

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias al Dr. Ramón Oliver y Dr. Santiago Hernández por darme la oportunidad de participar en este proyecto realizado en el Departamento de Quimiometría de la Universidad de Barcelona.

En segundo lugar, dar las gracias a la dirección de la parte experimental de este proyecto, al Dr. Xavier Saurina, sus consejos han hecho posible el desarrollo de este.

También agradecer a los compañeros del laboratorio de quimiometría, en especial a Anna y Toni, que me han ayudado a resolver los problemas y dudas que han ido surgiendo durante estos 4 meses.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. El vino y sus propiedades

El vino es una bebida alcohólica que se obtiene a partir de la fermentación alcohólica del zumo de uvas y por extensión la obtenida a partir de otros frutos o materiales vegetales. Su elaboración consta de 3 fases principales: obtención del mosto, su fermentación y por último su conservación y envejecimiento.

El vino forma parte de nuestra cultura desde hace aproximadamente 6.000 años. A lo largo de estos años la consideración social del vino ha ido cambiando. Hace poco tiempo que el estudio del vino estaba enfocado en los efectos adversos que producen sus componentes, ya que contiene especies químicas causantes de las alteraciones relacionadas con la seguridad alimentaria. En cambio, 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 (o sea no son nutrientes) y en los estudios se ha demostrado las propiedades biológicas como antioxidantes, antisépticos, antimutagénicas, anticarcinogénicas y antiinflamatorias 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 importantes del vino son el agua (componente mayoritario), el alcohol etílico (entre 7 y 17 grados alcohólicos), pequeñas cantidades de otros alcoholes, ácido málico, tartárico, cítrico, acético y carbónico, polifenoles (tañinos, antocianos), sustancias nitrogenadas (aminoácidos, aminos), hidratos de carbono, especies inorgánicas (potasio y fosfatos) y sustancias volátiles (aldehídos, cetonas, ésteres). La composición cualitativa y la cuantitativa depende de la clase del vino.

La calidad de los vinos se encuentra condicionada por la materia prima, los microorganismos que intervienen en la vinificación y por las condiciones tecnológicas de la elaboración.

Una Denominación de Origen es una indicación geográfica que garantiza el origen y la calidad 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, rendimiento límite por hectárea, grado alcohólico, prácticas vinícolas y envejecimiento, calidades organolépticas, etc.)

1.1.1. Vinificación

Las diversas etapas del proceso de elaboración del vino nombrado vinificación son las siguientes:

- Vendimia: es la cosecha de la uva cuando ha alcanzado el grado de maduración deseado, la composición de la cual depende de la variedad, el clima, el suelo y del agua.
- La mezcla de variedades de uva: se determina por el vino que se quiere obtener.
- La separación de la rapa: se ha de separa la parte leñosa del racimo de la uva mediante una máquina llamada despalladora.
- Obtención del mosto: 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). En otros tiempos se conseguía pisando la uva con los pies.
- Correcciones y manipulaciones del mosto: es la enyesada (con sulfato de calcio), la sulfatación (con dióxido de azufre o derivados) y la fosfatación (con fosfatos) para obtener vino de características correctas y constantes.
- Fermentación alcohólica: se vuelcan en grandes depósitos de madera o acero inoxidable donde el mosto va fermentando debido a las levaduras, transformando los azúcares en alcohol etílico y CO₂. Actualmente se acostumbra a inactivar la levadura del mosto por sulfatación y se añade la levadura seleccionada. Durante el proceso, en el cual se ha de controlar la temperatura y el aire, los restos de sólidos suben a la superficie impidiendo la correcta ventilación. La fermentación que primeramente es lenta, después es tumultuosa y finalmente vuelve a ser lenta, tiene una durada que oscila entre unos cuantos días y algunas semanas. Es importante controlar el pH de este proceso 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 antocianos (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 aun dentro de la piel del grano.
- Fermentación málico láctica: es debido a bacterias que producen la descarboxilación del ácido málico dando lugar al ácido láctico, alcoholes

y CO₂. Puede dar lugar espontáneamente después de la fermentación alcohólica o se puede inducir. Esta fermentación aporta una disminución del pH a la vez que aumenta el contenido en polifenoles y glicerol, la cual cosa da lugar a una pérdida de acidez del vino y una ganancia en suavidad y aroma, pero también puede conducir a su deterioramiento debido a la formación de aminas biogénicas, pérdida de color y aumento del 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: reposo y enfriamiento del vino que facilita su transparencia. Pasa en las bodegas y puede incluir una fermentación málico láctica espontánea. Después, el vino se vuelve a trasegar.
- Envejecimiento: químicamente, en esta etapa se producen un conjunto de oxidaciones, reducciones y esterificaciones que completan la maduración del vino, y tiene una duración que varía desde tres meses hasta más de cinco años. Tiene lugar en botas de madera, habitualmente roble, y el intercambio de aromas entre el vino y la madera le confiere a estos unos rasgos más complejos. Estos vinos serán los nombrados de Crianza, Reserva y Gran Reserva. La mayoría de vinos de mediana y baja calidad son sometidos, pero, 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 se conseguirían haciéndolos envejecer en la bodega durante tres meses.
- Embotellamiento: para obtener la calidad deseada, se puede someter el vino a diversas correcciones: alcoholización o adobamiento, adición de ácido tartárico o ácido cítrico, neutralización, corrección del color, corrección de la cata del vino dulce con azúcar o con mosto (vino vertido) y clarificación con gelatina, bentonita o enzimas.

1.2. Polifenoles en el vino

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas formadas por anillos aromáticos y caracterizados por la presencia de al menos un grupo fenol en su estructura. Son productos esenciales para la fisiología vegetal y en general, son potentes antioxidantes.

Se estima que hay más de 8.000 polifenoles diferentes. Estructuralmente van desde moléculas simples como los ácidos fenólicos a polímeros de alto peso molecular como los taninos.

Los polifenoles se subdividen de la siguiente manera:

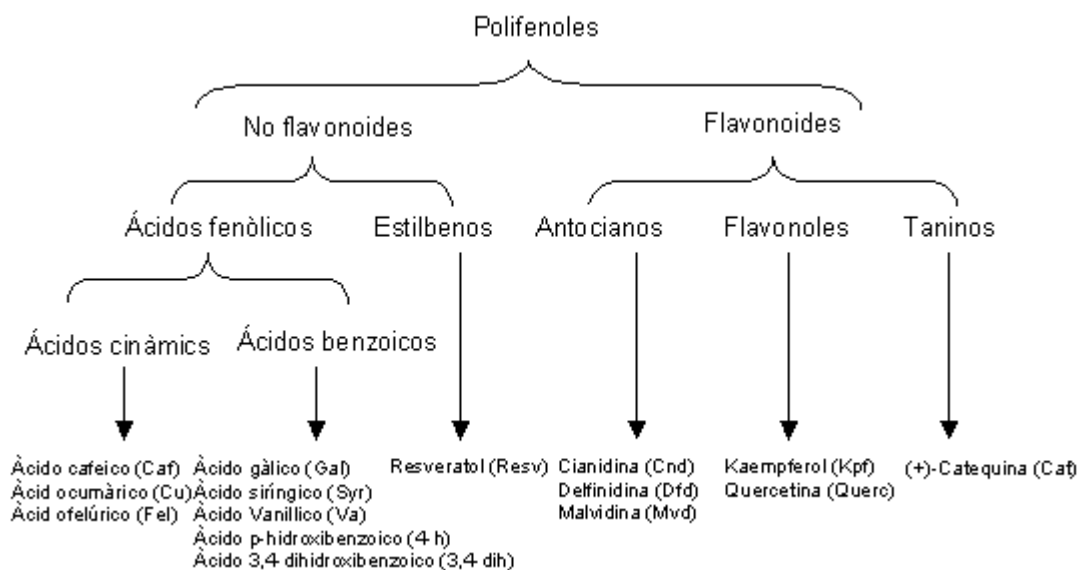


Figura 1. Clasificación de los polifenoles.

La ingesta total de polifenoles en el ser humano es difícil de calcular, pero se piensa que es muy alta, y puede superar el gramo por día en algunas poblaciones. No obstante esto, hasta hace poco tiempo, el interés nutricional de estos compuestos requiere en los efectos adversos que se producen. Estos efectos son debidos al hecho que algunos polifenoles, como ahora los taninos, precipiten proteínas presentes en los alimentos y también forman complejos insolubles con algunos oligoelementos y por lo tanto disminuyen el valor nutricional de los alimentos. Los compuestos polifenólicos de la uva se encuentra en la piel, en semillas y en la pulpa, y después del proceso de vinificación los encontraremos en el vino.

La siguiente tabla muestra el tipo de polifenol según el número de átomos de carbono y ejemplos de esos polifenoles en el vino.

Tabla 1.1. Clasificación Polifenoles

Átomos de Carbono	Esqueleto	Tipo	Ejemplos presentes en vino
6	C6	Fenoles Simples Benzoquinonas	
7	C6 - C1	Ácidos Fenólicos	Ácido Gálico
8	C6 - C2	Derivados de Tirosina Ácidos Fenilacéticos	Tirosol

9	C6 - C3	Ácidos cinámicos Fenilpropenos Cumarinas	Ácido Cafeico
10	C6-C4	Naftoquinones	
13	C6 -C1-C6	Xantonas	
14	C6- C2-C6	Estilbenos Antraquinones	Resveratrol
15	C6-C3-C6	Flavonoides Isoflavonoides	Quercetina Cianidina Catequina Miricetina Malvidina
18	(C6-C3)2	Lignanós Neolignanós	
30	(C6-C3-C6)2	Bioflavonoides	
n9	(C6-C3)n	Ligninas	
n6	(C6)n	Melaninas Catecolicas	
n15	(C6-C3-C6)n	Taninos Condensados	Procianidina

1.2.1. Papel de los polifenoles en el vino

Los polifenoles se les atribuye diferentes efectos beneficiosos para la salud humana, ya que la mayoría de estos compuestos actúan como antioxidantes y, por lo tanto, podrían tener efectos beneficiosos sobre enfermedades en que la oxidación representa un papel importante (enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson, el proceso de envejecimiento o el cáncer). En la última década los compuestos polifenólicos han despertado un gran interés en la comunidad científica. Muchos se investigan con profundidad para determinar si resultan útiles como anticancerígenos y en el tratamiento de otras enfermedades de gran trascendencia social.

Los polifenoles se encuentran en todos los tipos de vinos, pero en cantidades diferentes. F. Leighton y I. Urquiaga en su estudio [1] de polifenoles dan valores equivalentes a los de la tabla 1.3 donde se comparan diversas bebidas [2]. El vino tinto contiene muchos más polifenoles que el blanco, mientras que los vinos rosados se encuentran en una posición intermedia. Además, se han realizado diversos estudios que demuestran que el vino tinto presta mayor protección cardiovascular a diferencia del vino blanco.

Tabla 1.2. Concentración en mg/L de algunos constituyentes polifenólicos del vino.

Polifenoles	Vino tinto	Vino blanco
Ácido gálico	95	7
Catequina	191	35
Epicatequina	82	21
Ácido cafeico	7,1	2,8
Cianidina	2,8	0,0
Malvidina 3-glucosa	23,5	1,0
Rutina	9,1	0,0
Miricetina	8,5	0,0
Quercitina	7,7	0,0
Resveratrol	1,5	0,03

Tabla 1.3. contenido total de polifenoles en diversas bebidas.

Contenido total de polifenoles (mg/L)	
Vino tinto	1000-4000
Vino blanco	200-300
Cerveza	60-100
Te	750-1050

En un estudio de un vino tinto Cabernet Sauvignon se hizo un fraccionamiento y análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) obteniéndose como resultado tres fracciones:

- Polifenoles neutros
- Polifenoles ácidos
- En la fracción acuosa residual las antocianinas. [3]

La fracción de polifenoles hidrosolubles representa el 71% de sus componentes fenólicos por lo tanto lo más importante en cuanto a capacidad antioxidante. A

pesar de estola fracción de polifenoles neutros es la que tuvo mayor actividad antioxidante por unidad de concentración de polifenoles.[4]

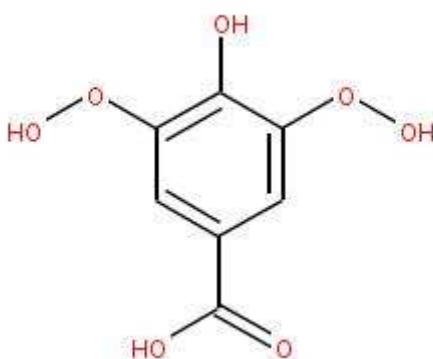
Como ejemplo de los polifenoles, hablamos del resveratrol, que es un producto natural que se encuentra principalmente en la piel y piñones de la uva, y se unen a las lipoproteínas humanas de baja densidad (LDL) después de un consumo moderado de vino. Es un potente antioxidante al que se le atribuyen diferentes efectos beneficiosos como actividad antiinflamatoria y antitumoral, ayuda a reducir el riesgo de enfermedades coronarias, y recientemente se asocia a la protección de enfermedades neurodegenerativas. Su contenido en el vino depende de la variedad de uva y de la tecnología aplicada en la producción vinícola. [5-7]

1.2.2. Polifenoles Utilizados

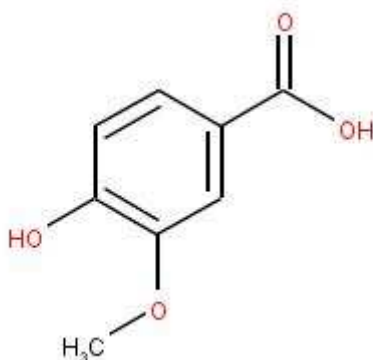
A continuación se muestra una lista con la clasificación y la estructura de cada uno de los polifenoles estudiados en este proyecto:

1. Ácidos Fenólicos

- Ácido Siríngico



- Ácido Gálico

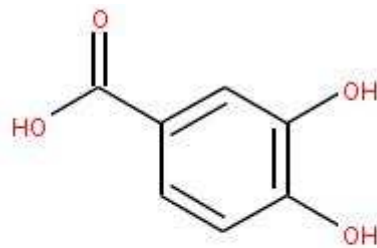


- Ácido Vanílico

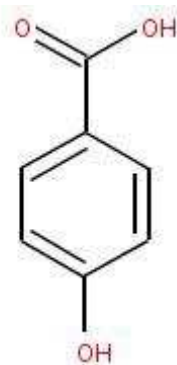


- 3,4-dihydroxibenzoico

-

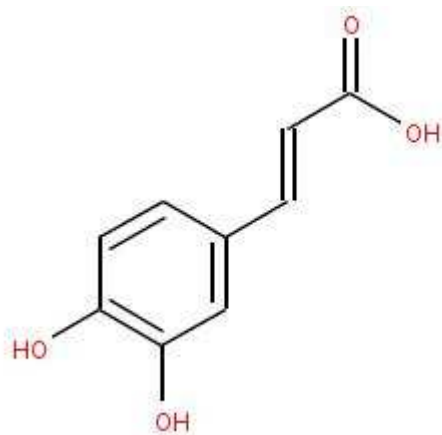


- 4-hidroxibenzoico

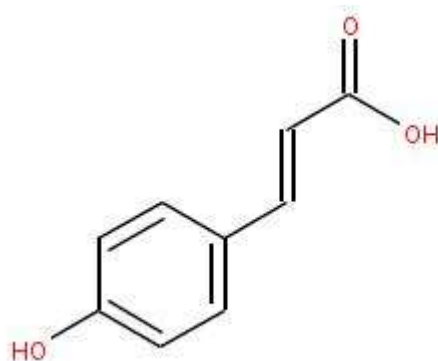


2. - Ácidos Cinámicos

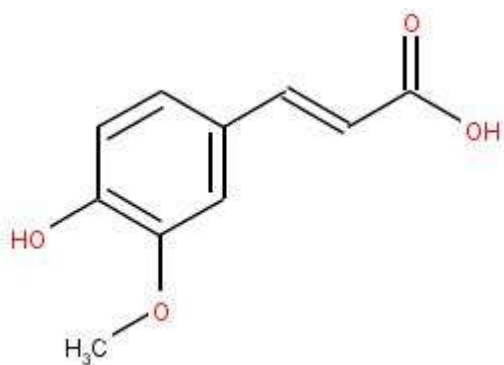
- Ácido Cafeico



- Ácido Cumárico

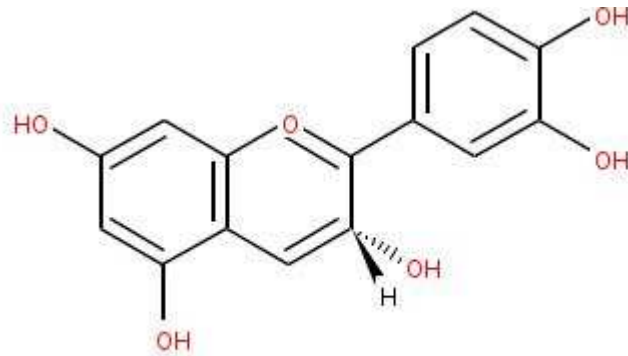


- Ácido Felúrico

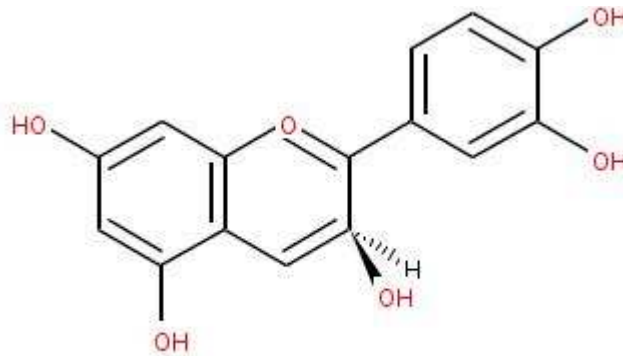


3. - Flavonoides

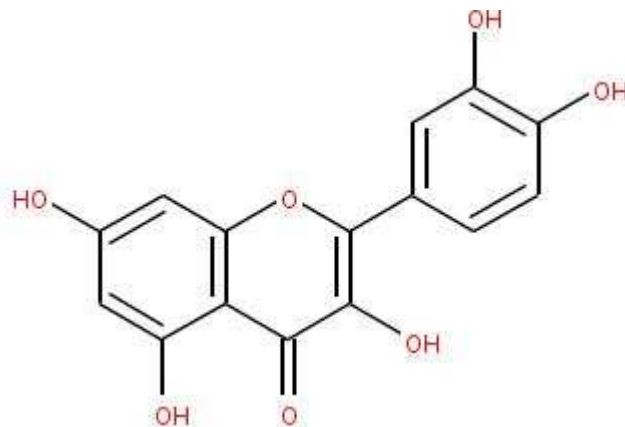
- Epicatequina



- Catequina



- Quercetina



1.3. Métodos analíticos para la determinación y caracterización de los polifenoles en el vino

Los polifenoles son los compuestos más relacionados con las propiedades organolépticas del vino. La caracterización de los vinos respecto a los polifenoles esta enfocada más en este sentido que no con el proceso vinícola, a pesar de que la composición de compuestos polifenólicos también se puede caracterizar los vinos según la región, el tipo de uva, el envejecimiento, etc.

La determinación polifenoles se suele llevar a cabo mediante técnicas de separación como HPLC [8,9] CE [10-12] o GC [13-15]. Estos métodos realizan la detección mediante técnicas espectrofotométricas, fluorimétricas o acoplamiento a MS. También se han descrito métodos inmunológicos y enzimáticos [16,17] de gran interés debido a la rapidez del análisis.

El contenido de los polifenoles en los vinos mantiene una fuerte dependencia con el clima, la agricultura y las prácticas vinícolas. Este perfil composicional puede dar información relevante. La composición elemental e isotópica [18], el contenido de polifenoles [19,20] y las impurezas volátiles [21] han estado utilizadas en diversos estudios para clasificar y correlacionar los vinos según la vinificación, los orígenes o otros factores.

El análisis por componentes principales (PCA) es el método quimiométrico más utilizado para un estudio preliminar de las propiedades de los vinos a partir de los datos de los perfiles composicionales anteriormente nombrados. Otros métodos como el análisis de agrupaciones (CA), el análisis discriminante lineal (LDA), las redes neuronales artificiales (ANN) y la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) se utilizan para obtener clasificaciones más específicas. De todos ellos se da una descripción en [22].

La caracterización de los vinos según la familia de compuestos estudiada la caracterización se enfoca en una dirección o en otra. Los estudios realizados con polifenoles se decantan para caracterizar los vinos según sus propiedades organolépticas. También hay estudios que tratan de extraer información de otras propiedades.

1.4. Técnicas utilizadas

1.4.1. Cromatografía de líquidos (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia o *High performance liquid chromatography* (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna.

El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

En la HPLC isocrática 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.

1.4.2. *Electroforesis Capilar (CE)*

Se basa en una técnica de separación de analitos mediante la aplicación de un campo eléctrico. El gran poder de separación, eleva eficacia y bajo consumo de muestra, esta técnica resulta adecuada para separar muchos analitos en una gran diversidad de áreas. Sus límites de detección están condicionados por el pequeño volumen de muestra introducida en el capilar, generalmente del orden de pocos nL. Para facilitar la detección se ha desarrollado diversas estrategias de derivatización. [23]

1.4.3. *Espectrofotometría*

La espectrofotometría es un método de análisis óptico que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

Todas las sustancias pueden absorber energía radiante, aun el vidrio que parece ser completamente transparente absorbe radiaciones de longitudes de onda que no pertenecen al espectro visible; el agua fuertemente en la región del infrarrojo.

La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química.

Cuando la luz atraviesa una sustancia, parte de la energía es absorbida; la energía radiante no puede producir ningún efecto sin ser absorbida.

El color de las sustancias se debe a que éstas absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y solo dejan pasar a nuestros ojos aquellas longitudes de onda no absorbidas.

La Ley de Beer declara que la cantidad de luz absorbida por un cuerpo depende de la concentración en la solución.

1.4.4. *Fluorescencia*

La fluorescencia es la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones del tipo ultravioleta, rayos catódicos o rayos X. Las radiaciones absorbidas (invisibles al ojo humano), son transformadas en luz visible, o sea, de una longitud de onda mayor al incidente.

En el proceso, una molécula absorbe un fotón de alta energía, se excita y después emite como un fotón de baja energía (mayor longitud de onda). La diferencia de energía entre la absorción y la emisión, es disipada como calor (vibraciones moleculares). En la fluorescencia todo el proceso es muy corto

(>10⁻⁵ s) y este intervalo de tiempo es la principal diferencia con otro conocido fenómeno luminoso, la fosforescencia (<10⁻⁵ s).

1.5. Métodos quimiométricos para el tratamiento de datos

El análisis por componentes principales (PCA) se basa en concentrar la información de un sistema, que originalmente puede estar contenida en un gran número de variables. Los componentes principales se obtienen por combinación lineal de las variables originales a través de una serie de transformaciones, de modo que el primer componente principal describe la máxima cantidad de información posible referente al sistema. El segundo componente principal, por su parte, es ortogonal o perpendicular al primero y describe la máxima cantidad de la información residual. De esta forma se van calculando los componentes principales superiores hasta que toda la información relevante del sistema queda descrita. El análisis por componentes principales actúa a modo de filtro de datos, eliminando la información repetitiva y las variaciones aleatorias asociadas al proceso experimental. Puede utilizarse para una caracterización preliminar de los datos y para establecer pautas y dosificaciones.

El PCA descompone la matriz de datos experimentales en sus componentes principales de la siguiente forma:

$$R = TP^T + E \quad (1)$$

Siendo R la matriz experimental, T la matriz de coordenadas principales o *scores* que contiene las coordenadas de cada muestra en el nuevo espacio de componentes principales, P la matriz de vectores propios, autovectores o *loadings*, todos ellos ortogonales entre sí, que representan la dirección de los componentes principales en el espacio de las variables originales, y E la matriz de error de la reproducción de los datos en sus componentes principales. El superíndice T se utiliza para indicar la matriz transpuesta.

Normalmente, suelen representarse los *scores* del primer componente principal con respecto a los *scores* del segundo. De esta forma, se consigue una distribución bidimensional de los objetos en la que pueden apreciarse las diferentes agrupaciones y los objetos que se separan de ellas. En ciertos casos particulares son interesantes las representaciones de los componentes principales superiores. También, las representaciones de los *loadings* proporcionan un información muy útil acerca de la relevancia de las variables y de sus posibles correlaciones.

CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos

Reactivos y disolventes:

- Tetraborato de sodio decahidratado (Merck, reactivo analítico)
- Hidróxido de sodio (Merck, reactivo analítico)
- Metanol (Merck, reactivo para HPLC)
- 2-Propanol (Merck, reactivo para HPLC)
- Agua Milli-Q (Millipore)
- Ácido Fosfórico (Merck, reactivo analítico)

Polifenoles:

- Ácido Gálico (Gal)
- 3,4-dihidroxibenzoico (3,4-h)
- Catequina (Cat)
- 4-hidroxibenzoico (4-h)
- Epicatequina (Epi)
- Ácido Siringico (Syr)
- Ácido Cafeico (Caf)
- Ácido Vanílico (Van)
- Ácido Cumárico (Cum)
- Ácido Felúrico (Fel)

- Resveratrol (Resv)

2.2. Soluciones

Las soluciones madre de cada uno de los polifenoles se han preparado en concentraciones de 100 mM en metanol.

A partir de las soluciones madre se han preparado todas las soluciones de trabajo utilizando agua Milli-Q como disolvente.

Todas las soluciones se mantienen en el frigorífico.

2.3. Muestras de vino

De cada vino se almacena en la nevera 30 mL en un recipiente de plástico, sin filtrar y sin desgasificar.

- 5 viñas, d.o. Tierra de Extremadura, Tempranillo y Garnacha 2007, Joven (M1)
- Castillo de Liria, d.o Liria, 2007, Joven (M2)
- Viña Fadri, d.o. Catalunya, 2007, Joven (M3)
- Don Luciano, d.o. La Mancha, 2006, Crianza (M4)
- Finca Resalso, d.o. Ribera del Duero, Tinto Fino (100%) 2006, Crianza (M5)
- Torres Coronas, d.o. Catalunya, Ull de llebre (100%) 2004, Crianza (M6)
- Señorío de los Llanos, d.o. Valdepeñas, Tempranillo 2005, Crianza (M7)
- Josep Foraster, d.o. Conca de Barberà, Cabernet Sauvignon, Tempranillo 2008, Joven (M8)
- Clos Gebrat, d.o. Priorat, 2007, Joven (M9)
- Abadia Raimat, d.o. Costers del Segre 2006, Crianza (M10)
- René Barbier, d.o. Penedès, Ull de llebre 70%, Cabernet Sauvignon 20% y Merlot 10% 2004, Reserva (M11)
- Raimat viña 32, d.o. Costers del Segre, Cabernet Sauvignon 2005, Crianza (M12)
- Señorío de los Llanos, d.o. Valdepeñas, Tempranillo 2007, Joven (M13)
- Estola, d.o. La Mancha, Tempranillo 2006, Crianza (M14)
- Pata Negra, d.o. Valdepeñas, Tempranillo 2001, Gran Reserva (M15)
- Finca Vieja, d.o. La Mancha, tempranillo 1999, Gran Reserva (M16)
- Protos, d.o. Ribera del Duero, Tinta del País 2007, Joven (M17)

- Tilenus, d.o. Bierzo, Mencía 2007, Joven (M18)
- Bajoz, d.o. Tinta de Toro, 2007, Joven (M19)
- Valpincia, d.o. Ribera del Duero, 2006, Crianza (M20)
- Señorío de Arriezu, d.o. Rioja, 2008, Joven (M21)
- Tierras Reina, d.o. Rioja, 2007, Joven (M22)
- Viña Zaco, d.o. Rioja, Tempranillo 2006, Crianza (M23)
- Viña Vial, d.o. Rioja, Tempranillo, Garnacha Tinta y Mazuelo 2004, Reserva (M24)
- Duque de Azara, d.o. Somontano, Sauvignon Tempranillo y Merlot 2007, Joven (M25)
- Duque de Azara, d.o. Somontano, Sauvignon Tempranillo y Merlot 2005, Crianza (M26)
- Señorío de Lazán, d.o. Somontano, Cabernet Sauvignon, Moristel y Tempranillo 2004, Reserva (M27)
- Irache, d.o. Navarra, Tempranillo, Cabernet Sauvignon y Garnacha 2007, Joven (M28)
- Gran Feudo, d.o. Navarra, Tempranillo, Garnacha y Cabernet Sauvignon 2004, Reserva. (M29)

2.4. Instrumentación y Aparatos

Los instrumentos y aparatos utilizados 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 μ L y detector de fluorescencia G1321A. la inyección de las muestras se lleva a cabo mediante una válvula de inyección de seis puertos Rheodyne 7725(i) con un helicoide de 20 μ L de volumen.
- Columna cromatográfica Synergi Hydro-RP C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i.) y 4 μ m de diámetro de partícula de Phenomenex con una precolumna C18 (4mm x 3mm d.i.) de la misma casa.
- Electroforesis Capilar (HP 3D CE, Agilent Technologies, Germany), equipada con un detector en serie de diodos y refrigeración del capilar por aire.
- Capilares de sílice fundida de 75 μ m d.i. x 375 μ m d.e., 670 mm de longitud total y 587 mm de longitud efectiva. (CMS, Reino Unido)
- Espectrofotómetro Perkin-Elmer λ -19, controlado por ordenador
- Espectrofluorímetro Aminco serie 2 modelo AB2.

- Micropipetas automáticas de 10, 100, 1000 y 5000 μL (Nichipet EX, Nichiryo Co., Japan)

2.5. Procedimiento experimental

2.5.1. Cromatografía de líquidos (HPLC)

Para la separación de los polifenoles se ha utilizado una columna cromatográfica Synergi Hydro-RP C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i.) y 4 μm de diámetro de partícula de Phenomenex con una precolumna C18 (4mm x 3mm d.i.) de la misma casa.

El eluyente A, solución acuosa, es ácido fosfórico a una concentración de 9 mM, y el eluyente B, solución orgánica, es metanol 100%. El caudal es de 1 mL / min.

Tabla 2.1. Tabla del gradiente.

Tiempo (min)	0	20	22	27	28
% Eluyente B	5	60	95	95	5

Se inyecta un volumen de 20 μL de cada vino filtrado previamente con un filtro de 45 μm con ayuda de una jeringa.

La detección se ha realizado a 280 nm, 320 nm, 360 nm y 520 nm con el detector UV-Visible. En el detector de fluorescencia la detección esta comprendido en un intervalo de 260 – 375 nm. Para la obtención de datos se ha utilizado el software suministrado por el fabricante (HP ChemStation).

2.5.2. Electroforesis Capilar (CE)

Para la separación de los polifenoles se ha utilizado un capilar de sílice fundida de 75 μm d.i. x 375 μm d.e., 670 mm de longitud total y 587 mm de longitud efectiva. El electrolito de separación es bórax 20 mM (pH acuoso 9,2) con un 20% de 2-isopropanol. El potencial de separación es + 25 KV y las intensidades obtenidas del orden de 30 μA .

La temperatura de termostatación del capilar de 25°C. La detección se ha realizado a 230 nm con un detector en serie de diodos y para la obtención de datos se ha utilizado el software suministrado por el fabricante (HP ChemStation).

Acondicionamiento del capilar

Antes de la primera inyección del día, el capilar se ha de activar con NaOH 0,1 M durante 20 min, 5 min de agua y 3 min de electrolito, todos ellos a una presión de ~ 1 bar finalmente se ha de equilibrar el capilar con el electrolito de separación aplicando el potencial de trabajo durante 30min. Antes de cada inyección se proceden a un pre-condicionamiento de capilar con NaOH 0,1 M durante 2 minutos seguido de 1 min de agua y 2 min de electrolito todos ellos a una presión de ~ 1 bar.

2.5.3. Espectrofotometría

Se han registrado los espectros UV-Visible de cada muestra de vino en un intervalo de longitud de onda comprendido entre 200 nm y 900 nm.

Las muestras de vino se diluyen en agua Milli-Q.

Se trabaja con 100 μ L de vino que se lleva a un matraz de 10 mL y se enrasa con agua Milli-Q.

Se utiliza como blanco el agua Milli-Q.

2.5.4. Fluorescencia

Se han registrado los espectros de excitación – emisión de 29 muestras de vino en un intervalo de longitud de onda de excitación entre 250 nm y 275 nm y de emisión entre 260 nm y 460 nm. El objetivo, es determinar el punto máximo de excitación y el de emisión.

Las muestras de vino se diluyen en agua Milli-Q.

Se trabaja con una solución de 200 μ L de vino en un matraz de 10 mL enrasado con agua Milli-Q.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Cromatografía de líquidos (HPLC)

En este apartado, se describirán todos los estudios realizados para separar el mayor número de compuestos polifenólicos. Como criterio de optimización, las condiciones experimentales de separación han de permitir separar el máximo número de analitos en el menor tiempo de análisis.

Se han fijado algunas de las condiciones cromatográficas:

- Eluyente A: 9 mM H₃PO₄ (pH = 2,5)
- Eluyente B: Metanol 100 %
- Caudal de 1mL/min
- $\lambda = 280, 320, 360, 520$ nm
- Columna cromatográfica: Synergi Hydro-RP C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i.) y 4 μ m de diámetro de partícula de Phenomenex
- Precolumna C18 (4mm x 3mm d.i.) de Phenomenex

3.1.1. *Optimización del gradiente de elución*

a) Estudio de muestras sintéticas de polifenoles

Se ha analizado el comportamiento cromatográfico de 11 polifenoles (ácido gálico, 3,4-dihidroxibenzoico, 4-hidroxibenzoico, catequina, epicatequina, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido felúrico, resveratrol) de los cuales se ha estudiado el tiempo de retención y los espectros de cada uno.

Se ha preparado una solución madre de polifenoles de 25 μ L de cada polifenol en 2 mL de metanol, a partir de las soluciones madre 100 mM preparadas en metanol. Y de la solución anterior se prepara otra de 200 μ L en 1mL de agua Milli-Q teniendo así una concentración de 0,0025 mM.

Con esta última solución, se estudia el comportamiento de los polifenoles en función del porcentaje inicial del eluyente B (Metanol) de la pendiente del gradiente de metanol generado. En la tabla 3.1 se muestra el diseño experimental utilizado.

Para asegurar que entre cada análisis la columna esté estabilizada se añade un periodo de 5 minutos más al final, llamado post-time.

Tabla 3.1. Optimización de la programación del gradiente de elusión para las muestras sintéticas de polifenoles.

Método						
A)	Tiempo (min)	0	15	17	19	20
	% Eluyente B	0, 5, 10	60	95	95	0, 5, 10
B)	Tiempo (min)	0	20	22	24	25
	% Eluyente B	0, 5, 10	60	95	95	0, 5, 10
C)	Tiempo (min)	0	25	27	29	30
	% Eluyente B	0, 5, 10	60	95	95	0, 5, 10
D)	Tiempo (min)	0	30	32	34	35
	% Eluyente B	0, 5, 10	60	95	95	0, 5, 10

Comprobamos que los picos salen bien definidos, es decir, sin cola y que se pueden identificar todos ellos excepto 3 polifenoles que son difíciles de separar adecuadamente.

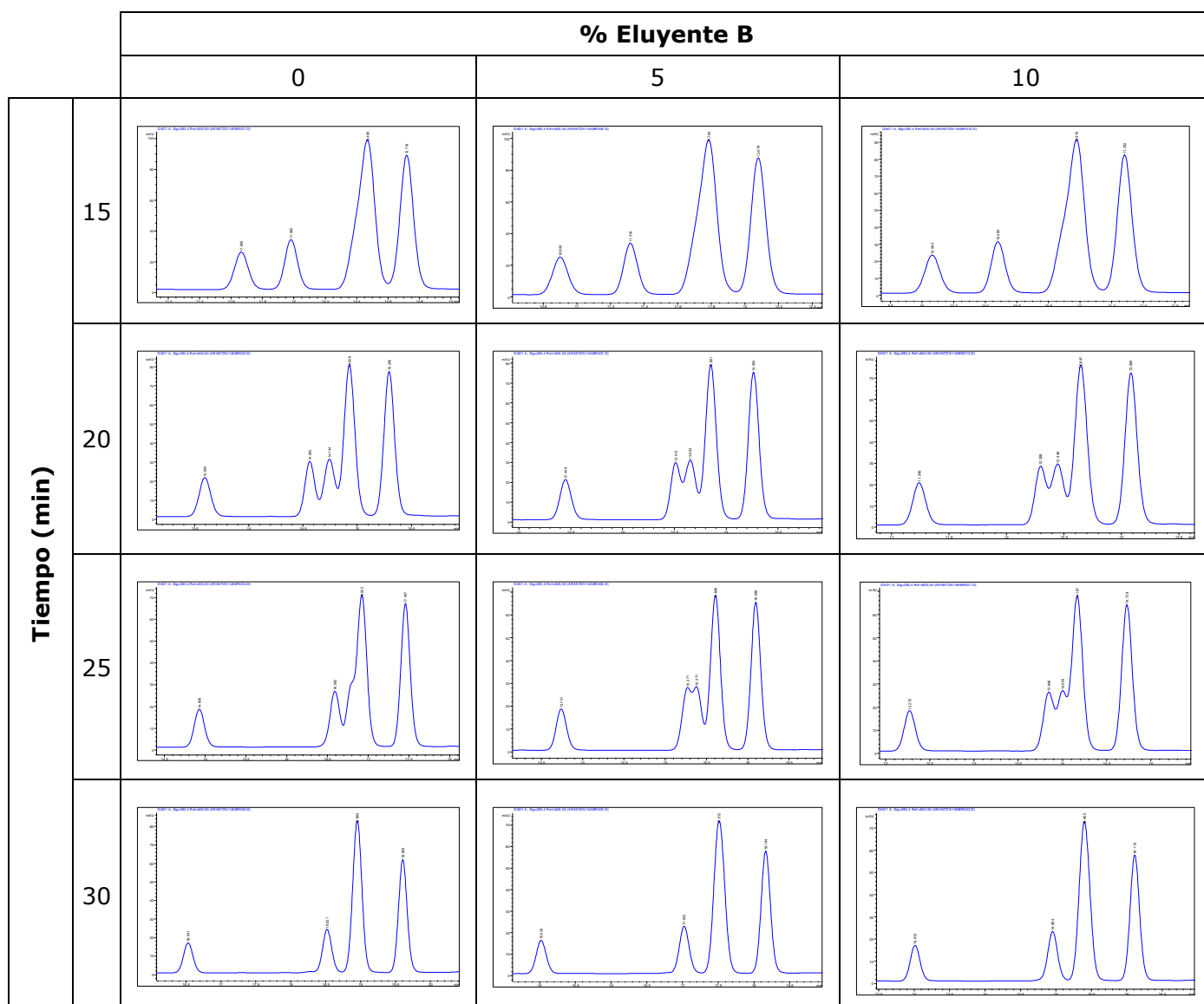
Estos polifenoles son:

Tabla 3.2. Polifenoles

Polifenol	Peso molecular	Familia
Epicatequina	290.27	Flavonode
Ácido vanílico	168.15	Ácido Fenólico
Ácido Cafeico	180.16	Ácido Cinámico

En la tabla 3.3 se refleja los tres polifenoles sintéticos que no se han podido definir correctamente en función del porcentaje inicial de eluyente B frente al tiempo que transcurre la pendiente del gradiente de metanol generado (60%).

Tabla 3.3. Optimización de la programación del gradiente de elución de separación de polifenoles.



b) Estudio con una muestra de vino

En este apartado, se estudia una muestra de vino filtrada previamente con un filtro de 45 μm para asegurar que no entra ninguna partícula que pueda obstruir la precolumna y la columna.

Se estudia el comportamiento de los polifenoles en función del porcentaje inicial del eluyente B (Metanol) de la pendiente del gradiente de metanol generado. En la tabla 3.4 se muestra el diseño experimental utilizado.

En este caso se amplía el tiempo de post-time a 10 minutos para asegurar que la columna está estabilizada y preparada para el siguiente análisis.

Tabla 3.4. Optimización de la programación del gradiente de elusión aplicada en muestras comerciales de vino.

Método

E)	Tiempo (min)	0	15	17	22	23
	% Eluyente B	0, 5, 10	60	95	95	0, 5, 10
F)	Tiempo (min)	0	20	22	27	28
	% Eluyente B	0, 5, 10	60	95	95	0, 5, 10
G)	Tiempo (min)	0	25	27	32	33
	% Eluyente B	0, 5, 10	60	95	95	0, 5, 10
H)	Tiempo (min)	0	30	32	37	38
	% Eluyente B	0, 5, 10	60	95	95	0, 5, 10

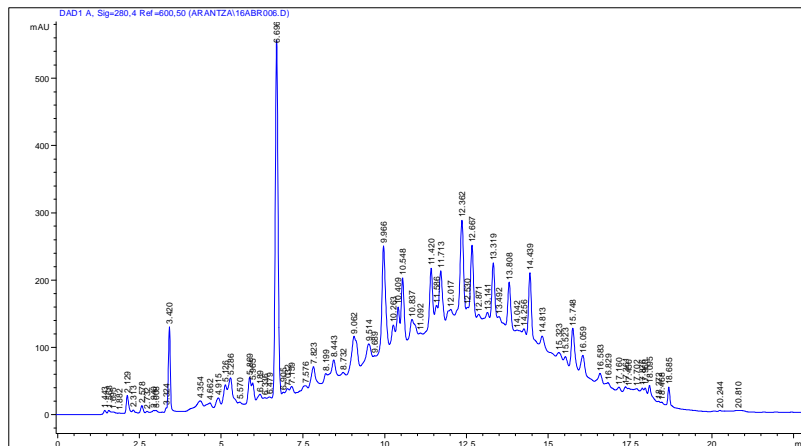


Figura 3.1. Cromatograma de una mezcla de vino. 0% de eluyente B inicial a 15 min.

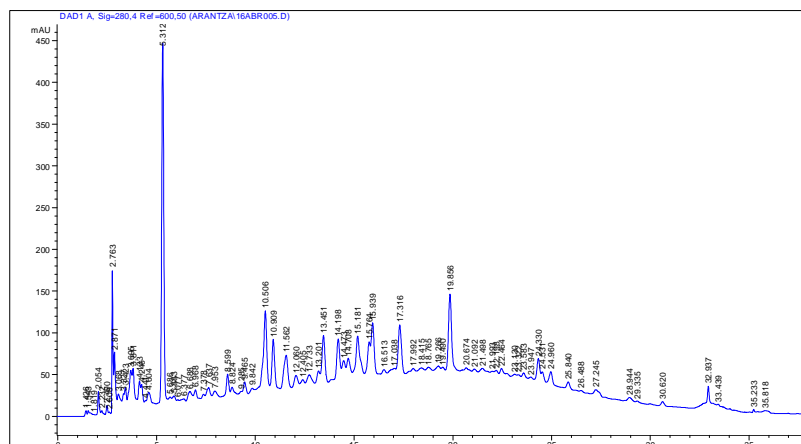


Figura 3.2. Cromatograma de una mezcla de vino. 10% de eluyente B inicial a 30 min.

En este caso, a diferencia del estudio de los polifenoles no se puede apreciar con facilidad cuál de los estudios es el más adecuado como se puede ver en los ejemplos de las representaciones cromatográficas, por lo tanto, se hace un tratamiento de datos.

Este tratamiento consiste en:

1. Seleccionar todos los picos del cromatograma (n picos).
2. Eliminar todos los picos con una altura inferior a 3 mAU (n picos filtrados).
3. Escoger el último pico del cromatograma como referencia para establecer el tiempo de análisis.

Tabla 3.5. Tratamiento de datos para optimizar el método.

Método		Pico ref. (min)	n Picos	n Picos Filtrados
% Eluyente B	Tiempo (min)*			
0	15	18.685	75	71
0	20	18.646	73	70
0	25	18.604	70	67
0	30	23.548	83	79
5	15	23.517	80	77
5	20	23.428	85	83
5	25	28.394	93	91
5	30	28.286	86	86
10	15	28.174	82	77
10	20	33.197	85	83
10	25	33.083	87	86
10	30	32.937	79	77

* Tiempo que dura el gradiente de elusión aplicado. Es decir, desde el %B inicial hasta el 60% de B.

4. Seleccionamos dos criterios para tratar los datos obtenidos:

a) Factor de tiempo (d_{tiempo})

Se da el valor 1 cuando el tiempo es inferior a 15 min y se da el valor 0 al tiempo que supere 30 min.

En este caso interesan los valores más próximos a 1 (óptimo) que los próximos a 0.

Estos límites se fijan por criterio propio.

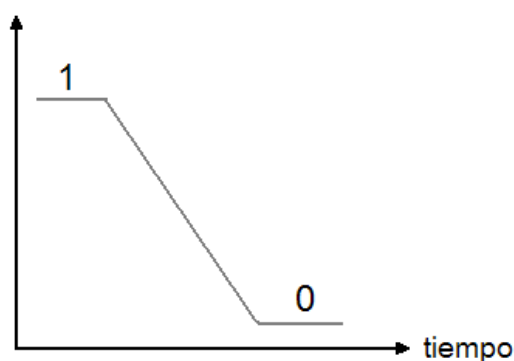


Figura 3.3. Representación gráfica del criterio factor tiempo.

Se aplica la siguiente ecuación:

$$d_{\text{tiempo}} = \frac{\text{Límite Superior} - \text{Pico de Referencia}}{\text{Límite Superior} - \text{Límite Inferior}} \quad (2)$$

Donde,

Límite Inferior = 15 min

Límite Superior = 30 min

b) Número de picos (d_{picos})

Se da el valor 0 cuando el número de picos es inferior a 50 picos y se da el valor 1 al número de picos que supere 100 picos.

En este caso interesan los valores más próximos a 1 (óptimo) que los próximos a 0.

Estos límites se fijan por criterio propio.

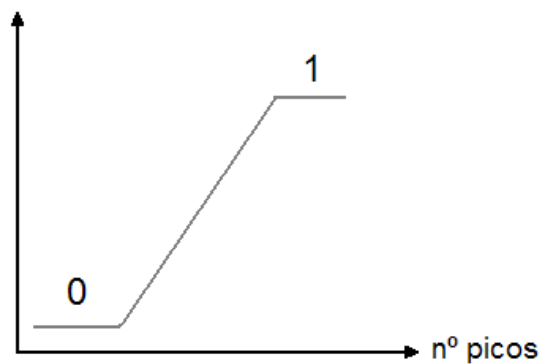


Figura 3.4. Representación gráfica del criterio número de picos.

Se aplica la siguiente ecuación:

$$d_{\text{picos}} = \frac{n \text{ Picos Filtrados} - \text{Límite Inferior}}{\text{Límite Superior} - \text{Límite Inferior}} \quad (3)$$

Donde,

Límite Inferior = 50 picos

Límite Superior = 100 picos

Estos criterios se relacionan mediante la función conjunta:

$$D_{\text{conjunta}} = \left(d_{\text{picos}} \cdot d_{\text{tiempo}} \right)^{1/2} \quad (4)$$

Tabla 3.5. Relación de los criterios según la función conjunta.

Método		d_{tiempo}	d_{picos}	D_{conjunta}
% Eluyente B	Tiempo* (min)			
0	15	0.82	0.42	0.52
0	20	0.82	0.40	0.50
0	25	0.82	0.34	0.44
0	30	0.57	0.58	0.60
5	15	0.57	0.54	0.56
5	20	0.58	0.66	0.65
5	25	0.33	0.82	0.66
5	30	0.34	0.72	0.59
10	15	0.34	0.54	0.50
10	20	0.09	0.66	0.41
10	25	0.10	0.72	0.44
10	30	0.10	0.54	0.36

* Tiempo que dura el gradiente de elusión aplicado. Es decir, desde el %B inicial hasta el 60% de B.

Como se puede observar en la función (D_{conjunta}) hay dos posibles métodos que podrían ser óptimos, 0.65 y 0.66.

Se elige el método con 5% eluyente de B inicial y duración de 20 minutos, porque los valor de d_{tiempo} y d_{picos} son, en comparación al otro método, más iguales entre ellos.

De esta manera se ha optimizado el método que queda de la siguiente manera:

Tabla 3.6. Gradiente optimizado.

Tiempo (min)	0	20	22	27	28
% Eluyente B	5	60	95	95	5

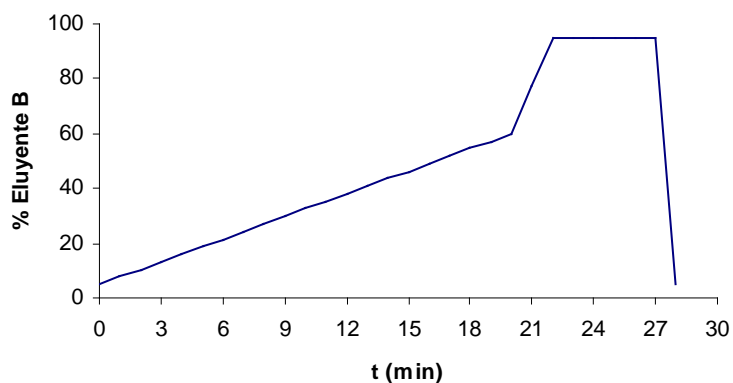


Figura 3.5. Representación gráfica del gradiente optimizado.

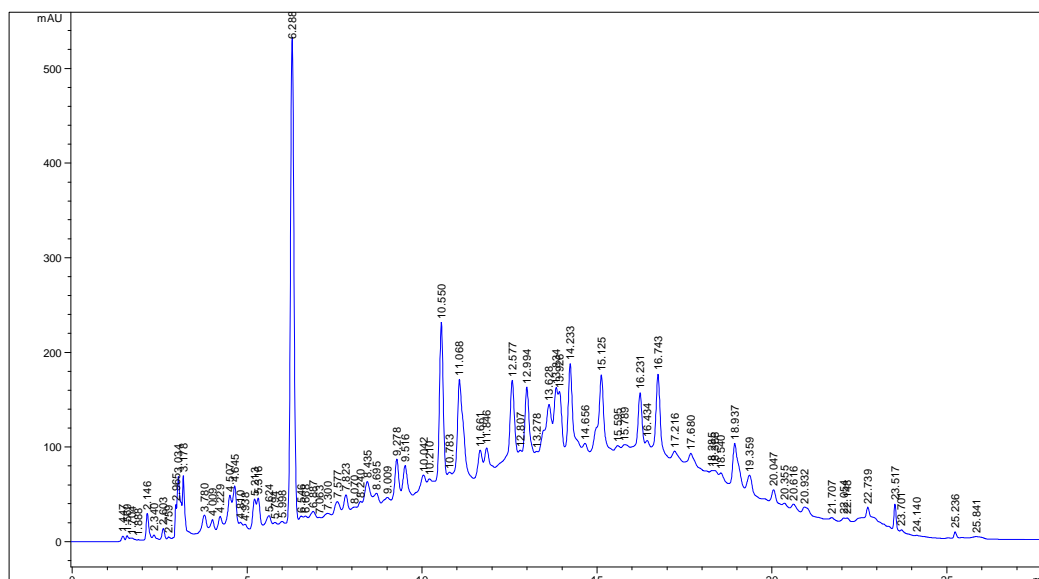


Figura 3.6. Cromatograma de una muestra de vino utilizando el gradiente optimizado.

3.1.2. Identificación de polifenoles en muestras vino

En este apartado se intenta identificar los polifenoles que anteriormente se han estudiado en una muestra concreta de vino.

Con las condiciones mencionadas anteriormente y con el gradiente de elución que se ha establecido en el *apartado 3.1.1.* se analiza:

1. Solución de polifenoles.

Se coge 200 μL de la solución madre de polifenoles y 800 μL de agua Milli-Q.

2. Muestra de vino diluida.

Se coge 200 μL de agua Milli-Q y 800 μL de vino.

3. Muestra adicionada.

Se coge 200 μL de la solución madre de polifenoles y 800 μL de vino.

Se ha obtenido los siguientes cromatogramas de los cuales se han podido identificar los polifenoles indicados:

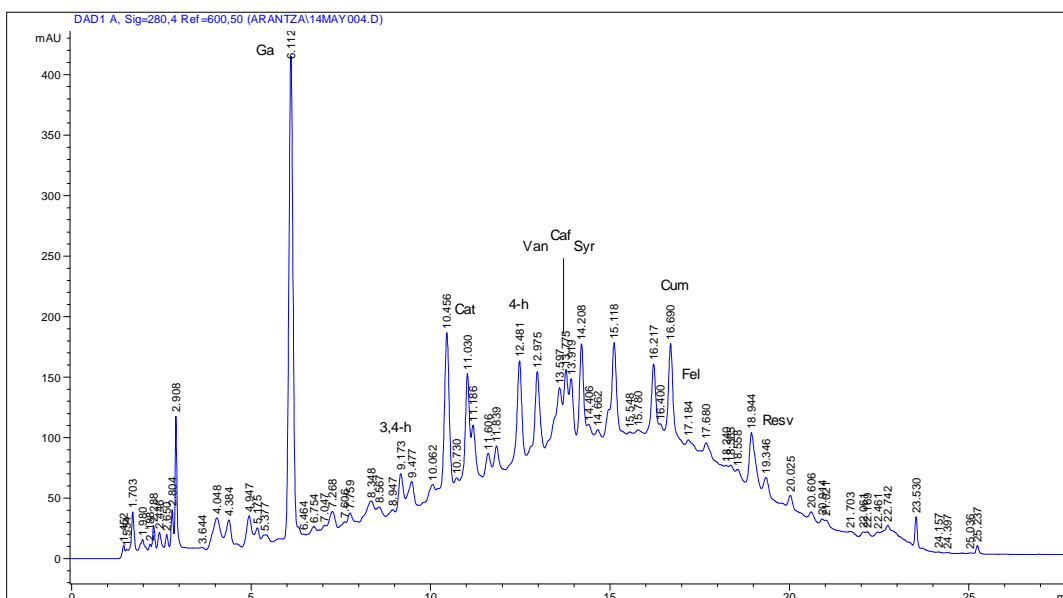


Figura 3.7. Cromatograma de la solución de vino con identificación preliminar de picos.

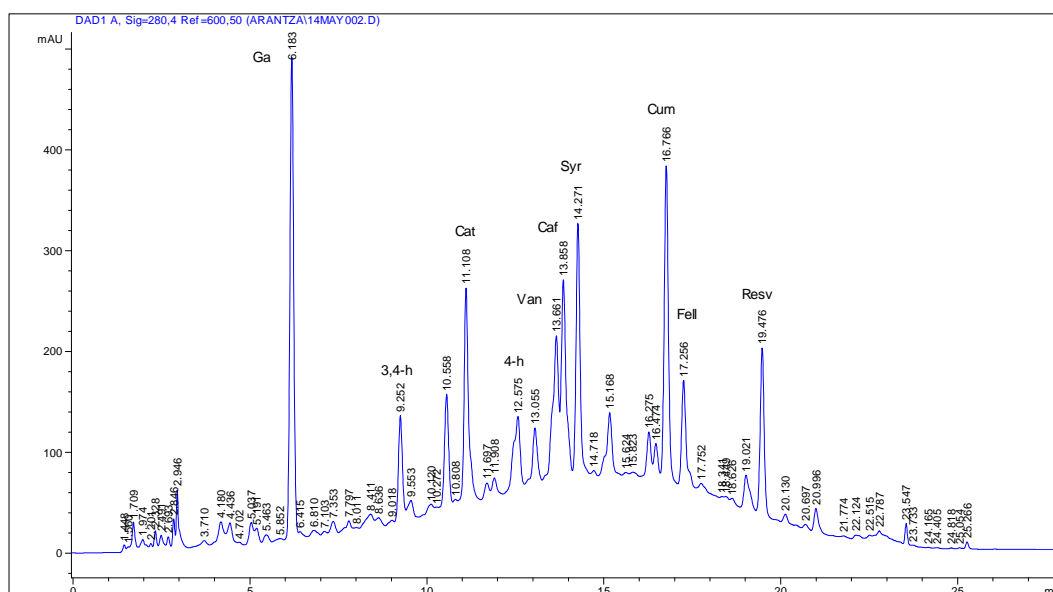
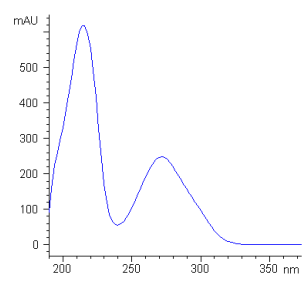
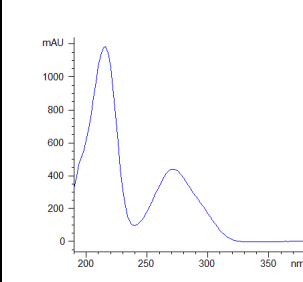
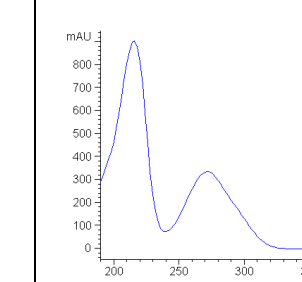
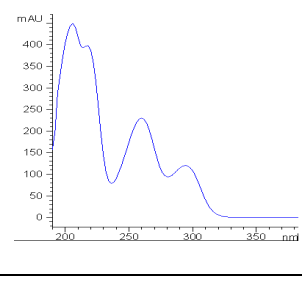
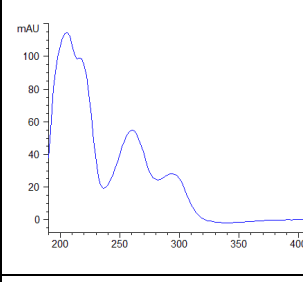
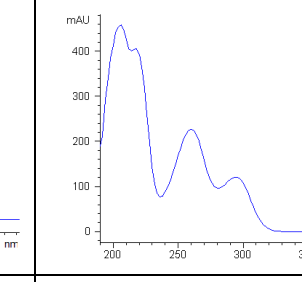
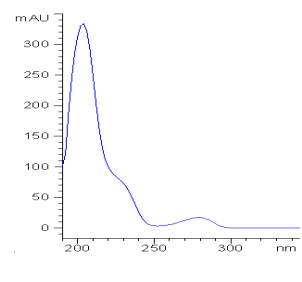
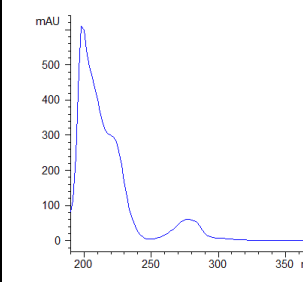
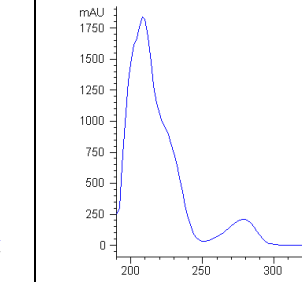
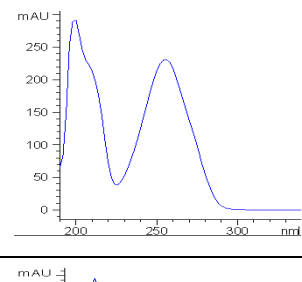
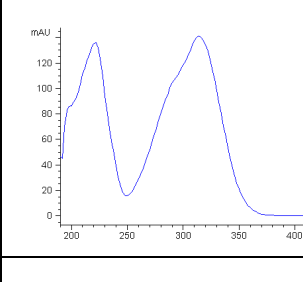
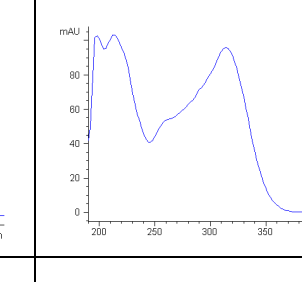
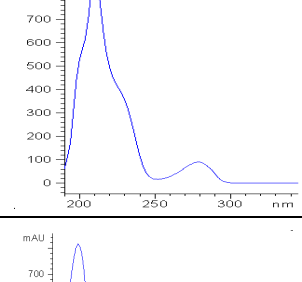
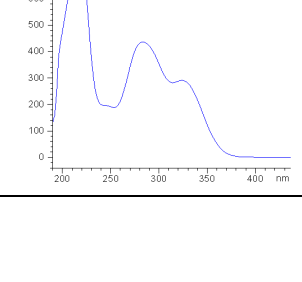
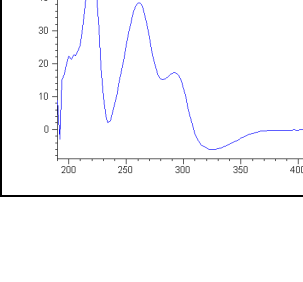
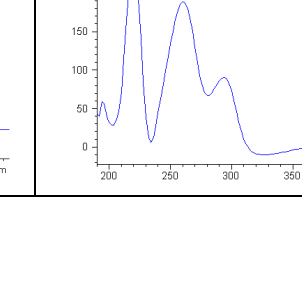
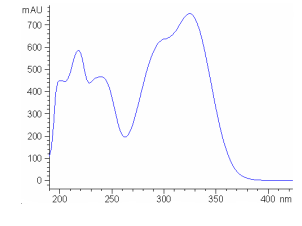
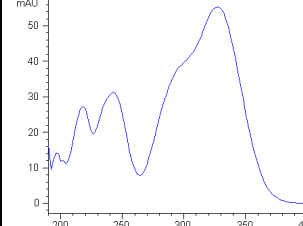
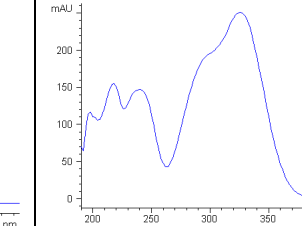
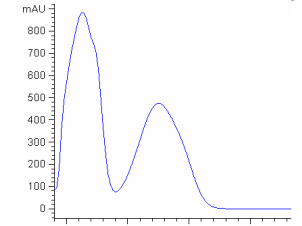
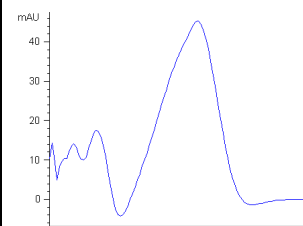
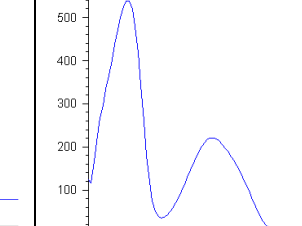
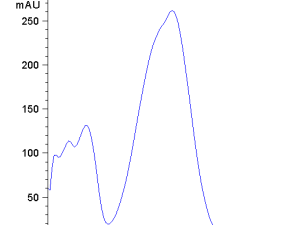
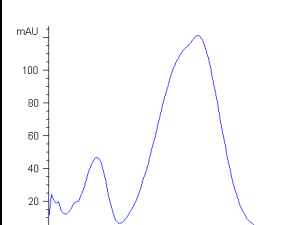
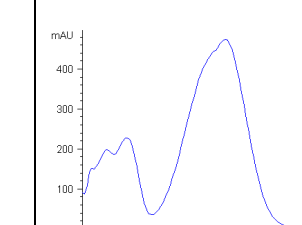
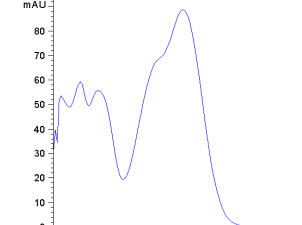
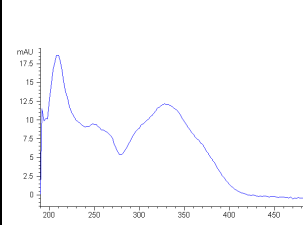
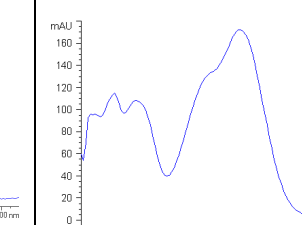
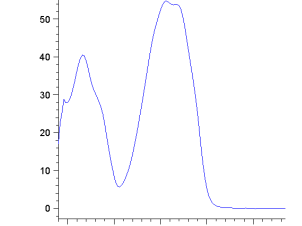
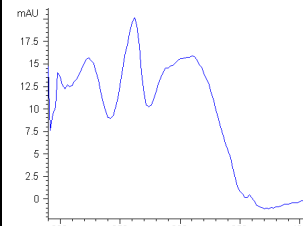
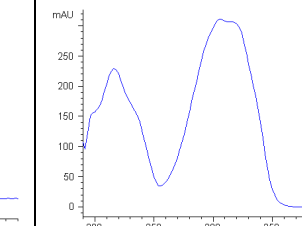


Figura 3.8. Cromatograma de la adición de polifenoles en el vino con identificación de picos.

Para verificar los polifenoles identificados en los cromatogramas, se identifica los espectros de cada pico en la muestra de vino y en la adicionada, teniendo de referencia el tiempo de retención y el espectro de cada solución sintética de polifenol individualmente. (ver Tabla 3.10. Espectros de los polifenoles)

Tabla 3.7. Espectros de los polifenoles.

Polifenol	Tiempo retención	Espectro polifenol	Espectro vino	Espectro vino+adición
Gal	6.12			
3,4-H	9.17			
Cat	11.04			
4-H	12.48			
Epi	12.98			
Van	13.59			

Polifenol	Tiempo retención	Espectro polifenol	Espectro vino	Espectro vino+adición
Caff	13.76			
Syr	13.91			
Coum	16.68			
Fell	17.19			
Resv	19.35			

Se puede ver que la mayoría se corresponden con el espectro del polifenol sólo.

En concreto, el 4-hidroxibenzoico su espectro en el vino sólo es muy similar en cambio con la adición no se podría asegurar, así que es muy probable que ese pico esté formado por varios componentes. En cambio, con el resveratrol pasa al revés, se identifica mejor en la adición de polifenoles en el vino que en la muestra de vino sola.

Otra observación es que en el vino sólo y en el vino con la adición de polifenoles no se ha podido identificar el polifenol epicatequina. Es uno de los tres componentes que en el estudio de polifenoles no se podía separar adecuadamente, por lo tanto es posible que por el tiempo de retención y el espectro que se obtiene al identificar el ácido vinílico, forme parte de éste.

En general, podemos decir que la identificación es correcta. Pero, la información es insuficiente, se necesitaría hacer un estudio más amplio para verificar que la adición de los polifenoles tiene un comportamiento proporcional.

3.1.3. Repetibilidad

En este apartado, la finalidad es obtener el mismo perfil cromatográfico respecto al tiempo de retención y el área del pico de los analitos de una misma muestra de vino analizada repetidamente con el mismo método para verificar que el método seleccionado es válido.

Se ha decidido analizar la muestra seis veces a 280 nm y queda representado de la siguiente manera:

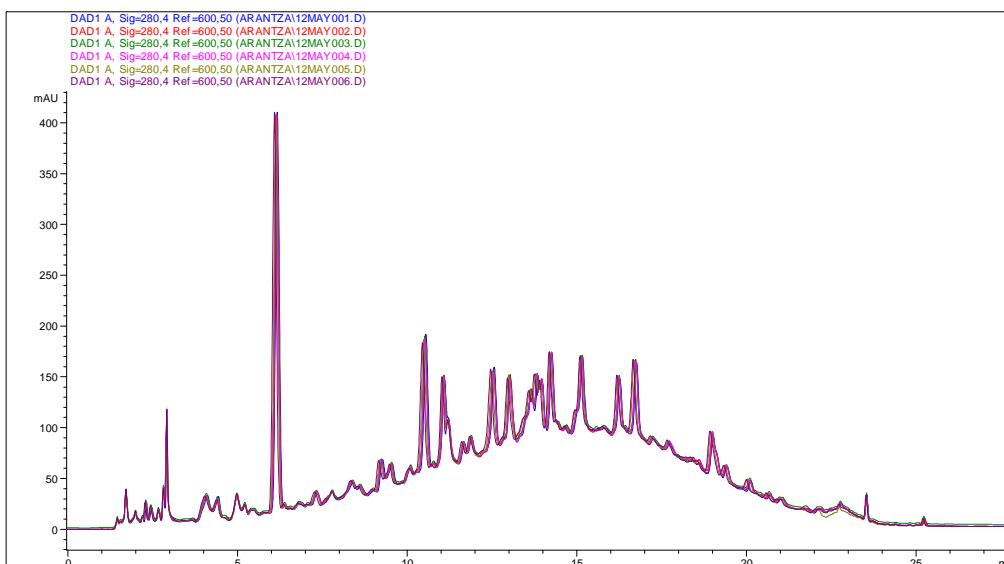


Figura 3.9. Cromatograma de repetibilidad a 280 nm.

Otra manera representativa queda reflejada en una tabla:

Tabla 3.9. Repetibilidad

Polifenol	Tr* promedio	RSD (%) (Tiempo)	Área promedia	RSD (%) (Area)
Ga	6.17	0.47	3106.15	0.55
3,4-H	9.27	0.42	178.35	0.96
Cat	9.56	0.24	148.38	0.87
4-H	10.10	0.32	89.36	1.55
Epi	10.55	0.25	1093.61	1.54
Van	11.10	0.30	1055.51	2.64
Caff	11.68	0.23	1191.37	4.17

Syr	11.90	0.22	1668.45	1.41
Coum	12.56	0.24	3422.67	2.48
Fell	13.04	0.22	3109.53	3.13
Resv	13.66	0.19	3214.05	2.66

* Promedio del tiempo de retención

En esta tabla se muestra el valor de RSD del área del pico y el tiempo de retención de los polifenoles identificados en el vino. Se ha fijado como criterio que el RSD no puede ser superior al 5%. Por lo tanto, se da válida la repetibilidad, teniendo en cuenta que la muestra sólo se filtra.

3.1.4. Detector de Fluorescencia

En este apartado, se conecta el detector de fluorescencia simultáneamente al detector de UV-Visible. Se ha utilizado el mismo método cromatográfico optimizado para el detector de absorción molecular UV-Visible. La finalidad es ver si algunos polifenoles pueden ser estudiados fluorimétricamente.

Como en el *apartado 3.1.2.*, se ha identificado los polifenoles de la solución madre que presentan mayor intensidad de fluorescencia y se han identificado en una muestra de vino:

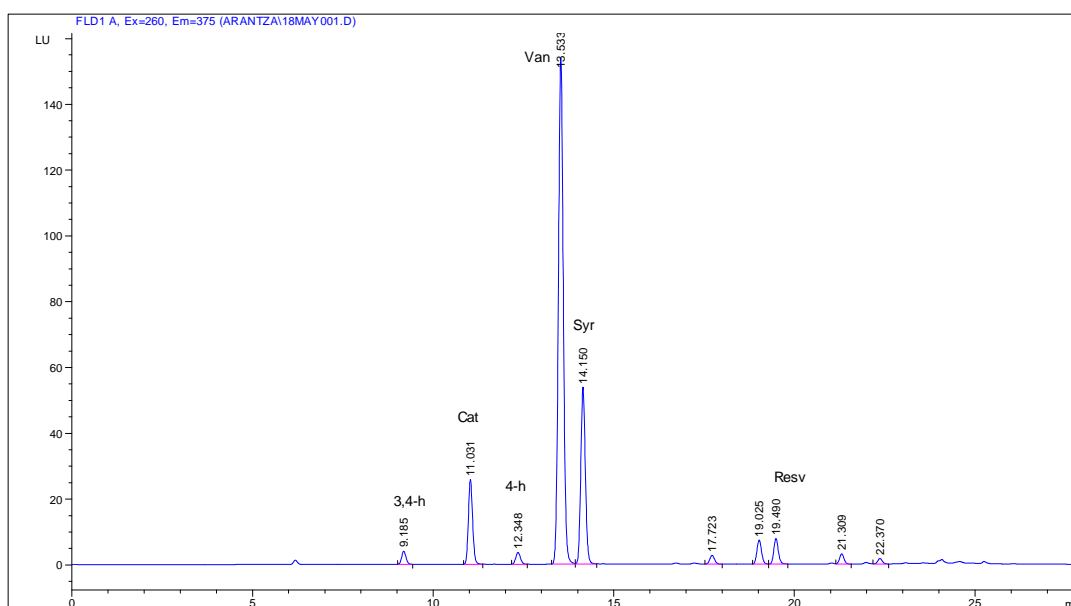


Figura 3.10. Cromatograma de los polifenoles estudiados en detector de fluorescencia con $\lambda_{excitación}=260$, $\lambda_{emisión}= 375$ nm

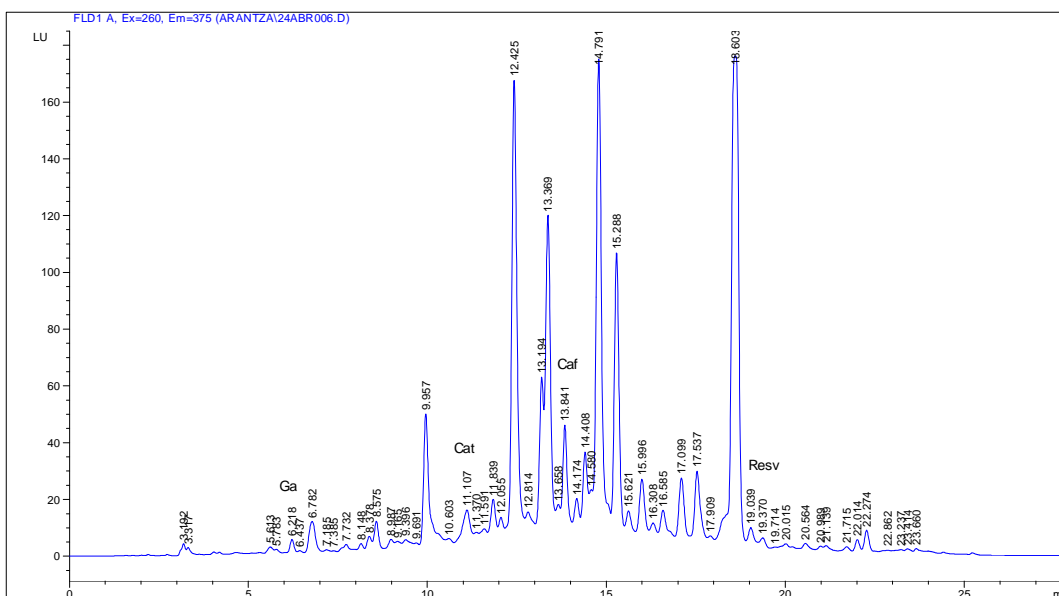


Figura 3.11. Cromatograma de una muestra de vino en detector de fluorescencia con $\lambda_{excitación}=260$, $\lambda_{emisión}=375$ nm.

3.2. Electroforesis Capilar

En este apartado se estudiará el comportamiento electroforético de diversos vinos utilizando unas condiciones experimentales optimizadas anteriormente. El procedimiento experimental está explicado en el apartado 2.5.2. *Electroforesis Capilar*.

El estudio realizado ha consistido en la comparación de los perfiles electroforéticos de 6 vinos diferentes:

- 5 viñas, d.o. Tierra de Extremadura, Tempranillo y Garnacha 2007, Joven (M1)
- Castillo de Liria, d.o Liria, 2007, Joven (M2)
- Viña Fadri, d.o. Catalunya, 2007, Joven (M3)
- Don Luciano, d.o. La Mancha, 2006, Crianza (M4)
- Finca Resalso, d.o. Ribera del Duero, Tinto Fino (100%) 2006, Crianza (M5)
- Torres Coronas, d.o. Catalunya, Ull de llebre (100%) 2004, Crianza (M6)

Además, los seis vinos escogidos son de dos tipos diferentes: joven y crianza, se diferencian en la denominación de origen, la añada y el tipo de uva.

En los perfiles electroforéticos aparecen diferencias y similitudes:

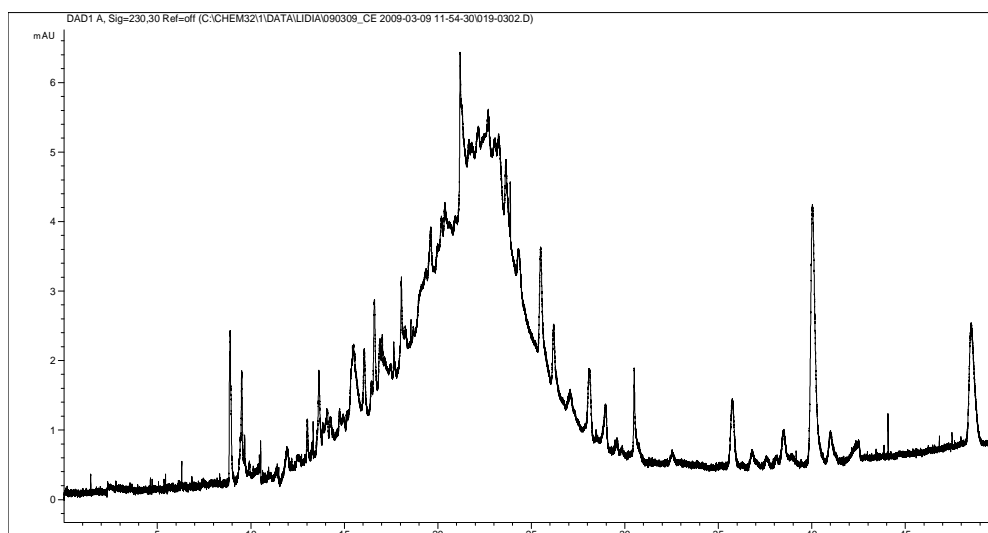


Figura 3.12. Electroferograma de la M1 a 230 nm, electrolito de bórax 20 mM con un 20% de 2-isopropanol a +25KV y 30 μ A.

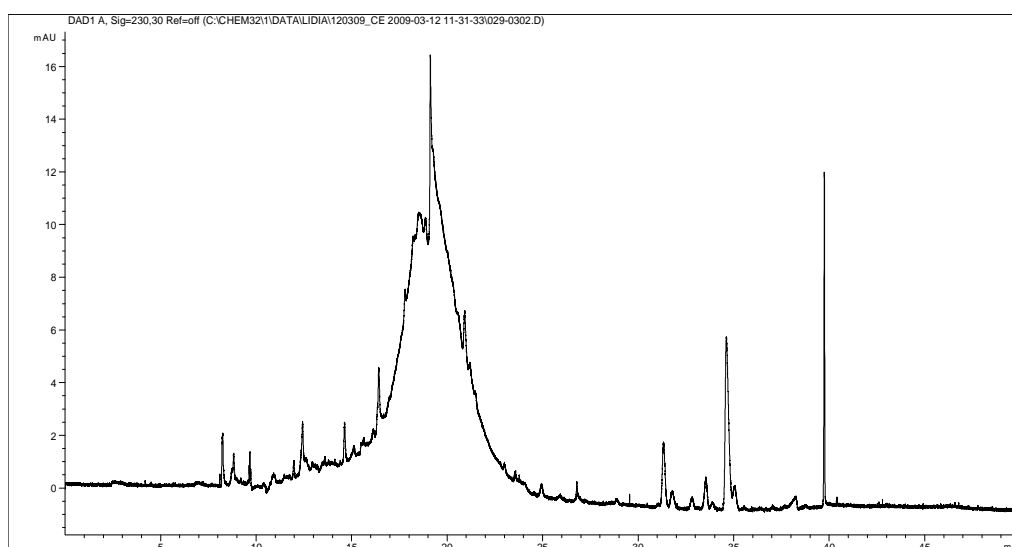


Figura 3.13. Electroferograma de la M5 a 230 nm, electrolito de bórax 20 mM con un 20% de 2-isopropanol a +25KV y 30 μ A.

3.3. Espectrofotometría

En este estudio se han registrado los espectros de 29 muestras de vino previamente diluidos con agua (100 μ L de vino en 10 mL de agua Milli-Q). La finalidad es obtener los espectros de absorción molecular de cada vino para ver si hay diferencias entre ellos. Se ha podido observar que todos los vinos analizados presentan espectros bastante semejantes.

(Ver Anexo 1 Apartado 1.3 Espectrofotometría)

3.4. Fluorescencia

En este estudio se han registrado los espectros de 29 muestras de vino previamente diluidos con agua (200 μ L de vino en 10 mL de agua Milli-Q). La finalidad es obtener los espectros fluorescentes o espectros de emisión molecular de cada vino para ver si hay diferencias entre ellos. Se ha podido observar que todos los vinos analizados presentan espectros bastante semejantes.

3.4.1. Espectros de emisión

Se ha registrado los espectros de emisión en un intervalo de 280 a 450 nm. Observamos que la longitud de máxima emisión es 376 nm.

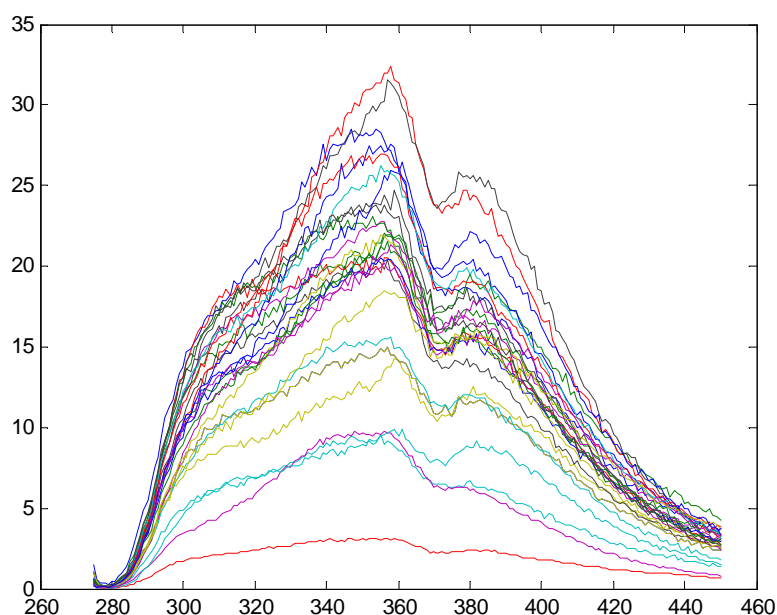


Figura 3.14. Representación de los espectros de emisión de las muestras de vino.

3.4.2. Excitación

Se ha registrado los espectros de emisión en un intervalo de 260 a 320 nm. Observamos que la longitud de máxima emisión es 260 nm.

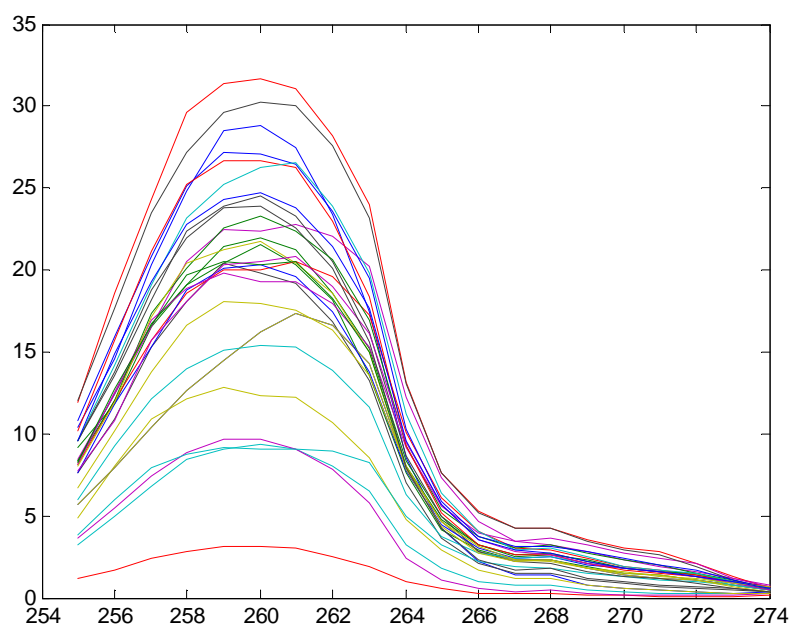


Figura 3.15. Representación de los espectros de excitación de las muestras de vino.

3.5. Estudio de los perfiles composicionales de vinos

En este apartado, se analiza los resultados de las 4 técnicas independientemente mediante el análisis por componentes principales (PCA).

Se puede establecer relaciones y pautas según la denominación de origen, la crianza, la añada y el tipo de uva.

La Figura 3.15, representación de *scores* de los datos obtenidos mediante la cromatografía de líquidos con detección fluorescente. Según la denominación de origen, se puede ver que las muestras de vinos están dispersas, teniendo en cuenta que la muestra es muy variable, se puede ver que los vinos con denominación de origen la Rioja (color lila) tienen un comportamiento similar, ya que se encuentran relativamente cerca. También pasa con algunos vinos de Cataluña, que según la zona también quedan próximos entre ellos.

En cambio en la 3.16, se representa el mismo *score* de cromatografía de líquidos por el detector de fluorescencia pero en función el tipo de crianza, y no se aprecia conjuntos definidos, sino dispersos.

El estudio también se ha realizado con el resto de técnicas. (Ver anexo 1 Apartado 1.4. Estudio PCA)

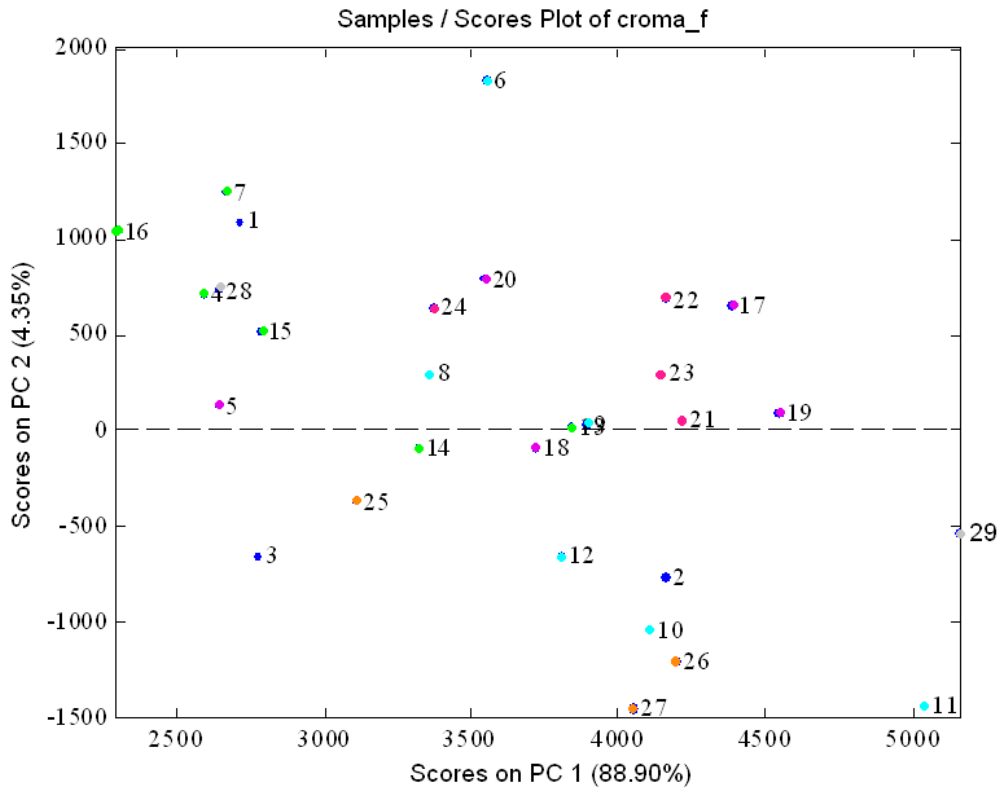


Figura 3.16. Representación Scores de HPLC con FLD en función la denominación de origen.

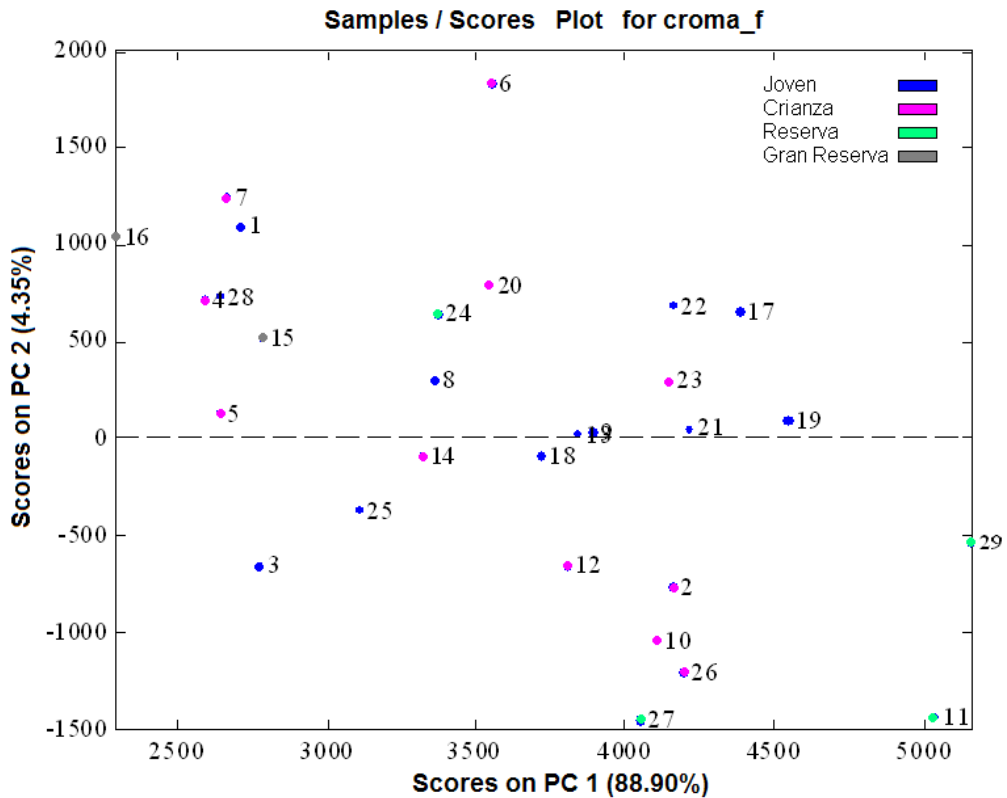


Figura 3.17. Representación Loadings de HPLC con FLD en función el tipo de crianza.