretamente nas 3', 4', 5 e 7, por máis que -ata o que nós sabemos- non se teñen atopado con anterioridade no xénero *Vitis*.

Compostos 9 e 12 (t_R 23,0 e 26,5 min)

Estes compostos presentan espectros de DAD característicos dos flavanoides, cun máximo de absorción en 291,5 nm no primeiro caso e 292,7 nm no segundo, e cun ombro arredor dos 340 nm en ámbolos dous casos. Os seus espectros de masas presentan un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 465 m/z e dous ións de fragmentación MS/MS a 303 e 285 m/z (figura 160), que claramente corresponden a derivados glicosilados da dihidroquercetina, como vimos de expoñer para os compostos anteriormente estudados.

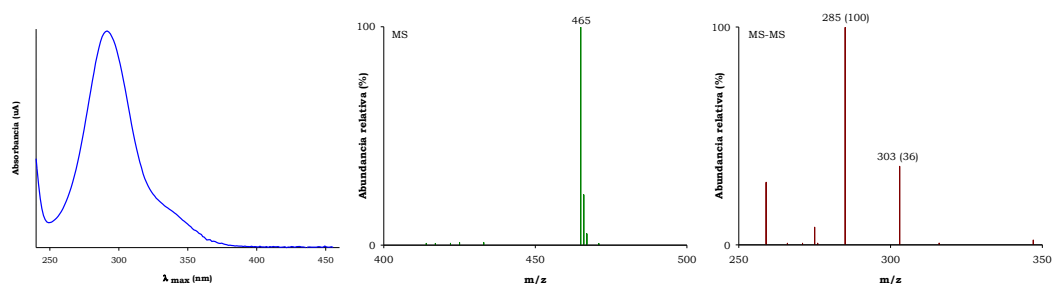


Figura 160. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 12 da banda VI.

Neste caso, a perda dun fragmento de 162 uma indica que se trata de glicósidos da dihidroquercetina nos que o azucre debe ter unha masa molecular

de 180 uma (normalmente glucosa ou galactosa) que, como xa adiantamos, pode estar en posicións diferentes á 3 que, sábese, é a máis común na vide (Baderschneider e Winterhalter, 2001). Non foi posíbel obter resultados nas hidrólises ácidas realizadas para estes compostos.

Compostos 19, 20 e 21 (t_R 38,8, 40,1 e 40,9 min)

Neste grupo de flavanoides da banda VI os compostos presentan espectros de DAD cun máximo de absorción no rango de 289 a 295 nm, e cun ombro entre os 340 e os 355 nm. En todos os casos, os seus espectros de masas presentan un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 433 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 287 m/z (figura 161), por máis que para o composto 19 apareza realmente un ión de 269 m/z, que indica a perda dunha molécula de H_2O , e que observamos tamén no composto 21 xunto co ión a 287 m/z.

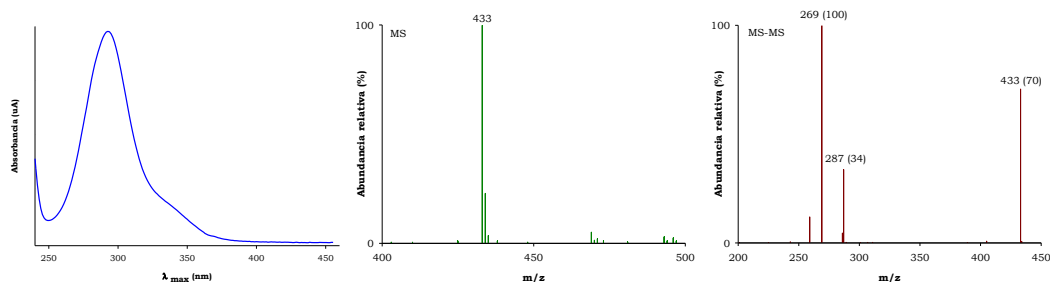


Figura 161. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 20 da banda VI.

Estes espectros correspóndense claramente cos dos derivados glicosilados do dihidrokaempferol, nos que “a priori” o azucre ten que ser a rhamnosa. Datos cromatográficos e espectrométricos (DAD e ESI-MS) obtidos no noso laboratorio co patrón do dihidrokaempferol-3-*O*-rhamnósido (engeletina) permiten identificar o noso composto 20 como este dihidroflavonol. Como sucedía para os compostos 15, 17 e 18, tamén no caso dos compostos 19 e 21 podemos pensar na posibilidade de que se trate de dúas formas isoméricas nas que a rhamnosa ocupe un -OH diferente ao da posición 3.

Composto 11 (tr 25,3 min)

Trátase de novo dun derivado glicosilado da dihidroquercetina; en efecto, tanto o seu espectro en DAD que presenta un máximo de absorción en 287,9 nm e un ombro en 336 nm, como o seu espectro de masas, cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 435 m/z e dous ións de fragmentación MS/MS a 303 e 285 m/z (figura 162), así o indican. Neste caso o azucre non pode ser máis que a xilosa ou a arabinosa. Aínda que na hidrólise ácida deste composto non obtivemos resultados que permitan identificar o azucre, entendemos que se debe tratar do dihidroquercetín-3-O-xilósido, non só polo feito de que este composto ten sido identificado previamente en viños por Baderschneider e Winterhalter (2001), senón tamén pola propia existencia do quercetín-3-O-xilósido nas nosas mostras, pois non se debe esquecer que os dihidroflavonois son os precursores dos flavonois.

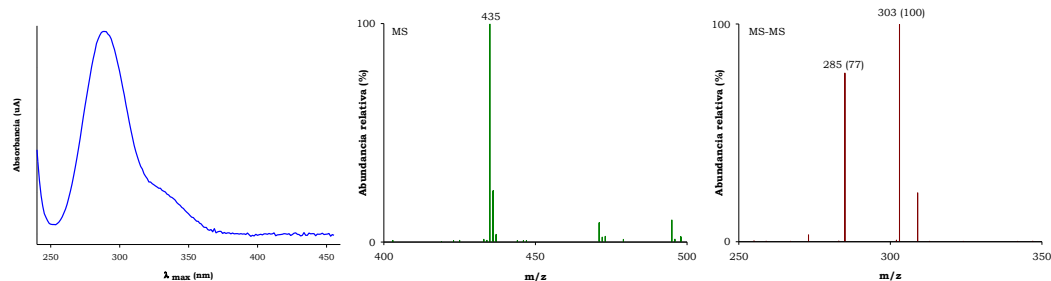


Figura 162. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 11 da banda VI.

Composto 10 (tr 23,4 min)

Cun espectro en DAD no que se observan dous claros máximos de absorción en 261 e 293,8 nm e un espectro de masas que presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 167 m/z e dous ións de fragmentación MS/MS a 152 e 108 m/z con abundancias relativas do 100 e 20 % (figura 163), non poden existir dúbidas de que estamos diante do ácido vanílico. Dicir en todo caso, que estes datos coinciden plenamente cos observados no noso laboratorio para o patrón comercial deste ácido benzoico e, así mesmo, cos proporcionados por Hollecker e col. no ano 2009 para este composto.

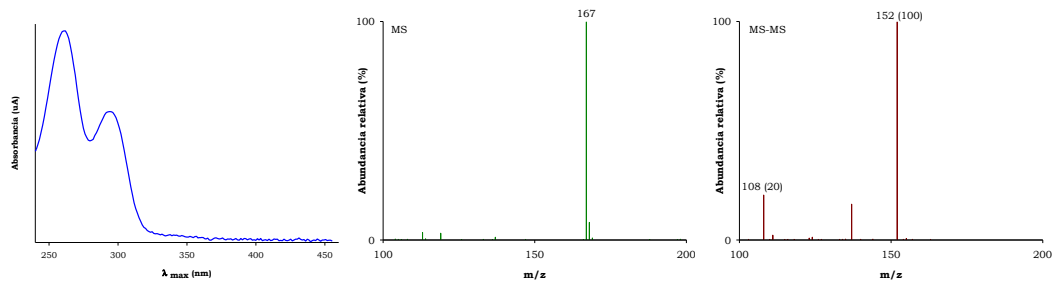


Figura 163. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 10 da banda VI.

Composto 14 (t_R 30,5 min)

O último dos compostos que analizaremos nesta banda ten un espectro en DAD moi similar ao do composto de tempo de retención 23,4 min que vimos de analizar; a presenza de dous máximos de absorción en 260,7 e 297,5 nm fainos pensar na posibilidade de que se trate dun derivado benzoico. En calquera caso, o seu espectro de masas, que presenta un ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 305 m/z (cunha abundancia relativa do 71 %) e un ión de fragmentación MS/MS a 169 m/z (figura 164), non nos permite adiantar máis nada acerca da súa identidade.

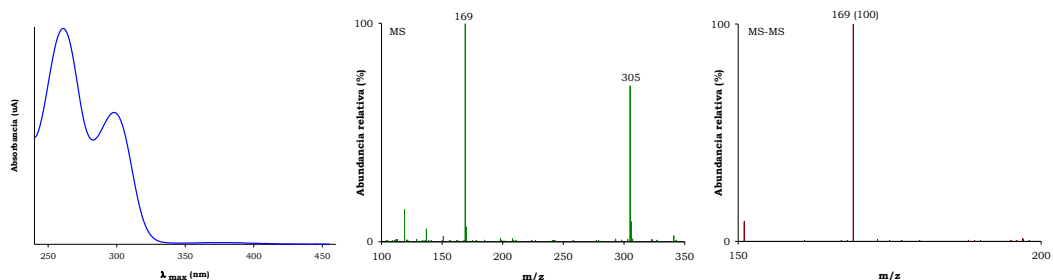


Figura 164. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 14 da banda VI.

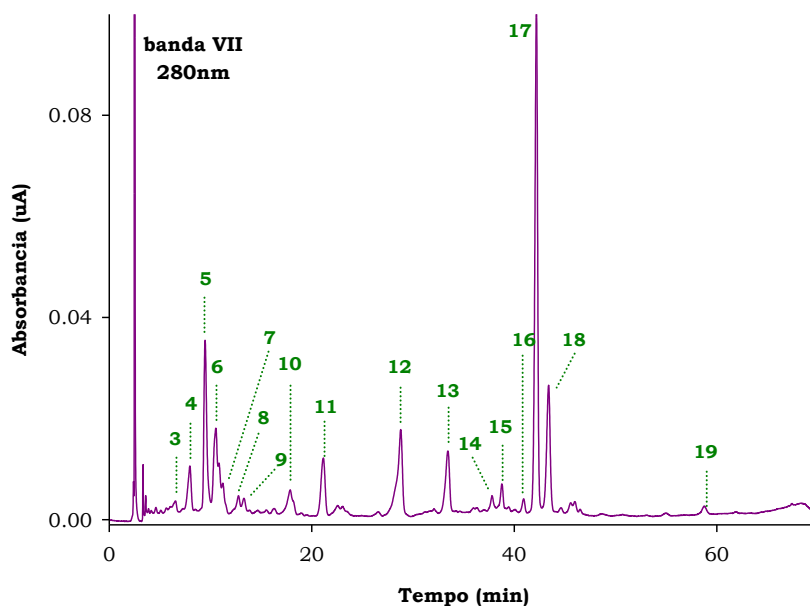
Tal e como fixemos para as bandas anteriores, na táboa 46 presentamos os datos espectrofotométricos e cromatográficos obtidos para os vinte e dous compostos illados na banda VI, todos eles previamente illados en HPLC-DAD.

Táboa 46. Características cromatográficas e espectrais en DAD e MS dos compostos fenólicos illados na banda VI.

Nº	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	Composto
1	4,0	279,6	577	451/425/407/289	Procianidina
2	5,1	257,2;289,1	153	153/109	Protocatéquico
3	6,0	279,6	349	289	Desc
4	6,2	259,5; 293,8	153	153/109	Bz
5	9,5	274,3; 281,4	349/289	-	Desc
6	10,8	278,4	577	451/425/407/289	Procianidina
7	12,1	279,6	435	289/271	Desc
8	17,9	286,7; 342	449	287	dhK-glic
9	23,0	291,5; 341	465	303/285	dhQ-glic
10	23,4	261,0; 293,8	167	152/108	Vanillico
11	25,3	287,9; 336	435	303/285	dhQ-xil
12	26,5	292,7; 341	465	303/285	dhQ-glic
13	28,8	295; 340	449	269	dhK-glic
14	30,5	260,7; 297,4	305	169	Bz
15	32,0	293; 344	449	303/285	dhQ-glic
16	33,5	290,3; 340	449	303/285	Astilbina
17	36,5	297; 340	449	303/285	dhQ-glic
18	37,8	292,7; 349	449	303/285	dhQ-glic
19	38,8	295; 346	433	269	dhK-glic
20	40,1	292,7; 342	433	287	Engeletina
21	40,9	289,1; 354	433	287/269	dhK-glic
22	42,2	284,4	389	227	c-piceido

En negraña amósanse os ombros; subliñado amósase o ión pseudomolecular que se fragmenta

Banda VII

**Figura 165.** Cromatograma HPLC-DAD da banda VII capturado a 280 nm.

Dos 19 compostos illados mediante HPLC-DAD nesta banda (figura 165), un total de oito xa foron illados e identificados –cando foi posíbel– nalgunha das bandas anteriores; así o composto 5 correspóndese co compostos 4 da banda III, os compostos 12 e 17 son o *trans*- e *cis*-piceido (identificados na banda I), o composto 13 é a astilbina, analizada xa na banda VI, e os compostos 10, 14, 15 e 16 correspóndense cos compostos 8, 18, 19 e 21 illados tamén nesa mesma banda.

Asi mesmo, debemos indicar que non imos falar aquí dos compostos 3 e 9, dos que falaremos ao tratar da banda VIII na que, como veremos, aparecen derivados hidroxicinámicos, grupo de compostos fenólicos ao que –en función do seu espectro en DAD– sabemos pertencen estes dous compostos.

Composto 1 (tr 5,1 min)

Trátase dun derivado benzoico; en efecto, tanto o seu espectro en DAD, que presenta dous máximos de absorción en 256 e 296,2 nm, como o seu espectro de masas, cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 169 m/z e dous ións de fragmentación MS/MS a 151 e 137 m/z con abundancias relativas do 100 e 55 % respectivamente (figura 166), así o indican. Da comparación destes resultados cos acadados por nós para os patróns comerciais de diversos derivados hidroxibenzoicos, podemos concluír que o noso composto é o ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico.

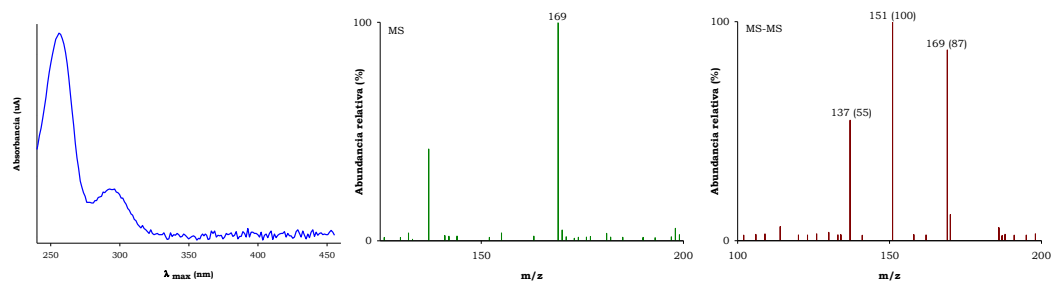


Figura 166. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 1 da banda VII.

Composto 2 (tr 5,5 min)

Tanto as características cromatográficas deste composto como o seu espectro en DAD, cun máximo de absorción en 293,5 nm, fan pensar que se poida tratar dun derivado benzoico; en calquera caso, o seu espectro de masas, cun ión pseudomolecul a $[M-H]^-$ a 325 m/z (e o seu aducto co ácido acético a 385 m/z) e un ión de fragmentación de MS/MS a 163 m/z corresponde, de acordo con Baderschneider e Winterhalter (2001), a un glicósido desprotonado do ácido *p*-coumárico (figura 167).

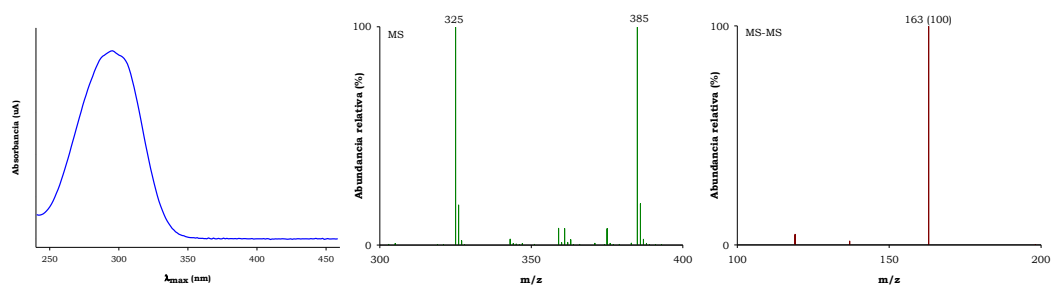


Figura 167. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 2 da banda VII.

Tal e como xa discutimos con anterioridade (páxina 97), a glicosilación dos grupos hidroxilo en posición 4 do anel aromático dos ácidos hidroxicinámicos provoca unha modificación hipsocrómica do seu máximo de absorción en UV-vis con respecto ao do aglicón e ao dos seus respectivos ésteres (Reschke e Herrmann, 1981; Ibrahim e Barron, 1989), o que nos leva a pensar que se poida tratar dalgún destes derivados glicosilados. A análise do patrón do 4-*O*-β-D-glucósido do ácido *p*-coumárico permitiunos observar que ámbolos dous compostos presentan un comportamento cromatográfico e espectrométrico semellante, e mesmo que sofren as mesmas modificacións do seu espectro UV-vis cando se someten a acción de diferentes axentes químicos modificadores do espectro, o que nos permite afirmar que estamos diante deste derivado. A análise dos produtos das hidrólises alcalina e enzimática (segundo os métodos descritos en material e métodos) posibilitou identificar a presenza do ácido *p*-

coumárico e da glucosa, o que confirma de cheo a identificación do 4-O- β -D-glucósido do ácido *p*-coumárico.

Debemos destacar aquí que este composto, previamente descrito por Baderschneider e Winterhalter (2001) en viños elaborados coa caste Riesling, non foi identificado con anterioridade –ata o que nós sabemos– en mostos. Con seguridade, trátase da primeira vez que se illa e identifica este composto en mostos de castes galegas.

Composto 4 (tr 8,0 min)

Este composto presenta un espectro de DAD característico dos flavanoides, cun máximo de absorción en 291,5 nm e cun ombro en 345 nm, e o seu espectro de masas presenta un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 465 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 303 (figura 168), que claramente corresponde a un derivado glicosilado da dihidroquercetina.

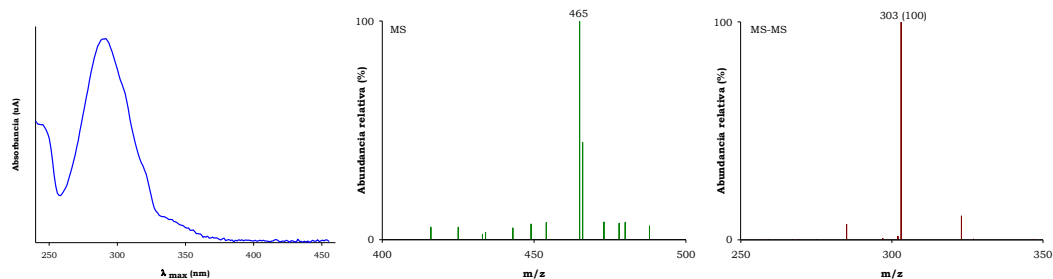


Figura 168. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 4 da banda VII.

Tal e como explicamos xa para algún dos compostos estudados na banda VI, a perda dun fragmento de 162 uma indica que se trata dun glicósido da dihidroquercetina, nos que –como xa adiantamos– o azucre normalmente é a glucosa ou a galactosa e podería estar en posicións diferentes á 3, a máis común na vide (Baderschneider e Winterhalter, 2001). Non foi posíbel obter resultados nas hidrólises ácidas realizadas para este composto, polo que non podemos indicar de que azucre se trata.

Composto 6 (t_R 10,5 min)

O espectro en DAD deste composto, cun máximo de absorción en 256 nm, faíños pensar que se trata dun derivado benzoico; ao estudar o seu espectro de masas, que presenta un ión pseudomolecular [M-H]⁻ a 137 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 93 m/z (figura 169), e ao comparar estes resultados tanto cos acadados por nós para os patróns comerciais de diversos derivados hidroxibenzoicos como cos atopados na bibliografía (Hollecker e col., 2009), chegamos á conclusión de que se trata do ácido 4-hidroxibenzoico.

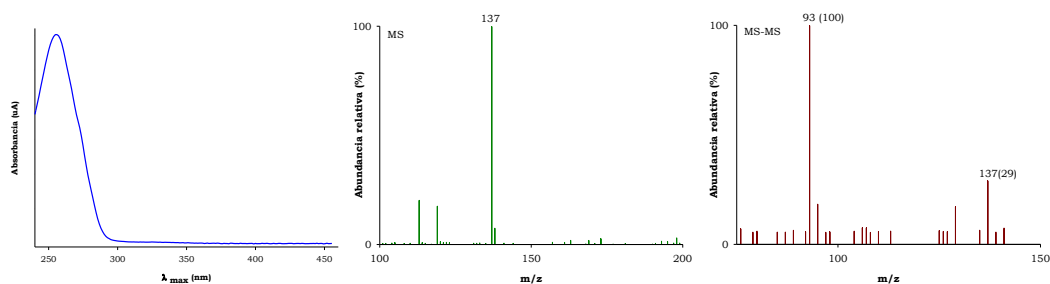


Figura 169. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 6 da banda VII.

Compostos 7 e 8 (t_R 11,2 e 12,8 min)

Para estes dous compostos non foi posíbel obter máis resultados que os correspondentes aos seus espectros en HPLC-DAD, que podemos observar na figura 170.

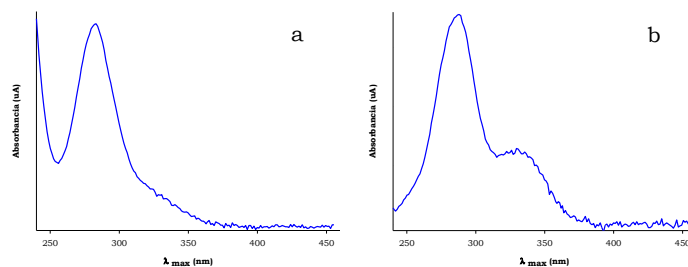


Figura 170. Espectros de DAD dos compostos 7 (a) e 8 (b) da banda VII.

En ámbolos dous casos os seus espectros presentan un máximo de absorción arredor dos 285 nm (283,2 nm para o primeiro deles e 287,9 nm para o segundo) e un ombro arredor de 330 nm, o que fai pensar que se poida tratar de dous flavanoides; en calquera caso, o aspecto do ombro no composto 8 –que pode semellar un máximo- lévanos a considerar a posibilidade de que se este producindo a coelución con algún outro composto.

Composto 11 (tr 21,2 min)

Este composto presenta un espectro de DAD cun máximo de absorción en 298,6 nm e un ombro a 360 nm, e un espectro de masas cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 465 m/z e un ión de fragmentación MS/MS a 285 m/z (figura 171) que corresponden a derivados glicosilados da dihidroquercetina; indicar que o ión a 285 m/z é o resultado da perda dunha molécula de H_2O do ión de 303 m/z. Neste caso –tal como xa dixemos para outros compostos- a perda dun fragmento de 162 uma indica que o azucre debe ter unha masa molecular de 180 uma (normalmente trátase de glucosa ou galactosa).

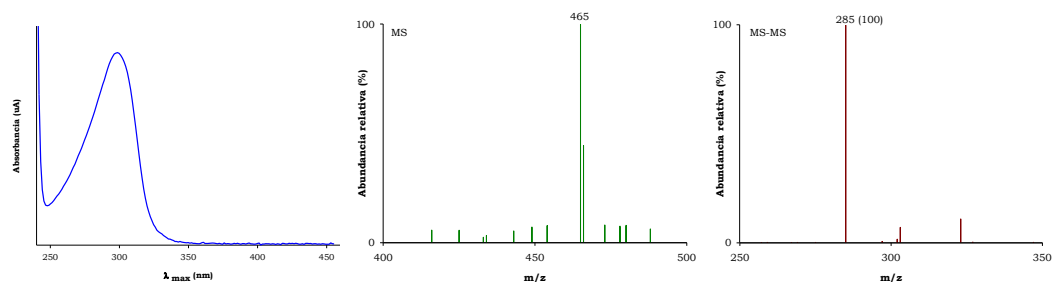


Figura 171. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 11 da banda VII.

Unha vez máis, indicar que aínda que a posición máis frecuente é a posición 3, existe a posibilidade de glicosilación noutras posicións (Baderschneider e Winterhalter, 2001). Como ten acontecido nalgún outro caso, non foi posíbel obter resultados satisfactorios tras a hidrólise ácida deste composto.

Compostos 18 e 19 (t_R 43,4 e 58,8 min)

Tampouco foi posíbel neste caso obter o espectro de masas destes dous compostos, e os seus espectros en DAD, cun máximo de absorción en 258,3 nm e un ombro en 300 nm para o primeiro deles e cun único máximo en 266,6 nm no caso do segundo (figura 172), fannos pensar que se poida tratar de derivados hidroxibenzoicos, sen que poidamos achegar máis información acerca de ningún deles.

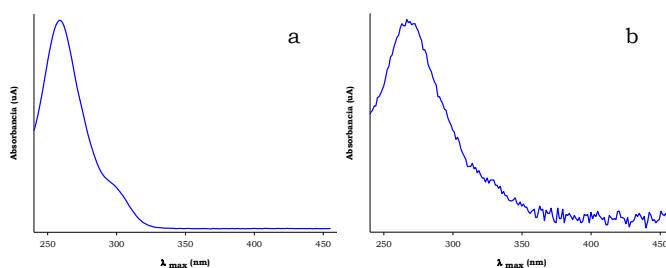


Figura 172. Espectros de DAD dos compostos 18 (a) e 19 (b) da banda VII.

Xa por último, e no que á análise desta banda se refire, indicar que xunto aos 19 compostos que vimos de describir, no estudo do cromatograma obtido mediante LC/ESI-MS-MS, observamos –no minuto 31,4– a presenza dun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 151 m/z e dous ións de fragmentación MS/MS a 123 e 107 m/z cunhas abundancias relativas do 28 e 58 % respectivamente (figura 173) que, por comparación con diversos patróns comerciais analizados no noso laboratorio nas mesmas condicións, pensamos podería tratarse da vanillina.

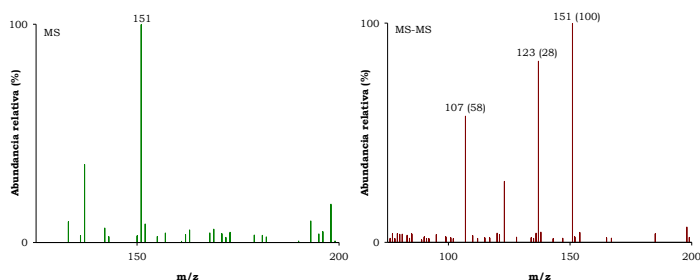


Figura 173. Espectros de ESI-MS e MS² do composto 19 da banda VII.

Os datos cromatográficos e espectrofotométricos dos compostos de natureza fenólica illados na banda VII, aparecen recollidos na táboa 47.

Táboa 47. Características cromatográficas e espectrais en DAD e MS dos compostos fenólicos illados na banda VII.

Nº	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	Composto
1	5,1	256; 296,2	169	151	triOH-benzoico
2	5,5	293,5	325	163	4-gluc <i>p</i> -coumárico
3	6,5	299 ; 330,7	311	179/149	Caftárico
4	8,0	291,5; 345	465	303	dhQ-glic
5	9,5	274,9; 281,8	289	-	Desc
6	10,5	256	137	93	4-OH-benzoico
7	11,2	283,2; 334	-	-	Flavanoide
8	12,8	287,9; 329	-	-	Flavanoide
9	13,3	298,6 ; 328,3	325	193	Fertárico
10	17,9	289,1; 343	449	287	Flavanoide
11	21,2	298,6	465	285	dhQ-glic
12	28,8	308; 320	449	227	<i>t</i> -piceido
	31,4	-	151	151/123/107	Vanillina
13	33,4	295; 340	449	303/285	Astilbina
14	37,8	292,7; 350	449	303/285	Flavanoide
15	38,8	295; 345	433	271/269	Flavanoide
16	40,9	287,9; 342	433	287/269	Flavanoide
17	42,2	285,5	389	227	<i>c</i> -piceido
18	43,4	258,3; 300	-	-	Bz
19	58,8	266,6	-	-	Bz

En negraña amósanse os ombros; o número de pico fai referencia aos 19 compostos illados en HPLC-DAD.

Banda VIII

Atopámonos nesta banda (figura 174) cun total de oito compostos que, en case todos os casos e en función dos seus espectros en DAD, semellan ser derivados hidroxicinámicos. Como teremos ocasión de ver, están presentes, entre outros, as formas isoméricas *cis* e *trans* dos ésteres tartáricos dos ácidos cafeico, *p*-coumárico e ferúlico; por esta razón, estudaremos de xeito conxunto as dúas formas isoméricas para cada un destes derivados, tratando logo de forma individualizada o resto dos compostos presentes na banda.

Debemos lembrar aquí, que algún destes compostos teñen aparecido xa na banda anterior, por máis que sexan analizados neste apartado; trátase, en concreto, dos compostos 2 e 6, de tempos de retención 6,3 e 13,3 min, respectivamente. Como xa dixemos, entendemos máis lóxico estudar de forma conxunta todos os ésteres tartáricos dos ácidos hidroxicinámicos.

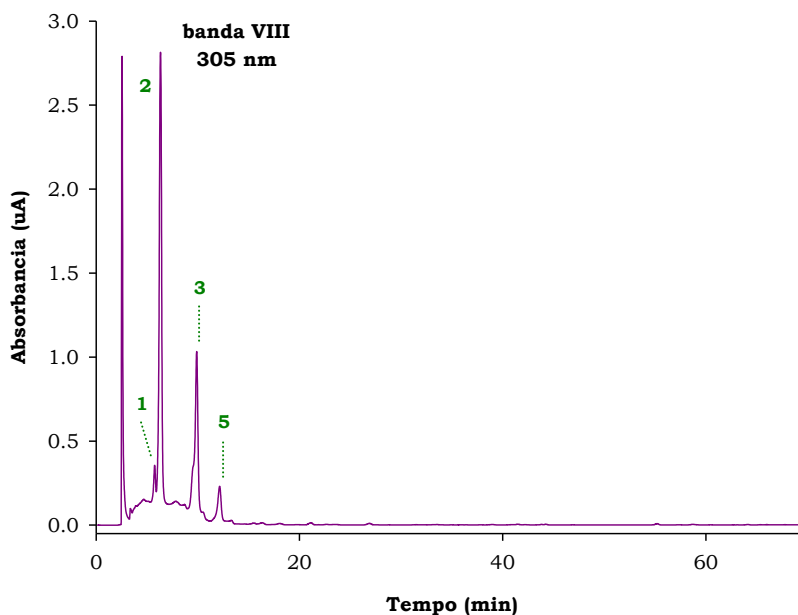


Figura 174. Cromatograma HPLC-DAD da banda VIII capturado a 305 nm.

Compostos 1 e 2 (t_R 5,8 e 6,3 min)

Con espectros de absorción en DAD cun máximo en 325,9 e un ombro en 282 nm no primeiro caso, e un máximo en 327,1 nm e un ombro en 299,5 nm no segundo, ámbolos dous compostos presentan un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 311 m/z e dous ións de fragmentación a 179 e 149 m/z con abundancias relativas do 58 e 100 % nos dous casos (figuras 175 e 176).

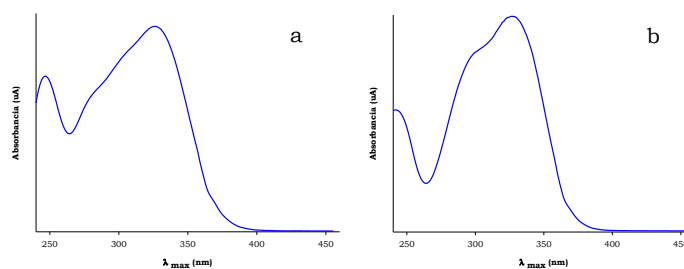


Figura 175. Espectros de DAD dos composto 1 (a) e 2 (b) da banda VIII.

De acordo con Maier e col. (2006) e Buiarelli e col. (2010) estamos diante das formas *cis* e *trans* do éster tartárico do ácido cafeico (ácido caftárico). Xunto ao ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 311 m/z aparece outro a 623 m/z (cunha abundancia relativa do 25 %) que entendemos se corresponde co ión $[2M-H]^-$.

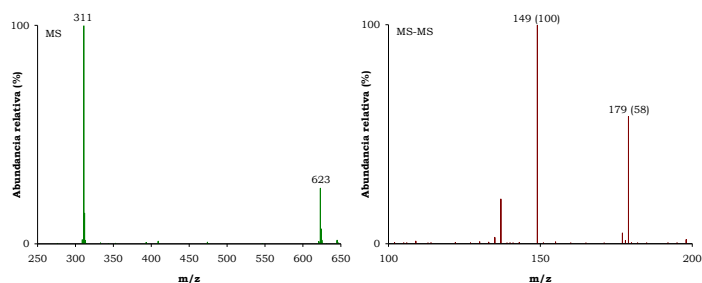


Figura 176. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 2 da banda VIII.

Compostos 3 e 4 (t_R 9,9 e 10,5 min)

No caso deste par de compostos, tanto os seus espectros en DAD, cun máximo de absorción arredor de 315 nm e un ombro en 300 nm, como os seus espectros de masas, que presentan un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 295 m/z e un ión de fragmentación a 163 m/z (figura 177), permiten afirmar que estamos diante das dúas formas isoméricas do ácido coutárico, o éster tartárico do ácido *p*-coumárico (Maier e col., 2006; Buiarelli e col., 2010).

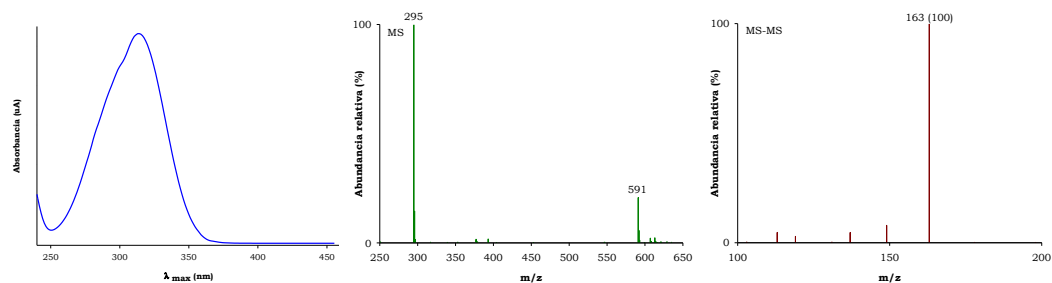


Figura 177. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 4 da banda VIII.

Como queira que neste caso dispoñemos do patrón comercial do ácido *trans*-coutárico, foi posíbel comparar os datos adquiridos para este patrón (tanto os cromatográficos como os de UV-vis e ESI-MS) cos de todos e cada un dos compostos descoñecidos. Como no caso anterior, tamén neste caso se observa, xunto a o ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 295 m/z, o ión $[2M-H]^-$ a 591 m/z.

Compostos 5 e 6 (t_R 12,2 e 13,3 min)

Os espectros en DAD destes compostos, cun máximo de absorción en 328,3 e 330,7 nm respectivamente e un ombro en 298 nm (figura 178), xunto cos seus espectros de masas, que presentan un ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 325 m/z e un ión de fragmentación a 193 m/z (figura 179), non deixan dúbida sobre a natureza destes compostos; en efecto, podemos asegurar que estamos diante das formas *cis* e *trans* do ácido fertárico, o éster tartárico do ácido ferúlico (Maier e col., 2006; Buiarelli e col., 2010).

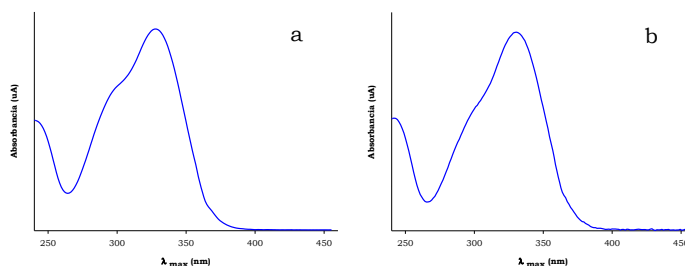


Figura 178. Espectros de DAD dos compostos 5 (a) e 6 (b) da banda VIII.

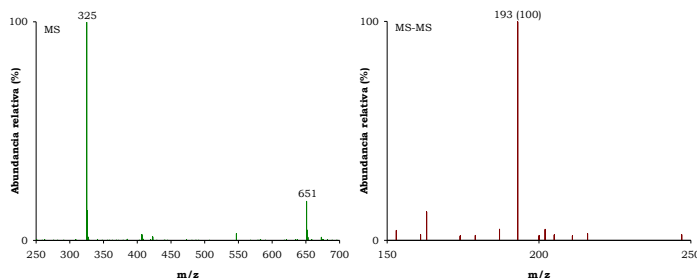


Figura 179. Espectros de ESI-MS e MS² do composto 5 da banda VIII.

Como ten ocorrido xa en moitas ocasións anteriores, tamén neste caso aparece, xunto a o ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 325 m/z do composto illado, outro fragmento de 651 m/z que se corresponde co seu ión $[2M-H]^-$.

Composto 7 (tr 21,9 min)

Non foi posíbel identificar este composto que presenta un espectro en DAD con dous máximos de absorción a 279,6 e 288 nm e un ombro en 274 nm, un espectro de masas cun ión pseudomolecular $[M-H]^-$ a 366 m/z e dous ións de fragmentación MS-MS a 204 e 186 m/z con abundancias relativas do 100 e 73 % respectivamente (figura 180).

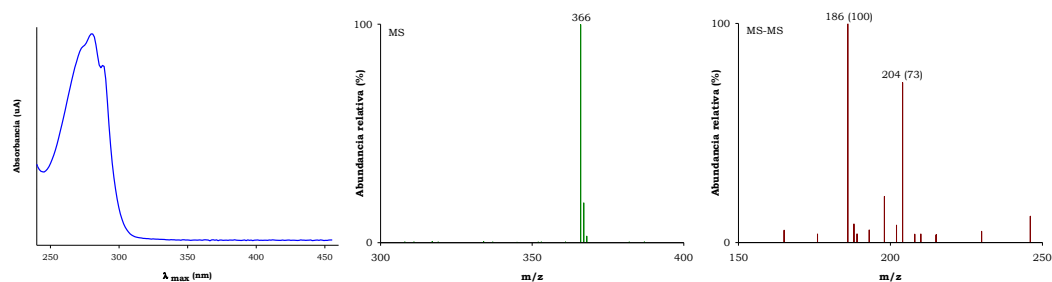


Figura 180. Espectros de DAD, ESI-MS e MS² do composto 10 da banda VIII.

Composto 8 (tr 54,9 min)

O último composto correspondente a esta banda ten un espectro en DAD cun máximo de absorción en 264,2 nm e un espectro de masas que presenta dous ións pseudomoleculares $[M-H]^-$ a 147 e 133 m/z (figura 181).

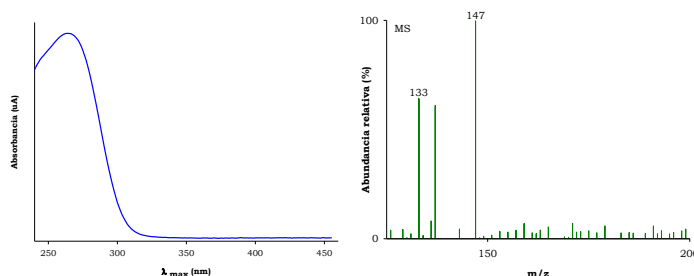


Figura 181. Espectros de DAD e ESI-MS do composto 11 da banda VIII.

Aínda que non fomos quen de obter ningún ión de fragmentación MS/MS para este composto, a comparación destes resultados cos acadados por nós para os patróns comerciais de diversos compostos fenólicos, permítenos concluír que se puidera tratar do ácido cinámico.

Tal e como viñemos facendo para o resto das bandas, na táboa 48 presentamos os resultados acadados para cada un dos oito compostos illados nesta banda, tanto os cromatográficos como os espectrofotométricos.

Táboa 48. Características cromatográficas e espectrais en DAD e MS dos compostos fenólicos illados na banda VIII.

Nº	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	Composto
1	5,8	282 ; 325,9	<u>311</u> , 623	179/149	c-caftárico
2	6,3	299,5 ; 327,1	<u>311</u> , 623	179/149	t-caftárico
3	9,9	300,5 ; 314	<u>295</u> , 591	163	c-coutárico
4	10,5	299 ; 316,4	<u>295</u> , 591	163	t-coutárico
5	12,2	298 ; 328,3	<u>325</u> , 651	193	c-fertárico
6	13,3	298 ; 330,7	325	193	t-fertárico
7	21,9	274 ; 279,6; 288	366	204/186	Desc
8	54,9	264,2	147/133	-	Cinámico

En negriña amósanse os ombros; subliñado amósase o ión pseudomolecular que se fragmenta

Como compendio deste apartado, na táboa 49 relacionamos a totalidade dos compostos illados e identificados total ou parcialmente no conxunto das oito bandas recollidas en PC.

Nesta táboa facilítase, ademais dos tempos de retención en HPLC e as características espectrais tanto en UV-vis (DAD) como en LC/ESI-MS-MS correspondentes a cada un dos 96 compostos illados na análise das oito bandas cromatográficas obtidas mediante cromatografía preparativa en papel, a correspondencia –no caso de existir– de cada un destes compostos con aqueles previamente illados e identificados mediante HPLC-DAD, que aparecen sinalados nesta táboa 49 polo número de orde que lles correspondía na táboa 9 (páxina 84).

Táboa 49. Compostos fenólicos illados nas oito bandas obtidas mediante PC preparativa.

Nº	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	Composto	Táboa 9*
1	3,7	271,3	169	125	Gálico	1
2	4,0	279,6	577	451/425/407/289	Procianidina	
3	4,5	270,2; 279	-	-	Bz	
4	5,1	257,2;289,1	153	153/109	Protocatéquico	2
5	5,1	256;296,2	169	151	triOH-benzoico	3
6	5,5	293,5	325	163	4-gluc <i>p</i> -coumárico	4
7	5,8	282 ;325,9	<u>311</u> , 623	179/149	<i>c</i> -caftárico	5
8	6,0	279,6	349	289	Desc	7
9	6,2	259,5;293,8	153	153/109	Bz	
10	6,3	299,5 ;327,1	<u>311</u> , 623	179/149	<i>t</i> -caftárico	8
11	7,0	279,6	579/349/289	-	Procianidina	9
12	7,1	271 ;278,4	-	-	Bz	
13	7,5	279,6	<u>579</u> /349/289	453/427/405/289	Procianidina	10
14	8,0	291,5; 345	465	303	dhQ-glic	
15	8,2	279,6	577	451/425/407/289	Procianidina	
16	9,0	279,6	349/ <u>289</u>	469/289	(+)-catequina	11
17	9,5	274,4;281,8	289		Desc	13
18	9,9	300,5 ;314	<u>295</u> , 591	163	<i>c</i> -coutárico	12
19	10,5	299 ;316,4	<u>295</u> , 591	163	<i>t</i> -coutárico	14
20	10,5	256	137	93	4-OH-benzoico	
21	10,8	278,4	577	451/425/407/289	Procianidina	
22	11,2	283,2; 334	-	-	Flavanoide	
23	12,1	279,6	435	289/271	Desc	
24	12,2	298 ;328,3	<u>325</u> , 651	193	<i>c</i> -fertárico	16
25	12,7	-	179	135	<i>c</i> -cafeico	
26	12,8	287,9; 329	-	-	Flavanoide	
27	13,3	298 ;330,7	325	193	<i>t</i> -fertárico	17
28	13,3	295 ;323,6	359/ <u>179</u>	135	<i>t</i> -cafeico	18
29	13,7	254,8; 265,8 ; 295 ; 349,8	808/ <u>625</u>	463/301	Q-diglic	
30	14,9	279,6	579/349/289	-	Procianidina	21
31	16,6	306,9	389	269	Desc	
32	17,9	286,7; 342	449	287	dhK-glic	20
33	18,2	303,6 ;323,6	<u>405</u> /441/465	243	<i>t</i> -astringina	22
34	18,5	260,7;297,4; 330,7;397,5	-	-	Estilbenoide	
35	18,8	279,6	289	245/205	(-)-epicatequina	19
36	19,7	285	<u>405</u> /441	243	<i>c</i> -astringina	
37	20,0	305,7;317	389/425/449	-	<i>t</i> -estilbeno	
38	21,2	298,6	465	285	dhQ-glic	24
39	21,9	274 ;279,6;288	366	204/186	Desc	23
40	22,6	298 ;309,3	163	119	<i>t-p</i> -coumárico	26
41	23,0	291,5; 341	465	303/285	dhQ-glic	
42	23,4	261,0;293,8	167	152/108	Vanillico	
43	24,3	261,9; 300 ;354,6	661/ <u>625</u>	463/301	Q-diglic	
44	25,3	287,9; 336	435	303/285	dhQ-xil	27
45	26,5	292,7; 341	465	303/285	dhQ-glic	
46	26,9	295	163	119	<i>c-p</i> -coumárico	
47	27,7	286; 340	303	285	dhQ	
48	28,1	295 ;323	193	193/178/149/134	<i>c</i> -ferúlico	
49	28,8	295; 340	449	269	dhK-glic	
50	28,8	308;318,9	389/425/449	227	<i>t</i> -piceido	29
51	29,5	260,7;297,4; 330,7;397,5	-	-	Estilbenoide	
52	29,7	-	193	149/134	<i>t</i> -ferúlico	} 30
53	29,7	282; 334	441	289	(-)-epicatequíngalato	
54	30,3	253,6; 307,5 ;363,8	301	301/198/137	Eláxico	
55	30,3	282; 324	433	271	N-hexósido	
56	30,5	260,7; 297,4	305	169	Bz	
57	30,7	277	591	547/439/301/289	Elagitanino	
58	31,0	279,6	591	547/439/301/289	Elagitanino	

Táboa 49. Continuación.

Nº	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	Compostos	Táboa 9*
59	31,4	-	151	151/123/107	Vanillina	
60	31,5	305;317,6	405	243	t-estilbeno	
61	32,0	293; 344	449	303/285	dhQ-glic	
62	32,1	256; 267 ; 297 ; 353,4	<u>645</u> /609	343/301	Q-rut	
63	32,1	256; 266 ; 294 ;353,4	463	301	Q-galact	32
64	33,3	256; 266 ; 293,5 ; 353,4	477	301	Q-glucur	33
65	33,3	256; 266 ; 294 ; 353,4	463	301	Q-gluc	34
66	33,5	290,3; 340	449	303/285	Astilbina	35
67	33,6	303,2 ;324,8	-	-	AHC	36
68	34,3	279,6	591	547/439/301/289	Elagitanino	
69	35,0	256; 267 ; 293 ; 353,4	433	301	Q-xil	
70	36,5	297; 340	449	303/285	dhQ-glic	
71	36,6	265,4; 294,5 ;346,2	593	285	K-rut	38
72	36,6	265,4; 293 ; 347;434,5	447	447/284/255	K-galact	
73	37,0	260,7;297,4; 330,7;397,5	-	-	Estilbenoide	
74	37,8	292,7; 349	449	303/285	dhQ-glic	
75	38,4	254,8; 263,2 ; 292,5 ;353	447	301/285	Q-rhamn	
76	38,6	265,4; 299 ;347,4	461	285	K-glucur	40
77	38,8	295; 346	433	269	dhQ-glic	
78	38,8	265,4; 294 ;347,4	447	447/285	K-gluc	
79	39,3	253,4; 266 ; 298 ;353	477	315/314	Isorh-galact	
80	39,5	-	389/425	-	Desc	
81	39,7	282	575	449/423	Procianidina A2	
82	40,1	292,7; 342	433	287	Engeletina	41
83	40,2	256; 260 ; 291 ; 353,4	491	315/301	Isorh-glucur	} 42
84	40,3	254,8; 267 ; 293 ;354,6	477	357/315/314	Isorh-gluc	
85	40,9	289,1; 354	433	287/269	dhK-glic	44
86	41,6	265,4; 294,5 ;347,4	417	285	K-xil	43
87	42,2	285,5	<u>389</u> /425	227	c-piceido	45
88	43,4	258,3; 300	-	-	Bz	48
89	44,6	284,4; 328	495/ <u>435</u>	273	dhN-glic	47
90	44,8	305,7;317,6	227	185	t-resveratrol	51
91	45,6	261,9;284,5; 341,4;358	387/ <u>423</u> /447	387/225	Estilbenoide	49
92	45,7	264,2; 293 ; 320 ;342,6	491/467/ <u>431</u>	285	K-rham	
93	47,0	-	591	547/439/301/289	Elagitanino	50
94	54,9	264,2	147/133	-	Cinámico	46
95	58,8	266,6	-	-	Bz	52
96	59,6	285,5	227	185	c-resveratrol	

En negraña amósanse os ombros; subliñado amósase o ión pseudomolecular que se fragmenta; *correspondencia cos compostos da táboa 9.

Da observación desta táboa pódese deducir que a separación preparativa en PC e a análise posterior en LC/ESI-MS-MS das bandas cromatográficas obtidas permitiu illar e identificar un maior número de compostos que cando se analizaron os extractos brutos mediante HPLC-DAD. Así, fronte aos 52

compostos que tiñamos illado inicialmente, nesta nova análise foi posíbel illar un total de 96 compostos dos que 90 foron identificados total (51) ou parcialmente (39). Destes compostos identificados, 13 son derivados hidroxibenzoicos (entre outros os ácidos gálico, protocatéquico, 2,3,4-trihidroxibenzoico, 4-hidroxibenzoico, vanílico, eláxico e a vanillina), 15 son derivados hidroxicinánicos (entre eles o 4-O- β -D-glucósido do ácido *p*-coumárico, os isómeros *cis*- e *trans* dos ácidos caftárico, coutárico, fertárico, cafeico, *p*-coumárico, ferúlico e o ácido cinámico), 17 glicósidos de flavonóis (8 derivados da quercetina, 6 do kaempferol e 3 da isorhamnetina), 14 flavan-3-ois entre os que están a (+)-catequina, a (-)-epicatequina, o (-)-epicatequíngalato e a procianidina A, 19 flavanoides dos que 15 son dihidroflavonóis (a astilbina e a engeletina, entre outros) e 12 derivados estilbénicos, entre os que atopamos os isómeros *cis* e *trans* da astringina, do piceido e do resveratrol.

Para rematar coa parte de identificación dos compostos fenólicos dos mostos de Albariño (obxectivo principal deste traballo), imos analizar comparativamente os resultados obtidos coas distintas metodoloxías aplicadas: HPLC-DAD dos extractos brutos; HPLC-DAD e espectrometría UV-vis dos compostos illados nas distintas fraccións seleccionadas a partir do cromatograma de HPLC-DAD dos extractos brutos; PC preparativa e análise mediante LC/ESI-MS-MS das distintas bandas cromatográficas obtidas.

Con este obxectivo, na táboa 50 recollemos, de forma comparada, os distintos compostos illados con cada unha destas metodoloxías, sinalando para cada un deles aquelas coas que foron observados e –no seu caso- identificados. Cando non foi posíbel identificar totalmente algún dos compostos, sinalase, en función dos datos acadados da súa análise, a familia á que pertencen, reservando a denominación de “descoñecido” para aqueles casos nos que non foi posíbel sequera a súa adscripción a unha familia de compostos fenólicos concreta.

Táboa 50. Relación de compostos fenólicos illados en función da metodoloxía empregada.

Composto	HPLC-DAD	HPLC-DAD	PC
		+ UV-vis	+ LC/ESI-MS-MS
1 Gálico	x	x	x
2 Procianidina			x
3 Bz			x
4 Protocatéquico	x	x	x
5 triOH-benzoico	x	x	x
6 4-gluc <i>p</i> -coumárico	x	x	x
7 Bz		x	
8 <i>c</i> -caftárico	x	x	x
9 AHC	x	x	
10 Desc	x		x
11 Bz	x	x	x
12 <i>t</i> -caftárico	x	x	x
13 Procianidina	x	x	x
14 Bz			x
15 Procianidina	x	x	x
16 dhQ-glic			x
17 Procianidina	x	x	x
18 (+)-catequina	x	x	x
19 Desc	x	x	x
20 <i>c</i> -coutárico	x	x	x
21 <i>t</i> -coutárico	x	x	x
22 4-OH-benzoico			x
23 Bz		x	
24 AHC	x		
25 Procianidina	x	x	x
26 Flavanoide			x
27 Desc	x	x	x
28 <i>c</i> -fertárico	x	x	x
29 Flavan-3-ol		x	
30 <i>c</i> -cafeico			x
31 Flavanoide			x
32 <i>t</i> -fertárico	x	x	x
33 <i>t</i> -cafeico	x	x	x
34 Desc		x	
35 Q-diglic			x
36 Procianidina	x	x	x
37 Desc			x
38 Flavanoide		x	
39 Flavan-3-ol		x	
40 Desc		x	
41 dhK-glic	x	x	x
42 <i>t</i> -astringina			x
43 Estilbenoide			x
44 (-)-epicatequina	x	x	x
45 <i>c</i> -astringina			x
46 <i>t</i> -estilbeno			x
47 dhQ-glic	x	x	x
48 Desc	x	x	x
49 AHC	x		
50 <i>t-p</i> -coumárico	x	x	x
51 dhQ-glic			x
52 Vanillico			x
53 Q-diglic			x
54 dhQ-xil	x	x	x

Táboa 50. Continuación.

Composto	HPLC-DAD	HPLC-DAD	PC
		+ UV-vis	+ LC/ESI-MS-MS
55 Bz		x	
56 Bz/AHC		x	
57 dhQ-glic	x	x	x
58 Desc	x	x	
59 Flavanoide		x	
60 <i>c-p</i> -coumárico	x	x	x
61 Desc		x	
62 dhQ			x
63 <i>c</i> -ferúlico	x	x	x
64 dhK-glic			x
65 <i>t</i> -piceido	x	x	x
66 Estilbenoide			x
67 <i>t</i> -ferúlico	x	x	x
68 (-)-epicatequingalato	x	x	x
69 Elágico			x
70 N-hexósido			x
71 Bz			x
72 Elagitanino			x
73 Elagitanino			x
74 Vanillina			x
75 <i>t</i> -etilbeno			x
76 dhQ-glic	x	x	x
77 AHC	x	x	
78 Q-rut			x
79 Q-galact	x	x	x
80 <i>c</i> -etilbeno		x	
81 Q-glucur	x	x	x
82 Q-gluc	x	x	x
83 Astilbina	x	x	x
84 AHC			x
85 Vanillico metil éster?	x	x	
86 Elagitanino			x
87 Q-xil			x
88 dhQ-glic			x
89 K-rut	x	x	x
90 K-galact			x
91 <i>o</i> -coumárico?	x	x	
92 Estilbenoide			x
93 dhQ-glic	x	x	x
94 Q-rhamn			x
95 K-glic		x	
96 K-glucur	x	x	x
97 dhQ-glic			x
98 K-gluc			x
99 Isorh-galact			x
100 Desc			x
101 Procianidina A2			x
102 Engeletina	x	x	x
103 Isorh-glucur			x
104 Isorh-gluc	x	x	x
105 dhK-glic	x	x	x
106 K-xil			x
107 <i>t</i> -etilbeno		x	
108 <i>c</i> -piceido	x	x	x
109 Bz	x	x	x
110 Bz		x	

Táboa 50. Continuación.

Composto	HPLC-DAD	HPLC-DAD		PC
			+	+
		UV-vis		LC/ESI-MS-MS
111 dhN-gluc	x	x		x
112 <i>t</i> -resveratrol	x	x		x
113 Estilbenoide	x	x		x
114 K-rham				x
115 Elagitanino				x
116 Cinámico				x
117 Bz	x	x		x
118 Bz		x		
119 <i>c</i> -resveratrol	x	x		x
120 Desc		x		
121 Desc		x		

Tal e como se pode ver nesta táboa, temos conseguido illar un total de 121 compostos, dos que 51 foron identificados totalmente; destes 51 compostos, 32 foron identificados ao empregar LC/MS mentres que os 19 restantes tiñan sido xa identificados mediante HPLC-DAD e espectrofotometría UV-vis, servindo as análises cromatográficas mediante líquido-masas para a confirmación da súa estrutura. A estes 51 compostos dos que vimos falando hai que engadirlle outros 58 que foron identificados parcialmente e para os que, en 31 ocasións (os compostos marcados en azul na táboa 50) coñecemos practicamente a súa estrutura; trátase das procianidinas e os elagitaninos (en ámbolos casos só descoñecemos a natureza das unidades monoméricas que os compoñen), de once dihidroflavonois, tres flavonois e unha flavanona (dos que coñecemos a natureza do aglicón pero non así a do azucre), catro estilbenoides dos que só para un deles (o composto 113 da táboa) coñecemos a masa pero que en todos os casos sabemos que se forman pola acción da luz UV sobre os isómeros *cis* dos estilbenos, e dous compostos (o 85 e o 91 da táboa) dos que non conseguimos os seus espectros de masas pero que, con moita probabilidade, en función das súas características cromatográficas e espectrofotométricas en UV-vis, deben ser o éster metílico do ácido vanílico e o ácido *o*-coumárico, respectivamente. Para os outros 27 compostos (en vermello na táboa 50), só fomos quen de identificar a familia fenólica á que pertencen; en calquera caso, dicir que para os catro estilbenos illados, sabemos se se trata de formas *cis* ou *trans* ou mesmo se están glicosilados ou non. A simple observación da táboa

permite concluir que só para 12 dos compostos illados non fomos quen de dicir nada acerca da súa natureza.

Debemos resaltar que –ata o que sabemos– cinco dos compostos identificados no noso traballo non tiñan sido citados previamente en *Vitis vinifera*, en concreto o dihidronaringenín-2'-*O*-glucósido (phloridzina), a primeira chalcona atopada nesta especie, os xilósidos da quercetina e do kaempferol e os compostos 35 e 53 (táboa 50), dous diglicósidos da quercetina diferentes da rutina, o único quercetín-diglicósido citado ata agora no xénero *Vitis*. Outros cinco foron identificados por primeira vez en mostos, o 4-*O*- β -D-glucósido do ácido p-coumárico, o dihidroquercetín-3-*O*-xilósido, a dihidroquercetina (só previamente identificados en viños por Baderschneider e Winterhalter no ano 2001), o (-)-epicatequínalato que só se tiña atopado en sementes (Adams, 2006), e un hexósido da naringenina que foi recentemente identificado en uvas da caste branca Sercial recollidas no inicio da maduración (Perestrelo e col., 2012). Ademais, temos illado e identificado parcialmente (descoñecemos a natureza dos azucres) once dihidroflavonois (oito nos que o aglicón é a quercetina e tres o kaempferol), sen dúbida moitos deles illados por primeira vez en *Vitis*; non se debe esquecer que xunto aos maioritarios astilbina e engeletina e ao dihidroquercetín-3-*O*-xilósido xa citado, só se teñen identificado con anterioridade tres novos glicósidos (o dihidrokaempferol-3-*O*-xilósido, o dihidroquercetín-3-*O*-glucósido e o dihidroquercetín-3'-*O*-glucósido) citados en viños por Baderschneider e Winterhalter (2001) e un posíbel dihidroquercetín-3-*O*-galactósido citado por Masa e Vilanova (2008) en uvas de Albarín branco.

4. ESTUDO DA COMPOSICIÓN FENÓLICA DOS MOSTOS NAS TRES SUBZONAS DA D.O. RÍAS BAIXAS.

Sen esquecer que o principal obxectivo do noso estudo é a identificación dos compostos de natureza fenólica presentes nos mostos da caste Albariño na

D.O. Rías Baixas, como colofón ao noso traballo –e sen pretender ser exhaustivos neste particular- imos abordar tamén a descrición cuantitativa da composición fenólica dos mostos de cada unha das subzonas estudadas na citada denominación de orixe (O Condado do Tea, O Rosal e o Val do Salnés). Limitaremos neste caso o noso estudo aos resultados acadados mediante HPLC-DAD e, xa que logo, á cuantificación daqueles compostos fenólicos illados mediante esta técnica cromatográfica. O feito de non dispoñer no noso laboratorio da equipa de LC/ESI-MS-MS coa que abordamos a identificación definitiva dos compostos fenólicos da caste Albariño (nin de ningún outro detector de m/z) impediu realizar con todas e cada unha das mostras unha análise máis pormenorizada e xustifica, ao noso entender, a utilización neste apartado dos datos resultantes da análise das mostras mediante HPLC-DAD.

Partindo pois das concentracións acadadas para cada un dos 52 compostos illados mediante HPLC-DAD nos distintos mostos considerados no noso estudo, imos describir os mostos das distintas zonas estudadas en función da súa composición fenólica. Como xa indicamos no apartado 2 de Resultados e Discusión no que achegabamos os resultados acadados para as análises dos mostos mediante HPLC-DAD, as diferenzas atopadas na composición fenólica das distintas mostras estudadas foron exclusivamente cuantitativas (táboa 10).

Debemos indicar, en primeiro lugar, que dous destes compostos (o composto 2, o ácido protocatéquico, de tempo de retención 6,5 min, e o composto 49, un estilbenoide de tempo de retención 56,6 min) estiveron por baixo do seu límite de cuantificación en todas as mostras, e así mesmo que o composto 30 ($t_R=38,7$ min) corresponde á mestura de dous compostos, o *trans*-ferúlico e o (-)-epicatequíngalato, o que dificultou poder determinar con exactitude a porcentaxe de área que corresponde a cada un destes compostos; neste sentido, temos tomado a decisión de considerar como valor da concentración para cada un deles, a metade da correspondente ao total do pico. Deste xeito, faremos a descrición cuantitativa da composición fenólica dos mostos en función dos 51 compostos cuantificados, dos que un total de 45 puideron ser identificados total (33) ou parcialmente (12); e imos agrupar estes compostos en

6 familias, ácidos benzoicos (6), ácidos hidroxicinámicos (16), estilbenos (5), flavan-3-óis (7), flavonóis (7) e flavanoides (7), considerando logo un sétimo grupo –ao que denominamos “outros”- que inclúe aqueles compostos que non foi posíbel identificar (táboa 51 e figura 182).

Táboa 51. Concentración (mg/L) total e por familias dos compostos fenólicos observados nos mostos da caste Albariño.

	Concentración (mg/L)		
	Condado do Tea	O Rosal	Val do Salnés
Ácidos benzoicos	5,93	6,35	3,28
Ácidos hidroxicinámicos	152,00	161,41	177,39
Estilbenos	2,70	3,41	2,31
Flavan-3-óis	17,40	30,64	6,49
Flavonóis	5,53	23,96	11,30
Flavanoides	12,50	14,81	6,74
Outros	3,11	7,88	4,11
TOTAIS	199,17	248,47	211,63

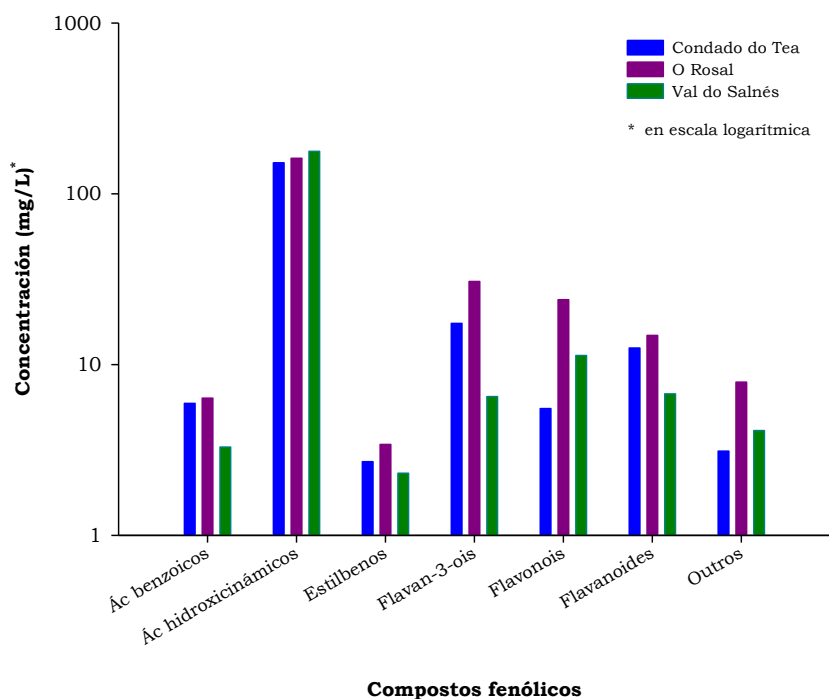


Figura 182. Concentración total (mg/L) dos compostos fenólicos observados nos mostos da caste Albariño.

Da observación da táboa 51 e a figura 182, que amosan o contido total en compostos fenólicos nos mostos da caste Albariño procedentes das tres áreas xeográficas motivo de estudo, pódese deducir que a concentración total nos mostos do Rosal (248,47 mg/L) foi máis elevada que a dos mostos do Val do Salnés (211,63 mg/L) e do Condado do Tea (199,17 mg/L), e que en todos os casos os ácidos hidroxicinámicos foron o grupo maioritario, o que coincide cos resultados obtidos por Simpson (1982), Singleton e col. (1985) e Cheynier e col. (1990), que indican que os ésteres tartáricos dos ácidos hidroxicinámicos representan o grupo maioritario de todos os polifenóis nos mostos de uvas brancas.

O Val do Salnés, con 177,39 mg/L é a subzona que presentou a concentración máis elevada destes compostos, seguida pola do Rosal e a do Condado do Tea, con 161,41 e 152,0 mg/L, respectivamente; estes valores están en consonancia cos obtidos por Ong e Nagel (1978), Singleton e col. (1986), Vrhovšek (1998) e Mozetič e col. (2006) que indican que nos mostos de uvas brancas o rango de concentración para os derivados hidroxicinámicos vai dos 99,0 aos 281 mg/L.

Para o resto das familias de compostos, os mostos procedentes do Rosal presentaron sempre a concentración máis elevada das tres subzonas: flavan-3-ois (30,64 mg/L), flavonóis (23,96 mg/L), flavanoides (14,81 mg/L), ácidos benzoicos (6,35 mg/L), estilbenos (4,39 mg/L), e outros (7,88 mg/L).

Se consideramos agora a porcentaxe de cada unha das familias de compostos fenólicos estudadas nas tres áreas xeográficas (figura 183), poderemos ver que os derivados hidroxicinámicos supoñen o 84 % do contido fenólico total no Val do Salnés, o 76 % no Condado do Tea e o 65 % no Rosal, sendo os estilbenos a familia minoritaria cun 1 % en cada unha das tres subzonas. Pode sorprenden a baixa porcentaxe que os flavan-3-ois presentaron no Val do Salnés (3 %), xa que tanto no Rosal (12 %) como no Condado do Tea (9 %) son a familia que ocupa o segundo lugar en abundancia.

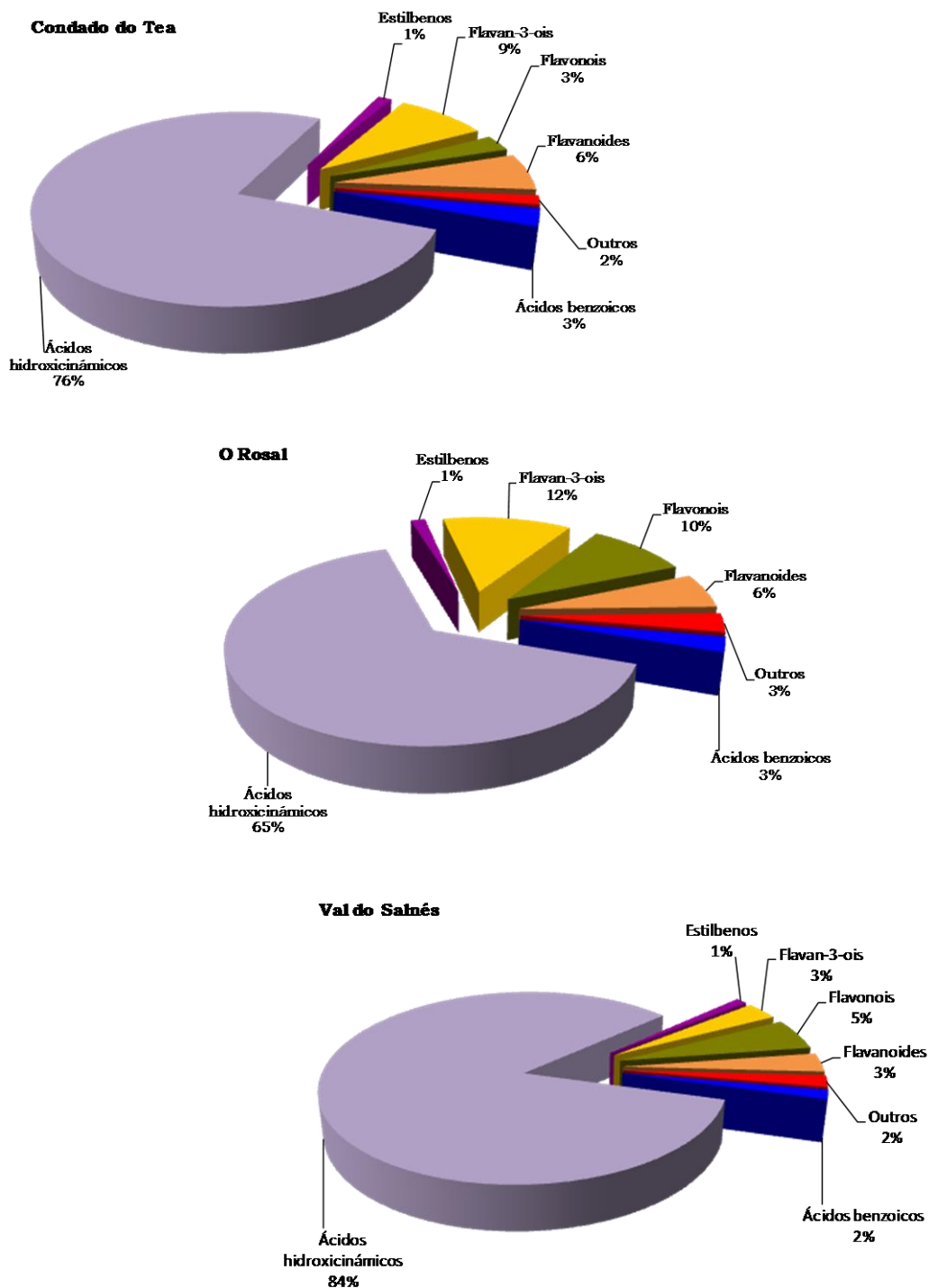


Figura 183. Porcentaxe das famílias de compostos fenólicos dos mostos estudados.

Sorprende tamén a elevada porcentaxe atopada para os flavonoides nos mostos do Rosal, un 10 % do total dos compostos fenólicos, fronte ao 5 e 3 % que representan no Val do Salnés e no Condado do Tea, respectivamente. Pola súa banda, os flavanoides representan o 6 % no Condado do Tea e no Rosal fronte ao 3 % no Val do Salnés. As porcentaxes atopadas tanto para os ácidos benzoicos como para o grupo de outros son moi semellantes nas tres subzonas, con valores entre o 2 e o 3 %.

Imos afondar de seguido na análise destas familias, abordando para elo o estudo individualizado daqueles compostos presentes en cada unha delas. Así, e tal e como se pode observar na táboa 52, dentro dos derivados benzoicos, o ácido gálico ($t_R=6,0$ min) foi o que presentou maior concentración nos mostos procedentes do Rosal e do Condado do Tea –con valores próximos aos 4,5 mg/L en ámbolos dous casos- mentres que nos do Val do Salnés, a súa concentración é de tan só 0,99 mg/L.

Táboa 52. Concentración (mg/L) dos ácidos benzoicos observados nos mostos da caste Albariño.

Compostos (t_R min)	Concentración (mg/L)		
	Condado do Tea	O Rosal	Val do Salnés
Gálico (6,0)	4,269	4,388	0,990
Protocatéquico (6,5)	tr	tr	tr
triOH-benzoico (7,7)	0,009	0,119	0,025
p37 (43,4)	1,112	1,246	1,614
p46 (54,1)	0,208	0,158	0,080
p48 (55,5)	0,331	0,439	0,576

tr= por debaixo do límite de cuantificación

Nos mostos do Val do Salnés, o ácido benzoico que presentou a concentración máis elevada foi o composto correspondente ao pico 37 ($t_R=43,3$ min). Cabe sinalar que o ácido protocatéquico encontrouse sempre por baixo do seu límite de cuantificación.

Dentro do grupo dos derivados hidroxicinámicos, e polo que fai ás nosas mostras (táboa 53), dicir que o ácido *trans*-caftárico ($t_R=10,9$ min) é o que

presentou maior concentración en todas as subzonas (94,24 mg/L nos mostos procedentes do Val do Salnés, 66,91 mg/L nos mostos do Condado do Tea e 64,76 mg/L nos do Rosal), seguido do pico de tempo de retención 16,9 min, o ácido *trans*-couteárico (37,64 mg/L nos do Rosal, 36,78 mg/L nos do Val do Salnés e 32,94 mg/L nos do Condado do Tea), e do ácido *cis*-couteárico (23,17 mg/L nos do Rosal, 22,27 mg/L nos do Val do Salnés e 21,04 mg/L nos do Condado do Tea), que se corresponde co pico de tempo de retención 16,0 min.

Táboa 53. Concentración (mg/L) dos derivados hidroxicinámicos observados nos mostos da caste Albariño.

Compostos (t_R min)	Concentración (mg/L)		
	Condado do Tea	O Rosal	Val do Salnés
4-gluc <i>p</i> -coumárico (8,1)	tr	0,041	0,011
<i>c</i> -caftárico (9,0)	1,730	1,019	1,055
p6 (9,7)	4,148	4,927	5,889
<i>t</i> -caftárico (10,9)	66,911	64,763	94,243
<i>c</i> -couteárico (16,0)	21,036	23,173	22,271
<i>t</i> -couteárico (16,9)	32,936	37,639	36,780
p15 (17,6)	0,335	1,510	1,533
<i>c</i> -fertárico (19,6)	2,233	1,720	1,665
<i>t</i> -fertárico (20,0)	7,386	6,517	8,210
<i>t</i> -cafeico (22,0)	5,956	8,017	0,432
p25 (33,9)	3,078	2,404	3,131
<i>t-p</i> -coumárico (34,5)	2,576	6,552	0,067
<i>t</i> -ferúlico (38,7)	0,152	0,302	tr
p31 (39,2)	0,287	0,291	0,141
p36 (42,2)	1,492	1,043	1,149
Cinámico (64,2)	1,742	1,495	0,811

tr= por debaixo do límite de cuantificación

O ácido *trans*-fertárico, cun tempo de retención de 20,0 min, ocupa o seguinte lugar no que ao contido se refire, por máis que cuns valores claramente máis baixos (8,2 nos mostos do Val do Salnés, 7,4 mg/L nos do Condado do Tea e 6,5 mg/L nos do Rosal). Debemos indicar que, en todos os casos, estes valores son semellantes aos atopados por Ong e Nagel (1978), Singleton e col. (1986) e Mozetič e col. (2006) para estes compostos en mostos de castes brancas (16-295 mg/L para o *trans*-caftárico; 18-44 mg/L para o *trans*- e *cis*-couteárico e 1,2-15,9 mg/L para o *trans*-fertárico).

Se observamos a porcentaxe de *trans*-caftárico nos nosos mostos (un 53 % nos procedentes do Val do Salnés, un 44 % nos do Condado do Tea e un 40 % nos do Rosal), veremos que en ningún caso alcanzan valores próximos aos considerados por Romeyer e col. (1983) para os mostos con alta capacidade de escurecemento; en efecto estes autores sitúan –como xa indicamos na introdución– nun 80 % o valor da relación entre o ácido *trans*-caftárico e o contido total en derivados hidroxicinámicos para considerar que un mosto teña esta consideración. Así pois, tal e como afirman Darias-Martín e col. (2008) para os viños brancos canarios, cabe agardar que os nosos mostos dean lugar a viños cunha cor verdosa. A concentración do 4-*O*- β -D-glucósido do ácido *p*-coumárico ($t_R=8,1$ min) foi de 0,04 mg/L nos mostos procedentes do Rosal e de 0,01 mg/L nos mostos do Val do Salnés, estando por debaixo do límite de cuantificación naqueles obtidos no Condado do Tea; cicais este baixo contido explique que nunca antes se teña identificado este composto en mostos.

As diferenzas existentes entre os valores acadados para o grupo dos ácidos fenólicos nos nosos mostos e aqueles atopados na bibliografía, pódense explicar polo feito de que o contido destes compostos vai depender da caste, das condicións climatolóxicas, da zona xeográfica, das técnicas de elaboración dos mostos, dos tratamentos analíticos das mostras, e de moitos outros factores (Vrhovsek, 1998; Bêtes-Saura e col., 1996; Soleas e col., 1997; Ramos e col., 1999; Andrade e col., 2001; Boselli e col., 2006; Bravo e col., 2006; Mozetič e col., 2006; Rodríguez-Montealegre e col., 2006; Dopico-García e col., 2007; Komes e col., 2007; Darias-Martín e col., 2008).

Polo que fai aos estilbenos, que xunto cos derivados benzoicos e hidroxicinámicos constitúen a fracción non flavonoidea dos compostos fenólicos, dicir que están presentes na natureza nun gran número de familias de vexetais, pero adquiren unha especial relevancia en uvas e os seus produtos derivados pola súa incidencia na dieta (Mattivi e col., 1995). Tal e como se pode ver na táboa 54, o derivado estilbénico que presentou a concentración máis elevada nas nosas mostras foi o piceido nas dúas formas isoméricas *cis* e *trans*

(con tempos de retención a 51,6 e 31,8 min, respectivamente), con valores próximos a 1,5 mg/L nos mostos do Rosal. Os mostos do Condado do Tea presentaron valores de 1,29 mg/L para o *cis*-piceido e 1,06 mg/L para o *trans*-piceido, e os mostos do Val do Salnés, 1,19 mg/L e 0,75 mg/L para os isómeros *cis*- e *trans*- deste derivado estilbénico. As concentracións atopadas para estes compostos nos nosos mostos son superiores ás observadas nos viños elaborados con Listán branco, Verdello e Gual (Darias-Martin e col., 2008), e con Albariño e outras castes (Romero-Pérez e col., 1996a,b). Para a *trans*-astringina ($t_R=29,7$ min) as concentracións acadadas (0,32 mg/L para os mostos do Rosal, 0,07 mg/L para os do Condado do Tea, e 0.2 para os do Val do Salnés) foron semellantes as atopadas na bibliografía para viños brancos e tintos (Carando e col., 1999).

Táboa 54. Concentración (mg/L) dos estilbenos observados nos mostos da caste Albariño.

Compostos (t_R min)	Concentración (mg/L)		
	Condado do Tea	O Rosal	Val do Salnés
<i>t</i> -astringina (29,7)	0,074	0,317	0,199
<i>t</i> -piceido (38,1)	1,064	1,426	0,755
<i>c</i> -piceido (51,6)	1,288	1,574	1,189
Estilbenoide (56,6)	tr	tr	tr
<i>t</i> -resveratrol (57,6)	0,272	0,238	0,168

tr= por debaixo do límite de cuantificación

En ningún dos mostos das tres áreas xeográficas motivo de estudo temos atopado *cis*-resveratrol, uns resultados que concordan cos obtidos por Moreno e col. (2008) na última semana do control de maduración en uvas das castes Mencía, Albarello e Merenzao. Darias-Martin e col (2008) teñen observado que as castes cun alto contido en compostos fenólicos totais non son as que teñen maior concentración de estilbenos e, así mesmo, que estes poden ser empregados –como ocorre con outros compostos fenólicos– como marcadores taxonómicos na caracterización de castes.

Dentro do grupo de compostos flavonoideos, os flavan-3-óis foron os maioritarios nas subzonas do Rosal e do Condado do Tea (figura 183). Esta

familia de compostos son os principais responsábeis da astrinxencia e o amargor dos viños pero tamén da súa estrutura (Gawel, 1998), e están representados polos monómeros (+)-catequina, que ten unha configuración 2,3-*trans*-, e (-)-epicatequina, cunha estrutura 2,3-*cis*-, que se unen formando dímeros, trímeros, tetrámeros e oligómeros para constituír os taninos, que son o grupo máis abundante de polifenois solúbeis. Atópanse principalmente nas peles e nas sementes, e teñen actividade antioxidante, anticancerixena e anti-inflamatoria (Komes e col., 2007).

Táboa 55. Concentración (mg/L) dos flavan-3-óis observados nos mostos da caste Albariño.

Compostos (t_R min)	Concentración (mg/L)		
	Condado do Tea	O Rosal	Val do Salnés
Procianidina (12,0)	0,085	0,695	tr
Procianidina (12,7)	0,055	0,010	tr
(+)-catequina (15,3)	10,244	17,432	4,479
Procianidina (23,8)	5,627	10,521	1,296
(-)-epicatequina (28,2)	1,205	1,579	0,660
(-)-epicatequín-galato (38,7)	0,152	0,302	tr
Elagitanino (57,1)	0,034	0,106	0,053

tr= por debaixo do límite de cuantificación

Tal e como podemos observar na táboa 55, dentro da familia dos flavan-3-óis o composto maioritario foi a (+)-catequina ($t_R=15,3$ min), con concentracións de 17,43 mg/L nos mostos procedentes do Rosal, de 10,24 mg/L nos mostos do Condado do Tea e de tan só 4,48 mg/L nos do Val do Salnés; o outro monómero desta familia, a (-)-epicatequina ($t_R=28,2$ min), tamén presentou a súa maior concentración nos mostos procedentes do Rosal, con valores de 1,56 mg/L, cercanos aos do Condado do Tea (1,2 mg/L), pero superiores aos 0,66 mg/L atopados nos mostos do Val do Salnés. Estes niveis de (-)-epicatequina foron moi semellantes aos atopados en viños galegos e portugueses elaborados coa caste Albariño (Andrade e col., 2001) pero máis baixos que os atopados para viños elaborados con outras castes brancas e tintas (Bétes-Saura e col., 1996; Soleas e col., 1997; Rodríguez-Montealegre e col., 2006; Darias-Martín e col., 2008).

Polo que fai á familia dos flavonóis (táboa 56), o quercetín-3-*O*-glucósido ($t_R=40,7$ min) e o quercetín-3-*O*-glucurónido ($t_R=40,1$ min) foron os compostos maioritarios, acadándose os valores máis elevados nos mostos do Rosal, con concentracións de 10,64 mg/L e 7,77 mg/L, respectivamente. Para os mostos do Val do Salnés as concentracións foron 4,67 mg/L para o primeiro e 4,13 mg/L para o segundo, e nos do Condado do Tea foron de 1,49 mg/L e 2,94 mg/L, respectivamente.

Táboa 56. Concentración (mg/L) dos flavonóis e porcentaxe dos seus aglicóns observados nos mostos da caste Albariño.

Compostos (t_R min)	Concentración (mg/L)		
	Condado do Tea	O Rosal	Val do Salnés
Q-galact (39,7)	0,553	1,732	1,090
Q-glucur (40,1)	2,945	7,773	4,130
Q-gluc (40,7)	1,488	10,642	4,675
K-rut (44,5)	0,020	0,483	0,305
K-glucur (46,8)	0,408	2,627	0,822
Isorh-glucur (48,0)	0,011	0,240	0,103
K-xil (48,7)	0,103	0,467	0,179
% Q	90,2	84,1	87,5
% K	9,6	14,9	11,5
% ISORH	0,2	1,0	0,9

Como se observou para as uvas da caste Albariño (Masa e col., 2007), nos nosos mostos só se atoparon derivados glicosilados de flavonóis e nunca aglicóns libres, que si aparecen en viños (Dopico-García e col., 2007). Ao comparar os nosos resultados cos atopados na bibliografía para outras castes, observamos que estes son moi variábeis en canto aos datos das concentracións absolutas para cada un dos flavonóis individuais (Bétes-Saura e col., 1996; Soleas e col., 1997; Boselli e col., 2006; Rodríguez-Montealegre e col., 2006; Masa e col., 2007; Darias-Martín e col., 2008), pero non así cando se consideran as porcentaxes destes compostos en función da natureza do seu aglicón; neste sentido, os nosos resultados (táboa 56) atópanse dentro dos rangos observados por Mattivi e col. (2006) en 27 castes brancas, nas que os derivados da quercetina oscilan entre o 72,46 e o 96,90 %, os do kaempferol entre o 2,33 e o 26,36 % e os da isorhamnetina entre o 0 e o 5,38 %.

Xa por último, e dentro da familia dos flavanoides, debemos resaltar os chamados dihidroflavonois, un grupo de compostos fenólicos que adquiren un especial interese polo seu papel como compostos bioactivos e como marcadores quimiotaxonómicos; esta relevancia é maior, se cabe, no caso da caste Albariño, para a que se ten atopado (Masa e col., 2007) un número moi superior destes compostos dos previamente citados na bibliografía para outras castes. Dentro deste grupo (táboa 57), o dihidroquercetín-3-*O*-rhamnósido ($t_R=41,7$ min), coñecido como astilbina, é o composto máis abundante, con concentracións de 10,07 mg/mL nos mostos do Rosal, 8,14 mg/L nos do Condado do Tea e 5,18 mg/L nos do Val do Salnés. Estas concentracións son maiores que as atopadas para outras castes (Trouslade e Singleton, 1983).

Táboa 57. Concentración (mg/L) dos flavanoides observados nos mostos da caste Albariño.

Compostos (t_R min)	Concentración (mg/L)		
	Condado do Tea	O Rosal	Val do Salnés
dhK-glic (27,6)	0,752	1,146	0,461
dhQ-glic (33,3)	1,241	1,384	0,045
dhQ-xil (35,4)	0,213	0,083	0,090
Astilbina (41,7)	8,139	10,073	5,184
Engeletina (47,1)	0,526	0,174	0,253
dhK-glic (49,1)	0,931	1,172	0,383
dhN-gluc (54,7)	0,702	0,776	0,328

Destacar a presenza do dihidroquercetín-3-*O*-xilósido ($t_R=35,4$ min) que –ata o que sabemos– é a primeira vez que se atopa en mostos, por máis que con valores relativamente baixos (0,21 mg/L nos mostos procedentes do Condado do Tea, 0,09 mg/L nos do Val do Salnés e 0,08 mg/L nos do Rosal). Destacar tamén que o dihidronaringenín-2'-*O*-glucósido ($t_R=35,4$ min), como xa dixemos, unha chalcona característica das mazás (Sánchez-Rabaneda e col., 2004), presentou valores de concentración semellantes nos mostos do Rosal e do Condado do Tea (0,78 e 0,70 mg/L, respectivamente) que se reducen a case a metade nos mostos do Val do Salnés (0,33 mg/L).

CONCLUSIONES

Dos resultados acadados no estudo da composición fenólica dos mostos da caste Albariño podemos tirar as seguintes conclusións:

1.- Este estudo supón a contribución máis completa feita ata hoxe sobre a composición fenólica dos mostos elaborados coa caste galega Albariño, non só polo importante número de compostos separados e identificados, senón tamén polo feito de que –a diferenza doutros estudos anteriores- non se ten limitado a un determinado grupo de derivados fenólicos. Aborda, en efecto, a análise de todas as familias de compostos de natureza fenólica presentes nas mostras (derivados benzoicos e hidroxicinámicos, estilbenos, flavonóis, flavan-3-óis e flavanoides).

2.- O proceso de separación de compostos fenólicos en mostras moi complexas, nas que existe un elevado número de compostos e con estruturas químicas moi diferentes, esixe a utilización combinada de diversas técnicas cromatográficas, tanto analíticas coma preparativas, o que sen dúbida complica en exceso este proceso. En efecto, coa HPLC analítica resulta en moitos casos imposíbel conseguir suficiente resolución e, xa que logo, poder recoller e identificar aqueles compostos que coelúen nesas condicións cromatográficas.

3.- A colección de compostos trala inxección repetidamente da mostra bruta en HPLC analítica presenta algúns problemas, tanto pola dificultade que supón recoller compostos que están presentes en moi baixa concentración como polo feito de que, en moitos casos, estes forman aductos co ácido acético da fase móbil; a formación de aductos conleva o bloqueo de OH libres na molécula e, xa que logo, modifica o seu comportamento espectrofotométrico fronte aos distintos axentes modificadores do espectro UV-visíbel dificultando a súa identificación.

4.- A PC preparativa, unha técnica considerada obsoleta por moitos, facilitou sobremaneira a separación das nosas mostras e demostrou a súa utilidade como paso previo á separación en HPLC cando se está en presenza de mostras

complexas e se pretende a identificación de todos e cada un dos compostos fenólicos presentes nas mesmas.

5.- Mediante a utilización combinada de todas estas técnicas cromatográficas, fomos quen de separar un total de 121 compostos de natureza fenólica, dos que 109 foron identificados total (51) ou parcialmente (58) mediante HPLC-DAD, UV-vis e LC/ESI-MS-MS e coa axuda –no seu caso- de hidrólises ácidas, alcalinas e/ou enzimáticas.

6.- Dos 51 compostos fenólicos identificados plenamente, 10 foron atopados por primeira vez en mostos. Cinco deles, o dihidronaringenín-2'-*O*-glucósido (phloridzina), o quercetín-3-*O*-xilósido, o kaempferol-3-*O*-xilósido e os dous diglicósidos da quercetina diferentes da rutina, tampouco teñen sido citados previamente en *Vitis vinifera*. O 4-*O*- β -D-glucósido do ácido *p*-coumárico, o dihidroquercetín-3-*O*-xilósido e a dihidroquercetina foron previamente identificados en viños; o hexósido da naringenina foi identificado recentemente en uvas brancas e o (-)-epicatequínalato só se tiña atopado en sementes.

7.- Debemos destacar polo novedoso a presenza da phloridzina, pois é a primeira cita dunha dihidrochalcona no xénero *Vitis*. Trátase dun composto característico do xénero *Malus* que se veu relacionando coa resistencia das plantas a distintos estreses, o que abre unha via de traballo no eido da mellora xenética da vide.

8.- O noso estudo permitiu confirmar a natureza dos compostos que presentan espectros en DAD con catro máximos de absorción a 261,5, 284,9, 341 e 357,7 nm como produtos da transformación das formas isoméricas *cis* dos estilbenos pola acción da luz UV, e que foron erróneamente identificados nalgunha ocasión como *cis*-resveratrol.

9.- Polo seu papel potencial como compostos bioactivos, subliñaremos o elevado número de dihidroflavonois illados, un total de quince dos que só dous

(astilbina e engeletina) foron previamente identificados en *Vitis*. Xunto a estes dous e ao taxifolín e ao dihidroquercetín-3-O-xilósido, temos identificado parcialmente oito glicósidos da dihidroquercetina e tres do dihidrokaempferol.

10.- A presenza dun total de catorce compostos de natureza estilbénica confirma a importancia destes compostos no Albariño –e por extensión ás castes brancas- no que fai ao seu potencial beneficioso para a saúde humana, un papel tradicionalmente atribuído aos viños tintos.

11.- As diferenzas na composición fenólica entre os mostos analizados, foron só cuantitativas, debéndose subliñar que os procedentes do Rosal presentaron sempre os contidos máis elevados en compostos fenólicos totais e para as distintas familias consideradas, agás para os derivados hidroxicinámicos para os que este maior valor correspondeu aos mostos do Val do Salnés.

12.- Con independencia da subzona da que procedan, a familia dos derivados hidroxicinámicos foi sempre a maioritaria nos nosos mostos, mentres que a dos estilbenos foi a que menor concentración presentou en todos os casos.

13.- Chama poderosamente a atención a baixa concentración dos flavan-3-óis e os flavanoides nos mostos do Val do Salnés e o elevado contido en flavonoides dos mostos procedentes do Rosal.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.O.** (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 249-256.
- Adrián, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L.A. e Bessis, R.** (1997). Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology*, 23: 1689-1702.
- Ali, K., Maltese, F., Choi, Y.H. e Verpoorte, R.** (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews*, 9: 357-378.
- Álvarez, C.** (2004). Os viños galegos sobre manteis. En: *Guía de Viños, Augardentes e Bodegas de Galicia 2004-2005*. Asociación de Sumilleres Gallaecia. Ed. Xerais de Galiza, Vigo (España), 27-29.
- Amico, V., Napoli, E.M., Renda, A., Ruberto, G., Spatafora, C. e Tringali, C.** (2004). Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar 'Nerello Mascalese'. *Food Chemistry*, 88: 599-607.
- Andrade, P.B., Oliveira, B.M., Seabra, R.M., Ferreira, M.A., Ferreres, F. e García-Viguera, C.** (2001). Analysis of phenolic compounds in Spanish Albariño and Portuguese Alvarinho and Loureiro wines by capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis*, 22: 1568-1572.
- Baderschneider, B. e Winterhalter, P.** (2000). Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2681-2686.
- Baderschneider, B. e 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: 2788-2798.
- Baldi, A., Romani, A., Mulinacci, N. e Vincieri, F.F.** (1993). Composés phénoliques dans les cépages de Toscane de *Vitis vinifera* L. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 27: 201-215.
- Baldi, A., Romani, A., Mulinacci, N., Vincieri, F.F. e Casetta, B.** (1995). HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2104-2109.

- Ballester, A., Ferro, E. e González-Mantilla, X.L.** (1988). Selección clonal e saneamento na variedade Albariño. En: IV Xornadas Agrarias Galegas. Cuadernos da Área de Ciencias Agrarias. Ed. Edicións do Castro, A Coruña (España), 235-241.
- Baranowski, J.D. e Nagel, C.W.** (1981). Isolation and identification of the hydroxycinnamic acid derivatives in white Riesling wine. *American Journal of Viticulture and Enology*, 32: 5-13.
- Barrios, G., Castillo, R., Coscolla, R., Lucas, A., Pérez, J., e Toledo, J.** (1998). Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ed. Mundi-Prensa, Madrid (España).
- Benayas, F.** (1992). Situación actual de la selección clonal. *Vitivinicultura*, 2: 37-39.
- Berente, B., De la Calle García, D., Reichendächer, M. e Danzer, K.** (2000). Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods. *Journal of Chromatography A*, 871: 95-103.
- Bétes-Saura, C., Andrés-Lacueva, C. e Lamuela-Raventós, R.M.** (1996). Phenolics in white free run juices and wines from Penedés by high performance liquid chromatography: Changes during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3040-3046.
- Blouin, J. e Guimberteau, G.** (2004). Maduración y madurez de la uva. Ed. Mundi-Prensa, Madrid (España).
- B.O.E.** (2009a). Disposición 17064 do MARM do 27 de outubro de 2009. Resolución do 14 de setembro de 2009 da Dirección Xeral de Industria e Mercados Alimentarios pola que se publica a Orde do 21 de xullo do 2009 pola que se aproba o Regulamento da Denominación de Orixe Rías Baixas e do seu Consello Regulador. Nº 259: 89914-89936.
- B.O.E.** (2009b). Disposición 17065 do MARM do 27 de outubro de 2009. Resolución do 14 de setembro de 2009 da Dirección Xeral de Industria e Mercados Alimentarios pola que se publica a Orde do 30 de xullo do 2009 pola que se aproba o Regulamento da Denominación de Orixe Ribeiro e do seu Consello Regulador. Nº 259: 89937-89954.

- B.O.E.** (2009c). Disposición 17855 do MARM do 9 de novembro de 2009. Resolución do 8 de outubro de 2009 da Dirección Xeral de Industria e Mercados Alimentarios pola que se publica a Orde do 30 de xullo do 2009 pola que se modifica o Regulamento da Denominación de Orixe Monterrei e do seu Consello Regulador. Nº 270: 93842-93851.
- B.O.E.** (2010). Disposición 3013 do MARM do 24 de febreiro de 2009. Resolución do 2 de decembro de 2010 da Dirección Xeral de Industria e Mercados Alimentarios pola que se publica a Orde do 29 de setembro do 2009 pola que se modifica o Regulamento da Denominación de Orixe Ribeira Sacra e do seu Consello Regulador. Nº 48: 18102-18120.
- Bogs, J., Ebadi, A., McDavid, D. e Robinson, S.P.** (2006). Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiology*, 140: 279-291.
- Bohm, B.A.** (1998). Introduction to flavonoids. Chemistry and biochemistry of organic natural products, Vol. 2 (Ed. B. Ravindranath), Harwood Academic Publishers (Canadá).
- Boselli, E., Minardi, M., Giomo, A. e Frega, N.G.** (2006). Phenolic composition and quality of white d.o.c. wines from Marche (Italy). *Analytica Chimica Acta*, 563: 93-100.
- Boso, S., Santiago, J.L., e Martínez, M.C.** (2004). Intravarietal agronomic variability in *Vitis vinifera* L. cv. Albariño. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55: 279-282.
- Boso, S., Santiago, J.L., Vilanova, M. e Martínez, M.C.** (2005). Caractéristiques ampélographiques et agronomiques de différents clones du cultivar Albariño (*Vitis vinifera* L.). *Bulletin de l'OIV*, 78: 143-158.
- Boss, P.K., Davies, C. e Robinson, S.P.** (1996a). Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology*, 32: 565-569.
- Boss, P.K., Davies, C. e Robinson, S.P.** (1996b). Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology*, 111: 1059-1066.

- Boursiquot, J.M., Sapis, J.M. e Macheix, J.-J.** (1986). Les esters hydroxycinnamiques chez le genre *Vitis*. Essai d'application taxonomique: Premiers résultats. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Ser. III, 302: 177-180.
- Bourzeix, M., Weyland, D. e Heredia, N.** (1986). Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. Bulletin de l'OIV, 59: 1171-1253.
- Bravo, M.N., Silva, S., Coelho, A.V., Vilas Boas, L., e Bronze, M.R.** (2006). Analysis of phenolic compounds in Moscatel wines produced in Portugal. Analytica Chimica Acta, 563: 84-92.
- Buiarelli, F., Coccioli, F., Merolle, M., Jasionowska, R. e Terracciano, A.** (2010). Identification of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters in wine by HPLC-tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 123: 827-833.
- Cabaleiro, C.** (1995). El enrollado de la vid (GLRaV): Incidencia, epidemiología y daños en *Vitis vinifera* L. cv. Albariño en la Denominación de Origen Rías Baixas. Tese de Doutoramento. Universidade Politécnica de Madrid.
- Cabaleiro, C. e García-Berrios, J.J.** (1994). Influencia del portainjerto en la producción y calidad del mosto de la variedad Albariño. Actas do I Congreso Internacional de la Vitivinicultura Atlántica, Illa da Toxa, Pontevedra (España), Tomo II: 199-202.
- Carando, S., Teissedre, P.L., Waffo-Tégou, P., Cabanis, J.C., Deffieux, G. e Mérillon, J.-M.** (1999). High-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection for the determination of *trans*-astringin in wine. Journal of Chromatography A, 849: 617-620.
- Caló, A., Tomasi, D., Cravero, M.C. e Di Stefano, R.** (1994). Contributo alla caratterizzazione e classificazione varietale (*Vitis* sp.), attraverso la determinazione degli antociani e degli acidi idrossicinnamoiltartarici della buccia di varietà a bacca rossa. Rivista di Viticoltura e di Enologia, 47: 13-25.
- Carballeira-Lois, L., Cortés-Diéguez, S., Gil de la Peña, M.L. e Fernández-Gómez, E.** (2001). SPE-GC determination of aromatic compounds in two varieties of white grape during ripening. Chromatographia Supplement, 53: 350-355.

Castillo-Muñoz, N., Fernández-González, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. e Hermosín-Gutiérrez, I. (2009a). Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7883-7891.

Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M.V., Velders, A.H. e Hermosín-Gutiérrez, I. (2009b). Flavonol 3-*O*-glycosides series of *Vitis vinifera* cv Petit Verdot red wine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 209-219.

Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. e Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 992-1002.

Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. e Hermosín-Gutiérrez, I. (2010). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 699-705.

Cathey Tasai Su e Singleton, V.L. (1969). Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry*, 8: 1553-1558.

Chang, L.C., e Kinghorn, A.D. (2001). Flavonoids as cancer chemopreventive agents. En: *Bioactive compounds from natural sources. Isolation, characterisation and biological properties* (Ed. C. Tringali), Taylor & Francis (USA), 159-187.

Cheyrier, V., Moutounet, M. e Sarni-Manchado, P. (2000). Los compuestos fenólicos. En: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos* (Ed. C. Flanzy), Mundi-Prensa, Madrid (España), 114-136.

Cheyrier, V. e Rigaud, J. (1986). HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37: 248-252.

Cheyrier, V., Rigaud, J., Souquet, J.M., Duprat, F. e Moutounet, M. (1990). Must browning in relation to the behavior of phenolic compounds during oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41: 346-349.

Cheyrier, V., Souquet, J.M. e Moutounet, M. (1989). Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40: 320-324.

- Climent, D. e Pardo, T.** (1993). Studio della composizione fenolica delle uve delle varietà Bobal, Grenache e Tempranillo. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 46: 35-44.
- Consellería do Medio Rural e do Mar**, <http://www.medioruralemear.xunta.es> [consulta: 21 de maio 2012].
- Consello Regulador da D.O. Rías Baixas**, <http://www.doriasbaixas.com> [consulta: 21 de maio 2012].
- Creasy, G.L. e Creasy, L.L.** (2003). Grape-derived wine flavonoids and stilbenes. En: *Wine. A scientific exploration* (Eds. M. Sandler e R. Pinder), Taylor & Francis, London (UK), 199-227.
- Cruickshank, I.A.M.** (1963). Phytoalexins. *Annual Review of Phytopathology*, 1: 351-374.
- Cuendet, M., Potterat, O., Salvi, A., Testa, B. e Hostettmann, K.** (2000). A stilbene and dihydrochalcones with radical scavenging activities from *Loiseleuria procumbens*. *Phytochemistry*, 54: 871-874.
- Darias-Martín, J.J., Andrés-Lacueva, C., Díaz-Romero, C. e Lamuela-Reventós, R.M.** (2008). Phenolic profile in varietal white wines made in the Canary Islands. *European Food Research and Technology*, 226: 871-876.
- De la Presa-Owens, C., Lamuela-Reventós, R.M., Buxaderas, S. e de la Torre-Boronat, M.C.** (1995). Characterization of Macabeo, Xarel-lo, and Parellada white wines from Penedès Region. II. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46: 529-541.
- Del Caño Abad, J.** (1984). El Albariño, producción y elaboración. Xunta de Galicia. Consellería de Agricultura, Pesca e Alimentación. Santiago de Compostela
- Del Caño Abad, J.** (1991). El Albariño, la uva y el vino. Xunta de Galicia. Consellería de Agricultura, Gandería e Montes. Santiago de Compostela.
- Díaz-Losada, E., Tato-Salgado, A., Ramos-Cabrer, A.M., Díaz-Hernández, B. e Pereira-Lorenzo, S.** (2012). Genetic and geographical structure in grapevines from northwestern Spain. *Annals of Applied Biology*, 161: 24-35.
- Diéguez, S.C., Lois, L.C., Gómez, E.F. e de la Peña, M.L.G.** (2003). Aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Albariño. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 36: 585-590.

- D.O.G.** (2009). Consellería de Medio Rural. Orde do 24 de novembro de 2009 pola que se aproba o Regulamento da Denominación de Orixe Valdeorras e o seu Consello Regulador, nº 234 do 30 de novembro de 2009: 18380-18390.
- Dopico-García, M.S., Valentão, P., Jagodzińska, A., Klepczyńska, J., Guerra, L., Andrade, P.B. e Seabra, R.M.** (2007). Solid-phase extraction *versus* matrix solid-phase dispersion: Application to white grapes. *Talanta*, 74: 20-31.
- Downey, M.O., Dokoozlian, N.K. e Krstic, M.O.** (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 257-268.
- Downey, M.O., Harvey, J.S. e Robinson, S.P.** (2003a). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9: 15-27.
- Downey, M.O., Harvey, J.S. e Robinson, S.P.** (2003b). Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grapes berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9: 110-121.
- Ector, B.J., Magee, J.B., Hegwood, C.P. e Coign, M.J.** (1996). Resveratrol concentration in Muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds, and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47: 57-62.
- Enciclopedia Galega Universal** (2002a). O Baixo Miño. Ed. Ir Indo tomo 2: 506-509.
- Enciclopedia Galega Universal** (2002b). Comarca do Condado do Tea. Ed. Ir Indo tomo 6: 108-111.
- Enciclopedia Galega Universal** (2002c). Comarca do Salnés. Ed. Ir Indo tomo 15: 114-116.
- Fajardo, M.A.** (1984). Albariño: Cultivo, implantación, vinificación. Servizo Agrario da Excm. Deputación Provincial de Pontevedra.
- Falqué, E., Darriet, P., Fernández, E. e Dubourdieu, D.** (2008). Volatile profile and differentiation between Albariño wines from different origins. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 464-475.

- Fanzone, M., Peña-Neira, A., Jofré, V., Assof, M. e Zamora, F.** (2010). Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 2388-2397.
- Favaron, F., Lucchetta, M., Odorizzi, S., Pais da Cunha, A.T. e Sella, L.** (2009). The role of grape polyphenols on *trans*-resveratrol activity against *Botrytis cinerea* and of fungal laccase on the solubility of putative grape PR proteins. *Journal of Plant Pathology*, 91: 579-588.
- Ferrandino, A. e Guidoni, S.** (2010). Anthocyanins, flavonols and hydroxycinnamates: And attempt to use them to discriminate *Vitis vinifera* L. cv. "Barbera" clones. *European Food Research and Technology*, 230: 417-427.
- Ferreira, D., Slade, D. e Marais, P.J.** (2006). Flavans and Proanthocyanidins. En: *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications* (Eds. Ø.M. Andersen e K.R. Markham), CRC, Taylor & Francis, London (UK), 553-616.
- Ferro, E.** (1989). Aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* de ápices caulinares en el saneamiento de clones seleccionados de vid, cv Albariño. Tese de Doutoramento. Universidade de Santiago de Compostela.
- Flanzy, C.** (2000). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid (España).
- Folts, J.D.** (2002). Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 505: 95-111.
- Fontela, A.** (1989). Caracterización de la evaluación de suelos de viñedo de la comarca del Ulla. Excma. Deputación Provincial de A Coruña.
- Foo, L.Y.** (1981). Proanthocyanidins: Gross chemical structures by infrared spectra. *Phytochemistry*, 20: 1397-1402.
- Freijanes, J. e Alonso, M.P.** (1997). Videiras galegas. Catálogo de variedades autóctonas. Xunta de Galicia, 17-19.
- Fuhrman, B., Volkova, N., Suraski, A. e Aviram, M.** (2001). White wine with red wine-like properties: Increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3164-3168.
- Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F. e Velasco, R.** (2008).

Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 11773-11785.

Gawel, R. (1998). Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4: 74-95.

Genisheva, Z. e Oliveira, J.M. (2009). Monoterpenic characterization of white cultivars from Vinhos Verdes Appellation of Origin (North Portugal). *Journal of The Institute of Brewing*, 115: 308-317.

Ginjom, I., D'Arcy, B., Caffin, N. e Gidley, M. (2011). Phenolic compounds profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. *Food Chemistry*, 125: 823-834.

Goetz, G., Fkyerat, A., Métails, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R. e Pont, V. (1999). Resistance factors to grey mould in grape berries: Identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry*, 52: 759-767.

Goldberg, D.M. e Soleas, G.J. (2003). Resveratrol: Biochemistry, cell biology and the potential role in disease prevention. En: *Wine. A scientific exploration* (Eds. M. Sandler e R. Pinder), Taylor & Francis, New York (USA), 160-198.

Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. e Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 618-626.

González-Barrio, R., Beltrán, D., Cantos, E., Gil, M.I., Espín, J.C. e Tomás-Barberán, F.A. (2006). Comparison of ozone and UV-C treatments on the postharvest stilbenoid monomer, dimer, and trimer induction in var. 'Superior' white table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4222-4228.

Gorham, J. (1995). The biochemistry of the stilbenoids. Vol. 1 de *The Biochemistry of Natural Products Series*. Ed. Chapman & Hall, London (UK).

Grayer, R.J. (1989). Flavanoids. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol 1, *Plant phenolics* (Ed. J.B. Harborne), Academic Press, London (UK), 283-323.

Guerrero, R.F., Liazid, A., Palma, M., Puertas, B., González-Barrio, R., Gil-Izquierdo, A., García-Barroso, C. e Cantos-Villar, E. (2009). Phenolic

characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, 112: 949-955.

Guerrero, R.F., Puertas, B., Fernández, M.I., Palma, M. e Cantos-Villar, E. (2010a). Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 231-238.

Guerrero, R.F., Puertas, B., Fernández, M.I., Piñeiro, Z. e Cantos-Villar, E. (2010b). UVC-treated skin-contact effect on both white wine quality and resveratrol content. *Food Research International*, 43: 2179-2185.

Hansen, A.S. (1995). *Grape seed extract: Procyanidolic oligmers (PCO)*. Ed. Healing Wisdom, New York (USA).

Harborne, J.B. (1967). *Comparative biochemistry of the flavonoids*. Ed. Academic Press, London (UK).

Harborne, J.B. (1984). *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. Ed. Chapman & Hall, London (UK).

Harborne, J.B. (1988). *The flavonoids. Advances in research since 1980*. Ed. Chapman & Hall, New York (USA).

Harborne, J.B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol. 1, Plant phenolics (Ed. J.B. Harborne), Academic Press, London (UK), 1-28.

Harborne, J.B. (1994). *The flavonoids. Advances in research since 1986*. Ed. Chapman & Hall, New York (USA).

Harborne, J.B. e Mabry, T.J. (1982). *The flavonoids. Advances in research*. Ed. Chapman & Hall, New York (USA).

Harborne, J.B., Mabry, T.J. e Mabry, H. (1975). *The flavonoids*. Ed. Chapman & Hall, London (UK).

He, J.J., Liu, Y.X., Pan, Q.H., Cui, X.Y. e Duan, C.Q. (2010). Different anthocyanin profiles of the skin and the pulp of Yan 73 (Muscat Hamburg x Alicante Boushet) grape berries. *Molecules*, 15: 1141-1153.

Hernández-Mañas, J.L. (2004). A viticultura galega. En: *Guía de Viños, Augardentes e Bodegas de Galicia 2004-2005*. Asociación de Sumilleres Gallaecia. Ed. Xerais de Galicia, Vigo (España), 30-33.

- Hernández-Mañas, J.L. e Rodríguez, J.M.** (2006). As decisións na plantación do viñado. Servizo de transferencia tecnolóxica, estudos e publicacións. Consellería do Medio Rural, Xunta de Galiza.
- Hidalgo, L.** (2004). Tratado de Viticultura. Ed. Mundi-Prensa, Madrid (España).
- Hillis, W.E. e Ishikura, N.** (1968). The chromatographic and spectral properties of stilbene derivates. *Journal of Chromatography*, 32: 323-336.
- Hmamouchi, M., Es-Safi, N., Lahrichi, M., Fruchier, A. e Essassi, E.M.** (1996). Flavones and flavonols in leaves of some Moroccan *Vitis vinifera* cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 186-192.
- Hollecker, L., Pinna, M., Filippino, G., Scrugli, S., Pinna, B., Argiolas, F. e Murru, M.** (2009). Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography-electron spray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216: 3402-3408.
- Ibrahim, R. e Barron, D.** (1989). Phenylpropanoids. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol. 1, Plant phenolics (Ed. J.B. Harborne), Academic Press, London (UK), 75-111.
- Jin, Z.M., He, J.J., Bi, H.Q., Cui, X.Y. e Duan, C.Q.** (2009). Phenolic compound profiles in berry skins from nine red wine grape cultivars in northwest China. *Molecules*, 14: 4922-4935.
- Jurd, L.** (1957). The detection of aromatic acids in plant extracts by the ultraviolet absorption spectra of their ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 66: 284-288.
- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B. e Kinsella, J.E.** (1994). Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 64-69.
- Katalinić, V., Možina, S.S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., Ljubenkov, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P. e Boban, M.** (2010). Phenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry* 119: 715-723.

- Kaur, G., Roberti, M., Raul, F. e Pendurthi, U.R.** (2007). Suppression of human monocyte tissue factor induction by red wine phenolics and synthetic derivatives of resveratrol. *Trombosis Research*, 119: 247-256.
- Kennedy, J.A.** (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent finding. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35: 107-120.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A. e Waterhouse, A.L.** (2002). Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture* 53: 268-274.
- Kennedy, J.A., Saucier, C. e Glories, Y.** (2006). Grape and wine phenolics: History and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 239-248.
- Kobayashi, S., Ishimaru, M., Hiraoka, K. e Honda, C.** (2002). *Myb*-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 215: 924-933.
- Komes, D., Ulrich, D., Kovacevic-Ganic, K. e Lovric, T.** (2007). Study of phenolic and volatile composition of white wine during fermentation and short time of storage. *Vitis*, 46: 77-84.
- Krisa, S., Larronde, F., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G. e Mérillon, J.-M.** (1999). Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: Methyl jasmonate induction and ¹³C biolabeling. *Journal of Natural Products* 62: 1688-1690.
- Labadie, R.P.** (1993). Immunomodulatory compounds. En: *Bioactive natural products. Detection, isolation, and structural determination* (Eds. S.M. Colegate e R.J. Molyneux), CRC Press, Florida (USA), 279-317.
- Lamuela-Raventós, R.M., Romero-Pérez, A.I., Waterhouse, A.L. e de la Torre-Boronat, M.C.** (1995). Direct HPLC analysis of *cis* and *trans* resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 281-283.
- Langcake, P.** (1981). Disease resistance to *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology*, 18: 213-226.

- Langcake, P. e Pryce, R.J.** (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9: 77-86.
- Langcake, P. e Pryce, R.J.** (1977a). A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33: 151-152.
- Langcake, P. e Pryce, R. J.** (1977b). The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* 16: 1193-1196.
- Lednicer, D. e Narayanan, V.L.** (1993). Acquisition and screening of natural products as potential anticancer and AIDS antiviral agents. En: *Bioactive natural products. Detection, isolation, and structural determination* (Ed. S.M. Colegate e R.J. Molyneux), CRC Press, Florida (USA), 159-172.
- Ledda, S., Sanna, G., Manca, G., Franco, M.A. e Porcu, A.** (2010). Variability in flavonol content of grapes cultivated in two Mediterranean islands (Sardinia and Corsica). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 580-585.
- Lee, J.-H., Johnson, J.V. e Talcott, S.T.** (2005). Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in Muscadine grapes by HPLC-ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6003-6010.
- Lema, M.J.** (1991). Valoración de algunos parámetros de fertilidad química de los suelos de viña del área de Cambados. *Vitivinicultura*, 6: 48-51.
- Li, Z., Pan, Q., Jin, Z., Mu, L. e Duan, C.** (2011). Comparison on phenolic compounds in *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon wines from five wine-growing regions in China. *Food Chemistry*, 125: 77-83.
- López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P., Sanches-Silva, A.T. e Lage-Yusty, M.A.** (2007). Study of the changes of *trans*-resveratrol caused by ultraviolet light and determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in Spanish white wines. *European Food Research and Technology*, 225: 789-796.
- Loureiro, M.D.** (1993). Estudio ampelográfico de poblaciones del cultivar Albariño. Tese de Licenciatura. Universidade de Santiago de Compostela.
- Loureiro, M.D.** (1999). Descripción ampelográfica de cepas de *Vitis vinifera* L., denominadas Albariño, procedentes de distintos puntos de la geografía gallega. Tese de Doutoramento. Universidade de Santiago de Compostela.

- Loureiro, M.D., Martínez, M.C., Boursiquot, J.M. e This, P.** (1998). Molecular marker analysis of *Vitis vinifera* “Albariño” and some similar grapevine cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123: 842-848.
- Mabry, T.J.** (1969). The ultraviolet and nuclear magnetic resonance analysis of Flavonoids. En: *Perspectives in Phytochemistry* (Eds. J.B. Harborne e T. Swain), Academic Press, London (España), 1-45.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A. e Billot, A.** (1990). *Fruit phenolics*. Ed. CRC Press, Florida (USA).
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A. e Jay-Allemand, C.** (2005). Les composés phénoliques dans les interacciones entre la plante et son environnement. En: *Les composés phénoliques des Végétaux*. Ed. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Luasanne (CH), 67-119.
- Macheix, J.-J., Sapis, J.C. e Fleuriet, A.** (1991). Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30: 441-486.
- M.A.G.R.A.M.A.** (2012). *Avances Anuario de Estadística 2011*. Ministerio de Agricultura, Alimentación e Medio Ambiente. <http://magrama.gob.es> [consulta: 21 de maio 2012].
- Maier, T., Sanzenbacher, S., Kammerer, D. R., Berardini, N., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R. e Schieber, A.** (2006). Isolation of hydroxycinnamoyltartaric acids from grape pomace by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*: 1128: 61-67.
- Makris, D.P., Kallithraka, S. e Kefalas, P.** (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 396-404.
- Makris, D.P., Psarra, E., Kallithraka, S. e Kefalas, P.** (2003). The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Research International*, 36: 805-814.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. e Rémésy, C.** (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (Suppl.): 230S-242S.

- Mane C., Loonis M., Juhel C., Dufour C. e Malien-Aubert, C.** (2011). Food grade Lingonberry extract: Polyphenolic composition and in vivo protective effect against oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 3330-3339.
- Markham, K.R.** (1982). Hydrolysis and the analysis of glycosides. En: *Techniques of flavonoid identification*. Ed. Academic Press, London (UK), 52-61.
- Markham, K.R.** (1989). Flavones, flavonols and their glycosides. En: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol I, Plant Phenolics (Ed. J.B. Harborne), Academic Press, London (UK), 197-235.
- Martínez-Chantada, H., Núñez-Pérez, M., Maceira-Vidal X.A., Leiro-Lois, A. e Daporta-Padín, M.** (1999). A vide e o viño. *Enciclopedia Temática Ilustrada II*. Ed. A Nosa Terra.
- Martínez, M.C.** (2002). El Albariño. Ilustraciones sobre la variedad Albariño (*Vitis vinifera* L.). Servizo de Publicacións da Excm. Deputación Provincial de Pontevedra.
- Martínez M.C., González-Mantilla, J.L., e Loureiro, M.D.** (1994). Descripción ampelográfica sobre hoja adulta de cepas de *Vitis vinifera* L. denominadas Albariño. *Viticultura y Enología Profesional*. 34: 30-40.
- Masa, A.** (1985). Método bioquímico de determinación de la afinidad entre injerto y patrón en vid. *Vitis*, 24: 12-16.
- Masa, A.** (1988). Afinidade bioquímica entre patrón e enxerto na vide. En: *IV Xornadas Agrarias Galegas. Cuadernos da Área de Ciencias Agrarias*. Ed. Edicións do Castro, A Coruña (España), 253-257.
- Masa, A., Vilanova, M. e Pomar, F.** (2007). Varietal differences among the flavonoid profiles of white grape cultivars studied by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1164: 291-297.
- Masa, A. e Vilanova, M.** (2008). Flavonoid and aromatic characterisation of cv. Albarín blanco (*Vitis vinifera* L.). *Food Chemistry*, 107: 273-281.
- Masa, A. e Zamuz, S.** (2010). Papel de los compuestos fenólicos en la caracterización de las variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) cultivadas en Galicia. En: *Actas do Seminario sobre Biodiversidade Vexetal no Sistema Agroforestal Atlántico*. Sociedad de Ciencias de Galicia, Pontevedra (España), 51-52.

- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M. e Velasco, R.** (2006). Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7692-7702.
- Mattivi, F., Reniero, F. e Korhammer, S.** (1995). Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1820-1823.
- Mazza, G. e Miniati, E.** (1993). Grapes. En: *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. Ed. CRC Press, Boca Raton (USA), 149-199.
- Méndez, J. e Lojo, M.I.** (1969). Spectral characterization of coumarins and cinnamic acids. *Microchemical Journal*, 14: 567-572.
- Moreno, A., Castro, M. e Falqué, E.** (2008). Evolution of *trans*- and *cis*-resveratrol content in red grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Mencía, Albarello and Merenzao) during ripening. *European Food Research and Technology*, 227: 667-674.
- Moya, L.** (2004). Galicia: O país dos mil viños. En: *Guía de Viños, Augardentes e Bodegas de Galicia 2004-2005*. Asociación de Sumilleres Gallaecia. Ed. Xerais de Galicia, Vigo (España), 46-49.
- Mozetič, B., Tomažič, I., Škvarč, A. e Trebše, P.** (2006). Determination of polyphenols in white grape berries cv. Rebula. *Acta Chimica Slovenica*, 53: 58-64.
- Obreque-Slier, E., Peña-Neira, A., López-Solís, R., Zamora-Marín, F., Ricardo-da Silva, J.M. e Laureano, O.** (2010). Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera*, L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 3591-3599.
- Oliveira, J.M.** (2000). Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das castas Loureiro e Albariño. Tese de Doutoramento, Universidade do Minho.
- Oliveira, J.M., Araújo, I.M., Pereira, O.M., Maia, J.S., Amaral, A.J. e Maia, M.O.** (2004). Characterization and differentiation of five “Vinhos Verdes” grape varieties on the basis of monoterpenic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 513: 269-275.

- Oliveira, J.M., Faria, M., Sá, F., Barros, F. e Araújo, I.M.** (2006). C₆-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *Analytica Chimica Acta*, 563: 300-309.
- Oliveira, J.M., Oliveira, P., Baumes, R.L. e Maia, M.O.** (2008a). Changes in aromatic characteristics of Loureiro and Alvarinho wines during maturation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 695-707.
- Oliveira, J.M., Oliveira, P., Baumes, R.L. e Maia, M.O.** (2008b). Volatile and glycosidically bound composition of Loureiro and Alvarinho wines. *Food Science and Technology International*, 14: 341-353.
- Ong, B.Y. e Nagel, C.W.** (1978). Hydroxycinnamic acid-tartaric acid ester content in mature grapes and during the maturation of white Riesling grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 29: 277-281.
- Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C.C., Sellappan, S. e Krewer, G.** (2003). Phenolic content and antioxidant capacity of Muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5497-5503.
- Pawlus, A.D., Waffo-Téguo, P., Shaver, J. e Mérillon, J.-M.** (2012). Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 46: 57-111.
- Pearce, F.L., Befus, A.D. e Bienenstock, J.** (1984). Mucosal mast-cells. 3.- Effects of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cell. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73: 819-823.
- Pedras, M.S.C. e Yaya, E.E.** (2010). Phytoalexins from Brassicaceae: News from the front. *Phytochemistry*, 71: 1191-1197.
- Perestrelo, R., Lu, Y., Santos, S.A.O., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P., Câmara, J.S. e Rocha, S.M.** (2012). Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra *Vitis vinifera* L. grape skins by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. Novel phenolic compounds in *Vitis vinifera* L. grape. *Food Chemistry*, 135: 94-104.
- Pérez-Fernández, J.E., Rega-Piñeiro, J. e Orriols-Fernández, I.** (1993). Variedades autóctonas de cepas gallegas para vinos blancos. Ed. Ici-Zeltia Agroquímicos, 37-47.
- Peynaud, E.** (1993). La composición del vino. En: *Enología práctica: Conocimiento y elaboración del vino*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid (España).

- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. e Spring, J.-L.** (2004). Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65: 297-303.
- Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J.B., Tabacchi, R., Gindro, K. e Viret, O.** (2003). δ -viniferin, a resveratrol dehydrodimer: One of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5488-5492.
- Pomar, F., Novo, M. e Masa, A.** (2005). Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1094: 34-41.
- Pool, R.M., Creassy, L.L. e Frackelton, A.S.** (1981). Resveratrol and the viniferins, their application to screening for disease resistance in grape breeding programs. *Vitis*, 20: 136-145.
- Porter, L.J.** (1989). Tannins. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol 1, Plant phenolics (Ed. J.B. Harborne), Academic Press, London (UK), 389-420.
- Porter, L.J. e Markham, K.R.** (1972). Aluminium complexes of flavonones and dihydroflavonols. *Phytochemistry*, 11: 1477-1478.
- Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M. e Watson, B.T.** (1995). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46: 187-194.
- Qing L.S., Xue, Y., Zhang, J.G., Zhang, Z.F., Liang, J., Jiang, Y., Liu, Y.M. e Liao X.** (2012). Identification of flavonoid glycosides in *Rosa chinensis* flowers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in combination with ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Journal of Chromatography A*, 1249: 130-137.
- Ramos, R., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Pereira, C., Ferreira, M.A. e Faia, M.A.** (1999). A preliminary study of non-coloured phenolics in wines of varietal white grapes (códega, gouveio and malvasia fina): Effects of grape variety, grape maturation and technology of winemaking. *Food Chemistry*, 67: 39-44.

- Regos, I., Urbanella, A. e Treutter, D.** (2009). Identification and quantification of phenolic compounds from the forage legume Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 5843-5852.
- Reschke, A. e Herrmann, K.** (1981). Vorkommen von 1-O-hydroxycinnamyl-b-D-glucosen im obst. 15. Phenolische inhaltsstoffe des obstes. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 173: 458-463.
- Revilla, E., García-Beneytez, E., Cabello, F., Martín-Ortega, G. e Ryan, J.M.** (2001). Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, 915: 53-60.
- Ribeiro de Lima, M.T., Waffo-Tguo, P., Teissedre, P.L., Pujolas, A., Vercauteren, J., Cabanis, J.C. e Mérillon, J.-M.** (1999). Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2666-2670.
- Ribèreau-Gayon, P.** (1963). Les acides phénols de *Vitis vinifera*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*, 256: 4108-4111.
- Ribèreau-Gayon, P.** (1965). Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans limbes et les baies de *Vitis vinifera*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*, 260: 341-343.
- Rigaud, J., Cheynier, V., Asselin, C., Brossaud, F. e Moutounet, M.** (1996). Caractérisation des flavonoides de la baie de raisin. Application á une étude terroir. En: *OEnologie 95*. Ed. Lavoisier, Paris (Francia), 137-140.
- Rodríguez, B.** (1993). Caracterización de la fertilidad de los suelos y estado nutricional de la vid en las comarcas vitícolas del interior de Galicia. Tese de Doutoramento. Universidade de Santiago de Compostela.
- Rodríguez-Lovelle, B., Martínez-Cortizas, A. e García-Rodeja E.** (1994). Clima y suelos vitícolas de Galiza. Disponibilidad hídrica para la vid. En: *Actas del I Congreso Internacional de la Vitivinicultura Atlántica*. Illa de A Toxa, Pontevedra (España), Tomo II: 55-72.
- Rodríguez-Montealegre, R., Romero-Peces, R., Chacón-Vozmediano, J.L., Martínez-Gascuña, J. e García-Romero, E.** (2006). Phenolic compounds in

skins and seeds of ten grapes *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 687-693.

Roggero, J.P. (1996). Évolution des teneurs en resvératrol et en picéide dans des vins en cours de fermentation ou de vieillissement. Comparaison des cépages grenache et mourvèdre. *Sciences des Aliments*, 16: 631-642.

Romani, A., Campo, M. e Pinelli, P. (2012). HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. *Food Chemistry*, 130: 214-221.

Romero-Pérez, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S. e de la Torre-Boronat, M.C. (1996a). Resveratrol and piceid as varietal markers of white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1975-1978.

Romero-Pérez, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., Waterhouse, A.L. e de la Torre-Boronat, M.C. (1996b). Levels of *cis*- and *trans*-resveratrol and their glucosides in white and rosé *Vitis vinifera* wines from Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2124-2128.

Romeyer, F.M., Macheix, J.-J., Goiffon, J.P., Reminiac, C.C. e Sapis, J.C. (1983). The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31: 346-349.

Sáenz-Navajas, M.P., Tena, M.T. e Fernández-Zurbano, P. (2009). Study of hydroxycinnamic acids and malvidin 3-monoglucoside derivatives using capillary zone electrophoresis and ultra-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 115: 766-774.

Saito, M., Hosoyama, H., Ariga, T., Kataoka, S. e Yamaji, N. (1998). Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1460-1464.

Saito, N. e Harborne, J.B. (1992). Correlations between anthocyanins type, pollinator and flower colour in the Labiateae. *Phytochemistry* 31: 3009-3015.

Salta, J., Martins, A., Santos, R.G., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Justino, J. e Rauter, A.P. (2010). Phenolic composition and antioxidant activity of Rocha pear and other pear cultivars – A comparative study. *Journal of Functional Foods*, 2: 153-157.

- Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R.M., Viladomat, F., Bastida, J. e Codina, C.** (2004). Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18: 553-563.
- Santos Solla, J.M.** (1992). Geografía de la Vid y el Vino en Galiza. Servizo de Publicacións da Deputación de Pontevedra.
- Schneider, Y., Chabert, P., Stutzmann, J., Coelho, D., Fougerousse, A., Gosse, F., Launay, J.F., Brouillard, R. e Raul, F.** (2003). Resveratrol analog (Z)-3,5,4'-tri-methoxystilbene is a potent anti mitotic drug inhibiting tubulin polymerization. *International Journal of Cancer*, 107: 189-196.
- Shahidi, F. e Chandrasekara, A.** (2010). Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. *Phytochemical Reviews*, 9: 147-170.
- Siemann, E.H. e Creasy L.L.** (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43: 49-52.
- Simirgiotis, M.J. e Schmeda-Hirschmann, G.** (2010). Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217: 443-449.
- Simpson, R.F.** (1982). Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis*, 21: 233-239.
- Singleton, V.L.** (1980). Grape and wine phenolic; background and prospects. *Comptes Rendus Collection Centenaire Paris*, pp. 215.
- Singleton, V.L. e Esau, P.** (1969). Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. *Advances in Food Research*, Supplement 1. Ed. Academic Press, London (UK).
- Singleton, V.L., Salgues, M., Zaya, J. e Trousdale, E.** (1985). Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape, must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36: 50-56.
- Singleton, V.L. e Trousdale, E.** (1983). White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC. *American Journal of Enology and Viticulture*, 34: 27-34.

- Singleton, V.L., Zaya, J. e Trousdale, E.** (1986). Caftaric and coumaric acids in fruit of *Vitis*. *Phytochemistry*, 25: 2127-2133.
- Soleas, G.J., Dam, J., Carey, M. e Goldberg, D.M.** (1997). Toward the fingerprinting of wines: Cultivar-related patterns of polyphenolic constituents in Ontario wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3871-3880.
- Steck, W.** (1967). On the identification of some naturally occurring hydroxycinnamic acid derivatives. *Analytical Biochemistry*, 20: 553-556.
- Sun, B., Ribes, A.M., Leandro, M.C., Belchior, A.P. e Spranger, M. I.** (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta*, 563: 382-390.
- Sun J., Liang, F., Bin, Y., Li, P. e Duan C.** (2007). Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. *Molecules*, 12: 679-693.
- Swain, T.** (1985). Plant phenolics: Past and future. En: *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe vol. 25* (Eds. C.F. Van Sumere e P.J. Lea), Clarendon Press, Oxford (UK), 453-468.
- Talcott, S.T. e Lee, J.-H.** (2002). Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3186-3192.
- Timberlake, C.F. e Bridle, P.** (1980). Anthocyanins. En: *Developments in Food Colours, Vol. 1* (Ed. J. Walford), Applied Science Publishers, London (UK). 115-149.
- Trousdale, E.K. e Singleton, V.L.** (1983). Astilbin and Engeletin in grapes and wine. *Phytochemistry*, 22: 619-620.
- Uchida, S., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Nonaka, G., Nishioka, I., Niwa, M. e Ozaki M.** (1987). Condensed tannins scavenge active oxygen free-radicals. *Medical Science Research - Biochemistry*, 15: 831-832.
- Vallverdú-Queralt, A., Jáuregui, O., Medina-Remón, A. Andrés-Lacueva, C. e Lamuela-Raventós, R.M.** (2010). Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid

chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24: 2986-2992.

Van Sumere, C.F. (1989). Phenols and phenolic acids. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol. 1, Plant phenolics (Ed. J.B. Harborne), Academic Press, London (UK), 29-73.

Van Sumere, C.F. e Lea, P.J. (1985). The biochemistry of plant phenolics. En: *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe* vol. 25 (Eds. C.F. Van Sumere e P.J. Lea), Clarendon Press, Oxford (UK).

Vanden-Berghe, D.A.R., Haemers, A. e Vlietinck, A.J. (1993). Antiviral agents from higher plants and an example of structure-activity relationship of 3-methoxyflavones. En: *Bioactive natural products. Detection, isolation, and structural determination* (Eds. S.M. Colegate e R.J. Molyneux), CRC Press, Florida (USA), 405-440.

Vázquez, E.I., Losada, A. e Orriols, I. (2008). Comportamiento agronómico de los sistemas de formación en Albariño durante 2008. En: *Nuevos Horizontes en la Viticultura y Enología*. Servizo de Publicacións da Universidade de Vigo (España), 159-162.

Versini, G., Orriols, I. e Dalla Serra, A. (1994). Aroma components of Galician Albariño, Loureira and Godello wines. *Vitis*, 33: 165-170.

Vian, M.A., Tomao, V., Gallet, S., Coulomb, P.O. e Lacombe, J.M. (2005). Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. *Journal of Chromatography A*, 1085: 224-229.

Vidal, J.R. (1996). Caracterización bioquímica de las variedades blancas de vid (*Vitis vinifera* L.) cultivadas en la Denominación de Origen "Rías Baixas". Tese de Doutoramento. Universidade de Santiago de Compostela.

Vidal, J.R., Moreno, S., Gogorcena, Y., Masa, A. e Ortiz, J.M. (1999a). On the genetic relationships and origins of six grape cultivars of Galicia (Spain) using RAPD markers. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50: 69-75.

Vidal, J.R., Moreno, S., Masa, A. e Ortiz, J.M. (1998). Study of the genetic homogeneity of Albariño (*Vitis vinifera* L.) growing in Galicia (Spain) using isoenzyme and RAPD markers. *Vitis*, 37: 145-146.

- Vidal, J.R., Moreno, S., Masa, A. e Ortiz, J.M.** (1999b). Estudio de la variabilidad genética de Albariño. Fundación Premio Arce e Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria. Madrid (España), 99-111.
- Vilanova, M. e Sieiro, C.** (2006). Determination of free and bound terpene compounds in Albariño wine. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 694-697.
- Vilanova, M. e Vilariño, F.** (2006). Influence of geographic origin on aromatic descriptors of Spanish Albariño wine. *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 373-378.
- Vilanova, M., Zamuz, S., Tardáguila, J. e Masa, A.** (2008). Descriptive analysis of wines from *Vitis vinifera* cv. Albariño. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 819-823.
- Vilanova, M., Zamuz, S., Vilariño, F. e Sieiro, C.** (2007). Effect of *terroir* on the volatiles of *Vitis vinifera* cv. Albariño. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 1252-1256.
- Vilanova, M., de la Fuente, M., Fernández-González, M. e Masa, A.** (2009). Identification of new synonymies in minority grapevine cultivars from Galicia (Spain) using microsatellite analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60: 236-240.
- Vrhovsek, U.** (1998). Extraction of hidroxycinnamoyltartaric acids from berries of different grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4203-4208.
- Waffo-Téguo, P., Fauconneau, B., Deffieux, G., Huguet, F., Vercauteren, J. e Mérillon, J.-M.** (1998). Isolation, identification and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Journal of Natural Products*, 61: 655-657.
- Wagner, P.** (1976). Vinos, vides y climas. *Investigación y Ciencia*, 1: 100-110.
- Waterhouse, A.L. e Lamuela-Raventós, R.M.** (1994). The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry*, Vol. 37: 571-573.
- Williamson, G. e Carughi, A.** (2010). Polyphenol content and health benefits of raisins. *Nutrition Research*, 30: 511-519.
- Wolfe, W.H.** (1976). Identification of grape varieties by isozyme banding patterns. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27: 68-73.

Wollenweber, E. (1994). Flavones and Flavonols. En: The Flavonoids Avances in Research since 1986 (Ed. J.B. Harborne), Chapman & Hall, Nueva York (USA), 259-335.

Yglesias, X.A. (1983). Caracterización vitícola de Galiza. Ecoclimas e castes. Cuadernos da Área de Ciencias Agrarias, 4. I Jornadas de estudio sobre los recursos básicos de la agricultura gallega. Publicacións do Seminario de Estudos Galegos, 311-334.

Zamuz, S., Díaz, R. e Vilanova, M. (2006). Aromatic diversity of *Vitis vinifera* cv Albariño. Quantification of aromatic potential. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 40: 197-202.

Zamuz, S., Díaz, R. e Vilanova, M. (2007a). Valor de la actividad odorífica en vinos de la variedad Albariño cultivada en la Denominación de Origen Rías Baixas. Enólogos, 46: 66-69.

Zamuz, S., Martínez, M.C. e Vilanova, M. (2007b). Primary study of enological variability of wines from different clones of *Vitis vinifera* L. cv. Albariño grown in Misión Biológica de Galicia. (CSIC). Journal of Food Composition and Analysis. 20: 591-595.

Zamuz, S. e Vilanova, M. (2006a). Volatile compounds after spontaneous fermentation of musts from *Vitis vinifera* cv. Albariño grapes cultivated in different origins from Rías Baixas AOC, Spain. Flavour and Fragrance Journal, 21: 743-748.

Zamuz, S. e Vilanova, M. (2006b). Volatile composition of the *Vitis vinifera* Albariño musts according to geographic areas from Rías Baixas D.O. (Spain). Italian Journal of Food Science, 18: 323-327.

Zamuz, S., Blanco, M., Masa, A. e Vilanova, M. (2009). Efecto del clima sobre la composición varietal del cultivar Albariño en la Denominación de Origen Rías Baixas. En: Nuevos horizontes en la viticultura y enología. Servizo de Publicacións da Universidade de Vigo (España), 23-26.