ÍNDICE MEMORIA

ÍNDICE MEMORIA 1
Resum 5
Resumen 5
Abstract 5
Agradecimientos 6
Capítulo 1. Introducción 7
1.1. Objetivos 8
1.2. El vino 8
1.2.1. Elaboración del vino 9
1.2.2. Tipos de vinos 11
1.3. Polifenoles 12
1.3.1. Mecanismos de acción de los polifenoles 12
1.4. Método Quimiométrico (PCA) 13
1.5. Método analítico 14
1.5.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución. (HPLC) 14
Capítulo 2. Parte experimental 17
2.1. Equipo utilizado 18
2.1.1. Método utilizado 18
2.2. Reactivos 20
2.2.1. Agua Milli-Q (Millipore sistema milli-Q Gradient) 20
2.2.2. Metanol (Panreac) 21
2.2.3. Ácido Fórmico (Rïedel-de-Haën) 22
2.2.4. Acetonitrilo (Panreac) 23
2.3. Patrones de referencia 24
2.3.1. acido 3,4-dihidroxibenzoico (Fluka Ref.37580) 28
2.3.2. Epicatechin (Sigma-aldrich Ref.E1753) 29
2.3.3. 4-Hydroxybenzoic acid (Sigma-aldrich Ref.H2005-9) 30
2.3.4. Vanillic acid (Fluka Ref.94770) 31
2.3.5. Catechin hydrate (Fluka Ref.22110) 32
2.3.6. P-Coumaric acid (Sigma-aldrich Ref.C9008) 33

2.3.7. Syringic acid (Fluka Ref.86230) 34
2.3.8. Caffeic acid (Sigma-aldrich Ref.C0626) 35
2.3.9. Gallic acid (Sigma-aldrich Ref.G7384) 36
2.3.10. Trans-ferulasaure (Sigma-aldrich Ref.128708) 37
2.3.11. Quercetinhydrate (Sigma-aldrich Ref.337951) 38
2.3.12. Resveratrol (Sigma-aldrich ref.R5010) 39
2.3.13. Syringaledehyd (Sigma-aldrich Ref.S7602) 40
2.3.14. Quercitrin hydrate (Sigma Ref. Q3001) 41
2.3.15. Myricetin (Sigma Ref.M6760) 42
2.3.16. 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (Sigma-aldrich Ref.D108405) 43
2.3.17. Caempferol (Sigma-aldrich Ref.H0133) 44
2.3.18. Tirosol (Fluka Ref.79058) 45
2.3.19. Fisetin (Sigma-aldrich Ref.F4043) 46
2.3.20. Malvin chloride (Sigma-aldrich Ref.72815) 47
2.3.21. Oenin chloride (Sigma-aldrich Ref.72813) 49
2.3.22. Ethyl gallate (Sigma-aldrich Ref.48640) 50
2.3.23. Rutin hydrate (Sigma-aldrich Ref.R5143) 51
Capítulo 3. Resultados y discusión 53
3.1. Optimización del método analítico 54
3.1.1. Fase móvil orgánica 55
3.1.2. Fase móvil acuosa 59
3.1.3. Elución en gradiente 62
3.1.4. Determinación longitud de onda 67
3.2. Estudios de filtrado 69
3.2.1. Filtros de Nylon 69
3.2.2. Tipos de Filtros 73
3.3. Estudio de estabilidad 76
3.3.1. Estabilidad vinos 76
3.3.2. Estabilidad método cromatográfico 87
3.4. Estudios preliminares para la clasificación 88
de 46 vinos 88
Capítulo 4. Conclusiones 93
Capítulo 5. Evaluación Económica 95
5.1. Coste energéticos 96
5.2. Coste en material y reactivos 96
5.3. Amortizaciones 99

5.4. Costes personales.....99
5.5. Coste total.....100
Capítulo 6. Bibliografia 101
6.1. Bibliografía de consulta 102
6.2. Páginas de consulta de Internet.....102

RESUM

En aquest projecte s'ha realitzat l'optimització del mètode analític. S'ha fet uns estudis previs, com són la preparació de la fase mòbil orgànica i la fase mòbil aquosa, l'elució del gradient i el filtrat.

S'ha estudiat també l'estabilitat dels vins i el mètode cromatogràfic.

Per últim, s'ha fet un estudi de 46 mostres de vins, en el qual s'ha estudiat la correlació entre els polifenols i les característiques dels vins, com és la Denominació d'Origen (D.O).

La tècnica utilitzada ha estat l' HPLC amb el detector de UV-visible i fluorescència.

RESUMEN

En este proyecto se ha realizado la optimización del método analítico. Se han hecho unos estudios previos, como son la preparación de la fase móvil orgánica y la fase móvil acuosa, la elución del gradiente y el filtrado del vino.

Se ha estudiado también la estabilidad de los vinos y del método cromatográfico.

Por último se ha hecho un estudio de 46 muestras de vinos, en el cual se ha estudiado la correlación entre los polifenoles y las características de los vinos, como es la Denominación de Origen (D.O).

La técnica utilizada ha sido el HPLC con detector de UV-visible y fluorescencia.

ABSTRACT

In this project it has been carried out the optimization of the analytic method. Some previous studies have been made, as the organic mobile phase and the watery mobile phase, the gradient elution and the wine filtering.

It has also been studied the stability of wine and of the cromatographic method.

Last, it has been undertaken a study with 46 wine samples, in which it has been studied the polyphenols correlation and the wines characteristics as can be the origin denomination (D.O.).

It has been used the HLPC method with UV-visible and fluorescence detector.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado y han hecho posible la realización de este proyecto.

También agradecer al Dr. Ramón Oliver, no solo por darme la oportunidad y su apoyo en el proyecto, sino también, por acompañarme y aconsejarme durante toda la carrera.

En segundo lugar dar las gracias a Antonio Checa Gómez por la dirección del proyecto, su ayuda y su paciencia. Sus consejos han hecho posible el desarrollo de éste. Agradecer también a Santiago Hernández por prestarnos las instalaciones y personal que hemos necesitado durante los meses que hemos trabajado en su departamento de Química analítica en la UB de Química.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se introducirán los objetivos de este proyecto y los conceptos básicos para comprender el desarrollo del proyecto. Se hablará del vino, sus propiedades y proceso de elaboración, y sus diferentes clasificaciones.

1.1. Objetivos

Los objetivos planteados en este proyecto son los siguientes:

- Identificar los polifenoles presentes en el vino, mediante HPLC adicionando los polifenoles al vino.
- Estudio de las posibles correlaciones entre niveles de polifenoles de los vinos y características como denominación de origen, tipo de uva y envejecimiento.
- Estudiar la estabilidad de diferentes vinos y polifenoles, analizando la misma muestra al cabo del tiempo.
- Estudiar diferentes aspectos del tratamiento del vino, para un estudio óptimo.

1.2. El vino

El vino es una bebida alcohólica obtenida a partir de la fermentación del mosto de la uva y forma parte de nuestra cultura desde hace aproximadamente unos 6.000 años. A lo largo del tiempo la consideración social del vino ha ido cambiando. Desde hace una década, el interés científico se ha centrado en los efectos beneficiosos que comporta el consumo moderado del vino para la salud. Los polifenoles no tienen una función conocida en la nutrición, no son nutrientes, y en los estudios se ha demostrado las propiedades biológicas que tienen como antioxidantes, antisépticos, antimutagénicos, anticarcinogénicos y antiinflamatorios entre otros, que son beneficiosas en la prevención de enfermedades y en la protección del genoma, particularmente para las células epiteliales intestinales, unos de los tejidos más proliferativos del cuerpo humano.

Los componentes más frecuentes del vino son: como componente mayoritario el agua, entre un 85-90%, alcoholes (etanol, como alcohol mayoritario, y pequeñas cantidades de otros alcoholes como, glicerol, metanol), ácidos, provenientes de la uva (ácido tartárico, málico, cítrico) y otros provenientes de la fermentación (el ácido acético, carbónico, succínico, etc.), azucares (la glucosa, fructosa,…), substancias fenólicas (taninos, antocianinas, flavonas, etc.), substancias nitrogenadas (aminoácidos, aminas), substancias volátiles (aldehídos y esteres), y otras substancias como vitamina, sales minerales, conservantes, especies inorgánicas. La composición cualitativa y cuantitativa depende de la clase del vino.

Las características del vino se ven afectadas por la región, el clima, el suelo, la topología y los cuidados de los productores (D.O).

Una Denominación de Origen (D.O.) es una indicación geográfica, aplicada a un producto, que garantiza el origen y la calidad, en este caso de un vino. Indica que el vino se ha obtenido en zonas delimitadas y que ha estado elaborado según el reglamento preciso (variedades de cepas, grado alcohólico, envejecimiento, características organolépticas, etc.)

En cuanto a la calidad, las materias primas, los microorganismos que intervienen en la vinificación y las condiciones tecnológicas de elaboración, son los factores condicionantes.

1.2.1. Elaboración del vino

La vinificación es el proceso de elaboración del vino. Podemos dividir este proceso en tres etapas: obtención del mosto, fermentación y por último, conservación y envejecimiento.

Las diversas etapas de la vinificación son las siguientes:

- Vendimia: es la recolección de la uva. Ésta se realiza cuando la uva ha adquirido el grado de maduración deseado, la composición de la cual depende de la variedad, el clima, el suelo y del agua.
- Mezcla de variedades de uva: con el objetivo de conseguir un vino determinado.
- Separación de la grapa: se hace mediante una máquina llamada despalilladora que separa la parte leñosa del racimo de la uva.
- Obtención del mosto: Antiguamente se conseguía pisando la uva con los pies. Hoy en día existen diferentes técnicas que nos permiten hacer este proceso. Puede ser por dilaceración (rotura de los granos del racimo mediante rodillos o cilindros), por centrifugación (separando las partes sólidas del líquido) o por prensado (directamente o mediante separación previa de la rapa).
- Correcciones y manipulaciones: Para obtener vino de características correctas y constantes existen tres métodos de corrección y manipulación, estos son: La enyesada, se hace con sulfato de calcio, la sulfatación, con dióxido de azufre o derivados, y por último la fosfatación, con fosfatos.
- La fermentación: es el paso más importante y la parte principal del proceso de la elaboración del vino. Consiste en transformar los azúcares de la uva en alcohol etílico y dióxido de carbono, ya que el mosto va fermentando gracias a la acción de las levaduras. Hoy en día, se realiza en cubas de acero inoxidable o en grandes depósitos de madera. Durante el proceso es importante controlar la temperatura y el aire para una correcta fermentación. En una primera fase, la fermentación es lenta, después experimenta una crecimiento exponencial, donde las levaduras se multiplican y alcanzan el máximo de la población, consumen el azúcar que hay en el mosto y por lo tanto la concentración de éste baja, en esta fase la fermentación es tumultuosa; seguidamente se alcanza una fase estacionaria donde la

fermentación se mantiene a una velocidad constante y la temperatura también, y finalmente la población de levaduras disminuye, ya que los azúcares o la alta concentración de alcohol etílico empieza a matar a las levaduras, y por lo tanto la velocidad de fermentación también. Este proceso puede durar entre varios días y algunas semanas. Existen diferentes factores que afectan a la fermentación, entre ellos, la temperatura, el intervalo donde se produce la fermentación es entre 5ºC y 38ºC. Es importante controlar el pH ya que de él depende su rendimiento. Si se trata de un vino negro o rosado hace falta que la piel esté en contacto con el mosto fermentado ya que los antonianos (donadores del color) sólo se disuelven bien en alcohol. En este caso, se lleva a cabo la maceración carbónica, proceso en el cual el racimo se fermenta sin romper la uva. El método convencional de fermentación alcohólica comporta la rotura o aplastamiento de los granos de uva para liberar el zumo y la pulpa de la piel. En la maceración carbónica, el zumo fermenta mientras se encuentra aún dentro de la piel del grano.

- Fermentación málico- láctica: es debido a las bacterias que producen la descarboxilación del ácido málico dando lugar al ácido láctico, alcoholes y dióxido de carbono. Esta fermentación provoca una disminución del pH y un aumento en el contenido de polifenoles y glicerol. Ésto aporta una pérdida de acidez en el vino y una ganancia en suavidad y aroma, pero también puede conducir a una pérdida de color y aumento de acidez volátil.

- Trasegar: facilita el aireo y la separación del poso.

- Prensa de la parte sólida: da un nuevo líquido, que se añade al trasegado, o se obtiene un vino de menos calidad (vino prensado).

- Segunda fermentación lenta: es característica de los vinos espumosos y se realiza en la botella. El reposo y enfriamiento del vino facilita su transparencia. Pasa en las bodegas y puede incluir una fermentación málico- láctica espontánea. Después el vino se vuelve a trasegar.

- Envejecimiento: aquí se producen un conjunto de reacciones, oxidaciones, reducciones y esterificaciones, con el objetivo de completar la maduración del vino. Tiene una duración que varía desde tres meses hasta más de cinco años. Se realiza en barricas de madera, generalmente de roble, de una capacidad de 225 a 250 litros, donde se produce un intercambio de aromas entre el vino y la madera. Estos vinos serán los nombrados de Crianza, Reserva y Gran Reserva. La mayoría de vinos de mediana y baja calidad son sometidos al envejecimiento acelerado, que consiste en mantenerlos a una temperatura próxima a la de su punto de congelación durante un periodo de ocho días, después del cual el vino adquiere unas características similares a las que conseguirían haciéndolos envejecer en la bodega durante tres meses.

- Embotellamiento: es el último paso para la elaboración del vino. Para obtener la calidad deseada, se puede someter al vino a diversas correcciones como: alcoholización, adición de ácido tartárico o cítrico, neutralización, correlación del color, corrección de la cata del vino dulce con azúcar o con mosto y clarificación con gelatina, bentonita o enzimas. Es decir, se trata de un conjunto de operaciones para el acondicionamiento final del vino con el fin de venderlo al consumidor.

1.2.2. Tipos de vinos

El vino puede clasificarse de distintas formas, las más habituales son, según su color, su envejecimiento y su proceso de elaboración y sus controles.

Entre todos los vinos, destacamos el vino corriente o de mesa. Éste está elaborado sin que intervengan sustancias o prácticas utilizadas para los "los vinos especiales" sin tener en cuenta su graduación, siempre que sea natural. Dentro del vino corriente, se diferencia entre:

- Vino negro: elaborado mayoritariamente a partir de uva negra. La fermentación se ha realizado con el mosto sin filtrar, con la piel, y sólo una vez terminada la fermentación, unos 20 días, se filtra. El vino negro puede envejecer, y en función del tiempo que pase en barricas y botellas, es clasifica en:

    a. Vino joven: menos de seis meses en barrica.

    b. Crianza: al menos seis meses en barrica y un periodo similar en botella.

    c. Reserva: al menos un año en barrica y dos en botella.

    d. Gran Reserva: más de un año en barrica y más de dos en botella.

  Los meses de envejecimiento varían en función de la denominación de origen del vino.

- Vino blanco: se puede elaborar con uva blanca o negra, en este segundo caso, separando la piel del mosto inmediatamente para que no le dé color. Aunque no es frecuente envejecerlo, hay vinos blancos de crianza.

- Vino rosado: son vinos elaborados con uva negra donde se permite una cierta maceración de la uva antes del prensado del mosto, de esta manera el mosto adquiere un poco de color. Después se fermenta el mosto filtrado.

También existen otros tipos de vinos como el Xacolí, el vino dulce, los vinos espumosos o de aguja, el vino gasificado, etc.

1.3. Polifenoles

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas, siendo los flavonoide el grupo mejor definido entre los polifenoles de la dieta humana. Los polifenoles son importantes para la fisiología de las plantas pues contribuyen a la resistencia de microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad por su continua exposición a estresantes ambientales, incluyendo radiaciones ultravioletas y relativamente altas temperaturas.

Cantidades significativas de sustancias fenólicas activas están presentes en la dieta humana. El conocimiento de la biodisponibilidad y los niveles sanguíneos e hísticos de polifenoles es importante en la extrapolación de estudios en líneas celulares a modelos animales y humanos. Hoy se reconoce que una fracción de los polifenoles es capturada por las células de la mucosa del sistema alimentario proximal, y ellos o sus metabolitos son detectados en el plasma a concentraciones micromolares varias horas después de su administración por vía oral y pueden estar envueltos directamente en las defensas antioxidantes in vivo.

Una gran proporción de los polifenoles probablemente no son absorbidos a nivel de la luz intestinal pero bien ellos o sus productos de degradación bacteriana se concentran a nivel del íleon o del intestino grueso donde pueden ejercer interacciones beneficiosas con las células de la mucosa del intestino distal, pues aunque los polifenoles no tienen una función conocida en la nutrición (o sea no son nutrientes), muchos de ellos tienen propiedades antioxidantes, antimutagénicas, anticarcinogénicas y antinflamatorias, beneficiosas en la prevención de enfermedades y en la protección del genoma, particularmente para las células epiteliales intestinales, unos de los tejidos más proliferativos del cuerpo humano.

1.3.1. Mecanismos de acción de los polifenoles

Los polifenoles son poderosos antioxidantes que protegen a las LDL del daño oxidativo, y su acción como antioxidante está relacionada no sólo con su estructura química sino que también con su localización en la partícula. Pueden actuar como potentes inhibidores de la oxidación de las LDL por varios mecanismos:

Como antioxidantes propiamente tales, actuando como atrapadores de radicales libres. Los distintos polifenoles tienen distinta especificidad por las distintas especies oxidantes que se generan en el organismo.

En forma indirecta, como agentes quelantes de iones de metales de transición, es decir, uniéndose a estos iones y reduciendo la capacidad de estos metales pesados de generar radicales libres.

Por sus propiedades de solubilidad pueden localizarse sobre la superficie de la partícula de LDL, disminuyendo el consumo de los antioxidantes propios de las LDL como vitamina E y carotenoides, y en algunos casos regenerando vitamina E oxidada en la partícula de LDL.

Por su capacidad de inhibir, activar o proteger enzimas específicas en el organismo. Los distintos polifenoles tienen cada uno actividades particulares. Por ejemplo, se ha observado que el consumo de catequina, quercetina y vino tinto preservan la actividad de la paraoxonasa, enzima, asociada a las HDL o colesterol "bueno", que puede hidrolizar y regenerar lípidos oxidados en las LDL. Otros polifenoles inhiben oxigenasas celulares y por tanto la producción de especies oxidantes del oxígeno y del nitrógeno dentro del cuerpo humano. Quercetina y sus glicosidos inhiben la oxidación de las LDL inducida por lipoxigenasa. Catequina, epicatequina, epigalocatequina, epicatequin galato y epigalocatequin galato inhiben la producción de radicales libres por inhibición de la xantino oxidasa hepática.

Cada polifenol actuará por uno o más de estos mecanismos según sus propiedades particulares. En contraste con muchas frutas y verduras, cada una rica en uno o dos polifenoles en particular, en el vino hay muchos polifenoles diferentes. La gran variedad de polifenoles que posee el vino tinto y sus diversas características estructurales, posibilitan distintas propiedades de solubilidad y su acción como antioxidante para combatir distinto tipo de agentes oxidantes que se generan *in vivo*. Lo anterior, sumado a la capacidad de algunos polifenoles de inhibir o activar enzimas específicas en el organismo contrarias a la oxidación, explica las evidencias epidemiológicas relativas al consumo de polifenoles antioxidantes como protectores de enfermedades crónicas que hoy son la preocupación principal de la salud pública mundial.

En el Apartado 2.3, se encuentran detallados una descripción de los polifenoles estudiados.

1.4. Método Quimiométrico (PCA)

El método quimiométrico más utilizado para el estudio de las propiedades de los vinos a partir de los datos obtenidos experimentalmente es el PCA o también llamado ACP, análisis por componentes principales.

El Análisis por Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible.

Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí.

Un aspecto clave en ACP es la interpretación de los factores, ya que ésta no viene dada a priori, sino que será deducida tras observar la relación de los

factores con las variables iniciales (habrá, pues, que estudiar tanto el signo como la magnitud de las correlaciones).

1.5. Método analítico

El método analítico de separación utilizado en este proyecto para la determinación de polifenoles es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Es difícil definir rigurosamente el término de cromatografía, ya que se ha aplicado ese nombre a varios sistemas y técnicas. Sin embargo, todos esos métodos tienen en común el uso de una fase estacionaria y una fase móvil.

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmiscible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

1.5.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución. (HPLC)

La Cromatografía líquida de alta eficacia o High performance liquid chromatography (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. También se la denomina a veces Cromatografía líquida de alta presión o High pressure liquid chromatography (HPLC), aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las substancias analizadas y la columna cromatográfica.

Básicamente es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector.

El compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones

químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía.

Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

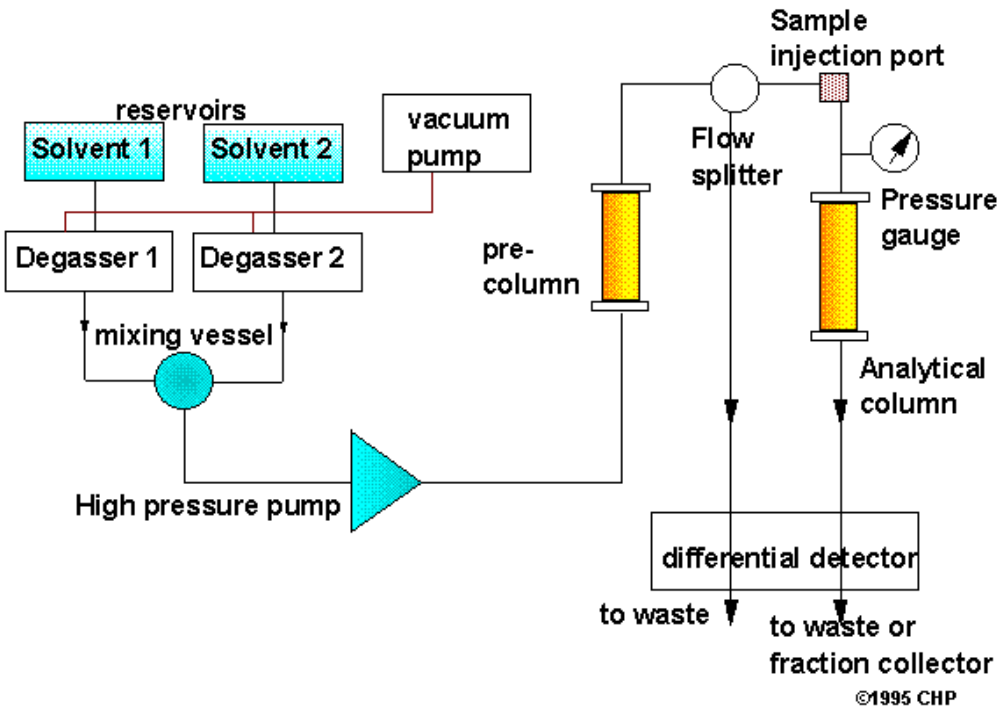


Figura 1.Diagrama Básico de un sistema de HPLC

Existen varios tipos de HPLC:

- Cromatografía de fase normal
- Cromatografía de fase inversa
- Cromatografía de intercambio iónico
- Cromatografía de bioafinidad

En este proyecto se usa la cromatografía de fase inversa:

Este tipo de HPLC es el más común. En esta técnica se usa una fase estacionaria no polar y una fase móvil moderadamente polar.

La fase estacionaria típica es silicio tratado con RMe2SiCl, donde R es una cadena lineal con un grupo alcalino.

La adición de disolventes polares incrementa el tiempo de retención y añadir disolventes hidrofóbicos lo disminuyen. El tiempo de retención es mayor para moléculas no polares.

El principio básico de este método está basado en las interacciones del disolvente polar, el analito no polar y la fase estacionaria no polar.

Las características del analito son importantes para sus propiedades de retención. Las moléculas muy grandes pueden causar que la interacción no sea completa. El tiempo de retención aumenta con el área hidrofobicidad, que es inversamente proporcional al tamaño del soluto. Los componentes ramificados eluyen más rápido porque el área total esta disminuida.

Hay otros modificadores de la fase móvil que afectan a la retención del analito. Añadir sales inorgánicas causa incremento lineal en la tensión superficial de soluciones acuosas, incrementando el tiempo de retención.

El pH también es importante porque modifica la hidrofobia del analito. Por eso se suele usar un buffer como fosfato sódico para controlar el pH. Un ácido orgánico como ácido fórmico o ácido trifluoracetico. Sirven para muchas cosas, controlan el pH, neutralizan cualquier carga residual del silicato en la fase estacionaria y actúa como formador de pares iónicos para neutralizar la carga del analito. Los efectos varían pero aumentan la calidad de la cromatografía.

Las columnas de fase inversa son más difíciles de dañar que las normales. Algunas consisten en silicatos alcalinos y nunca se deben usar con sales acuosas, destruirían el silicato. Pueden ser usados con ácidos acuosos, pero no durante mucho tiempo, pueden corroer metal. El metal debe estar en bajo contenido para que la separación de sustancias sea mejor.

Cromatografía de exclusión por tamaño:

También conocida como cromatografía de gel permeante o cromatografía de gel filtrante. Separa las partículas en función del tamaño.

Es una cromatografía de baja resolución y sirve para determinar estructuras terciarias y cuaternarias de proteínas y es la técnica común para averiguar el peso molecular de polímeros sintéticos y naturales.

CAPÍTULO 2.

PARTE EXPERIMENTAL

En este capítulo se hace una descripción del equipo utilizado.

Se describen también brevemente los reactivos y patrones que se ha manipulado a lo largo del proyecto.

2.1. Equipo utilizado

Los equipos utilizados durante este estudio han sido los siguientes:

- Cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 series equipado con bomba cuaternaria G1311A, desgasificador de vacío G1379A, detector de diodos en serie G1315B equipado con una celda de flujo de 13 µL y detector de fluorescencia G1321A. La inyección es automática mediante Agilent Technologies 1200 series G1329B.
- Columna cromatográfica Synergi Hydro-RP C-18 (150mm·4,6 mm d.i) y 4 µm de diámetro de partícula de Phenomenex con una precolumna C18 (4mm·3mm d.i) de la misma casa.

Figura 2. HPLC Agilent 1100.

2.1.1. Método utilizado

Antes de pasar a analizar las muestras de vino se han realizado unos estudios previos con la finalidad de optimizar el método analítico.

- Estudio de filtrado de las muestras de análisis con diferentes filtros.
- Usando diferentes fases móviles acuosas, como Ác. Fórmico al 1%, Ác. Fórmico al 0,1%, Ác. Fórmico al 0,1% y Ác. Ortofosfórico 9mM.
- Usando diferentes fases móviles orgánicas, como Metanol y Acetonitrilo (ACN).
- Usando diferentes variaciones en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como *elución en gradiente.*

Estos estudios se encuentran detallados en el Capítulo 3.

Con los resultados de los estudios previos se decide que el método más adecuado para identificar los polifenoles es:

- Fase móvil acuosa: disolución de ácido fórmico al 0,1%.
- Fase móvil orgánica: metanol 100%.
- Las muestras serán los diferentes vinos.
- El gradiente usado es el VI 55 con un post time de 5 minutos.
- El caudal durante todo el proceso es de 1mL/min.

Es importante que tanto las muestras como la fase móvil se filtren antes de ser analizadas.

Antes del primer análisis del día, es necesario realizar una purga. Dicha purga se hace de la siguiente manera: Se abre la purga, se aumenta el caudal a 5ml·min^{-1} y se pone un 100% del eluyente B durante unos 4-5 min aproximadamente, se baja el caudal a 0ml·min^{-1}, a continuación se cambia el tanto por ciento y se pone 100% del eluyente A, solución tampón, durante otros 4-5 min, el caudal se vuelve a bajar a 0 y por último, se ponen las condiciones iniciales de trabajo, (5% B, 95% A) durante dos minutos, se baja el caudal a 0 y se cierra la purga. Volvemos a poner el caudal en condicione iniciales de trabajo, 1ml·min^{-1}.

A partir de aquí ya se puede poner la muestra o preparar la secuencia.

Cada muestra se pone en un vial de HPLC, previamente filtradas (con un filtro de 45 µm y la ayuda de una jeringuilla de 2 ml) El vial tienen una capacidad de 1,5 ml, se recomienda llenarlos de 1 a 1,5 ml para garantizar que hay muestra suficiente. En el software se puede determinar cuánto volumen inyectara para hacer el análisis, se indica 20 µL de cada vino.

La detección se ha realizado a diferentes longitudes de onda para el detector UV-visible: 280 nm, 320 nm, 360 nm, y 520 nm. En el detector de fluorescencia se registra la intensidad de fluorescencia cuando la longitud de onda de excitación es 260 nm y las de emisión de 360 y 420 nm.

Para el tratamiento de datos se ha usado el software suministrado por el fabricante, HP ChemStation.

2.2. Reactivos

Consideraremos como reactivos todo compuesto químico utilizado tanto para la preparación de las muestras de análisis para su análisis, como los reactivos necesarios por el equipo (HPLC) para el análisis de dichas muestras.

Las fichas de seguridad de los reactivos utilizados se encuentran en el ANEXO I.

2.2.1. Agua Milli-Q (Millipore sistema milli-Q Gradient)

El agua ultrapura (Tipo I) que resulta idónea para las aplicaciones críticas de laboratorio debe satisfacer una serie de características comunes mínimas, tales como un nivel de resistividad de 18,2 MegaOhmios.cm a 25° C y un nivel de COT (carbono orgánico total) inferior a 10 ppb.

Existen varios modelos de equipos que proporcionan agua ultra pura, para este proyecto se ha usado el equipo: "Millipore sistema milli-Q Gradiente"

El sistema Milli-Q Gradient emplea un proceso de purificación de tres etapas. Un módulo de purificación Q-Gard adaptado al tipo de agua de alimentación lleva a cabo la purificación inicial a fin de optimizar el rendimiento de los medios posteriores. La segunda etapa es un módulo de ultrapurificación Quantum específico para la aplicación y diseñado para eliminar los contaminantes iónicos y orgánicos hasta niveles de trazas. La purificación final la realiza el filtro Millipak de 0,22 µm, que elimina las bacterias y las partículas de tamaño superior a 0,22 µm.

Además, está dotado de una etapa de foto-oxidación UV diseñada para reducir las sustancias orgánicas a niveles inferiores a 5 ppb a fin de optimizar los resultados cromatográficos y aumentar el tiempo de vida de las columnas.

La radiación UV se genera mediante una potente lámpara de vapor de mercurio a baja presión (17 vatios), construida en cuarzo ultrapuro para garantizar una transmisión óptima de luz UV a 185 y 254 nm. Una carcasa de acero inoxidable 316 L electropulidoa proporciona el máximo reflejo de luz UV para lograr la eficacia óptima.

La longitud de onda de 254 nm también actúa como un eficaz tratamiento germicida que mantiene los niveles bacterianos bajos dentro del propio sistema.

Figura 3. Millipore sistema milli-Q Gradient

2.2.2. Metanol (Panreac)

El compuesto químico metanol, también conocido como alcohol metílico o alcohol de madera, es el alcohol más sencillo. A temperatura ambiente se presenta como un líquido ligero (de baja densidad), incoloro, inflamable y tóxico que se emplea como anticongelante, disolvente y combustible. Su fórmula química es CH_3OH.

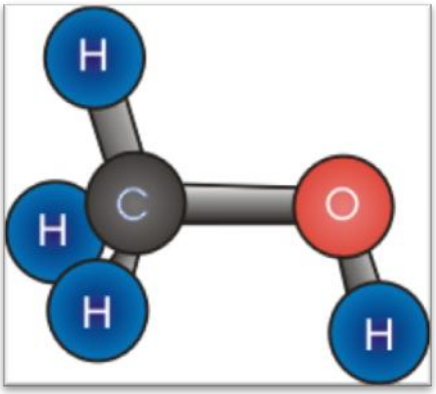


Figura 4. Fórmula estructural del Metanol.

2.2.3. Ácido Fórmico (Rïedel-de-Haën)

El ácido metanoico, también llamado ácido fórmico, es un ácido orgánico de un solo átomo de carbono, y por lo tanto el más simple de los ácidos orgánicos. Su fórmula es H-COOH (CH_2O_2), el grupo carboxilo es el que le confiere las propiedades ácidas a la molécula. Su base conjugada se ve estabilizada por dos estructuras de resonancia, favoreciendo su acidez.

El pKa del ácido fórmico es de 3,75. Teniendo en cuenta que el pH varía generalmente entre 0 y 14 (siendo 7 el pH neutro) podríamos decir que el fórmico, pese a ser un ácido de origen natural es relativamente fuerte.

Entre otras propiedades el ácido metanoico es un ácido líquido, incoloro, de olor irritante, con punto de ebullición de 100,7 °C y de congelación de 8,4 °C y es completamente soluble en agua pues su cadena carbonada es muy corta y fácilmente ionizable.

En el agua el ácido metanoico se disocia, reaccionando de la siguiente manera:

$$HCOOH + H_2O \rightarrow HCOO^- + H_3O^+$$

Cuando se manipule ácido fórmico hay que hacerlo con guantes, ya que este en contacto con la piel produce rápidamente ampollas dolorosas que se revientan y sangran.

Este ácido es el que inyectan las hormigas al morder. De ahí el nombre de fórmico (del latín formica, hormiga).

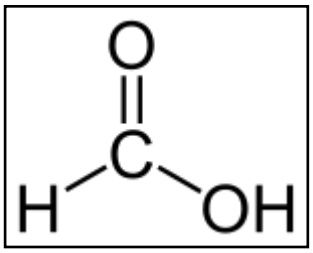


Figura 5. Fórmula estructural del Ácido fórmico.

2.2.4. Acetonitrilo (Panreac)

El acetonitrilo es el compuesto químico con formula CH_3CN. Este líquido incoloro es el nitrilo orgánico más simple. Se produce principalmente como un subproducto de la fabricación del acrilonitrilo. Se utiliza como disolvente polar aprótico (tipo de disolvente que no dan ni aceptan protones) en la purificación del butadieno. En el laboratorio, se utiliza como disolvente de medio-polaridad que sea miscible con agua y tenga una gama líquida conveniente. Con un momento de dipolo de 3.84 , el acetonitrilo disuelve una amplia gama de compuestos iónicos y no polares y es útil como fase móvil en HPLC.

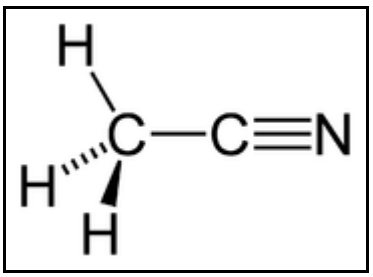


Figura 6. Fórmula estructural del Acetonitrilo.

2.3. Patrones de referencia

De todos los posibles polifenoles que pueden existir en los vinos vamos a centrar nuestro estudio en la determinación de 23 polifenoles, para ello primero realizaremos un estudio previo con cada polifenol por separado.

De cada polifenol usando el método VI55 (ver método pág. 64) realizaremos un cromatograma, para poder determinar cuál es su tiempo de retención y así poder identificarlo posteriormente en una muestra de vino.

Se usa como fase móvil Ácido fórmico 0,1% y como fase estacionaria Metanol 100%.

De todas las longitudes de onda que nos permite ver el HPLC, tomaremos para este caso, solo el cromatograma obtenido a 280 nm, ya que será suficiente para determina el tiempo de retención de cada polifenol.

Las fichas de seguridad de cada polifenol se encuentran en el ANEXO I.

Preparación de las muestras de análisis

Se preparan unas soluciones madre de cada polifenol a una concentración de 1mg/mL (se preparan 5 mL de cada patrón) diluidas en Metanol. Estas soluciones madre se almacenan en nevera 2-8 ºC excepto el Reveratrol y Fisetin que se almacenan congelados a -20±5 ºC.

Las muestras para ser inyectada en el HPLC se preparan añadiendo al vial del HPLC:

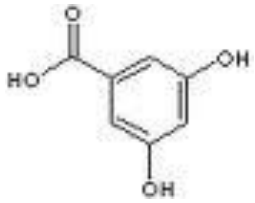
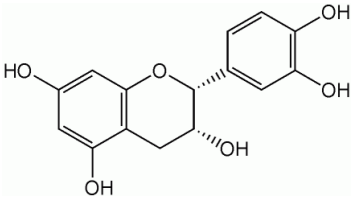
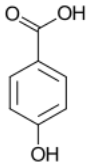
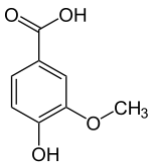
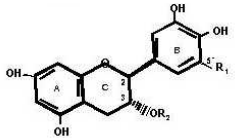
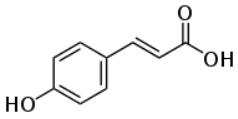
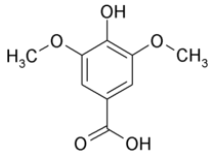
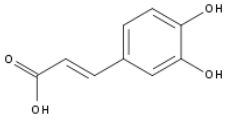
- 200 µL polifenol y 800µL agua milli-Q
- 50 µL polifenol y 950 µL agua milli-Q

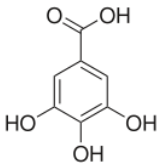
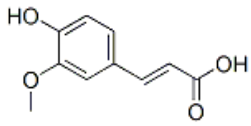
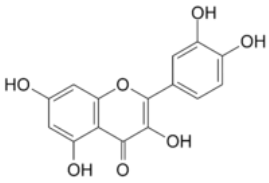
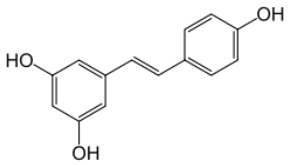
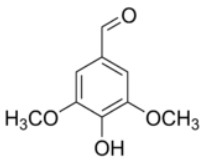
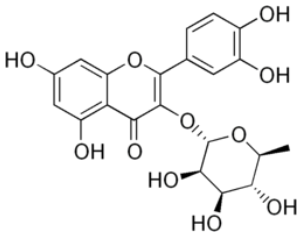
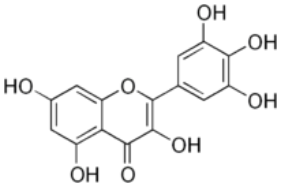
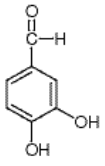
La diferencia de volumen del polifenol añadida en cada caso, no afecta al tiempo de retención de cada polifenol, ya que un aumento de la concentración de la muestra objeto de estudio en la solución a analizar solo afecta a que el área del pico obtenido será mayor cuanto mayor es la concentración del polifenol.

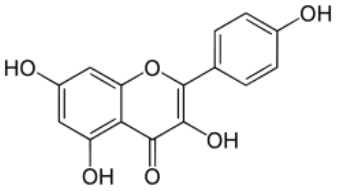
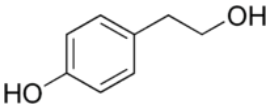
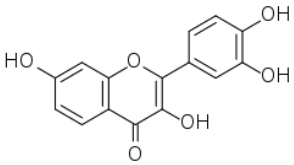
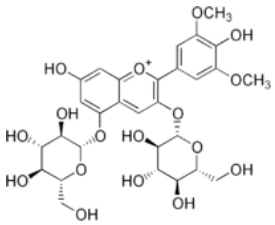
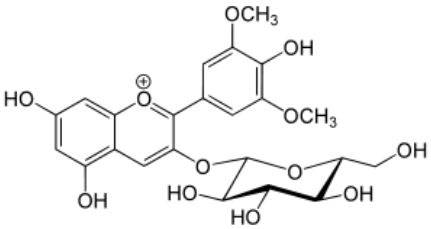
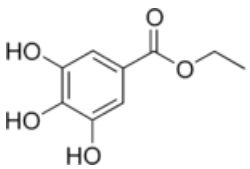
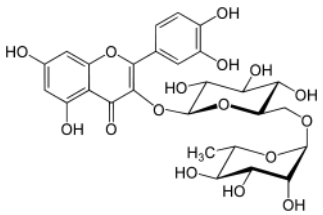
Tabla resumen tiempos de retención

A continuación se representa las tablas resumen de los tiempos de retención correspondientes a cada polifenol.

Tabla 1.Tiempos de retención.

Polifenol	**Fórmula**	**Tiempo retención (Lámparas nuevas)**
3,4-dihidroxibenzoico		8,732
Epicatequina		13,618
Ácido 4-hidroxibenzoico		12,089
Ácido vanílico		13,615
Catequina hydrato		10,951
Ácido cumárico		16,972
Ácido siríngico		14,357
Ácido cafeico		13,731

Ácido gálico		5,597
Ácido trans-ferúlico		17,648
Quercetin hidrato		23,306
Resveratrol		20,653
Siringaledehído		15,780
Quercetrina hidrato		21,333
Miricetina		21,030
3,4-dihidroxibenzaldehido		10,601

Kaemferol		23,944
Tirosol		11,153
Fisetin		21,909
Malvin chloride		-
Oenin chloride		-
Galato de etilo		15,588
Rutina hidrato		19,657

2.3.1. acido 3,4-dihidroxibenzoico (Fluka Ref.37580)

Nº CAS [99-50-3]

Es uno de los seis isómeros que tiene el ácido dihiroxibenzoico.

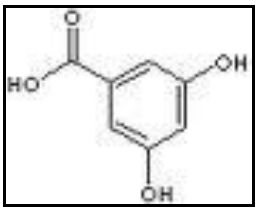


Figura 7. Fórmula estructural del ácido 3,4-dihidroxibenzoico.

Se suelen utilizar en la industria farmacéutica y perfumería. La propiedad destructiva del metabolismo del oxígeno que contienen derivados del ácido benzoico, como el ácido 3,4-hidroxibenzoico (ácido protocatéquico) se utiliza en la aplicación de los productos farmacéuticos, se usa como un agente anticancerígeno. Es un catabolito de la epinefrina.

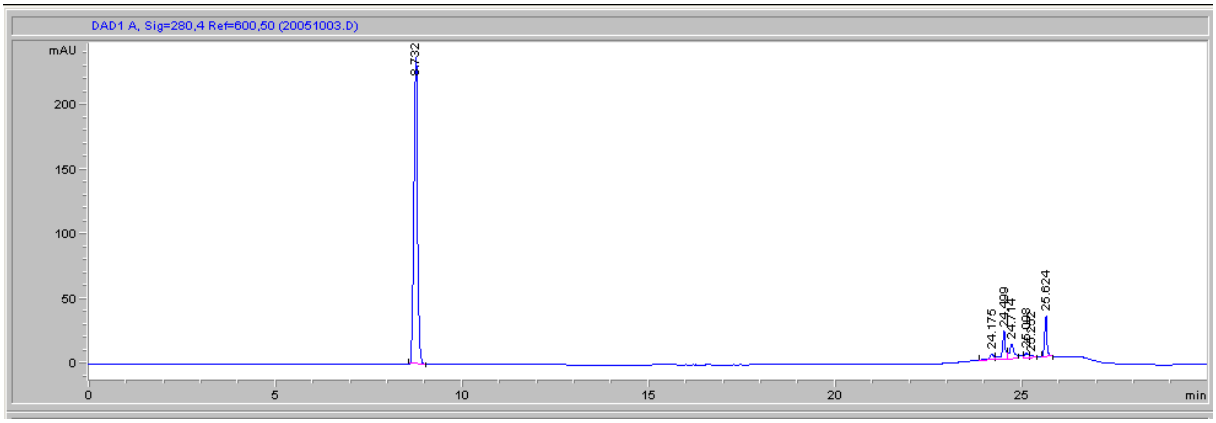


Figura 8. Cromatograma acido 3,4-dihidroxibenzoico.

2.3.2. Epicatechin (Sigma-aldrich Ref.E1753)

Nº CAS [490-36-0]

Epicatequina es un potente antioxidante, imita la acción de insulina y mejora la salud del corazón.

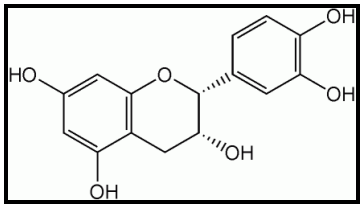


Figura 9. Fórmula estructural de la epicatequina.

Los estudios muestran que los flavonoides de la epicatequina y otros ejercen un papel protector sobre la fragilidad osmótica de las células, similar a la de la insulina. El mecanismo de acción de la epicatequina es diferente a la de la insulina y sigue siendo especulativa. La epicatequina en células rojas de la sangre de diabéticos provoca un aumento en la actividad de la acetilcolinesterasa. Esta actividad es significativamente menor en pacientes diabéticos tipo 2.

La Epicatequina reduce la peroxidación lipídica e inhibe la agregación plaquetaria.

La epicatequina causa la dilatación de los vasos sanguíneos mediante el control de óxido nítrico, una molécula secretada por el endotelio de los vasos sanguíneos que rodean a la señal de los músculos de que se relajen.

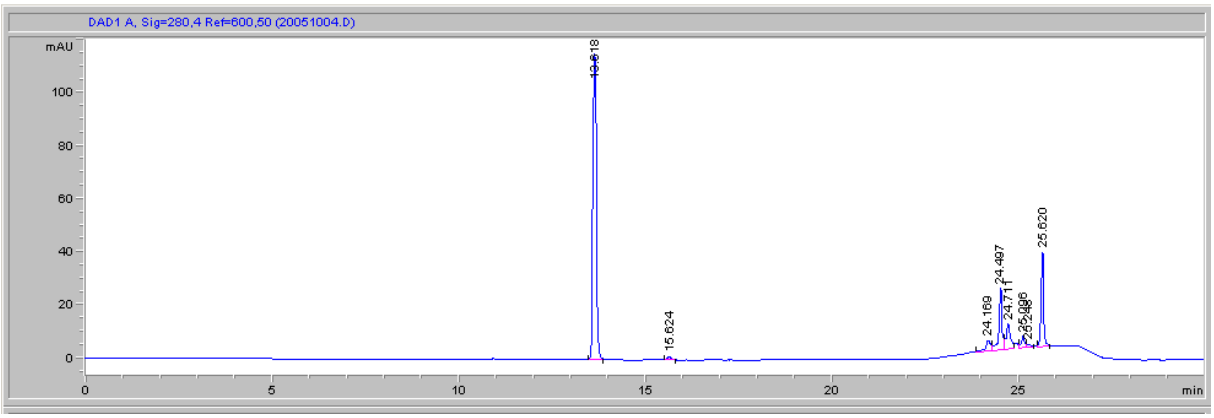


Figura 10. Cromatograma Epicatequina.

2.3.3. 4-Hydroxybenzoic acid (Sigma-aldrich Ref.H2005-9)

Nº CAS [99-96-7]

Ácido 4-hidroxibenzoico o ácido para-hidroxibenzoico es un isómero del ácido salicílico (el isómero orto).

Los parabenos son ésteres del 4-ácido hidroxibenzoico, también llamado p-ácido hidroxibenzoico o para-ácido hidroxibenzoico, de donde deriva su nombre. Los parabenos más usuales son metilparabeno (methylparaben, Número E E218), etilparabeno (ethylparaben, E214), propilparabeno (propylparaben, E216) y butilparabeno (butylparaben). Parabenos menos comunes son isobutilparabeno (isobutylparaben), isopropilparabeno (isopropylparaben), bencilparabeno (benzylparaben) y sus sales.

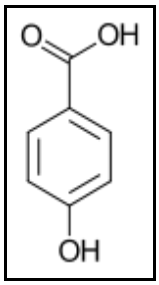


Figura 11. Fórmula estructural del ácido 4-hidroxibenzoico.

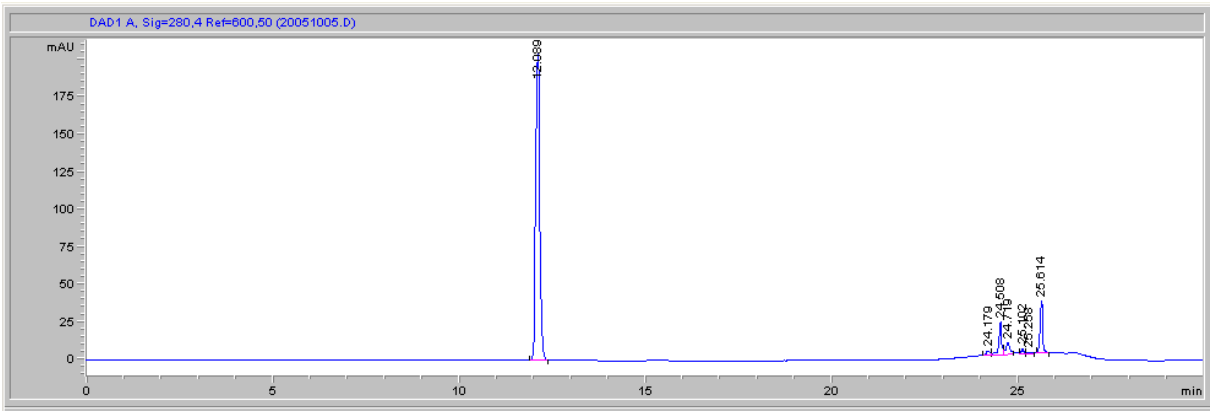


Figura 12. Cromatograma Ácido 4-hidroxibenzoico.

2.3.4. Vanillic acid (Fluka Ref.94770)

Nº CAS [121-34-6]

ácido vanílico (-hidroxi-3-metoxibenzoico ácido 4) es un ácido benzoico derivado utilizado como aromatizante. Se trata de un oxidado forma de vainillina .

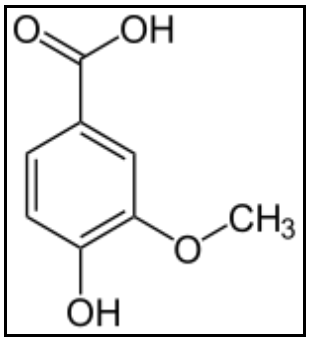


Figura 13. Fórmula estructural del ácido vanílico.

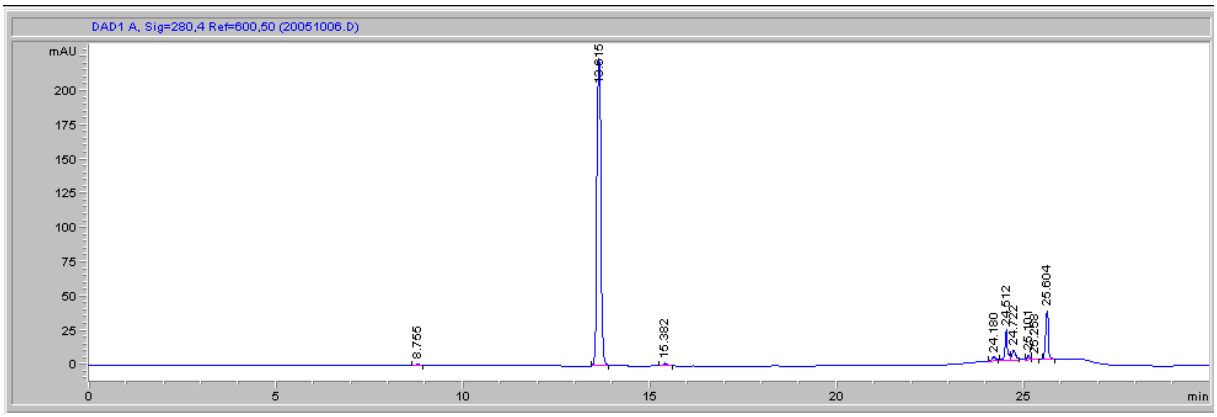


Figura 14. Cromatograma Ácido Vanílico.

2.3.5. Catechin hydrate (Fluka Ref.22110)

Nº CAS [225937-10-0]

Las Catequinas, reconocidos por poseer una potente actividad antioxidante, pueden proporcionar efectos beneficiosos para la salud protegiendo el cuerpo de los efectos perjudiciales de daño oxidativo de los radicales libres. Existen evidencias de que los polifenoles del Té Verde y en específico las Catequinas pueden:

- Mejorar el funcionamiento del sistema inmune
- Coadyuva a reducir el colesterol y los triglicéridos
- Favorece la pérdida de peso
- Anti-cancerígeno

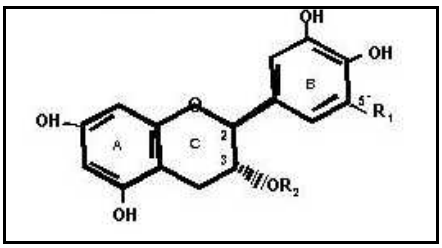


Figura 15. Fórmula estructural de catequina.

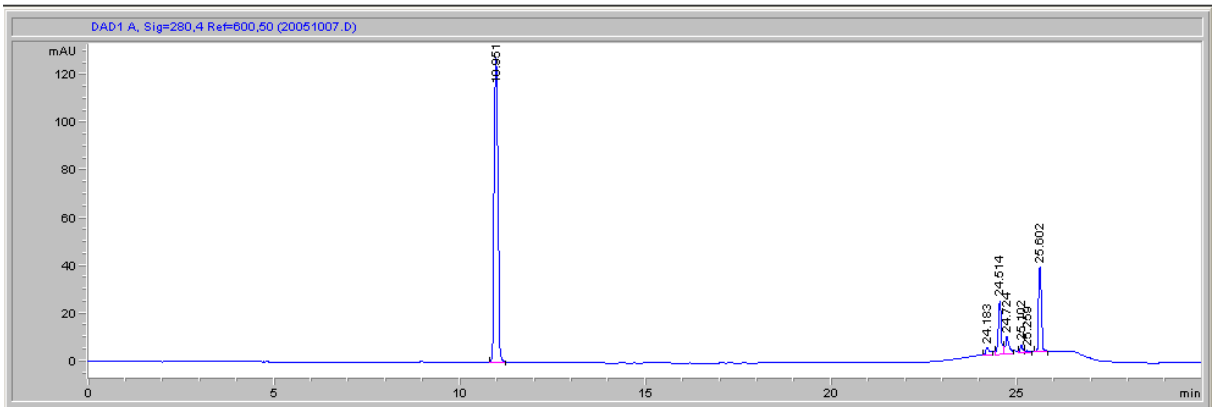


Figura 16. Cromatograma catequina hidrato.

2.3.6. P-Coumaric acid (Sigma-aldrich Ref.C9008)

Nº CAS [501-98-4]

Los ácidos cumárico son compuestos orgánicos que son hidroxi derivados del ácido cinámico. Existen tres isómeros , ácido o-cumárico, ácido m-cumárico y ácido p-cumárico, que se diferencian por la posición de la sustitución del grupo hidroxi fenil. El ácido p-cumárico es el isómero más abundante de los tres en la naturaleza.

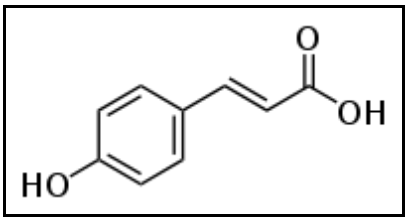


Figura 17. Fórmula estructural del ácido cumárico.

El ácido cumárico se puede encontrar en una gran variedad de plantas comestibles, tales como cacahuetes , tomates , zanahorias y ajo. Es un sólido cristalino que es levemente soluble en agua, pero también soluble en etanol y éter dietílico .

Tiene antioxidantes y se cree que tiene propiedades para reducir el riesgo de cáncer estómago, reduciendo la formación de carcinógenos nitrosaminas.

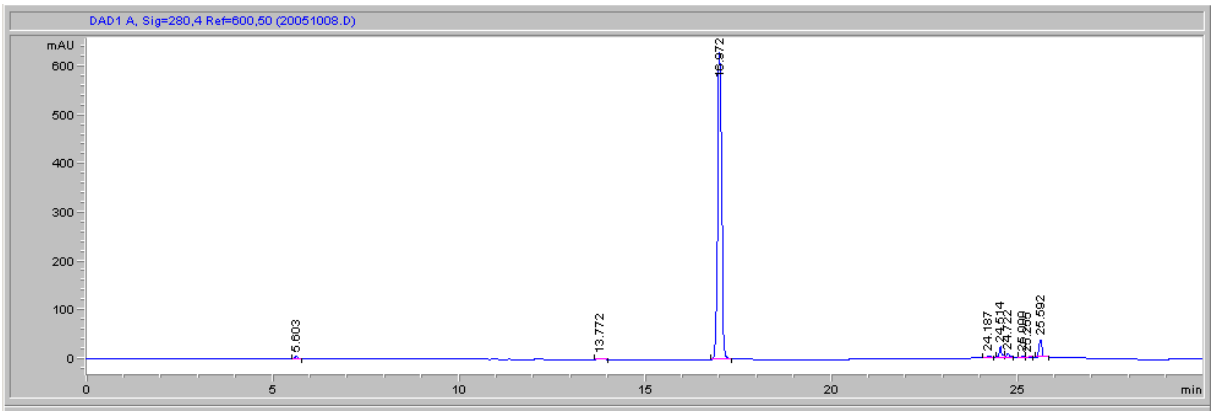


Figura 18. Cromatograma ácido cumárico.

2.3.7. Syringic acid (Fluka Ref.86230)

Nº CAS [530-57-4]

El ácido siríngico es un compuesto químico de origen natural. Se puede encontrar en la palma de açaí (Euterpe oleracea), en elliptica Ardisia. Su presencia en la bebida del antiguo Egipto pudo confirmar que fue hecho de la uva, como el ácido siríngico es liberado por la descomposición del compuesto malvidina.

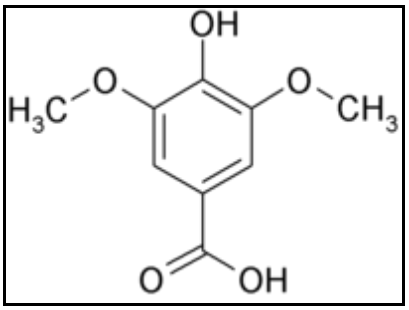


Figura 19. Fórmula estructural del ácido siríngico.

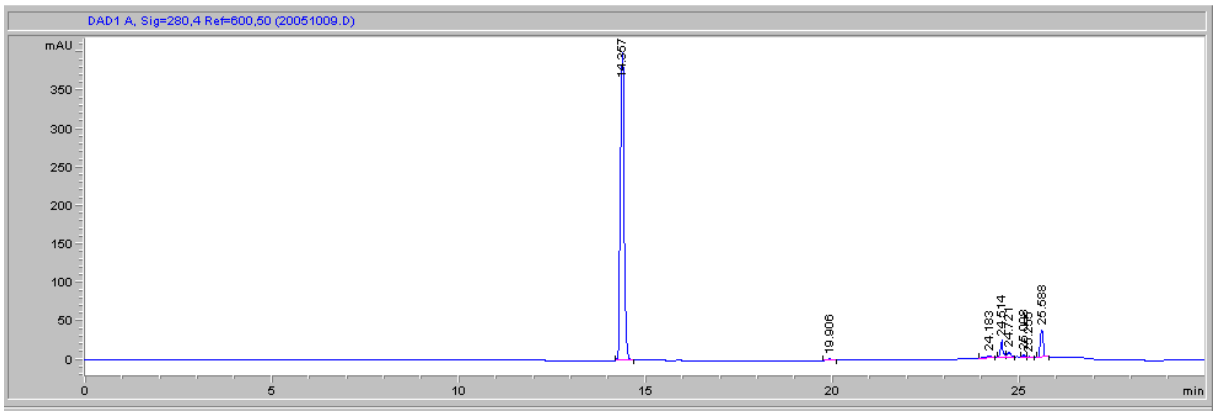


Figura 20. Cromatograma ácido siríngico.

2.3.8. Caffeic acid (Sigma-aldrich Ref.C0626)

Nº CAS [331-39-5]

El ácido cafeico es uno de origen natural compuesto orgánico. Este sólido amarillo se compone de dos fenólicas y acrílicas grupos funcionales. Se encuentra en todas las plantas, ya que es un intermediario clave en la biosíntesis de la lignina , una de las principales fuentes de biomasa .

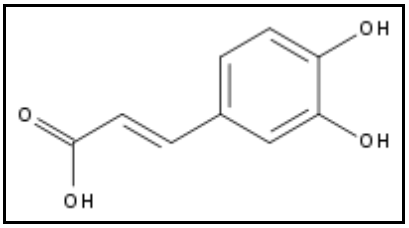


Figura 21. Fórmula estructural del ácido cafeico.

El ácido cafeico se ha demostrado que inhiben la carcinogénesis , aunque otros experimentos muestran los posibles efectos cancerígenos. También es conocido como un antioxidante in vitro y in vivo . El ácido cafeico y también se muestra como antiinflamatorio y actividad inmunomoduladora.

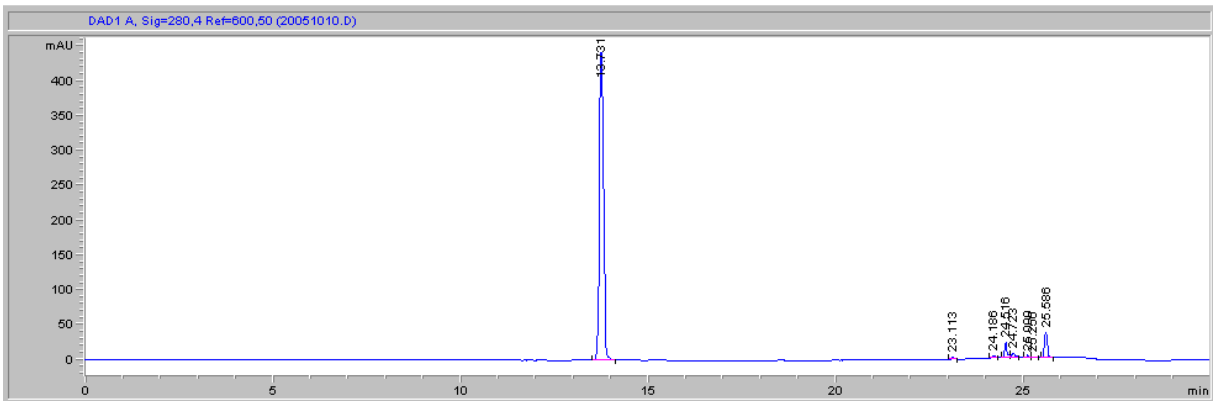


Figura 22. Cromatograma ácido cafeico.

2.3.9. Gallic acid (Sigma-aldrich Ref.G7384)

Nº CAS [149-91-7]

El ácido gálico es un ácido orgánico, también conocido como 3,4,5-trihidroxi ácido benzoico , que se encuentra en gallnuts , zumaque , hamamelis , hojas de té, corteza de roble, y otras plantas. El ácido gálico se encuentra libre y como parte de los taninos . Sales y ésteres del ácido gálico se denominan galatos .

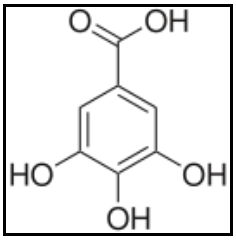


Figura 23. Fórmula estructural del ácido gálico.

El ácido gálico se utiliza comúnmente en la industria farmacéutica. Se utiliza como un estándar para la determinación del fenol contenido de varios analitos por el ensayo de Folin-Ciocalteau , los resultados son reportados en equivalentes de ácido gálico. El ácido gálico también puede ser utilizado como material de partida en la síntesis del alcaloide psicodélico de mescalina.

El ácido gálico parece tener propiedades anti-hongos y anti-virales. Ácido gálico actua como un antioxidante y ayuda a proteger nuestras células contra el daño oxidativo. El ácido gálico se encontró que muestran citotoxicidad contra las células cancerosas, sin dañar las células sanas. El ácido gálico se utiliza como astringente a distancia en los casos de hemorragia interna. El ácido gálico se utiliza también para tratar la albuminuria y la diabetes. Algunos ungüentos para tratar la psoriasis y hemorroides externas contienen ácido gálico.

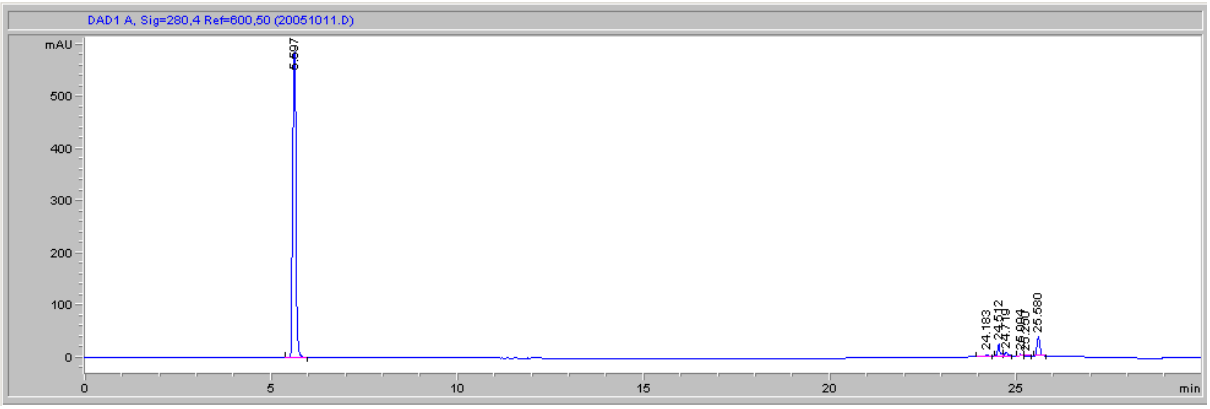


Figura 24. Cromatograma ácido gálico.

2.3.10. Trans-ferulasaure (Sigma-aldrich Ref.128708)

Nº CAS [537-98-4]

El ácido ferúlico es un antioxidante se encuentra naturalmente en las paredes celulares vegetales, hojas y semillas Una buena cantidad de ácido ferúlico se encuentra en la avena, arroz integral, trigo, maní, manzanas y piñas.

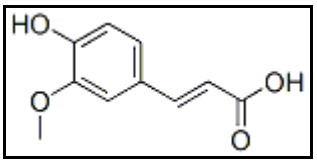


Figura 25. Fórmula estructural del ácido trans-ferúlico.

Se hace a partir del metabolismo de la fenilalanina y la tirosina. Se produce principalmente en las semillas y las hojas, tanto en su forma libre y unida covalentemente a la lignina y otros biopolímeros. Debido a su núcleo fenólicos y una conjugación de cadena lateral de tiempo, una forma fácilmente estabilizado por resonancia radical fenoxi que representa su potencial antioxidante. Absorción de rayos UV por el ácido ferúlico cataliza la formación de radicales fenoxi estable y, por ende potencia su capacidad para poner fin a las reacciones en cadena libre radical. En virtud de lo efectivamente eliminar los radicales nocivos y la supresión inducida por la radiación reacciones de oxidación, el ácido ferúlico puede servir una función antioxidante importante para preservar la integridad fisiológica de las células expuestas al aire y al incidir la radiación UV. Fotoprotección similares que brindan a la piel por el ácido ferúlico disuelto en lociones cosméticas. Su adición a los alimentos inhibe la peroxidación lipídica y el deterioro oxidativo posteriores. Por el mismo mecanismo que el ácido ferúlico puede proteger contra diversas enfermedades inflamatorias. Un número de otras aplicaciones industriales se basan en el potencial antioxidante del ácido ferúlico.

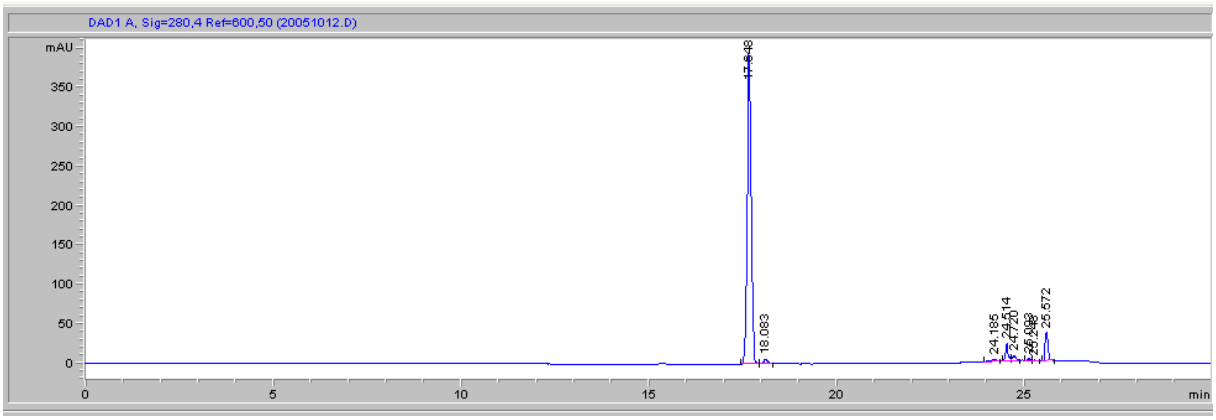


Figura 26. Cromatograma ácido trans-ferúlico.

2.3.11. Quercetinhydrate (Sigma-aldrich Ref.337951)

Nº CAS [6151-25-3]

La quercetina es un flavonol, flavonoides derivados de plantas, utilizado como suplemento nutricional. Los estudios de laboratorio muestran que podría tener propiedades anti-inflamatoria y anti-antioxidante y está siendo investigado por una amplia gama de beneficios potenciales para la salud.

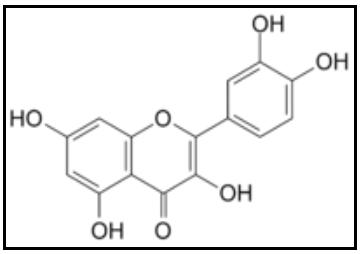


Figura 27. Fórmula estructural del Quercetin hidrato.

Estudios recientes han apoyado que la quercetina podría ayudar a hombres con prostatitis crónica, y tanto hombres como mujeres con cistitis intersticial, posiblemente debido a su acción como un mastocitos inhibidor.

La quercetina puede tener efectos positivos en la lucha contra o ayudar a prevenir el cáncer, prostatitis , enfermedad cardíaca , cataratas , alergias / inflamaciones y enfermedades respiratorias como la bronquitis. También se ha afirmado que tiene propiedades antidepresivas, sin embargo cualquier reclamación de acción contra la quercetina en enfermedades neurológicas deben ser tratadas con escepticismo por el hecho de que la quercetina es una neurotoxina in vitro.

También se ha afirmado que la quercetina reduce la presión arterial en pacientes hipertensos.

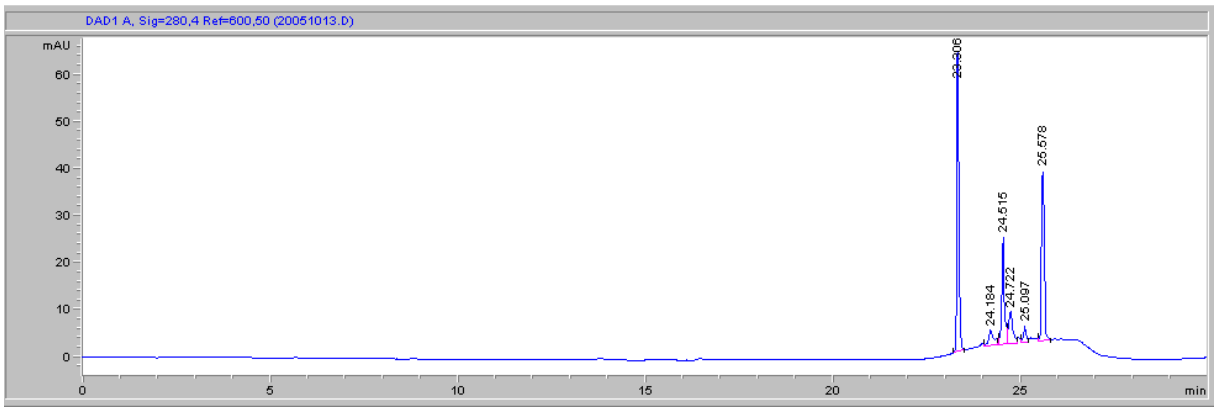


Figura 28. Cromatograma Quercetin hidrato.

2.3.12. Resveratrol (Sigma-aldrich ref.R5010)

Nº CAS [501-36-0]

El resveratrol (trans-resveratrol) es una fitoalexina producida naturalmente por varias plantas, cuando un ataque en virtud de agentes patógenos como las bacterias o los hongos .

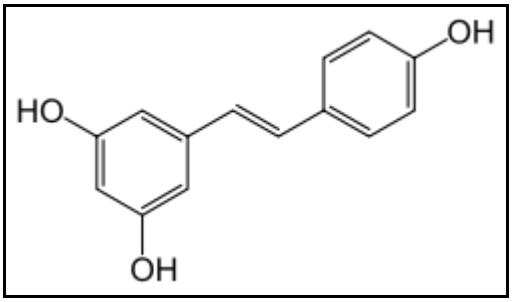


Figura 29. Fórmula estructural del Resveratrol.

El resveratrol es actualmente un tema de numerosos animales y estudios en seres humanos en sus efectos. Los efectos del resveratrol en la esperanza de vida de muchos organismos modelo siguen siendo controvertidos, con efectos inciertos en la moscas de la fruta, los gusanos nematodos y la duración corta del pescado. En experimentos con ratas y ratones, anti-cáncer, anti-inflamatorio, la capacidad bajar el azúcar y otros efectos beneficiosos cardiovasculares de resveratrol se ha informado. La mayor parte de estos resultados aún no se han replicado en los seres humanos. En el único ensayo en humanos positivos, ha sido necesaria una alta dosis (3-5 g) de resveratrol en una fórmula patentada para reducir significativamente azúcar en la sangre.

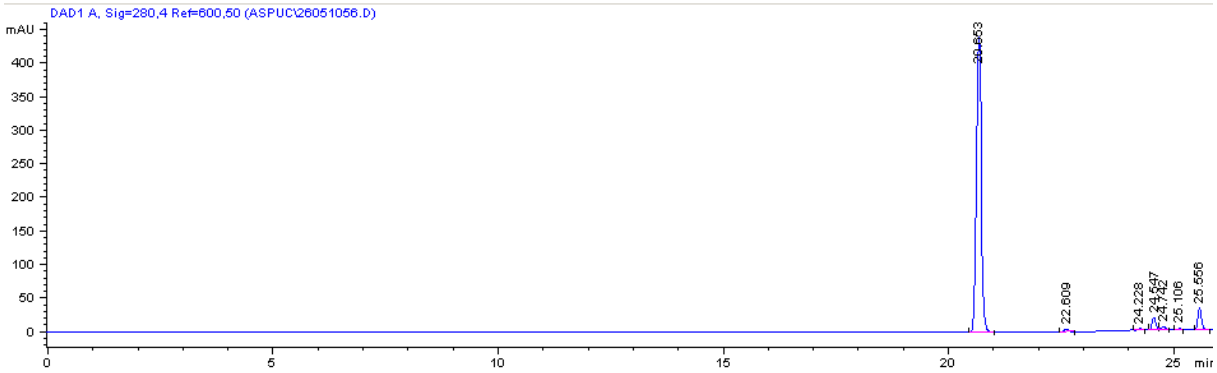


Figura 30. Cromatograma Resveratrol.

2.3.13. Syringaledehyd (Sigma-aldrich Ref.S7602)

Nº CAS [134-96-3]

Siringaldehído es una forma natural aromáticas aldehído soluble en alcohol . Algunas especies de insectos utilizan siringaldehído en sus sistemas de comunicación química.

Siringaldehído se encuentra naturalmente en la madera de abeto y los árboles de arce.

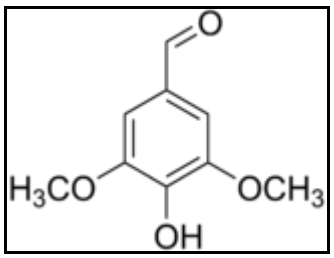


Figura 31. Fórmula estructural del Siringaldehido.

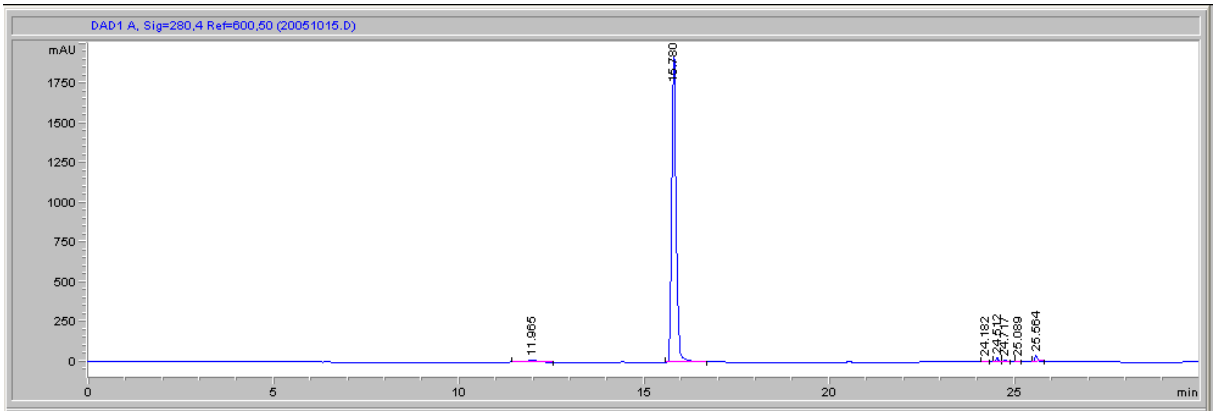


Figura 32. Cromatograma Siringaledehido.

2.3.14. Quercitrin hydrate (Sigma Ref. Q3001)

Nº CAS [522-12-3]

Quercetrina es un glucósido formado por los flavonoides quercetina y el azúcar desoxiramnosa. Es un componente de la tinta Quercitron

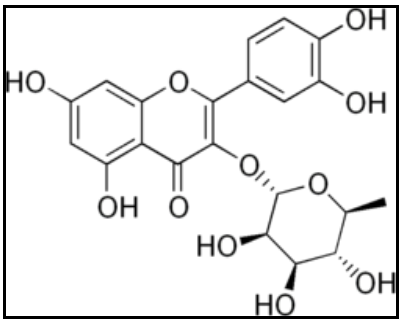


Figura 33. Fórmula estructural de la Quercetrina hidrato.

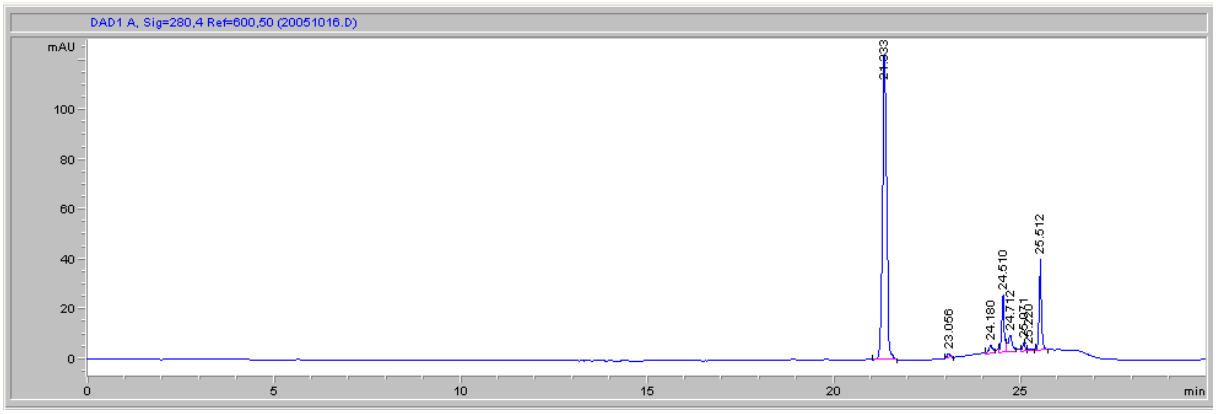


Figura 34. Cromatograma Quercetrina hidrato.

2.3.15. Myricetin (Sigma Ref.M6760)

Nº CAS [529-44-2]

Miricetina es una forma natural de flavonoles , un flavonoide encontrado en muchas uvas, bayas, frutas, verduras, hierbas, así como otras plantas. Las nueces son una fuente dietética rica. Es uno de los compuestos fenólicos presentes en el vino tinto.

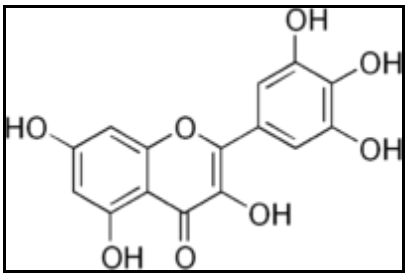


Figura 35. Fórmula estructural de la Miricetina.

Miricetina tiene propiedades antioxidantes. In vitro investigación sugiere que la miricetina en altas concentraciones puede modificar el colesterol LDL de forma que la captación por las células blancas de la sangre aumenta. Un estudio finlandés de alto consumo de miricetina correlaciona con tasas bajas de cáncer de próstata.

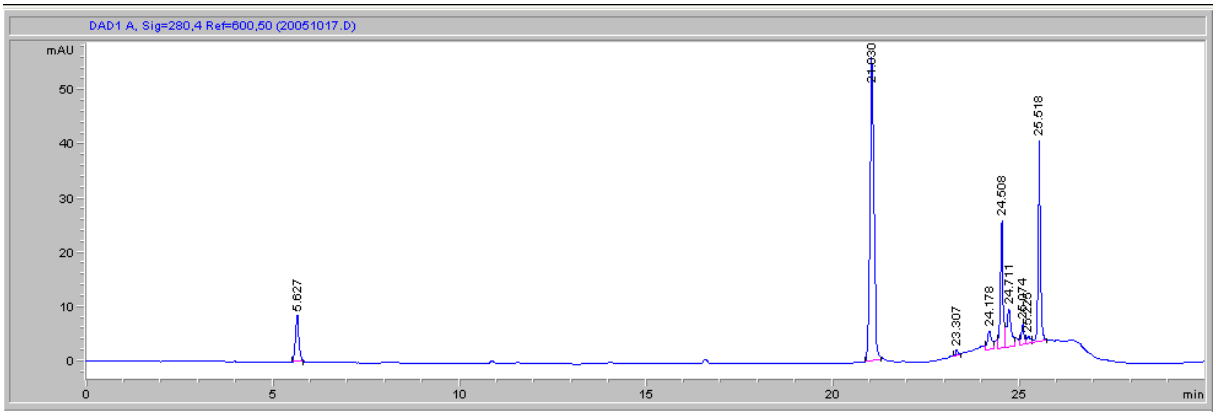


Figura 36. Cromatograma Miricetina.

2.3.16. 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (Sigma-aldrich Ref.D108405)

Nº CAS [139-85-5]

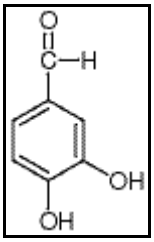


Figura 37. Fórmula estructural del 3,4-dihidroxibenzaldehido.

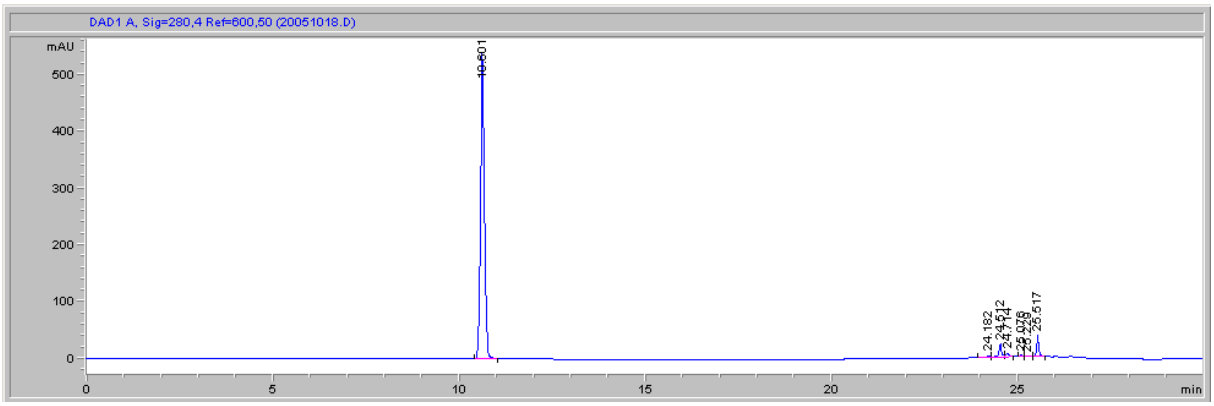


Figura 38. Cromatograma 3,4-dihidroxibenzaldehido.

2.3.17. Caempferol (Sigma-aldrich Ref.H0133)

Nº CAS [520-18-3]

Camferol es un natural de flavonoides que se ha aislado de té, brócoli, Espuela de Caballero, Hamamelis, pomelo, las coles de Bruselas, las manzanas y las plantas de otras fuentes. Camferol es un sólido cristalino amarillo con un punto de fusión de 276-278 ° C. Es levemente soluble en agua pero solubles en agua caliente etanol y éter dietílico .

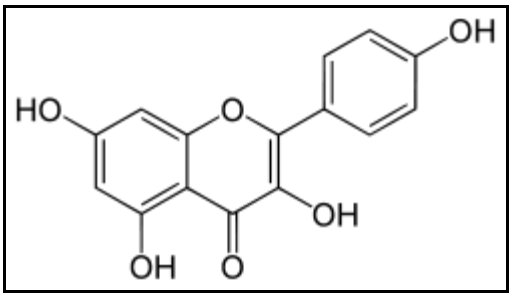


Figura 39. Fórmula estructural del Camferol.

Muchos glucósidos de caempferol, como kaempferitrin y astragalin , han sido aislados como productos naturales de las plantas. El consumo de Camferol en el té y el brócoli se ha asociado con un menor riesgo de enfermedad cardiaca.

Camferol es lo que da la flor de Acacia decurrens y Acacia longifolia su color. El compuesto tiene propiedades antidepresivas.

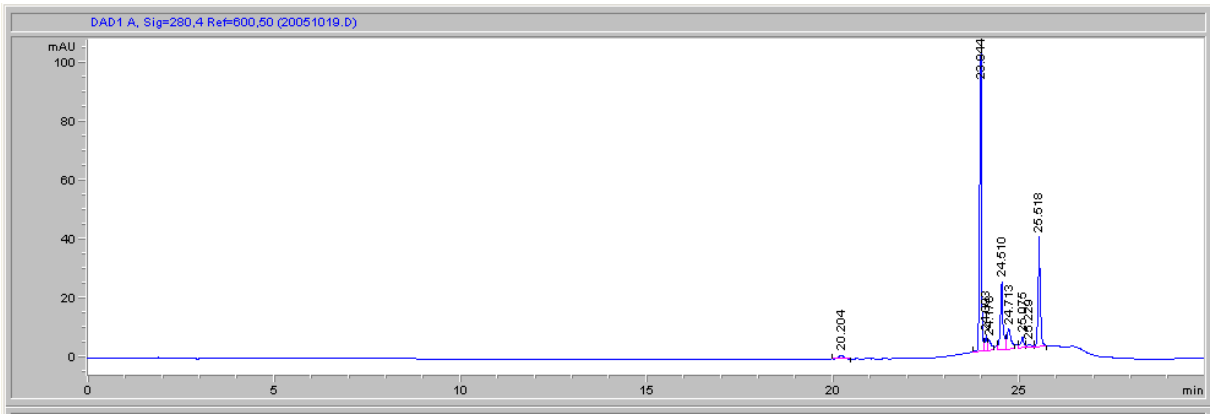


Figura 40. Cromatograma Camferol.

2.3.18. Tirosol (Fluka Ref.79058)

Nº CAS [501-94-0]

El tirosol es uno de los polifenoles (antioxidantes) que se han identificado dentro de los componentes tradicionales de la dieta mediterránea. Y está presente en al aceite oliva y en el vino.

El tirosol es un fuerte antioxidante, evitando la oxidación de los componentes que circulan por la sangre. Es importante entender que la oxidación de muchas moléculas de nuestro cuerpo las hace especialmente dañinas.

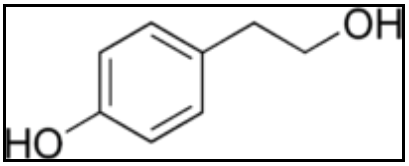


Figura 41. Fórmula estructural del Tirosol.

El tirosol, al ser un potente antioxidante, impide la oxidación del colesterol LDL, disminuyendo así la capacidad aterógenica de este. Esto es intersante ya que es posible que por el consumo de ciertos antioxidantes, como son el tirosol y la EGCG presente en el green tea, no se modifique la medición de la concentración de LDL en la sangre, pero sí su capacidad de producir un mayor daño.

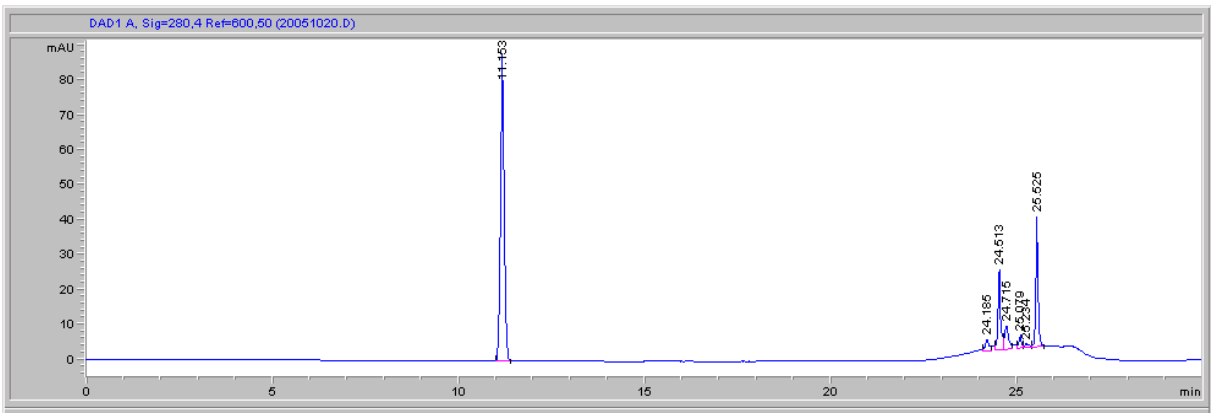


Figura 42. Cromatograma Tirosol.

2.3.19. Fisetin (Sigma-aldrich Ref.F4043)

Nº CAS [345909-34-4]

Fisetin es un flavonol , una sustancia química estructuralmente distinta a la que pertenece flavonoides del grupo de los polifenoles. Se encuentra en muchas plantas, donde actúa como un agente colorante.

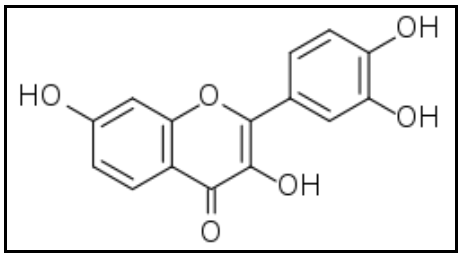


Figura 43. Fórmula estructural del Fisetin.

Fisetin es un potente activador sirtuin compuestos (STAC), un agente que modula las sirtuinas. Por lo tanto,genera una restricción calórica mimética, una droga que ha demostrado ser capaz de aliviar los efectos del envejecimiento en determinados organismos modelo como la levadura S. cerevisiae el nematodo C. elegansy la mosca de la fruta D. melanogasterue tales efectos puedan ser replicados en humanos es actualmente todavía no del todo claro y sigue siendo un tema de la investigación científica y el debate.Fisetin es un potente antioxidante . Su actividad antioxidante puede ser debido a sus propiedades estructurales. Aparte de sus efectos sobre el envejecimiento, diversas in vitro los estudios han demostrado que ejercer como anti- inflamatorios y anti- cancerígenos los efectos en las diferentes líneas de células de cultivo.

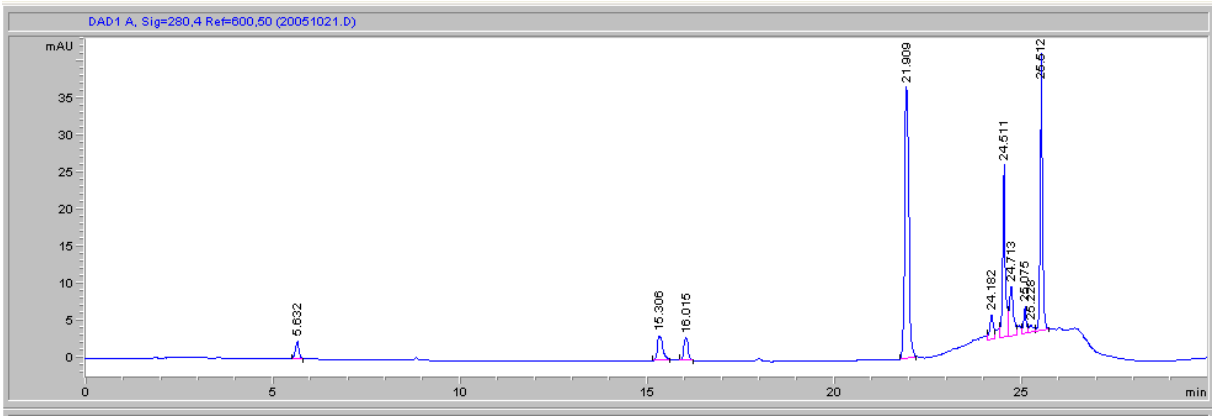


Figura 44. Cromatograma Fisetin.

2.3.20. Malvin chloride (Sigma-aldrich Ref.72815)

Nº CAS [16727-30-3]

Malvín es un compuesto natural químico de la antocianina familia. Se trata de un diglucósido de malvidina encuentra principalmente como un pigmento en hierbas como Malva, Primula y Rhododendron. Se puede encontrar en una variedad de alimentos comunes, incluyendo pero no limitado a lo siguiente:

- Verduras y hortalizas: rábano , tomate , nabo , patata , pimiento , guisantes de ojos negro , guisante verde , oliva (verde y negro), cebolla , berenjena , col , zanahoria , remolacha , aguacate , maíz
- Frutos secos: nueces , anacardos
- Especias: pimentón , semilla de mostaza , la canela
- Frutas: sandía , ruibarbo , fresa , membrillo , durazno , pera , ciruela , higo , uva (rojo y verde), manzana , albaricoque , plátano , moras , arándanos , frambuesa , cereza , arándano , grosella negro
- Peces: carne de cangrejo
- Lácteos: la albúmina (la leche de vaca), queso , yogur , mantequilla
- Azúcar: la remolacha azucarera , la miel

Malvín no es peligroso para ingerir a menos que uno desarrolle una alergia hacia él. Una alergia a malvin puede producir estreñimiento , grave gases , vómitos o diarrea cuando los alimentos que lo contienen son ingeridos en grandes cantidades

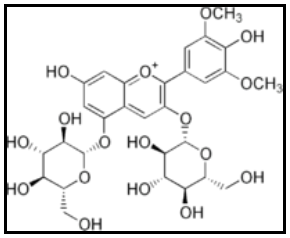


Figura 45. Fórmula estructural del Malvin chloride.

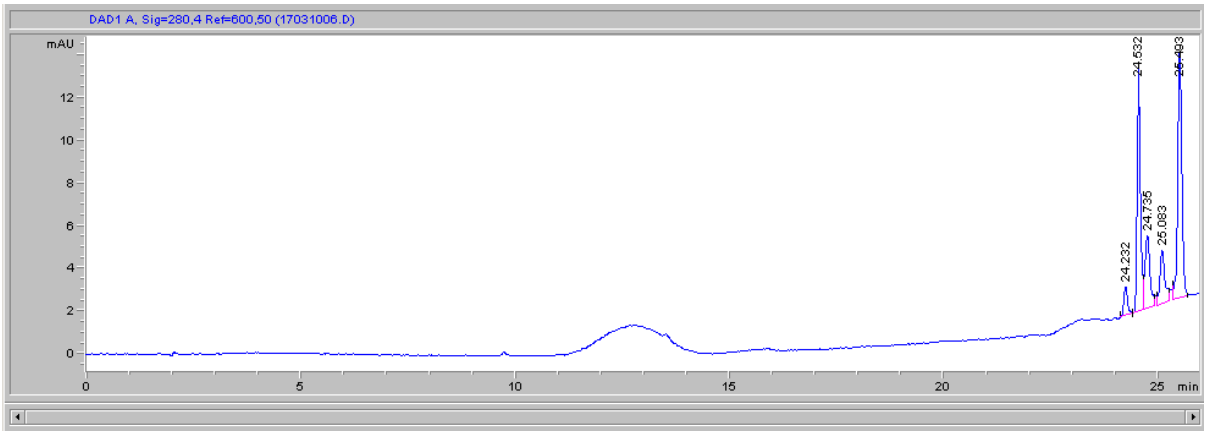


Figura 46. Cromatograma Malvin chloride.

Como la lectura del cromatograma no es buena despreciamos este polifenol y no lo detrminaremos en nuestras muestras de vino.

Para la determinación de este polifenol sería preciso aplicar otras técnicas analíticas.

2.3.21. Oenin chloride (Sigma-aldrich Ref.72813)

Nº CAS [7228-78-6]

Oenin es una antocianina. Es la 3 - glucósido de malvidina. Se puede encontrar en la piel de color morado uva.

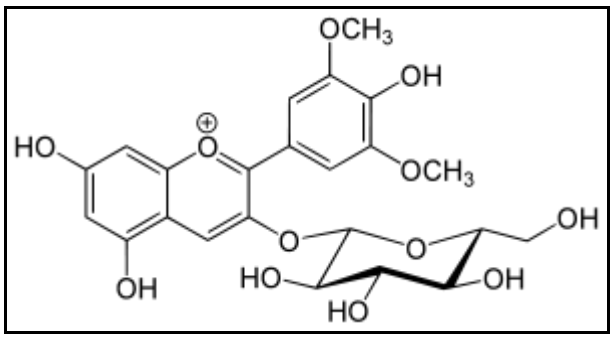


Figura 47. Fórmula estructural del Oenin chloride.

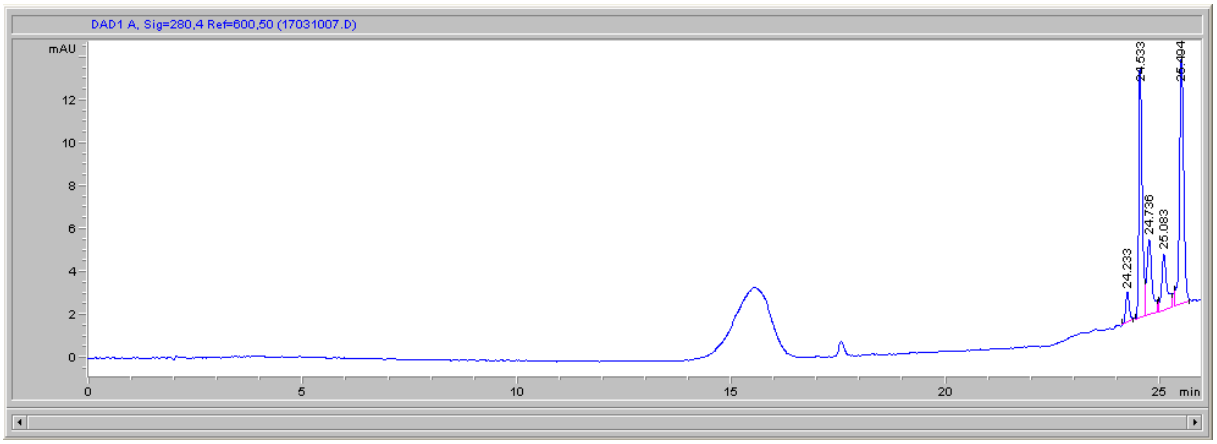


Figura 48. Cromatograma Oenin chloride.

Como la lectura del cromatograma no es buena despreciamos este polifenol y no lo detrminaremos en nuestras muestras de vino.

Para la determinación de este polifenol sería preciso aplicar otras técnicas analíticas.

2.3.22. Ethyl gallate (Sigma-aldrich Ref.48640)

Nº CAS [831-61-8]

Galato de etilo es un aditivo alimentario con el número E E313. Es el etil éster del ácido gálico. Galato de etilo, se añade a los alimentos como un antioxidante.

Aunque se encuentra naturalmente en una variedad de fuentes vegetales como nueces, el galato etílico es producido a partir de ácido gálico y el etanol.

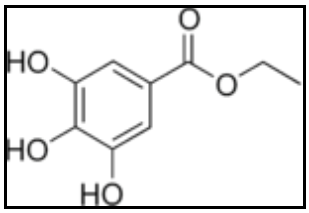


Figura 49. Fórmula estructural del Galato de etilo.

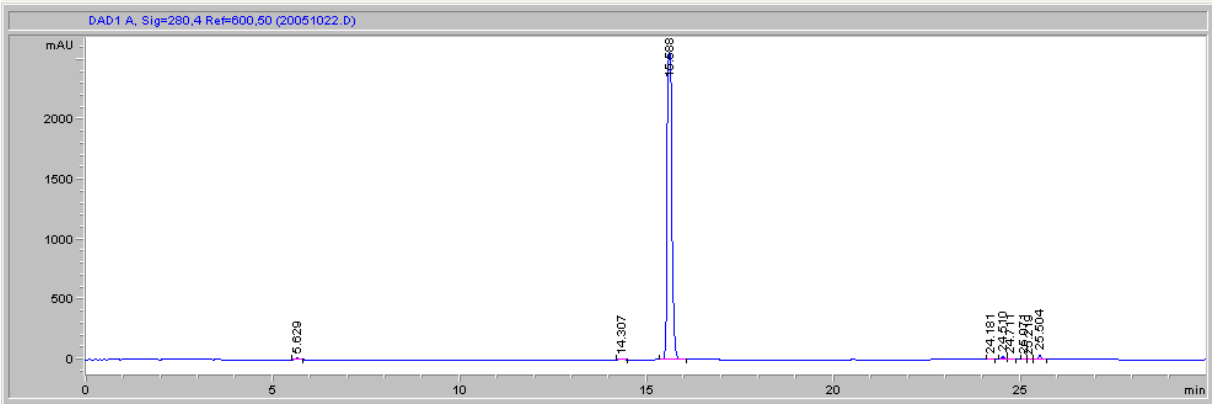


Figura 50. Cromatograma Galato de etilo.

2.3.23. Rutin hydrate (Sigma-aldrich Ref.R5143)

Nº CAS [207671-50-9]

La rutina, también llamado rutósido, quercetina-3-rutinósido y sophorin. La rutina se encuentra en trigo sarraceno, las hojas y los pecíolos de Rheum especies, los espárragos, el fruto de la Fava D'Anta árbol (de Brasil), frutas y cáscaras de frutas y bayas como moras y arándanos. A veces se conoce como vitamina P, aunque no es estrictamente una vitamina.

La rutina es el glucósido entre los flavonoles quercetina y el disacárido rutinose. La rutina puede ser creada por la unión de un disacárido sobre el grupo hidroxilo de quercetina.

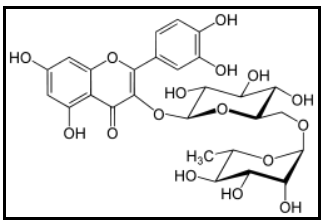


Figura 51. Fórmula estructural de la Rutina hidrato.

- La rutina inhibe las plaquetas de agregación, así como disminución de la permeabilidad capilar, haciendo que el diluyente de la sangre y la circulación mejora.
- La rutina inhibe la actividad de la aldosa reductasa. Aldosa reductasa es una enzima que normalmente está presente en el ojo y en otras partes del cuerpo.
- La rutina también refuerza los capilares, y, por tanto, puede reducir los síntomas de la hemofilia. La rutina, como el ácido ferúlico, puede reducir la citotoxicidad de oxidado colesterol LDL y disminuir el riesgo de enfermedades del corazón.
- También hay alguna evidencia de que la rutina se puede utilizar para tratar las hemorroides , várices , y microangiopatía.

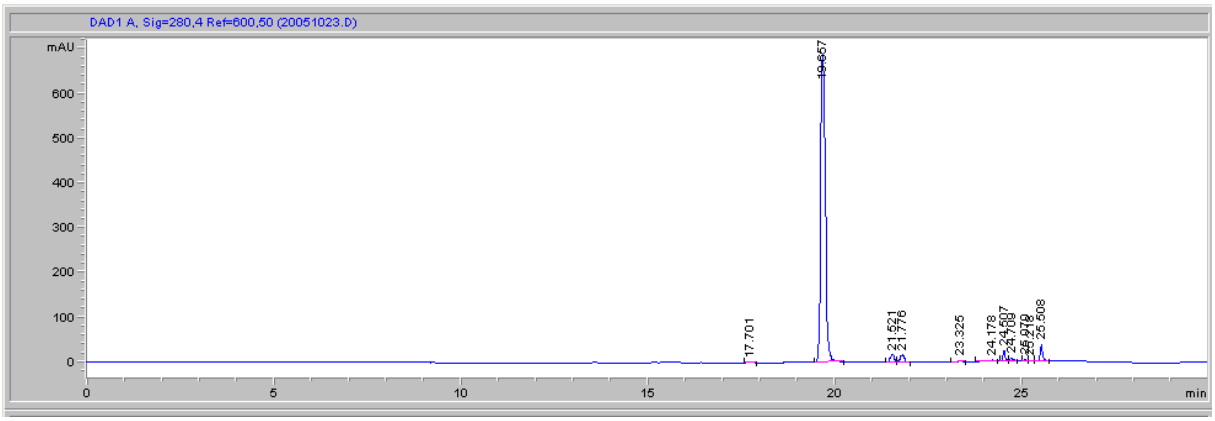


Figura 52. Cromatograma Rutina hidrato.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se detalla los estudios previos realizados antes de pasar a analizar las diferentes muestras de vino. A continuación se realiza el estudio de las muestras de vino objeto de este proyecto y se extran las conclusiones pertinentes.

3.1. Optimización del método analítico

Antes de realizar el ensayo con las muestras de vino se han realizado unos estudios previos con la finalidad de optimizar el método analítico.

El objetivo de esta optimización es conseguir que la separación entre los picos obtenidos en el cromatograma sea la mejor, ya que esto nos facilitará el poder identificarlos con mayor rapidez y facilidad. Pero también se busca poder reducir el tiempo de cada inyección, si necesitamos inyectar 50 muestras y podemos reducir el tiempo de inyección por muestras de 30 a 25 minutos estamos reduciendo 250 minutos, esto supone un ahorro no solo energético sino también supone gastar mucha menos fase móvil y fase estacionaria.

Cuando se desarrolla una técnica analítica por HPLC, normalmente se elige, en primer lugar, una fase estacionaria adecuada. Luego se selecciona una fase móvil, tipo de solvente y composición, de manera tal que disuelva los componentes a analizar y que permita una buena separación. Luego se optimizan las condiciones de flujo de solvente, cantidad de muestra a inyectar y, por último, se determinaran la/s longitud/es de onda de detección

Hay que tener también en cuenta como es la muestra objeto de análisis y si requiere ser tratada mediante métodos físicos, como puede ser el filtrado, antes de ser analizada.

A la hora de elegir los solventes hay que tener en cuenta:

- Disponible comercialmente
- Precio
- Pureza y Estabilidad. En la actualidad contamos con productos de calidad de pureza cromatográfica.
- Bajo contenido de impurezas.
- Disolver la muestra
- Miscible con otros solventes para formar mezclas útiles
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener baja viscosidad para reducir las caídas de presión
- Ser compatible con el detector utilizado. Transparencia óptica

3.1.1. Fase móvil orgánica

En este estudio se usa como fase móvil orgánica acetonitrilo en lugar de metanol, esto conlleva hacer también unos cambios en el método de análisis y en la forma de preparar las muestras de análisis.

Se determina el tiempo de retención de 17 polifenoles para poder determinar si se reduce considerablemente, lo que significaría una mejora para el método.

Este estudio se realizó al principio de la elaboración del proyecto y no se disponían de todos los polifenoles, se trabajó con los 17 primeros polifenoles.

- 3,4-dihidroxibenzoico
- Epicatequina
- Ácido 4-hidroxibenzoico
- Ac. Vanílico
- Catequina hydrato
- Ác. Cumárico
- Ác. Syríngico
- Ác. Caféico
- Ác. Gálico
- Ácido trans-ferúlico
- Quercetin hidrato
- Resveratrol
- Siringaledehído
- Quercitrina hidrato
- Miricetina
- 3,4-dihidroxibenzaldehido
- Caemferol

El método utilizado se denomina VIACN y es:

- Fase móvil acuosa: disolución de ácido fórmico al 1%.
- Fase móvil orgánica: Acetonitrilo (ACN) 100%.
- El caudal durante todo el proceso es de 0,9 mL/min.

Para este ensayo la preparación de las muestras se realiza tomando 10 µL de las disoluciones iniciales de cada polifenol, de concentraciones 1mg/mL y diluyéndolas hasta 1mL de volumen final con etanol al 10% en agua milli Q. La dilución de las muestras de análisis en este caso se realizan con etanol para poder compensar la cantidad de alcohol que llevan de por si las muestras de vino, ya que al usar ACN como fase móvil orgánica, esto podría distorsionar los resultados obtenidos.

Se programa un método de gradiente específico para este estudio:

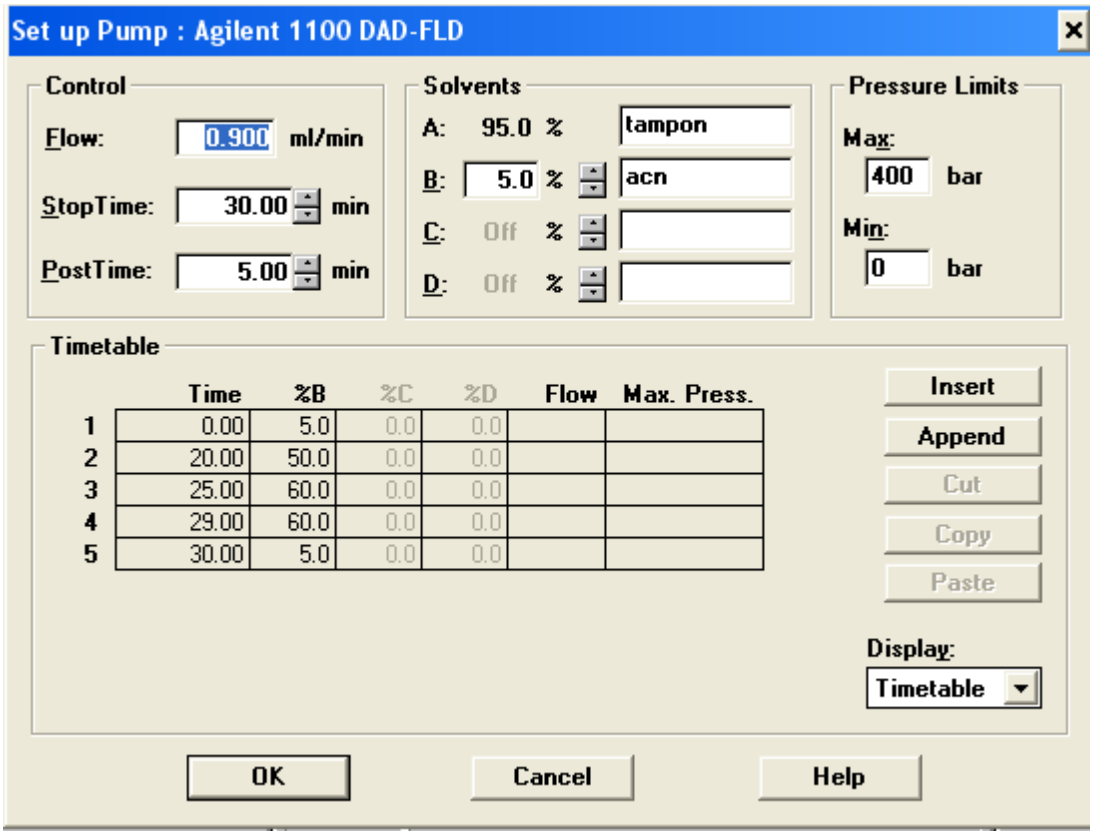


Figura 53. Método VIACN.

Se determina cuales son los tiempos de retención de cada uno de los 17 polifenoles usando ACN como fase estacionaria.

Los cromatogramas obtenidos para cada uno de los polifenoles usando ACN se encuentran en el ANEXO II (Capítulo 1.).

Tabla 2. Comparativa Tiempos de retención.

Polifenol	**Tiempo retención (ACN)**	**Tiempo retención (Metanol)**
3,4-dihidroxibenzoico	6,755	8,732
Epicatequina	9,533	13,618
Ácido 4-hidroxibenzoico	8,924	12,089
Ácido vanílico	9,715	13,615
Catequina hydrato	8,399	10,951
Ácido cumárico	11,985	16,972
Ácido siríngico	9,938	14,357
Ácido cafeico	9,721	13,731
Ácido gálico	4,532	5,597
Ácido trans-ferúlico	12,663	17,648
Quercetin hidrato	17,048	23,306
Resveratrol	15,778	20,653
Siringaledehído	12,182	15,780
Quercetrina hidrato	13,113	21,333
Miricetina	14,456	21,030
3,4-dihidroxibenzaldehido	8,394	10,601
Caemferol	19,655	23,944

El cromatograma obtenido para la mezcla de los 17 polifenoles con el método VIACN es:

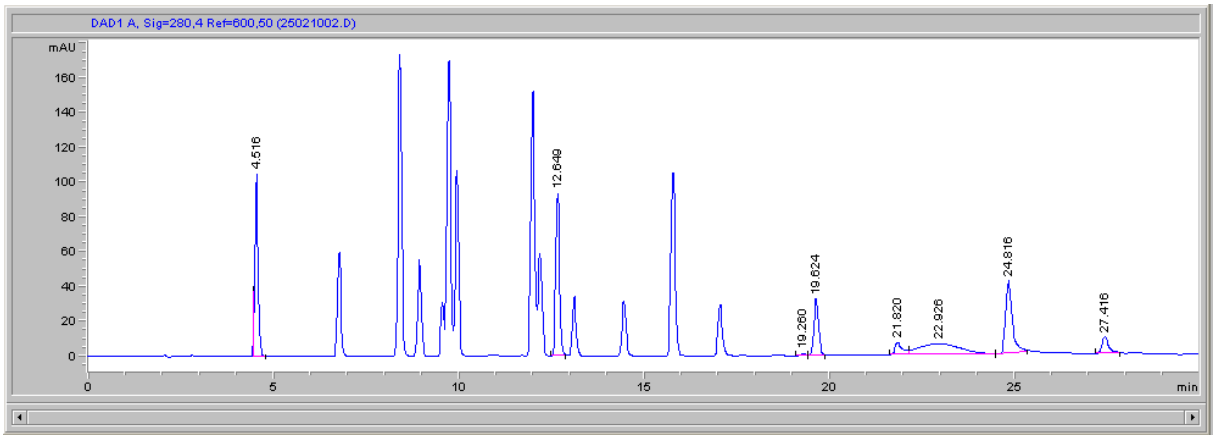


Figura 54. Cromatograma 17 polifenoles con método VIACN.

Si se compara el cromatograma de la mezcla de los 17 polifenoles usando ACN con el obtenido usando Metanol como fase móvil orgánica:

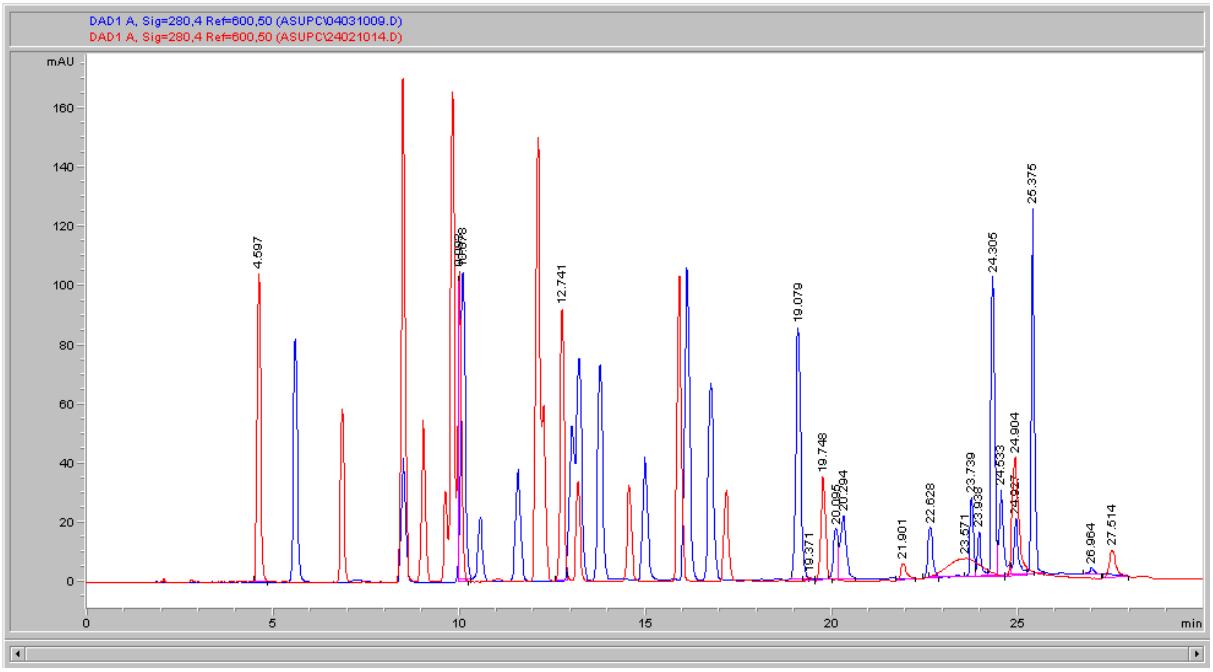


Figura 55. Cromatograma comparación 17 polifenoles con método VIACN (en rojo) y con Metanol (en azul)

Se observa que: usando como fase móvil orgánica ACN se adelantan los tiempos de retención de los polifenoles, pero no mejora mucho la separación de los polifenoles, por tanto teniendo en cuenta el coste tan elevado del ACN frente al del metanol no se considera que el beneficio de los resultados compense este gasto extra. Así que se decide realizar el estudio de las muestras de vino usando como fase móvil orgánica ACN.

3.1.2. Fase móvil acuosa

La fase móvil acuosa en la cromatografía de fase reversa es un disolvente polar. La fase móvil se mueve a través de la columna de cromatografía (fase móvil orgánica) de forma que la muestra interacciona con la fase móvil orgánica y se separa.

En este estudio se intenta establecer que concentración de fase móvil acuosa es la más adecuada para favorecer la separación de los componentes de la muestra.

En estudios previos ya realizados por otros compañeros que han trabajado en este proyecto se determinó que la fase móvil acuosa sería Ácido fórmico, en este proyecto se obtienen los cromatogramas de la mezcla de 17 polifenoles.

Este estudio se realizó al principio de la elaboración del proyecto y no se disponían de todos los polifenoles, se trabajó con los 17 primeros polifenoles.

- 3,4-dihidroxibenzoico
- Epicatequina
- Ácido 4-hidroxibenzoico
- Ac. Vanílico
- Catequina hydrato
- Ác. Cumárico
- Ác. Syríngico
- Ác. Caféico
- Ác. Gálico
- Ácido trans-ferúlico
- Quercetin hidrato
- Resveratrol
- Siringaldehído
- Quercitrina hidrato
- Miricetina
- 3,4-dihidroxibenzaldehido
- Caemferol

El método utilizado es:

- Fase móvil acuosa: disolución de ácido fórmico al 0,1%, 0,5% y 1%.
- Fase móvil orgánica: metanol 100%.
- El caudal durante todo el proceso es de 1mL/min.
- Gradiente fase móvil VI60.

La muestra será la mezcla de los 17 polifenoles.

Para la preparación de la mezcla de los polifenoles, se prepara una solución madre tomando 250µL de la disolución de cada polifenol a concentración 1mg/mL en metanol, preparadas inicialmente, y llevándolo a volumen final de 5mL con agua milli Q (es decir añadiendo 750 µL de agua milli Q).

La muestra a inyectar de los 17 polifenoles se prepara tomando 200 µL de la solución madre y añadiendo 800µL de agua milli Q al vial para inyectar.

Los cromatogramas obtenidos son:

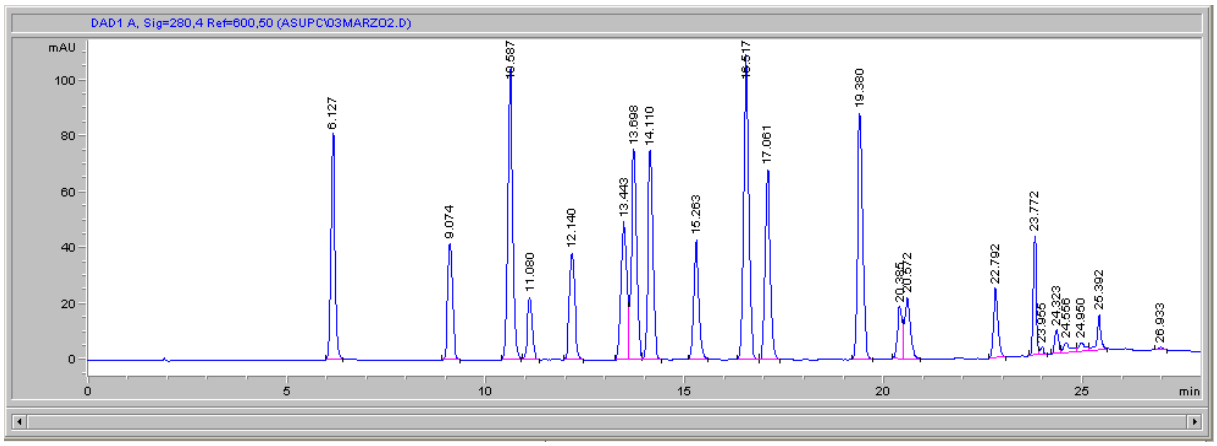


Figura 56. Mezcla 17 polifenoles con fase móvil Ác. Fórmico 0,1%.

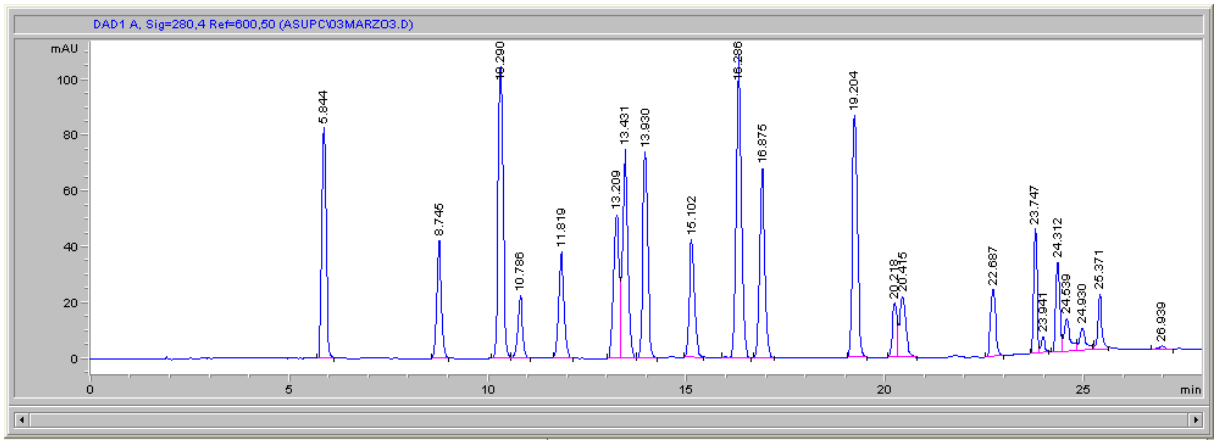


Figura 57. Mezcla 17 polifenoles con fase móvil Ác. Fórmico 0,5%.

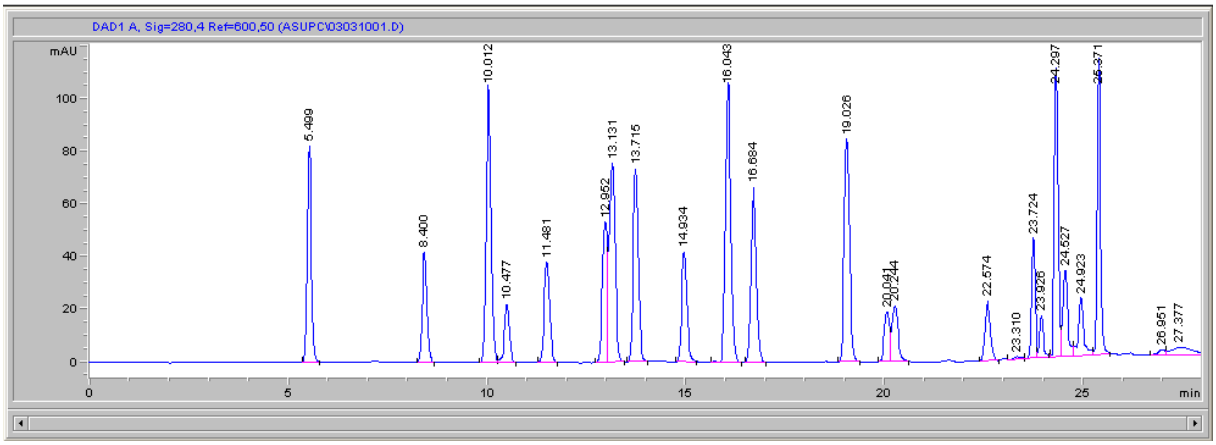


Figura 58. Mezcla 17 polifenoles con fase móvil Ác. Fórmico 1%.

Si se comparan los tres cromatogramas:

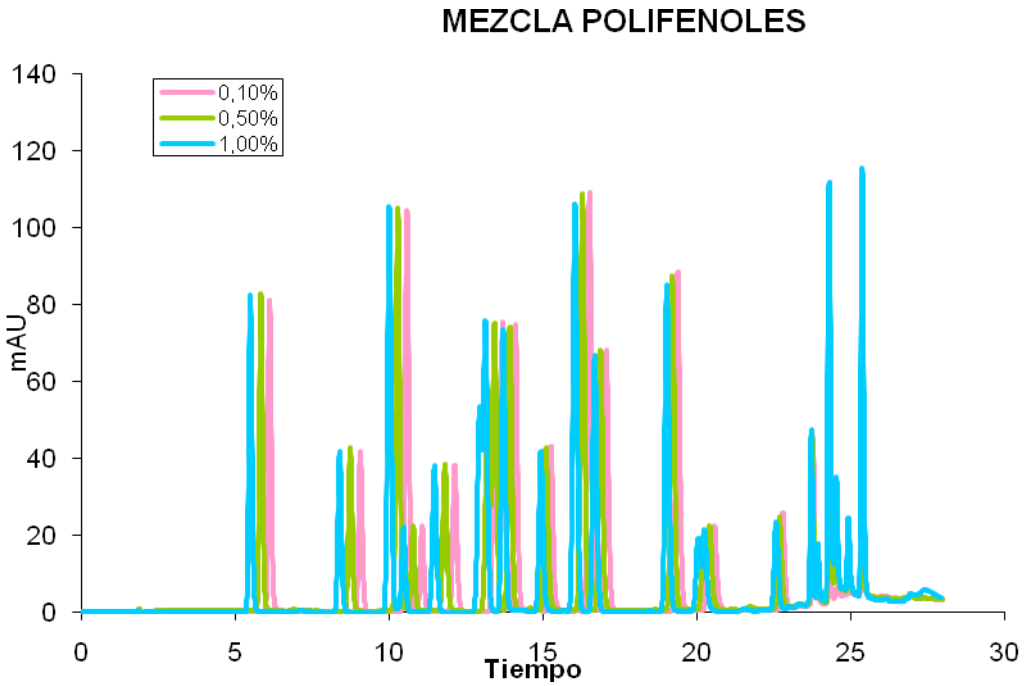


Figura 59. Comparación mezcla 17 polifenoles con diferentes % de fase móvil.

Se puede observar que la diferencia es inapreciable entre los tres cromatogramas, con Ác. Fórmico al 1% se reduce pero casi insignificablemente el tiempo de retención de los polifenoles, así que se decide realizar el análisis de las muestras de vino con Ác. Fórmico al 0,1%.

3.1.3. Elución en gradiente

Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de metanol y progresar de forma lineal hasta un 50% en 20 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil acuosa utilizada respecto a la afinidad por la fase móvil orgánica. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/metanol los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de metanol. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas por tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.

Este estudio se realizó al principio de la elaboración del proyecto y no se disponían de todos los polifenoles, se trabajó con los 17 primeros polifenoles.

- 3,4-dihidroxibenzoico
- Epicatequina
- Ácido 4-hidroxibenzoico
- Ac. Vanílico
- Catequina hydrato
- Ác. Cumárico
- Ác. Syríngico
- Ác. Caféico
- Ác. Gálico
- Ácido trans-ferúlico
- Quercetin hidrato
- Resveratrol
- Siringaldehído
- Quercitrina hidrato
- Miricetina
- 3,4-dihidroxibenzaldehido
- Caemferol

El método utilizado es:

- Fase móvil acuosa: disolución de ácido fórmico al 0,1%.
- Fase móvil orgánica: metanol 100%.
- El caudal durante todo el proceso es de 1mL/min.

La muestra será la mezcla de los 17 polifenoles.

Para la preparación de la mezcla de los polifenoles, se prepara una solución madre tomando 250µL de la disolución de cada polifenol a concentración 1mg/mL en metanol, preparadas inicialmente, y llevándolo a volumen final de 5mL con agua milli Q (es decir añadiendo 750 µL de agua milli Q).

La muestra a inyectar de los 17 polifenoles se prepara tomando 200 µL de la solución madre y añadiendo 800µL de agua milli Q al vial para inyectar.

Se han programados 4 gradientes distintos para determinar cual separa mejor la mezcla de los 17 polifenoles, con un *post time* de 5 minutos para asegurar las condiciones iníciales. (c. i 95% A y 5% B).

- Método VI 40

Tabla 3. Método VI 40.

Timetable

	Time	%B	%C	%D	Flow	Max. Press.
1	0.00	5.0	0.0	0.0		
2	20.00	40.0	0.0	0.0		
3	22.00	95.0	0.0	0.0		
4	27.00	95.0	0.0	0.0		
5	28.00	5.0	0.0	0.0		

- Método VI 50

Tabla 4. Método VI 50.

Timetable

	Time	%B	%C	%D	Flow	Max. Press.
1	0.00	5.0	0.0	0.0		
2	20.00	50.0	0.0	0.0		
3	22.00	95.0	0.0	0.0		
4	24.00	95.0	0.0	0.0		
5	25.00	5.0	0.0	0.0		

- Método VI 55

Tabla 5. Método VI 55.

Timetable

	Time	%B	%C	%D	Flow	Max. Press.
1	0.00	5.0	0.0	0.0		
2	20.00	55.0	0.0	0.0		
3	22.00	95.0	0.0	0.0		
4	24.00	95.0	0.0	0.0		
5	25.00	5.0	0.0	0.0		

- Método VI 60

Tabla 6. Método VI 60.

Timetable

	Time	%B	%C	%D	Flow	Max. Press.
1	0.00	5.0	0.0	0.0		
2	20.00	60.0	0.0	0.0		
3	22.00	95.0	0.0	0.0		
4	27.00	95.0	0.0	0.0		
5	28.00	5.0	0.0	0.0		

Se comparan los cromatogramas obtenidos para ver con que gradiente se separa mejor los polifenoles y permite reducir el tiempo de inyección de la muestra.

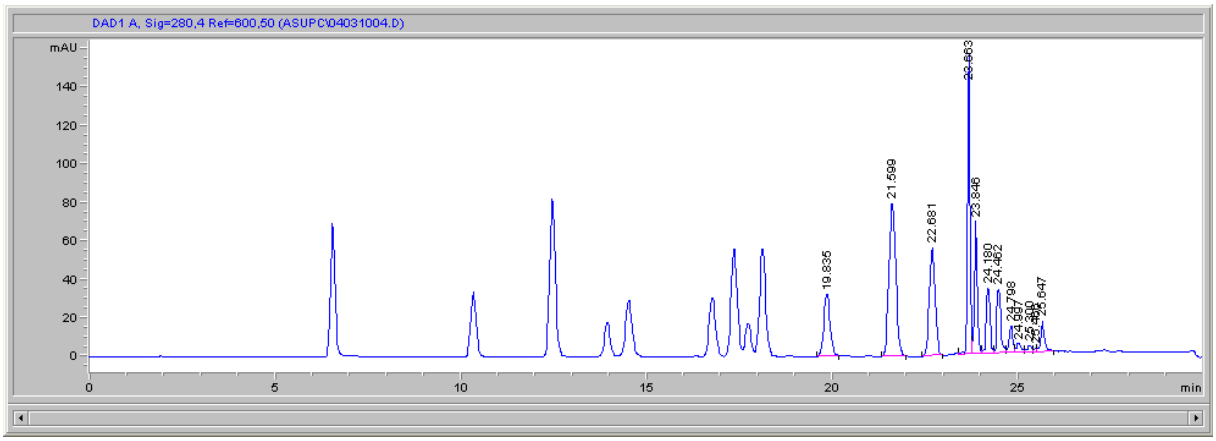


Figura 60. Cromatograma mezcla 17 polifenoles gradiente VI 40.

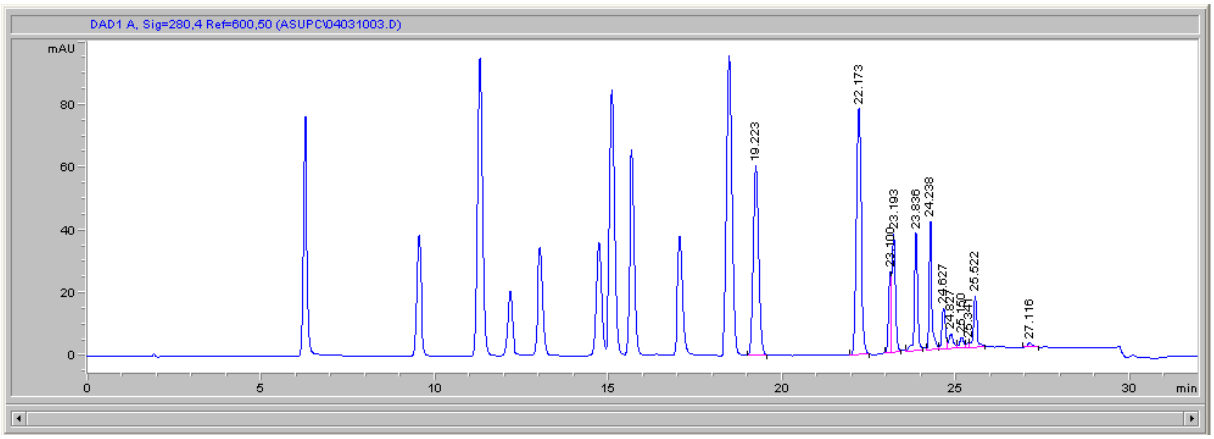


Figura 61. Cromatograma mezcla 17 polifenoles gradiente VI 50.

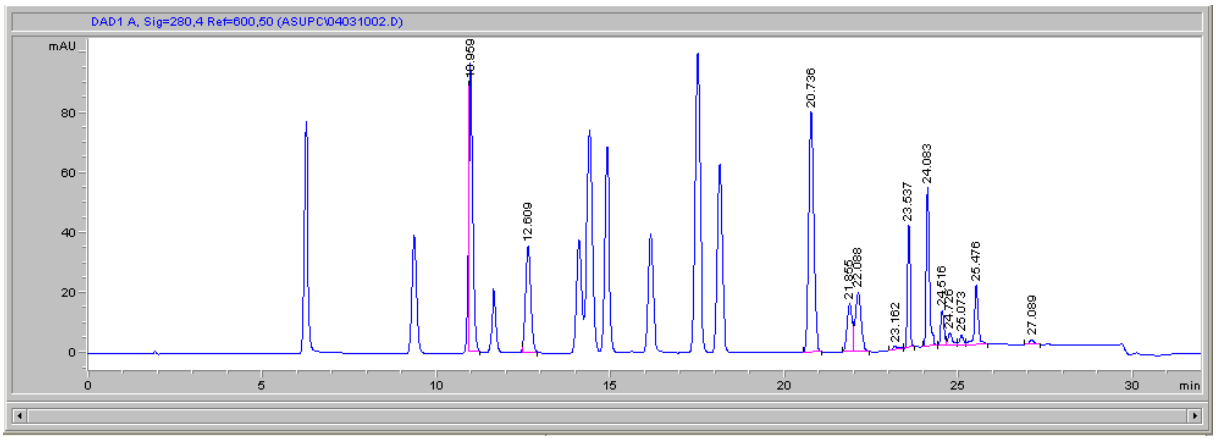


Figura 62. Cromatograma mezcla 17 polifenoles gradiente VI 55.

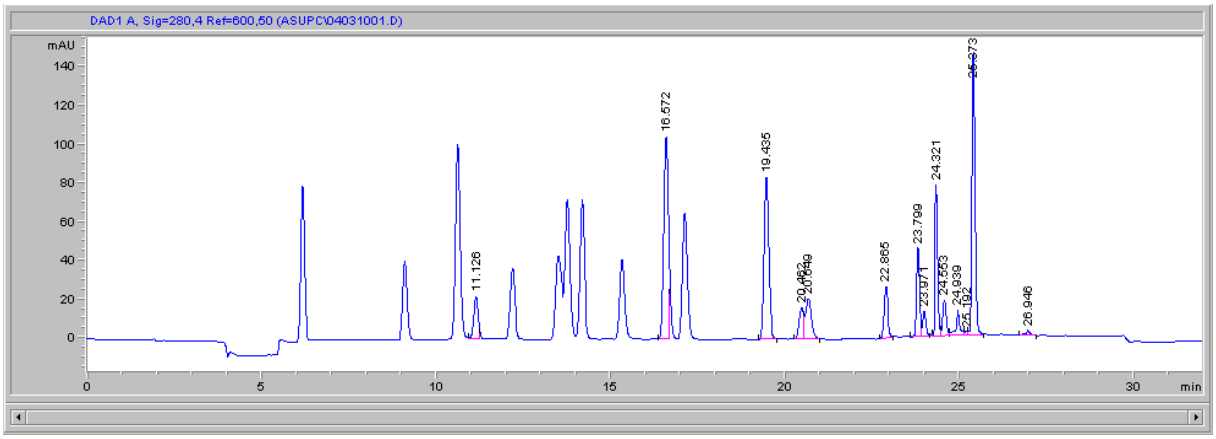


Figura 63. Cromatograma mezcla 17 polifenoles gradiente VI 60.

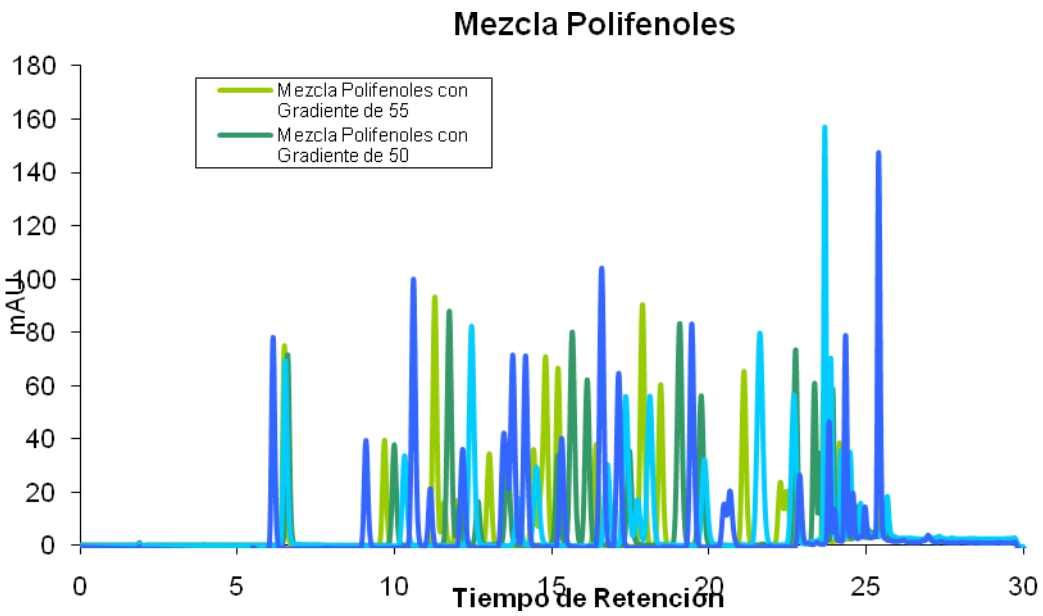


Figura 64. Cromatograma mezcla 17 polifenoles con todos los gradientes.

Como se observa en los cromatogramas anteriores, el gradiente que permite separar mejor los polifenoles y no hace que se retrase mucho la salida de todos los picos es el gradiente se VI50 y VI55.

Comparamos el cromatograma de estos dos gradientes para ver cuál es el más apropiado.

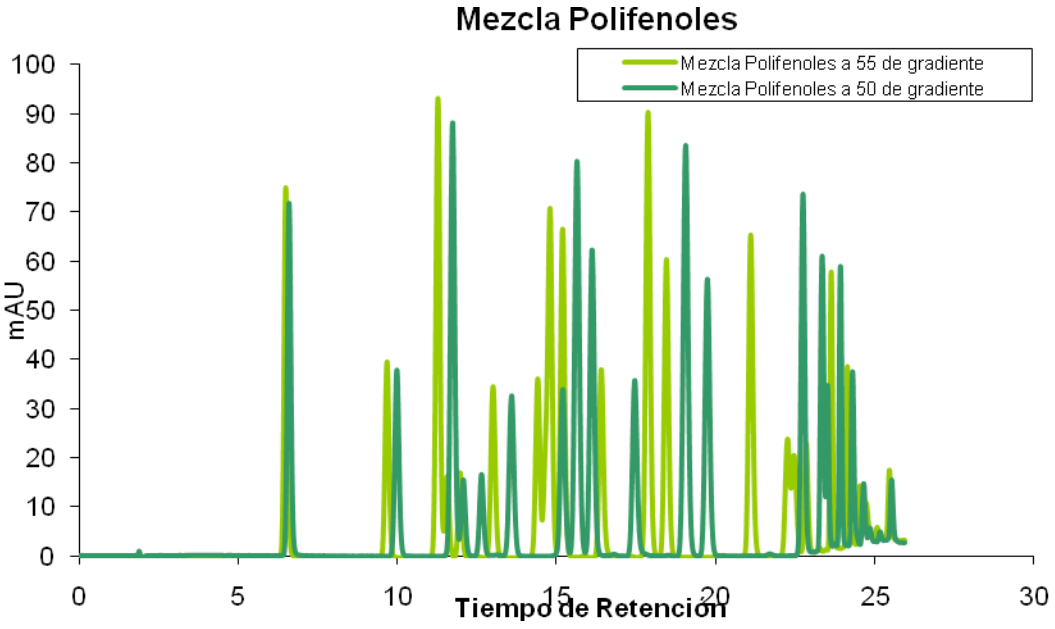


Figura 65. Cromatograma mezcla 17 polifenoles con todos los gradientes.

En el cromatograma anterior se observa que el mejor gradiente es el de VI55, por tanto se usará este método en el análisis de las muestras de vino.

3.1.4. Determinación longitud de onda

Se usa una solución madre de la mezcla de los polifenoles para comparar las muestras de vino y poder identificar los picos de los polifenoles.

Esta solución madre se prepara añadiendo una cantidad fija e igual de cada polifenol, pero la respuesta que da cada polifenol a esa concentración concreta no es la misma, algunos polifenoles dan un pico con un área muy grange y en otros casos el área de este pico es tan pequeño, que en un cromatograma a una determinada longitud de onda puede ser casi indetectable al lado de otro pico.

Por este motivo de cada polifenol se extrae, gracias al programa que incorpora el equipo de HPLC, el espectro de absorción, este espectro nos da información de a que longitud de onda es más detectable ese compuesto.

Se han realizado los espectros de absorción de los polifenoles usando como fase móvil acuosa Ác. Fórmico al 0,1 % y al 1%.

Para el esudio de estabilidad y el de filtrado con nylon se usó como fase móvil acuosa Ác. Fórmico al 1%, porque todavía no se había realizado el estudio de la fase móvil acuosa y para el resto (filtrado con diferentes vinos y análisis de los vinos) se usó fase móvil acuosa de Ác. Fórmico 0,1%.

Se exportan los datos con el programa del equipo Agilent a un Excel y se hacen los gráficos. (Adjuntados en el Anexo II, Capítulo 2, Apartado 2.5).

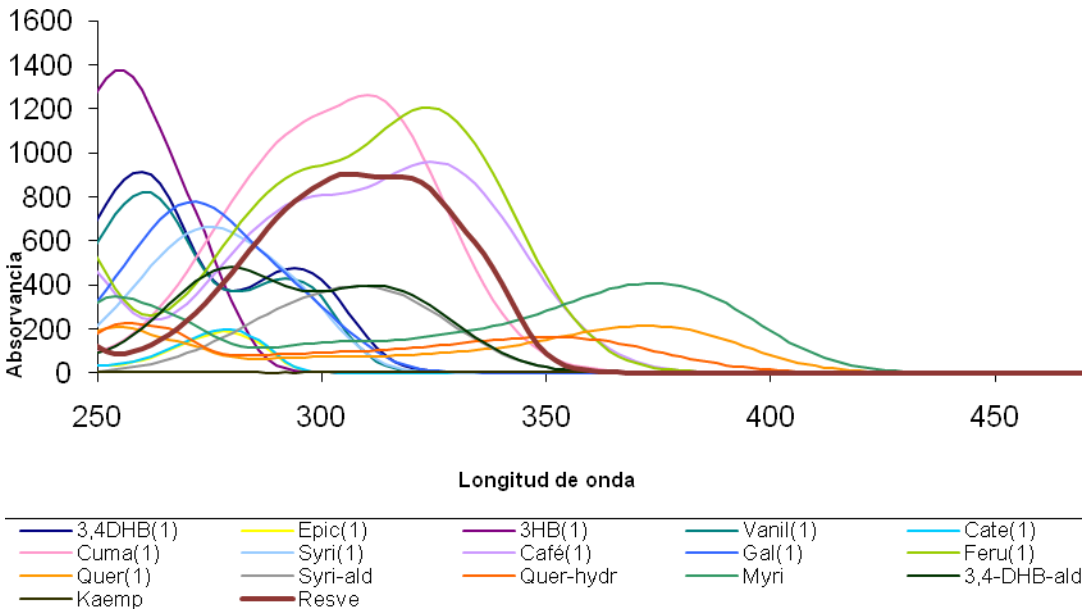


Figura 66. Espectros de absorción mezcla de 17 polifenoles con Ác. Fórmico 1%.

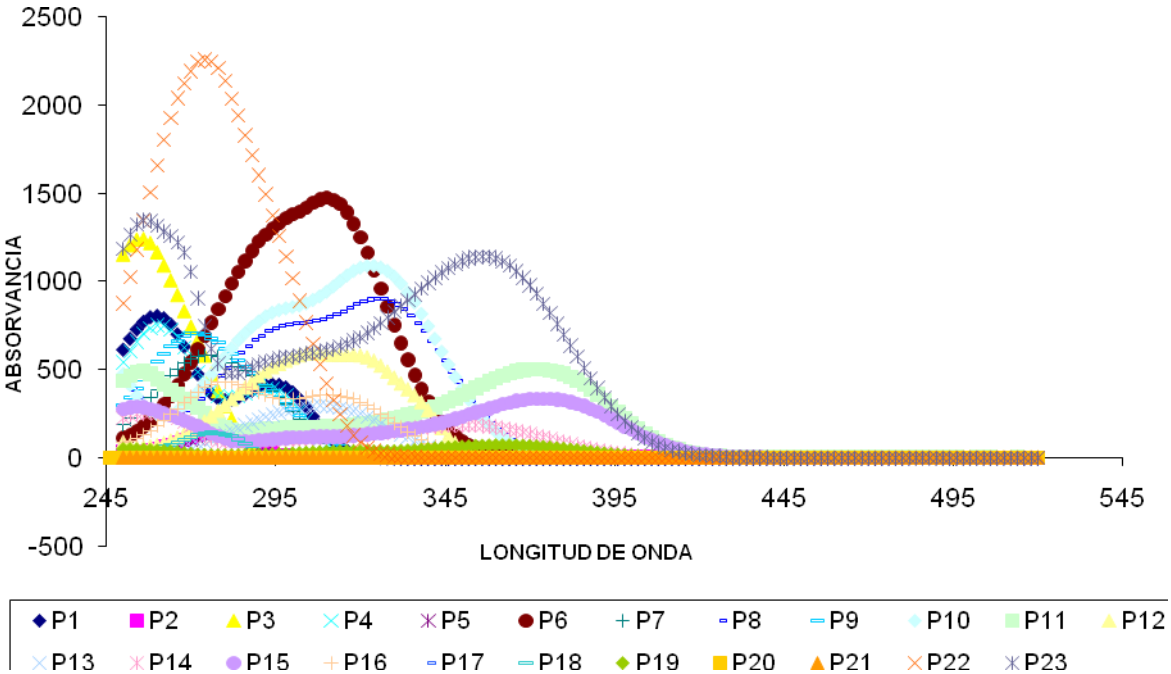


Figura 67. Espectros de absorción mezcla de 23 polifenoles con Ác. Fórmico 0,1%.

Como se observa de los gráficos anteriores para el caso con Ác. Fórmico al 0,1% se trabajo ya con los 23 polifenoles, pero recordar que el P20 y el P21 daban una señal tan baja que los despreciamos, en la Figura 67 se observa que el espectro de estos polifenoles es plano, es decir que casi no dan señal a estas longitudes de onda.

Estos espectros nos servirán en estudios posteriores, como el de filtrado, estabilidad y análisis de los vinos, para ver en que longitud de onda podemos mirar algún pico que no se vea claramente en el cromatograma completo de la muestra de ensayo.

3.2. Estudios de filtrado

El vino en ocasiones puede contener partículas en suspensión que hagan que el resultado del cromatograma varíe y no sea el deseado, por lo cual antes de preparar las muestras para ser analizadas es preciso filtrarlas. Este paso también es necesario para evitar posibles contaminaciones de la columna cromatográfica que acortarían su vida útil.

Al filtrar la muestra se eliminan estas partículas. La concentración de polifenoles, que es el objeto de nuestro análisis, también se puede ver afectada por ello.

Pero ¿qué fracción de vino filtrado desecharemos y a partir de que volumen filtrado podremos tomar la muestra para ser analizada?

El objeto es determinar que fracción de vino hay que desechar en el filtrado para poder obtener unos resultados que no se vean muy alterados por dicho proceso.

Se realizaron dos estudios de filtrado, inicialmente solo se disponían de filtros de nylon, por tanto se realizó con este tipo de filtro, un estudio para ver qué cantidad de vino había que filtrar y desechar.

Posteriormente se valoró la posibilidad de usar filtros de otro material, y se estudió si la fracción de filtrado a desechar era menor.

3.2.1. Filtros de Nylon

Este estudio se realiza con los 5 primeros vinos estudiados (V1, V2, V3, V4 y V5).

Tabla 7. Vinos usados en el estudio de filtrado.

Nombre	**Tipo de vino**
V1	Cava
V2	Vino blanco
V3	Vino tinto Reserva
V4	Vino tinto Crianza
V5	Vino tinto joven

Se analizan 6 fracciones del filtrado:

Los primeros 0.5 mL filtrados, 1 mL de filtrado, 1.5 mL de filtrado, 2 mL de filtrado, 2.5 mL de filtrado y 3 mL de filtrado.

Las muestras se filtran con un filtro de Nylon de tamaño de poro de 0.45 µm.

Cada fracción de vino filtrada es distribuida en viales del cromatógrafo, y preparada para su análisis.

Se usan como fase móvil Ácido fórmico al 1% y como fase móvil orgánica Metanol.

El método de análisis usado es el método VI60 (descrito en la pág 64).

Los cromatogramas obtenidos se encuentran en el Anexo II (Capítulo 3, Apartado 3.1).

A partir de los cromatogramas obtenidos para cada vino y cada fracción de filtrado, se realiza la lectura de las áreas de los picos de cada polifenol.

Mirado a la longitud de onda adecuada para realizar la lectura de cada pico, se analizan los datos creando una tabla de excel. Se puede calcular como ha variado la concentración de polifenoles durante los diferentes fracciones de filtrado, tomando el filtrado de 0 mL como el 100% de concentración de polifenoles.

A partir de la tabla de excel (que se encuentra en el ANEXO II, Capítulo 3, Apartado 3.2) se realizan unos diagramas de barras donde se puede observar cómo va disminuyendo la cantidad de polifenoles que se retiene en los filtros en cada fracción de filtrado.

Si se analiza las gráficas del filtrado de los diferentes vinos se observa con más claridad.

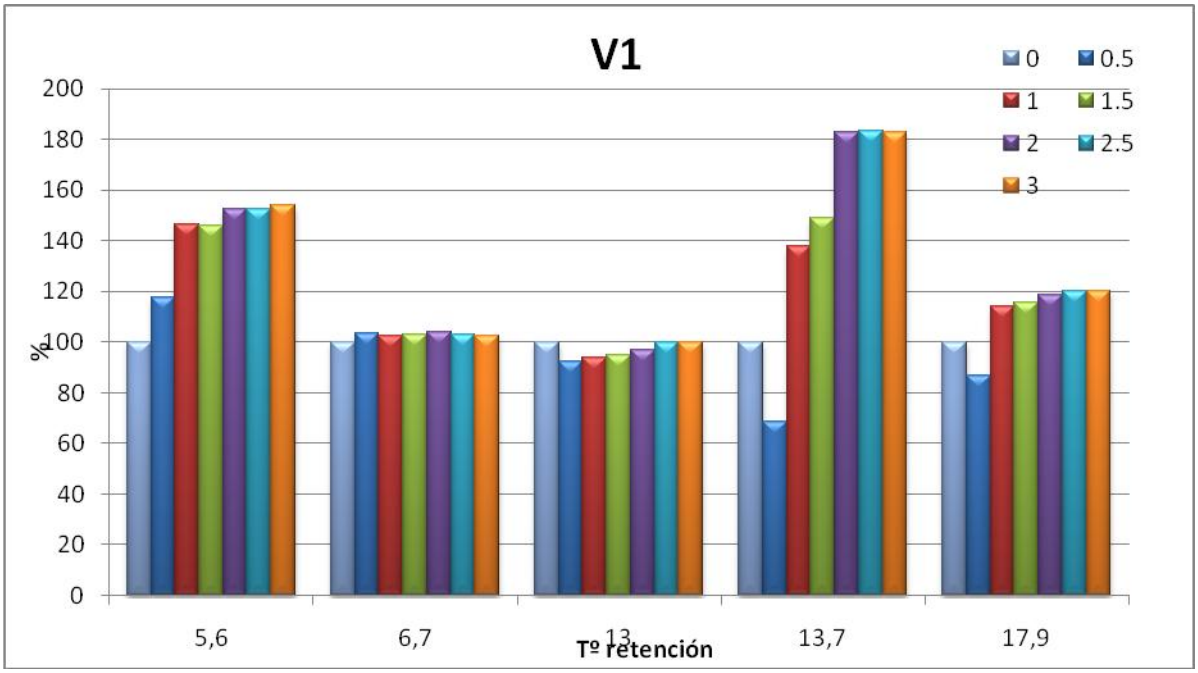


Figura 68. Gráfica de las fracciones de filtrado del V1.

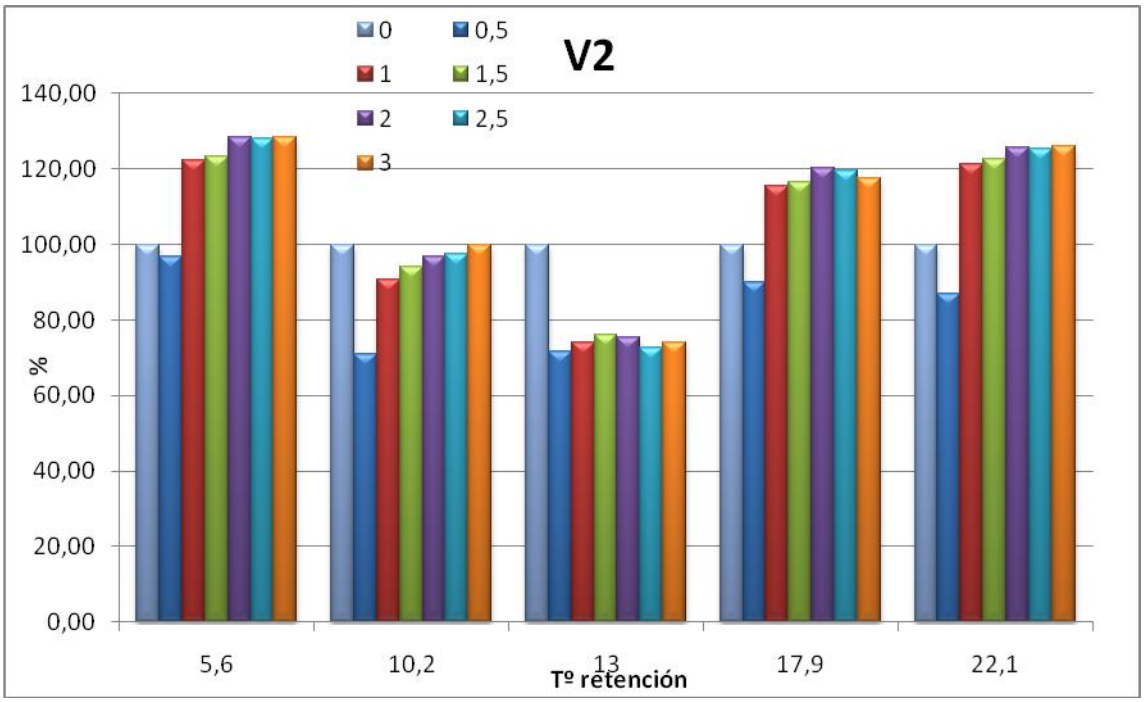


Figura 69. Gráfica de las fracciones de filtrado de V2.

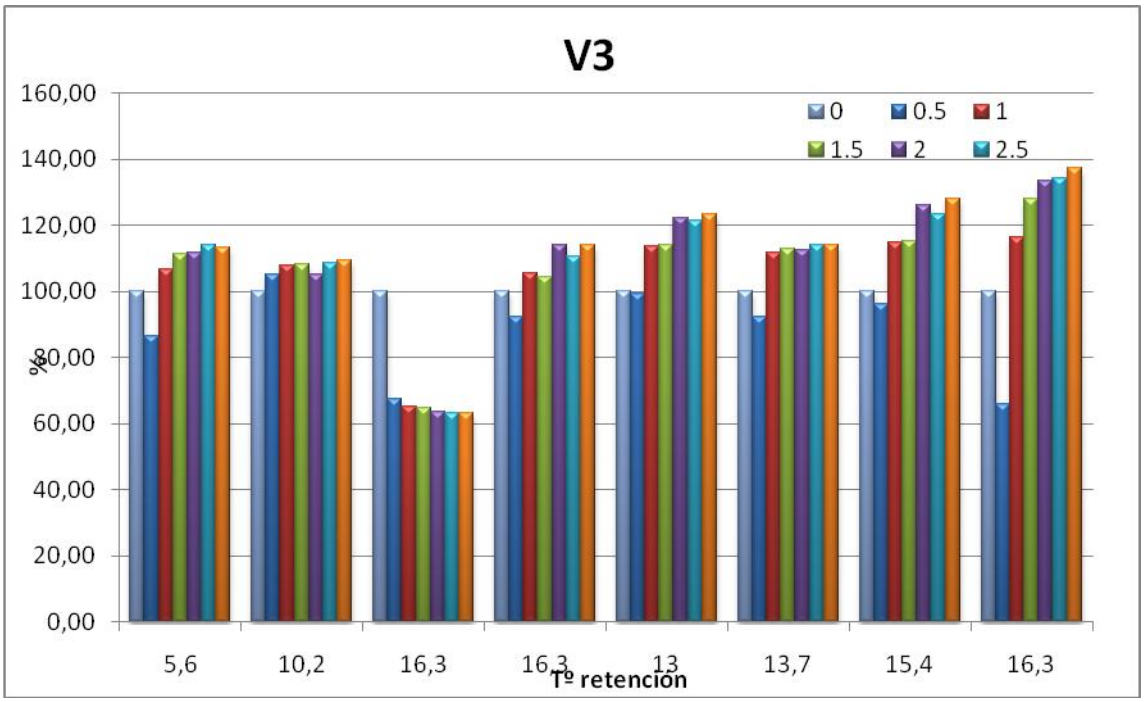


Figura 70. Gráfica de las fracciones de filtrado de V3.

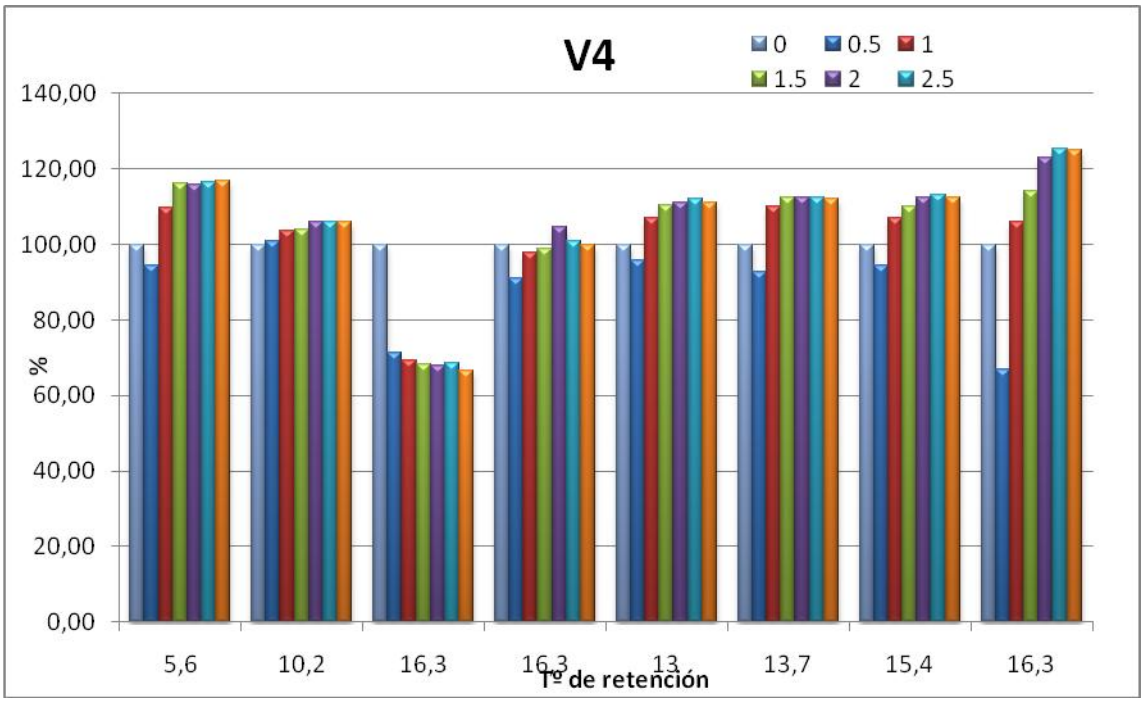


Figura 71. Gráfica de las fracciones de filtrado de V4.

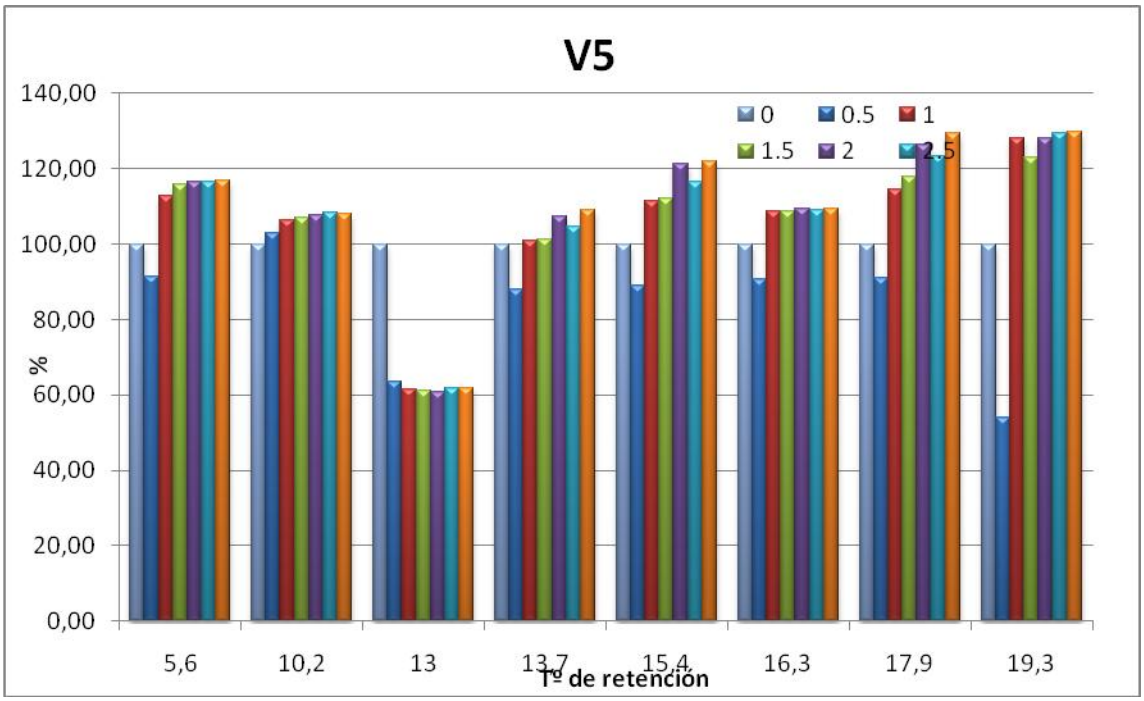


Figura 72. Gráfica de las fracciones de filtrado de V5.

En los gráficos anteriores se puede observar que durante los primeros 1.5 mL del filtrado es donde se produce la mayor pérdida de concentración de polifenoles

por filtrado, es decir, que a partir de 2 mL la concentración de polifenoles no se ve excesivamente alterada en el filtrado de la muestra.

Por los resultados obtenidos durante esta prueba, se decide que toda muestra de vino objeto de análisis se filtrará, desechando los 2 primeros mL del filtrado.

Con el resultado del estudio de este tipo de filtro se realizó el estudio de estabilidad de los vinos, descrito en el apartado 3.1.6.

3.2.2. Tipos de Filtros

Posteriormente, fue posible hacer un estudio con otros dos tipos de filtros distintos:

- Teflón
- Acetato de celulosa

El fin de este estudio es escoger el filtro óptimo, es decir, que retenga menos cantidad, y por lo tanto menos perdidas de componentes, y desechar menos mL de vino.

Figura 73. Fotografía de los tres tipos de filtros .

En este caso, se estudia para un solo vino (V5), y igualmente como en el estudio del filtrado se analizan 6 fracciones de filtrado.

Las muestras se filtran con los distintos filtros (Nylon, Acetato de Celulosa y Teflón) de tamaño de poro de 0.45 µm.

Cada fracción de vino filtrada es distribuida en viales del cromatógrafo, y preparada para su análisis.

Se usan como fase móvil acuosa Ácido fórmico al 0.1% en agua milli Q y como fase móvil orgánica Metanol.

El método de análisis usado es el método VI55 (descrito en la página 64).

Los cromatogramas obtenidos se encuentran en el Anexo II (Capítulo 3, Apartado 3.3).

Con los cromatogramas obtenidos, se ha realizado el mismo procedimiento para tratar los datos que en el apartado anterior del filtrado con los filtros de nylon. En este caso se busca poder reducir la fracción de filtrado que hay que desechar antes de tomar la muestra para ser analizada.

Se analizan los gráficos obtenidos a partir de la tabla creada con los cromatogramas que se adjunta en el ANEXO II (Capítulo 3, Apartado 3.4).

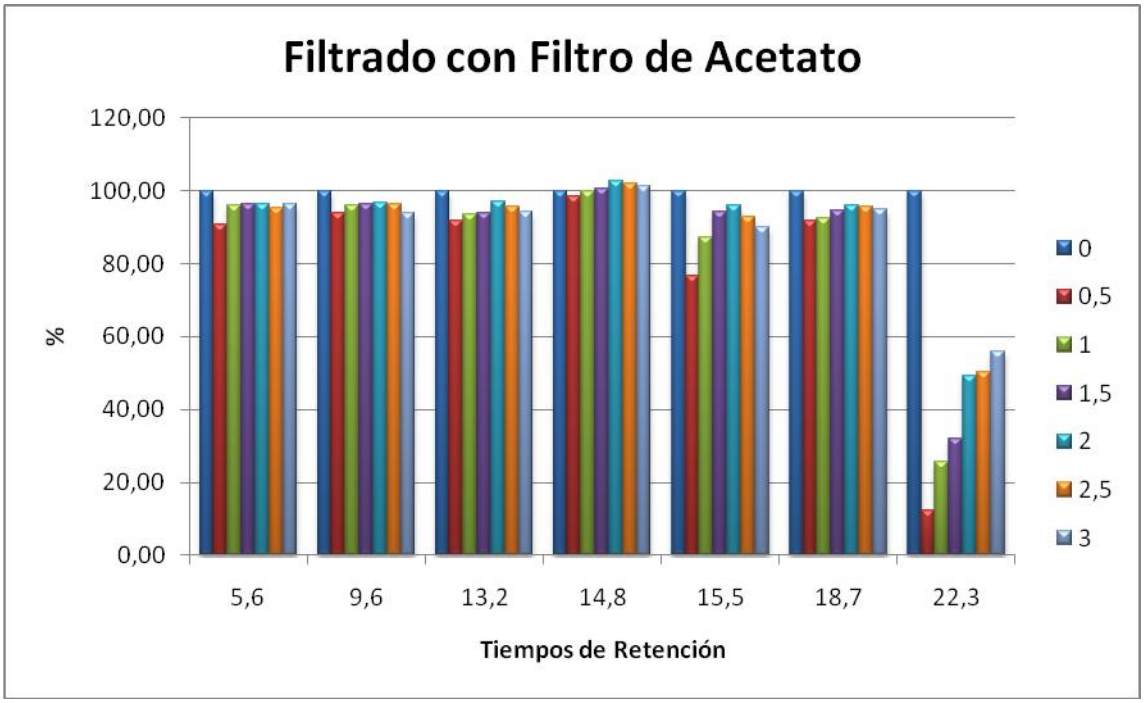


Figura 74. Gráfica de las fracciones de filtrado de V5 con filtro de Acetato de Celulosa.

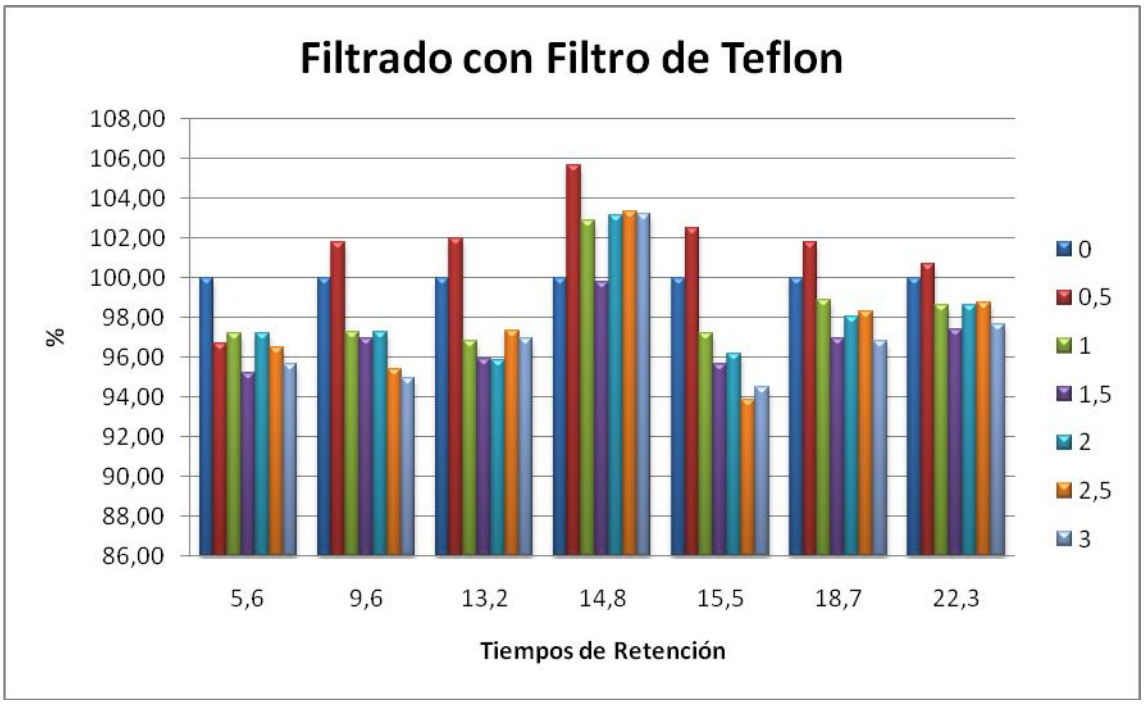


Figura 75. Gráfica de las fracciones de filtrado de V5 con filtro de Teflón.

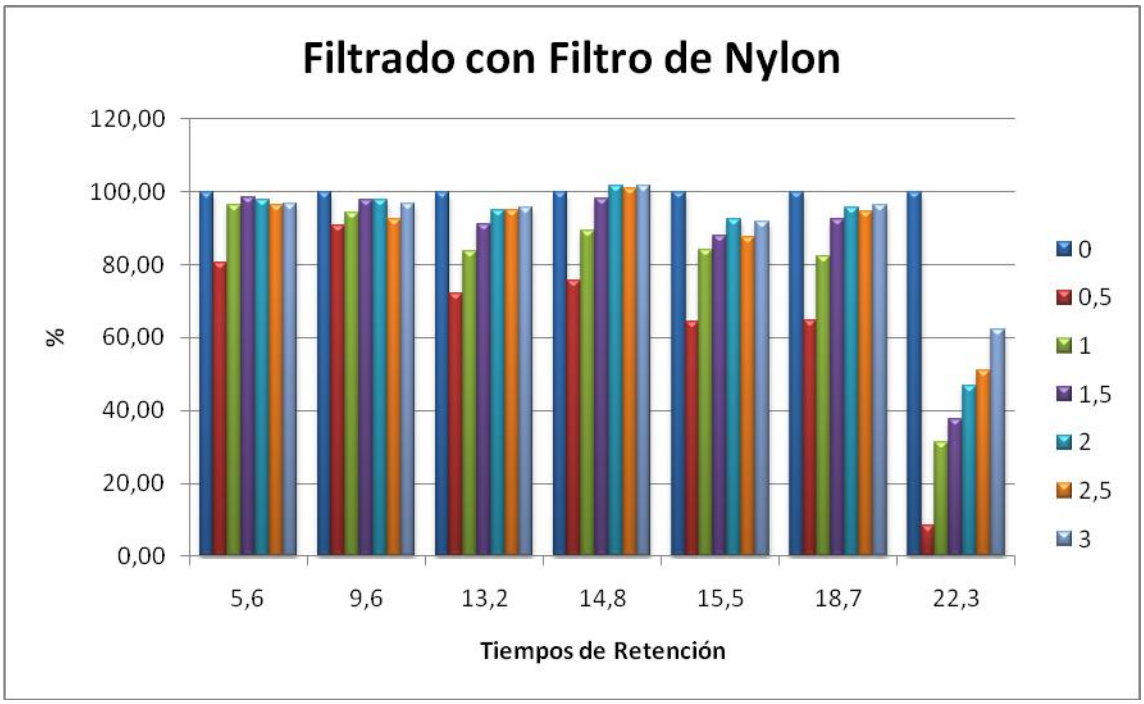


Figura 76. Gráfica de las fracciones de filtrado de V5 con filtro de Nylon.

En la gráfica se puede observar, que a partir de 1,5mL de filtrado, las aéreas son semejantes, por lo que concluimos que se filtra el vino 1,5mL y se desecha, y con el mismo filtro se filtra los mL necesarios de vino que se necesiten para el análisis.

Y en cuanto a los distintos filtros, el que menos pierde componentes, y por tanto menos retiene, es el filtro de teflón, por consiguiente concluimos que el filtro a utilizar en el análisis de los 46 vinos, es el filtro de teflón, desechando los 1,5 primeros mililitros de filtrado.

3.3. Estudio de estabilidad

La estabilidad del vino en el tiempo es un requisito imprescindible, el cual se debe lograr sin afectar negativamente la calidad.

Este proyecto realiza dos estudios de estabilidad, el primero, de cinco vinos diferentes que son:

- un cava V1
- un vino blanco V2
- un vino joven V3
- un vino de crianza V4
- un vino de Reserva V5

El segundo estudio es la estabilidad del método cromatográfico en 4 días diferentes.

3.3.1. Estabilidad vinos

Para el primer estudio se realiza el análisis de estos vinos a diferentes tiempos:

-Días: 1, 2, 8, 15, 30, 60, 90

El primer análisis se realiza el 04 de Febrero del 2010 con el vino acabado de abrir y a temperatura ambiente, después el vino se guarda en tubos de P.P, unas vez filtrados, y se conservan en nevera (2-8ºC) durante todo el tiempo que dura el estudio de estabilidad.

Se usan como fase móvil acuosa el Ácido fórmico al 1% en agua milli Q y como fase móvil orgánica el Metanol.

El método de análisis usado es el método VI60 (descrito en la página 64).

Para el estudio de estabilidad de cada vino se determina el área del pico en los tiempos de retención correspondientes a unos polifenoles concretos (Anexo II, Capítulo 4, apartado 4.6).

De cada día de análisis de la estabilidad se obtienen los cromatogramas, tanto UV-visible como de fluorescencia (adjuntados en el Anexo II, Capítulo 4).

Para éste estudio de estabilidad se coge el área del día 1 como el 100% y se compara con los siguientes días para analizar si se trata de un vino estable o no.

A continuación se ilustran unas gráficas a unos tiempos de retención específicos en los cuales se estudia mejor la estabilidad.

El objetivo de este estudio es poder averiguar que estudios son factibles a analizar, dependiendo de cuánto tiempo se dispone. Para ello, se escogen unos tiempos de retención con tendencias claras que se encuentran tabulados en el Anexo II (Capítilo 4, Apartado 4.6).

Graficos tiempo de retención 5,7 minutos

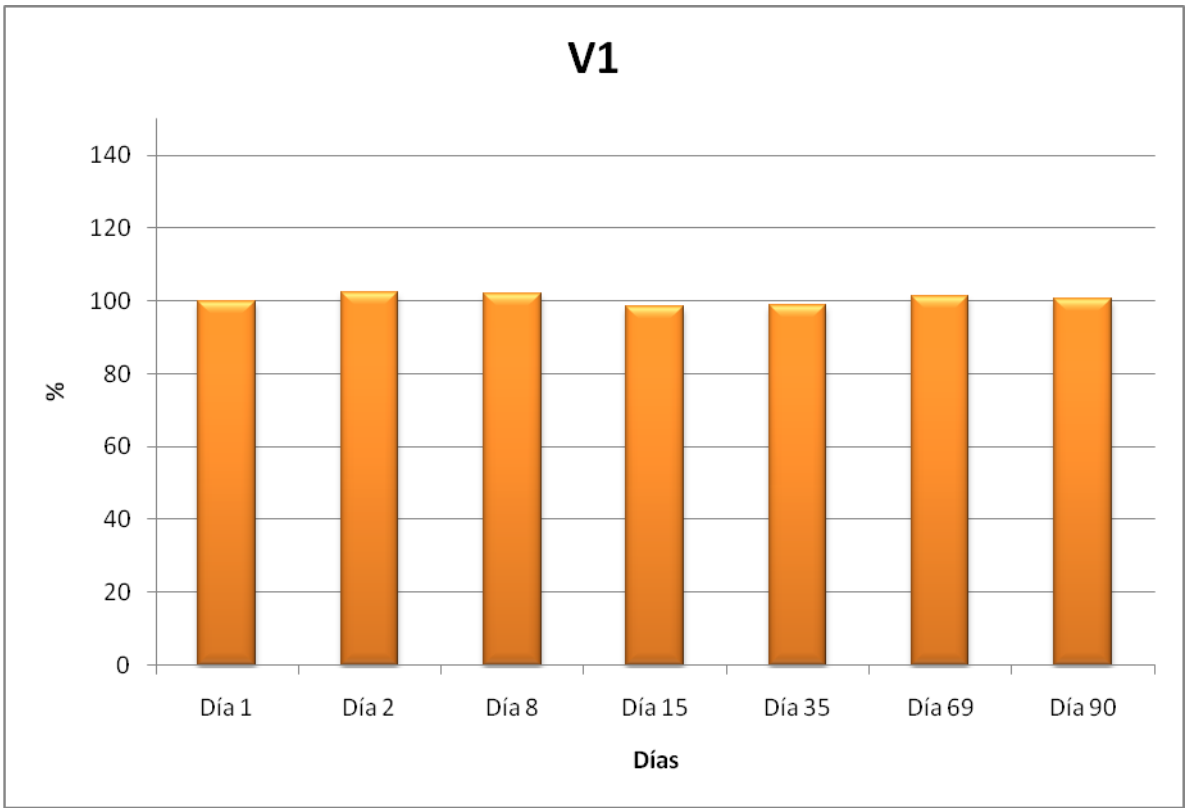


Figura 77. Gráfica de estabilidad del V1 a 5,7 minutos de tiempo de retención.

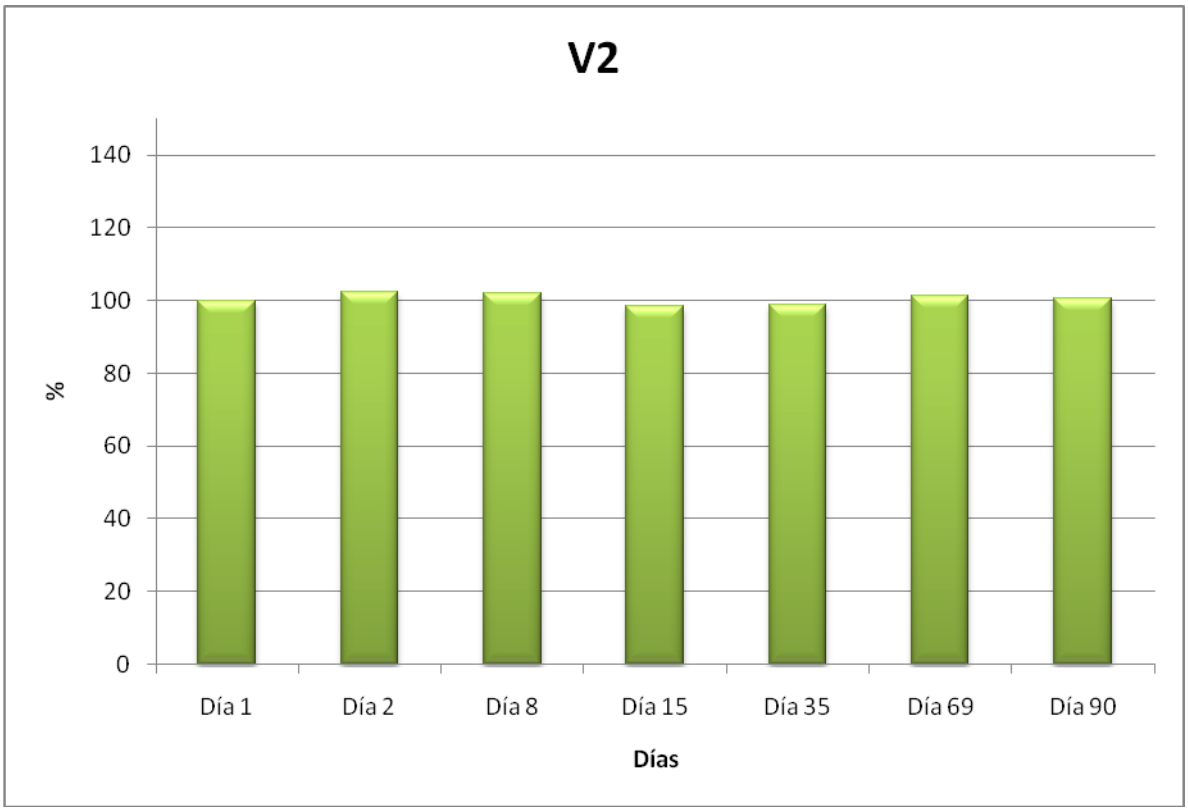


Figura 78. Gráfica de estabilidad del V2 a 5,7 minutos de tiempo de retención.

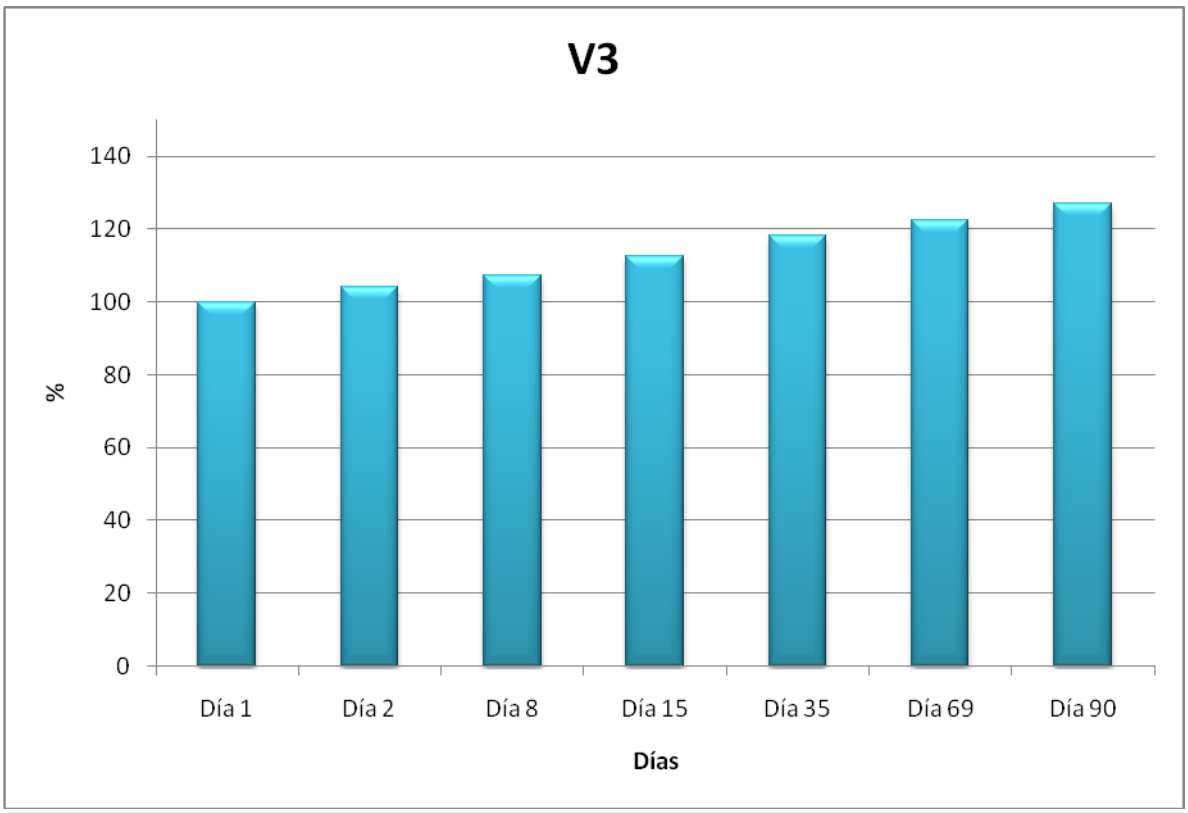


Figura 79. Gráfica de estabilidad del V3 a 5,7 minutos de tiempo de retención.

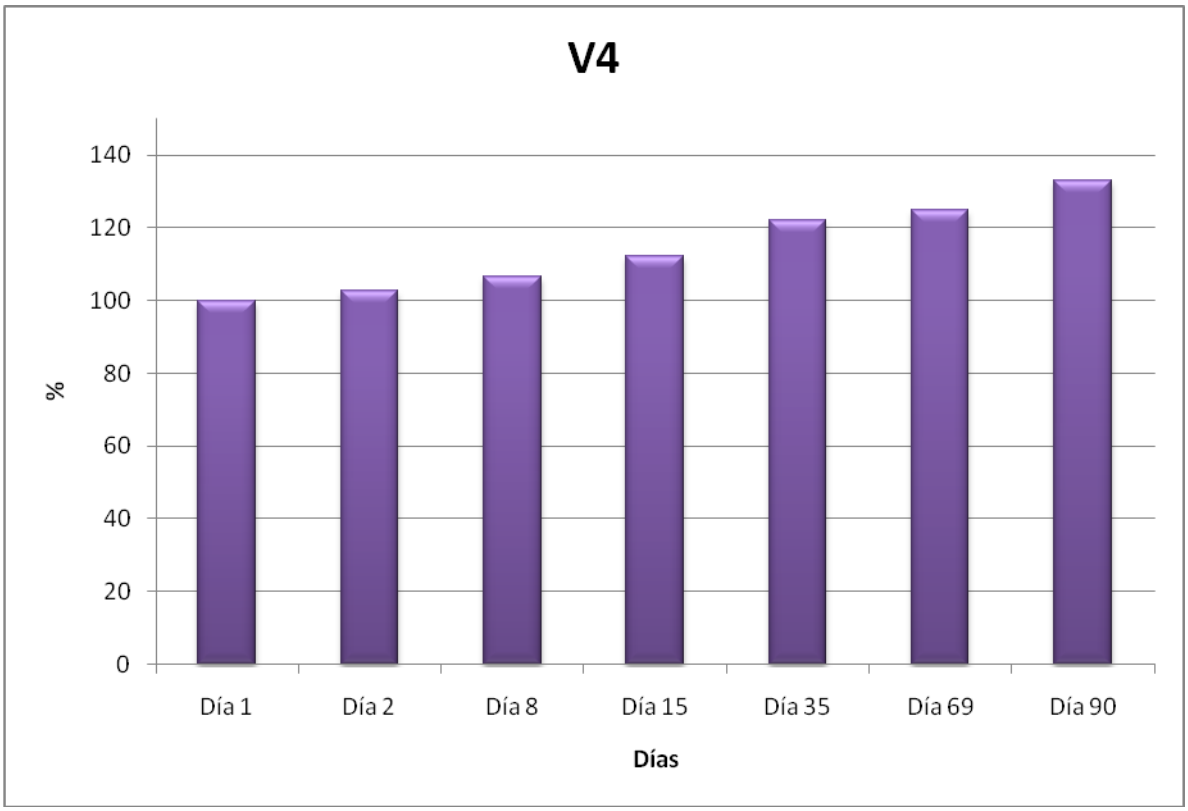


Figura 80. Gráfica de estabilidad del V4 a 5,7 minutos de tiempo de retención.

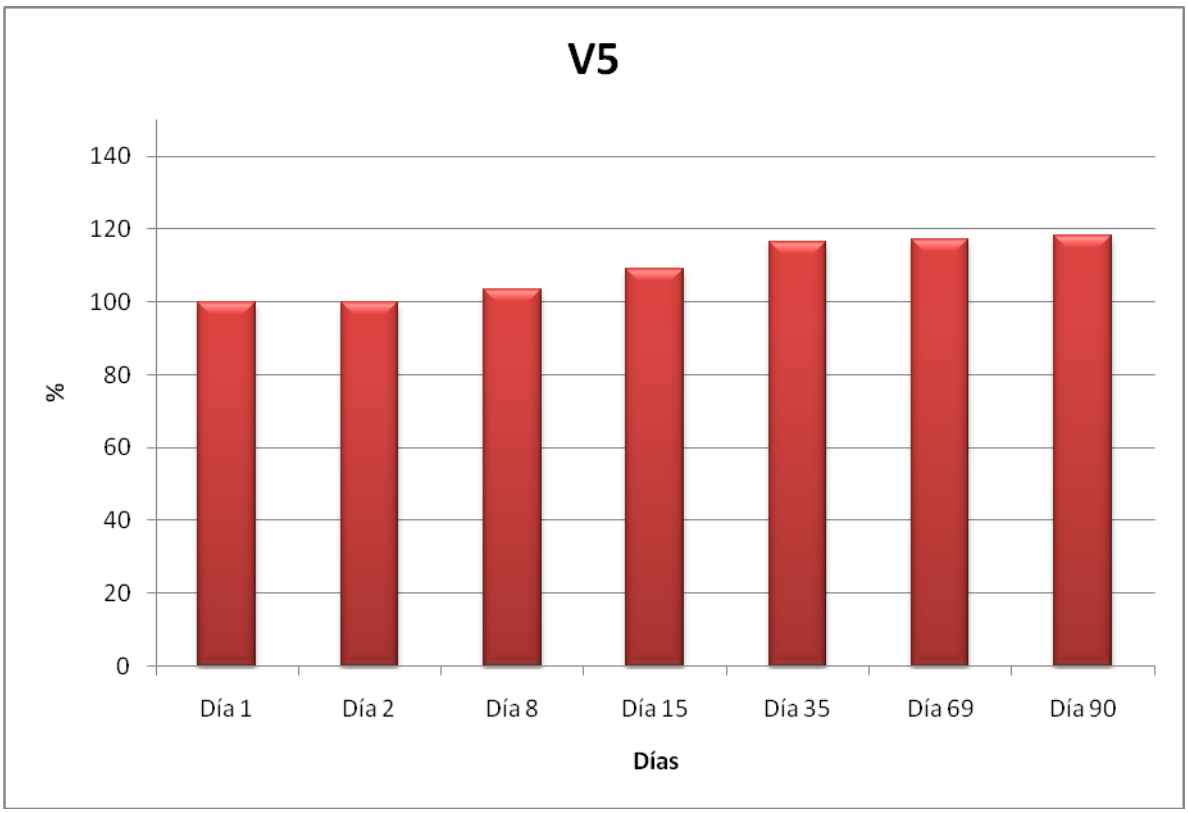


Figura 81. Gráfica de estabilidad del V4 a 5,7 minutos de tiempo de retención.

Observando estos gráficos se puede concluir que a 5,7 minutos de tiempo de retención, compuesto conocido que es el ácido Gálico, con el tiempo en la mayoría de vinos aumenta.

Para el V1 y V2 es bastante constante, pero sobre todo para los vinos negros, V3, V4 y V5, va aumentando el área con el paso del tiempo. Este aumento es debido a que se están formando otros compuestos como puede ser el ethyl gallate; por lo que se puede concluir diciendo que para un estudio del ácido gálico no se puede tener el vino mucho tiempo para su estudio, ya que se formarán más compuestos y no se podrá analizar con precisión.

Graficos tiempo de retención 13 minutos

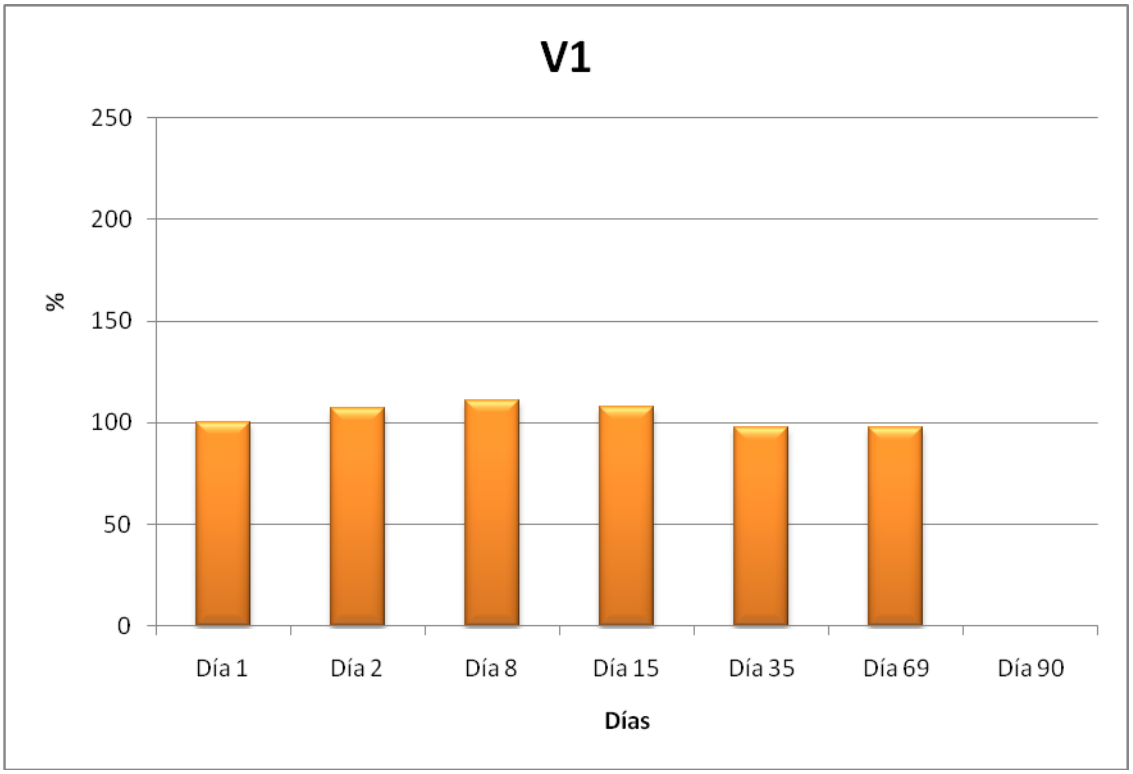


Figura 82. Gráfica de estabilidad del V1 a 13 minutos de tiempo de retención.

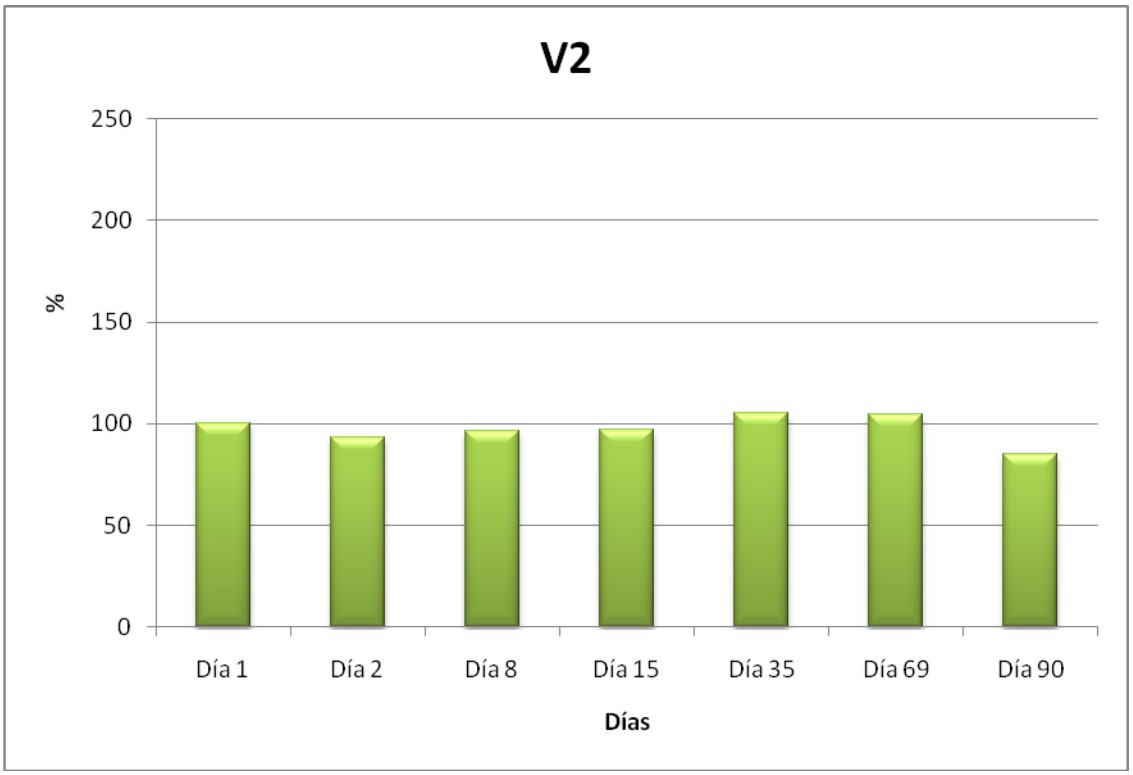


Figura 83. Gráfica de estabilidad del V2 a 13 minutos de tiempo de retención.

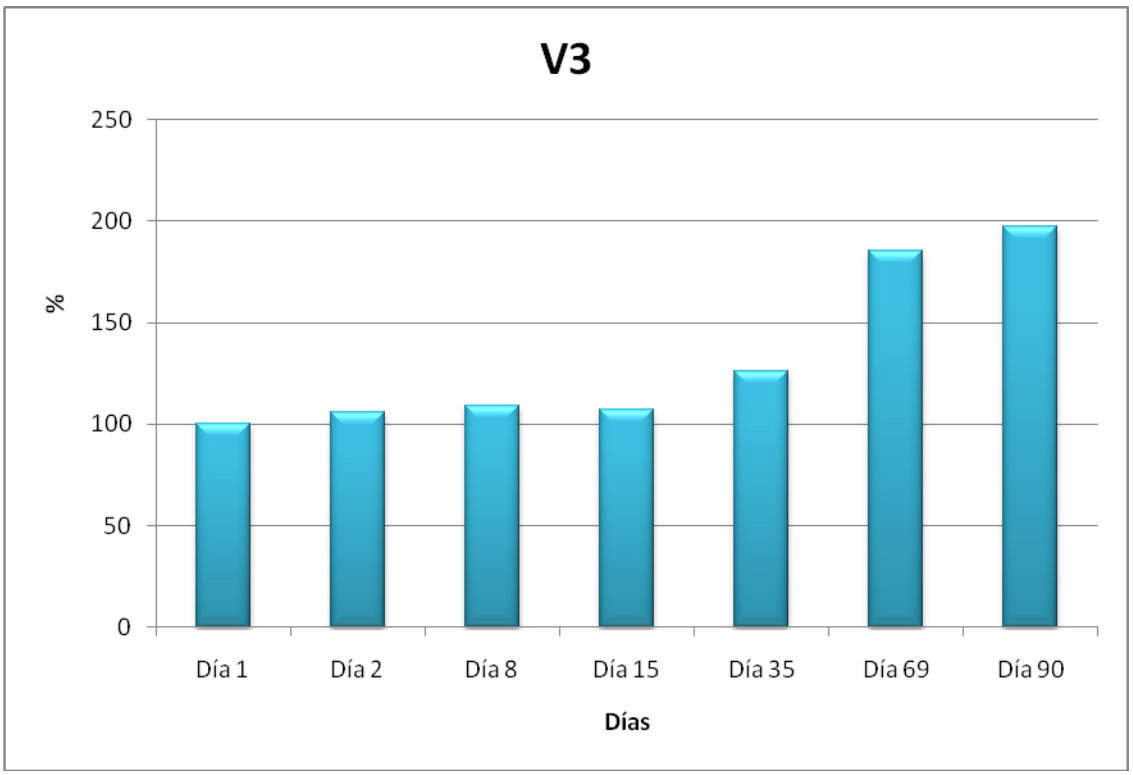


Figura 84. Gráfica de estabilidad del V3 a 13 minutos de tiempo de retención.

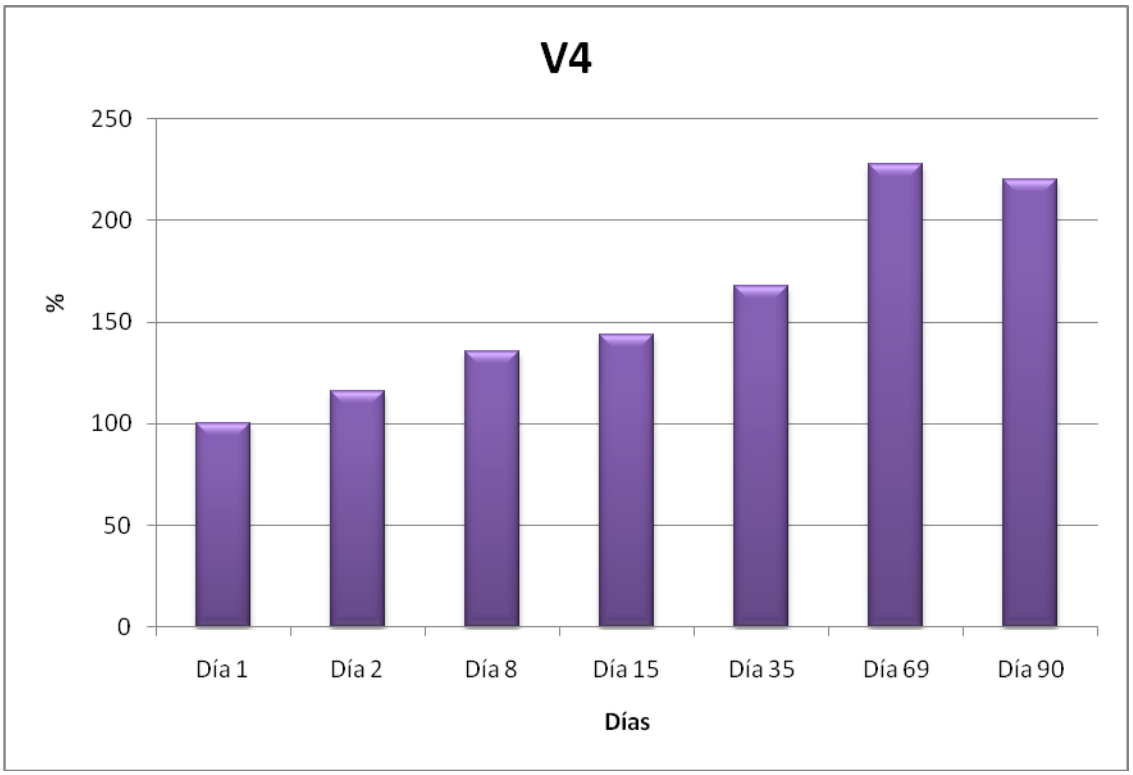


Figura 85. Gráfica de estabilidad del V4 a 13 minutos de tiempo de retención.

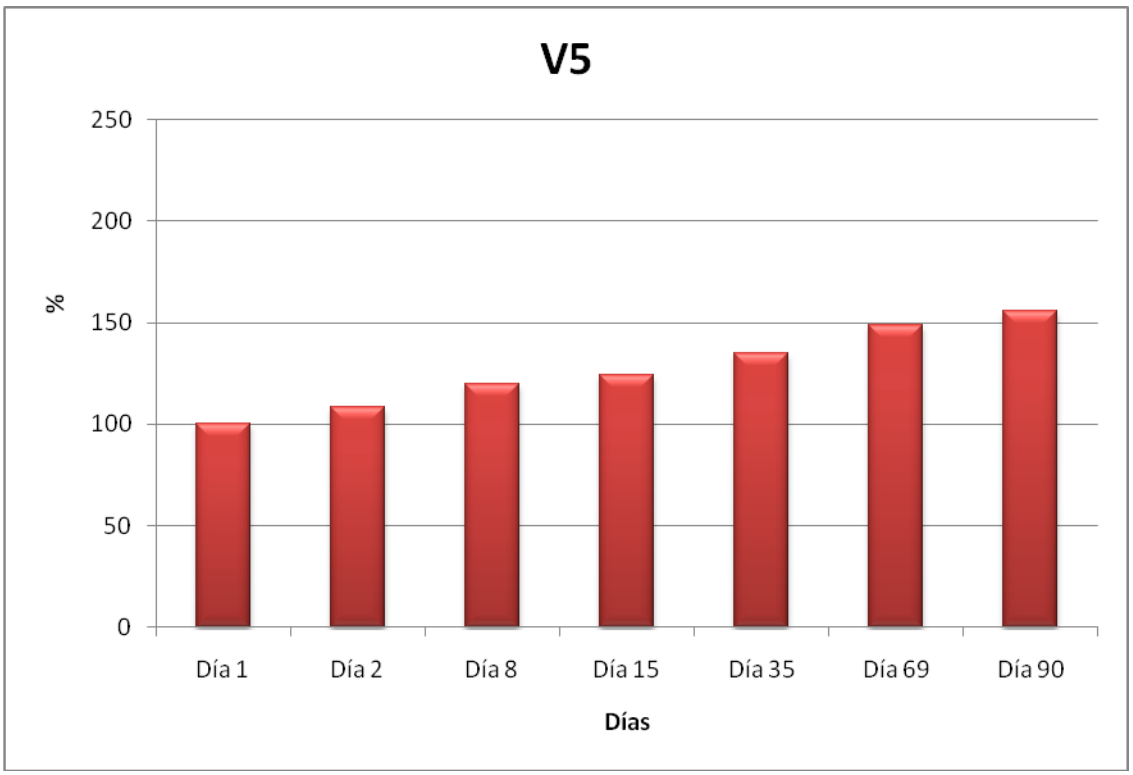


Figura 86. Gráfica de estabilidad del V5 a 13 minutos de tiempo de retención.

En el caso de 13 minutos de tiempo de retención, no es un compuesto identificado, pero ocurre lo mismo que para el ácido gálico, como se comprueba en los graficos anteriores.

Graficos tiempo de retención 13 minutos

Por último, si analizamos a tiempo de retención 19,3 (compuesto no identificado), que solo se encuentra presente en los vinos negros, se comprueba que con el tiempo el vino se matiene constante, por lo que es factible hacer un estudio de larga duración.

Se comprueba a continuación esta conclusión.

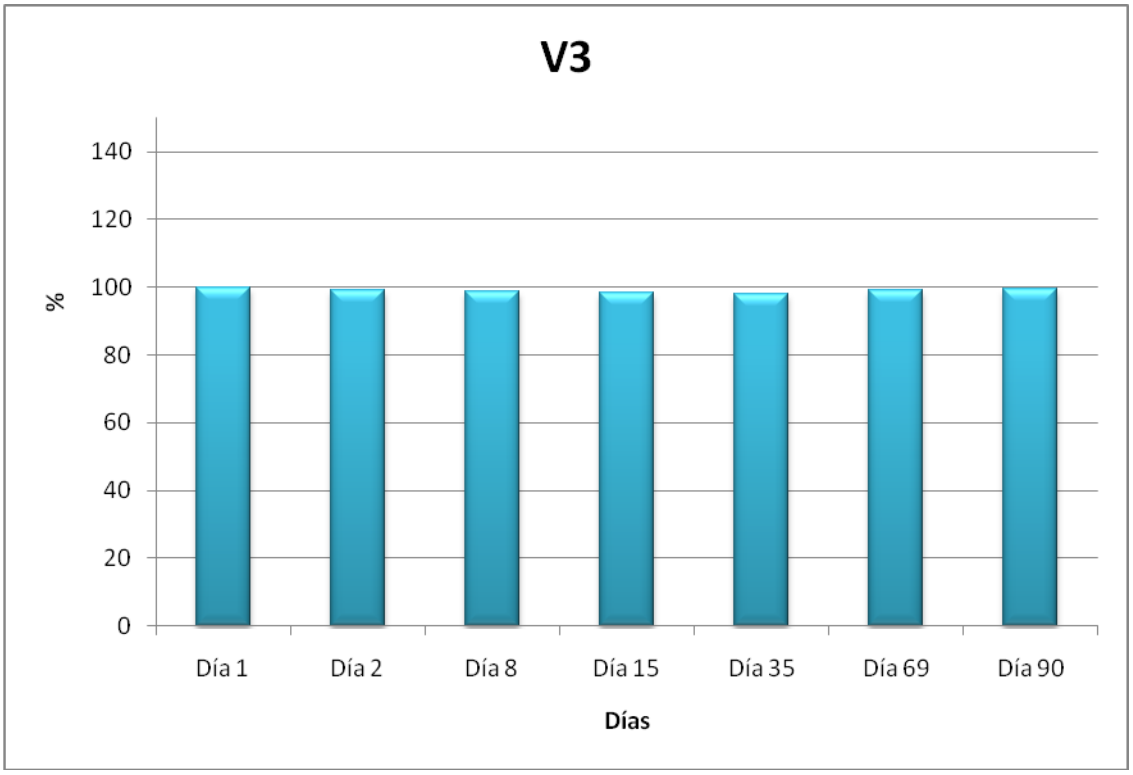


Figura 87.Gráfica de estabilidad del V3 a 19,7 minutos de tiempo de retención

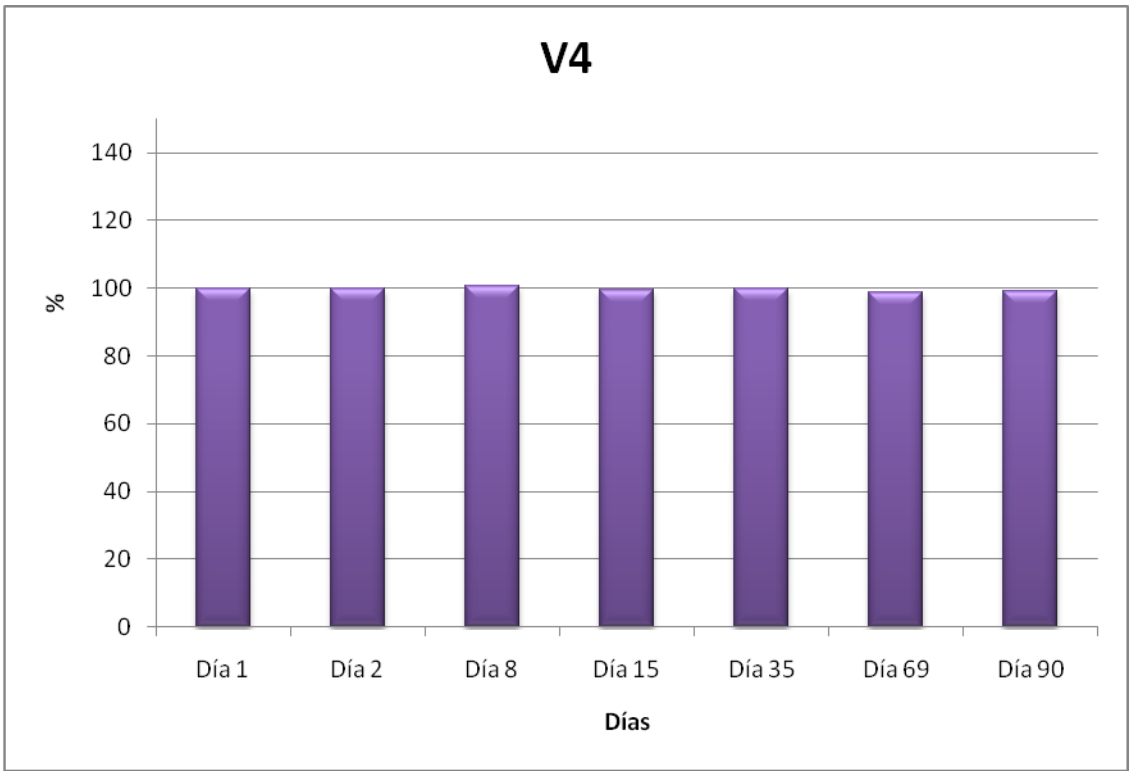


Figura 88.Gráfica de estabilidad del V4 a 19,7 minutos de tiempo de retención

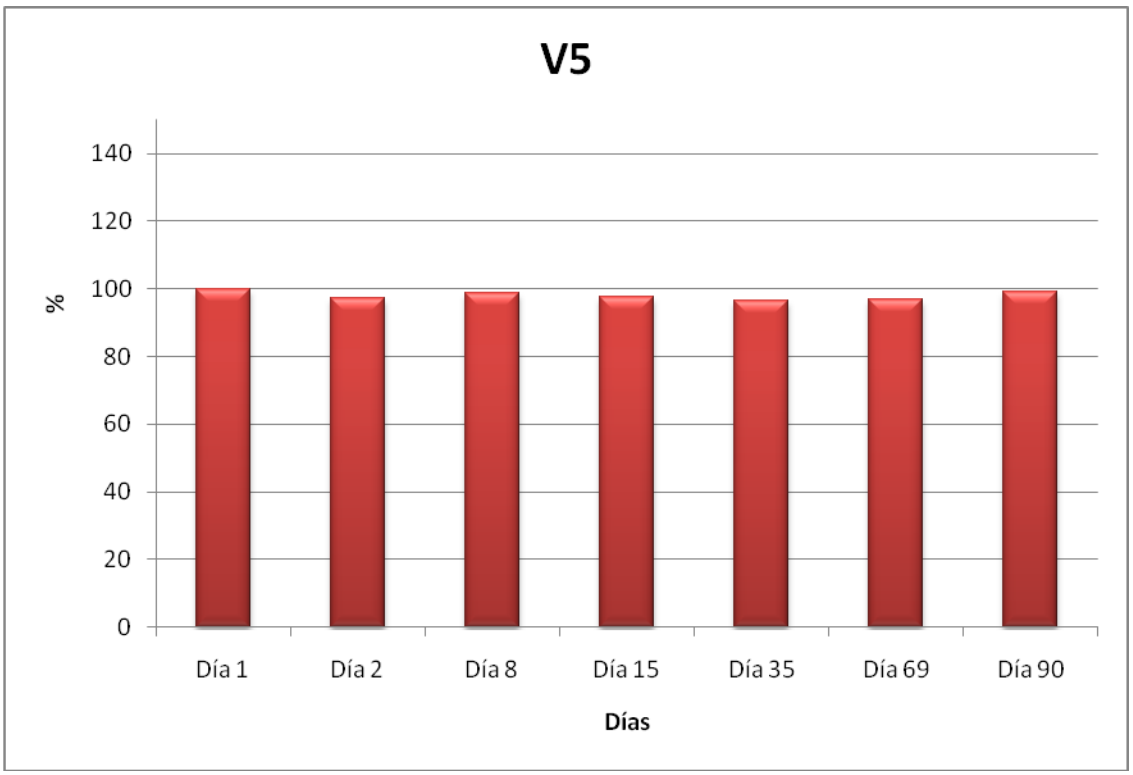


Figura 89.Gráfica de estabilidad del V5 a 19,7 minutos de tiempo de retención

Si analizamos a 19,3 (compuesto no identificado), en el rango de fluorescencia, que solo se encuentra presente en los vinos negros, se comprueba que con el tiempo va disminuyendo, por lo que tampoco nos sirve para un estudio exhaustivo.

El problema de su disminución es que se trata de un compuesto que con el tiempo se descompone, por lo que forma otros compuestos y va disminuyendo su área.

A continuación se comprueba su disminución con el paso del tiempo.

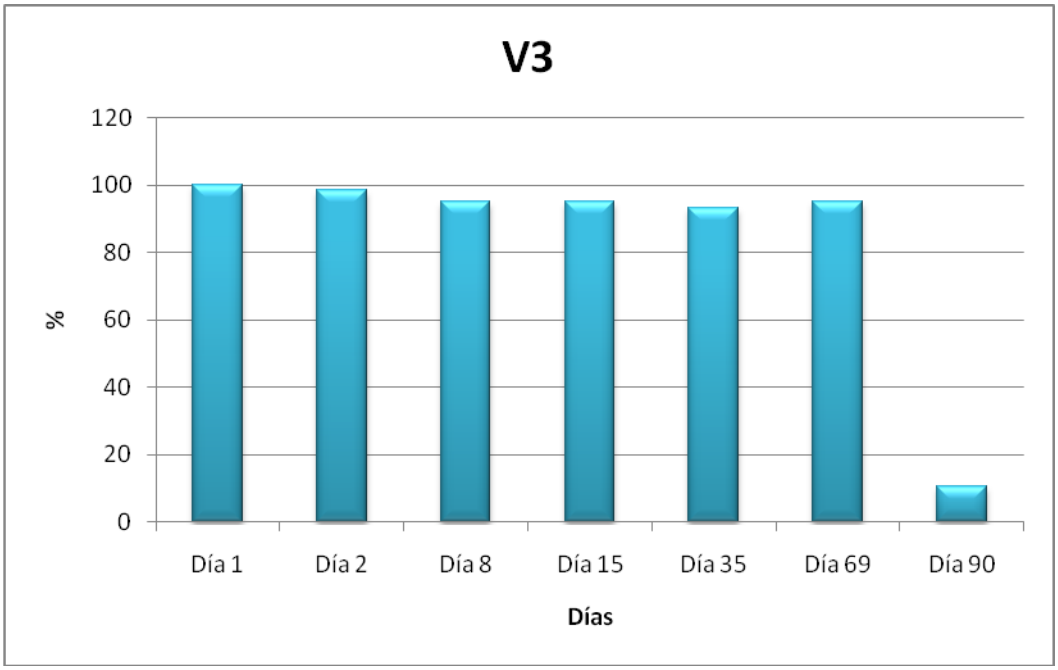


Figura 90.Gráfica de estabilidad del V3 a 13,5 minutos de tiempo de retención

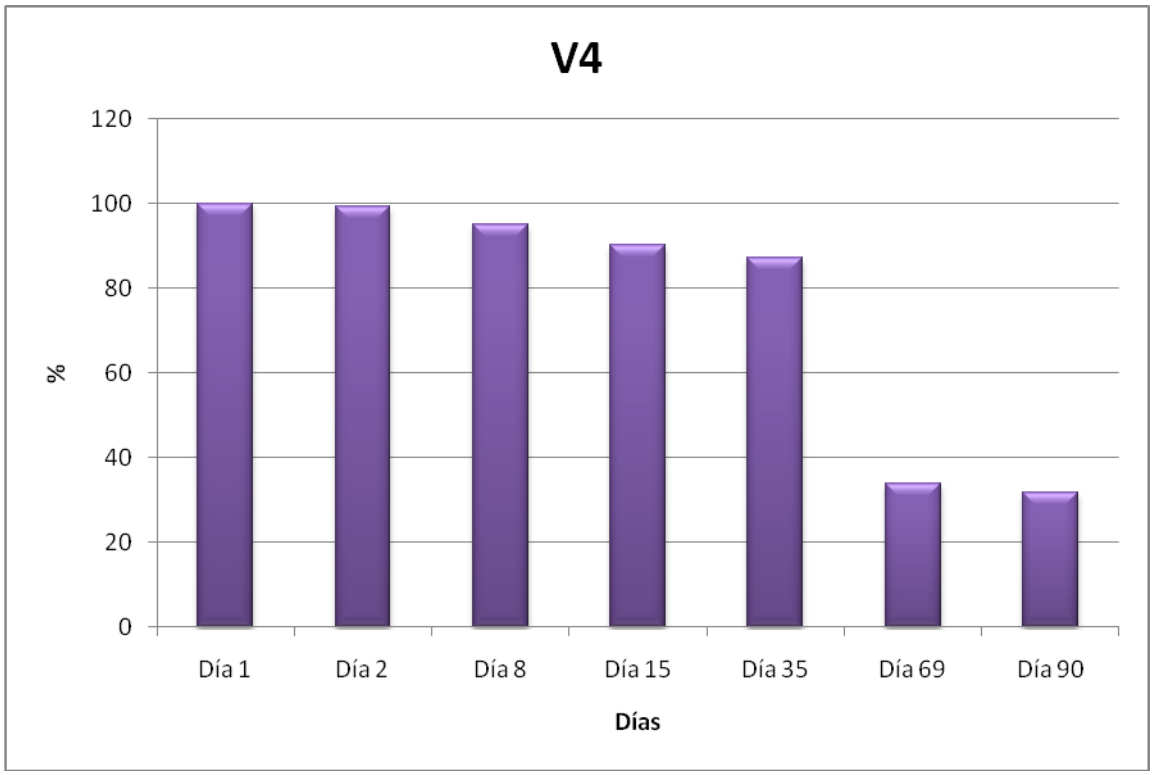


Figura 91.Gráfica de estabilidad del V4 a 13,5 minutos de tiempo de retención

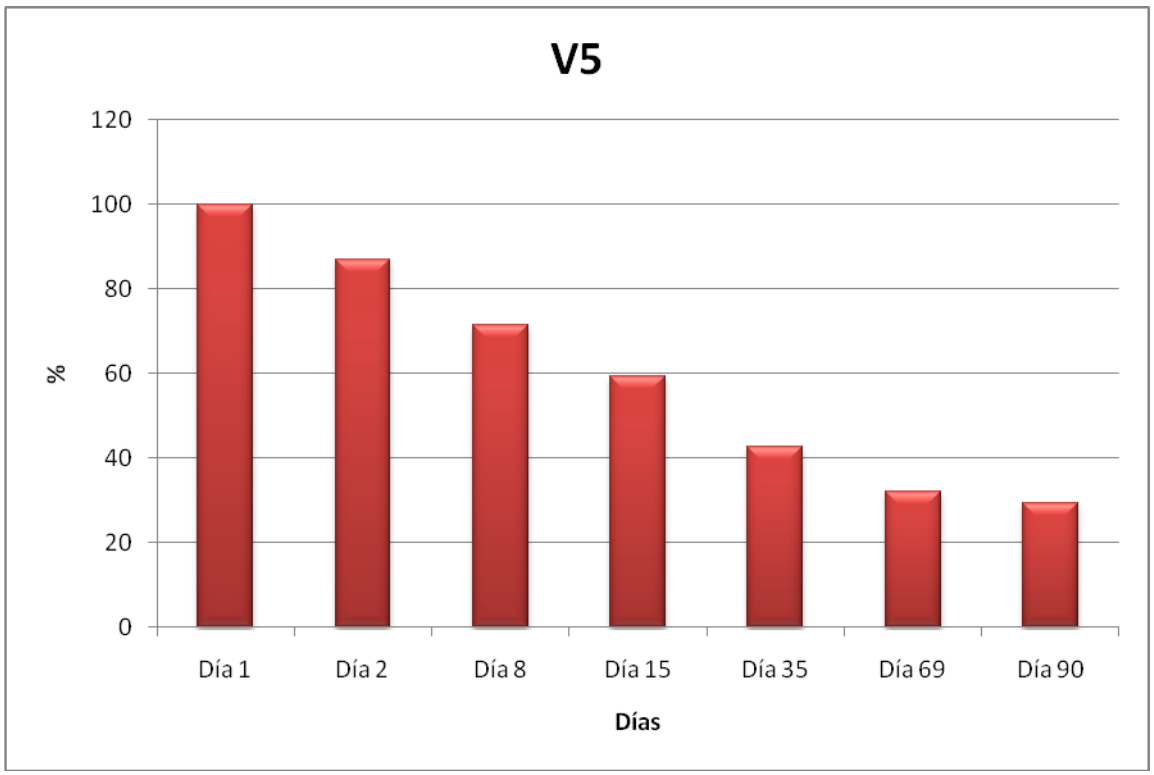


Figura 92.Gráfica de estabilidad del V5 a 13,5 minutos de tiempo de retención

3.3.2. *Estabilidad método cromatográfico*

El segundo estudio, es la estabilidad de cuatro días consecutivos (23 de marzo de 2010, 24 de marzo de 2010, 25 de marzo de 2010 y 26 de marzo de 2010) del método cromatográfico. Los datos se encuentran en la siguiente gráfica:

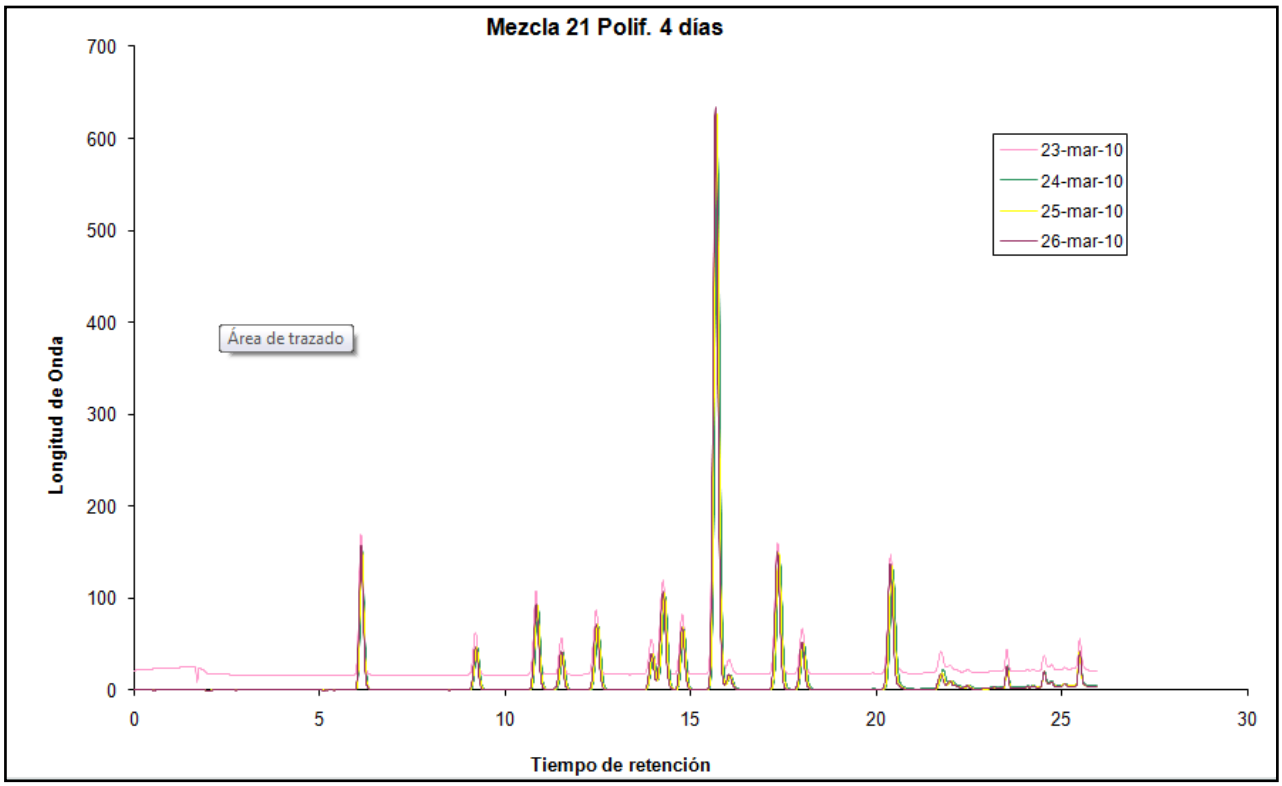


Figura 93.Gráfica de establidad del método cromatográfico

Se observa que el día 23 de marzo del 2010, la línea base está por encima de la resta, esto es debido a un fallo de la lámpara, pero no influye porque su aumento es proporcional para todos los picos, y el estudio de las áreas se hace a partir de la línea base de cada mezcla de polifenoles.

Se observa la gráfica, y se comprueba que la mezcla de polifenoles se mantiene constante con 4 días de diferencia, por consiguiente podemos concluir, que el método cromatográfico, VI 55 (descrito en la página 64) es estable, puede analizarse en estudios de larga duración.

3.4. Estudios preliminares para la clasificación de 46 vinos

El método quimiométrico más utilizado para el estudio de las propiedades de los vinos a partir de los datos obtenidos experimentalmente es el PCA, análisis por componentes principales.

Para éste estudio se han analizado 46 vinos descritos en el Anexo II (Capítulo 5, Apartado 5.3).

Se obtienen estos mapas, después de un proceso de tratamiento de datos de los 46 cromatogramas obtenidos con el análisis cuantitativo con el HPLC (adjuntado en el Anexo II, Capítulo 5, Apartado 5.1), tanto para UV-visible como para fluorescencia. Se han escogido diferentes picos característicos de los cromatogramas y se ha elaborado una tabla con los tiempos de retención de dichos picos de cada vino y se ha calculado el área, las tablas se adjuntan en el Anexo II (Capítulo 5, Apartado 5.2).

A partir de estos datos se obtienen dos mapas, uno con las 46 muestras y el otro con los diferentes picos escogidos, un total de 27 picos teniendo en cuenta ambos tipos de detectores. Estos mapas son complementarios y se han de utilizar los dos para poder realizar un análisis completo.

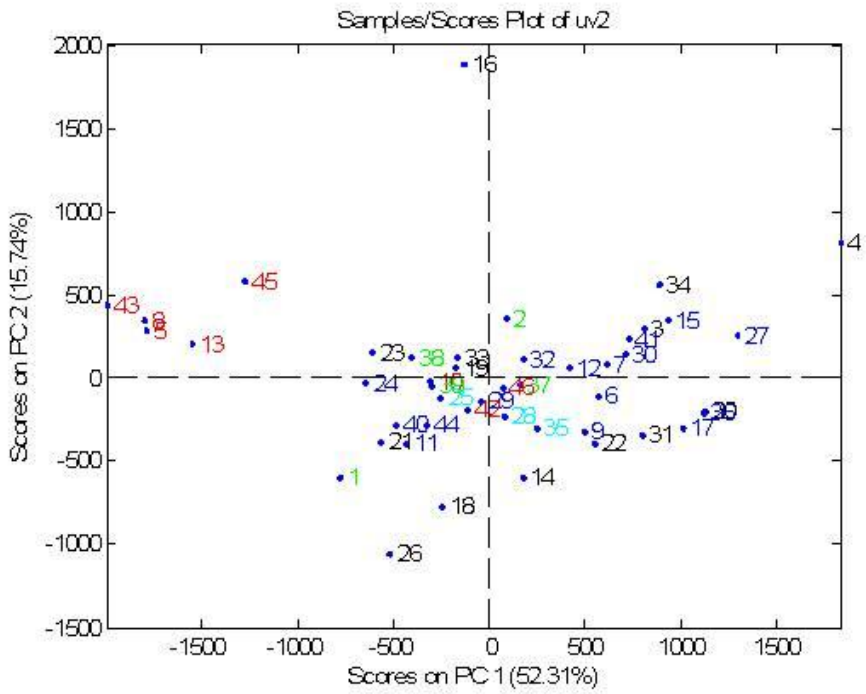
A continuación se muestra un mapa de PCA, que permite estudiar una característica del vino. El estudio se ha hecho con el objetivo de intentar discriminar los vinos por denominación de origen a partir del contenido de polifenoles.

Antes de realizar el tratamiento de los datos mediante PCA, se ha realizado un centrado de la media.

La clasificación de los vinos mejora si no se incluye durante el tratamiento de los datos el ácido gálico, y por ello no se tiene en cuenta todo y ser el polifenol más presente en todas las muestras.

Según denominación de origen (D.O) :

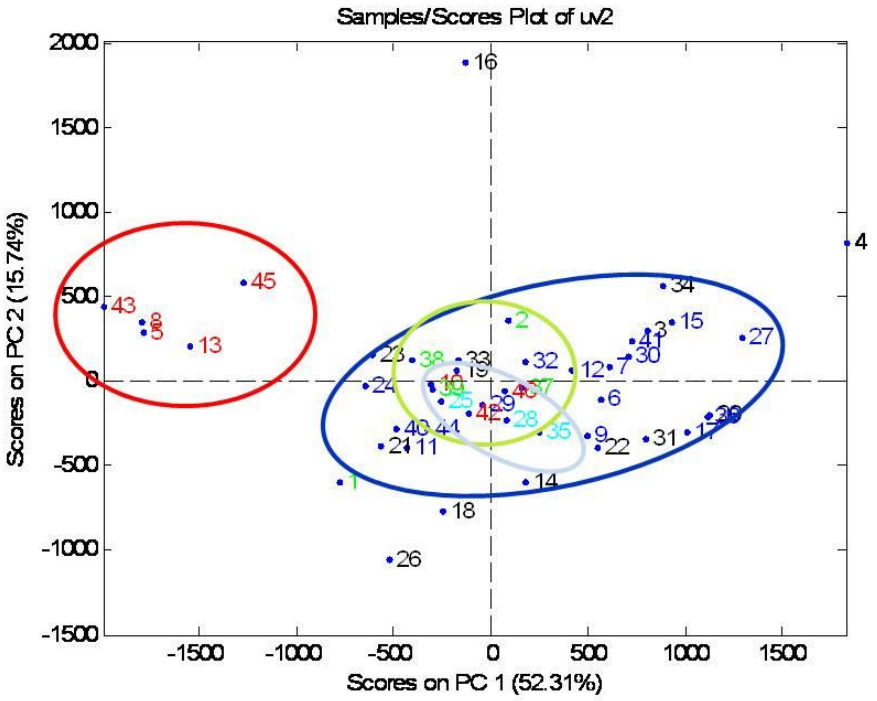
En el siguiente mapa se representan 46 muestras de vinos diferentes. Se han coloreado según D.O; se encuentran vinos de D.O Riojas, Somontanos, Penedés y Ribera del Duero. El resto de vinos analizados se presentan en color negro.



Ribera del Duero *Somontano* *Penedés* *Rioja* *Resto de vinos*

Figura 94. Mapa PCA. Representa cada una de las muestras clasificadas según D.O

En la siguiente figura, se presentan las agrupaciones encontradas dependiendo de la denominación de origen. A la izquierda, aparece una agrupación que corresponde a los vinos de D.O. Ribera del Duero. En la zona central se presentan las otras denominaciones de origen. En una zona extensa a lo largo de PC1 se encuentran los vinos con D.O. Rioja y distribuidos en zonas concretas del centro, los correspondientes a Somontano y Penedés. Del resto de muestras analizadas, cabe destacar las correspondientes a la D.O Montsant (muestras 16 y 4), que se encuentran diferenciadas de todos los demás vinos, incluidos aquellos de denominaciones de origen catalanas.



Ribera del Duero *Somontano* *Penedés* *Rioja* *Resto de vinos*

Figura 95. Mapa PCA. Representa las agrupaciones según denominación de origen.

A continuación se muestra el mapa de loadings o mapa de variables relacionadas con las muestras anteriores. En este se encuentran representados los diferentes picos seleccionados para realizar el análisis.

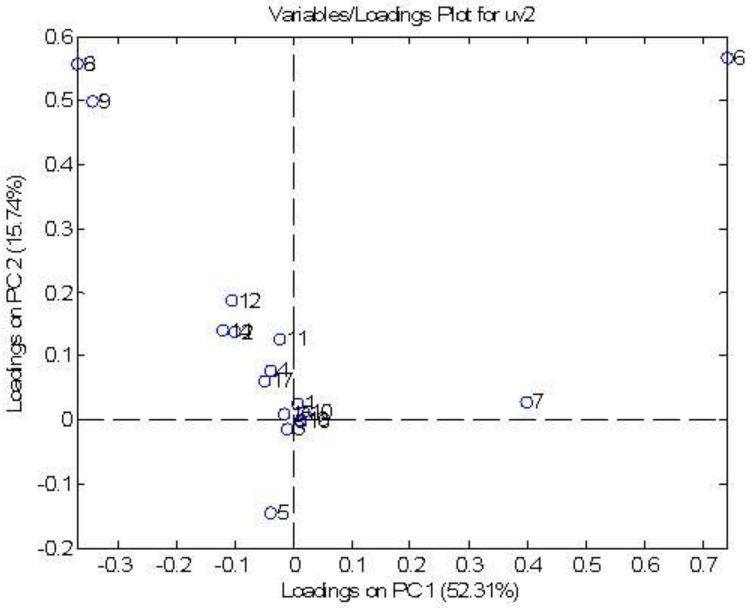


Figura 96. Mapa PCA. Representa los picos escogidos de los cromatogramas para el análisis.

Si se observan conjuntamente los mapas de muestras y de variables, puede observase que los vinos pertenecientes a la D.O. Ribera del Duero, presentan una tendencia hacia los puntos correspondientes a las variables 8 (Mezclas de ácidos vanílico y cafeico) y 9 (ácido cumárico). Otro de los picos determinados, el 6, correspondiente a una sustancia no identificada, nos permite discriminar los vinos correspondientes a la D.O. Montsant. Cabe destacar que todo y la dificultad de identificar el centenar de picos presentes en el vino, algunos de estos nos permiten discriminar entre denominaciones de origen todo y pertenecer a especies desconocidas.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

Además de cumplir con los objetivos propuestos al inicio del proyecto se pueden dar las siguientes conclusiones:

- Se han conseguido identificar los polifenoles objeto de estudio en las muestras de los vinos.
- De entra las diferentes concentraciones de Ác. Fórmico con las que se puede trabajar, se concluye que la que mejor resultados ofrece es la concentración de Ác. Fórmico al 0,1%.
- Aunque la diferencia en los cromatogramas realizados con ACN y Metanol como fase móvil orgánica no difieren mucho entre sí, se decide por motivos económicos trabajar con Metanol.
- Se observo que el gradiente óptimo era el del método VI 55.
- Con las pruebas realizadas de filtrado se observó que el filtro que mejores resultados da es el de Teflón, con el que es necesario desechar 1,5 mL del filtrado de la muestra.
- Los resultados de estabilidad indican que el vino no es estable en la mayoría de sus compuestos para estudios de larga duración, por lo que se recomienda utilizar vinos recién abiertos para el análisis de estos.
- Los vinos con D.O Rivera del Duero presentan una tendencia a contener Ác. Vanílico-Ác Cafeico y Ác. Cumárico.

CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN ECONÓMICA

Para asegurar la viabilidad de cualquier proyecto experimental se debe hacer una evaluación económica.

- El coste total del proyecto se ha dividido en cinco partes:
- Coste energéticos (luz y agua)
- Coste en material y reactivos
- Amortizaciones
- Costes personales
- Coste total

5.1. Coste energéticos

En este apartado se calcularan los gastos energéticos, agua y electricidad.

Para calcular el gasto de electricidad se han de tener en cuenta los siguientes conceptos:

- Potencia: es el resultado de multiplicar la potencia contratada por la duración del proyecto, en este caso en meses, y por el precio (kW)
- Consumo: es el resultado de multiplicar el consumo del periodo por el precio en kW·h
- Impuesto eléctrico: es la suma de la potencia y el consumo multiplicado por el coeficiente establecido por la ley
- Conservación del aparto: es el resultado de multiplicar el precio del alquiler de los equipos por el número de meses que cubre la factura

Para calcular este gasto se ha estimado una potencia de 5kW y un consumo de 50 kW·h, teniendo en cuenta que el proyecto dura 4 meses y que se ha trabajado 370h, se obtiene el coste total de electricidad del proyecto. Para calcular el coste total de electricidad se tiene que aplicar un 16% de IVA.

Para saber los gastos en agua se ha decidido fijar el consumo en 0,01 L/h de agua de la red, ya que se utiliza para realizar experimentos y para limpiar el material antes y después de su uso. De esta forma se obtiene el coste total del agua del proyecto durante estos 4 meses (370h)

Aplicando un IVA del 7% al consumo de agua, se obtiene una estimación del coste total en agua del proyecto.

Tabla 8. Coste energético

Coste electricidad	45,31 €
Coste agua	14,01 €
Coste total energético	**59,32 €**

5.2. Coste en material y reactivos

En este apartado se tiene en cuenta todo el material utilizado en el proyecto, que no es amortizable, y todos los reactivos necesarios para la realización de los experimentos.

En la siguiente tabla se detallan los costes de los reactivos utilizados, teniendo en cuenta el uso exclusivo de los mismos para la realización de este único proyecto.

Tabla 9. Coste de los reactivos.

Material	Cantidad(mL)	Precio unidad (€)	Coste (€)
Metanol	10000	61,60 (2,5 L)	246,40
Ac. Formico	100	29,90 (100 mL)	29,90
Acetonitrilo	2000	107,60 (1 L)	215,20
vinos	46	precio medio: 5,7	262,2
		Total	**491,5**

Tabla 10. Coste de los polifenoles.

Polifenol	Producto gastado aprox. g	Precio por unidad (€)	Coste (€)
3,4-dihidroxibenzoico	0,050	40,7 (25 g)	0,0814
Epicatequina	0,050	83,9 (1 g)	4,1950
Ácido 4-hidroxibenzoico	0,050	12,5 (100 g)	0,0063
Ácido vanílico	0,050	19,2 (10 g)	0,0960
Catequina hydrato	0,050	17,5 (1 g)	0,8750
Ácido cumárico	0,050	10,6 (1 g)	0,5300
Ácido siríngico	0,050	67,5 (1 g)	3,3750
Ácido cafeico	0,050	11,3 (2 g)	0,2825
Ácido gálico	0,050	50,2 (100 g)	0,0251
Ácido trans-ferúlico	0,050	17,5 (5 g)	0,1750
Quercetin hidrato	0,050	26,9 (25 g)	0,0538
Resveratrol	0,050	113,5 (0,1 g)	56,7500
Siringaledehído	0,050	19,3 (5 g)	0,1930
Quercetrina hidrato	0,050	38 (0,01 g)	190,0000
Miricetina	0,050	50,3 (0,025 g)	100,6000

3,4-dihidroxibenzaldehido	0,050	32,4 (5 g)	0,3240
Caemferol	0,050	67,7 (0,01 g)	338,5000
Tirosol	0,050	24,3 (0,1 g)	12,1500
Fisetin	0,050	43,5 (0,1 g)	21,7500
Malvin chloride	0,050	48,7 (1 g)	2,4350
Oenin chloride	0,050	117,8 (1 g)	5,8900
Galato de etilo	0,050	43,2 (100 g)	0,0216
Rutina hidrato	0,050	66,8 (50 g)	0,0668
		Total	**738,38 €**

En la tabla siguiente se pueden ver detallados los costes del material de vidrio utilizado sólo para la realización de este proyecto

Tabla 11. Coste del material fungible.

Material	**Cantidad**	**Euros (€)**	**Coste (€)**
Pipetas automáticas	3	105,00	315,00
Matraz aforado de 10 ml	2	2,50	5,00
Matraz aforado de 1L	2	13,50	27,00
Cubeta de cuarzo 10mm	2	54,00	108,00
puntas para pipetas 0-100µL	1 caja (1000u)	10,00	10,00
puntas para pipetas 10-200µL	1 caja (1000u)	10,00	10,00
puntas para pipetas 100-1000µL	1 caja (1000u)	13,30	13,30
viales de plástico	1 caja (500u)	7,00	7,00
Probeta de 10 ml	1	3,5,	3,50
Probeta de 5ml	1	3,5,	3,50
Gradillas	2	4,2,	8,40
viales cromatografia	2cajas(100u/c)	8(€)/100 u	16,00
		Total	**526,70**

El coste total de material y reactivos es: **1756,58 €**

5.3. Amortizaciones

Hay que tener en cuenta que al utilizar los aparatos del laboratorio sufren un desgaste, y esto se debe tener en cuenta como gastos del proyecto.

Para calcularlo se utiliza la siguiente fórmula:

$$Amortización = \frac{Coste. - V.residual}{Vida\ útil} \quad (1)$$

El Valor Residual será nulo ya que el material de laboratorio al fin de su vida útil no tiene ningún valor

La siguiente tabla muestra el material amortizable utilizado para este proyecto:

Tabla 12. Precio de los aparatos amortizados.

Material	**Precio (€)**	**Años amortización**	**Precio amortización (€)**
HPLC	40000,00	15	2666,67
Columna	900,00	10	90,00
Pre-columna	600,00	10	60,00
Espectrofotómetro	15000,00	15	1000,00
Fluorescencia	22000,00	15	1466,67
Balanza analítica precisión 0,0001g	1180,00	20	59,00
Total			**5342,33**

5.4. Costes personales

El coste personal se ha calculado como si el proyecto fuera realizado por una empresa, teniendo en cuenta el coste del director del proyecto, el ingeniero técnico y un técnico de laboratorio.

Los costes de personal han sido calculados a partir de la siguiente fórmula:

$$Costes\ \ personales(€) = RH \cdot \frac{SBA + SS(\frac{€}{año \cdot persona})}{\frac{horas\ trabajadas}{año}} \quad (2)$$

Donde:

RH: recursos humanos asignados al proyecto (hora · persona)

SBA: salario bruto anual

SS: cuota de empresa de la seguridad social, es un 32% sobre el SBA

Se ha considerado un total de horas anuales de 1110. Se diferencian 3 categorías profesionales, cada una de ellas pertenece a un grupo de cotización diferente, por lo que los SBA son distintos.

En la siguiente tabla se desarrolla el coste personal.

Tabla 13. Cálculo del SBA + SS

Cargo	**Salario bruto anual (SBA) (€)**	**SS=32% SBA (€)**	**SBA+SS(€)**
Director proyecto	25000	8000	33000
Ingeniero técnico	19000	6080	25080
Personal de laboratorio	12000	3840	15840

Tabla 14. Coste del personal en una empresa.

Categoría	**Horas/año**	**RH**	**SBA+SS(€)**	**Coste total (€)**
Director proyecto	1110	50	3300	1486,39
Ingeniero técnico	1110	200	25080	4518,92
Personal de laboratorio	1110	370	15840	5280,00

De manera que, la parte de personal habría costado a una empresa aproximadamente **11285,41€** teniendo en cuenta a las personas que lo ha realizado en función de las horas de dedicación.

5.5. Coste total

El coste total es la suma de todos los costes anteriores. A continuación se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 15. Coste total del proyecto.

Gastos energéticos	59,32 €
Gastos en material y reactivos	1756,58 €
Amortizaciones	5342,33 €
Costes de personal	11285,41 €
Total	**18443,64 €**

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFIA

6.1. Bibliografía de consulta

Coordinador Claude Flanzy. "Enologia: Fundamentos científicos y tecnológicos." AMV-Ediciones.. Noviembre de 2008.

Mc Master, Marvin (1994) HPLC: A Practical User's Guide. Wiley-VCH.

Skoog, Douglas A. y Leary, James J. (1994), Análisis Instrumental, Madrid: McGraw-Hill.

Rafael Molina Ubeda. "Teoria de la clarificación de mostos y vinos, y sus aplicaciones prácticas". Noviembre de 2008.

6.2. Páginas de consulta de Internet

http://www.acenologia.com/ciencia55_2.htm

http://www.bio.puc.cl/vinsalud/boletin/52mecanismos.htm

http://www.espectrometria.com/espectrometra_de_fluorescencia

http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_2_02/ali07202.pdf

http://www.labotienda.com/es/index.aspx

http://www.labquimica.wordpress.com/2008/02/07/cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-hplc/

http://www.materialparalaboratorio.es/pagina/es/1204/3

http://www.panreac.es/

http://www.quiminet.com

http://www.sigmaaldrich.com

http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0406103-215825//ivm02de14.pdf