



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE COMPUESTOS VOLATILES EN VINO POR
MICROEXTRACCION EN FASE SOLIDA (MEFS) Y MICRO
EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO (MELL) ACOPLADA A
CROMATOGRAFIA DE GASES (CG).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MARIO EDGAR NERI ZARAGOZA



MEXICO, D. F.,



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Francisco Rojo Callejas
Vocal	Prof. María de Lourdes Gómez Ríos
Secretario	Prof. Araceli Patricia Peña Álvarez
1er. Suplente	Prof. Carlos Manuel Shelly Álvarez-Tostado
2º. Suplente	Prof. Erika María Ramírez Maya

Sitio en donde se desarrolló el tema

Laboratorio 101, Departamento de Química Analítica, DEPg, Facultad de Química,
Edificio "B", U. N. A. M.

Asesor del tema:

Dra. Araceli Peña Álvarez. Araceli Peña Álvarez

Supervisor técnico

M. en C. Carmen Labastida Rubio: Carmen Labastida Rubio

Sustentante

Mario Edgar Neri Zaragoza: Mario Edgar Neri Zaragoza

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Mario Edgar Neri

Zaragoza

FECHA: 9-Julio-2004

FIRMA: (P.A.) [Firma]

DEDICATORIA

A mis Padres

No puedo, ni podré expresarles todo mi agradecimiento por sus esfuerzos y desvelos para que llegara aquí.

Ha sido un largo camino que en ocasiones parecía interminable y en más de una ocasión supe que sus esperanzas se desvanecían. Lejos de eso, siempre estuvieron en mi mente para concluir esta parte importante de mi vida, porque sabía que en la meta estaban ustedes, esperándome con los brazos abiertos. Este trabajo es tan suyo como mío.

Finalizo diciéndoles: "Mami, Papi: Hemos alcanzado la luna"

A Anita

Que has sido mas que mi hermana, compañera de juegos en la niñez y confidente en algunas ocasiones. Hemos pasado momentos muy gratos y desagradables; por todos ellos te doy mi más grande agradecimiento.

Tú fuiste y eres una de mis más grandes inspiraciones; aunque nunca te lo he confesado, este me parece un momento muy oportuno para hacerlo.

Este trabajo también está dedicado a ti, **GRACIAS 'MANITA'**.

A Alejandra

Porque llegaste a mi vida justo en el momento indicado, porque me devolviste la fe perdida y has sido más que una compañera, amiga y confidente. Por tu apoyo incondicional, por tu amor, paciencia y cada una de las lecciones que me has enseñado.

No importa donde nos llevé el destino; contigo no hay tarea imposible ni esfuerzo que no merezca la pena.

Muchas gracias. T. A.

AGRADECIMIENTOS

Llegado este punto se hace difícil recordar a tanta gente que contribuyó a que al fin llegara a este tan ansiado punto en mi vida que es la presentación de este trabajo escrito. Toda esa gente que ha contribuido desde una pequeña palabra de aliento hasta aquellas que han sido más que un soporte y aliento en las horas amargas y un incentivo en todo este rato que llevo robando oxígeno del planeta.

Tomo este riesgo de olvidar mencionar a alguna de ellas, pero aclaro que de ninguna manera son olvidadas y en mi corazón siempre aparecerán cuando volteé la vista en momentos de reflexión.

A mis amigos

Abraham, Gilberto, Nadia Nayeli, Silvia Citlali, Doña Silvia V., Victor; porque han sido para mí una segunda familia y una parte muy importante en mi vida fuera de la academia; ustedes me animaron y apoyaron en más de una ocasión.

Es un honor poder llamarme su amigo.

Marisol F., Marisol O., mis dos mejores amigas en la Facultad, ustedes soportaron mis constantes quejas y desánimos y nunca dejé de contar con ustedes. En su compañía crecí de mil formas con las maravillosas e interminables pláticas.

Mi corazón siempre las lleva en un lugar especial.

Pedro, Miguel, Eric, Erika, Lizbeth, Gino, Marce, Vero, Juan, Valeria, Mario, Emilio, Leti, Mariana, que me aceptaron como su amigo y compañero de trabajo en muchas ocasiones, juntos vivimos los últimos "jalones" de la carrera y animaron las interminables horas en la escuela. Muchas gracias

Beatriz Alcántara, marcaste un gran punto en mi vida y aunque no lo creas, fuiste un gran impulso para llegar hasta ahora. Siempre te consideraré mi amiga.

A mis tíos y familiares, por todos sus consejos y apoyo en todo momento, por el mar de recuerdos agradables, en fin por ser mi familia: ¡**Gracias!**

A todos mis profesores, sin su guía jamás hubiera llegado hasta este punto. Desde la primaria hasta la licenciatura. Gracias

A la Dra. Araceli Peña, por su dirección, consejos, gran apoyo y paciencia para la realización de esta tesis.

A la M. en C. Carmen Labastida, por sus invaluable consejos y su gran calidad humana.

A la Facultad de Química y la Universidad Nacional Autónoma de México, que me abrió sus puertas y me formó humana y profesionalmente en esta maravillosa carrera lo largo de todos estos años.

Y finalmente, y por sobre todas las cosas a **DIOS**, porque me has revelado tu presencia y me abrazaste con tu infinito amor con todas y cada una de las personas que he mencionado y las que involuntariamente he olvidado. Gracias por permitirme llegar hasta este momento y nunca haberme abandonado.

Mario



CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN	1
--------------	---

CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES

2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS VINOS	2
2.1.1 Vinos blancos	2
2.1.2 Vinos tintos	2
2.1.3 Vinos rosados	2
2.2 CEPAS	3
2.2.1 Cepas blancas	3
2.2.1.1 Chardonnay	3
2.2.1.2 Sauvignon Blanc	3
2.2.1.3 Riesling	3
2.2.1.4 Semillon	4
2.2.1.5 Chenin Blanc	4
2.2.1.6 Gewürztramine	4
2.2.2 Cepas tintas	5
2.2.2.1 Cabernet Sauvignon	5
2.2.2.2 Merlot	5
2.2.2.3 Pinot Noir	5





2.2.2.4	Syrah	6
2.2.2.5	Malbec	6
2.2.2.6	Cabernet Franc	6
2.3	COMPUESTOS PRESENTES EN EL VINO	7
2.3.1	Ésteres	8
2.3.2	Alcoholes superiores	9
2.3.3	Ácidos grasos	10
2.3.4	Otros compuestos	10
2.4	MÉTODOS DE ANÁLISIS	12
2.4.1	Microextracción en Fase Sólida (MEFS)	12
2.4.1.1	Antecedentes	12
	a. Métodos de preparación en fase gaseosa	13
	b. Extracción en membrana	14
	c. Extracción por adsorción	14
2.4.1.2	Principios básicos de la Microextracción en Fase Sólida	15
2.4.1.3	Extracción	16
2.4.1.4	Sensibilidad	17
2.4.1.5	Velocidad de extracción	19
2.4.1.6	Desorción	19
2.4.1.7	Instrumentación	19





2.4.2	Microextracción líquido – líquido (MELL)	20
2.5	CROMATOGRAFIA DE GASES (CG)	22
2.5.1	Descripción general	22
2.5.2	Instrumentación	23
2.5.2.1	Gas portador	23
2.5.2.2	Sistema de inyección	24
2.5.2.3	Temperatura del horno	24
2.5.2.4	Detector de ionización a la flama (FID)	25

CAPÍTULO 3 PARTE EXPERIMENTAL

	ABREVIATURAS USADAS	27
3.1	MATERIALES Y REACTIVOS	28
3.1.1	Estándares	28
3.1.2	Muestras	28
3.1.3	Microextracción en Fase Sólida	29
3.1.4	Microextracción Líquido–Líquido	30
3.1.5	Condiciones cromatográficas	30
3.1.5.1	Cromatografía de Gases–Detector de Ionización a la Flama	30
3.1.5.2	Cromatografía de Gases–Espectrometría de Masas (CG–EM)	31





3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	32
3.2.1 Identificación de alcoholes y ésteres etílicos en vino sintético	32
3.2.2 Microextracción en Fase Sólida (MEFS)	32
3.2.2.1 Optimización de las condiciones de la MEFS	33
a. Tiempo de extracción	33
b. Efecto salino sobre la extracción	34
c. pH	34
3.2.2.2 Identificación de compuestos por CG-DIF	34
3.2.2.3 Precisión de la MEFS	34
3.2.2.4 Identificación de compuestos por CG-EM	35
3.2.2.5 Perfiles de las muestras	35
3.2.3 Microextracción Líquido-Líquido (MELL)	36
3.2.3.1 Cuantificación	37

CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Microextracción en Fase Sólida	38
4.1.1 Identificación de alcoholes y ésteres en vino sintético	38
4.1.2 Condiciones de la Microextracción en Fase Sólida	40
4.1.2.1 Tiempo de extracción	40
4.1.2.2 Efecto salino	41





4.1.2.3	pH	42
4.1.3	Identificación de compuestos por CG–DIF	43
4.1.4	Precisión de la Microextracción en Fase Sólida	44
4.1.5	Identificación de compuestos por CG–EM	45
4.1.6	Perfiles de las muestras	53
4.1.6.1	Fibra PDMS/DVB	54
a.	Vinos tipo <i>Cabernet Sauvignon</i>	54
b.	Vinos tintos	59
c.	Vinos L. A. Cetto	65
4.1.6.2	Fibra PA	70
a.	Vinos tipo <i>Cabernet Sauvignon</i>	70
b.	Vinos tintos	74
c.	Vinos L. A. Cetto	80
4.2	Microextracción Líquido–Líquido (MELL)	85
4.2.1	Cuantificación	87
CONCLUSIONES		91
BIBLIOGRAFÍA		93
APÉNDICE		





CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

El vino es el producto de la transformación enzimática del zumo de la uva a una bebida que contiene alcohol⁽¹⁾. Es considerado una de las bebidas alcohólicas más complejas⁽²⁾ debido a la presencia de una gran cantidad de compuestos aromáticos en un rango de concentraciones que va desde los cientos de mg/L hasta $\mu\text{g/L}$ o ng/L ⁽³⁾, y por lo tanto el análisis cualitativo y cuantitativo completo es extremadamente complicado y caro⁽⁴⁾; por lo que es necesario establecer métodos de análisis confiables que hagan posible determinar la variedad de uva utilizada en la elaboración del vino para una correcta clasificación de los vinos⁽⁵⁾.

Con el propósito de caracterizar, diferenciar y cuantificar los distintos compuestos volátiles y semivolátiles aromáticos en muestras de vino tinto y blanco; en este trabajo (1) se establecieron y optimizaron los parámetros de la MEFS-CG, obteniéndose el perfil cromatográfico de los compuestos volátiles y semivolátiles presentes en diferentes vinos tintos y blancos cuya comparación permitió establecer las similitudes y diferencias entre ellos con el propósito de poder llegar a caracterizar el tipo de cepa de origen y calidad del vino; además (2) se optimizaron las condiciones para la microextracción líquido-líquido (MELL) y se cuantificaron tres de los principales alcoholes superiores responsables del aroma.





2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS VINOS ⁽⁶⁾

2.1.1 Vinos tintos

Para elaborar vino tinto, las uvas rojas se estrujan y el mosto pasa una parte o la totalidad del periodo de fermentación (y en muchos casos un periodo de maceración previo o posterior a la fermentación) en contacto con la piel de la uva u hollejos. Toda la materia colorante, además de múltiples compuestos saborizantes y taninos, se encuentran en los hollejos de las uvas y la fermentación y maceración se encargan de liberarlos. Esta liberación se intensifica a menudo por técnicas de activación mecánica (remontado), o batido (bazuqueada), durante estos periodos.

2.1.2 Vinos blancos

Los vinos blancos son aquellos producidos a partir de uvas verdes o blancas; o bien a partir de uvas negras aunque en estos casos nunca se deja al mosto en contacto con el hollejo. El color obtenido en los vinos blancos es de tono verdoso o amarillento

2.1.3 Vinos rosados

El vino rosado (*rosé*) es producido dejando el mosto en contacto por un tiempo breve con los hollejos. Suele producirse utilizando uvas rojas que permanecen en contacto con los hollejos por breves períodos. Con menor frecuencia se produce mezclando vinos tintos y blancos.





2.2 CEPAS

Para la elaboración del vino, se emplean diversas variedades de uvas, también llamadas cepas. Éstas se dividen principalmente en **cepas blancas** o **cepas tintas**, y obtienen su nombre de la región de donde provienen.

2.2.1 Cepas blancas

2.2.1.1 Chardonnay

La Chardonnay puede ser la variedad de vid más elegante del mundo, pero no es la más plantada⁽⁸⁾. Procedente de Borgoña, Francia, produce los mejores vinos blancos y champagnes del mundo. A partir de ella se elaboran vinos que envejecidos en roble obtienen una gran complejidad de sabores⁽⁷⁾. Entre ellos: manzana, pera, cítricos, melón, piña, mantequilla y miel⁽⁸⁾. Su aroma es intenso a plátano, piña, pera y frutas tropicales⁽⁷⁾.

2.2.1.2 Sauvignon Blanc

Originaria de Burdeos, Francia. Produce vinos blancos aromáticos, con alto grado de frescor. Su aroma es muy intenso a hierbas y frutos cítricos⁽⁷⁾, sabores: uva espina, hierba, hojas de grosella pero básicamente unidimensional, estimulante, seco y alto en ácido⁽⁸⁾.

2.2.1.3 Riesling

La auténtica es de origen alemán, es una de las mejores cepas del mundo. Crece en los climas fríos, así como en climas cálidos⁽⁷⁾. Genera vinos con perfecto equilibrio entre





azúcares y ácidos, verdosos y con aroma a flores secas cuando son jóvenes y que al madurar van adquiriendo intensidad y delicado aroma a pasas e higos secos⁽⁸⁾. Sus sabores: manzanas verdes, manzanas asadas con especias, membrillo y naranja.

2.2.1.4 Semillon

Es el principal pilar del Burdeos blanco, tanto el seco como el dulce⁽⁷⁾. Su aroma recuerda a la vainilla, limón con toques de melón y especias. Si las uvas de semillón no están bien maduras a veces el vino producido puede presentar un olor herbáceo a pasto, haba o arveja⁽⁸⁾. Sabor: Hierba, cítrico, lanolina, miel y tostada⁽⁷⁾.

2.2.1.5 Chenin Blanc

Es una cepa con una acidez muy alta, de una gran longevidad. Requiere de mucho sol para realzar sus sabores intensos afrutados y suavizar su acidez áspera. Sabor: manzana, albaricoque, nuez, miel y mazapán.

2.2.1.6 Gewürztraminer

De origen alemán. Una de las uvas con aromas más penetrantes, de un perfume exótico y especiado. Su aroma recuerda a rosas, especias, durazno y kiwi. Genera vinos altos en grado alcohólico y de mucho cuerpo.





2.2.2 Cepas tintas

2.2.2.1 Cabernet Sauvignon

Originaria de Burdeos, Francia⁽⁸⁾. Se trata de una uva de color intenso y una piel gruesa que produce un vino oscuro y sabroso⁽⁷⁾. Cuando es joven presenta un aroma intenso a frutos rojos como guinda, mora, frutilla, tabaco, humo y cassis. El Cabernet Sauvignon envejecido presenta un intenso bouquet de cedro, trufa, cuero, con suaves notas animales y mentol⁽⁸⁾.

Si el clima es demasiado cálido, los vinos tendrán sabores confitados y cocidos, perderán estructura y concentración y, si se les niega el sol suficiente, serán tenues con sabor a caña y a hierba⁽⁷⁾. En general sus sabores son grosella, cedro, pimienta, menta, chocolate negro, tabaco y aceituna.

2.2.2.2 Merlot

Originaria de Burdeos, Francia. La uva es más suave⁽⁸⁾, parecida al Cabernet Sauvignon, pero menos tánica y con menos sabor a grosella⁽⁷⁾. Su aroma presenta normalmente notas de bayas rojas, pimienta y hierbas suaves⁽⁸⁾. Sus sabores: parecidos al Cabernet Sauvignon pero a veces contiene más ciruelas y rosas⁽⁷⁾.

2.2.2.3 Pinot Noir

Debe su fama a los grandes vinos de Borgoña⁽⁷⁾. Produce un muy buen vino con aroma a frambuesa, frutilla, cereza y especias, pudiendo presentar también notas de roble⁽⁸⁾. Sabor: frambuesa, fresa, cereza, arándano, violeta y rosa⁽⁷⁾.





2.2.2.4 Syrah

Llamado también Shiraz en Australia y Estados Unidos, es una cepa de mucho sabor y con un gran potencial de envejecimiento. Crece en climas cálidos⁽⁷⁾, donde produce vinos de gran cuerpo y carga tánica⁽⁸⁾. Produce vinos de mucho cuerpo, potentes y alcohólicos⁽⁸⁾. En climas más fríos produce vinos algo más ligeros y con más pimienta, con frutas de baya madura menos intensa, menos taninos y más riqueza carnosa⁽⁷⁾. Su característica son sus notas especiadas (pimienta negra y mentol) y frutos rojos maduros (frambuesa, zarzamora y grosella).

2.2.2.5 Malbec

Proveniente de Burdeos, es conocida también como "Cot". Produce vinos de excelentes características tanto en aromas como en sabores. En nariz presenta notas a violeta, ciruela seca y jugo de uva, en boca puede presentar sabores terrosos.⁽⁸⁾

2.2.2.6 Cabernet Franc

Esta cepa es utilizada en Burdeos principalmente en las mezclas como tercera cepa después de Cabernet Sauvignon y Merlot. Produce un vino concentrado, sabroso, de menor cuerpo que el Cabernet Sauvignon, pero con mayor intensidad aromática. Presenta aromas a berries, frutilla, con notas de chocolate y toques de roble si ha sido criado en barricas.⁽⁸⁾





2.3 COMPUESTOS PRESENTES EN EL VINO

Varios factores influyen en la producción del aroma en los vinos, entre ellos el medio ambiente (humedad, clima), la cepa (uva), la cosecha, las condiciones de la fermentación, algunos factores biológicos (la levadura y otros compuestos presentes en la microflora enológica), el proceso de producción y el añejamiento⁽³⁾. Los vinos contienen cerca de 800 compuestos volátiles diferentes tales como alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres y lactonas, entre otros⁽⁹⁾. Esta composición volátil influye en las características organolépticas de los vinos, particularmente las características aromáticas y se acepta que tiene un papel principal en el carácter varietal.^(10,11)

La parte esencial del sabor del vino es formada durante la fermentación alcohólica⁽¹⁾; durante la maduración, el vino en contacto con la madera sufre importantes modificaciones. En primer lugar el aroma evoluciona y se hace más complejo. La madera también cede al vino numerosas sustancias específicas formadas durante el tostado. Además, como la madera es un material poroso, permite que el vino sufra simultáneamente diferentes procesos que se denominan como "condiciones de baja oxidación"⁽¹²⁾.

Los alcoholes dominantes son el etanol y glicerol, seguidos por alcoholes superiores (también conocidos como aceites fusel) y ésteres⁽¹⁾.





2.3.1 Ésteres

Los ésteres son los principales constituyentes cualitativos y cuantitativos (>100 ppm). Considerando sus concentraciones (APÉNDICE II), los ésteres etílicos de ácidos orgánicos son los más abundantes, seguidos por los acetatos y ésteres etílicos de ácidos grasos⁽¹³⁾. El principal éster producido durante la fermentación es el acetato de etilo⁽¹⁾. Los ésteres etílicos y acetatos de ácidos grasos se han considerado como contribuyentes muy importantes al aroma del vino porque están presentes como constituyentes aromáticos principales y porque presentan olores frutales similares a aquellos que son empleados para describir los vinos (ver APÉNDICE III). Los mono y poliésteres formados de los llamados ácidos orgánicos, principalmente de los ácidos succínico, málico, 2-hidroxipropanóico, cítrico y glutárico también se han identificado en el vino. De éstos, el ácido 2-hidroxipropanóico es el único que ha sido estudiado por su contribución al aroma del vino sin embargo, se ha sugerido que los monoetil malato, tartrato y succinato, pueden contribuir con algunas características de olor.

Los ésteres homólogos son definidos con descriptores generales similares. Distintos autores sugieren que los ésteres presentes con concentraciones menores al umbral de percepción podrían sin embargo, contribuir al aroma frutal por una posible adición de sus aromas individuales⁽¹³⁾. Los acetatos de alcoholes superiores de cadena larga (acetato isoamilico y 2-fenil acetato) son importantes, ya que sus concentraciones en el





vino son menores a 10 $\mu\text{L/L}$, pero éste valor es aproximadamente 10 veces el umbral de percepción⁽¹⁾.

2.3.2 Alcoholes superiores

Al igual que los ésteres, y a causa de su abundancia, los alcoholes superiores o "aceites fusel" han sido ampliamente estudiados. A diferencia de los ésteres, los alcoholes superiores nunca se han considerado como factores de calidad. El nombre "fusel" es en sí un recordatorio del olor nauseabundo del aceite obtenido durante la destilación de papas fermentadas⁽¹³⁾. Algunos alcoholes superiores que pueden estar presentes en concentraciones por debajo de su umbral de percepción organoléptica^a (<300 mg/L), ciertamente contribuyen a la complejidad deseada del vino; cuando su concentración excede los 400 mg/L, los alcoholes superiores son generalmente considerados como un factor negativo de calidad⁽¹⁾. La mayoría de los alcoholes superiores han sido descritos como términos desagradables: "alcohólico", "a fusel", "agrio" y "ahogado"; el hexanol se describe como "verde", "coco", y "picante". El 2-feniletanol es el único alcohol fusel descrito en terminos agradables como "rosa añeja", "dulce ligero" y "perfumado"⁽¹³⁾.

^a APÉNDICE II





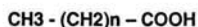
2.3.3 Ácidos grasos^b

Los olores individuales de los ácidos grasos son conocidos y varían desde “avinagrado” hasta parecido a mantequilla, queso o sudoroso, a cabra, parecido a aceite vegetal y jabonoso conforme aumenta el peso molecular. A pesar de los numerosos ácidos identificados en vinos, los ácidos grasos son los únicos que realmente se consideran por su posible impacto al sabor en los vinos; éstos muestran simultáneamente bajos umbrales de percepción, además de altas concentraciones en vinos y suficiente volatilidad a temperatura ambiente. Su contribución sensorial al vino ha sido escasamente estudiada, tal vez debido a que el impacto al sabor es considerado generalmente como negativo⁽¹³⁾.

2.3.4 Otros compuestos

La presencia de compuestos fenólicos volátiles en vinos, algunos producidos por levaduras, provoca ciertas desviaciones olfativas en el aroma de estos, el 4-etilguayacol (EG), por ejemplo es el compuesto responsable del aroma ahumado y especiado del vino, mientras que el 4-etil-fenol (EP) es el que proporciona olor a “cuero”, “medicinal” y “sudor a caballo”. Estos compuestos fenólicos volátiles varían

^b Como ácidos grasos, se agrupan a los ácidos carboxílicos que contienen desde 4 átomos de carbono con una sola función ácido.



Donde n representa el número de grupos etileno.

Los ácidos grasos tienen un número par de átomos de carbono, y la configuración en el caso de los insaturados corresponde a *cis*.⁽³⁰⁾





CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES

considerablemente sus concentraciones dando, a altas concentraciones, olores pesados e indeseables^(14,15).

Durante la maduración, los distintos compuestos volátiles extraídos de la madera tienen distinto impacto sobre el aroma del vino, de esta manera, junto con los aldehídos aromáticos, la vainillina tiene una gran influencia sobre el aroma del vino; mientras el furfural y el 5-metil furfural tienen una pequeña influencia y por lo mismo, los aromas de estos compuestos no se consideran deseables.

Existen distintos factores de los barriles de roble que influyen en la extracción de compuestos volátiles, siendo especialmente importante la zona geográfica donde provenga el roble. Las especies americanas y francesas son las más importantes, por ser las más utilizadas en América y Europa respectivamente⁽¹⁶⁾.

Los compuestos azufrados de volatilidad moderada o baja (compuestos azufrados pesados) destacan por la influencia negativa que pueden ejercer sobre la calidad del vino que los contiene, ya que le confieren aromas generalmente desagradables⁽¹⁷⁾. La presencia de los compuestos con azufre significa que las condiciones de elaboración o almacenamiento no han sido las adecuadas. Entre los compuestos más importantes se encuentran los mercaptanos, los sulfuros, los disulfuros y los tioacetatos⁽¹⁸⁾.





2.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.4.1 Microextracción en fase sólida

2.4.1.1 Antecedentes

Uno de los principales problemas que se presentan durante el estudio de los compuestos volátiles responsables del vino es la elección de un método de extracción adecuado que refleje el contenido aromático cualitativo y cuantitativo original. Esto significa obtener un extracto que contenga todos los compuestos volátiles presentes en la muestra original sin que éstos hayan sido alterados, degradados o derivados en otros compuestos.⁽²⁾

El análisis de los componentes volátiles por cromatografía de gases es una herramienta útil para la clasificación del vino sin embargo, el análisis completo es extremadamente complejo y costoso. Por lo tanto es de interés desarrollar una metodología rápida, sencilla y robusta para obtener un perfil cromatográfico de cada vino y cuantificar algunos de sus componentes más importantes⁽⁴⁾.

Cualquier método de separación tiene como principio la partición de los analitos estudiados entre la matriz de la muestra y una fase extractora. Durante algún tiempo han estado disponibles técnicas de preparación de muestras que utilizan poco o ningún disolvente orgánico. Éstas técnicas pueden clasificarse como de extracción de fase gaseosa, en membrana y por adsorción, como se muestra en la Figura 1.



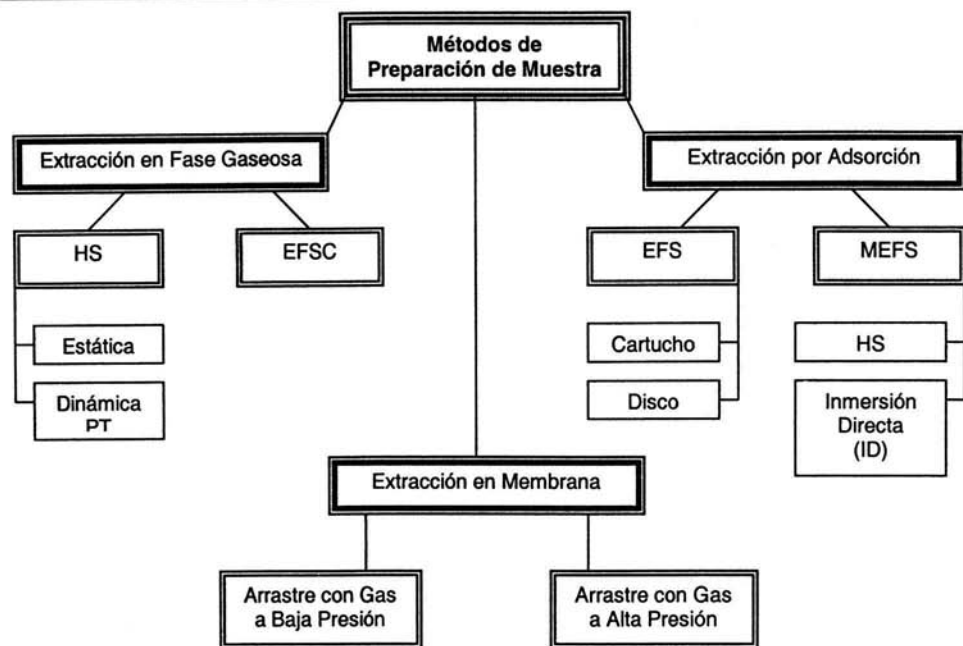


Figura 1. Clasificación de métodos de separación sin disolventes. (J. Pawliszyn, TrAC 14, 113 (1995))

a. Métodos de preparación de muestra en fase gaseosa

Los métodos de separación en fase gaseosa, como el muestreo en Head Space (HS) estático o la extracción de Purga y Trampa (PT), tienen un punto en común, la partición del analito en una fase gaseosa.

Otro método de preparación de muestras por extracción usa un gas sobrecomprimido como fase extractante, que es capaz de remover compuestos menos volátiles a temperatura ambiente. Esta técnica es llamada Extracción de Fluidos Supercríticos (EFSC) sin embargo, la EFSC requiere de sistemas muy costosos que mantengan la presión alta y una fuente de gas de alta pureza.





b. Extracción en membrana

La extracción en membrana consta de dos procesos simultáneos: la extracción de los analitos de la matriz por el material de la membrana, y la extracción de los analitos de la membrana por una fase arrastrante.

c. Extracción por adsorción

Una técnica de adsorción ampliamente usada es la extracción en fase sólida (EFS). El primer paso de la EFS es filtrar la matriz líquida a través de cartucho plástico (tubo) o una delgada membrana (disco) que contenga al adsorbente disperso en un soporte particular. Generalmente primero se utiliza un disolvente selectivo para remover las interferencias, seguido de un segundo disolvente para lavar los analitos deseados. La EFS tiene una serie de características atractivas sobre la extracción tradicional con disolventes. Ésta es simple, barata y utiliza relativamente poco disolvente. Sin embargo, la interacción entre la matriz de la muestra y los analitos tiene como resultado una poca recuperación y los componentes sólidos y aceitosos en la misma matriz pueden saturar el cartucho de la EFS o bloquear los poros en el adsorbente provocando que se sobrecargue y la variación entre lotes de los disolventes provoca una reproducibilidad pobre.

Las limitaciones de la EFS pueden ser resueltas dispersando una pequeña cantidad de la fase extractante en un fino filamento de sílice fundida u otro material apropiado. El uso de pequeñas cantidades de fase líquida en la técnica de microextracción ha





demostrado recientemente que mejora la eficiencia sobre las experiencias con grandes volúmenes. A pesar de que no se logra la completa remoción de los analitos deseados de la matriz de la muestra, la capacidad de alta concentración y la selectividad de la técnica permite un análisis de extracción de muestras mixtas directamente y con alta sensibilidad. La dificultad que se presenta al manejar volúmenes pequeños de disolventes conlleva una limitación mayor a este intento. El uso de materiales absorbentes permanentemente unidos a la fibra supera esta limitación y permite volver a utilizar la misma fase. La técnica que resulta es llamada Microextracción en Fase Sólida (MEFS)⁽²⁰⁾.

2.4.1.2 Principios básicos de la Microextracción en Fase Sólida

La Micro Extracción en Fase Sólida (MEFS) fue desarrollada por Janusz Pawliszyn⁽²⁰⁾ y su grupo a principios de los 80's, en la Universidad de Waterloo, Ontario, Canadá. El principio de la MEFS se basa en la partición de los analitos de una matriz y la fase estacionaria sobre la fibra⁽²¹⁾. El proceso se lleva a cabo en el recubrimiento de la fibra.

La MEFS se efectúa en dos pasos, el primero es extraer los analitos de la matriz, el segundo es desorber estos analitos directamente en un CG o un CL para su análisis. (Figura 2)

La difusión del analito al recubrimiento de la fibra está determinada por la medida de transferencia de masa de la muestra al recubrimiento de la fibra; en muchos casos el equilibrio analito/fibra es alcanzado en menos de 1 min.



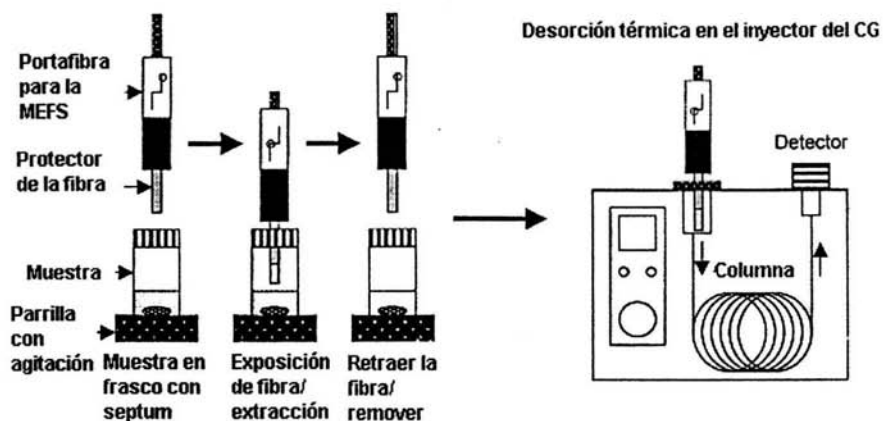


Figura 2. Diagrama general de la MESF-GG utilizando "Head Space"

En caso de componentes volátiles es relativamente fácil analizarlos por "Head Space" (análisis del vapor sobrenadante), ya que los analitos tienden a vaporizarse una vez que son disociados de la matriz. En el caso de compuestos semivolátiles, su baja volatilidad y que sean moléculas relativamente grandes podría hacer lento el proceso de transferencia de masa de la matriz hacia la fase vapor, y en algunos casos controlar la cinética de desorción o humectación, podrían también limitar la velocidad de extracción, resultando un largo tiempo de proceso o de extracción.

2.4.1.3 Extracción

La MEFS tiene dos funciones importantes: la extracción del analito y la desorción del analito dentro del equipo. En esta técnica se tienen diferentes tipos de recubrimientos en las fibras (Figura 3), por lo que pueden ser extraídos diversos grupos de analitos. Para los compuestos orgánicos se aplica el principio básico de "lo similar disuelve a lo





similar”, es decir, recubrimientos polares extraen compuestos polares; por el contrario, recubrimientos no polares como el polidimetil siloxano (PDMS) retiene bien a compuestos no polares. En general, los compuestos volátiles requieren una cubierta de polímero gruesa y una cubierta delgada es efectiva para los compuestos semivolátiles. Además, las fibras recubiertas con películas gruesas requieren un mayor tiempo para alcanzar el equilibrio de extracción, pero pueden proporcionar alta sensibilidad debido a la mayor masa del analito que pueden extraer.

2.4.1.4 Sensibilidad

Existen varios factores que influyen en la cantidad de analito extraído, algunos de estos son el volumen del recubrimiento así como sus características, la modificación de la fuerza iónica y el calentamiento de la muestra.

La cantidad de los analitos extraídos por el recubrimiento de la fibra es directamente proporcional al volumen del recubrimiento por el incremento del espesor de éste, al modificar la longitud de la fibra, o ambos.

Como el coeficiente de partición de los analitos es parcialmente determinado por la interacción entre el analito de interés y la matriz, la naturaleza de la matriz puede ser modificada. Esto se puede lograr por la adición de sales (NaCl o NaSO_4) a la muestra acuosa de este modo la fuerza iónica puede ser incrementada y a su vez incrementar la partición de los compuestos orgánicos polares (pero no de iones) dentro del





recubrimiento polimérico. Del mismo modo el pH de las muestras debe ser ajustado para prevenir la ionización de los analitos de interés.

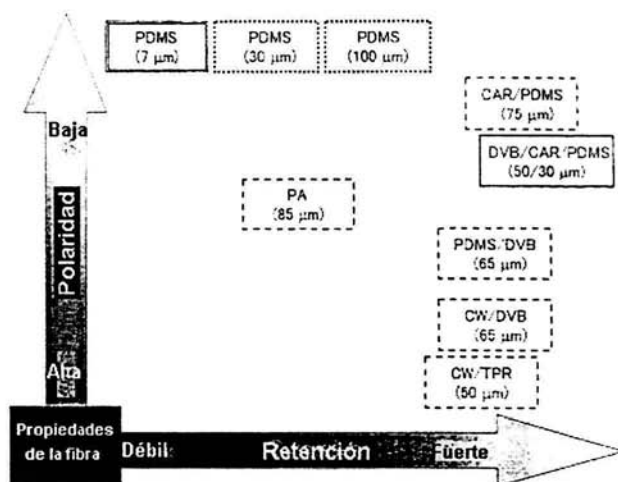


Figura 3 Propiedades de las fibras comerciales disponibles para MESF: Enlazada; No enlazada; Parcialmente entrelazada; altamente enlazada

Para los analitos térmicamente estables, una de las formas eficientes para vencer las limitaciones cinéticas es el calentamiento de la muestra, incrementando así la presión de vapor de los analitos, dando la energía necesaria para la desorción de los analitos de la matriz y al mismo tiempo aumenta el transporte de masa de los analitos de la matriz al "Head Space" y así mejorar la extracción. Es muy importante tomar en cuenta que mientras la temperatura aumenta el recubrimiento empieza a perder la capacidad de absorción, de los analitos de interés, y por lo tanto decrece el coeficiente de partición del recubrimiento.





2.4.1.5 Velocidad de extracción

La velocidad de extracción es controlada por el transporte de masa del analito en la matriz al recubrimiento de la fibra. Este proceso involucra transporte convectivo en el aire o en la muestra líquida. Cuando la matriz es agitada, la medida de transferencia de masa es determinada por la difusión del analito al recubrimiento de la fibra por ejemplo, cuando se usa agitación magnética, el tiempo de equilibrio es más largo y está determinado por la difusión que se lleva a cabo a través de una capa acuosa estática adyacente a la fibra. Cuando se usan métodos de agitación muy fuertes, como el uso de un baño de ultrasonido la velocidad de extracción aumenta.

2.4.1.6 Desorción

En casi todos los casos el proceso de desorción de los analitos en la microextracción es muy eficiente, con aumento en la temperatura, el coeficiente de partición recubrimiento/gas decrece y la capacidad del recubrimiento para retener a los analitos disminuye rápidamente. En el cromatógrafo de gases el flujo del gas acarreador dentro del inyector facilita la desorción de los analitos del recubrimiento. Para compuestos volátiles y algunos semivolátiles pueden ser desorbidos del recubrimiento a temperaturas entre 150 °C y 250 °C.

2.4.1.7 Instrumentación

Una fibra típica disponible comercialmente empleada en el análisis de MEFS es como la que se muestra en la Figura 4.



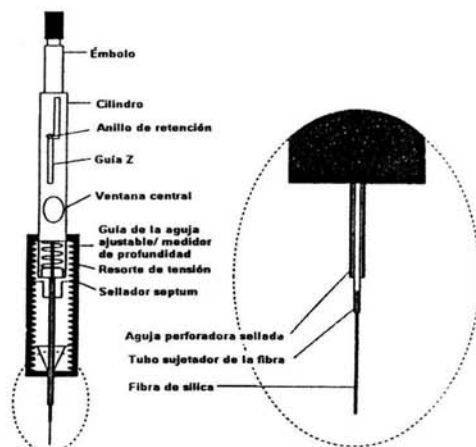


Figura 4. Fibra empleada para la microextracción en fase sólida (MEFS)

2.4.2 Microextracción líquido-líquido (MELL)

La extracción líquido-líquido se basa en equilibrio de distribución de las especies a separar entre dos fases líquidas no miscibles. Generalmente los disolventes son el agua y un disolvente orgánico (donde se encuentra el extractante); normalmente se trata de un líquido orgánico de baja constante dieléctrica cuyas principales características son baja solubilidad y reactividad con el agua. ^(22, 23, 24)

Dentro de los disolventes más empleados en la extracción líquido-líquido encontramos a los hidrocarburos como el pentano, el n-hexano y el ciclohexano; los aromáticos como el benceno, el tolueno y los xilenos; los disolventes clorados como el tetracloruro de carbono, el cloroformo y el cloruro de metileno⁽²³⁾. Por lo tanto, en el disolvente orgánico sólo existirán moléculas neutras.⁽²⁷⁾





CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES

La extracción se basa en la sencilla ley de distribución que establece que a una temperatura constante un soluto se distribuye entre dos disolventes esencialmente inmiscibles, de tal forma que la relación de las concentraciones del soluto en las fases es constante⁽²⁵⁾.

La recuperación puede mejorarse incrementando el volumen de la fase orgánica, pero el método preferido es la extracción con volúmenes adicionales de la fase orgánica.⁽²⁶⁾

La adición de una fuerte concentración de sales disociadas a la disolución acuosa se utiliza frecuentemente para facilitar el paso de compuestos a la fase orgánica. Este hecho se explica por la acción de diversos factores: variación de los coeficientes de actividad a causa de la fuerza iónica en la disolución acuosa, cambio del grado de hidratación de los iones en la disolución acuosa por la presencia de elevadas concentraciones iónicas y disminución de la constante dieléctrica de la disolución acuosa al incrementar la concentración de iones, con la consiguiente estabilización de los complejos.⁽²⁷⁾ La agitación manual o mecánica permite acelerar el paso de la fase acuosa a la fase orgánica estableciéndose un equilibrio entre ambas fases.^(22,23)

Se han propuesto algunas técnicas que disminuyen la cantidad de disolvente empleado en la extracción, manteniendo una buena recuperación y una reproducibilidad aceptable. A estas técnicas se les ha dado el nombre de microextracción líquido – líquido debido a los bajos volúmenes empleados tanto de la fase acuosa o de la orgánica⁽²⁴⁾. En el presente trabajo, se propone una técnica aprovechando la





modificación a la fuerza iónica con la fuerte adición de sal, de esta forma los volúmenes de la fase orgánica empleados para la extracción líquido-líquido son reducidos considerablemente, obteniéndose buenos resultados; tanto de recuperación como de reproducibilidad.

2.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)⁽²⁸⁾

2.5.1 Descripción general

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos que permiten separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una *fase móvil* que, en este caso se trata de un gas. Ésta fase móvil se hace pasar a través de una *fase estacionaria* con la que es inmisible, y que se fija a una columna. 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.

En cromatografía de gases (CG), la muestra se inyecta y se volatiliza en la cabeza de una columna cromatográfica. La elusión se produce por el flujo de una fase móvil de un





gas inerte. La fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

La CG se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.

2.5.2 Instrumentación

Los componentes básicos de un instrumento para la CG se muestran en la Figura 5. A continuación se da una breve descripción de cada uno de los componentes.

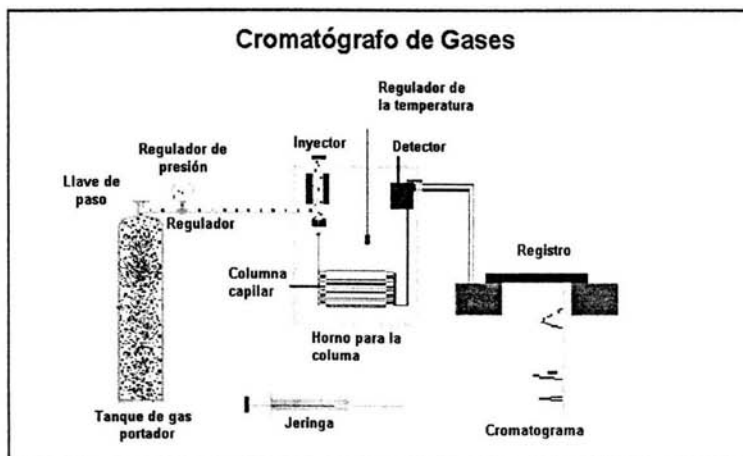


Figura 5. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases (CG)

2.5.2.1 Gas portador

Un gas portador debe ser químicamente inerte. Entre éstos se encuentran el helio y el hidrógeno. El intervalo de presiones de entrada normalmente oscila entre 10 y 15 psi.





2.5.2.2 Sistema de inyección

El método más común de inyección de muestra implica el uso de una micro jeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un diafragma o “septum” de goma de silicona (Figura 6), en una cámara de gas de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna. En algunos casos se emplea un sistema divisor de la muestra que permite pasar a la cabeza de la columna solamente una pequeña fracción de la muestra, desechando el resto. A este sistema se le llama “con división/sin división” (en inglés *SPLIT/SPLITLESS*).

2.5.2.3 Temperatura del horno

La temperatura de la columna es una variable importante. Para un trabajo preciso ha de regularse a las décimas de grado, por ello la columna normalmente se introduce dentro de un horno con temperatura controlada. Para muestras cuyos componentes presentan un amplio intervalo de temperaturas de ebullición, a menudo es conveniente emplear una *programación de temperatura*, con lo que se aumenta la temperatura de la columna bien en forma continua o bien por etapas, al mismo tiempo que se obtiene la separación.



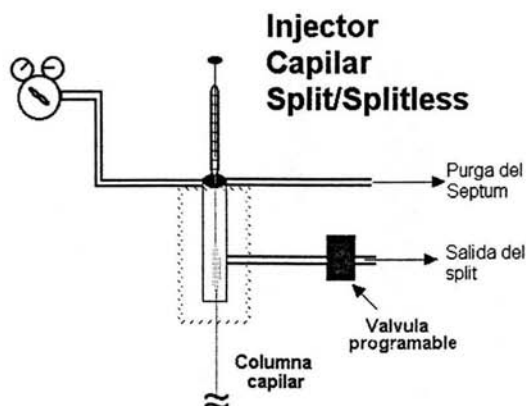


Figura 6. Sistema de Inyección split/splitless de Cromatografía de Gases

2.5.2.4 Detector de ionización de llama (FID)

El detector de ionización de llama (FID, por su siglas en inglés *Flame Ionization Detector*) es el detector más extensamente utilizado y por lo general, uno de los más aplicables en CG. En un quemador tal como se muestra en la Figura 7, el efluente de la columna se mezcla con el hidrógeno y con el aire para luego encenderse eléctricamente. La mayoría de los compuestos orgánicos, cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno/aire, produce iones y electrones que pueden conducir electricidad a través de la llama⁽²⁸⁾. El mecanismo exacto de la ionización de llama no está bien establecido. El FID responde a todos los compuestos orgánicos que sean combustibles a la llama. La señal es relativamente proporcional a la cantidad de carbón reducido en la llama. De esta manera todos los hidrocarburos deben exhibir la





misma respuesta. Sin embargo, cuando existen heteroátomos como oxígeno o nitrógeno, el factor de respuesta disminuye.⁽²⁹⁾

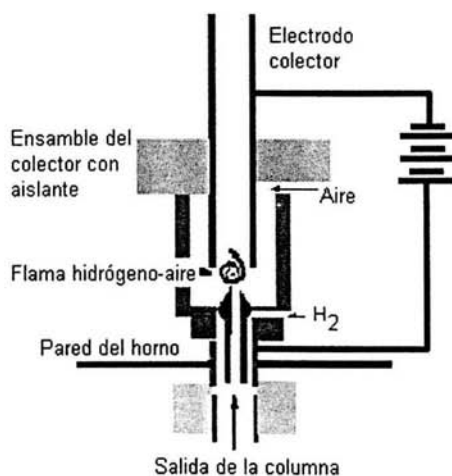


Figura 7. Sistema de Detección de Ionización a la llama

El detector es insensible a los gases no combustibles como H_2O , CO_2 , SO_2 y NO_x . Estas propiedades hacen del FID uno de los detectores generales más utilizados para el análisis de la mayoría de los compuestos orgánicos. Una desventaja del FID es que se trata de un detector destructivo de la muestra.⁽²⁸⁾





ABREVIATURAS USADAS

Los compuestos citados en el texto fueron abreviados de la siguiente forma:

COMPUESTO	ABREVIACIÓN
Acetaldehído	AcetHO
Acetato de etilo	AcOEt
Alcohol metílico	MeOH
Alcohol etílico	EtOH
1-propanol	ProOH
Alcohol isobutílico, 2-metil-1-propanol	IsoBuOH
Acetato isoamílico	Acet. Isoamílico
1-butanol	BuOH
Alcohol amílico, Alcohol pentílico	Alc. amílico
Alcohol isoamílico, Alcohol isopentílico, 3-metil-1-butanol	Alc. isoamílico
Alcohol hexílico, n-Hexanol	HexOH
Alcohol octílico, n-Octanol	Octanol
Éster etílico del ácido hexanoico	EE6:0
Éster etílico del ácido heptanoico	EE7:0
Éster etílico del ácido octanoico	EE8:0
Éster etílico del ácido nonanoico	EE9:0
Éster etílico del ácido decanoico	EE10:0
Éster etílico del ácido láurico	EE12:0
Éster etílico del ácido tridecanoico	EE13:0
Éster etílico del ácido mirístico	EE14:0
Éster etílico del ácido palmítico	EE16:0
Éster etílico del ácido palmitotéico	EE16:1
Éster etílico del ácido esteárico	EE18:0
Éster etílico del ácido oléico	EE18:1
Éster dietílico del ácido succínico	EE Ac. Succ.
2-feniletanol	PheEtOH





3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 Estándares

Alcohol etílico (99.9%), alcohol butílico (99.7%), alcohol isoamílico (99.8%), alcohol amílico (99.7%), acetato de etilo (99.99%); ácido láctico (99.8%), ácido clorhídrico (37.2%) y cloruro de sodio (100%) de J. T. Baker Xalostoc, Estado. de México. Diclorometano (99.8%) de Mallinckrodt Xalostoc, Estado. de México. Alcohol isobutílico (99.5%), 2-feniletanol (99.1%) y alcohol octílico (99.5%) de Chem Service West Chester, PA. Éter isopropílico (99%) y 2,2,4-trimetilpentano de Aldrich Chemical Company Milwaukee, Wis., USA. Alcohol propílico (99%), ácido tartárico (99.5%), fosfato de potasio monobásico (99.5%) de Merck, Darmstadt. Ácido hexanoico (99.1%), octanoico (99.8%), decanoico (99.5%) y succínico (99.9%) de Sigma St. Louis, MO., USA Glicerina (pura) de Mead Johnson de México, Ciudad de México.

3.1.2 Muestras

Las muestras se adquirieron en la sección de vinos dentro del supermercado: 9 vinos tintos y dos vinos blancos (Tabla 1).





CAPÍTULO 3
PARTE EXPERIMENTAL

Tabla 1. Vinos estudiados en este trabajo

VINO	NOMBRE	CEPA	AÑO	%ALC. VOL.	REGIÓN	TIPO
CABERNET SAUVIGNON	L.A CETTO	CABERNET SAUVIGNON	2000 2001	13	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	TINTO
	PEDRO DOMEQ X-A		2000 2001	12.6	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	
	HIDALGO		N. E.	11	QUERÉTARO, MÉXICO	
	CALIXA		2001	13	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	
	CONCHA Y TORO		2001	12.5	VALLE CENTRAL, CHILE	
	CLASSICO CANEPA		2000	12.5	VALLE CENTRAL, CHILE	
	SANGRE DE CRISTO	VARIAS	N. E.	12	COAHUILA, MEXICO	
L. A. CETTO	PETITE Sirah	PETITE Sirah	1998 2001	13.5	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	BLANCO
	ZINFANDEL	ZINFANDEL CALIFORNIANA	2001	13.5	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	
	BLANC DE ZINFANDEL	ZINFANDEL CALIFORNIANA	N. E.	11.5	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	
	FUMÉ BLANC	SAUVIGNON BLANC	2001 2001	12.5	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	

N. E. No Especificado

En el APÉNDICE I se detallan los datos de los vinos.

3.1.3 Microextracción en Fase Sólida

Se utilizaron fibras para inyección manual. Tanto el portafibra como las fibras fueron adquiridos de SUPELCO, Supelco Park, Bellefonte, PA. E. U. A. La fase estacionaria de





las fibras fué de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB) y poliacrilato (PA), con una película de 65µm y 85µm de grosor respectivamente y ambas con una longitud de 10.6 mm.

La fibra de PDMS/DVB se acondicionó a 260°C por 30 minutos y la fibra de PA a 300°C por 120 minutos, según las recomendaciones del fabricante.

Se emplearon viales de vidrio de 11 mL de capacidad, con tapón de rosca horadado de baquelita, y sellos de silicón de 1.2 cm. Para realizar la agitación en los viales se utilizó una barra magnética de 10 x 3 mm y Parrilla DataPlate® serie 720 de PMC con agitación magnética.

3.1.4 Microextracción Líquido-Líquido

Tubos de ensaye con rosca de baquelita de 16 x 120 Pyrex; matraces aforados de 10 mL, ambos de vidrio de borosilicato marca Pyrex; pipetas aforadas (tipo A) de 1 mL (Fishebrana) y de 10 mL (PK).

Centrífuga modelo CLA3076X-24 de International Equipment Co. de 3100 rpm, y vortex MaxiMix II Tipo 37600 Mezclador de Thermolyne.

Micro jeringas Hamilton de 10, 100 y 500 mL.

3.1.5 Condiciones cromatográficas

3.1.5.1 Cromatografía de Gases-Detector de Ionización a la Flama

Cromatógrafo de Gases Hewlett-Packard 5890, equipado con sistema de detección de ionización de llama (DIF), y sistema de inyección *split/splitless*.





Columna capilar SP-1000 (SUPELCO Park, Bellefonte), de 30 m × 0.32 mm x 1 μm .El programa de temperatura empleado fue: temperatura inicial 40 °C, isotérmicamente por 3 min., con un incremento posterior de 10°C/min hasta una temperatura final de 220 °C que se mantuvo por 10 min. La inyección se realizó utilizando el modo con división de flujo (*split*). Las temperaturas del inyector y detector fueron de 220 °C.

3.1.5.2 Cromatografía de Gases–Espectrometría de Masas (CG–EM)

Cromatógrafo de Gases 6890N acoplado a un Detector Selectivo de Masas 5973 de Agilent Technologies. Columna capilar de sílice fundida ZB-5M (Zebron Phenomenex, USA) de 30 m × 0.32 mm x 0.32 μm. Gas acarreador: Helio con flujo de 1 mL/min. La temperatura de la línea de transferencias fue de 280 °C; analizador (cuadrupolar) 150 °C. Los análisis se realizaron por impacto electrónico (70 eV). Se utilizó el modo Barrido Toral del Espectro (SCAN, por sus siglas en inglés). El programa de temperatura empleado fue 50 °C isotérmicamente por 3 min., con un incremento posterior de 10 °C/min hasta una temperatura final de 280 °C que se mantuvo por 10 min. La temperatura del inyector fue de 220 °C.





3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.2.1 Identificación de alcoholes y ésteres etílicos en vino sintético

El propósito de preparar un vino sintético fue obtener una matriz lo más similar a las muestras en estudio y disminuir el efecto matriz en el desarrollo de la metodología. Se preparó 100 mL de un vino sintético con 11% de etanol; 6 g/L de glicerina, 2.5 g/L de ácido tartárico, 3 g/L de ácido láctico y 1 g/L de fosfato de potasio. El pH se ajustó a 3 con HCl al 10%.

Para identificar algunos alcoholes y ésteres que están reportados como característicos de los vinos, se preparó una solución estándar de alcoholes: EtOH, ProOH, BuOH, Alc. amílico, Alc. isoamílico y PheEtOH (100 mg/L en EtOH) y una solución estándar de ésteres etílicos de ácidos grasos: EE6:0, EE7:0, EE8:0, EE9:0, EE10:0, EE12:0, EE13:0, EE14:0, EE16:0, EE16:1, EE18:0, EE18:1^c (100 mg/L en EtOH). Con estas soluciones estándar se fortifico el vino sintético a una concentración de 1 mg/mL. De esta solución se inyectó 1 µL en el CG-DIF para obtener los tiempos de retención y realizar la identificación.

3.2.2 Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

La fibra empleada para la identificación de alcoholes y ésteres etílicos en vino sintético así como en las muestras en estudio fue la PDMS/DVB. La optimización de las condiciones de extracción y la identificación de otros compuestos volátiles también se

^c Véase la lista de abreviaciones que se encuentra al inicio de este capítulo.





realizaron con esta fibra, debido a que en la literatura se reportan buenos resultados para vinos.^(9,14,16,17,18,32,33)

En un vial de vidrio de 11 mL se adicionaron 4 mL de muestra (vino *Cabernet Sauvignon*) y un agitador magnético; la muestra fue sellada con cinta teflón, y cerrada con el tapón y septum de silicón. La muestra se colocó en baño maría a una $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con agitación magnética (1200 rpm). Permitiendo alcanzar el equilibrio de la cabeza-espacio durante de 5 min. antes de la extracción. Posteriormente de la extracción la fibra se colocó en el inyector del cromatógrafo por 10 min. para la desorción de los analitos. Todas las determinaciones se realizaron con las condiciones cromatográficas indicadas en la sección 3.1.5.1.

3.2.2.1 Optimización de las condiciones de la MEFS

Antes de la determinación de los compuestos volátiles y semivolátiles en el vino, se establecieron las condiciones óptimas de la MEFS. Estas condiciones fueron: tiempo de extracción, efecto salino y pH.

a. Tiempo de extracción

Los tiempos de extracción que se analizaron fueron 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min. Este tiempo de extracción se determinó para asegurar que la fibra estuviera en equilibrio con la muestra. Una vez determinado, el tiempo de extracción se empleó para optimizar el efecto salino y el pH.





b. Efecto salino

El efecto salino se estudio adicionando 0, 5, 10, 15, 25 y 50% (m/v) a 4 mL de muestra. Las condiciones de MEFS fueron las mismas que para el estudio de tiempo de extracción (apartado anterior). La cantidad de sal seleccionada se utilizó posteriormente en todas las determinaciones.

c. pH

Los valores de pH estudiados fueron de 1, 2 y 3, adicionando una solución de HCl al 10%. El valor de pH elegido se utilizó en todas las determinaciones.

3.2.2.2 Identificación de compuestos por CG-DIF

Una vez optimizados los parámetros de la MEFS se analizó una muestra de vino tinto tipo *Cabernet Sauvignon*, para comparar los tiempos de retención obtenidos con los tiempos de retención de alcoholes y ésteres en el vino sintético.

3.2.2.3 Precisión de la MEFS

Debido a que la propia matriz es una fuente de variación, por el gran número de compuestos presentes, se determinó la precisión de la MEFS analizando 5 veces la muestra (vino *Cabernet Sauvignon* L. A. Cetto) y calculando el coeficiente de variación con la Ec. 1

$$CV = \frac{\sigma}{x} \times 100 \dots \text{Ec. 1}$$





3.2.2.4 Identificación de compuestos por CG–EM

Con el fin de confirmar los compuestos identificados por CG–DIF e identificar otros compuestos presentes en el vino, las muestras se analizaron por CG–EM utilizando las mismas condiciones de MEFS optimizadas. La identificación se efectuó comparando los espectros obtenidos con los espectros de la biblioteca NIST^d del equipo. Este análisis se realizó con las muestras de los vinos *Cabernet Sauvignon* (L. A. Cetto, Pedro Domeq e Hidalgo); *Petite Sirah* y *Fumé Blanc* (L. A. Cetto).

3.2.2.5 Perfiles de las muestras

Una vez optimizadas las condiciones de la MEFS e identificados algunos de los compuestos presentes en los vinos, se analizó el perfil de los vinos mencionados en la Tabla 1 para compararlos entre sí.

Las muestras se analizaron empleando dos tipos de fibras: PDMS/DBV, de polaridad intermedia (debido a las dos fases utilizadas) y retención alta (esta característica se la da la resina de DVB que es recomendada para compuestos volátiles), y la fibra de PA que está recomendada para compuestos orgánicos polares⁽²⁰⁾. La extracción se realizó siguiendo los parámetros optimizados para la MEFS.

Para determinar si es posible clasificar los vinos en base a sus perfiles obtenidos por MEFS, se analizaron por triplicado los vinos *Cabernet Sauvignon* (L. A. Cetto, Pedro

^d National Institute of Standards and Technology





Domeq e Hidalgo), *Petite Sirah* (L. A. Cetto) y *Fumé Blanc*. (L. A. Cetto) con el propósito de realizar un estudio estadístico.

3.2.3 Microextracción Líquido-Líquido (MELL)

Para este trabajo se desarrolló un método de cuantificación a través de la MELL basado en los antecedentes mencionados en la sección 2.4.2. El propósito es establecer las condiciones experimentales adecuadas para realizar la cuantificación de todos o casi todos los compuestos presentes en el vino.

Debido a que la cuantificación de todos los compuestos encontrados en los vinos analizados representaría un gran trabajo, solamente se eligieron y cuantificaron a tres alcoholes (IsoBuOH, Alc. Isoamílico y el PheEtOH), por las siguientes razones:

1. Fueron de los primeros compuestos identificados en el vino, hecho que facilitaba su identificación dentro de los cromatogramas obtenidos,
2. que son parte de los alcoholes fusel los cuales son importantes en el aroma y el sabor del vino, y
3. al analizar los resultados de los vinos, se encontró que estos alcoholes eran representativos dentro de las muestras.

Los disolventes probados para realizar la MELL fueron el diclorometano (CH_2Cl_2), cloroformo (CHCl_3), tetracloruro de carbono (CCl_4), 2,2,4-trimetil pentano $\{[(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3]\}$ y éter isopropílico $\{[(\text{CH}_3)_2\text{CH}]_2\text{O}\}$.





En un tubo de ensaye con rosca se colocaron 10 mL de vino *Cabernet Sauvignon* L. A. Cetto, 1 mL del disolvente extractor, 15% de sal, 500 μL de metanol y 5 μL de octanol (500 ppm) como estándar interno (EI). Las muestras se sellaron con cinta teflón y el tubo se cerró con su tapa. Se agitaron en vortex por 1 min. y centrifugaron durante 5 min. Se tomó 1 μL de la fase orgánica y se inyectó en el CG-DIF.

Las condiciones cromatográficas fueron las mencionadas en la sección 3.1.5.1.

3.2.3.1 Cuantificación

Después de optimizar la MELL, se procedió a realizar la cuantificación elaborando una curva por adiciones patrón relativas agregando 0, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de los estándares de Alc. Isoamílico, IsoBuOH y PheEtOH a 10 ml de cada vino en estudio. Para evitar las incertidumbres asociadas a la inyección de la muestra⁽²⁸⁾ se eligió utilizar octanol como estándar interno.





4.1 Microextracción en Fase Sólida

4.1.1 Identificación de alcoholes y ésteres etílicos en vino sintético

El análisis de la mezcla de estándares de alcoholes se muestra en la Figura 8, los tiempos de retención se muestran en la Tabla 2.

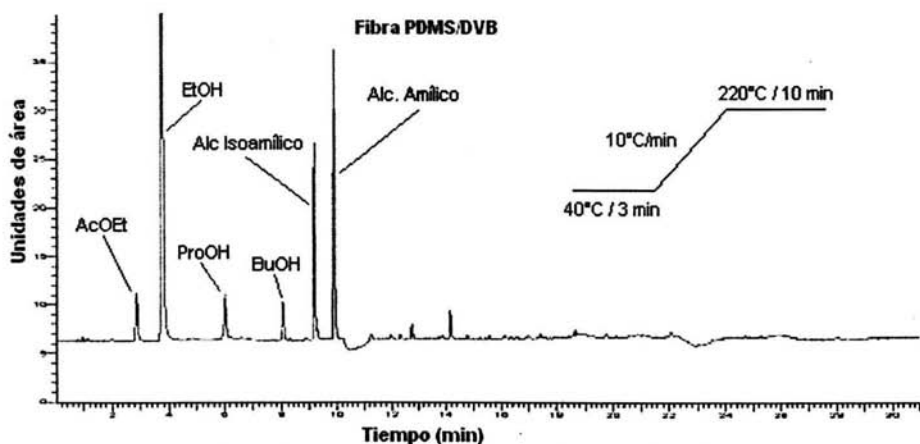


Figura 8. Cromatograma de los estándares de alcoholes
(Inyección directa. Las condiciones cromatográficas se encuentran en la sección 3.1.5)

Tabla 2. Tiempo de retención de los estándares de alcoholes

Compuesto	Tiempo de retención (min)
AcOEt	2.87
EtOH	3.74
ProOH	6.02
BuOH	8.04
Alc. Isoamílico	9.17
Alc. Amílico	9.91

Los resultados de los ésteres etílicos de ácidos grasos se muestran en Figura 9 y los tiempos de retención en la Tabla 3.



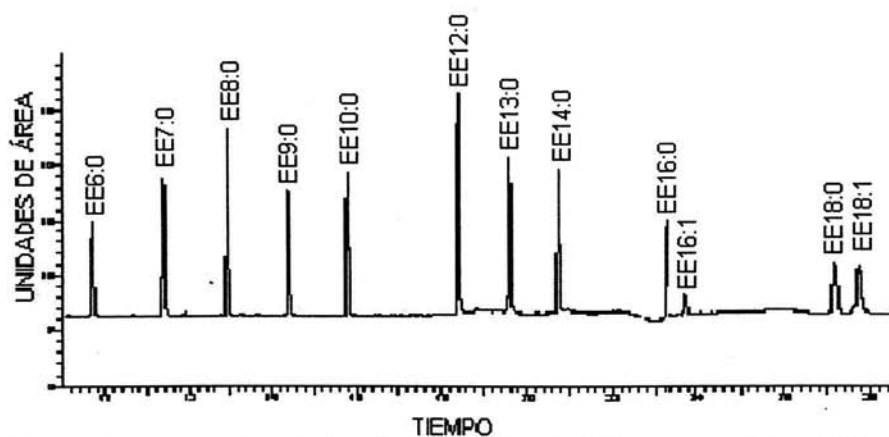


Figura 9. Cromatograma de estándares de ésteres etílicos de ácidos grasos en el vino sintético. (Inyección directa. Las condiciones cromatográficas se encuentran en la sección 3.1.5)

Tabla 3. Tiempo de retención de los estándares de ésteres etílicos de ácidos grasos

Compuesto	Tiempo de retención (min)
EE6:0	9.71
EE7:0	11.37
EE8:0	12.94
EE9:0	14.40
EE10:0	15.80
EE12:0	18.38
EE13:0	19.58
EE14:0	20.73
EE16:0	23.26
EE16:1	23.73
EE18:0	27.15
EE18:1	27.73





4.1.2 Condiciones de la Microextracción en Fase Sólida

4.1.2.1 Tiempo de extracción

El perfil obtenido con la MEFS se muestran en la Figura 10. Como puede observarse la respuesta de los alcoholes isoamílico y butílico permanecen prácticamente constantes en el intervalo de tiempo estudiado. Sin embargo, los alcoholes etílico y propílico no alcanzan el equilibrio en este tiempo.

De acuerdo a estos resultados, se seleccionó 30 minutos como el tiempo de extracción para la MEFS.

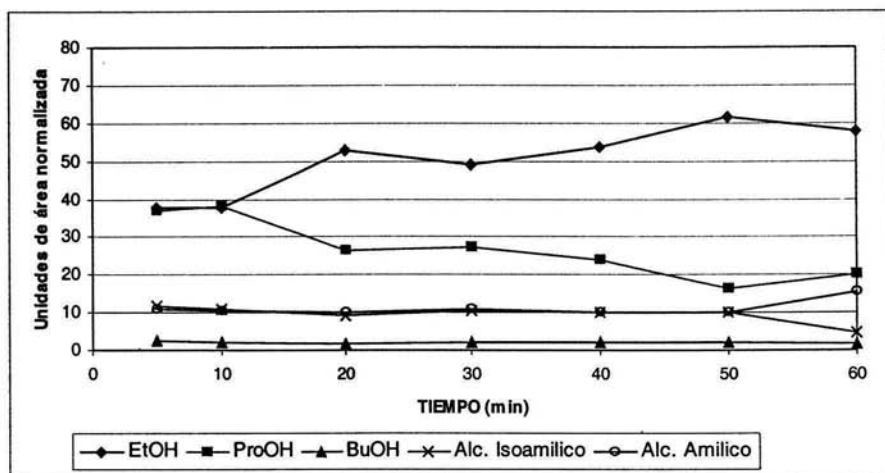


Figura 10. Efecto del tiempo de extracción sobre distintos alcoholes





4.1 2.2 Efecto salino

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11. Se puede observar una gran variación en la respuesta de los distintos compuestos. Observándose más significativamente en el AcOEt donde aparentemente se obtiene una mejor extracción al agregar más de 30% de sal. Sin embargo, los ésteres etílicos de los ácidos grasos y el PheEtOH, se extraen mejor sin adición de sal. Para el IsoBuOH y Alc. Isoamílico aparentemente se obtiene una mejor extracción cuando se agrega sal al 15%, si bien los resultados no son significativos; el ProOH no muestra diferencias significativas y la extracción del EE Ác. Succ. disminuye cuando se agrega más del 30% de sal.

Debido a estos resultados se eligió agregar 15% de sal para realizar a la MEFS.

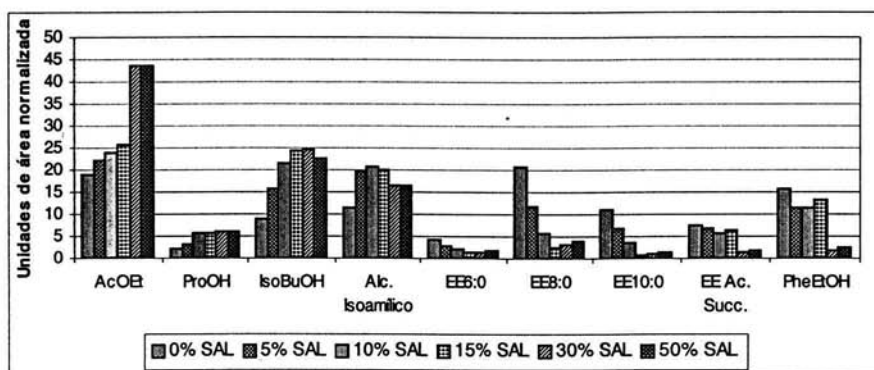


Figura 11. Efecto salino sobre la extracción





4.1.2.3 pH

Se observó que el cambio de pH no modifica significativamente la extracción del ProOH, IsoBuOH, BuOH, Alc. Isoamílico y los ésteres etílicos de los ácidos grasos como se observa en la Figura 12, en cambio en el EE Ac. Succ. y el PheEtOH la extracción disminuye ligeramente a pH de 2, pero la diferencia no es significativa. En base a estos resultados se seleccionó trabajar a pH 3, ya que el pH del vino es 3 y se evita dañar a la fibra.

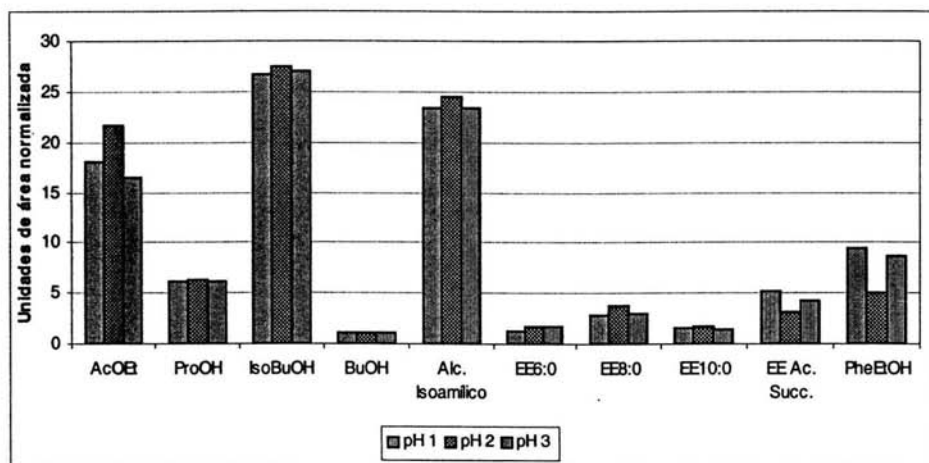


Figura 12. Efecto del pH





4.1.3 Identificación de compuestos por CG-DIF

Se extrajo una muestra de vino con los parámetros optimizados de la MEFS para comparar los tiempos de retención de ésta con los obtenidos de las mezclas de estándares de alcoholes y ésteres etílicos de ácidos grasos y realizar de esta forma la identificación de algunos de los compuestos presentes en el vino.

De esta forma, se lograron identificar en el vino los compuestos mencionados en la Figura 13.

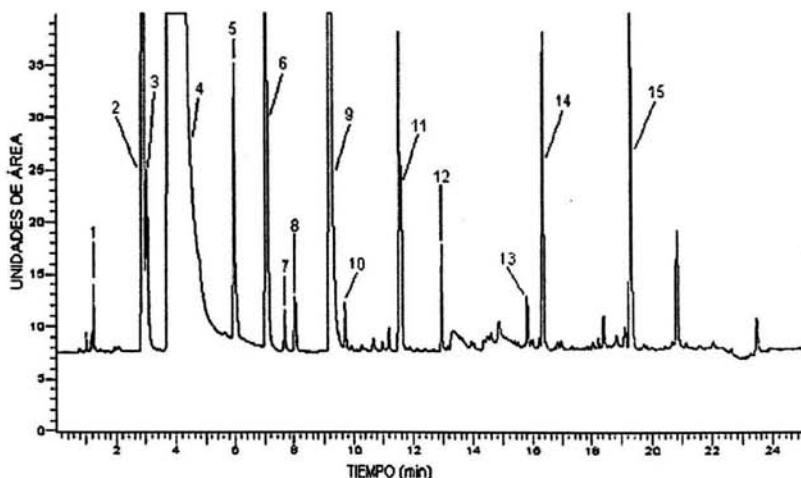


Figura 13. Identificación de compuestos en vino Cabernet Sauvignon por adición de estándares: 1, AcEtOH; 2 AcOEt; 3, MeOH; 4, EtOH; 5, ProOH; 6, IsoBuOH; 7, Acet. Isoamílico; 8, BuOH; 9, Alc. Isoamílico; 10, EE6:0; 11, HexOH; 12, EE8:0; 13, EE10:0; 14, EE Ác. Succ; 15, PheEtOH.





4.1.4 Precisión de la Microextracción en Fase Sólida

Como se describió en la sección 3.2.2.3, la precisión de la MEFS se determinó calculando el coeficiente de variación (CV) de los analitos identificados en el vino *Cabernet Sauvignon* de L. A. Cetto. En la Tabla 4 se encuentran los resultados obtenidos.

Se observa que la precisión de la MEFS es aceptable ya que el porcentaje del CV calculado de la mayoría de estos compuestos es menor a 20%. Sin embargo, el AcOEt, EE10:0, EE Ác. Succ. y el PheEtOH presentaron un porcentaje de CV mayor a este valor. En el caso del AcOEt se comprobó que la señal de este compuesto está traslapada con la señal del MeOH (Figura 13) y debido a esto, era de esperarse que el porcentaje de CV fuera alto.

Tabla 4. Precisión de la MEFS de algunos compuestos en el vino (n=5)

	COMPUESTO	σ^2	C. V. (%)
1	AcetOH	3336.89	0.87
2	AcOEt	20375.34	28.64
3	ProOH	14739.64	14.03
4	IsoBuOH	40520.05	10.15
5	Acet. Isoamílico	1009.52	5.99
6	BuOH	2183.71	13.54
7	Alc. Isoamílico	222535.22	5.67
8	EE6:0	1306.03	6.83
9	Alc. Amílico	116.88	6.04
10	HexOH	9145.56	15.78
11	EE8:0	5583.32	14.92
12	EE10:0	4539.87	23.42
13	EE Ác. Succ.	19201.34	25.17
14	PheEtOH	63044.74	38.68





Como ya se mencionó, existen muchos factores que influyen en la cantidad de analito extraído, uno de ellos es el coeficiente de partición analito/recubrimiento/matriz, que está parcialmente determinado por la interacción del analito con la matriz. Para vencer estas limitaciones cinéticas, uno de los métodos utilizados es el calentamiento de la muestra. Sin embargo, mientras la temperatura aumenta el recubrimiento empieza a perder la capacidad de absorción de los analitos de interés, y por lo tanto decrece el coeficiente de partición del recubrimiento. Este hecho, unido a la baja volatilidad de algunos de los analitos, explicaría la variación del porcentaje del CV determinados.

4.1.5 Identificación de compuestos por CG-EM

Para complementar la identificación realizada con CG-DIF, debido a que otros compuestos no pudieron ser identificados y, que a pesar de ser minoritarios, son muy importantes por su probable contribución al aroma del vino, se intentó identificarlos a través de la CG-EM.

Los vinos analizados fueron los vinos *Cabernet Sauvignon* de L. A. Cetto, Pedro Domeq e Hidalgo; así como los vinos *Petite Sirah* y *Fumé Blanc* de L.A. Cetto. A continuación se muestran los cromatogramas iónicos totales obtenidos de los vinos de L. A. Cetto (Figuras 14 a la 16) y en la Tabla 5 se observa la relación de compuestos identificados en los vinos antes mencionados.





CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

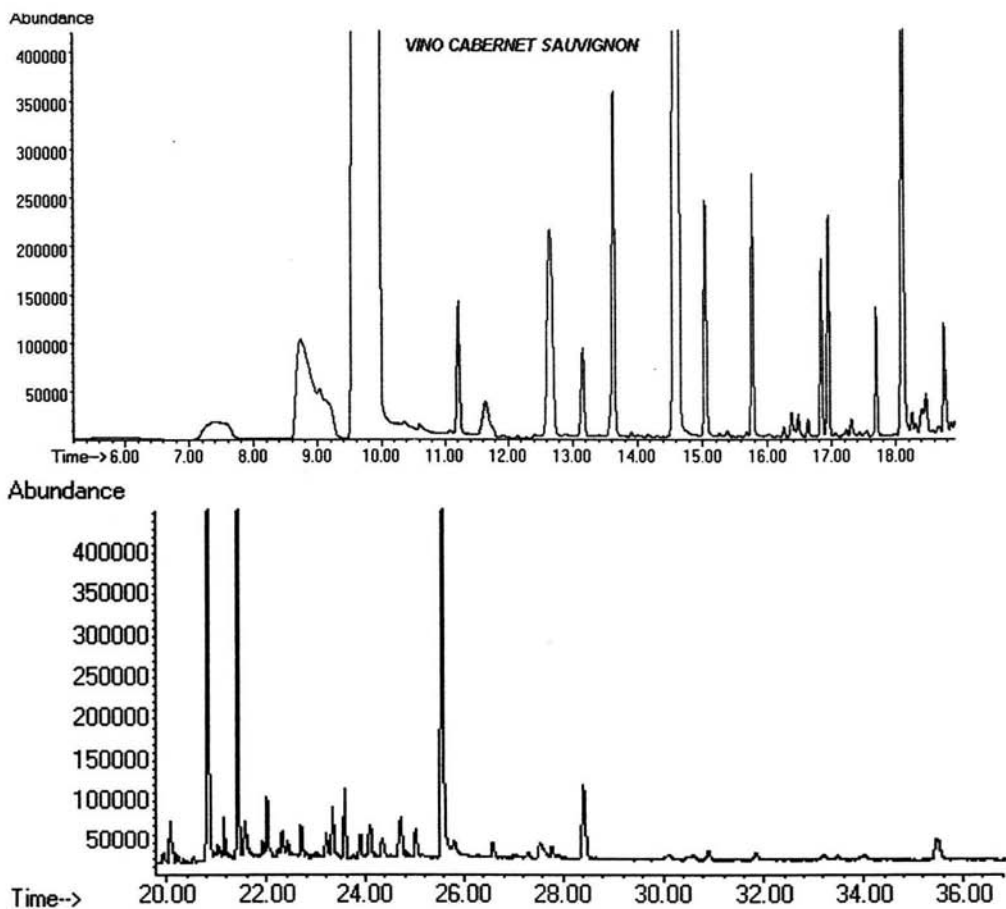


Figura 14. Cromatograma del vino Cabernet Sauvignon de la marca L. A. Cetto.





CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

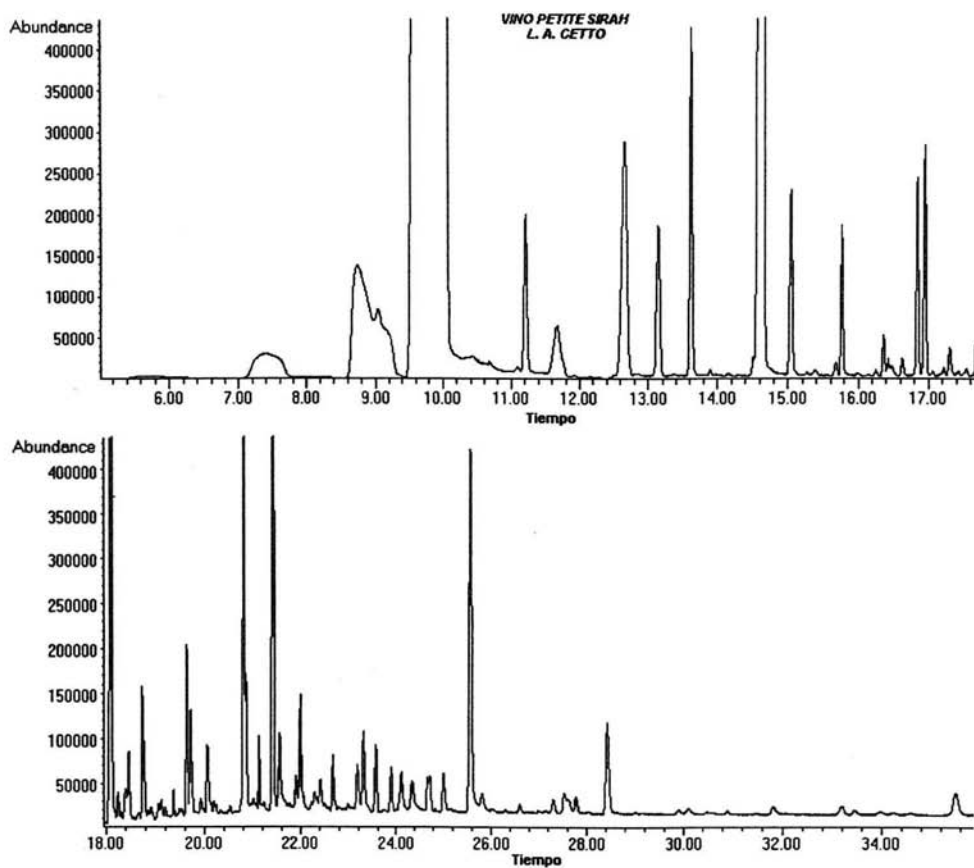


Figura 15. Cromatograma del vino Petite Sirah de la marca L. A. Cetto.





CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

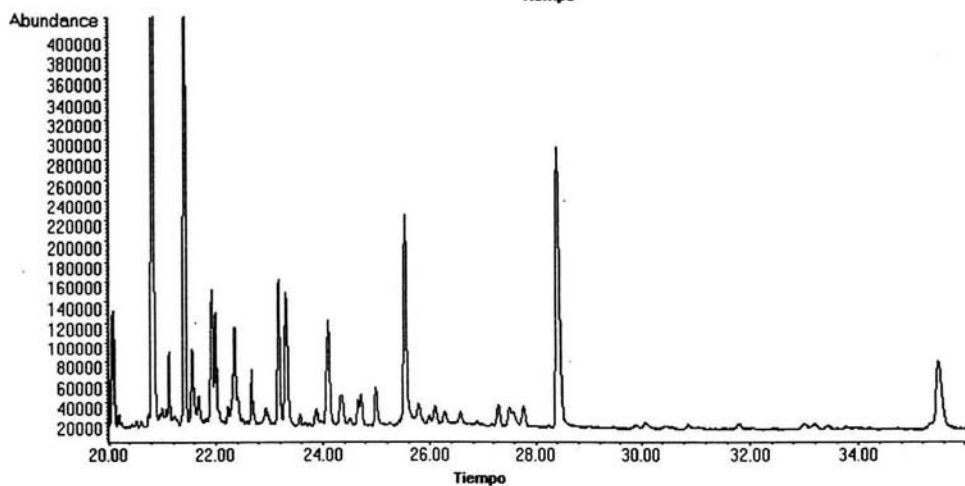
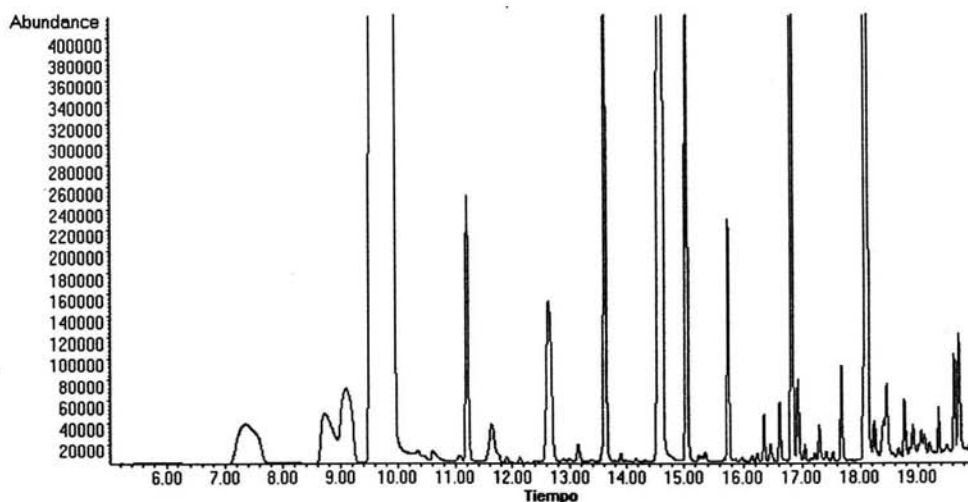


Figura 16. Cromatograma del vino Fumé Blanc de la marca L. A. Cetto





CAPÍTULO 4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5. Compuestos encontrados en los vinos por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

Compuesto	Cabernet Sauvignon			L. A. Cetto	
	L. A. Cetto	Pedro Domeq	Hidalgo	Petite Sirah	Fumé Blanc
Acetaldehído	x	x	x	x	x
Acetato de etilo	x	x	x	x	x
Etanol	x	x	x	x	x
Éster etílico del ácido isobutírico		x	x	x	x
Dióxido de azufre	x				x
1-Propanol	x	x	x	x	x
Éster etílico del ácido-2-metil butírico		x			x
Éster etílico del ácido isovalérico		x	x	x	x
Isobutanol	x	x	x	x	x
Acetato isoamílico	x	x	x	x	x
1-Butanol	x	x	x	x	x
Metil éster del ácido-4-metil valérico		x			
Alcohol isoamílico	x	x	x	x	x
Éster etílico del ácido caproico	x	x	x	x	x
1-Pentanol	x	x	x	x	x
Alcohol isopropeniletílico		x			
Hexiléster del ácido acético	x	x	x	x	
Isohexanol	x	x	x	x	x
Acetoína		x		x	
3-Metil-1-pentanol	x	x	x	x	x
1-Hexanol	x	x	x	x	x
Éster etílico del ácido láctico	x	x	x	x	x
<i>trans</i> -3-Hexen-1-ol	x	x	x	x	x
<i>cis</i> -3-Hexen-1-ol		x	x	x	x
Éster etílico del ácido caprílico	x	x	x	x	x
1-Heptanol	x	x	x	x	
Pentadecano		x			
Ácido acético	x	x	x	x	x
n-Decanal		x			
2-Etil hexanol			x		
Éster etílico del ácido sórbico			x		
Éster etílico del ácido nonanóico		x	x	x	
Linalol		x	x	x	
2-Borneno		x	x		
Isoamilacetato			x		





CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ácido isobutírico		x	x	x	x
Éster etílico del ácido cáprico	x	x	x	x	x
1-Nonanol	x	x	x	x	
Isoamilcaprilato		x	x		x
Diéster etílico del ácido succínico	x	x	x	x	x
Etil- <i>trans</i> -4-decanoato			x		
Éster etílico del ácido benzoico			x		
Santalol					x
Éster etílico del ácido láurico	x	x	x	x	x
Metil salicilato		x	x		
2-Fenil éster del ácido acético		x	x	x	
Ácido capríco	x	x		x	x
Alcohol bencílico	x	x	x		
2-Feniletanol	x	x	x	x	x
Éster etílico del ácido mirístico	x	x	x	x	
Ácido capríco	x	x	x	x	x
Éster etílico del ácido pentadecanoico	x			x	
Ácido sórbico			x		
Éster etílico del ácido palmítico	x	x	x	x	
Ácido cáprico	x	x	x	x	x
Amifenol		x			
Ácido mirístico		x			

En la Tabla 5 se muestra todos los compuestos identificados mediante CG-EM. El análisis de esta Tabla muestra:

- No se identificaron los mismos compuestos en todos los vinos.
- El acetaldehído, acetato de etilo, 1-propanol, isobutanol, acetato isoamílico, 1-butanol, alcohol isoamílico, éster etílico del ácido capríco, 1-pentanol, isohexanol, 3-metil-1-pentanol, 1-hexanol, éster etílico del ácido láctico, *trans*-3-hexen-1-ol, éster etílico del ácido capríco, ácido acético, éster etílico del ácido cáprico, diéster etílico del ácido succínico, éster etílico del ácido láurico, 2-





feniletanol, ácido caprílico, ácido cáprico y etanol fueron identificados en todos los vinos, estos compuestos pueden ser los principales responsables del sabor y olor afrutado del vino, ya sea de forma individual o combinados con otros compuestos.

- Algunos compuestos como el éster etílico del ácido isobutírico, éster etílico del ácido isovalérico, *cis*-3-hexen-1-ol y ácido isobutírico no se identificaron en el vino *Cabernet Sauvignon* de L. A. Cetto bajo estas condiciones de análisis. Esto no indica que estos compuestos no estén presentes en dicho vino, podría suponerse que su concentración es tan baja que se encuentran debajo del límite de detección del cromatógrafo y se confunden con el ruido del instrumento.
- El dióxido de azufre solo está presente en el vino *Cabernet Sauvignon* de L. A. Cetto y en el vino *Fumé Blanc*, probablemente hubo problemas durante el proceso, por lo que hubo que adicionar éste compuesto.
- Los compuestos metiléster del ácido-4-metil valérico, alcohol isopropeniletílico, pentadecano, n-decanal, amifenol y el ácido mirístico solo pudieron detectarse en el vino *Cabernet Sauvignon* de Pedro Domeq, estos pueden tener su origen debido al proceso de elaboración.
- Los compuestos 2-etil hexanol, éster etílico del ácido sórbico, isoamilacetato, etil-*trans*-4-decanoato, éster etílico del ácido benzoico y ácido sórbico sólo fueron identificados en el vino *Cabernet Sauvignon* de Hidalgo. Como se indicó, el vino





Hidalgo procede de la región de Querétaro, por lo que las condiciones de desarrollo de la vid son distintas a las que se presentan en la región de Calafia, donde se cultivaron la uva de los vinos L. A. Cetto y Pedro Domeq.

Estos factores son muy importantes para el desarrollo del sabor del vino (sección 2.3), por lo que esto explicaría la presencia de estos compuestos sólo en el vino Hidalgo.

- El ácido caprónico fue encontrado en todos los vinos analizados, excepto en el vino Hidalgo y el vino L. A. Cetto, probablemente la concentración está por debajo del límite de detección.
- El hexiléster del ácido acético, 1-heptanol, 1-nonanol, éster etílico del ácido mirístico y el éster etílico del ácido palmítico; sólo se presentan en los vinos tintos *Cabernet Sauvignon* y *Petite Sirah* de L. A. Cetto, Pedro Domeq e Hidalgo.
- Los compuestos éster etílico del ácido nonanóico, linalol y el 2-fenil éster del ácido acético están presentes en los vinos Pedro Domeq e Hidalgo tipo *Cabernet Sauvignon* y en el vino *Petite Sirah*. En el vino *Cabernet Sauvignon* de L. A. Cetto no se encontraron dichos compuestos, sin embargo cabe la posibilidad de que se encuentren debajo del límite de detección del instrumento.
- El alcohol bencílico solo se encuentra en los vinos *Cabernet Sauvignon*; el 2-borneol solo se identificó en los vinos Pedro Domeq e Hidalgo sin embargo, al





igual que los casos anteriores, probablemente la concentración de éste compuesto está por debajo del límite de detección en el vino L. A. Cetto.

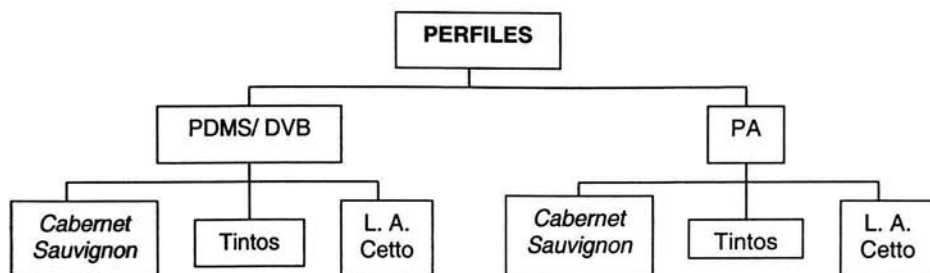
- El santalol sólo se encontró en el vino Fumé Blanc.

Finalmente, algunos compuestos se identificaron en ciertos vinos por ejemplo:

- El éster etílico del ácido pentadecanoico sólo se identificó en los vinos *Cabernet Sauvignon* y *Fumé Blanc*, ambos de L. A. Cetto.
- El éster etílico del ácido-2-metil butírico sólo se identificó en el vino *Cabernet Sauvignon* de Pedro Domeq y en el *Fumé Blanc* de L. A. Cetto.
- La acetoina se identificó en los vinos *Cabernet Sauvignon* de Pedro Domeq y *Petite Sirah* de L. A. Cetto.
- El isoamilcaprilato se identificó en los vinos *Cabernet Sauvignon* de Pedro Domeq e Hidalgo y en el *Fumé Blanc* de L. A. Cetto.

4.1.6 Perfiles de las muestras

Los resultados se obtuvieron y se presentan según se indica en el siguiente esquema:





Los datos analizados se obtuvieron realizando tres extracciones de cada vino. Los vinos analizados fueron:

- Tres vinos tipo *Cabernet Sauvignon* (marcas L. A. Cetto, Pedro Domeq e Hidalgo), y
- Tres vinos tintos (*Petite Sirah* y *Fumé Blanc*, además del *Cabernet Sauvignon*, los tres de la marca L. A. Cetto)

4.1.6.1 Fibra PDMS/DVB

a. Vinos tipo *Cabernet Sauvignon*

En la Figura 17 se muestran los resultados de la MEFS realizada a todos los vinos *Cabernet Sauvignon* estudiados.

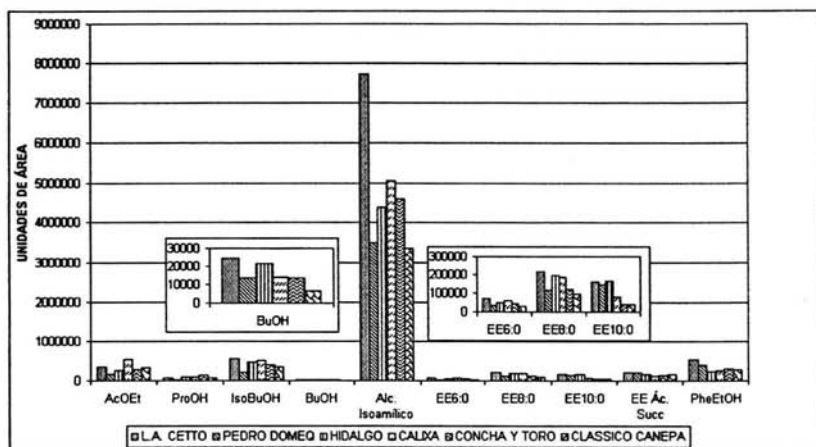


Figura 17. Perfiles de los compuestos obtenidos con la fibra PDMS/DVB de los vinos tipo *Cabernet Sauvignon*.





Con los perfiles cromatográficos obtenidos no es posible llegar a una conclusión importante por lo que se realizó el análisis estadístico de varianza ANOVA (acrónimo del inglés Analysis Of Variance) de un solo factor con un intervalo de confianza del 95%. ($\alpha=0.05$). El resultado del ANOVA se encuentra en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados del ANOVA para los vinos tipo Cabernet Sauvignon analizados por MEFS (PDMS/DVB)

Compuesto	Valor calculado de F	Valor teórico de F	Probabilidad de error
AcOEt	1.52	5.14	0.29
ProOH	1,037.95		2.39×10^{-08}
IsoBuOH	178.65		4.50×10^{-06}
BuOH	7.11		0.03
Alc. Isoamílico	113.41		1.71×10^{-05}
EE6:0	133.57		1.06×10^{-05}
EE8:0	46.63		2.21×10^{-04}
EE10:0	4.10		0.08
EE. Ác. Succ.	252.02		1.63×10^{-06}
PheEtOH	164.26		5.77×10^{-06}

Este análisis muestra que existen diferencias significativas entre la mayoría de los compuestos analizados ya que los valores de F calculados son mayores que los valores de F teóricos, excepto en los casos del AcOEt y el EE10:0. Este resultado sin embargo, no es suficiente para afirmar que la MEFS no es útil para clasificar la cepa de origen de los vinos.

Como se explicó en los antecedentes, existen diversos factores que pueden ser responsables de variación en la concentración de algunos compuestos a pesar de que la cepa de uva sea la misma. Un primer análisis de estos resultados indica que las diferencias entre los compuestos son debidas a las propias muestras y no a la MEFS,





ya que si la MEFS fuera la fuente de variación, el resultado del ANOVA no mostraría ninguna diferencia significativa entre los compuestos, por lo tanto las diferencias encontradas se deben a los de factores que se presentan durante la elaboración del vino como clima, proceso, región, entre otros.

Debido a que los resultados del ANOVA sólo muestran si existen diferencias significativas entre las medias de las pruebas pero no indica si una media dada, o un grupo de ellas, difieren de otra media dada, o grupo de medias, se realizó la **prueba de rango múltiple de Duncan^d** (PRMD) a las medias de los compuestos que mostraron diferencias significativas para intentar diferenciar los vinos de la misma cepa y diferente marca. En la Tabla 7 se muestran los resultados de esta prueba. Debido a que el AcOEt y el EE10:0 no mostraron diferencias significativas en el ANOVA, estos fueron omitidos en esta prueba.

Para este análisis se parte de la hipótesis de que todos los vinos fueron elaborados a partir de una misma cepa de uva, es decir, *Cabernet Sauvignon* (originaria de Burdeos, Francia); por lo que los resultados obtenidos de la PRMD se explicarán de acuerdo a otros factores que se presentan durante la elaboración del vino.

^d APÉNDICE V





Tabla 7. Resultados de la PRMD para los vinos Cabernet Sauvignon analizados con la fibra PDMS/DVB

ProOH		
<u>DOMEQ</u>	<u>L. A. CETTO</u>	<u>HIDALGO</u>
IsoBuOH		
<u>DOMEQ</u>	<u>HIDALGO</u>	<u>L. A. CETTO</u>
BuOH		
<u>DOMEQ</u>	<u>HIDALGO</u>	<u>L. A. CETTO</u>
Alc. isoamílico		
<u>HIDALGO</u>	<u>DOMEQ</u>	<u>L. A. CETTO</u>
EE6:0		
<u>DOMEQ</u>	<u>HIDALGO</u>	<u>L. A. CETTO</u>
EE8:0		
<u>DOMEQ</u>	<u>HIDALGO</u>	<u>L. A. CETTO</u>
EE Ác. Succ.		
<u>HIDALGO</u>	<u>L. A. CETTO</u>	<u>DOMEQ</u>
PheEtOH		
<u>HIDALGO</u>	<u>DOMEQ</u>	<u>L. A. CETTO</u>

De esta prueba se obtiene lo siguiente:

- La concentración de todos los compuestos, excepto el ProOH y el EE Ác. Succ., es mayor en el vino L. A. Cetto.
- Los únicos compuestos que no presentan diferencias significativas fueron el AcOEt y el EE8:0; esto quiere decir que dichos compuestos probablemente no se vean afectados por ningún factor durante la elaboración del vino, por lo que estos compuestos serían los más confiables para diferenciar a la cepa *Cabernet Sauvignon* de otras cepas.





- Las concentraciones del ProOH, IsoBuOH y el EE Ác. Succ. presentan diferencias significativas en todos los vinos analizados. Estas diferencias podrían deberse a la región geográfica, en el caso del vino Hidalgo, y por esto no es posible utilizar estos compuestos para clasificar la cepa *Cabernet Sauvignon* debido a que la concentración podría variar según las condiciones climáticas de cada año.
- La concentración del BuOH no difiere significativamente entre los vinos Domeq e Hidalgo, y entre los vinos Hidalgo y L. A. Cetto sin embargo, si existe una diferencia significativa entre los vinos Domeq y L. A. Cetto, esto podría deberse principalmente al proceso de elaboración que provoca que exista una diferencia significativa entre las tres medias de la concentración y no a la cepa de uva.
- Un caso similar se presenta con el Alc. Isoamílico. Nuevamente estas diferencias pueden atribuirse a los factores diversos que se presentan durante el proceso de elaboración del vino como clima, tipo de suelo, etc., y no a la cepa de origen, de ahí que estos compuestos (BuOH y Alc. Isoamílico) podrían utilizarse para identificar la cepa de origen siempre y cuando sean comparados junto a otros compuestos que confirmen esta suposición, como el AcOEt y el EE8:0.
- El EE6:0 muestra diferencias significativas entre los vinos de Pedro Domeq e Hidalgo y el vino de L. A. Cetto. En el caso del EE8:0 las diferencias





significativas se presentan entre los vinos Hidalgo y L. A. Cetto con el vino Pedro Domeq.

Cuando no se presentan diferencias significativas (EE6:0: Pedro Domeq e Hidalgo; EE8:0: Hidalgo y L. A. Cetto), la explicación más probable es que durante la formación del vino, ninguno de los factores antes mencionados afectan de manera significativa la concentración final y así, el perfil obtenido confirmaría que la cepa de vino es la misma. Estos resultados podrían emplearse para ayudar a diferenciar la cepa por su proceso más no por región geográfica.

Nuevamente se necesitan la ratificación de estas afirmaciones empleando otros compuestos presentes en el vino que ayuden a confirmar esta suposición.

- El PheEtOH no presenta diferencia significativa entre los vinos Pedro Domeq y L. A. Cetto, pero sí con el vino Hidalgo. Este compuesto es el único que aparentemente tiene el comportamiento esperado, debido a que ambos proceden de la región del Valle de Calafia, Baja California y también corrobora la influencia que tiene este factor sobre el vino. Este compuesto podría servir para clasificar el origen del vino por la región donde se produjo el vino, pero se necesitan estudios más profundos.

b. Vinos tintos

En la sección anterior solamente fueron analizados los resultados obtenidos de la MEFS de los vinos *Cabernet Sauvignon* y se propuso la utilidad de algunos de los





compuestos para intentar clasificar a los vinos en base a la cepa de uva. Sin embargo, existe la posibilidad de que otros vinos producidos por cepas distintas proporcionen resultados semejantes.

Para analizar la diferencia entre diferentes cepas de uva que producen vino tinto, se estudiaron los vinos *Cabernet Sauvignon* junto al vino tinto *Petite Sirah* de L. A. Cetto. En la Figura 18 se muestran los perfiles obtenidos con los vinos tintos analizados por MEFS.

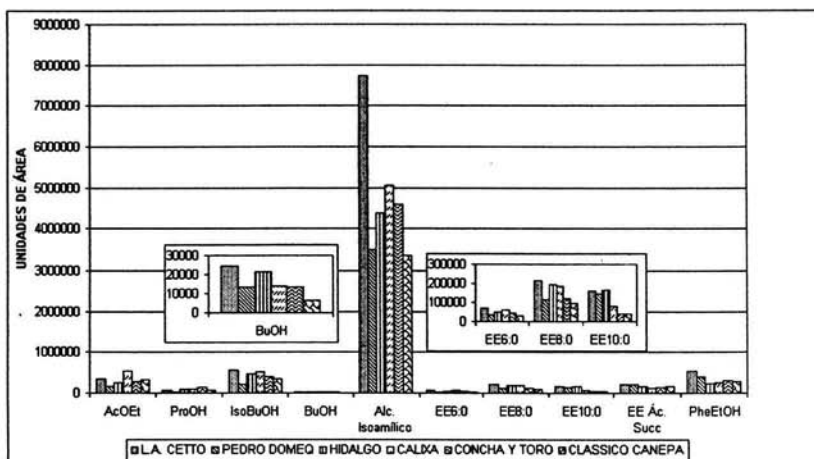


Figura 18. Perfiles de compuestos de los vinos tintos analizados por MEFS-CG con la fibra PDMS/DVB.

Al igual que en la sección anterior, con estos perfiles no puede obtenerse ninguna conclusión por lo que se realizó el ANOVA (Tabla 8).





Tabla 8. Resultados del ANOVA para los vinos tintos analizados por MEFS (PDMS/DVB)

Compuesto	Valor calculado de F	Valor teórico de F	Probabilidad de error
AcOEt	1.99	4.07	0.19
ProOH	2,522.71		3.06×10^{-12}
IsoBuOH	162.08		1.68×10^{-07}
BuOH	7.82		9.17×10^{-03}
Alc. Isoamílico	94.02		1.41×10^{-06}
EE6:0	371.12		6.36×10^{-09}
EE8:0	841.22		2.45×10^{-10}
EE10:0	35.46		5.72×10^{-05}
EE Ác. Succ	195.57		8.01×10^{-08}
PheEtOH	202.56		6.98×10^{-08}

Los resultados muestran que, a excepción del AcOEt, todos los compuestos presentan diferencias significativas.

Los resultados obtenidos con la PRMD para los vinos analizaos se muestran en la Tabla 9. Como puede notarse, los resultados de estas pruebas difieren a los obtenidos del análisis de los vinos *Cabernet Sauvignon* (sección anterior).

De la PRMD se obtiene lo siguiente:

- Las concentraciones del ProOH y EE6:0, EE8:0 y EE10:0 son mayores estadísticamente en el vino *Petite Sirah* que en los vinos *Cabernet Sauvignon*.
- A diferencia de la PRMD de los vinos *Cabernet Sauvignon* (sección anterior), el AcOEt es el único compuesto que no presenta diferencias significativas entre ninguno de los vinos analizados.





Tabla 9. Resultados de la PRMD para los vinos tintos analizados con la fibra PDMS/DVB

<i>ProOH</i>			
<u>DOMEQ</u>	<u>L. A. CETTO</u>	<u>HIDALGO</u>	<u>PETITE SIRAH</u>
<i>IsoBuOH</i>			
<u>DOMEQ</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>HIDALGO</u>	<u>L. A. CETTO</u>
<i>BuOH</i>			
<u>DOMEQ</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>HIDALGO</u>	<u>L. A. CETTO</u>
<i>Alc. Isoamílico</i>			
<u>HIDALGO</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>DOMEQ</u>	<u>L. A. CETTO</u>
<i>EE6:0</i>			
<u>DOMEQ</u>	<u>HIDALGO</u>	<u>L. A. CETTO</u>	<u>PETITE SIRAH</u>
<i>EE8:0</i>			
<u>DOMEQ</u>	<u>HIDALGO</u>	<u>L. A. CETTO</u>	<u>PETITE SIRAH</u>
<i>EE10:0</i>			
<u>L. A. CETTO</u>	<u>HIDALGO</u>	<u>DOMEQ</u>	<u>PETITE SIRAH</u>
<i>EE Ác Succ.</i>			
<u>HIDALGO</u>	<u>L. A. CETTO</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>DOMEQ</u>
<i>PheEtOH</i>			
<u>HIDALGO</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>DOMEQ</u>	<u>L. A. CETTO</u>

- Existen diferencias significativas en las concentraciones del ProOH y del EE8:0 entre los vinos *Cabernet Sauvignon* y en el vino *Petite Sirah*. Debido a estos resultados no se podría clasificar las cepas en base al perfil de estos compuestos por los que deben buscarse otras alternativas para intentar utilizar estos compuestos.

Como puede observarse, la concentración de ambos compuestos es mayor en el vino *Petite Sirah* que en los vinos *Cabernet Sauvignon*. Si se calcularan





los rangos de concentraciones mínimas y máximas podrían utilizarse para clasificar a una cepa de uva de otra cepa distinta.

- El IsoBuOH no presenta diferencias significativas entre el vino *Cabernet Sauvignon* Hidalgo y el vino *Petite Sirah* L. A. Cetto a pesar de proceder de cepas diferentes; este resultado podría confirmar la influencia que la región de cultivo tiene sobre el vino. La diferencia entre el vino *Petite Sirah* y los vinos L. A. Cetto y Pedro Domeq, indica que los vinos de cepa diferente y de la misma región dan diferencias significativas. Sin embargo, la diferencia en el proceso de elaboración entre vinos *Cabernet Sauvignon* posiblemente sea la causa de que existan diferencias significativas entre ellos mismos.
- El análisis del Alc. Isoamílico muestra un comportamiento similar al IsoBuOH, por lo que la explicación dada para este último compuesto se considera válida también en este caso.
- El resultado de la PRMD del BuOH no muestra diferencia significativa entre los vinos Pedro Domeq, *Petite Sirah* e Hidalgo, probablemente debido a los procesos de elaboración de los vinos *Cabernet Sauvignon*, unidos a las características de la cepa *Petite Sirah*. Sin embargo, los vinos Hidalgo y L. A. Cetto no muestran diferencias significativas entre ellos. Este comportamiento indica que ni la región geográfica ni las condiciones del proceso influyen en la concentración final de BuOH en estos dos vinos. Sin embargo, estos factores





si influyen en los demás vinos que provocan que existan diferencias significativas con el vino L. A. Cetto.

- La concentración del EE6:0 en el vino *Petite Sirah* es estadísticamente diferente a la del vino *Cabernet Sauvignon* de L. A. Cetto sin embargo, el vino L. A. Cetto también muestra diferencias significativas con los vinos Pedro Domeq e Hidalgo (que no presentan diferencias significativas entre ellos). De estos resultados se puede concluir lo siguiente: 1) los vinos de distinta cepa de L. A. Cetto pueden diferenciarse con la MEFS, ya que ambos vinos (*Cabernet Sauvignon* y *Petite Sirah*) son estadísticamente diferentes y, 2) es probable que ninguno de los factores hasta ahora mencionados influyen sobre la concentración del EE6:0 en los vinos *Cabernet Sauvignon* de las marcas Pedro Domeq e Hidalgo ya que este resultado es el mismo que el obtenido cuando se analizaron solamente a los vinos *Cabernet Sauvignon*.
- En la PRMD realizado para el EE10:0^o muestra que el vino *Petite Sirah* tiene diferencias significativas con los vinos *Cabernet Sauvignon*. Sin embargo, el vino Pedro Domeq también es estadísticamente diferente a los vinos L. A. Cetto e Hidalgo. Estos resultados son similares al EE6:0, ya que pueden diferenciarse los vinos procedentes de L. A. Cetto. En cambio, ahora las

^o Debe recordarse que el ANOVA del EE10:0 no mostró diferencias significativas en el análisis de los vinos *Cabernet Sauvignon* (sección anterior)





condiciones mencionadas aparentemente no afectan a los vinos L. A. Cetto e Hidalgo pero si influyen en el vino Pedro Domeq.

Finalmente en ambos casos, probablemente si se determinaran los rangos de concentración de los vinos *Cabernet Sauvignon* y *Petite Sirah*, podrían utilizarse como referencia para clasificar a una cepa de uva como se propuso para los casos del ProOH y EE8:0.

- El resultado obtenido del ANOVA del PheEtOH confirma la explicación dada en la sección anterior para este mismo compuesto, ya que nuevamente el vino *Cabernet Sauvignon* Hidalgo es estadísticamente diferente a los vinos L. A. Cetto y Pedro Domeq. En el caso del vino Hidalgo y el vino *Petite Sirah*, no existe una diferencia significativa y puede considerarse como válida la explicación dada para el IsoBuOH en la que aparentemente se confirma la influencia de la región de cultivo para el desarrollo de este compuesto durante la elaboración del vino.

b. Vinos L. A. Cetto

En las dos secciones anteriores se analizaron los resultados de algunos de los compuestos encontrados en los vinos y como pudo observarse existen muchos factores que influyen en la concentración de dichos compuestos. En esta sección se analizaron tres vinos de tres cepas diferentes (*Cabernet Sauvignon*, *Petite Sirah* y *Fumé Blanc*) de L. A. Cetto por lo que ciertos factores de variación como son el clima, año de cosecha y





región geográfica pueden no ser tomados en cuenta, debido a que los vinos analizados fueron cultivados en la misma región (Baja California, México) y en el mismo año (2001). De esta manera, las diferencias que se presenten entre los vinos, serían principalmente causadas por las mismas cepas de uvas.

El perfil obtenido de la MEFS-CG de estos vinos se muestra en la Figura 19.

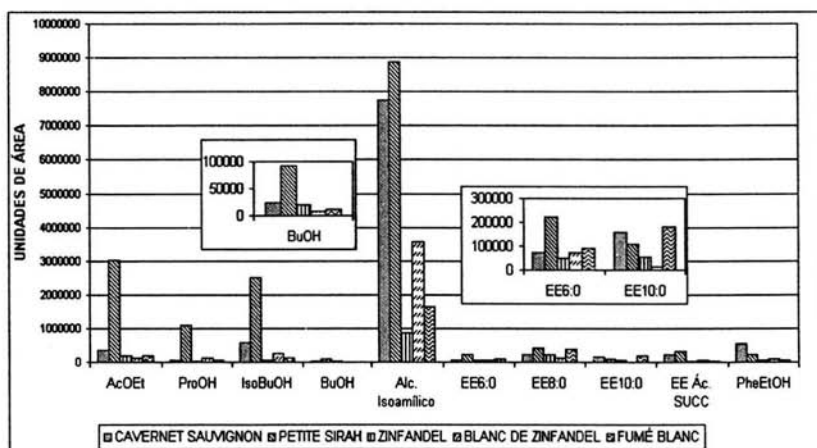


Figura 19. Perfiles de compuestos obtenidos de los vinos L. A. Cetto analizados por MEFS-CG con la fibra PDMS/DVB

En este caso, en el perfil puede notarse que si existen diferencias significativas entre los vinos analizados, principalmente entre los vinos tintos y los vinos blancos. Se podría prescindir del ANOVA sin embargo, éste análisis se realizó para confirmar estas observaciones y para continuar con el proceso que se ha seguido en los anteriores análisis.





El ANOVA se realizó a los vinos tintos *Cabernet Sauvignon* y *Petite Sirah*, y al vino blanco *Fumé Blanc*.

Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados del ANOVA para los vinos L. A. Cetto analizados por MEFS (PDMS/DVB)

Compuesto	Valor calculado de F	Valor teórico de F	Probabilidad de error
AcOEtOH	43.26	5.14	2.73×10^{-04}
ProOH	8.82		0.02
IsoBuOH	48.43		1.98×10^{-04}
BuOH	43.91		2.62×10^{-04}
Alc. Isoamílico	49.55		1.86×10^{-04}
EE6:0	51.63		1.66×10^{-04}
EE8:0	107.79		1.99×10^{-05}
EE10:0	198.73		3.29×10^{-06}
EE Ác. Succ.	9.71		0.01
PheEtOH	38.10		3.89×10^{-04}

En la Tabla 10 puede observarse que todos los compuestos presentan diferencias significativas en todos los vinos. Estos resultados confirman la hipótesis de que la MEFS si es una herramienta útil para clasificar a los vinos por la cepa de uva utilizada para su elaboración.

Los resultados de la PRMD se muestran en la Tabla 11. Este análisis se realizó nuevamente para saber cuales compuestos tienen diferencias significativas entre los vinos con el fin de definir los compuestos que pueden ser utilizados para clasificar las cepas de uva.





Tabla 11. Resultados de la PRMD para los vinos L. A. Cetto analizados con la fibra PDMS/DVB

AcOEt		
<u>FUMÉ BLANC</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>CAVERNET SAUVIGNON</u>
ProOH		
<u>CAVERNET SAUVIGNON</u>	<u>FUMÉ BLANC</u>	<u>PETITE SIRAH</u>
IsoBuOH		
<u>FUMÉ BLANC</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>CAVERNET SAUVIGNON</u>
BuOH		
<u>FUMÉ BLANC</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>CAVERNET SAUVIGNON</u>
Alc. Isoamílico		
<u>PETITE SIRAH</u>	<u>FUMÉ BLANC</u>	<u>CAVERNET SAUVIGNON</u>
EE6:0		
<u>CAVERNET SAUVIGNON</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>FUMÉ BLANC</u>
EE8:0		
<u>CAVERNET SAUVIGNON</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>FUMÉ BLANC</u>
EE10:0		
<u>CAVERNET SAUVIGNON</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>FUMÉ BLANC</u>
EE Ác. Succ.		
<u>CAVERNET SAUVIGNON</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>FUMÉ BLANC</u>
PheEtOH		
<u>PETITE SIRAH</u>	<u>FUMÉ BLANC</u>	<u>CAVERNET SAUVIGNON</u>

Al igual que las secciones anteriores se analizarán cada uno de los compuestos, de esta se observa lo siguiente:

- El vino *Cabernet Sauvignon* tiene una mayor concentración en cinco compuestos analizados (AcOEt, IsoBuOH, BuOH, Alc. Isoamílico, PheEtOH). En segundo





lugar el vino *Fumé Blanc* muestra 4 compuestos con mayor concentración (EE6:0, EE8:0 y EE10:0) y el vino *Petite Sirah* en tercero con un compuesto (ProOH).

- El IsoButOH, BuOH, Alc. Isoamílico y EE10:0 presentan diferencias significativas entre todos los vinos analizados. Estos compuestos podrían ser de utilidad para clasificar a los vinos por su cepa de origen. Además el orden de las concentraciones del IsoButOH y el BuOH es el mismo.
- En el caso del AcOEt, ProOH y PheEtOH, no se presentan diferencias significativas entre los vinos *Fumé Blanc* y *Petite Sirah* sin embargo, si hay diferencia con el vino *Cabernet Sauvignon*. Una explicación posible sería que este resultado se deba a que las cepas poseen inicialmente ciertos precursores bioquímicos que son intermediarios en el origen de estos compuestos.
- En los EE6:0 y EE8:0, y en el EE Ác. Succ. no existe diferencia entre los vinos *Cabernet Sauvignon* y *Petite Sirah* (ambos procedentes de cepas tintas) y en cambio si hay diferencias con el vino *Fumé Blanc* (cepa blanca). Se dio también el caso de que el orden de las concentraciones es el mismo en todos los compuestos. Cabe señalar que este comportamiento únicamente se dio en el grupo de los ésteres. Al igual que el punto anterior, la explicación más probable sería el de los precursores bioquímicos y cabría la posibilidad de emplear estos compuestos para diferenciar cepas tintas de cepas blancas.





4.1.6.2 Fibra PA

Para complementar el estudio de los perfiles de los vinos, además de la fibra PDMS/DVB, se obtuvieron los perfiles utilizando la fibra de PA que tiene características distintas a la fibra de PDMS/DVB, como puede apreciarse en la Figura 3.

Los resultados obtenidos se dividieron de la misma forma que la empleada en la fibra PDMS/DVB (sección 4.1.6). También se realizaron los análisis estadísticos ANOVA y PRMD.

a. Vinos tipo *Cabernet Sauvignon*

En la Figura 20 se encuentran los perfiles de todos los vinos tipo *Cabernet Sauvignon* analizados con la fibra PA.

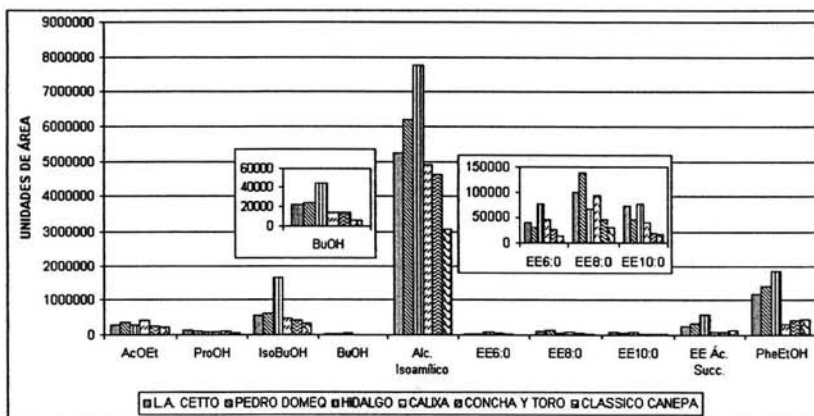


Figura 20. Perfiles de compuestos obtenidos con la fibra PA analizados por MEFS-CG de los vinos tipo *Cabernet Sauvignon*

En los perfiles se puede apreciar algunas diferencias entre los vinos analizados en el IsoBuOH, alc. Isoamílico y EE. Ác. Succ. y el PheEtOH. Para obtener más detalles de





estos resultados, se realizó el ANOVA de la misma manera que en las secciones anteriores.

Los resultados de este análisis para los vinos *Cabernet Sauvignon* pueden observarse en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados del ANOVA para los vinos tipo *Cabernet Sauvignon* analizados por MEFS (PA)

Compuesto	Valor calculado de F	Valor teórico de F	Probabilidad de error
AcOEt	335.09	5.14	6.99×10^{-07}
ProOH	1,576.74		6.85×10^{-09}
IsoBuOH	430,767.07		3.38×10^{-16}
BuOH	216.20		2.56×10^{-06}
Alc. Isoamílico	129.94		1.15×10^{-05}
EE6:0	584.52		1.33×10^{-07}
EE8:0	2,008.90		3.32×10^{-09}
EE10:0	659.97		9.27×10^{-08}
EE Ác. Succ.	14,484.08		8.88×10^{-12}
PheEtOH	74.78		5.74×10^{-05}

Los resultados del ANOVA muestran que existen diferencias significativas en todos los compuestos extraídos y analizados con la fibra PA.

A diferencia los resultados de la fibra PDMS/DVB, el valor calculado para F excede por mucho su valor teórico y este resultado parece indicar que la MEFS con la fibra de PA, no es útil para clasificar la cepa de uva en base al perfil cromatográfico obtenido.

Debido a esto se realizó nuevamente la PRMD para todos los compuestos. El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 13.





Tabla 13. Resultados de la PRMD para los vinos Cabernet Sauvignon analizados con la fibra de PA

AcOEt		
L. A. CETTO	HIDALGO	DOMEQ
ProOH		
HIDALGO	DOMEQ	L. A. CETTO
IsoBuOH		
DOMEQ	L. A. CETTO	HIDALGO
BuOH		
DOMEQ	L. A. CETTO	HIDALGO
Alc. Isoamílico		
L. A. CETTO	DOMEQ	HIDALGO
EE6:0		
DOMEQ	L. A. CETTO	HIDALGO
EE8:0		
HIDALGO	DOMEQ	L. A. CETTO
EE10:0		
DOMEQ	HIDALGO	L. A. CETTO
EE Ác. Succ.		
DOMEQ	L. A. CETTO	HIDALGO
PheEtOH		
DOMEQ	L. A. CETTO	HIDALGO

De la PRMD realizada a los vinos *Cabernet Sauvignon* se puede establecer lo siguiente:

- Todos los compuestos presentaron diferencias significativas al analizarlos con la fibra de PA, incluso las concentraciones se presentan en orden distinto a las encontradas con la fibra PDMS/DVB. Este comportamiento es debido a la diferencia de polaridades entre estas dos fibras. Como se ha mencionado anteriormente, la fibra PDMS/DVB es de naturaleza ligeramente polar debido a





la unión de fases. Por otro lado la fibra de PA es de naturaleza polar y por lo tanto la extracción de analitos es diferente.

- La PRMD indica que el ProOH, IsoBuOH, los EE6:0, EE8:0 y EE10:0, el EE Ác. Succ. y el PheEtOH, presentan diferencias significativas entre todos los vinos *Cabernet Sauvignon* analizados. Estas diferencias, probablemente causadas por los factores climáticos y geográficos, hacen más difícil clasificar a la cepa de uva con el perfil obtenido de la MEFS con la fibra de PA, en contraste con la extracción obtenida con la fibra de PDMS/DVB donde los EE6:0, EE8:0 y EE10:0, y el PheEtOH tenían al menos dos vinos sin diferencias significativas entre ellos.
- El AcOEt presenta diferencias significativas entre el vino Pedro Domeq y los vinos L. A. Cetto e Hidalgo cuando se analizan con la fibra de PA. Estos resultados contrastan con los obtenidos con fibra PDMS/DVB donde este compuesto no presentaba diferencia significativa entre ninguno de los vinos. Las diferencias que se presentan con el vino Pedro Domeq, ya se discutieron anteriormente y se presume que la fibra de PA detecta estas diferencias debido a su diferencia de polaridad con la fibra PDMS/DVB.
- El BuOH y Alc. Isoamílico no presentan diferencias entre los vinos L. A. Cetto y Pedro Domeq con la fibra de PA, este comportamiento es similar al observado con el PheEtOH cuando es extraído con la fibra PDMS/DVB, por lo que las





consideraciones realizadas podrían ser aplicadas para estos compuestos. En cambio, la fibra PDMS/DVB aparentemente sólo detectaba diferencias debidas al proceso y no a la cepa. Ahora con estos resultados cabe la posibilidad de diferenciar la región de cultivo.

- El vino Hidalgo es el vino que tiene una mayor concentración en los compuestos IsoBuOH, BuOH, Alc. Isoamílico, EE6:0, EE Ác. Succ. y PheEtOH; el siguiente vino con mayor concentración de compuestos es L. A. Cetto (ProOH y los EE8:0 y EE10:0); y finalmente, la concentración del AcOEt es mayor en el vino Pedro Domeq.

Como ya se discutió anteriormente, cabe la posibilidad de que se intente clasificar a los vinos en base a las concentraciones (si estas son determinadas) de los compuestos presentes en los vinos tipo *Cabernet Sauvignon* utilizando la fibra de PA.

b. Vinos tintos

Al igual que en estudio de la fibra PDMS/DVB, se analizó el vino *Petite Sirah* junto a los vinos *Cabernet Sauvignon*, ahora con la fibra de PA.

El perfil de todos los vinos tintos extraídos con la fibra PA se muestra en la Figura 21:



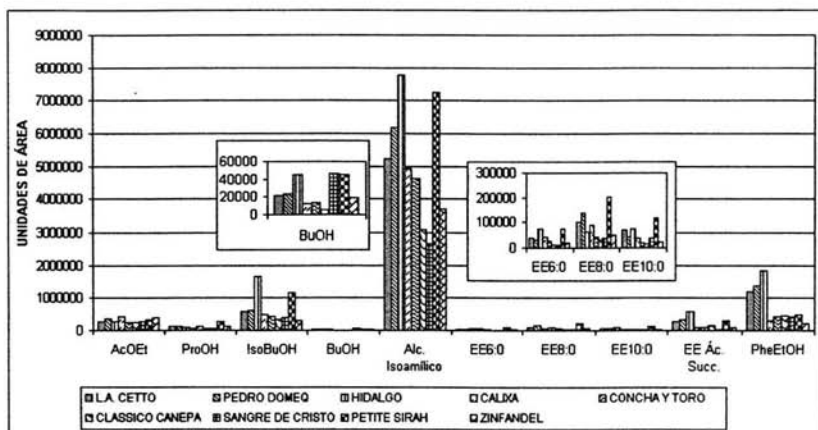


Figura 21. Perfiles de compuestos obtenidos con la fibra PA analizados por MEFS-CG de los vinos tintos

Los resultados del ANOVA se presentan en la Tabla 14; de nuevo se pueden observar diferencias en el resultado de la ANOVA con respecto a los resultados obtenidos en el análisis anterior. La causa de esta variación se debe al factor R_p , por lo que únicamente se compararán los resultados obtenidos entre las fibras PDMS/DVB y PA.

La PRMD realizada a los vinos *Petite Sirah* y *Cabernet Sauvignon* se presenta en la Tabla 15.





Tabla 14. Resultados del ANOVA para los vinos tintos analizados por MEFS (PA)

Compuesto	Valor calculado de F	Valor teórico de F	Probabilidad de error
AcOEt	21.6520	4.0662	0.0003
ProOH	32.5575		7.8350E-05
IsoBuOH	45.1389		2.3289E-05
BUOH	11.7457		0.0027
Alc. Isoamílico	18.5396		0.0006
EE6:0	349.1414		1.0834E-10
EE8:0	262.6703		4.4341E-10
EE10:0	70.2711		4.3323E-06
EE Ác. Succ.	10.6357		0.0036
PheEtOH	12.8380		0.0020

Realizando el análisis de la PRMD se obtiene lo siguiente:

- La PRMD muestra que ahora los vinos Hidalgo y *Petite Sirah* tienen la mayor concentración en el mismo número de compuestos (ProOH, BuOH, EE6:0 y EE10:0 para el *Petite Sirah*; y IsoBuOH, Alc. Isoamílico, EE Ác. Succ. Y PheEtOH para el vino Hidalgo) y los vinos L. A. Cetto y Pedro Domeq solamente en un compuesto tienen mayor concentración (EE10:0 y AcOEt, respectivamente)
- La PRMD muestra que todos los compuestos analizados presentan diferencias significativas entre los vinos analizados. Este resultado difiere con el obtenido con la fibra PDMS/DVB, en la que sólo el AcOEt no tenía diferencias significativas entre los vinos tintos. Ahora, los vinos Pedro Domeq y *Petite Sirah* presentan diferencias significativas con los vinos L. A. Cetto e Hidalgo. Este resultado podría ser más útil que el obtenido con la fibra de PDMS/DVB, ya que





la fibra de PA aparentemente puede distinguir las diferencias entre al menos dos vinos *Cabernet Sauvignon* y el vino *Petite Sirah*.

Tabla 15. Resultados de la PRMD para los vinos tintos analizados con la fibra PA

AcOEt			
L. A. CETTO	HIDALGO	PETITE SIRAH	DOMEQ
ProOH			
HIDALGO	DOMEQ	L. A. CETTO	PETITE SIRAH
IsoBuOH			
DOMEQ	L. A. CETTO	PETITE SIRAH	HIDALGO
BuOH			
DOMEQ	L. A. CETTO	HIDALGO	PETITE SIRAH
Alc. Isoamílico			
L. A. CETTO	DOMEQ	PETITE SIRAH	HIDALGO
EE6:0			
DOMEQ	L. A. CETTO	HIDALGO	PETITE SIRAH
EE8:0			
HIDALGO	DOMEQ	PETITE SIRAH	L. A. CETTO
EE10:0			
DOMEQ	HIDALGO	L. A. CETTO	PETITE SIRAH
EE Ác. Succ.			
PETITE SIRAH	DOMEQ	L. A. CETTO	HIDALGO
PheEtOH			
PETITE SIRAH	DOMEQ	L. A. CETTO	HIDALGO

- El ProOH presenta diferencias significativas entre los vinos tipo *Cabernet Sauvignon* Hidalgo y L. A. Cetto. Sin embargo, aparentemente estos vinos están ligeramente relacionados entre ellos al no presentar diferencias significativas con el vino Pedro Domeq. En cambio, estos vinos presentan diferencias significativas





con el vino *Petite Sirah*. Este resultado podría ser de utilidad para clasificar el tipo de cepa de un vino, a diferencia del perfil obtenido con la fibra PDMS/DVB, donde hay diferencias significativas entre los vinos.

- Los vinos Pedro Domeq y L. A. Cetto no presentan diferencias significativas cuando se analizó el IsoBuOH, en cambio si existen diferencias significativas entre estos y el vino Hidalgo. Además se puede observar que estos tres vinos tienen diferencia significativa con el vino *Petite Sirah*. Este resultado podría ser de utilidad para intentar 1) clasificar a los vinos según la cepa de origen según el perfil cromatográfico obtenido y, 2) diferenciar la zona geográfica de cultivo en base a la concentración (si se establecieran los rangos mínimos y máximos). Si se compara este resultado con el obtenido con la fibra PDMS/DVB, se observa que la fibra de PA es más útil para intentar hacer esta clasificación.
- Un caso similar ocurre con el BuOH, Alc. Isoamílico y el EE6:0 donde los vinos Domeq y L. A. Cetto presentan diferencias significativas entre ellos y los vinos Hidalgo y *Petite Sirah* (ambos agrupados por parejas). Este resultado es muy parecido al que se obtuvo con el AcOEt, por lo que la explicación que se dio para este compuesto se aplicaría en este caso.

Adicionalmente podría suponerse que con la fibra de PA es posible diferenciar la zona geográfica donde fueron cultivadas uvas de la misma cepa (Pedro Domeq y L. A. Cetto), e incluso podrían diferenciarse dos cepas distintas cultivadas en la





misma zona (*Cabernet Sauvignon* y *Petite Sirah*) sin embargo, este resultado no permitiría diferenciar dos cepas distintas que fueran cultivadas en zonas diferentes (vino Hidalgo y *Petite Sirah*); resultado mucho más útil que el obtenido con la fibra PDMS/DVB para los mismos compuestos.

- Al igual que en el AcOEt, el EE8:0 no presenta diferencias significativas entre los vinos Pedro Domeq y *Petite Sirah*; sin embargo, todos los demás vinos tipo *Cabernet Sauvignon* presentan diferencias entre ellos. Este resultado obtenido con la fibra PA es parecido al obtenido con la fibra PDMS/DVB, y únicamente quedaría intentar clasificar a los vinos en base a sus concentraciones debido a los resultados obtenidos con ambas fibras.
- El resultado obtenido para el EE10:0 muestra que todos los vinos presentan diferencias significativas. Solo quedaría intentar clasificar a los vinos en base a su rango de concentraciones.
- El resultado del EE Ác. Succ. muestra que los vinos *Petite Sirah*, Pedro Domeq y L. A. Cetto no indican que existan diferencias significativas entre ellos sin embargo, si muestran diferencia con el vino Hidalgo. Este comportamiento podría utilizarse para intentar clasificar las cepas según la zona geográfica donde fueron cultivadas (ya que los tres primeros vinos son cultivados en Baja California); en cambio, intentar clasificarlas por el tipo de cepa sería complicado.





A pesar de este resultado, es aún mas útil que el obtenido con la fibra PDMS/DVB para este mismo tipo de vinos.

- El ANOVA del PheEtOH presenta un resultado muy similar al obtenido para el ProOH, por lo que la aplicación que se propuso para este compuesto podría aplicarse para el PheEtOH. Incluso el resultado de esta fibra puede ser utilizado junto al obtenido con la fibra PDMS/DVB, o podrían complementarse.

c. Vinos de L. A. Cetto

Siguiendo el mismo orden que el empleado para la fibra PDMS/DVB, ahora se analizarán los resultados obtenidos para los vinos de L. A. Cetto.

En primer lugar se presenta el perfil cromatográfico obtenido de todos los vinos de L. A. Cetto en la Figura 22.

Si se compara este perfil contra el obtenido con la fibra PDMS/DVB, se puede observar que el comportamiento de los compuestos analizaros son similares, aunque la respuesta de los compuestos es menor para la fibra de PA.



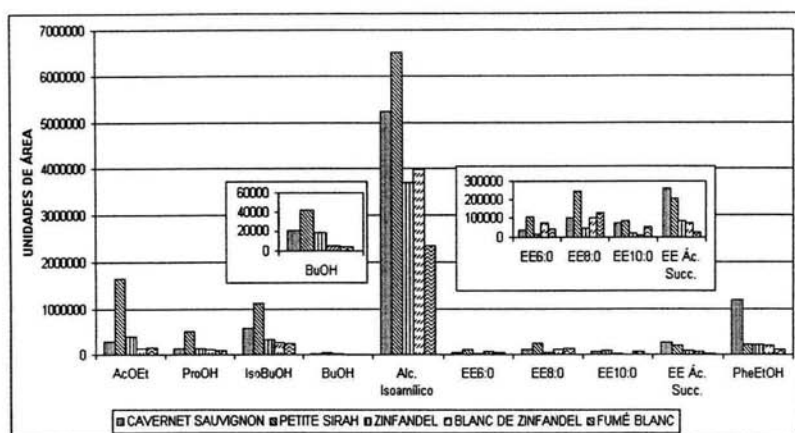


Figura 22. Perfiles de compuestos obtenidos con la fibra PA analizados por MEFS-CG de los vinos L. A. Cetto

En la Tabla 16 se presenta el ANOVA realizado a los vinos *Cabernet Sauvignon*, *Petite Sirah* y *Fumé Blanc* de L. A. Cetto.

Tabla 16. Resultados del ANOVA para los vinos L. A. Cetto analizados por MEFS (PA)

Compuesto	Valor calculado de F	Valor teórico de F	Probabilidad de error
AcOEt	33.61	5.14	5.50E-04
ProOH	7.51		0.02
IsoBuOH	10.48		0.01
BuOH	13.30		6.23E-03
Alc. Isoamílico	6.86		0.03
EE6:0	324.56		7.68E-07
EE8:0	230.28		2.13E-06
EE10:0	22.41		1.65E-03
EE Ác. Succ.	0.48		0.64
PheEtOH	13.23		6.31E-03

Como puede observarse, el EE Ác. Succ. es el único compuesto que no presenta diferencias significativas entre los vinos analizados. A excepción de éste compuesto,





todos los demás tienen diferencias significativas entre los valores calculados y teóricos de F más o menos grandes.

Cabe señalar que se esperaba que todos los compuestos presentaran diferencias significativas entre los vinos, ya que son producidos por cepas de uvas diferentes. Debido a este resultado, se realizó de nuevo la PRMD para estos vinos. El resultado puede verse en la Tabla 17

De esta prueba se obtiene lo siguiente:

- El vino *Petite Sirah* tiene una mayor concentración en cinco compuestos (AcOEt, ProOH, IsoBuOH, BuOH y Alc. Isoamílico), seguido por los vinos *Fumé Blanc* con tres (EE6:0, EE8:0 y EE10:0) y *Cabernet Sauvignon* con dos^f (EE Ác. Succ. y PheEtOH). Como puede verse en el análisis de la fibra PDMS/DVB (página 65) este resultado es opuesto, ya que el vino *Cabernet Sauvignon* tenía mayor concentración en cinco compuestos, seguido por el vino *Fumé Blanc* y por último el vino *Petite Sirah*.
- Únicamente dos compuestos (AcOEt y el EE6:0) presentaron el comportamiento esperado para los vinos procedentes de distintas cepas, ya que presentaron diferencias significativas entre los vinos analizados; al contrario del resultado obtenido con la fibra PDMS/DVB, donde al menos cuatro compuestos presentaron diferencias entre los vinos. Estos resultados indicarían que la fibra

^f Aunque no se muestra, la PRMD muestra que el vino *Cabernet Sauvignon* tiene mayor concentración en el EE Ác. Succ.





PDMS/DVB es un poco mejor para intentar clasificar a las cepas de vinos en base a su perfil cromatográfico.

Tabla 17. Resultados de la PRMD para los vinos L. A. Cetto analizados con la fibra PA

AcOEt		
<u>FUMÉ BLANC</u>	<u>CABERNET SAUVIGNON</u>	<u>PETITE SIRAH</u>
ProOH		
<u>FUMÉ BLANC</u>	<u>CABERNET SAUVIGNON</u>	<u>PETITE SIRAH</u>
IsoBuOH		
<u>FUMÉ BLANC</u>	<u>CABERNET SAUVIGNON</u>	<u>PETITE SIRAH</u>
BuOH		
<u>FUMÉ BLANC</u>	<u>CABERNET SAUVIGNON</u>	<u>PETITE SIRAH</u>
Alc. Isoamílico		
<u>CABERNET SAUVIGNON</u>	<u>FUMÉ BLANC</u>	<u>PETITE SIRAH</u>
EE6:0		
<u>CABERNET SAUVIGNON</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>FUMÉ BLANC</u>
EE8:0		
<u>CABERNET SAUVIGNON</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>FUMÉ BLANC</u>
EE10:0		
<u>CABERNET SAUVIGNON</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>FUMÉ BLANC</u>
PheEtOH		
<u>FUMÉ BLANC</u>	<u>PETITE SIRAH</u>	<u>CABERNET SAUVIGNON</u>

- El ProOH, IsoBuOH y BuOH no presentan diferencias significativas entre los vinos *Fumé Blanc* y *Cabernet Sauvignon*. En cambio si existen diferencias entre éstos y el vino *Petite Sirah*. Una posible explicación sería que los dos vinos proceden de cepas emparentadas (ambos proceden de cepas *Sauvignon*, como puede apreciarse en el Apéndice I), por lo que la fibra de PA no detectaría





diferencias entre estas cepas, en cambio si detectaría cepas completamente distintas. Cabe señalar que ningún compuesto tuvo un comportamiento similar cuando fueron analizados con la fibra PDMS/DVB, además estos compuestos específicamente mostraron resultados dispares e incluso dos de ellos se sugirieron para intentar clasificar las cepas de uvas.

- El Alc. Isoamílico y el PheEtOH no mostraron diferencias significativas entre los vinos *Fumé Blanc* y *Petite Sirah*; por el contrario, el vino *Cabernet Sauvignon* si mostró diferencias significativas con los otros dos vinos antes mencionados; por lo que estos compuestos se descartaron para intentar clasificar a los vinos por sus cepas. Como puede apreciarse en el análisis con la fibra PDMS/DVB, el PheEtOH presentó el mismo comportamiento que el observado en este análisis; en cambio el Alc. Isoamílico presentó diferencias entre los vinos y se sugirió como posible compuesto para diferenciar a las cepas.
- Los EE8:0 y EE10:0 no mostraron diferencias significativas entre los vinos originados de cepas tintas (vinos *Petite Sirah* y *Cabernet Sauvignon*), pero si mostraron diferencias con el vino *Fumé Blanc*. Como el mismo comportamiento se obtuvo en el análisis de la fibra PDMS/DVB para el EE8:0 la explicación que se dio se considerará válida para estos compuestos.





4.2 Microextracción Líquido-Líquido (MELL)

La selección del disolvente para la extracción se realizó utilizando los disolventes mencionados y siguiendo las condiciones de extracción indicadas en la sección 3.2.3.

En las Figuras 23 a la 27 se muestran los resultados obtenidos.

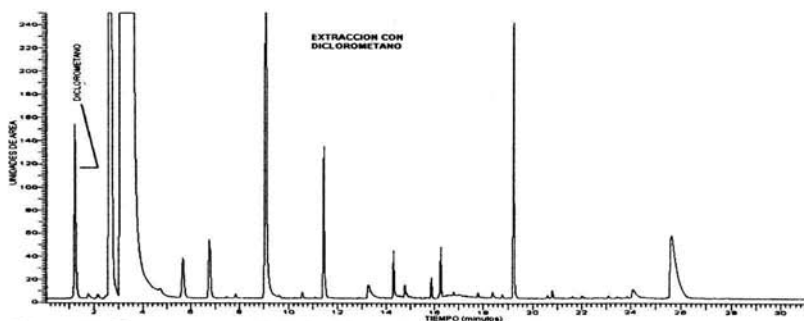


Figura 23. Cromatograma de la MELL del vino Cabernet Sauvignon con diclorometano.

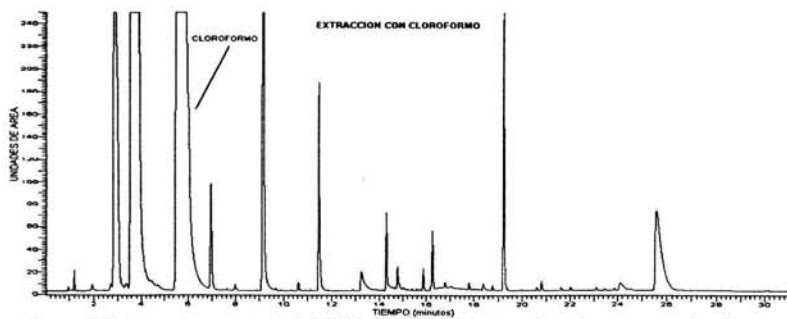


Figura 24. Cromatograma de la MELL del vino Cabernet Sauvignon con cloroformo.



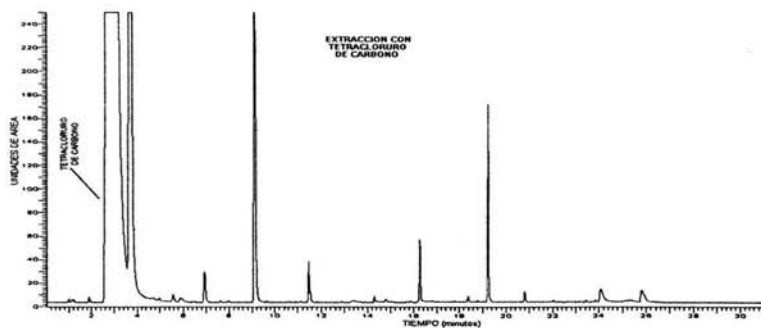


Figura 25. Cromatograma de la MELL del vino Cabernet Sauvignon con tetracoloro de carbono.

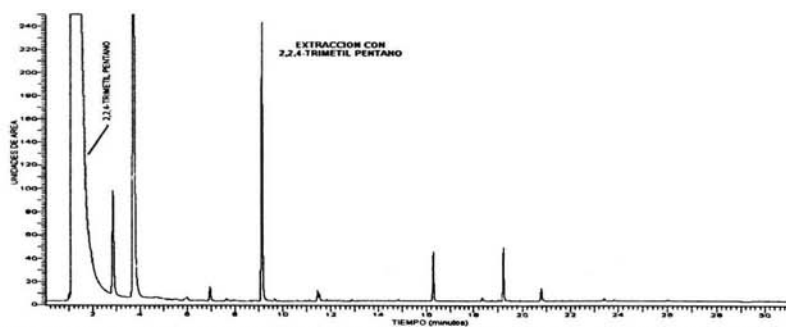


Figura 26. Cromatograma de la MELL del vino Cabernet Sauvignon con 2,2,4-trimetil pentano.

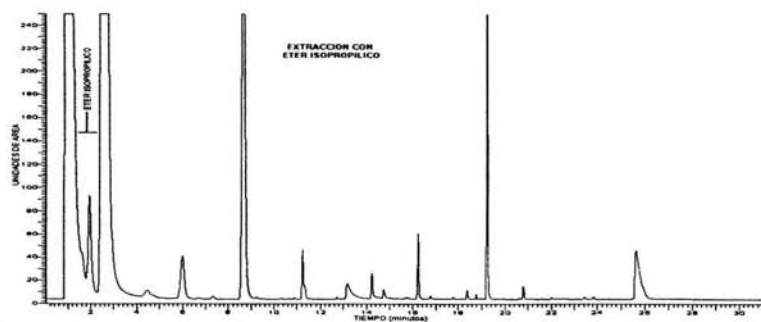


Figura 27. Cromatograma de la MELL del vino Cabernet Sauvignon con éter isopropílico.





Puede observarse que la mejor extracción se obtiene con el cloroformo, seguida por el diclorometano. Sin embargo, la señal del cloroformo interfiere con el ProOH, por lo que se eligió al diclorometano para realizar la MELL debido a que se obtiene una buena extracción de los compuestos y no interfiere con ninguno de los compuestos volátiles extraídos.

4.2.1 Cuantificación

Con los datos obtenidos de la MELL, se obtuvo el gráfico de la concentración relativa contra el área relativa. Realizando la regresión lineal, se obtuvo el factor de respuesta (Fr). En la figura 28 se muestra un ejemplo de la curva de adiciones patrón para el vino.

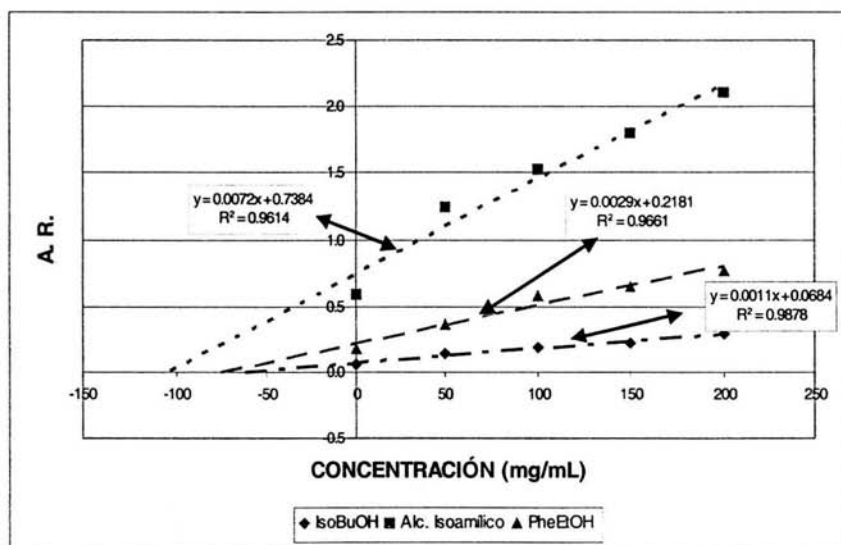


Figura 28. Ejemplo de una curva de adiciones patrón utilizada para la cuantificación de los alcoholes IsoBuOH, Isoamílico y PheEtOH, presentes en el vino.





Los resultados obtenidos de la MELL para los vinos en estudio se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Promedio de las concentraciones obtenidas de los vinos analizados

	VINO	CONCENTRACIÓN (mg/L)					
		IsoBuOH	R ²	Alc. Isoamílico	R ²	PheEtOH	R ²
Cabernet Sauvignon	L.A. CETTO	62.18	0.9878	102.56	0.9614	75.21	0.9661
	PEDRO DOMEQ X-A	74.42	0.9985	145.02	0.9438	64.67	0.9960
	HIDALGO	90.50	0.9866	128.59	0.9556	60.00	0.9906
	CONCHA Y TORO (RESERVADO)	72.90	0.9938	151.18	0.9436	99.64	0.9612
	CALIXA	64.50	0.9987	152.39	0.9548	98.07	0.9671
	CLASSICO CANEPA	67.75	0.9990	119.53	0.9447	74.36	0.9566
	SANGRE DE CRISTO	56.39	0.9776	67.91	0.9445	156.00	0.9674
L. A. Cetto	PETITE SIRAH	69.30	0.9817	345.33	0.9100	36.10	0.9765
	ZINFANDEL	25.27	0.9708	227.78	0.9784	43.87	0.9928
	BLANC DE ZINFANDEL	43.00	0.9952	313.12	0.9323	33.83	0.9735
	FUMÉ BLANC	60.89	0.9867	425.27	0.8028	23.55	0.9964

Como se puede observar la linealidad (R^2) fue del orden del 0.97–0.99 para el IsoBuOH y del 0.96–0.99 para el PheEtOH. Para el Alc. Isoamílico la linealidad fue del orden de 0.91–0.97, excepto para el vino Fumé Blanc, cuyo linealidad fue de 0.8028.

La baja linealidad del Alc. Isoamílico fue resultado de su concentración inicial, que como puede observarse es más elevada que los otros compuestos analizados (Figura 28), que provocó que hubiera dispersión en los resultados obtenidos a pesar de que se adicionó un estándar interno.

Sin embargo las concentraciones calculadas son confiables ya que comparando los resultados obtenidos con resultados reportados (APÉNDICE II) se observa que los valores obtenidos por MELL están en los rangos reportados.

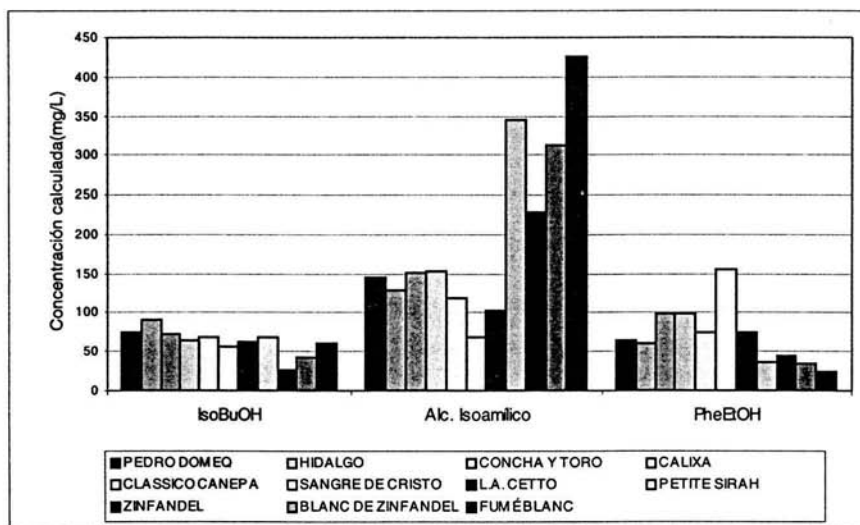




La ventaja que tiene la MELL sobre otros métodos de extracción reportados es el ahorro de tiempo y reactivos.

En la Figura 29, se comparan en forma de barras las concentraciones calculadas de los vinos. Puede apreciarse que las concentraciones obtenidas de los vinos *Cabernet Sauvignon* no muestran diferencias notables entre ellas y que existen diferencias notables entre las concentraciones calculadas de los otros vinos analizados.

Figura 29. Comparación de las concentraciones obtenidas en los vinos analizados



Se observa que si se acomodan en forma creciente a las concentraciones obtenidas de la MELL de los vinos *Cabernet Sauvignon*, *Petite Sirah* y *Fumé Blanc*, estas coinciden con los resultados de la PRMD de la fibra PA para los compuestos IsoBuOH y PheEtOH, ya que el orden en que se presentan las concentraciones es el mismo. Sin





embargo, los resultados de la PRMD de la fibra PDMS/DVB no coinciden con los resultados de la MELL.

El orden de la concentración calculada con la MELL del alc. isoamílico no coincidió con el resultado de ninguna de las dos fibras. Como puede observarse en la Tabla 18, el coeficiente de regresión fue menor que en los otros dos compuestos analizados y esto probablemente sea la razón por lo que no existieron coincidencias sin embargo, el resultado de la PRMD de la fibra PDMS/DVB es más parecido al resultado de la MELL. Debido a estos resultados, la MELL mostró ser un buen método para la extracción y cuantificación de los alcoholes estudiados para este trabajo y que están presentes en el vino.





- Las condiciones de la MEFS-CG fueron optimizadas para la realización de este trabajo.
- Se determinaron con la MEFS-CG-FID los tiempos de retención de los estándares estudiados. Estos tiempos de retención fueron comparados con los tiempos de retención de una muestra de vino identificándose de esta manera al AcetOH; AcOEt; MeOH, EtOH; ProOH, IsoBuOH; Acet. Isoamílico; BuOH; Alc. Isoamílico; Alc. Amílico; EE6:0; HexOH; EE8:0; EE10:0, EE Ác. Succ y PheEtOH.
- Con la MEFS-CG-EM se comprobó la presencia de estos compuestos y además se identificaron 41 compuestos más en los vinos *Cabernet Sauvignon*, *Petite Sirah* (tintos) y *Fumé Blanc* (blanco).
- Los compuestos AcetOH, AcOEt, ProOH, IsoBuOH, acet. Isoamílico, BuOH, alc. Isoamílico, EE6:0, pentanol, HexOH, éster etílico del ácido láctico, *trans*-3-Hexen-1-ol, EE8:0, ácido acético, EE10:0, EE Ác. Succ., EE12:0, PheEtOH, ácido caprílico y ácido cáprico fueron comunes entre los vinos estudiados.
- El metil éster del ácido-4-metil valérico, alcohol isopropeniletílico, pentadecano, n-decanal, 2-etilhexanol, éster etílico del ácido sórbico, isoamilacetato, etil-*trans*-4-decanoato, éster etílico del ácido benzoico, santalol, ácido sórbico, amifenol y ácido mirístico fueron encontrados solamente en un vino. Estos compuestos pueden ser exclusivos de cada vino donde fueron encontrados y tienen su origen debido a las diferencias en el proceso de elaboración y/o a la cepa utilizada, que provoca que la concentración sea suficiente para que sea detectada por CG-EM.
- De los perfiles cromatográficos obtenidos con las fibras PDMS/DVB y PA se comprobó que es difícil intentar clasificar a los vinos elaborados con la misma cepa o del mismo tipo (tintos) pero de distinta marca debido a que existen muchas variaciones en el proceso de elaboración que afectan la presencia o ausencia de estos compuestos.





- Los perfiles cromatográficos de vinos L. A. Cetto de distintas cepas obtenidos por MEFS–CG mostraron que las diferencias encontradas son causadas por la misma cepa y no por variaciones del proceso.
- En este trabajo también se cuantificaron tres alcoholes por MELL. Sin embargo, esta metodología puede aplicarse a otros compuestos presentes en el vino.
- Con la MELL optimizada se cuantificó al IsoBuOH, Alc. Isoamílico y PheEtOH. Estos alcoholes se eligieron debido a su representabilidad en el perfil cromatográfico obtenido por MEFS.
- La concentración del IsoBuOH, Alc. Isoamílico y PheEtOH obtenida por MELL (Tabla 18) están dentro de los rangos de concentración reportados en la literatura (Apéndice II) y los coeficientes de regresión lineal (R^2) fueron superiores a 0.90, excepto en el Alc. Isoamílico obtenido del vino Fumé Blanc, cuya R^2 fue de 0.8028.
- Se comprobó que los resultados de la MELL coinciden con los resultados obtenidos de la MEFS para el IsoBuOH y el PheEtOH si las concentraciones determinadas se ordenaban en forma creciente. En el caso del Alc. Isoamílico, no hubo coincidencia entre la MELL y la MEFS. Asimismo, el empleo de las dos técnicas son complementarias entre ellas ya que el perfil cromatográfico obtenido por MEFS es muy semejante al obtenido por MELL.
- Una perspectiva de la MELL es encontrar los rangos de concentración de diversos tipos de vino para ayudar a la clasificación de estos.
- La información obtenida en este trabajo podría emplearse en el futuro como base para establecer una metodología analítica confiable con el fin de establecer un control de calidad en la industria vinícola como se ha sugerido en muchos trabajos experimentales anteriores.





1. MATEO, J. J., Jimenez, M., Pastor, A., Huerta, T., Yeast starter cultures affecting wine fermentation and volatiles, Food Research International 34 (2001) 307-314
 2. ORTEGA-HERAS, M., González-SanJosé, M. L., Beltrán, S., Aroma composition of wine studied by different extraction methods, Analytica Chimica Acta 458 (2002) 85-93
 3. BONINO, M., Schellino, R., Rizzi, C., Aigotti, R., Delfini, C., Baiocchi, C., Aroma compounds of an Italian wine (*Ruché*) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS, Food Chemistry 80 (2003) 125-133
 4. ORTEGA, C., Lopez, R., Cacho, J., Ferreira, V., Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts, Journal of Chromatography A, 923 (2001) 205-214
 5. POZO-BAYÓN, M. A., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., Polo, M. C., Polydimethylsiloxane solid-phase microextraction-gas chromatography method for the analysis of volatile compounds in wines. Its application to the characterization of varietal wines, Journal of Chromatography A, 922 (2001) 267-275
 6. <http://www.lavina.com.mx>
 7. http://www.edn.edu.mx/temp/miembros/ver_articulo.php?clave=2, J. P. VERGARA,
 8. <http://www.csgastronomia.edu.mx/ClubVino/uvas.html>
 9. RODRÍGUEZ-BENCOMO J. J., Conde, J. E., Gercía-Montelongo, F., Pérez-Trujillo, J. P., Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography, Journal of Chromatography A, 991 (2003) 13-22
 10. ZEA, L., Moreno, J., Medina, M., Characterization of aroma fractions in biological aging of "Fino" white wine produced in Montila-Moriles appellation d'origine, Acta Horticolae 388 (1995) 233-238
-





-
11. HERNANZ VILA, D., Heredia Mira, F. J., Beltrán Lucena, R., Fernández Recamales, M. A., Optimization of an extraction method of aroma compounds in white wine using ultrasound, *Talanta*, 50 (1999) 413-421
 12. GARDE CERDÁN, T., Torrea Goñi, D., Ancín Azpilicueta, C., Evolución de compuestos volátiles en vino envejecido durante 18 meses en barricas de roble, VI Jornadas Científicas 2001. Grupos de Investigación Enológica, Valencia, 2001, <http://www.acenologia.com/pdf/aroma01.pdf>
 13. Volatile compounds in food and beverages, capítulo 14, editado por Henk Maarse
 14. MARTORELL, N., Pilar M., Busto, M., Guasch, O., Análisis de compuestos fenólicos volátiles en vino mediante Headspace y SPME, VI Jornadas Científicas 2001. Grupos de Investigación Enológica, Valencia, 2001, <http://www.acenologia.com/pdf/aroma01.pdf>
 15. MONJE, M. C., Privat, C., Gastine, V., Nepveu, F., Determination of ethylphenol compounds in wine by headspace solid phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionization detection, *Analytica Chimica Acta* 458 (2002) 111-117
 16. GARDE, T., Rodríguez, S., Ancín, C., Volatile composition of aged wine in used barrels of French oak and of American oak, *Food Research International* 35 (2002) 603-610
 17. MAESTRES, M., Busto, O., Guasch, J., Determinación de compuestos azufrados mediante HS-SPME, VI Jornadas Científicas 2001. Grupos de Investigación Enológica, Valencia, 2001, <http://www.acenologia.com/pdf/aroma01.pdf>
 18. MAESTRES, M., Busto, O., Guasch, J., Análisis de mercaptanos, sulfuros y disulfuros en vinos mediante SPME, Jornadas Científicas 99. Aspectos aromáticos del vino. Grupos de Investigación Enológica, http://www.rubes.es/ace_anterior/pdf/aroma.pdf
-





19. Demyttenaere, J. C. R., Dagher, C., P., Kallithraka S. S., Verhé, R., De Kimpe, N., Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 985 (2003) 233-246
20. PAWLISZYN, J. SOLID PHASE MICROEXTRACTION. Theory and Practice, Wiley-VCH Inc., NY, EUA, 1997, páginas 3-7
21. ZHOUYAO Z., Min J. Y., Pawliszyn J. Anal. Chem. 66, 17 (1994), 844-852
22. MARCUS, Y., Development and publication of solvent extraction methods, Talanta 23, (1976), 203-209
23. VALCARCEL Casas, M, Rodríguez Silva, M., Teoría y prácticas de la extracción líquido – líquido. Alambra, 1984
24. DEAN, J.A. Chemical separation methods. Van Nostrand Reinhold company. NY, 1969 p. 18-59
25. MORRISON, G. H. and Freiser, H. Solvent extraction in Analytical Chemistry. J. Wiley and sons, NY, 1957
26. LAWRENCE, James F., Organic trace Analysis by liquid chromatography, Academic Press, NY, 1981
27. CHARLT, Gaston, Química Analítica General, Toray-Mason, Barcelona
28. SKOOG, D. A., Moller, F, J., Nieman, T. A., Principios de Análisis Instrumental, McGraw Hill, 5ª edición, España, 2001.
29. McNAIR, H. M., Miller, J. M., Basic Gas Chromatography, Ed. John Wiley & Sons, N.Y., E.U.A., 1998
30. <http://www.nutrinfo.com.ar/pagina/info/trans.html>





APÉNDICE I
DATOS COMPLETOS DE LOS VINOS EMPLEADOS

	NOMBRE DEL VINO	CEPA	AÑO	% ALC. VOL	pH	REGIÓN	PRODUCTOR	TIPO
CABERNET SAUVIGNON	L.A. CETTO	Cabernet Sauvignon	2001	13	3	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	VINICOLA L.A. CETTO	TINTO
	PEDRO DOMEQ X-A	Cabernet Sauvignon	2001	12.6	3	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	CASA PEDRO DOMEQ	
	HIDALGO	Cabernet Sauvignon	N. E.	11	3	QUERETARO, MÉXICO	LA MADRILEÑA S.A. DE C.V.	
	CALIXÁ	Cabernet Sauvignon	2001	13	3	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	MONTE XANIC S. DE R.L	
	CONCHA Y TORO (RESERVADO)	Cabernet Sauvignon	2001	12.5	3	VALLE CENTRAL, CHILE	VIÑA CONCHA. Y TORO S.A. DE C.V.	
	CLÁSICO CANEPA	Cabernet Sauvignon	2000	12.5	3	VALLE CENTRAL, CHILE	JOSE CANEPA Y CIA. LTDA.	
	SANGRE DE CRISTO	VARIAS	N. E.	12	3	COAHUILA, MEXICO	BODEGAS FERRIÑO, S.A. DE C.V.	
L. A. CETTO	PETITE SIRAH	Petite Sirah	2001	13.5	4	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	VINICOLA L.A. CETTO	BLANCO
	ZINFANDEL	Zinfandel Californiana	2001	13.5	3	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	VINICOLA L.A. CETTO	
	BLANC DE ZINFANDEL	Zinfandel Californiana	N. E.	11.5	3	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	VINICOLA L.A. CETTO	
	FUMÉ BLANC	Sauvignon Blanc	2001	12.5	3	BAJA CALIFORNIA, MÉXICO	VINICOLA L.A. CETTO	





APÉNDICE II
CONCENTRACIONES Y UMBRALES DE PERCEPCIÓN REPORTADAS DE
ALGUNOS DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL VINO⁽¹³⁾

ÉSTERES	RANGOS DE CONCENTRACIÓN (ppm)		VALORES UMBRALES DE OLOR (ppm)
	VINO TINTO	VINO BLANCO	
Etil formato	0.5 – 8	0 – 4.3	155.20
Etil acetato	9 – 257	0.15 – 150	12.27
Etil propanoato	tr – 20	0 – 0.9	1.84
Etil pentanoato	5 – 10	1.3	0.01
Etil hexanoato	tr – 3.4	0.03 – 1.3	0.08
Etil heptanoato	—	—	0.22
Etil octanoato	0.2 – 3.8	0.05 – 2.3	0.58
Etil nonanoato	—	—	0.85
Etil decanoato	tr – 0.3	0 – 2.1	0.51
Metil acetato	—	tr	470
Propil acetato	—	—	4.74
Butil acetato	tr – 0.02	tr – 0.02	1.83
Pentil acetato	—	0.043	0.18
Hexil acetato	tr – 4.8	0 – 3.6	0.67/2.4
Heptil acetato	—	—	0.83
Octil acetato	—	—	0.80
2-Feniletal acetato	0.02 – 8	0 – 18.5	1.80
Etil cinamato	0 – 0.008	0.06	0.048
3-Metilbutil acetato	0 – 23	0.03 – 0.5	0.16/1.0
Etil lactato	12 – 382	0.17 – 378	150
2-Metilpropil acetato	0.01 – 1.2	0.03 – 0.16	—
Etil butanoato	0.08 – 1.8	0.01 – 1.2	—
Etil 2-metil propanoato	0.04 – 0.1	0.06 – 0.23	—
Etil hidrogen succinato	—	1.5 – 7.9	—
Etil 3-metil butanoato	0.01 – 0.11	0.01 – 0.06	—
3-Metilbutil propionato	—	—	—
ALCOHOLES			
Metanol	8 – 269		500
Propanol	5 – 125		500
2-Metil propanol (Isobutanol)	9 – 174		228
1-Butanol	0.003 – 8.5		150





APÉNDICE

2-Metil butanol	8 – 150	300 – 330	
3-Metil butanol	6 – 490	14.5	
2- y 3-Metilbutanol	87 – 564	180	
Pentanol	0.008 – 5.1	64.4	
Hexanol	0.3 – 12	5.2	
Heptanol	0.02 – 0.05	2.5	
Octanol	0.09 – 1.5	0.8	
2-Feniletanol	4 – 197	25 – 105	
Nonanol	tr – 0.009	0.03	
Decanol	—	0.4	
Dodecanol	—	1.0	
ÁCIDOS			
Acético	2.5 – 2.6	4.7 – 400	—
Propanóico	0.1 – 1.7	0.1 – 1.7	—
2-Metil propanóico	0.7 – 1.5	0.01 – 2.1	—
Butanóico	0.4 – 4.8	0.04 – 1.1	—
3-Metil butanóico	0.3 – 1.3	0.1 – 1.6	—
Hexanóico	0.7 – 2.6	0.02 – 5.7	8
Octanóico	0.7 – 3.7	0.07 – 20.9	10
Decanoico	0 – 1.6	0 – 4.5	6
COMPUESTOS CARBONÍlicos			
Acetaldehído	7 – 252	100	
3-Metilbutanal	—	—	
Benzaldehído	0.006 – 0.5	3	
Fenilacetaldehído	0.12	1.1	
Hexanal	0 – 0.002	—	
(E)-2-Hexanal	tr	—	
(Z)-3-Hexanal	tr	—	
2,4-Decadienal	—	—	
3-Hidróxi-2-butanona (Acetoína)	0 – 140	150	
2,3-Butanediona (Diacetil)	0.2 – 4.1	3	
2,3-Pentanodiona	0.01 – 0.1	—	
2-Furfural	tr – 10.3	—	
5-Hidroximetil-2-furfural	tr – 87	—	
5-Metil-2-furfural	—	—	
β-Damascenona	0.005 – 0.17	1.6	
β-Ionona	0.03	0.0045	





APÉNDICE III
COMPUESTOS QUÍMICOS ASOCIADOS A LOS DESCRIPTORES MAS COMUNES
EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS SENSORIAL DE VINOS⁽³⁰⁾

Compuesto	Notas de cata
α -ionona	grosella, violeta
δ -octalactona	herbáceo
4-etil fenol	animal
4-metil guaiacol	especies
4-vinil fenol	desagradable, farmacia
4-vinil guaiacol	fenólico
Acetaldehído	Madera-vainilla
Acetato 2-fenil etilo	rosa, violeta
Acetato hexilo	fruta, uva
Acetato isoamílico	plátano
Ácido acético	vinagre
Ácido butírico	queso, leche agria
Ácido cáprico	graso
Ácido caprílico	queso, rancio
Ácido caproico	queso, savia, bosque
Ácido isobutírico	ácido, cítrico
Ácido isovalérico	queso, sudor pies
Alcohol 2-fenil etanol	rosa
Alcohol isoamílico	fusel, almendra amarga
Benzaldehido	almendra amarga
Butirato etilo, propanol	mora
Cinemat de etilo	azúcar quemado
cis-3-hexenol	hierba cortada
Decanoato etilo	fruta madura, plátano
Eugenol	Madera-vainilla
Furaneol	azúcar quemado, caramelo
Guaiaacol	medicinal
Hexanoato etilo	manzana, piña
Hexanol	hierba
Isobutanol	fusel
Isobutirato etilo	fruta, manzana
Isovalerato etilo	fruta del bosque, mora
Isovalerato isoamilo	agrio
Lactato etilo	agrio
Metional	conserva, patata hervida
Metionol	ajo, mercaptano
Octanoato etilo	manzana, piña, plátano
Terpineol	fresco, romero
Vainillina	Madera-vainilla





APÉNDICE IV
Prueba Estadística de Rango Múltiple de Duncan⁽³¹⁾

Esta prueba consiste en comparar el rango de cualquier conjunto de p medias con un apropiado **rango de mínima significación, R_p** , que está dado por:

$$R_p = s_{\bar{x}} \cdot r_p$$

Aquí, $s_{\bar{x}}$ es una estimación de $\sigma_{\bar{x}} = \sigma / \sqrt{n}$, y se calcula por medio de la fórmula:

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{MSE}{n}}$$

donde MSE es el cuadrado medio del error en el análisis de varianza. El valor de r_p depende del nivel de significación y del número de grados de libertad correspondiente al MSE y se obtiene de tablas.

Para la interpretación de los resultados del análisis de Duncan, las variables se colocan en orden ascendente, según su promedio obtenido en el Análisis de Varianza.

A continuación se da un ejemplo de esta prueba:

Se calculó el ANOVA para el butanol de los vinos *Cabernet Sauvignon* extraídos con la fibra PDMS/DVB (Figura 34).





Figura 34. ANOVA del butanol realizado a los vinos Cabernet Sauvignon con la fibra de PDMS/DVB

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
L. A. CETTO	3	73960.75	24653.58	12748564.98		
PEDRO DOMEQ	3	54146.00	18048.67	620761.33		
HIDALGO	3	64256.59	21418.86	430384.27		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	65446563.22	2	32723281.61	7.11	0.03	5.14
Dentro de los grupos	27599421.17	6	4599903.53			
Total	93045984.39	8				

El primer paso es agrupar las medias en orden ascendente

PEDRO DOMEQ	18048.67
HIDALGO	21418.86
L. A. CETTO	24653.58

calcular el valor de s_x^- :

$$s_x^- = \sqrt{\frac{MSE}{n}}$$

$$s_x^- = 1,238.27$$

se obtiene entonces (por interpolación lineal) de los valores de la tabla (para $\alpha=0.05$ y 6 grados de libertad)

p	2	3
r_p	3.46	3.59

Multiplicando cada valor de r_p por s_x^- se obtiene:





p	2	3
R_p	4,284.40	4,445.37

El rango de *todas las tres medias* es $24,653.58 - 18,048.67 = 6,604.92$, que excede de $R_3 = 4,445.37$, es decir el rango de mínima significación. Este resultado debía haberse esperado ya que el valor F en el ANOVA muestra que las diferencias entre todas las tres medias son significativas en $\alpha = 0.05$. Para probar diferencias significativas entre *dos medias adyacentes*, se obtiene rangos de 3,243.72 y 3,370.20 respectivamente para 24,653.58, 21,418.86 y 21,418.86, 18,048.67. Como ninguno de los valores excede de $R_2 = 4,284.40$ las diferencias no son significativas. Todos los resultados pueden resumirse escribiendo

PEDRO DOMEQ HIDALGO L. A. CETTO

donde se traza una línea *bajo cualquier conjunto de medias adyacentes para el cual; el rango es menor que el valor apropiado de R_p , esto es, bajo cualquier conjunto de medias adyacentes para los cuales las diferencias no son significativas.*





CROMATOGRAMAS DE LAS EXTRACCIONES REALIZADAS A LOS VINOS CON DISTINTOS SOLVENTES

