



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Determinación de Compuestos Volátiles y Polifenoles en Vinos Tintos

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

VIANEY CERVANTES DÍAZ



MÉXICO, D.F

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: **Profesor: Hermilo Leal Lara**

VOCAL: **Profesor: Josefina Elizalde Torres**

SECRETARIO: **Profesor: Araceli Patricia Peña Álvarez**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Arturo Navarro Ocaña**

2° SUPLENTE: **Profesor: Jose Guadalupe de la Rosa Canales**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 101, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Rocío Juárez Ciprés _____

SUSTENTANTE:

Vianey Cervantes Díaz _____

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme pertenecer a esta gran institución, por brindarme mi formación académica y crecer como persona y profesionalista.

A Dios por darme salud y la oportunidad de vivir día a día y especialmente por mi familia.

A mis papás, Pedro y Olivia, por su apoyo, amor, sacrificio, comprensión, por darme la oportunidad de tener una carrera profesional, por la familia en la que me forme como persona y por ser mi ejemplo a seguir.

A mis hermanos, Sherley y Pedro, por creer en mí, por su cariño y su apoyo.

A Daniel por llegar a mi vida, por su apoyo, amor y comprensión. Por estar conmigo y compartir las derrotas y los triunfos.

A la Dra. Araceli Peña Álvarez por su asesoría, confianza, amistad, tiempo invertido en la realización de este trabajo y por compartir conmigo sus conocimientos.

A la maestra Rocío Juárez Cíprés por su ayuda, apoyo, consejos y amistad.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, Bety, Alex, Fabián, Hugo y Luis, por su amistad y apoyo.

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.
Un sabio en su laboratorio no es solamente un teórico, es
también un niño colocado ante los fenómenos naturales
que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
1 OBJETIVOS.....	13
1.1 Objetivos Generales.....	13
1.2 Objetivos Particulares.....	13
2 Antecedentes.....	14
2.1 El Vino.....	14
2.1.1 Breve Historia del Vino.....	14
2.2 Producción y Consumo de vino en el mundo.....	14
2.2.1 Producción mundial de vino.....	14
2.2.2 Consumo mundial de vino.....	16
2.2.3 Producción y Consumo de Vino en México.....	16
2.3 Definición de Vino.....	17
2.4 Tipos de Vino.....	18
2.5 Beneficios del consumo de vino a la salud.....	19
2.5.1 Importancia enológica de los polifenoles.....	20
2.6 Composición Química del Vino.....	20
2.6.1 Compuestos Volátiles en los vinos.....	21
2.6.2 Polifenoles en los Vinos.....	22
2.6.2.1 Clasificación de los Polifenoles.....	27
2.6.2.2 Polifenoles no flavonoides.....	27
2.6.2.3 Polifenoles flavonoides.....	29
2.7 Métodos de Extracción.....	30
2.7.1 Métodos de Extracción de compuestos volátiles y polifenoles en el vino.....	30
2.8 Microextracción en Fase Sólida (MEFS).....	31
2.8.1 Modos de extracción para la MEFS.....	32
2.8.2 Optimización de la MEFS.....	33
2.8.2.1 Extracción.....	33
2.8.2.2 Desorción de los analitos.....	33
2.8.3 Tipos de fibras disponibles para la MEFS.....	34

2.8.4	Derivatización.....	34
2.9	Extracción por sorción con barras magnéticas (SBSE)	35
2.9.1	Extracción y desorción de la SBSE	36
2.9.2	Factores que afectan a la SBSE.....	38
2.10	Cromatografía de Gases (CG)	38
2.10.1	Instrumentación para CG	39
2.11	Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas (CG-EM)	40
3	Desarrollo Experimental.....	42
3.1	Materiales	42
3.2	Reactivos y Estándares	43
3.3	Condiciones Cromatográficas.....	43
3.4	Muestras de Vino utilizadas	44
3.5	Identificación de compuestos volátiles en vinos por MEFS	44
3.6	Identificación de Polifenoles	45
3.7	Determinación de Polifenoles (ácido trans-cinámico, ácido cafeíco y trans-resveratrol) en vinos por MEFS.....	46
3.7.1	Selección de la fibra para la MEFS.....	46
3.7.1.1	Extracción de estándares de polifenoles con fibra de PA	47
3.7.2	MEFS en muestras de vino	48
3.8	Determinación de Polifenoles (ácido trans-cinámico, ácido cafeíco y trans-resveratrol) por SBSE	48
3.8.1	Identificación de los estándares de polifenoles por SBSE.....	48
3.8.2	Optimización de los parámetros de SBSE para la extracción de polifenoles en vino tinto.....	49
3.8.2.1	Optimización del porcentaje de etanol en las muestras de vino	49
3.8.2.2	Optimización del pH del medio de extracción	50
3.8.2.3	Optimización del tiempo de extracción	50
3.8.2.4	Optimización de la adición de sal.....	50
3.8.2.5	Optimización del tiempo de desorción	50
3.8.3	Análisis por SBSE en muestras de vino tinto	50
3.9	Cuantificación de polifenoles en muestras de vino tinto.....	51
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53

4.1	Identificación de compuestos volátiles en vino tinto	53
4.2	Identificación de polifenoles	55
4.2.1	Selección de la fibra para MEFS	57
4.2.2	Extracción de los estándares de polifenoles con fibra de PA.....	58
4.2.3	Análisis de muestras de vino	61
4.3	Determinación de Polifenoles por SBSE.....	63
4.3.1	Identificación de polifenoles por SBSE.....	63
4.3.2	Optimización de los parámetros de SBSE para la extracción de polifenoles en vino tinto.....	65
4.3.2.1	Porcentaje de etanol	65
4.3.2.2	pH	66
4.3.2.3	Tiempo de extracción	67
4.3.2.4	Adición de sal (NaCl).....	68
4.3.2.5	Tiempo de desorción.....	68
4.3.2.6	Condiciones optimizadas para la extracción de polifenoles en vino tinto.....	70
4.3.3	Aplicación de la metodología desarrollada a diferentes muestras de vino tinto	71
4.3.4	Cuantificación de polifenoles identificados en las muestras de vino	72
5	Conclusiones.....	78
6	Referencias:.....	79

ABREVIATURAS

BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CG	Cromatografía de Gases
CGL	Cromatografía Gas-Líquido
CGS	Cromatografía Gas-Sólido
CV	Coefficiente de Varianza
CW	Carbowax
DE	Diethyl éster
DVB	Divinilbenceno
EEAD	Etil éster del ácido decanoico
EEAH	Etil éster del ácido hexanoico
EEAO	Etil éster del ácido octanoico
EM	Espectrometría de Masas
EG	Etilenglicol
EI	Estándar Interno
EUA	Estados Unidos de América
EPM	Extracción Protegida con Membrana
FEA	Fenil etil alcohol
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HS	Headspace
ID	Inmersión Directa
MEFS	Microextracción en Fase Sólida
MONICA	Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease
OIV	Organización Internacional del Vino
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Polietilenglicol
PTV	Vaporización a Temperatura Programable
PTFE	Politetrafluoroetileno
SCAN	Barrido Total de Iones

SBSE	Extracción por Sorción en Barra Magnética
SIM	Monitoreo Selectivo de Iones
SPE	Extracción en Fase Sólida
TDU	Unidad de Desorción Térmica
UE	Unión Europea

RESUMEN

En los últimos años, el vino ha llamado la atención de los científicos ya que, numerosos estudios han avalado los efectos benéficos de la ingesta de polifenoles sobre la salud, especialmente sobre el sistema cardiovascular y el vino es una bebida rica en polifenoles y su consumo moderado conlleva efectos benéficos para la salud. Esto es importante, porque las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo.

Existen diferentes estudios que demuestran las propiedades biológicas del vino como matriz rica en polifenoles, compuestos con propiedades antioxidantes, antisépticas y anticancerígenas, entre muchas otras, además los polifenoles son importantes bajo el punto de vista organoléptico ya que, le confieren el amargor y la astringencia al vino lo cual se ha tomado como un atributo para evaluar la calidad del mismo¹.

Dada la importancia que ha tomado el estudio del vino y lo que implica tener una dieta rica en polifenoles, en este trabajo se desarrolló y aplicó la microextracción en fase sólida (MEFS) acoplada a Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM) para la identificación de los compuestos volátiles y semivolátiles presentes en dos muestras de vinos tintos (Cabernet Sauvignon) Mexicanos. Los compuestos fueron identificados de acuerdo a los espectros de masas obtenidos de las muestras y comparados con los de la base de datos de la Biblioteca de Espectros de Masas del NIST (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NH Mass Spectra Library versión 2.0 build 19 Nov 2011). La MEFS se realizó en modo headspace (MEFS-HS) utilizando la fibra PDMS/DVB. En el análisis de vinos estudiados se obtuvo un perfil similar para todos los compuestos identificados.

Para el análisis de polifenoles (ácido trans-cinámico, ácido cafeíco y trans-resveratrol) en vinos tintos (Cabernet Sauvignon), se probaron dos técnicas de preparación de muestra: la MEFS en modo inmersión (MEFS-ID) y la extracción por sorción con barra magnética (SBSE; por sus siglas en inglés), con el objetivo

de compararlas sin embargo, esto no fue posible ya que, en la MEFS no se obtuvo reproducibilidad debido a que la fibra se dañaba.

Para la extracción con SBSE se utilizó la barra de extracción recubierta de Etilenglicol - Silicon (EG - Silicon) en modo inmersión. La técnica fue optimizada variando algunos de los factores que afectan la extracción: % de etanol, pH, adición de sal, tiempo de extracción y de desorción.

La metodología optimizada se aplicó a 5 vinos tintos con el fin de comparar los resultados. La cuantificación de los polifenoles se realizó con Factores de Respuesta, obteniéndose buena precisión con coeficientes de variación menores al 17%.

En los 5 vinos tintos analizados se determinó mayor concentración de ácido cafeíco y en menor concentración el trans-resveratrol, el ácido trans-cinámico no se logró detectar o los vinos analizados no lo contenían sin embargo, se identificó el isómero ácido cis-cinámico el cual es menos estable y puede formarse al entrar en contacto con la radiación UV o por estar en solución.

Los métodos propuestos utilizando MEFS y SBSE seguido de CG-EM para la determinación de compuestos volátiles y semivolátiles, así como de polifenoles respectivamente son métodos sensibles, sencillos, rápidos y amigables con el ambiente.

INTRODUCCIÓN

El vino es el resultado de la fermentación de los azúcares de la uva tras los procesos de colecta, prensado y maceración, sin embargo; el vino dista mucho de ser una simple disolución de agua, ácidos y alcohol. La gama de reacciones bioquímicas que se dan durante la elaboración del vino, dan como resultado un gran número de componentes que al encontrarse en perfecta armonía, producen un vino de calidad¹.

El vino es una de las bebidas alcohólicas más antiguas, complejas y fascinantes que existen actualmente. Su consumo, beneficios para la salud y excelente acompañamiento que le da a la comida, han sido algunas de las razones que han impulsado su estudio e investigaciones que permiten comprenderlo, apreciarlo y mejorar su calidad².

La fracción volátil de los vinos determina en gran medida su aroma, que es una de las características más importantes que influyen en la calidad del vino y preferencia de los consumidores. La fracción volátil del vino es muy compleja, principalmente debido a la gran cantidad de compuestos que lo forman. Hasta la fecha, más de 1000 compuestos han sido identificados, de diferentes propiedades fisicoquímicas³.

Por otro lado, los compuestos fenólicos presentes en los vinos son importantes ya que son responsables de las características organolépticas, como color, astringencia y amargor. Además se ha observado que una dieta rica en polifenoles es benéfica para la salud gracias a sus propiedades antioxidantes la capacidad antioxidante del vino está directamente relacionada con su contenido de polifenoles. Los principales constituyentes fenólicos del vino con capacidad antioxidante son: derivados de ácidos fenólicos, ácidos cinámicos y tirosina; estilbenos, flavonoides y procianidinas¹.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivos Generales

- Desarrollar y optimizar una metodología analítica para la determinación de tres polifenoles (ácido trans-cinámico, ácido cafeico y trans-resveratrol) presentes en vinos tintos.
- Obtener un perfil de compuestos volátiles y semi-volátiles en vinos tintos por Microextracción en Fase Sólida (MEFS) seguida de Cromatografía de Gases (CG) – Espectrometría de Masas (EM).

1.2 Objetivos Particulares

- Aplicar la metodología desarrollada en diferentes muestras de vinos tintos.

2 Antecedentes

2.1 El Vino

2.1.1 Breve Historia del Vino

El vino es una bebida producida exclusivamente por la fermentación de la uva o del zumo de uvas, es una de las bebidas alcohólicas más antiguas que existen actualmente. Desde hace 6000 a 7000 años en la zona mediterránea, los pueblos nómadas ya elaboraban vinos a partir de uvas silvestres⁴.

Los griegos aportaron la ordenación del cultivo y lo extendieron a las costas mediterráneas de Italia, Sicilia, Francia y España. Después los Romanos heredaron la cultura vitivinícola griega, la perfeccionaron e impulsaron su cultivo en Europa. Tras la caída del Imperio Romano, durante la Edad Media, la vitivinicultura se identifica con la cultura cristiana y se difunde. En el siglo XVI, con el descubrimiento de América, los españoles y portugueses llevan la vid a Sudamérica y México, desde donde se extiende a todo el continente^{5,6}.

2.2 Producción y Consumo de vino en el mundo

2.2.1 Producción mundial de vino

Según la estimación de la Organización Internacional del Vino (OIV), la producción mundial de vino en 2011 (sin contar zumo y mosto) puede situarse en 265.8 millones de hectolitros, 700000 más que en 2010 (Figura 1).

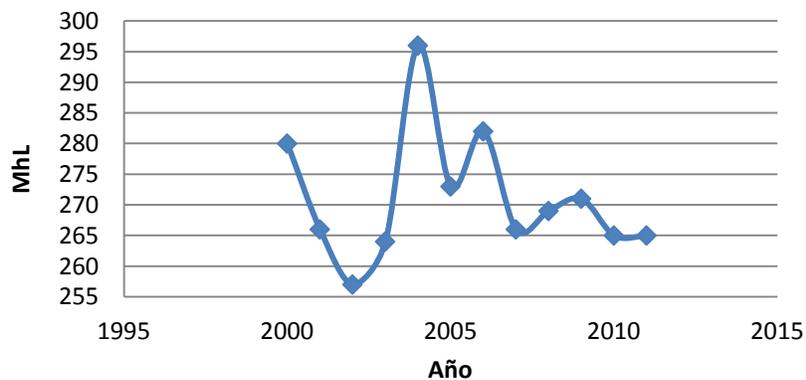


Figura 1.- Producción mundial de Vino del año 2000 al año 2011.
Fuente: OIV 2010.

El primer país productor de vino es Francia con 49.6 millones de hL (18.7% mundial), seguido por Italia con 41.6 millones de hL (15,6% mundial), y España con 34.3 millones de hL (12,9% mundial)⁷.

Fuera de la Unión Europea (UE), el nivel de producción en 2011 es ligeramente superior con 108.9 millones de hL a 2010 con 108.7 millones de hL. E.U.A es el país no europeo de mayor producción de vino con 18.7 millones de hL, lo que supone un descenso de más de 2 millones de hL respecto a 2010. En segundo lugar, se encuentra Argentina con 15.5 millones de hL, que disminuye sus cifras en 800.000 hL con respecto a la producción del año anterior, cuando se aumentó considerablemente. En el tercer puesto aparece Australia con una producción de vino de 11 millones de hL, seguida de Chile con 10.6 millones, casi un millón y medio más que en 2010^{7, 8}.

Respecto a otros países fuera de la UE, Sudáfrica pasa de producir 9.3 millones de hL en 2010 a 9.7 millones en 2011, aunque aún por debajo de la cifra registrada en 2009 que rozó los 10 millones. Brasil aumenta de 2.5 millones de hL en 2010 a 3.5 millones en 2011, volviendo a registrar datos positivos tras la caída en 2010^{7, 8}. En la Figura 2 se puede observar gráficamente lo mencionado anteriormente.

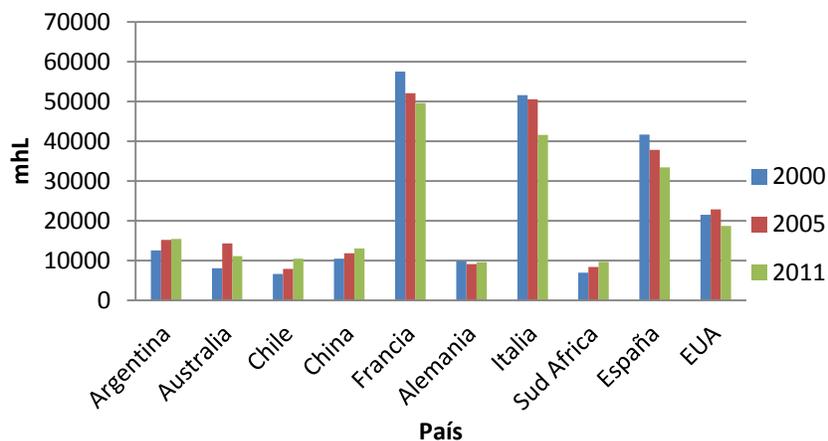


Figura 2.- Principales países productores de vino.
Fuente OIV.

2.2.2 Consumo mundial de vino

Las estimaciones de consumo mundial de Vino para el 2011 por la OIV, son de alrededor de 241.9 millones de hectolitros, se aprecia un aumento respecto al año anterior de 1.7 millones de hL. Este crecimiento se observa analizando la previsión para los países externos a la Unión Europea: China, en primer lugar, subiría cerca de 1.2 millones de hL hasta los 17 millones, seguida de E.U.A., con cerca de 1 millón más de hL que en 2010. En cifras generales, se estima un crecimiento en el consumo de 2.5 millones de hL. Otros países con cifras positivas en consumo son Hungría, Brasil, Sudáfrica o Nueva Zelanda⁷.

En cuanto a la UE, el consumo bajaría 864.000 hL respecto a 2010. Los principales países consumidores europeos presentan una tendencia decreciente con respecto al año anterior⁷.

2.2.3 Producción y Consumo de Vino en México

La producción del Vino en México, se remonta a la época de la conquista española; para los colonizadores españoles el vino era un elemento muy importante de su dieta diaria. Luego de conquistar por completo México, Hernán Cortés mandó traer de España las primeras vides europeas, las cuales se adaptaron de manera rápida al clima de la región lo que derivó el desarrollo de la vitivinicultura en la nueva colonia. Sin embargo, debido a esta situación se dejaron de traer vinos desde España, lo cual provocó que el rey Felipe II prohibiera plantar más vides y la destrucción de aquellas con uvas de buena calidad, aunque tal restricción no aplicaba a las misiones establecidas por los religiosos, quienes siguieron elaborando vinos para las celebraciones⁹.

Hasta 1948 se creó la Asociación Nacional de Vitivinicultores con quince empresas; cuya finalidad era la de fomentar el desarrollo del cultivo de la vid, la industrialización de la uva y comercializar los productos obtenidos; así como proteger y mejorar la calidad de los productos vitivinícolas. Es a partir de esa década que la producción de vino mexicano comienza a crecer¹⁰.

Actualmente, la producción de vinos mexicanos finos es una realidad, pero requiere de mayor apoyo por parte de los consumidores, para desarrollarse y así

consolidar su posición tanto en el mercado nacional, como en los mercados extranjeros⁹.

La industria vinícola mexicana ha crecido en los últimos años, al grado que, según la Asociación Nacional de Vinicultores (2008) estima que apoya en gran medida la economía del país. Según dicho organismo, su valor es de aproximadamente 137 millones de dólares, en donde la mitad es mexicana y el resto se importa de países como Chile, España, Estados Unidos y Alemania. En el país existen cerca de 3350 hectáreas destinadas al cultivo de uva para la producción de vino, destacando las que se encuentran en Baja California, Zacatecas, Coahuila y Querétaro, al producir aproximadamente 27 mil toneladas de uva en cada ciclo agrícola⁹.

El consumo per cápita de vino en México se ha incrementado, ya que en 2003 se consumían aproximadamente 200 mL por persona al año, cifra que aumentó a 340 mL; y para 2007 alcanzó los 500 mL. El mercado nacional del vino empieza por jóvenes de 23 a 35 años que antes no consumían, pero que debido a la difusión de los beneficios del vino para la salud comienzan a beberlo con más frecuencia⁹.

2.3 Definición de Vino

El vino es la bebida que se obtiene de la fermentación alcohólica de la uva, la cual se produce por la acción de levaduras que transforman los azúcares del fruto en alcohol etílico y dióxido de carbono. Se conoce como vino, solamente al líquido que resulta de la fermentación alcohólica, total o parcial, del zumo de uvas¹¹.

Debido al bajo consumo de vino en México, no se cuenta con una amplia normatividad como es el caso de la Unión Europea¹⁰.

En México existe la norma NMX-V-012-1986 Bebidas Alcohólicas. Vinos. Especificaciones, la cual define al vino como la bebida resultante, exclusivamente, de la fermentación alcohólica o parcial de mostos de uva en contacto o no de sus orujos¹². En dicha norma, los vinos se clasifican en tres calidades; vino, vino de mosto concentrado y vino de uva pasa y que a su vez podrán ser:

- **Tipo I. Vino blanco.** Es el producto de la vinificación de los mostos de uvas blancas o de mostos blancos de uvas tintas.
- **Tipo II. Vino tinto.** Es el producto de la vinificación de los mostos o de uvas tintas, con maceración más o menos prolongada de sus orujos, o de la vinificación de mostos de uvas cuyo jugo es tinto.
- **Tipo III. Vino rosado.** Es el producto de la vinificación de los mostos de uvas rosadas o de uvas tintas con maceración parcial de sus orujos¹².

2.4 Tipos de Vino

Vinos Tintos

Son elaborados mayoritariamente a partir de uvas tintas, debido a que el color se encuentra en el hollejo, normalmente la fermentación se debe realizar con el mosto y el hollejo¹³. El vino tinto se puede envejecer, y en función del tiempo que pase en barrica ó botella, se clasifica en:

- Joven o Cosecha: entre cero y seis meses en barrica de madera.
- Crianza: dos años de vejez, de los cuales al menos seis meses en madera.
- Reserva: tres años de vejez, de los cuales al menos uno en madera.
- Gran Reserva: cinco años de vejez, de los cuales al menos dos en madera.

Vinos blancos

Se pueden elaborar con uvas blancas o tintas, con uvas tintas se debe separa el mosto del hollejo inmediatamente, para que no le de color, no es frecuente añejarlo.

Vinos Rosados

Son vinos elaborados con uvas tintas en los que se permite cierta maceración de la uva antes del prensado del mosto, de esta forma toma algo de color.

Vinos espumosos

Contiene dióxido de carbono originado por una segunda fermentación alcohólica en un envase cerrado. La calidad de estos vinos depende del tipo de envase en el que se realice la segunda fermentación. Según este criterio, se distinguen tres clases de vinos espumosos:

Cava champan. Obtenido a partir de una segunda fermentación en botella.

El Charmat o Granvas. Con este método se hace la segunda fermentación del vino en grandes tanques; cuando ya está gasificado se embotella. Aunque es más económico y sencillo que el anterior, el resultado final es óptimo.

El Gasificado. Se inyecta el gas directamente en el vino, de manera industrial. Las burbujas obtenidas son más gruesas y menos integradas que en los dos procesos anteriores¹⁴.

2.5 Beneficios del consumo de vino a la salud

El vino es una bebida que contiene más de mil sustancias, la mayoría de las cuales vienen de las uvas. El consumo de vino, en especial del tinto, puede presentar potenciales efectos benéficos para la salud. El vino es rico en antioxidantes, especialmente en compuestos polifenólicos; se ha demostrado que son bioactivos, no nutrientes, que se encuentran de forma natural y en concentraciones muy bajas en el vino entre 1060 y 1080 mg/L, procedentes de las uvas de origen¹.

Debido a que contiene alcohol etílico, el vino ha pasado por circunstancias difíciles (sobre todo a principios del siglo XX), cuando numerosas organizaciones trataron de evitar su consumo denunciando los efectos negativos que conlleva el abuso del alcohol. Sin embargo, a partir de la década de los noventa, se comenzó a dar a conocer los beneficios del vino en la salud del ser humano; sin dejar de mencionar el daño que puede causar beber en exceso⁹.

Con el paso del tiempo, se ha comprobado científicamente, e incluso organizaciones de salud en el mundo han confirmado que entre las bebidas existentes en el mundo, el consumo de vino es muy saludable. Lo anterior debido al bajo contenido de alcohol etílico y de sus muchos componentes nutritivos; además es una bebida digestiva, que ayuda a relajar, antidepresiva y antiséptica⁹.

Entre los beneficios de consumir vino tinto están que ayuda a reducir el colesterol perjudicial en las arterias, por lo cual pueden prevenirse males cardiovasculares, su alto contenido de antioxidantes retarda el envejecimiento, además, uno de sus compuestos (resveratrol) previene el desarrollo de

enfermedades cancerígenas y ayuda a neutralizar manifestaciones negativas de células malignas ya desarrolladas, por otro lado, el alcohol que contiene licua la sangre y ayuda a reducir la grasa en el cuerpo^{11, 12}.

2.5.1 Importancia enológica de los polifenoles

La relevancia enológica de los polifenoles de la uva está dada por su incidencia en las propiedades químicas y en las características sensoriales de los vinos. Extraídos durante la vinificación, son los compuestos que determinan el color, astringencia y amargor de los vinos, incidiendo también en otros aspectos relacionados con su sabor y aroma. Participan en múltiples reacciones, que determinan profundos cambios en la composición y propiedades de los vinos durante su conservación y eventual crianza¹⁴.

Los polifenoles pueden considerarse como flavonoides o no flavonoides según su estructura química. Entre los flavonoides se encuentran los polifenoles de mayor importancia enológica, tanto cualitativa como cuantitativa, este grupo incluye a los antocianos, flavonoles, catequinas y proantocianidinas¹⁵.

Los estilbenos son compuestos que están presentes exclusivamente en los hollejos de las uvas, en concentraciones muy variables en función de la especie de *Vitis*, la variedad de uva y los factores ambientales. De los más estudiados se encuentra el trans-resveratrol.

Las concentraciones de los ácidos fenólicos de la uva son bajas. Los ácidos cinámicos se localizan en las vacuolas de las células de los hollejos y la pulpa.

Los factores climáticos, como temperatura, luminosidad y disponibilidad hídrica, afectan significativamente la síntesis de antocianos, por lo que sus contenidos en las uvas de un mismo viñedo pueden ser muy diferentes. La evolución de los distintos polifenoles de la uva durante la maduración es diversa^{15,16}.

2.6 Composición Química del Vino

El vino es una solución hidroalcohólica que contiene varias sustancias que forman el extracto y dan sabor y otras tantas sustancias volátiles que constituyen el

aroma¹⁵. Contiene un 75 a 90% de agua y etanol en un rango de 9 a 14%, que puede llegar hasta un 21%¹⁶.

Es difícil de precisar el número de constituyentes del vino sin embargo, las técnicas analíticas actuales han permitido poner en evidencia compuestos en concentraciones de trazas, generalmente volátiles, que participan en el aroma del vino.

El aroma básico del vino está constituido por cuatro ésteres: acetato de etilo, isoamil acetato, etil caproato y etil caprilato; dos alcoholes: isobutílico e isoamílico y un aldehído: acetaldehído; los demás componentes lo modifican^{16, 17}. Los ésteres se forman durante la fermentación, otros provienen de la uva y otros del añejamiento¹⁵. Entre los azúcares que se pueden encontrar en el vino son principalmente glucosa y fructosa, y en menor proporción galactosa, manosa, celobiosa, rafinosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, ribosa^{6, 17}. También se encuentran diferentes ácidos orgánicos: tartárico, málico, cítrico, succínico y en menor cantidad el ácido láctico, fórmico, acético, propanoico, butanoico^{16, 17}.

Por otro lado los polifenoles del vino varían desde compuestos relativamente sencillos producidos por las vides, hasta sustancias sumamente complejas formadas durante el envejecimiento. Proviene básicamente de las partes sólidas de la uva, y en menor medida de la pulpa, siendo su aportación diferente según procedan de hollejos ó pepitas, ya que la composición polifenólica del vino varía según el tiempo de contacto de cada una de estas partes con el mosto¹⁸ por lo tanto, su concentración depende del tipo de vinificación: en los vinos blancos, la piel de la uva se quita y no entra en contacto con el mosto; en los tintos, el mosto y piel permanecen en contacto durante la maceración debido, a esto, los vinos tintos contienen una mayor concentración de polifenoles.

2.6.1 Compuestos Volátiles en los vinos

El aroma del vino está formado por varios compuestos volátiles de diversa naturaleza química. Se han caracterizado alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, e hidrocarburos, todos a concentraciones muy bajas y con umbrales de detección que van desde 10^{-4} a 10^{-12} g/L. La concentración de estas sustancias en el vino

depende de factores relacionados con el cultivo de la uva como el clima, el suelo, el riego y el momento de la vendimia; así como de las variables del proceso de fermentación, pH, temperatura, nutrientes, microflora y de las operaciones que integran la elaboración del vino¹⁵.

El aroma de los vinos está compuesto por unas 800 sustancias de las cuales solo 50 contribuyen decididamente al aroma; éstas pueden clasificarse en la categoría “aroma base” formado por aromas que están en todos los vinos en concentraciones apreciables¹⁸.

Los constituyentes del aroma del vino han sido clasificados según su origen:

- Los constituyentes varietales que provienen de la uva, que dependen esencialmente de la variedad.
- Los constituyentes pre-fermentativos, formados durante las etapas que van desde la cosecha hasta el principio de la fermentación; son esencialmente compuestos de 6 átomos de carbono, debidos a la acción de enzimas de la uva sobre ciertos lípidos.
- Los constituyentes fermentativos, formados por la levadura durante la fermentación alcohólica y por las bacterias lácticas en el caso de que la fermentación maloláctica sea realizada. Los constituyentes fermentativos del aroma son de hecho los productos secundarios del metabolismo de la levadura, implicando los nutrientes no específicos del medio que provienen de la uva. Cuantitativamente, estos son más abundantes y son responsables de la nota vinosa común en todos los vinos.
- Los constituyentes post-fermentativos incluyen todos los compuestos volátiles que se forman durante la conservación del vino¹⁷.

2.6.2 Polifenoles en los Vinos

Los compuestos fenólicos están presentes en la vid al igual que en el resto de los vegetales, están representados por centenares de compuestos de diversa estructura química pero que tienen en común un núcleo bencénico que lleva asociados uno o varios grupos hidroxilo¹⁹, a estos compuestos se les llama

polifenoles, los cuales le confieren el sabor amargo al vino, el amargor está acompañado de la astringencia, sensación táctil de aspereza y rugosidad además, son el origen del color de los vinos tintos e influyen en la calidad de los mismos¹⁹.

Los polifenoles son importantes para la fisiología de las plantas porque contribuyen a la resistencia de microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad por su continua exposición a estresantes ambientales, incluyendo radiaciones ultravioletas y relativamente altas temperaturas²⁰. Su importancia en enología es muy significativa, ya que entre estas sustancias se encuentran las responsables en mayor medida del color de las uvas (particularmente de la tintas), jugando un importante papel en la evolución de los vinos con el envejecimiento¹⁸.

El contenido total de los polifenoles en alimentos y bebidas se correlaciona muy fuertemente con su actividad antioxidante²⁰. Recientemente los polifenoles del vino han llamado la atención debido a su poder antioxidante el cual ayuda a explicar el efecto benéfico contra enfermedades coronarias. Una ventaja importante del vino como matriz de polifenoles es que estos compuestos son solubles y biodisponibles en el vino, mientras que los componentes fenólicos de los productos alimenticios vegetales son poliméricos e insolubles lo que causa que no estén disponibles para su absorción²¹.

En la Tabla 1 se muestran estudios realizados previos a este trabajo sobre la determinación de polifenoles en vinos tintos de otros países, en ella se observan los métodos de extracción, separación, identificación y cuantificación utilizados, así como un breve resumen de la preparación de la muestra, los resultados obtenidos, el tipo de vino analizado y su país de origen.

Esta tabla se utilizó como referencia para comparar los resultados obtenidos en este estudio con los publicados en la bibliografía.

Tabla 1. Estudios previos de la determinación de polifenoles en vinos tintos

Extracción	Concentración mg/L			Detección	Preparación de muestra	Cuantificación	Muestras de Vino; Referencia
	Ácido trans-cinámico	Ácido cafeico	trans-resveratrol				
SPE Cartuchos C-18		Cabernet S. 0.44 Merlot: 0.52	Cabernet S. 0.37 Merlot: 0.55	CG-EM Modo: SIM	Se diluye el vino 1:1 Elución con acetato de etilo. Derivatización: BSTFA/piridina	Adición patrón 3 conc.	Vinos Canada; Anal. Chem. 1997, 69, 4405-4409.
Extracción continúa líquido-líquido por 16hr.	0.065 0.196 0.374 0.271	12.474 1.577 5.638 3.981	0.827 0.623 0.471 1.443	CG-EM Modo: SIM	100 mL de vino, pH=2, extracción con acetato de etilo (100mL). Derivatización: 50µL BSTFA	Curva de calibración	Vinos tintos, Italia; J. Chromatogr. A. 1114 (2006) 263-268.
MSPD Fase sólida dispersante 1.5g silica gel 70-230	0.02 0.01 0.02 0.03 0.02 0.05	0.24 4.10 1.27 2.79 3.59 2.23	0.02 0.76 1.36 0.77 0.52 1.46	CG-EM Modo SIM	1 mL de vino 20% NaCl pH = 1 5mL acetato de etilo Derivatización: 1mL de piridina, 100µL BSTFA, 50µL de E.I (antraquinona)	Estándar interno (antraquinona)	Vinos tintos, Italia, J. Chromatogr. A 1185 (2008) 23-30
SPE Cartuchos C18			0.949 0.668 1.300 1.800 0.140 0.137 1.810 0.680	CG-EM	Dilución del vino 1:1 Derivatización: 50µL BSTFA	Adiciones patrón	Vinos tintos, España; Analytica Chemica Acta 673 (2010) 47-53.

Extracción	Concentración mg/L			Detección	Preparación de la muestra	Cuantificación	Muestras de vino; Referencia
	Ácido trans-cinámico	Ácido cafeico	trans-resveratrol				
SPE Cartuchos C18			0.44 0.52 0.93	CG-EM	Elución: acetato de etilo. 50 µL BSTFA	Curva de calibración externa	Vinos tintos, China; Analytical Chemica Acta (2000) 19-25.
MEFS Fibra PA			0.36 0.42 0.54 0.714	CG-EM Modo: SIM	Sin dilución ID 30 min Derivatización HS BSTFA 20 min. Desorción: 7 min. 280°C.	Curva de calibración externa	Vinos tintos, China; Analytical Chemica Acta (2000) 19-25
MEFS Fibra PA			Merlot (1) 0.95	CG-EM	Extracción ID 10 min Derivatización HS, 10µL BSTFA durante 15 min.	Curva de calibración externa 0.02 mg/L a 2.0 mg/L	Vinos tintos, Australia; Chromatographia Supplement Vol. 57, 2003.
			Shiraz Cabernet 0.68				
			Merlot (2) 0.29				
			Shiraz 0.18				
			Cabernet S. 0.10				
Extracción líquido-líquido		Cabernet S. 5.7	Cabernet S. 2.2490	CG-EM	Derivatización con 50 µL BSTFA a 70°C durante 15 min.	Curva de calibración externa	Vinos tintos, California; J. Agric. Food Chem; Vol.42, 4, 1995.
		Merlot 6.0	Merlot 1.651				
		Zinfandel 5.7	Zinfandel 0.608				
		Petit S. 8.2	Petit S. 0.338				
		Pinot Noir 4.7	Pinot Noir 0.977				

Extracción	Concentración mg/L			Detección	Preparación de la muestra	Cuantificación	Muestras de vino; Referencia
	Ácido trans-cinámico	Ácido cafeíco	trans-resveratrol				
SBSE PDMS			ND	HPLC- FLD	Extracción: 40°C durante 30min. 5 mL de vino+5mL de carbonato de potasio 5% (m/v)+0.5g NaCL+0.5mL de anhídrido acético. Desorción en un micro-inserto en HPLC	Adición patrón 5 y 20 ng/L	Vinos tintos, España; Analytica Chemica Acta 611 (2008) 119-125.
MEFS CW/TPR			Región Rioja 2.51		ID a 40°C durante 30 min. 7 mL de vino + 1mL de buffer ácido acético/acetato pH=6, 0.7g de NaCl y se afora con agua hasta un volumen de 14 mL Desorción 10 min.	Adición patrón 20 y 60 ng/L	
			Regió Rioja 0.442				
			Rejión Jumilla 2.21				
			Región Yecla 1.23				
			Región Bullas 1.08				

2.6.2.1 Clasificación de los Polifenoles

Los compuestos polifenólicos se dividen en flavonoides y no flavonoides. En los polifenoles no flavonoides se encuentran las familias de los ácidos fenólicos y de los estilbenos, a su vez los ácidos fenólicos se dividen en ácidos cinámicos y benzoicos. En los polifenoles flavonoides encontramos a los flavonoles, las antocianas y los taninos, en la Figura 3 se presenta la clasificación²².

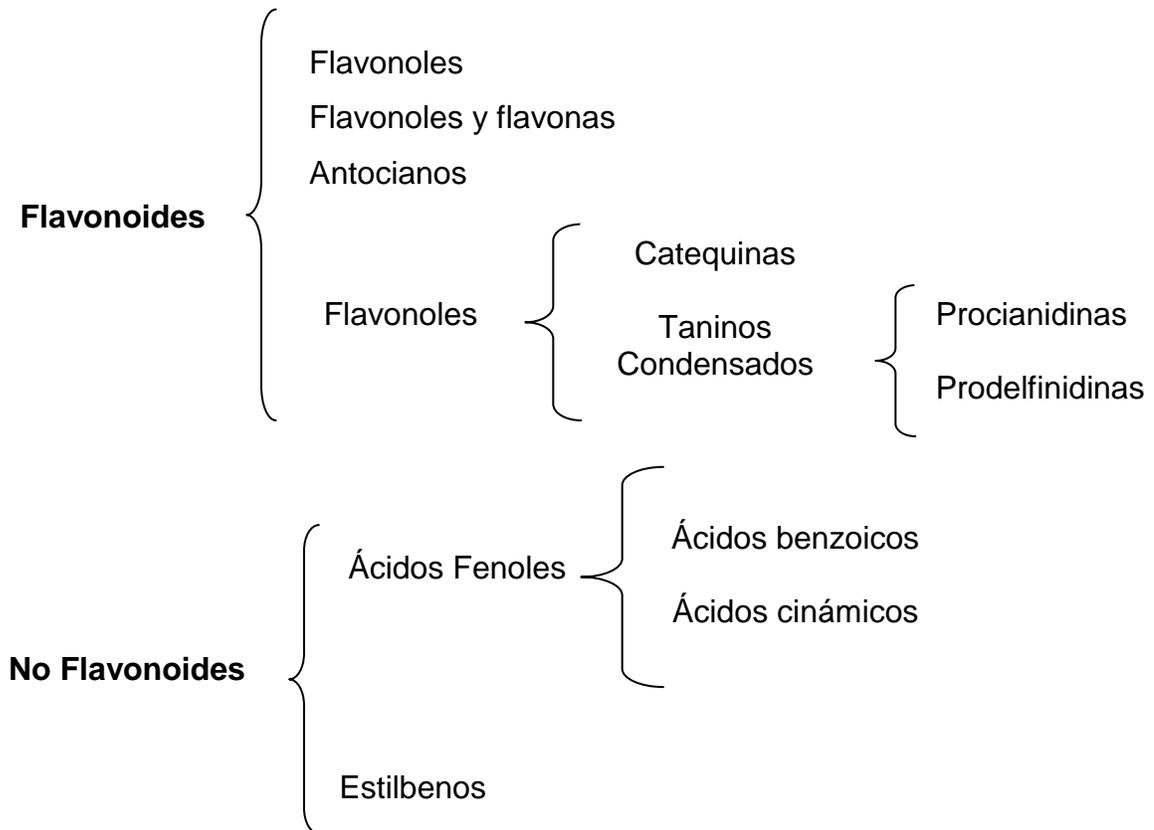


Figura 3. Clasificación de los polifenoles²².

2.6.2.2 Polifenoles no flavonoides

Entre los polifenoles no flavonoides se incluyen los ácidos fenoles, divididos en benzoicos y cinámicos, y otros derivados fenólicos como los estilbenos. Los ácidos fenoles son moléculas derivadas del ácido benzoico o cinámico respectivamente que pueden aparecer en el vino en forma libre o esterificada, especialmente con el ácido tartárico (ésteres hidroxicinámicos). Se encuentran

localizados principalmente en el hollejo y en la pulpa. Bajo la acción de algunos microorganismos pueden transformarse en fenoles volátiles, que presentan olores muy característicos y a veces defectuosos¹⁹.

- **Ácidos benzoicos.** Se consideran derivados del ácido p-hidroxibenzoicos. En la Figura 4 se muestra la estructura química general para los ácidos benzoicos y en la Tabla 2 los sustituyentes correspondientes para cada ácido benzoico¹⁸.

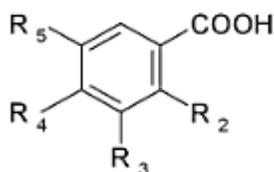


Figura 4 Estructura de los ácidos benzoicos.

Tabla 2. Sustituyentes de los ácidos benzoicos

Nombre del ácido benzoico	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
p-hidroxibenzoico	H	H	OH	H
Protocatéquico	H	OH	OH	H
Vanílico	H	OCH ₃	OH	H
Gálico	H	OH	OH	OH
Siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Salicílico	OH	H	H	H
Gentísico	OH	H	H	OH

- **Ácidos cinámicos:** Se caracterizan por poseer una estructura C₆-C₃. La estructura química general de los ácidos cinámicos se observan en la Figura 5 y en la Tabla 3 se observan los sustituyentes correspondientes para cada ácido cinámico¹⁸.

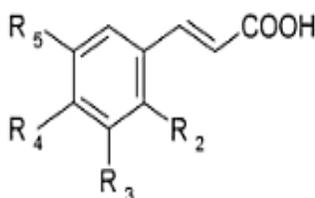


Figura 5. Estructura química de los ácidos cinámicos.

Tabla 3. Ácidos cinámicos

Nombre del ácido cinámico	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
p-cumárico	H	H	OH	H
Cafeíco	H	OH	OH	H
Ferúlico	H	OCH ₃	OH	H
Sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

- **Estilbenos:** Forman un grupo de compuestos relacionados con mecanismos de defensa de la baya que no presentan importancia desde el punto de vista del color de los vinos. Se localizan en el hollejo. Entre ellos destaca el trans-resveratrol al cual se le atribuye un notable poder antioxidante¹⁹, las concentraciones de resveratrol encontradas oscilan para vinos tintos entre 0.001 y 10 mg/L, en vinos rosados entre 0.05 y 1.2 mg/L y en vinos blancos desde trazas a 0.190 mg/L. En la Figura 6 se muestra la estructura química del trans-resveratrol.

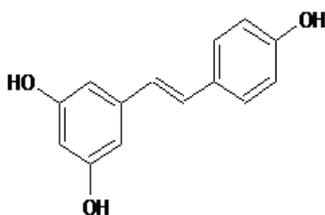


Figura 6. trans-resveratrol.

2.6.2.3 Polifenoles flavonoides

Los flavonoides son derivados fenólicos sintetizados en cantidades substanciales por las plantas. Son derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados de la 2 fenil benzo y pirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo pirano. Estos compuestos poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres²² (Figura 7).

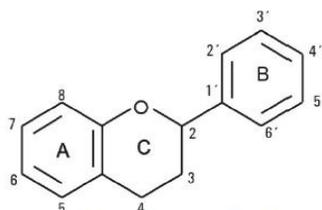


Figura 7. Estructura básica de los flavonoides.

2.7 Métodos de Extracción

2.7.1 Métodos de Extracción de compuestos volátiles y polifenoles en el vino

La búsqueda de técnicas de extracción adecuadas que permitan la identificación de compuestos volátiles del vino ha atraído la atención de muchos científicos. Estas metodologías se basan principalmente en su solubilidad en disolventes orgánicos (extracción líquido-líquido), en su volatilidad (técnicas en espacio de cabeza estáticas y dinámicas) ó en base a su capacidad de sorción/adsorción en fase polimérica (extracción en fase sólida: SPE, microextracción en fase sólida: MEFS, extracción con barra magnética: SBSE). Además, los compuestos volátiles pueden ser extraídos por métodos basados en combinaciones de algunas de estas propiedades (microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza HS-MEFS)²³.

El interés por estudiar el vino nació después de una investigación de la Organización Mundial de la Salud: el proyecto Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease (MONICA) en 1989. Se comprobó que Francia presentaba cifras de mortalidad por cardiopatía coronaria muy bajas, comparado con Estados Unidos o Gran Bretaña, a pesar de tener un consumo muy elevado de grasas saturadas y cifras altas de colesterol sérico. A este fenómeno se le conoce como la “paradoja francesa” y se le atribuye al consumo elevado de vino en este país y por lo tanto mayor consumo de polifenoles.

Debido a la gran importancia de los polifenoles, los métodos analíticos para su determinación rápida, viable y precisa en vinos son cada vez más necesarios²⁴. Los polifenoles son generalmente determinados por cromatografía líquida (HPLC) utilizando diferentes sistemas de detección. Muy pocos estudios basados en la cromatografía de gases se han propuesto debido a que estos compuestos no son volátiles y una etapa de derivatización química es necesaria para obtener derivados volátiles y termoestables. Sin embargo, el uso de CG acoplado a espectrometría de masas proporciona ventajas importantes debido a la combinación de las capacidades de separación de CG y el poder de EM como un método de identificación y confirmación. Los enfoques convencionales para el

tratamiento de la muestra son tediosos, requieren mucho tiempo y se necesitan grandes volúmenes de muestra y disolventes orgánicos, lo que implica la contaminación ambiental, riesgos para la salud humana y costes adicionales para el tratamiento de residuos. Debido a la importancia del desarrollo de procedimientos de limpieza química, métodos emergentes para matrices de alimentos se basan en procedimientos libres de disolvente como la microextracción en fase sólida que es una técnica selectiva, rápida, eficaz, sencilla y libre de solventes²⁵.

2.8 Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

La MEFS ha sido introducida en la química analítica como una técnica alternativa de preparación de muestra libre de disolventes y bastante más rápida y simple que los métodos convencionales, puesto que los pasos de extracción y concentración en la preparación de la muestra quedan simplificados en un solo paso. Las primeras aplicaciones de la técnica fueron publicadas en 1989 por Belardi y Pawliszyn. La MEFS se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura. La fibra está instalada sobre un soporte, obteniéndose un sistema con cierta semejanza a una jeringa modificada²⁶ (Figura 8).

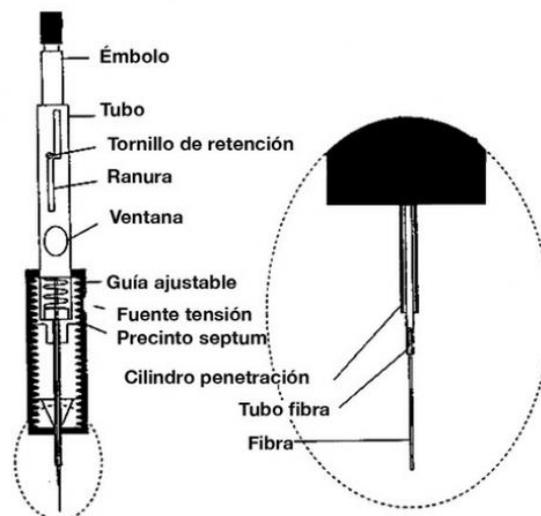


Figura 8. Dispositivos de la MEFS/Supelco.

2.8.1 Modos de extracción para la MEFS

Existen tres tipos básicos de extracción. Extracción directa (MEFS-ID), Headspace (MEFS-HS) y la Extracción Protegida con Membrana (MEFS-EPM). En el modo MEFS-ID la fibra es sumergida directamente en la muestra y los analitos son directamente transportados de la matriz de la muestra hacia la fase de extracción. En el modo MEFS-HS la fase se expone a la fase vapor o espacio de cabeza que existe sobre la muestra, este modo se utiliza para la extracción de compuestos volátiles y semivolátiles. En el modo MEFS-EPM la fibra se protege utilizando una membrana que le sirve como barrera, se utiliza en muestras con muchas interferencias en donde los compuestos tienen baja volatilidad para ser analizados por MEFS-HS²⁶ (Figura 9).

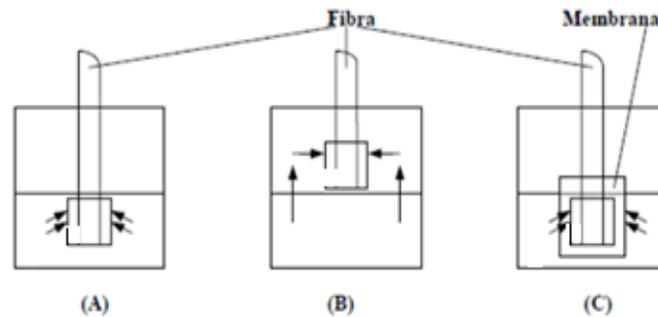


Figura 9. Modos de la MEFS: (A) inmersión directa, (B) espacio de cabeza, (C) con membrana de protección.

La selección del modo de extracción debe hacerse considerando tres aspectos importantes: la matriz de la muestra, la volatilidad del analito y su afinidad por la matriz^{26,27} (Tabla 4).

Tabla 4. Criterios de selección del modo de extracción²⁶

Modo MEFS	Propiedades analito	Matrices
Inmersión directa	De media a baja volatilidad	Muestras gaseosas, líquidas (preferentemente simples)
Espacio de cabeza	De alta a media volatilidad	Líquidas (incluyendo complejas), sólidas
Membrana protectora	Baja volatilidad	Muestras complejas

2.8.2 Optimización de la MEFS

La MEFS requiere de la optimización de una serie de variables relacionadas con la extracción y la desorción de los analitos en la fibra.

2.8.2.1 Extracción

Algunas de las variables que afectan la extracción son: el tipo de fibra, el tiempo de extracción, la adición de sal, el pH, la temperatura, los efectos de matriz y la agitación²⁶.

Agitación de la muestra. La agitación de la muestra, incrementa la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra a la fibra o al espacio de cabeza por lo que disminuye el tiempo requerido para llegar al equilibrio^{26, 27}.

Tiempo de extracción. Se debe determinar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio que es característico de cada analito-fibra. El tiempo de equilibrio es aquél a partir del cual la cantidad de analito extraída se mantiene constante. Sin embargo, para algunos compuestos el tiempo necesario para llegar al equilibrio es muy elevado por lo que se opta por trabajar en condiciones de no equilibrio^{26, 27}.

Temperatura de extracción. Los coeficientes de difusión de los analitos de la muestra aumentan al incrementar la temperatura, por lo que aumenta la cantidad de analito extraída^{26, 27}.

Adición de sales. La presencia de sales (generalmente NaCl) en la muestra aumenta el coeficiente de distribución de analitos que están presentes en forma no ionizada por lo que la cantidad de analito extraída generalmente aumenta. Sin embargo, si los analitos están en su forma ionizada, se observa una disminución de la eficacia de la extracción²⁷.

pH. Se ajusta el pH a fin de obtener el soluto total o parcialmente en forma no iónica que conduce a la eficacia de la extracción²⁷.

2.8.2.2 Desorción de los analitos

Los parámetros que afectan la etapa de desorción dependen del tipo de desorción utilizada (térmica o por disolvente orgánico). Si se realiza térmicamente en un

cromatógrafo de gases, los parámetros a optimizar son la temperatura y el tiempo de desorción. La temperatura se recomienda fijarla a la máxima temperatura de uso de la fibra recomendada por el fabricante y el tiempo deber ser el adecuado para que la desorción de los analitos de la fibra sea completa²⁶.

2.8.3 Tipos de fibras disponibles para la MEFS

Existen varios tipos de fibra disponibles comercialmente, con diferentes polaridades y espesores de la fase estacionaria, estas son: polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB), carboxen/polidivinilbenceno (CAR/DVB), Divinilbenceno/carboxen/PDMS (DVB/CAR/PDMS) y polietilenglicol (PEG)²⁸. En la Tabla 5 se muestran los tipos de fibras con los diferentes espesores con los que se comercializan.

Tabla 5. Tipos de fibra para la MEFS actualmente comercializadas²⁸

Tipo de Fibra	Espesor (µm)
PDMS	7, 30, 100
PA	85
PDMS/DVB	60, 65
DVB/CAR/PDMS	50, 30
PEG	60

2.8.4 Derivatización

La derivatización es un proceso químico para modificar la estructura química de algunos compuestos y generar nuevos productos con mejores propiedades cromatográficas. Varias son las razones para realizar un paso de derivatización ya que, mejora la estabilidad térmica de algunos compuestos básicamente, compuestos que contengan grupos polares. La derivatización con un reactivo selectivo mejora la detectabilidad en las muestras de matriz compleja y la derivatización con reactivos quirales mejora la separación de los picos²⁹.

Un resumen de las diferentes técnicas de derivatización que se pueden implementar junto con la MEFS se muestra en la Figura 10. En la técnica directa, el agente derivatizante, se adiciona primero al vial que contiene la muestra, los

derivados son entonces extraídos por la fibra y después se introduce en el instrumento analítico. La derivatización sobre la fibra se realiza después de la extracción, la fibra conteniendo los analitos se expone al espacio de cabeza del vial en el que se encuentra el derivatizante. Por otro lado, la derivatización en el puerto de inyección, tiene lugar en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases los analitos y el reactivo derivatizante, presentes en la fibra, se someten a altas temperaturas durante la etapa de desorción²⁶.

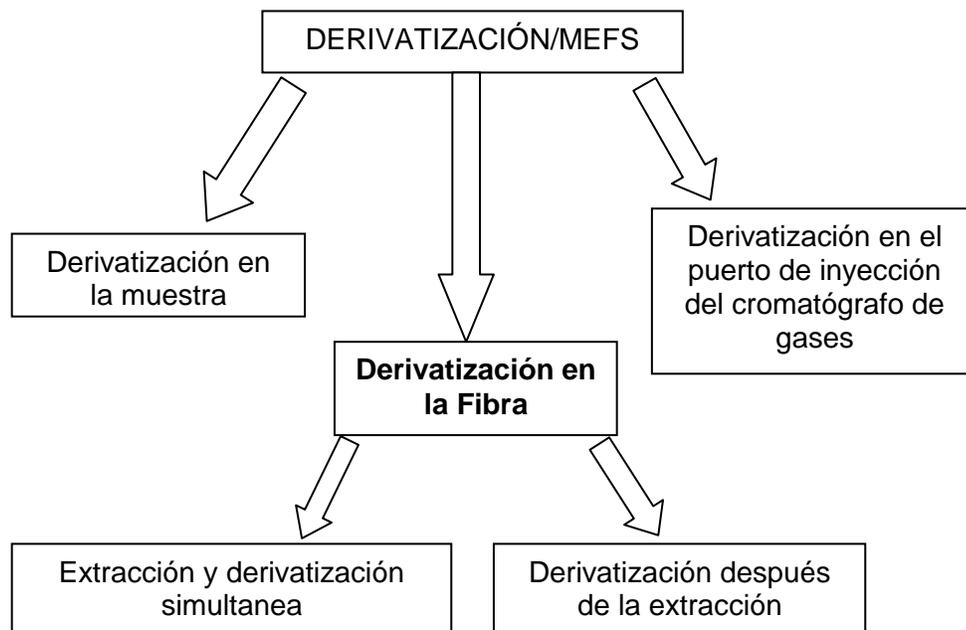


Figura 10. Técnicas de derivatización con MEFS.

2.9 Extracción por sorción con barras magnéticas (SBSE)

La extracción por sorción con barra magnética (SBSE, por sus siglas en inglés), es un método de preparación que consta de una barra magnética recubierta con un polímero donde los analitos o compuestos de interés se distribuyen mediante equilibrios de sorción. La SBSE es una técnica de preparación de muestra miniaturizada, la cual es una evolución de la microextracción en fase sólida (MEFS) ya que, ambas tienen el mismo principio, la diferencia que se tiene es el volumen de la fase polimérica para cada técnica por ejemplo, el volumen de PDMS que tiene la fibra es de 0.5 μL mientras que la barra de extracción tiene de 25-100 μL de PDMS³⁰.

Estas barras de extracción tienen 1 o 2 cm de longitud y están recubiertas con 0.5 o 1 mm de una capa polimérica; existen dos tipos disponibles comercialmente una recubierta de polidimetilsiloxano (PDMS) para compuestos no polares y otra de Etilenglicol-Silicon (EG-Silicone) para analitos de polaridad media a polaridad alta, comercialmente se denominan Twister™, (Figura 11).



Figura 11. Barras de Extracción (a) Barra recubierta de PDMS y (b) Barra recubierta de EG-Silicon.

2.9.1 Extracción y desorción de la SBSE

Los analitos son extraídos introduciendo directamente la barra en la muestra o bien en el espacio de cabeza de la misma (Figura 12), la extracción puede llegar al equilibrio bajo ciertas condiciones establecidas durante la agitación. A continuación la barra de extracción es retirada de la muestra, enjuagada con agua destilada, secada con un pañuelo y los compuestos extraídos por la barra son desorbidos térmicamente o bien mediante un disolvente orgánico^{30, 31}.

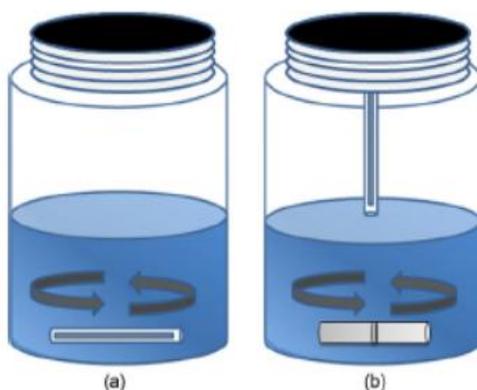


Figura 12. Extracción con SBSE: (a) modo inmersión y (b) headspace³⁰.

La desorción térmica evita el uso de disolventes orgánicos, se realiza a temperaturas entre 150-300 °C, y puede durar hasta 15 min, requiere un sistema de desorción térmica (TDU; por sus siglas en ingles, Figura 13) que se acopla al sistema de inyección del cromatógrafo de gases³⁰, este sistema consta básicamente de la combinación de dos inyectores de Vaporización de Temperatura Programable (PTV; por sus siglas en ingles) conectados en serie. El primero de los PTV consta de un tubo de vidrio en el que se introduce la barra de extracción para llevar a cabo la desorción térmica. Los analitos desorbidos son arrastrados al segundo PTV, este se mantiene a temperaturas muy bajas (del orden de -150 °C) para que los compuestos que son desorbidos en el primer PTV queden retenidos en el segundo. Una vez completada la desorción de todos los analitos en el primer PTV se procede a aumentar la temperatura del segundo PTV de manera que los analitos son introducidos en la columna de separación por el flujo del gas portador^{30, 31}.



Figura 13. Unidad de Desorción Térmica (TDU) para la SBSE/GERSTEL.

En la desorción líquida la barra está inmersa en un disolvente o mezcla de disolventes orgánicos para la desorción química del analito extraído. El volumen mínimo del disolvente de desorción utilizado debe garantizar la completa inmersión de la barra para lograr desorber los analitos completamente³⁰.

2.9.2 Factores que afectan a la SBSE

Al igual que en la MEFS, en esta técnica se deben optimizar los parámetros que afectan tanto la extracción como la desorción de los analitos en estudio.

Los parámetros que afectan la extracción por sorción con barras de extracción son: el tiempo de extracción, pH, adición de NaCl, adición de modificador orgánico, velocidad de agitación, temperatura de extracción y algunos parámetros menores como la dilución de la muestra³⁰, estos parámetros ya han sido detallados en el inciso 1.8.2.1.

Para la desorción, los parámetros a optimizar dependen de la desorción que se utilice. Para la desorción térmica, la temperatura de desorción es la variable mas estudiada, en cuanto a la desorción líquida, la naturaleza del disolvente de extracción, el tiempo de desorción y el volumen de desorción son los parámetros más estudiados. Con el fin de minimizar el tiempo de análisis se optimiza la agitación ó la temperatura³⁰.

2.10 Cromatografía de Gases (CG)

La cromatografía es un método físico de separación, en el cual los componentes a separar de una mezcla están distribuidos entre dos fases una estacionaria y una fase móvil. Los métodos cromatográficos se clasifican de acuerdo a su fase móvil, en cromatografía de gases la fase móvil es un gas³².

La cromatografía de gases utiliza un gas acarreador como fase móvil junto con una fase estacionaria en el interior de una columna empacada ó capilar³², los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia de su reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria líquida o sólida mantenida en la columna cromatográfica. A diferencia de muchos otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, sino que su única función

es transportar el analito a lo largo de la columna³³. Se usa un gas de arrastre de gran pureza, químicamente inerte como nitrógeno, dióxido de carbono, helio o argón. Los gases de mayor densidad producen separaciones más lentas, pero más eficientes, mientras los de menor densidad producen separaciones más rápidas aunque no tan bien definidas³³.

Existen dos tipos de cromatografía de gases, la Cromatografía de Gas-Líquido (CGL) y la Cromatografía de Gas-Sólido (CGS). En la CGL, la fase estacionaria es un líquido que recubre la pared interior de una columna, se basa en el reparto del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmobilizada sobre un sólido inerte o en las paredes de un tubo capilar. En CGS el analito se absorbe directamente sobre las partículas sólidas de la fase estacionaria, esta variante ha tenido aplicación limitada debido a la retención semipermanente de moléculas activas o polares y a que los picos de elución suelen presentar grandes colas³³.

2.10.1 Instrumentación para CG

La CG se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases, éste consta de diversos componentes como el sistema del gas acarreador, el sistema de inyección, sistema de separación, sistema de detección y el sistema de registro, en la Figura 14 se observa el esquema de un cromatógrafo de gases.

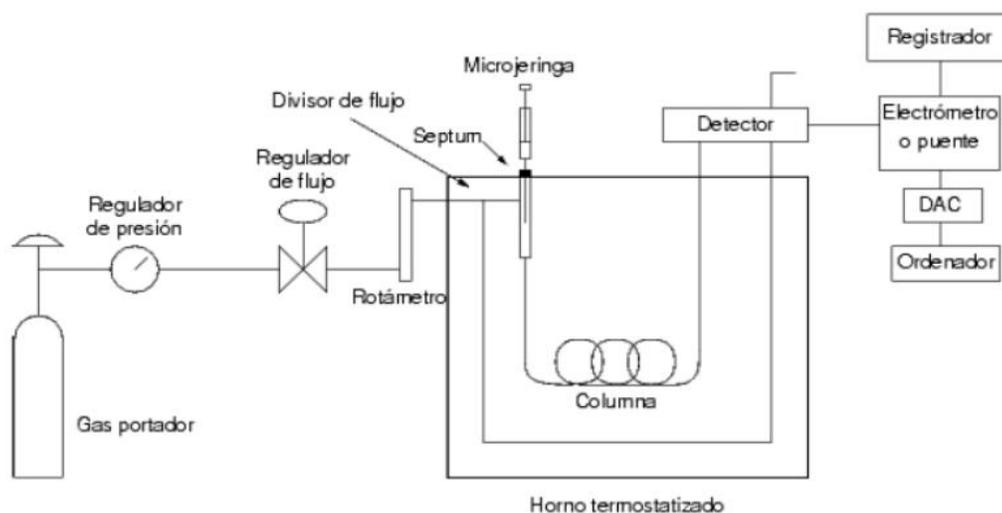


Figura 14. Esquema de un Cromatógrafo de Gases simple.

El suministro del gas acarreador se regula para mantener una presión constante del gas en todo el cromatógrafo, independientemente de las variaciones de presión en el cilindro de suministro³².

En CG, los líquidos se inyectan mediante una jeringa, a través de un disco (septo) de goma, en un inyector caliente para a) facilitar la evaporación rápida de las muestras líquidas y b) para permitir el equilibrio térmico del gas de arrastre, la columna y el analito antes de que comience la separación además, contiene un vidrio de tubo silanizado en el cual los productos de descomposición y los componentes no volátiles de la muestra se van acumulando por lo que se debe reemplazar periódicamente. El gas acarreador arrastra la muestra vaporizada desde el inyector a la columna en donde los analitos son separados y llegan al detector cuya respuesta aparece en la pantalla de un registrador^{32, 34}.

La columna debe estar suficientemente caliente a fin de que los analitos alcancen una presión de vapor suficiente para que eluyan en un tiempo razonable.

El detector se mantiene a una temperatura más alta que la columna, de forma que los analitos se encuentran en forma gaseosa³⁴.

2.11 Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas (CG-EM)

La Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas se ha convertido en una de las herramientas más poderosas para el análisis de mezclas orgánicas y bioquímicas complejas al alcance de los químicos. La ventaja de esta técnica se debe a la forma en la que se complementan ambas técnicas; la Cromatografía de Gases, se basa en la separación de los componentes de una muestra de acuerdo a las interacciones entre la muestra y la fase estacionaria en la columna, la Espectrometría de Masas se emplea para conocer la composición elemental de la muestra, que eluye de la columna³³.

El equipo de CG-EM consta de un Cromatógrafo de Gases (CG) con un inyector, una columna capilar, acoplado a un Espectrómetro de Masas que contiene una cámara de ionización y un analizador másico. El efluente que sale de la columna del CG es ionizado y fragmentado por un bombardeo de electrones en la cámara de ionización (70 eV), los iones son acelerados y dirigidos hacia el

analizador másico, en donde el analizador permite separar a los fragmentos según su relación masa/carga (m/z)³³. El espectro de masas obtenido es generalmente característico del analito. El perfil de iones en un espectro de masas resulta de la fragmentación de una molécula la cual la caracteriza y la diferencia de otras moléculas y de otros compuestos^{33, 34}.

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas CG-EM da lugar a una técnica combinada la cual permite la separación e identificación de mezclas complejas. Usualmente se emplea Espectrometría de Masas para la confirmación de la identidad o estructura de las señales cromatográficas^{32, 34}.

3 Desarrollo Experimental

3.1 Materiales

- Barras magnéticas de 10x3 mm
- Viales de 11 mL con tapón horadado de polipropileno y septas de PTFE (politetrafluoroetileno)
- Soporte para fibras de MEFS (Supelco, USA)
- Pipetas volumétricas de 5 mL
- Parrilla con agitación magnética marca MIRAK Thermolyne
- Soporte universal
- Pinzas de tres dedos
- Balanza analítica Sartorius modelo CP124S
- Viales de vidrio color ámbar de 4 mL con tapón horadado
- Fibras de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB) 65 μm , Poliacrilato (PA) 85 μm , Polietilenglicol (PEG) 60 μm , Carbowax/divinilbenceno (CW/DVB), Supelco, U.S.A.
- Pipetas volumétricas de 5 mL
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Jeringas Hamilton de vidrio de 25 μL , 50 μL , 100 μL y 250 μL
- Matraces aforados Pyrex de 2 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL
- Viales de reacción con tapón
- Barra EG-Silicon Twister™, Gerstel GmbH, Müllheim a/d Ruhr, Alemania de 10 mm de largo recubierta con 32 μL de copolímero (podidimetilsiloxano y etilenglicol) en una rejilla de metal para la estabilización mecánica.
- Espátula de níquel-cromo
- Potenciómetro OAKTON pH 510 series

3.2 Reactivos y Estándares

Alcohol etílico desnaturalizado (99.5% de pureza), HCl 37.2%, cloruro de sodio 99.9%, hidróxido de sodio 98.7% de pureza todos de J. T. Baker, México. Agua nanopure sometida a filtración en un sistema purificador y desionizador de agua Nanopure (Barnstead Thermolyne, modelo 04747), acetona Q. P. pureza 99% Química Alvi.

Ácido trans-cinámico $\geq 99\%$, ácido cafeico $\geq 98\%$ HPLC y trans-resveratrol $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, U.S.A). Como agente derivatizante se utilizó N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) de Sigma Aldrich, U.S.A.

Las disoluciones estándar de cada polifenol se prepararon pesando por separado aproximadamente 5 mg de cada compuesto, se disolvieron y aforaron con etanol a un volumen final de 5 mL obteniendo disoluciones concentradas de aproximadamente 1000 ppm. Se almacenaron a 4 °C, en viales de vidrio ámbar con tapón de rosca y sellados con teflón, para su uso posterior.

3.3 Condiciones Cromatográficas

Cromatógrafo de Gases con inyector split/splitless (HP5890) acoplado a un Detector Selectivo de Masas (HP5971) con una columna capilar de sílice fundida, 5% fenil 95% polidimetilsiloxano (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) Zebron Phenomenex, ZB-5. He como gas acarreador a flujo constante de 1 mL/min. Temperatura del inyector fue de 250 °C modo "splitless" (1 min). La temperatura de la línea de transferencia 280 °C. Programa de Temperatura: Temperatura inicial 40 °C durante 1 min, aumentándose a 10 °C/min hasta 300 °C manteniéndose durante 10 min.

Los análisis se realizaron por impacto electrónico a 70 eV; se utilizó el modo de barrido total del espectro (SCAN; por sus siglas en ingles) para la identificación de iones.

3.4 Muestras de Vino utilizadas

Las muestras de vino tinto utilizadas para la realización de este trabajo se observan en la Tabla 6, en la cual se indican las características de los vinos.

Tabla 6. Características de las muestras de vino utilizadas

Características	L.A. Cetto	XA Domecq	Monte Viña	Las Moras	Casa Madero
Variedad de uva	Cabernet Sauvignon	Cabernet Sauvignon	Cabernet Sauvignon 60% - Merlot 40%	Cabernet Sauvignon	Cabernet Sauvignon
Casa productora	L. A. Cetto México	Pedro Domecq	Casa Madero	Finca Las Moras	Casa Madero
Zona de producción	Colinas del valle de Guadalupe, Baja California, México.	Valle de Guadalupe, Ensenada, Baja California, México.	Valle de Parras, Coahuila, México.	Valle de Pedernal, San Juan, Argentina.	Valle de Parras, Coahuila, México.
Grado alcohólico (v/v)	13.5 %	13.7 %	13.5 %	13.5 %	13.5 %
Maduración	En botella, 18 meses	En barrica de roble americano, 6 meses	Sin madurar	Contacto sutil con madera	En barrica de 7 a 12 meses

3.5 Identificación de compuestos volátiles en vinos por MEFS

El procedimiento para la determinación de compuestos volátiles que se utilizó no se optimizó debido a que en estudios previos en bebidas alcohólicas ya se había optimizado, por lo que el siguiente procedimiento se aplicó al análisis de dos vinos tintos Mexicanos.

A un vial de vidrio con tapón horadado y septum de teflón con capacidad de 11 mL se transfirieron 5 mL de vino (L.A. Cetto y XA Domecq) y se colocó una barra magnética de 10x3 mm. Una vez sujeto el vial con pinzas a un soporte universal, se introdujo la fibra PDMS/DVB en modo headspace y se extrajo durante 60 min a temperatura ambiente y con agitación a 1200 rpm (Figura 15). Para mejorar la extracción se añadió a los 5 mL de vino 1.8 g de NaCl. Terminada la extracción se retrajo la fibra y se colocó en el inyector del CG-EM durante 10 min para la desorción. El análisis de las muestras se realizó por triplicado.

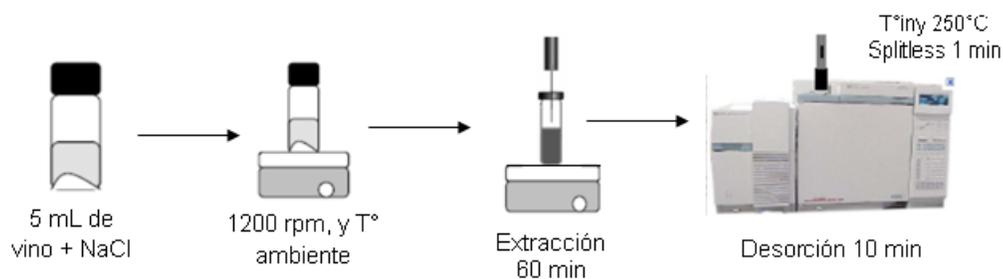


Figura 15. Procedimiento para la extracción, preconcentración e identificación de compuestos volátiles en vinos por MEFS.

Previo al análisis, la fibra fue acondicionada de acuerdo a las especificaciones del proveedor y un blanco de fibra se realizó antes de cada extracción exponiendo la fibra en el inyector del CG-EM durante 10 min.

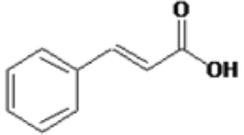
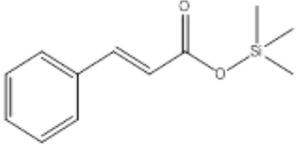
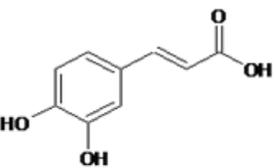
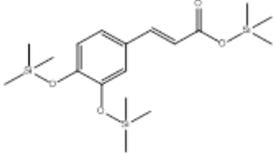
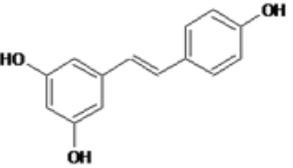
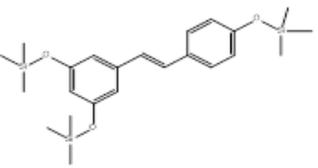
Los compuestos fueron identificados de acuerdo a los espectros de masas obtenidos y comparados con los de la base de datos de la biblioteca de espectros de masas del NIST (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NH Mass Spectra Library versión 2.0 build 19 Nov 2011).

3.6 Identificación de Polifenoles

Se llevó a cabo la identificación de polifenoles mediante la inyección en disolución de los estándares en etanol previamente sometidos al siguiente proceso de derivatización:

Se prepararon disoluciones patrón de los analitos (100 ppm) en etanol, se transfirieron 50 μ L a un vial de reacción y se evaporó a sequedad bajo flujo de Nitrógeno, posteriormente se adicionaron 50 μ L de BSTFA, se selló con cinta teflón y se colocó en la estufa a 80 °C durante 30 min. Después de este tiempo, se inyectó 1 μ L de esta disolución en el CG-EM para obtener el cromatograma iónico total y el espectro de masas correspondiente. En la Tabla 7 se muestra la estructura química de los derivados de polifenoles así como su peso molecular y los iones fragmentos característicos.

Tabla 7. Polifenoles estudiados

Analito	Estructura	Derivado trimetil siliado (TMSD)	Iones fragmento (m/z)
Ácido trans-cinámico pKa = 4.4		 PM = 220 g/mol	131, 205, 220
Ácido cafeíco pKa = 4.6		 PM = 396 g/mol	73, 219, 396
trans-resveratrol pKa's = 9.3, 10.0, 10.6		 PM = 444 g/mol	73, 444

3.7 Determinación de Polifenoles (ácido trans-cinámico, ácido cafeíco y trans-resveratrol) en vinos por MEFS

3.7.1 Selección de la fibra para la MEFS

Se estudiaron las fibras de PDMS/DVB (65 μm), PA (85 μm), PEG (60 μm) y CW/DVB (70 μm) las cuales se acondicionaron según las especificaciones del fabricante (Tabla 8) antes de ser utilizadas por primera vez. Para evitar interferencias, después de cada análisis la fibra se acondicionó 10 min en el inyector.

Tabla 8 Características de las fibras utilizadas

Fibra	Espesor de la película (μm)	Acondicionamiento Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (h)	pH óptimo de trabajo
PDMS/DVB	65	250	0.5	2-10
PA	85	280	1	2-11
PEG	60	240	0.5	2-9
CW	70	220	0.5	2-9

Se estudiaron 4 diferentes tipos de fibra para evaluar la capacidad y eficiencia de extracción de los polifenoles. Debido a que la fibra de la MEFS es sensible a altas concentraciones de alcohol y se pretendía tener una matriz similar a la que se tendría en las muestras de vino. Se preparó una disolución de etanol al 2% fortificada con los estándares: ácido trans-cinámico, ácido cafeíco y trans-veratrol a 10 ppm.

De esta disolución se transfirieron 5 mL a un vial con capacidad de 11 mL se selló con cinta teflón y tapón horadado con septa, este sistema se puso en equilibrio durante 5 min con agitación constante a 1200 rpm y temperatura ambiente. Posteriormente se colocó la fibra a evaluar en modo de inmersión y se extrajo durante 15 min. Al cabo de este tiempo se retrajo la fibra y se transfirió a un vial color ámbar de 4 mL con 100 μL de BSTFA en modo *headspace* a temperatura ambiente durante 20 min para obtener los trimetil silil derivados. Posteriormente, la fibra se desorbió durante 10 min en el inyector del equipo CG-EM.

3.7.1.1 Extracción de estándares de polifenoles con fibra de PA

De acuerdo a los resultados de la selección de fibra, se seleccionó la fibra de PA al ser la que mejor extrae a los 3 polifenoles y la que más tiempo de vida útil mostró.

Para determinar el tiempo óptimo de extracción se realizaron pruebas a 15 y 30 min, utilizando la fibra de PA, seleccionando el tiempo de 30 min de extracción ya que es el tiempo en donde se obtuvo una mejor extracción a concentraciones más bajas de los polifenoles.

También se varió la concentración de los estándares y se fue disminuyendo desde 10 ppm hasta que los 3 polifenoles mostraran un pico de buen tamaño ya

que, el trans-resveratrol al ser muy afín a la fibra de PA se extraía demasiado saturando la fase polimérica y esto no permitía que el ácido cafeico y ácido trans-cinámico se extrajeran adecuadamente. Las concentraciones finales de los estándares de los polifenoles fueron: 2 ppm ácido trans-cinámico, 5 ppm ácido cafeico y 0.1 ppm trans-resveratrol.

3.7.2 MEFS en muestras de vino

Después de haber optimizado la extracción con los estándares, se aplicaron las mismas condiciones para la extracción de los polifenoles en las muestras de vino previamente diluidas al 2% de etanol (Figura 16).

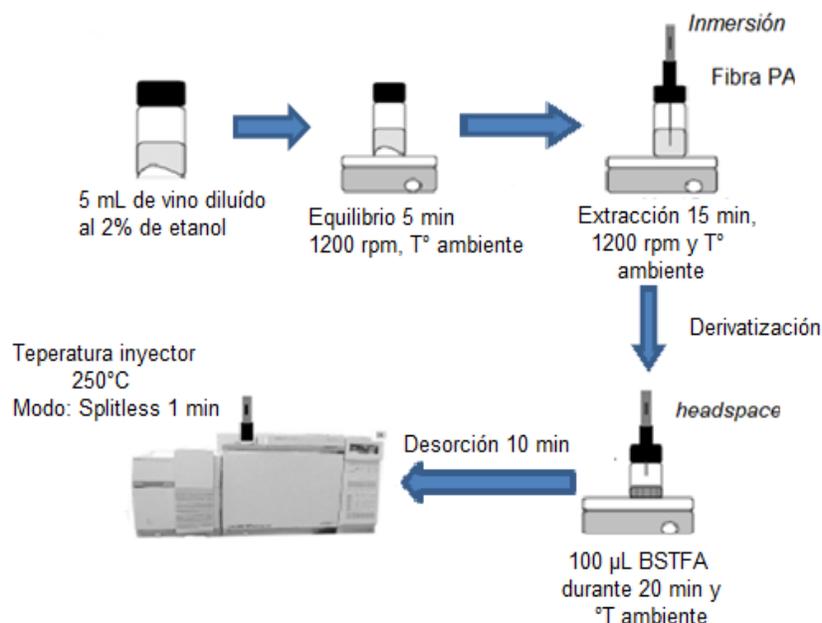


Figura. 16 Esquema analítico para la identificación de los polifenoles en vino por MEFS.

3.8 Determinación de Polifenoles (ácido trans-cinámico, ácido cafeico y trans-resveratrol) por SBSE

3.8.1 Identificación de los estándares de polifenoles por SBSE

Para la identificación de los polifenoles se prepararon 5 mL de una solución estándar en etanol al 2% con las siguientes concentraciones: ácido trans-cinámico 2 ppm, ácido cafeico 5 ppm y trans-resveratrol 0.5 ppm. La solución se transfirió a un vial de 11 mL y se colocó la barra de extracción EG-Silicone y se extrajo

durante 60 min a temperatura ambiente y con agitación constante de 600 rpm. Terminada la extracción, la barra fue retirada de la solución y se secó con un pañuelo limpio y sin pelusa. Posteriormente se colocó la barra de extracción en un vial de 4 mL con rosca y se adicionaron 500 μ L de acetona para realizar la desorción durante 20 min a 600 rpm y temperatura ambiente. Al terminar la desorción, se transfirieron los 500 μ L de acetona a un vial de reacción y se llevó a sequedad bajo flujo de nitrógeno. Para la derivatización se adicionaron 50 μ L de BSTFA, el vial se selló con cinta teflón y se colocó en la estufa a 80 °C durante 30 min, al terminar la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se inyectó 1 μ L al CG-EM.

Es importante mencionar que se varió el pH de las soluciones con el objetivo de lograr la extracción de los tres polifenoles de manera eficiente, para ello se utilizó HCl 0.01N. Los pH's 2.5, 4.0 y 4.5 fueron evaluados.

3.8.2 Optimización de los parámetros de SBSE para la extracción de polifenoles en vino tinto

Para lograr la máxima respuesta de la extracción utilizando SBSE en la determinación de los polifenoles en vinos, fue necesario optimizar algunos de los factores que influyen en la técnica, ya que la extracción con barra de extracción depende de la constante de partición del analito en la fase acuosa y la fase polimérica que está determinada por varios factores como el pH, adición de sal, tiempo de extracción y tiempo de desorción.

3.8.2.1 Optimización del porcentaje de etanol en las muestras de vino

Ya que el etanol actúa como modificador orgánico, se realizaron extracciones con la barra de extracción con vino diluido al 2% y al 6.8% de etanol, seleccionando la dilución del vino al 6.8% de etanol ya que se observó una respuesta mayor en la extracción. Las extracciones se realizaron por triplicado para cada porcentaje de etanol evaluado.

3.8.2.2 Optimización del pH del medio de extracción

Para la optimización en la extracción con barra de extracción se evaluaron cinco valores de pH: 2.5, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0, utilizando el vino tinto diluido al 6.8% de etanol. El pH se ajustó con soluciones de HCl 0.05N y NaOH 0.1N, según fuera necesario. Las extracciones a cada pH evaluado se realizaron por triplicado.

3.8.2.3 Optimización del tiempo de extracción

Para la optimización del tiempo de extracción se evaluaron tres tiempos: 15, 30 y 60 min, estas extracciones se realizaron con el pH y porcentaje de etanol previamente seleccionados y por triplicado cada una.

3.8.2.4 Optimización de la adición de sal

Una vez optimizado el pH, el porcentaje de etanol y el tiempo de extracción, se evaluó la adición de sal al 50% de NaCl y sin adición de sal.

Para realizar esta prueba, a los 5 mL de vino tinto diluido al 6.8% de etanol y pH = 4.0, se le adicionaron 0.90 g de NaCl (equivalente al 50% con respecto a la saturación en agua) y se realizó la extracción con barra de extracción con agitación a 600 rpm durante 60 min y el análisis se realizó por triplicado. Los resultados se compararon con respecto a lo obtenido en las extracciones realizadas sin adición de sal, pH = 4 y 60 min de extracción.

3.8.2.5 Optimización del tiempo de desorción

Se realizaron desorciones sucesivas de 10, 20 y 30 min a temperatura ambiente. Las extracciones se realizaron con los parámetros de pH, porcentaje de etanol, tiempo de extracción y adición de sal, previamente seleccionados. Cada tiempo de desorción evaluado se realizó por triplicado.

3.8.3 Análisis por SBSE en muestras de vino tinto

Las muestras de vino tinto se diluyeron al 50% por lo que el porcentaje de etanol quedó aproximadamente al 6.8% y se ajustó el pH con una solución de NaOH 0.1N hasta pH = 4.0, de esta dilución se tomaron 5 mL y se colocaron en un vial

con tapa de rosca de 11 mL en el cual se introdujo la barra de extracción EG-Silicone y se realizó la extracción durante 60 min con agitación constante de 600 rpm y temperatura ambiente.

Terminada la extracción, se retiró la barra de extracción de la muestra y se secó con la ayuda de un pañuelo limpio y sin pelusa. Posteriormente, se colocó la barra de extracción en un vial de 4 mL con rosca y se adicionaron 500 μ L de acetona para la desorción, la cual se realizó durante 20 min a 600 rpm y temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de desorción, con la ayuda de una pipeta pasteur se transfirió el disolvente de desorción a un vial de reacción de 2 mL y se llevó a sequedad bajo flujo de nitrógeno. Para realizar la derivatización se adicionaron 50 μ L de BSTFA, el vial de reacción se selló con cinta teflón y se colocó en una estufa a 80 °C durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de derivatización, se retiró el vial de la estufa de reacción dejando enfriar hasta temperatura ambiente y se inyectó 1 μ L en el CG-EM.

3.9 Cuantificación de polifenoles en muestras de vino tinto

Para determinar la concentración de polifenoles en las muestras de vino, se utilizó una disolución estándar con la que se calculó el Factor de Respuesta para cada analito (ecuación 1 y 2), para ello se realizó la extracción a una solución de etanol al 6.8% fortificada con ácido trans-cinámico (2 ppm), ácido cafeico (5 ppm) y trans-resveratrol (0.5 ppm), se ajustó el pH = 4.0 con una solución de HCl 0.05M. Posteriormente, el análisis se realizó por triplicado como se indica en el inciso 5.2.2.

La concentración se calculó obteniendo el Factor de Respuesta relacionando el promedio del área entre la concentración para cada estándar, como se muestra en la siguiente ecuación 1:

$$Fr = \frac{\text{área del estándar}}{\text{Concentración del estándar}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Una vez obtenido el Fr para cada polifenol, se despeja de la ecuación la concentración y se sustituye el área obtenida para cada polifenol en cada muestra de vino analizada, como se muestra en la ecuación 2:

$$\text{Conc. en muestra} = \frac{\text{área de cada polifenol en muestra}}{\text{Fr de cada polifenol}} \quad \text{Ecuación 2}$$

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación de compuestos volátiles en vino tinto

Se utilizó la fibra de PDMS/DVB que es una fibra de polaridad dual, la extracción se realizó por triplicado con y sin adición de NaCl.

En las dos muestras de vino estudiadas se identificaron los mismos compuestos volátiles (Tabla 9) y la adición de NaCl²⁶ mejoró la extracción ya que, la altura de los picos cromatográficos fue mayor. En las Figuras 17 y 18 se pueden observar los cromatogramas iónicos totales obtenidos para el vino L.A. Cetto y del vino X.A. Domecq y se señalan los compuestos que se extrajeron con la fibra PDMS-DVB.

Los resultados obtenidos eran de esperarse ya que los ésteres son cualitativamente los constituyentes más importantes en el aroma global del vino, éstos dan el típico aroma afrutado. Respecto a su origen, la mayoría de los ésteres proceden de las uvas, otro origen es el metabolismo secundario durante la fermentación alcohólica o bien se producen a lo largo del tiempo de almacenamiento, la causa de esta última es la esterificación de ácidos orgánicos con el alcohol^{3, 6}.

Los factores que más afectan al contenido de ésteres son todos aquellos relacionados con la uva (variedad, maduración, estado sanitario, etc.), condiciones de fermentación (temperatura, anaerobiosis, maceración), las cepas de levadura y la edad del vino⁶.

Tabla 9. Compuestos volátiles identificados en el vino L.A.Cetto y X.A Domecq

Compuesto	L.A. Cetto	XA Domecq
1) Etil éster del ácido hexanoíco (EEAH)	✓	✓
2) Fenil etil alcohol (FEA)	✓	✓
3) Dietil éster (DE)	✓	✓
4) Etil éster del ácido octanoíco (EEAO)	✓	✓
5) Etil éster del ácido decanoíco (EEAD)	✓	✓

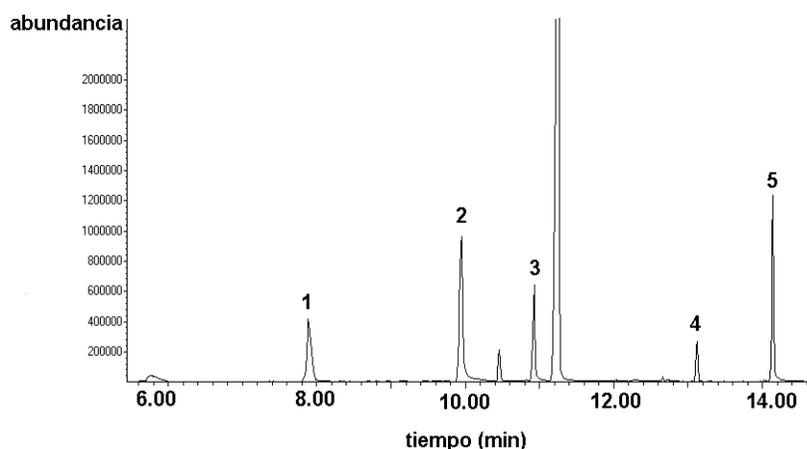


Figura 17. Cromatograma iónico total del análisis por MEFS-CG-EM de vino tinto L.A. Cetto con adición de sal.

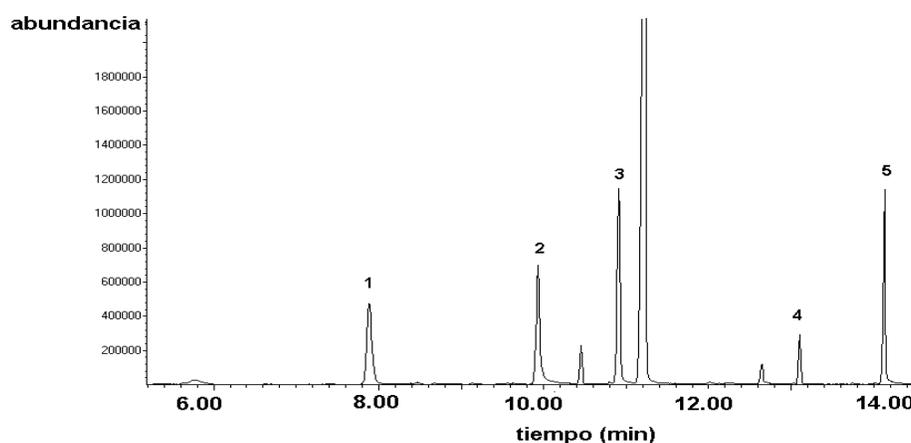


Figura 18. Cromatograma iónico total del análisis por MEFS-CG-EM de vino tinto X.A. Domecq con adición de sal.

En la Figura 19, podemos observar que no existe diferencia entre los vinos analizados en cuanto a la abundancia y cantidad de los compuestos volátiles que se identificaron, puede deberse a que estos vinos tintos provienen de la misma cepa de uva Cabernet Sauvignon además, existen compuestos volátiles que son característicos de los vinos tintos, estos compuestos siempre están presentes, a estos compuestos se les llama el aroma básico y la mayoría son ésteres y/o alcoholes^{3, 6}.

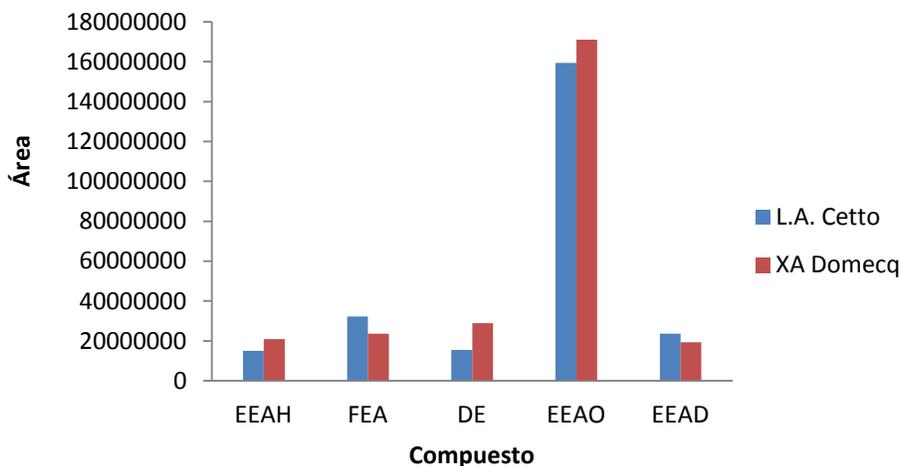


Figura 19. Compuestos volátiles de los vinos analizados por MEFS-HS-CG-EM con la fibra PDMS/DVB.

4.2 Identificación de polifenoles

Con el objetivo de obtener el cromatograma iónico total y el espectro de masas del derivado de cada uno de los polifenoles en estudio, se realizó la derivatización de los estándares en disolución y se inyectaron en el CG-EM. La Figura 20 presenta el cromatograma iónico total de la mezcla de los estándares de los polifenoles derivatizados mostrando una buena resolución y sin interferencias que puedan afectar la determinación.

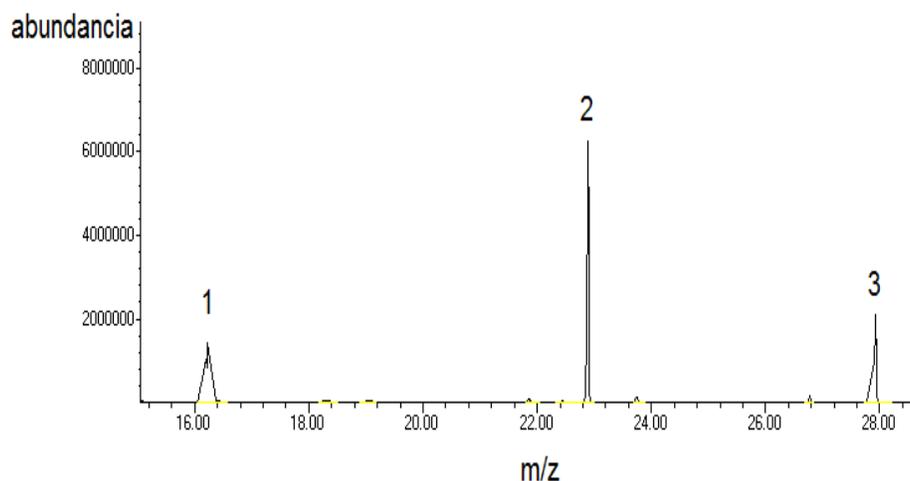


Figura 20 Cromatograma iónico total de la mezcla de estándares trimetilsililados (modo SCAN): 1) ácido trans-cinámico, 2) ácido cafeíco, 3) trans-resveratrol.

En la Figura 21 se muestra el espectro de masas del derivado del ácido trans-cinámico, observando el ion molecular a 220 m/z y el pico base a 205 m/z el cual corresponde a la pérdida de un metilo. También, se observa que la molécula no es muy estable ya que presenta un patrón de fragmentación amplio.

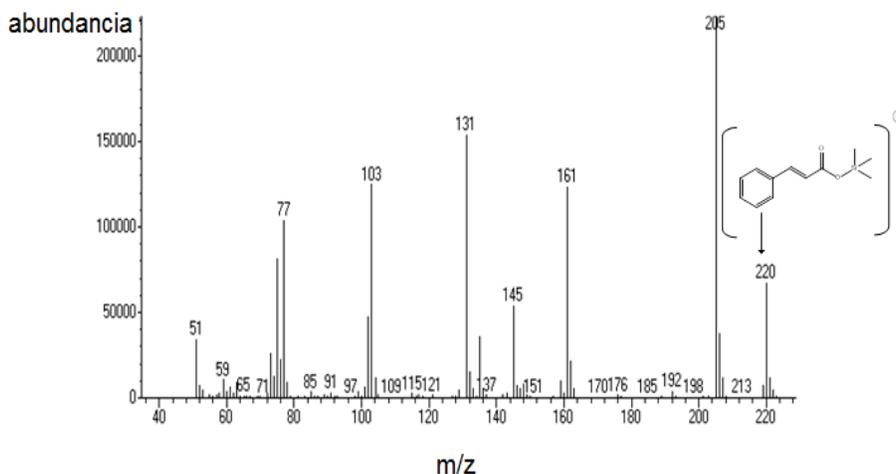


Figura 21 Espectro de masas del ácido trans-cinámico.

Los espectros de masas del ácido cafeíco y del trans-resveratrol, se muestran en las Figuras 22 y 23 respectivamente.

El ión molecular del ácido cafeíco se encuentra a 396 m/z, el pico base a 219 m/z y el pico a 73 m/z representa al grupo trimetil silil. Se observa que es más estable en comparación con el ácido trans-cinámico.

Por otro lado en el espectro de masas del trans-resveratrol solo se observa el ión molecular a 444 m/z y a 73 m/z se observa el pico que representa al grupo trimetil silil. La poca fragmentación que presenta esta molécula, indica que es muy estable.

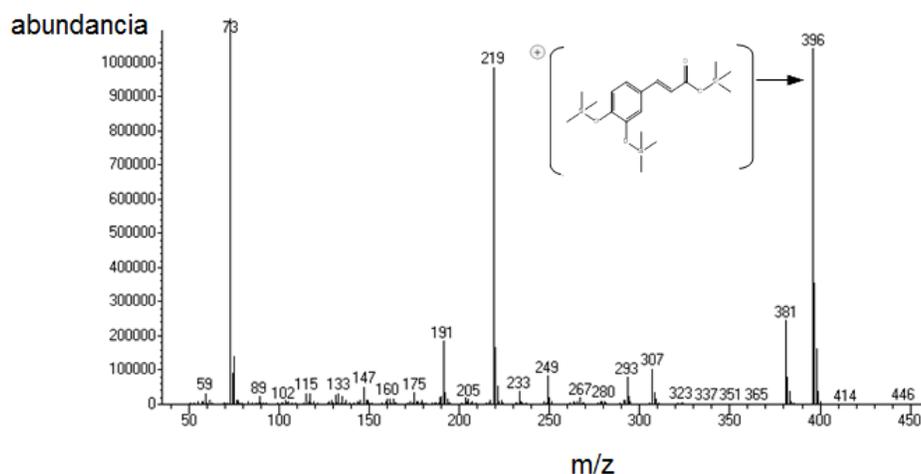


Figura 22 Espectro de masas del ácido cafeico.

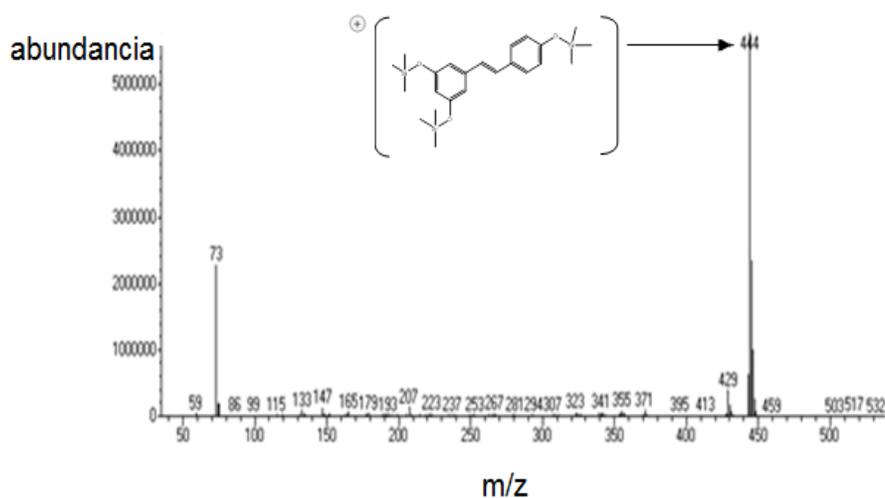


Figura 23 Espectro de masas del trans-resveratrol.

De los espectros de masas obtenidos de los derivados de los estándares de polifenoles, se obtuvieron los iones fragmento característicos (Tabla 7) para el análisis de las muestras por CG-EM, tanto para su identificación como para el análisis con Monitoreo Selectivo de Iones (SIM; por sus siglas en inglés).

4.2.1 Selección de la fibra para MEFS

En la Tabla 10 y en la Figura 24 se observa que la mejor fibra para extraer los polifenoles fue PA mostrando mejor afinidad por los mismos, ya que los tres

analitos se extraen en mayor concentración que con las otras fibras. Se observa que la fibra PA extrae los 3 analitos mientras que la fibra PDMS/DVB solo extrae 2 y con la fibra CW ningún analito es extraído. Al evaluar la fibra PEG, la fase polimérica se desprendió al estar extrayendo, por lo que está fibra se descartó inmediatamente.

Tabla 10. Extracción de los estándares con las diferentes fibras

Compuesto	C (ppm)	PDMS/DVB Área	PA Área	CW Área	PEG Área
Ácido trans-cinámico	10	8884377.5	2632145.5	NE	---
Ácido cafeíco	10	NE	1278997	NE	---
trans-resveratrol	10	672493	9554186	NE	---

*NE: No extraído; --- La fase polimérica se desprendió.

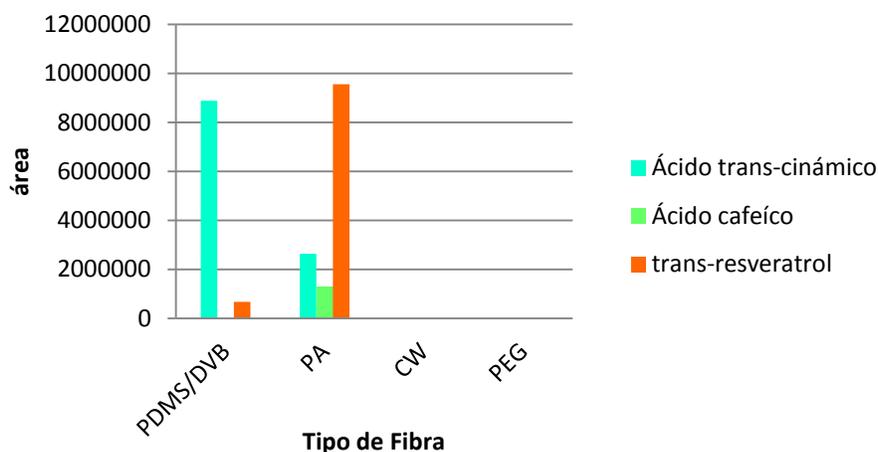


Figura 24. Extracción de los polifenoles (10 ppm) empleando diferentes fibras.

4.2.2 Extracción de los estándares de polifenoles con fibra de PA

Se evaluaron los tiempos de extracción de 15 y 30 min utilizando la fibra PA, seleccionada anteriormente y la concentración de los polifenoles se disminuyó a 5 ppm. Sin embargo, al bajar la concentración de 10 a 5 ppm se observó que sólo se extraía el trans-resveratrol en ambos tiempos de extracción probablemente debido

a que es muy afín a la fase polimérica de la fibra y se extraía demasiado saturando la fibra e impidiendo la extracción de los ácidos cafeíco y trans-cinámico por lo que se disminuyó la concentración del trans-resveratrol a 0.5 ppm y los ácidos cafeíco y trans-cinámico se mantuvieron a 5 ppm extrayéndose durante 15 min.

La Figura 25 muestra el cromatograma iónico total de los polifenoles, observándose que el pico del trans-resveratrol seguía teniendo mayor área con respecto a los ácidos cafeíco y trans-cinámico. Por lo anterior se decidió disminuir la concentración de los polifenoles y aumentar el tiempo de extracción para lograr extraerlos sin necesidad de modificar otros parámetros.

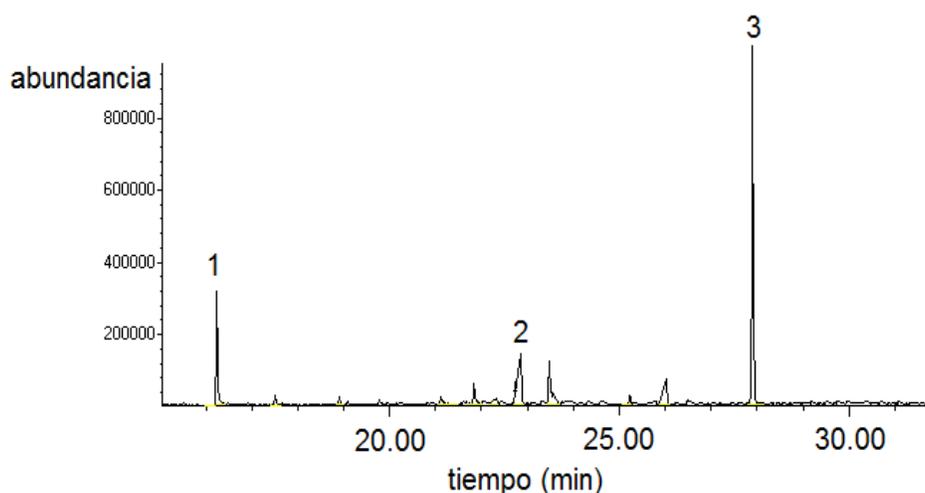


Figura 25. MEFS con fibra PA de los polifenoles: 1) ác. trans-cinámico, 2) ác. cafeíco y 3) trans-resveratrol.

Para mejorar la extracción, las concentraciones del trans-resveratrol se disminuyó a 0.1 ppm y la del ácido trans-cinámico a 2 ppm, la concentración del ácido cafeíco se mantuvo en 5 ppm, el tiempo de extracción se aumentó a 30 min. En la Figura 26 podemos observar que con estas condiciones se lograron extraer los tres polifenoles, por lo que de esta forma se pudo realizar otra extracción e inyectar en modo selectivo de iones (SIM) para hacer más sensible la detección.

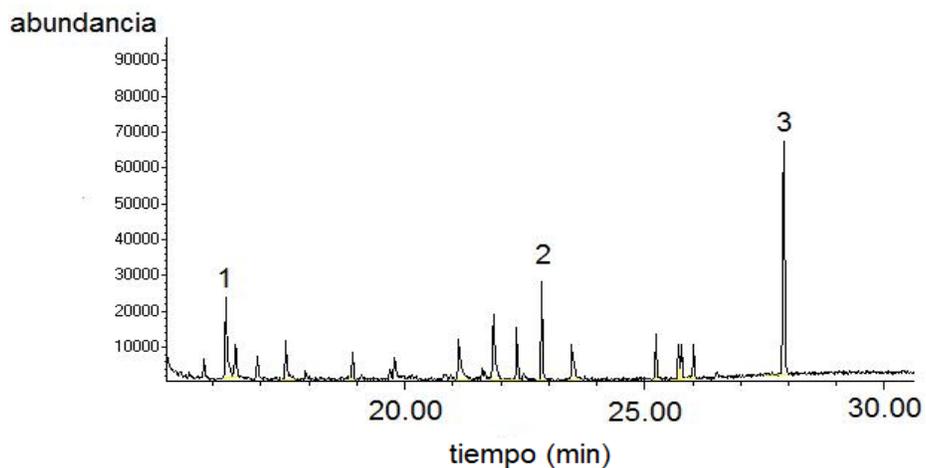


Figura 26. MEFS con fibra PA de los polifenoles 1) ác. trans-cinámico, 2) ác. cafeíco y 3) trans-resveratrol.

En la Figura 27 se muestra el cromatograma en modo SIM de los polifenoles observándose los picos cromatográficos bien definidos y de buen tamaño.

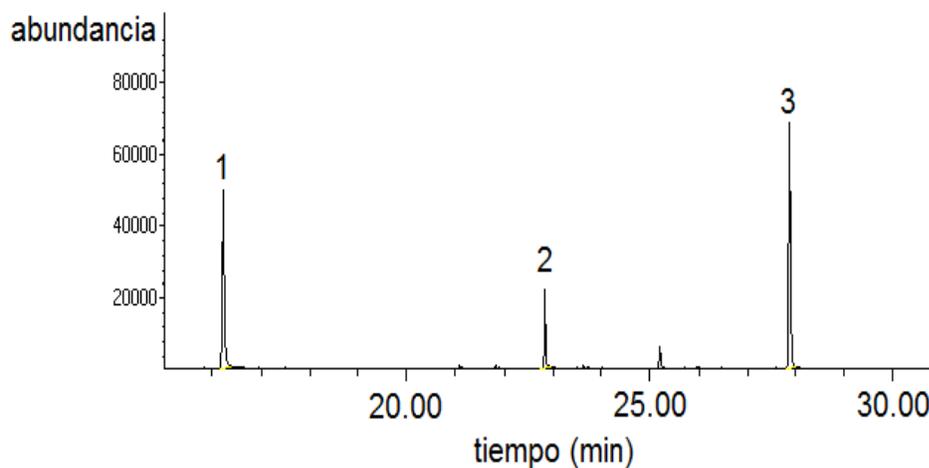


Figura 27 Cromatograma iónico total de la MEFS con fibra PA de la mezcla de estándares de polifenoles. 1) ác. trans-cinámico, 2) ác. cafeíco y 3) trans-resveratrol. Modo SIM.

4.2.3 Análisis de muestras de vino

En las condiciones seleccionadas anteriormente, se realizaron las extracciones en el vino Domecq diluido al 2% de etanol. Esta dilución tenía un pH = 4, a este pH los polifenoles se encuentran en su forma molecular, se extrajeron el ácido cafeíco y el trans-resveratrol. En la Figura 28 se muestra el cromatograma obtenido y se observa el ácido cafeíco en $t_r = 22.85$ min y el trans-resveratrol en 27.9 min. Sin embargo, no se logró tener reproducibilidad ya que la fibra dejó de extraer después de esta extracción en el vino, por lo que se tuvo que cambiar de fibra por una fibra nueva de PA, la primera fibra duró 17 extracciones.

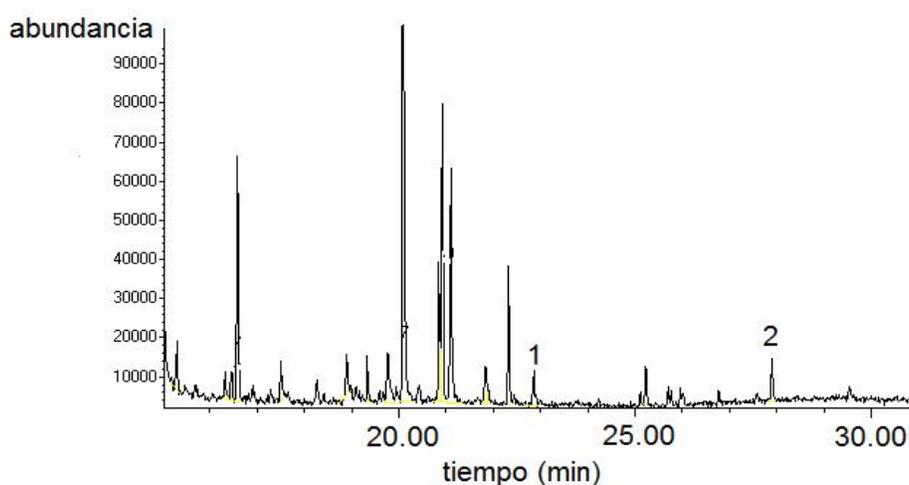


Figura 28. Extracción vino Domecq 2% etanol con fibra PA durante 30 min: 1) ác. cafeíco, 2) trans-resveratrol.

Al cambiar la fibra, se realizaron las extracciones en el vino Domecq bajo las mismas condiciones sin embargo, no se obtuvo el mismo resultado ya que, solo se extrajo el trans-resveratrol, presentando en la Figura 29 el cromatograma obtenido.

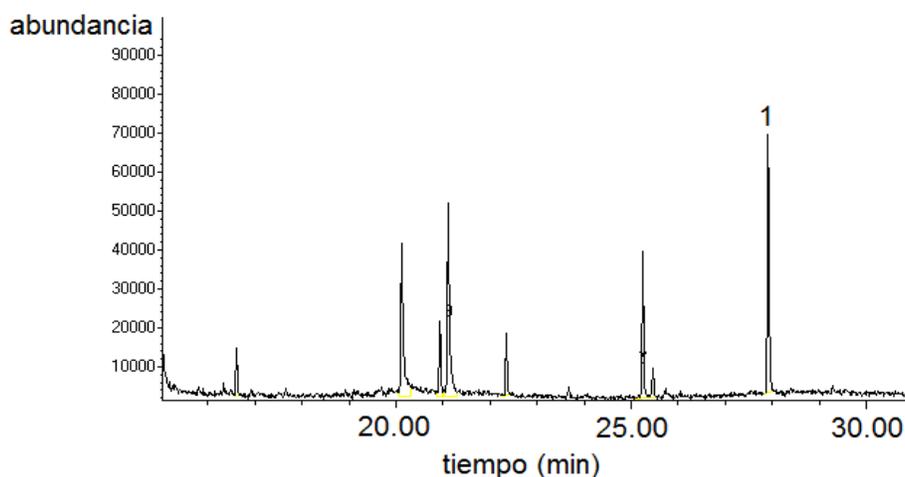


Figura 29. MEFS del vino Domecq al 2% etanol: 1) trans-resveratrol.

Al observar que el pico del trans-resveratrol tenía un tamaño grande se optó por disminuir el tiempo de extracción a 15 min ya que el trans-resveratrol saturaba la fibra y no se lograban extraer los otros polifenoles.

En la Figura 30 se observa que al disminuir el tiempo de extracción a 15 min, se extrajeron el ácido cafeico y el trans-resveratrol sin embargo, al realizar la repetición de la extracción, no se obtuvo el mismo resultado debido a que no se extrajeron los polifenoles. Esto pudo deberse a que la fibra se daña al momento de la extracción ya que, el vino no es una matriz sencilla y contiene muchos compuestos que pudieran estar dañando la fibra y/o saturándola de tal forma que no se pueden desorber y por lo tanto no permiten la extracción de los polifenoles, además el derivatizante BSTFA puede ser el factor principal de que la fibra se dañe debido a su reactividad, el polímero es silanizado y al no haber sitios de interacción disponibles la extracción no se efectúa.

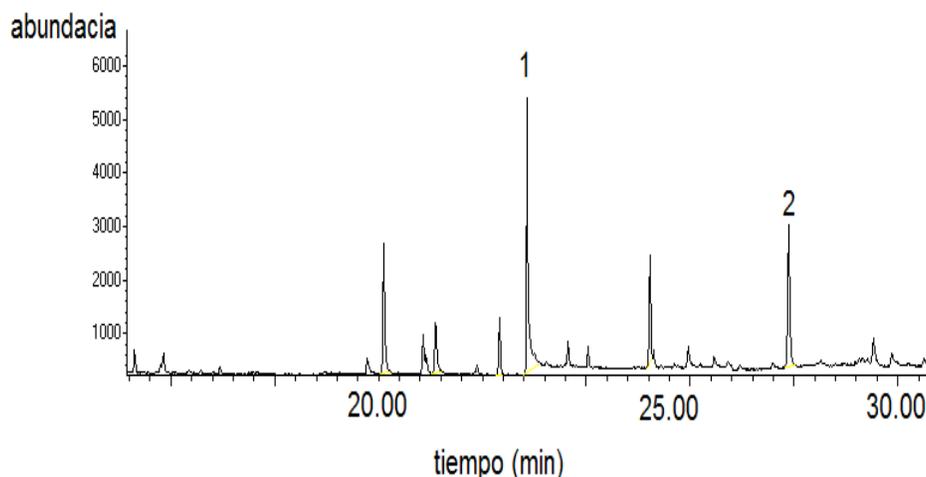


Figura 30 MEFS del vino Domecq al 2% etanol: 1) ác. cafeíco, 2) trans-resveratrol.

Al observar que no se obtenía reproducibilidad con esta técnica de extracción, que las fibras se dañaban y se gastaban recursos se realizó una revisión bibliográfica y con la ayuda de estudios realizados con anterioridad en el laboratorio se decidió dar por terminada la etapa experimental con MEFS y comenzar a desarrollar la metodología de extracción por sorción con barra magnética (SBSE; por sus siglas ingles) debido a que es una evolución de la MEFS basada en los mismos principios pero con la ventaja de que la SBSE contiene un mayor volumen de fase polimérica y que ésta se encuentra protegida por una rendija de metal inerte.

4.3 Determinación de Polifenoles por SBSE

4.3.1 Identificación de polifenoles por SBSE

Para la identificación de polifenoles, se utilizó una disolución estándar de ácido trans-cinámico 2 ppm, ácido cafeíco 5 ppm y trans-resveratrol 0.5 ppm al 2% de etanol. Las extracciones se realizaron con la barra de extracción. Al preparar la solución estándar de los polifenoles, se obtuvo un pH próximo a 7 lo cual indica una extracción óptima para el trans resveratrol y no del todo para el ácido cafeíco y ácido trans cinámico. Este fenómeno esta explicado por el pKa de cada compuesto por lo que se decidió variar el pH de la solución estándar, obteniéndose así diferentes respuestas dependiendo de la relativa proximidad

entre el pKa de cada polifenol y el pH del medio, es decir, se necesita tener los analitos en estado molecular y al mismo tiempo minimizar la fracción iónica para asegurar la extracción de los compuestos.

En la Figura 31 se puede observar que a pH = 2.5 se extraen los tres polifenoles utilizando SBSE, por lo que se decidió realizar la extracción a este pH y a las condiciones mencionadas en el inciso 5.2.1. En el caso del pH 2.5, éste se encuentra muy por debajo del pKa de los analitos lo que implica una mejor extracción de los polifenoles.

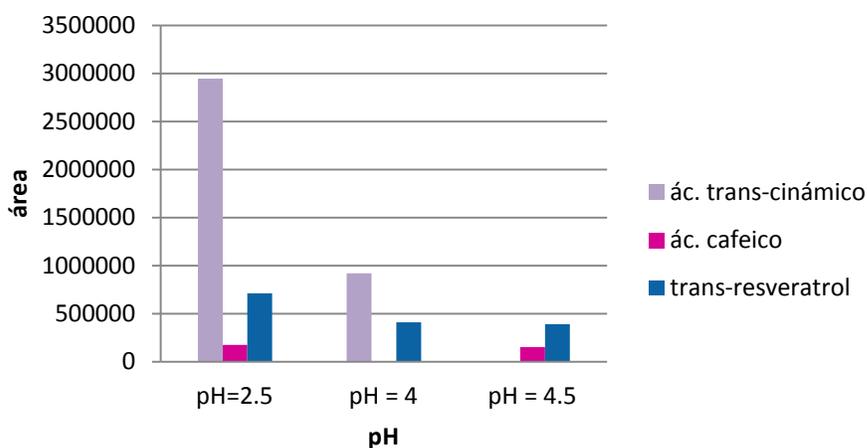


Figura 31 Variación del pH en los estándares de los polifenoles.

En la Figura 32 se muestra el cromatograma iónico total obtenido de la extracción de los polifenoles al pH seleccionado con las condiciones antes mencionadas, observando los picos correspondientes de los derivados del ácido trans-cinámico, ácido cafeíco y del trans-resveratrol, los espectros de masas obtenidos para cada uno de los analitos se presentaron en las Figuras 21, 22 y 23 respectivamente.

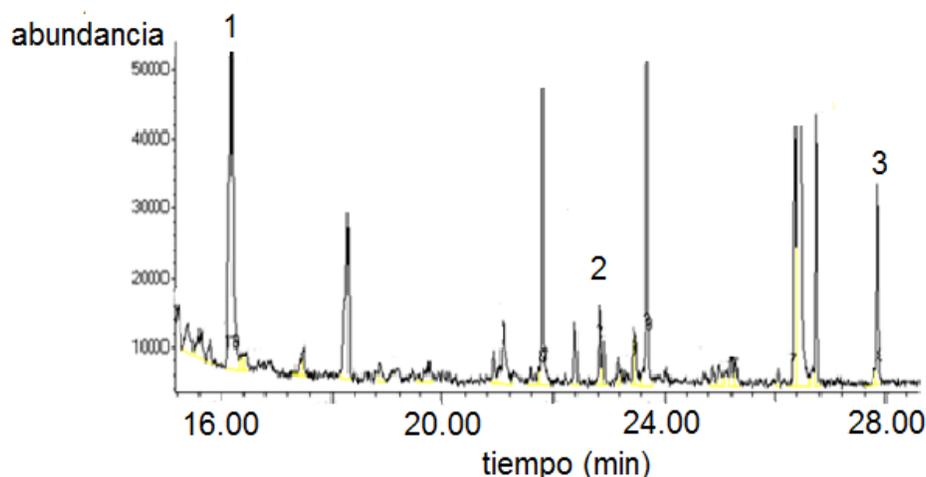


Figura 32. Cromatograma Iónico Total de la extracción efectuada a una solución al 2% de etanol fortificada con: 1) ácido trans-cinámico (2.04 ppm), 2) ácido cafeíco (5 ppm) y 3) trans-resveratrol (0.52 ppm) y pH = 2.5. Modo SCAN.

4.3.2 Optimización de los parámetros de SBSE para la extracción de polifenoles en vino tinto

La optimización se llevó a cabo para lograr una extracción eficiente por SBSE de los polifenoles en las muestras de vino, se realizó como se indica en el inciso 5.2.3. Los parámetros que se optimizaron fueron: porcentaje de etanol, pH, tiempo de extracción, adición de sal y tiempo de desorción.

4.3.2.1 Porcentaje de etanol

Al realizar la extracción al 2% de etanol en las muestras de vino como se había hecho para la extracción de los estándares, se observó que los picos de los polifenoles tenían un área muy pequeña por lo que se varió el porcentaje de etanol para lo cual se disminuyó la dilución del vino y el porcentaje de etanol aumentó al 6.8%.

Se realizaron extracciones por triplicado al 2% y al 6.8% de etanol, en la Figura 33 se observa que la extracción se favorece al 6.8% de etanol por lo que este porcentaje fue seleccionado.

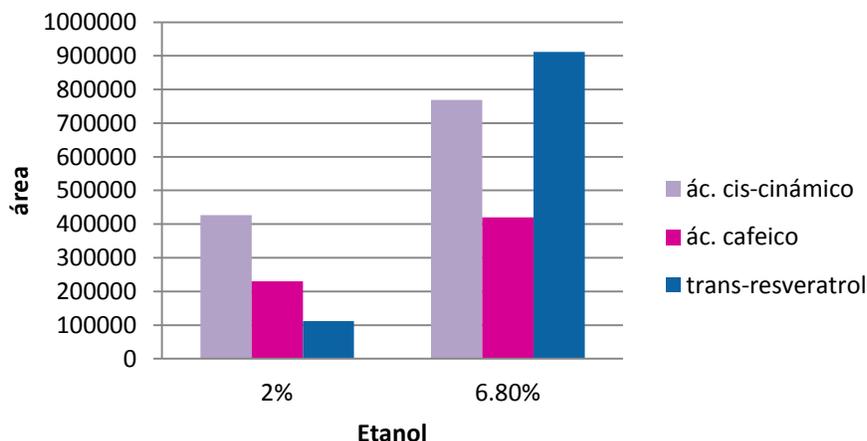


Figura 33. Efecto de la variación del porcentaje de etanol en la extracción con SBSE en vino tinto.

4.3.2.2 pH

La Figura 34 muestra el efecto del pH en la extracción de polifenoles en las muestras de vino, se mantuvo el porcentaje de etanol al 6.8% y se varió el pH del medio, evaluando 5 valores de pH: 2.5, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0.

La máxima concentración de los analitos extraídos fue a pH = 4.0 debido a que los analitos se encuentran en forma molecular a este pH ya que está por debajo de los pKa's de los tres polifenoles.

Al aumentar el pH a 4.5 y 5 los ácidos cafeico y trans-cinámico se extrajeron menos debido a que el pH es mayor a su pKa por lo que los analitos se encuentran en su forma iónica lo que favorece su solubilidad en el medio de extracción y no migran a la fase polimérica de la barra, sin embargo la extracción del trans-resveratrol fue mayor ya que el pH sigue siendo menor a su pKa por lo que se encuentra en su forma molecular y la migración se ve favorecida hacia la fase polimérica.

Por otro lado a pH = 2.5 la extracción fue menor, contrastando con la obtenida al mismo pH en la solución estándar, esto podría deberse al efecto de matriz, es decir, las interacciones de los analitos con los componentes endógenos del vino son muy diversas lo cual no ocurre en la solución estándar.

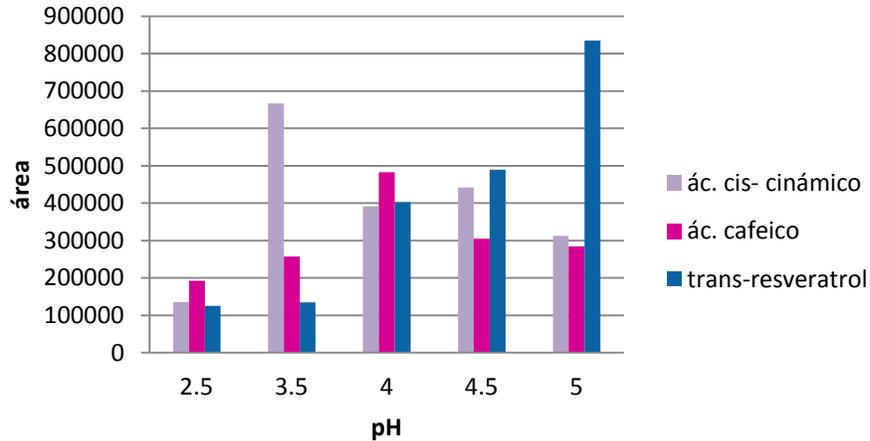


Figura 34. Efecto de la variación del pH en la extracción con SBSE de los polifenoles en vino tinto.

4.3.2.3 Tiempo de extracción

El tiempo de extracción se evaluó a: 15 min, 30 min y 60 min con una dilución del vino al 6.8% de etanol y pH = 4.0. En la Figura 35 se observa que a 60 min se tuvo una mejor extracción de los polifenoles además, a 60 min se presentó la menor variación y por consiguiente un menor %CV.

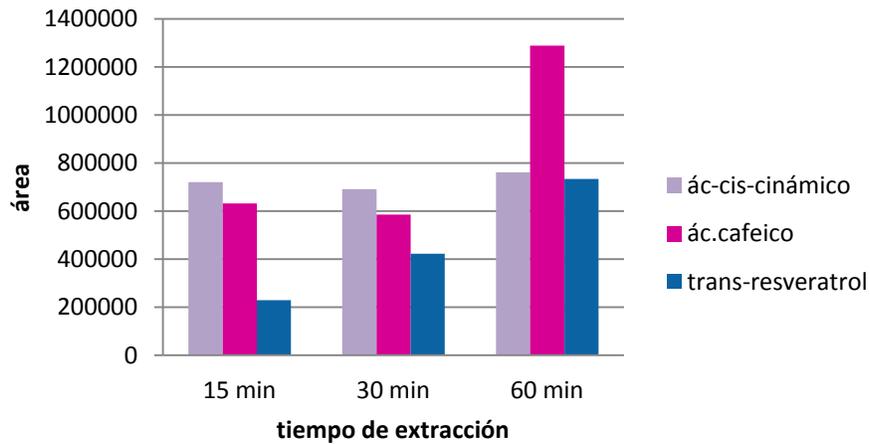


Figura 35. Efecto de la variación del tiempo de extracción con SBSE en vino tinto.

4.3.2.4 Adición de sal (NaCl)

Se evaluó el efecto de la adición de NaCl en la extracción del vino al 6.8% de etanol, pH = 4.0 y 60 min de extracción.

Para éste estudio, se comparó la extracción sin adición de sal y con 50% de NaCl con respecto a la saturación del agua, el análisis se realizó por triplicado.

En la Figura 36 se observa que no se favorece la extracción al adicionar NaCl además, la precisión del análisis disminuyó obteniendo $CV \geq 20\%$. Por otro lado al no adicionar NaCl se observó una variación menor con $CV \leq 6\%$. Por estas razones, se decidió no adicionar NaCl.

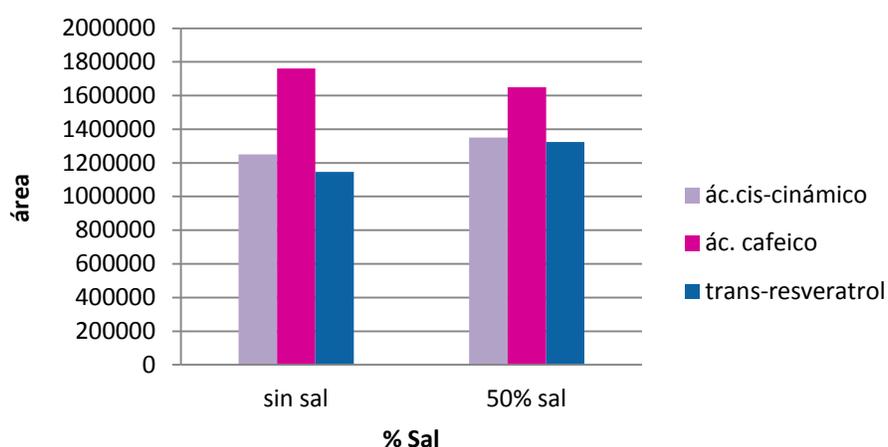


Figura 36. Efecto de la adición de Sal (NaCl) en la extracción de los polifenoles en vino tinto.

4.3.2.5 Tiempo de desorción

Optimizar el tiempo de desorción tiene como objetivo garantizar la desorción completa de los analitos, por lo que se realizaron desorciones sucesivas durante 10, 20 y 30 min.

En la Figura 37 se observa que a la segunda desorción de 10 min la desorción fue completa ya que a la tercera desorción de 10 min ya no se observó la presencia de ninguno de los analitos.

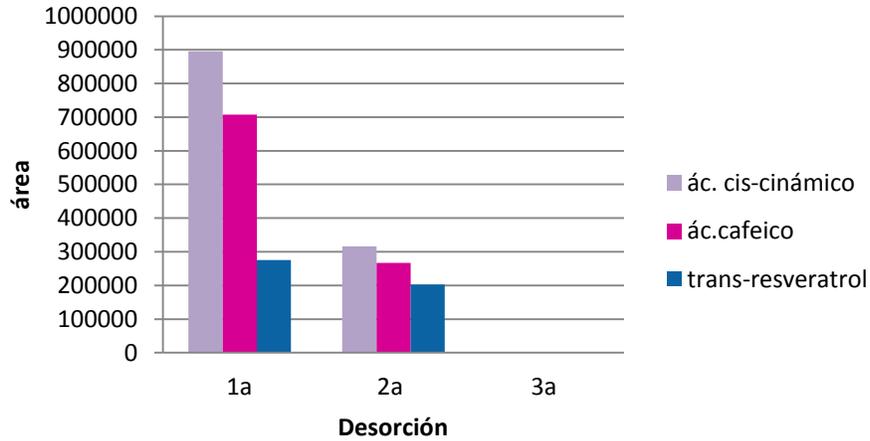


Figura 37. Desorciones sucesivas de 10 min.

En la Figura 38 se observa que a la primera desorción de 20 min ésta fue completa ya que a la segunda desorción sucesiva de 20 min ya no se observó la presencia de ninguno de los analitos, lo mismo se observa para las desorciones de 30 min (Figura 39).

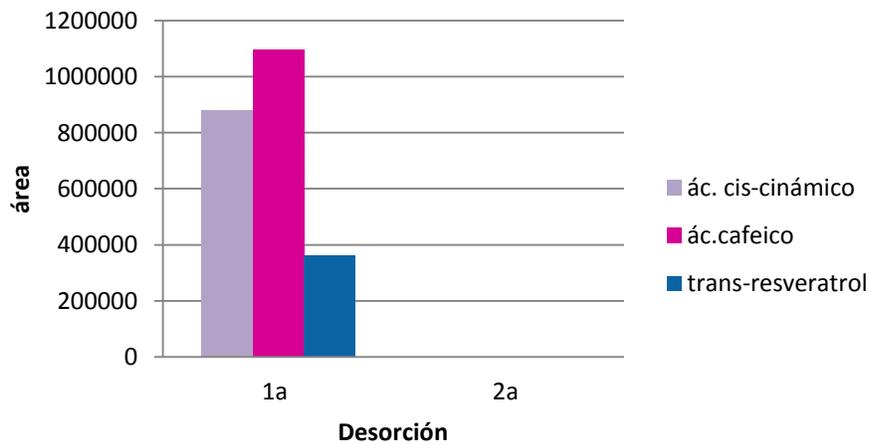


Figura 38. Desorciones sucesivas de 20 min.

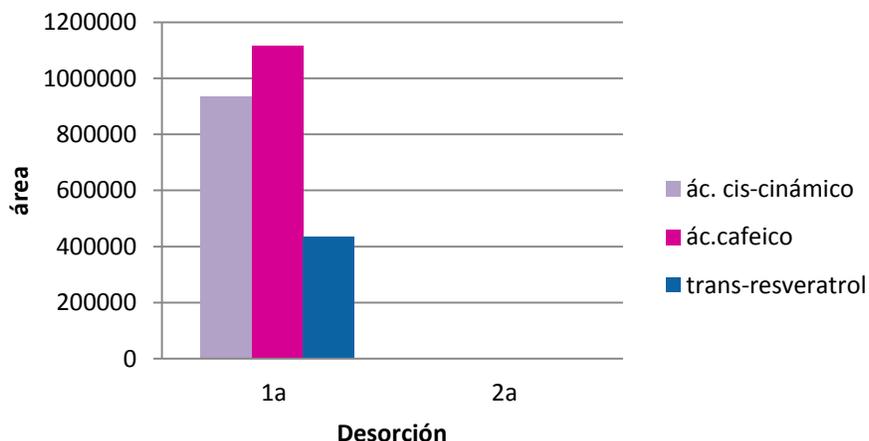


Figura 39. Desorciones sucesivas de 30 min.

El tiempo óptimo de desorción seleccionado fue 20 min ya que, es el tiempo en el que los analitos extraídos se desorben completamente.

Las diferencias que se observan en cuanto al área de cada analito en las tres diferentes desorciones se debe al error experimental y que en las desorciones sucesivas de 10 y 30 min los coeficientes de variación eran mayores en comparación a la desorción de 20 min, esta fue otra de las razones para elegir 20 min como tiempo de desorción óptimo.

4.3.2.6 Condiciones optimizadas para la extracción de polifenoles en vino tinto

Después de evaluar los parámetros que afectan la extracción con SBSE, se obtuvieron las condiciones óptimas para el análisis, éstas se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones óptimas para la extracción con SBSE de los polifenoles en vino tinto

Etapas 1. Extracción	
Volumen de muestra	5 mL
% Etanol	6.85
pH	4.0
Adición de Sal	Sin adición de NaCl
Tiempo de extracción Velocidad de agitación Temperatura	1 hora 600 rpm Ambiente
Etapas 2. Desorción	
Tiempo de Desorción Velocidad de Agitación Disolvente Temperatura	20 min 600 rpm 500 μ L de acetona Ambiente
Etapas 3. Derivatización	
Volumen de derivatizante Tiempo Temperatura	50 μ L de BSTFA 30 min 80°C

4.3.3 Aplicación de la metodología desarrollada a diferentes muestras de vino tinto

Se analizaron 5 muestras de vino; un vino argentino y cuatro vinos mexicanos, las características de cada uno se muestran en la Tabla 5. Se analizaron siguiendo la metodología optimizada y descrita en la Tabla 11, el análisis se realizó en modo SCAN.

En la Figura 40 se muestra el CIT del análisis mediante SBSE en muestras de vinos comerciales, se observa la presencia de ácido caféico en el tiempo de retención de 22.82 min y del trans-resveratrol a 27.86 min, sin embargo el ácido trans-cinámico no se logró identificar o bien se encuentra a concentraciones muy bajas, sin embargo en un tiempo de retención de 15.80 min se pudo identificar un pico cuyos iones fragmento son los que caracterizan al ácido trans-cinámico (220 m/z y 205 m/z), para este caso la biblioteca reporta el isómero ácido cis-cinámico, los iones característicos se deben a la misma estructura y grupos funcionales, sin embargo la interacción con la fase estacionaria presenta distinto tiempo de retención.

Se sabe que el isómero geométrico trans es el más estable y a menudo presente en mayor proporción, aunque diversos factores ambientales tales como la luz UV o la disolución del ácido trans-cinámico dentro de la matriz, son factores que favorecen la interconversión a su isómero cis, el cual fue el compuesto detectado.

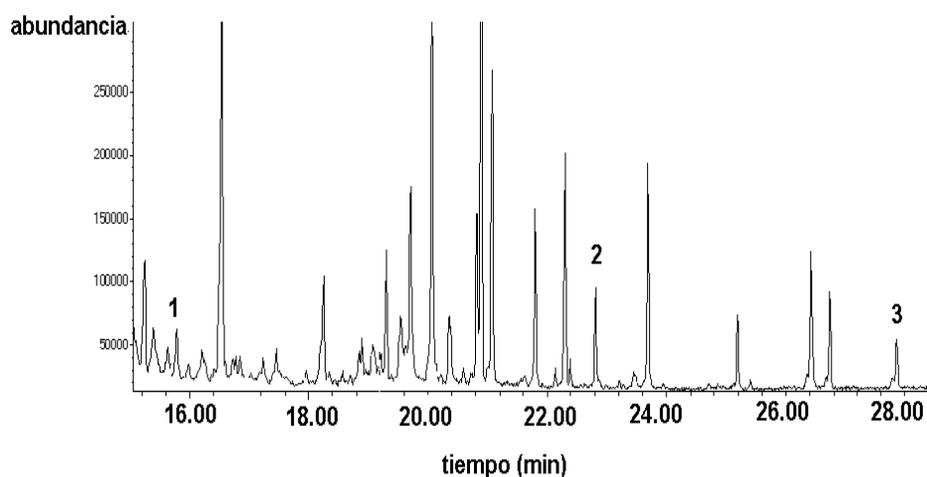


Figura 40. CIT de una muestra de vino analizado con el método optimizado: 1) ácido cis-cinámico, 2) ácido cafeico, 3) trans-resveratrol. Modo SCAN.

4.3.4 Cuantificación de polifenoles identificados en las muestras de vino

Con fines cuantitativos y una mayor exactitud se utilizaron Factores de Respuesta para cada uno de los polifenoles estudiados, los cuales fueron calculados de acuerdo a la metodología descrita en el inciso 5.3, el análisis se realizó por triplicado.

Los analitos presentan diferente respuesta, lo cual se puede observar en el cromatograma iónico total de la Figura 41. Por otra parte en la Tabla 12 se muestran los factores de respuesta obtenidos y la concentración de cada estándar de polifenol.

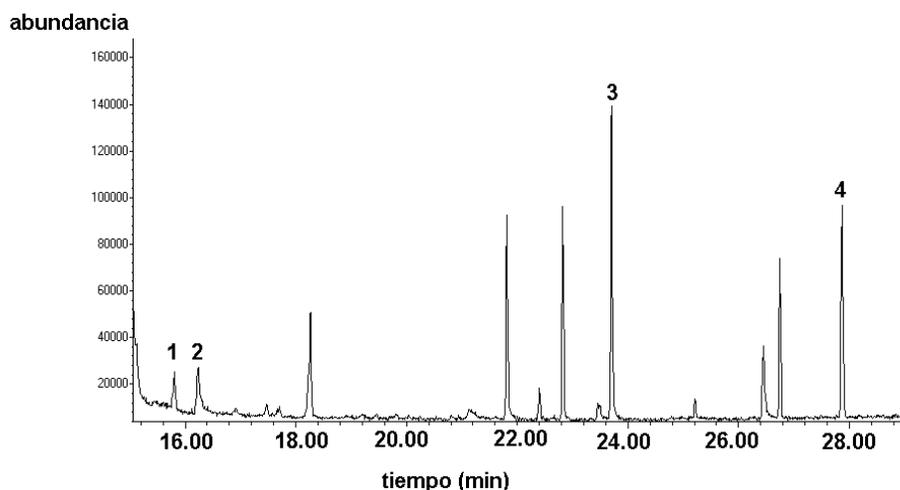


Figura 41. Cromatograma iónico total del análisis de los estándares de los polifenoles con la metodología optimizada. Solución de etanol al 6.8%, pH = 4.0, fortificada con 1) ácido cis-cinámico (0.97 ppm), 2) ácido trans-cinámico (2.04 ppm), 3) ácido cafeíco (5.0 ppm) y 4) trans-resveratrol (0.52 ppm).

Tabla 12. Factores de Respuesta de polifenoles

Polifenol	Factor de Respuesta	Concentración mg/L	% CV
Ácido. cis-cinámico	490422.34	0.97	5.96
Ácido trans – cinámico	259054.41	2.04	10.58
Ácido cafeíco	346021.6	5.0	15.09
trans-resveratrol	3520290.38	0.52	15.71

n = 3

Las concentraciones de los polifenoles obtenidas en las muestras de vino se presentan en la Tabla 13 con sus respectivos coeficientes de variación, encontrándose la mayoría por debajo de 17% lo cual es aceptable debido a la variabilidad en el proceso de extracción de los analitos hacia la fase polimérica, ya que los analitos estudiados poseen diferente afinidad hacia el polímero de la barra de extracción también, el efecto de matriz influye en la variación de la extracción ya que la variabilidad depende del vino que se analice. Por otro lado, las concentraciones determinadas en los vinos utilizados se pueden comparar con los resultados obtenidos en estudios previamente reportados para vinos extranjeros, en la Tabla 1 se muestran los estudios que se han realizado y se puede observar que los resultados obtenidos en este trabajo son equiparables con respecto a la

concentración de trans-resveratrol. En el caso del ácido cafeíco la concentración es mayor en los vinos mexicanos comparado con los resultados de la Tabla 1, estas variaciones pueden deberse a que el contenido de polifenoles varía dependiendo de los factores agronómicos, ambientales y geográficos³⁵.

Algunas de las ventajas conseguidas por la técnica de preparación de muestra utilizada en vinos tintos y a su vez en comparación con los métodos ya existentes, se deben a que la SBSE es una técnica de extracción miniaturizada ya que, utiliza menor cantidad de reactivos y es una técnica limpia que disminuye o elimina la utilización de disolventes orgánicos lo que implica un menor impacto al medio ambiente.

Tabla 13. Contenido de polifenoles en las muestras de vino tinto analizadas

Muestras de Vino	Las Moras		L.A. Cetto		Monte-Viña		XA Domecq		Casa Madero	
	mg/L	%CV	mg/L	%CV	mg/L	%CV	mg/L	%CV	mg/L	%CV
Ácido cis-cinámico	5.11	6.6	3.83	6.35	3.68	7.8	3.15	7.97	3.60	8.5
Ácido cafeíco	19.94	13.46	9.56	14.8	12.90	13.1	17.78	13	18.30	11.3
trans-resveratrol	0.61	16.22	0.33	15.6	0.72	8.5	0.36	9	0.47	8.85

n = 3

La Figura 42 muestra los resultados descritos en la Tabla 13. Los vinos de la variedad Cabernet Sauvignon (Las Moras, XA Domecq, L.A. Cetto y Casa Madero) poseen concentraciones de polifenoles muy similares, aunque para la muestra L.A. Cetto, el ácido cafeíco está en menor concentración aún siendo producido en la región de Baja California al igual que el vino XA de Pedro Domecq, la variabilidad observada en este caso se puede deber a factores de producción tales como: frecuencia de riego, tiempo de maduración de la uva, elección del momento de cosecha. Dichos factores afectan también el contenido de polifenoles. El vino de Casa Madero, producido en Coahuila, presentó mayor concentración de polifenoles que los producidos en Baja California, aquí el factor geográfico afectó el contenido de los mismos.

En cuanto al trans-resveratrol, las concentraciones encontradas en vinos mexicanos de la misma cepa (Cabernet Sauvignon), es decir, en L.A. Cetto, Casa Madero y XA Domecq, son muy similares, pero para el vino Monte Viña cuyo origen es una mezcla de cepas (60% Cabernet Sauvignon y 40% Merlot) y el vino argentino Las Moras de la cepa Cabernet Sauvignon, la concentración determinada de este compuesto fue mayor comparada con el resto. De acuerdo a estos resultados se puede decir que el contenido de polifenoles en vinos está sujeto a factores ambientales, producción y composición de la uva, esos factores pueden ser modificados también por las técnicas culturales aplicadas en el viñedo.

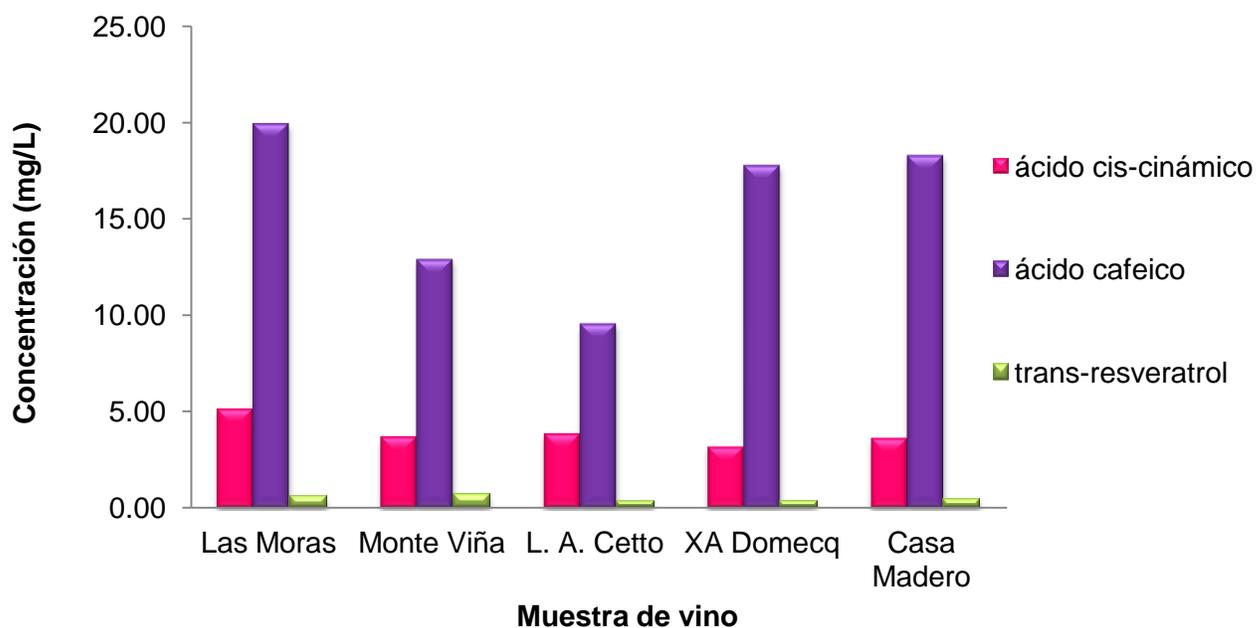


Figura 42. Concentración (mg/L) de polifenoles en las muestras de vino.

La determinación de polifenoles en vino tinto, constituye una herramienta fundamental para la caracterización de diferentes cepajes y zonas de producción. En particular el trans-resveratrol juega un rol importante en la resistencia de las bayas de uva, este compuesto actúa como agente antifúngico previniendo enfermedades fúngicas como la “podredumbre del racimo” (*Botrytis cinérea*), además de que su presencia y niveles son condicionados según el grado de inducción de la infección³⁶. Existen datos que reportan que su concentración

puede variar entre 0 y 10 mg/L en vino tinto. En la actualidad determinar el contenido de trans-resveratrol en distintos alimentos ha sido objeto de estudio debido a su capacidad de actuar como antioxidante y en consecuencia tener actividad anticarcinogénica (prevención o retraso en la evolución del cáncer)³⁷.

Por otro lado, conocer las concentraciones de polifenoles en vinos mexicanos, es una forma de posicionarlos dentro de los niveles mundiales en cuanto al contenido polifenólico en base a las propiedades antioxidantes atribuidas a los componentes polifenólicos.

Al comparar las concentraciones obtenidas con estudios reportados en vinos de otros países, se observa que los vinos mexicanos cuentan con un contenido de ácido cafeíco y de trans resveratrol superior al promedio mundial, el ácido trans-cinámico no se logró detectar por lo que se determinó ácido cis-cinámico del cual no se encontraron datos reportados en otros estudios sin embargo se reporta que el ácido trans-cinámico se isomeriza al estar expuesto a radiación UV o al encontrarse en solución.

Según la A.H.A 2000 (American Heart Association), un consumo de vino tinto capaz de ejercer efectos benéficos para la salud sería: 2 vasos por día, en caso de los hombres y 1 vaso por día en el caso de las mujeres. Otros estudios anteriores aconsejan el consumo de vino tinto asociado a una dieta sana y equilibrada que incluya frutas, verduras, pescado, pan, quesos y aceite de olivo (dieta mediterránea). Para poder promocionar el consumo de vino en nuestro país, se tendría que analizar los vinos elaborados en México y evaluar su calidad polifenólica con el objetivo de informar a la población acerca de los efectos benéficos producidos por los polifenoles del vino tinto, sin dejar a un lado la recomendación de que el exceso en el consumo de alcohol presenta otros problemas de salud³⁸.

Para concluir, la extracción con SBSE de polifenoles en vinos tintos resultó mejor a diferencia de la MEFS, lo cual pudo deberse a que la fibra utilizada en MEFS se dañaba al estar expuesta al agente derivatizante BSTFA en comparación con la barra magnética de extracción la cual no se expuso al derivatizante, además como se mencionó en los antecedentes de este trabajo, la

barra de extracción de la SBSE tiene mayor volumen de fase polimérica (EG-Silicone) y se encuentra protegida por una rejilla de metal inerte a comparación de la fibra de MEFS la cual tiene un volumen de fase polimérica menor y se expone directamente a la muestra y al derivatizante.

5 Conclusiones

- Se desarrolló una metodología por MEFS-HS-CG-EM para la determinación de compuestos volátiles y semi-volátiles en vinos tintos (Cabernet Sauvignon).
- Se determinaron ésteres etílicos derivados de ácido hexanoíco, octanoíco, decanoíco, dietil éster y fenil etil alcohol en las muestras de vino estudiadas. Estos compuestos son característicos del aroma del vino tinto de la variedad de uva Cabernet Sauvignon.
- Se desarrolló y optimizó una metodología con extracción por sorción con barra magnética seguido de cromatografía de gases – espectrometría de masas (SBSE-CG-EM) para la determinación de polifenoles: ácido cis-cinámico, cafeíco y trans-resveratrol presentes en vino tinto.
- Se aplicó la metodología desarrollada (SBSE-CG-EM) para el análisis de cinco diferentes muestras de vino tinto, obteniéndose diferentes intervalos de concentración: ácido cis-cinámico 3.15 - 5.11 mg/L, cafeíco 12.90 - 19.94 mg/L y trans-resveratrol de 0.36 - 0.72 mg/L. Estas concentraciones nos indican los beneficios nutracéuticos que tendría la inclusión de los vinos tintos de la variedad Cabernet Sauvignon en la dieta, brindándole un valor agregado a los vinos estudiados.

6 Referencias:

1. Aguilar A. y Gris L. (2012). Estudio de la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y calidad sensorial de vinos tintos mexicanos procedentes de diferente región. Tesis Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM.
2. Noguez, R. (2006). El papel de la microbiología enológica y su importancia en la elaboración de vinos de calidad. Tesis Facultad de Química, UNAM.
3. Sagratini, G.; Maggi, F.; et. al. (2012). Comparative study of aroma profile and phenolic content of Montepulciano monovarietal red wines from Marches and Abruzzo of Italy using HS-SPME-CG-MS. Food Chemistry: 132, 1592-1599.
4. Muñoz, J. (2010). Las bebidas alcohólicas en la historia de la humanidad. AAPAUNAM Academia, Ciencia y Cultura: 101, 42-52.
5. Juárez, R. (2006). Determinación de Terpenos en Tequila 100% Agave. Tesis de maestría. Facultad de Química. UNAM.
6. Peynaud, E. (1984). Enología Práctica, Conocimiento y Elaboración del Vino. Edit. Mundi-Prensa, 2ª ed. Madrid, España. 111-156.
7. Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). Estadísticas del sector vitivinícola mundial.
Consultado en: <http://www.oiv.int/oiv/info/esstatistiquessecteurvitivinicole>: 7 de enero de 2013.

8. Vinos de España. "El vino en cifras". Consultado en: http://www.winesfromspain.com/icex/cda/controller/pageGen/0,3346,1559872_6763355_6778152_0,00.html: 8 de enero de 2013.
9. Font, I., Gudiño, P. y Sánchez, A. (2011). La industria Vinícola Mexicana y las Políticas Agroindustriales: REDPOL-UAM: 2, 1-30.
10. Brizuela, R. Diario del Vino. México: sesenta años institucional. Consultado en: http://www.diariodelvino.com/notas3/noticia1257_08feb08.htm: 8 de enero de 2013.
11. Domine, A., Supp, E. y Schawarzwald, D. (2003). Wine. Edit. Konemann. 2^a ed. España, 52-56.
12. NMX-V-012-1986. Bebidas Alcohólicas. Vinos. Especificaciones. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
13. Lorraín, B., Tempere, S.; et. al. (2013). Influence of phenolic compounds on the sensorial perception and volatility of red wine esters in model solution: An insight at the molecular level. Food Chemistry: 76-82.
14. Perez, P. (2010) Determinación de Polifenoles en el vino. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña. España.
15. Goldner, C. (2008). Caracterización Sensorial y Físicoquímica de vinos Chardonnay y Malbec de distintas regiones vitivinícolas Argentinas. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Católica Argentina.
16. Peynaud, E. (1996). Conocimiento y elaboración del Vino. Edit. Mundi-Prensa, 2^a ed. España, 86-101.

17. Flanzy, C. (2003). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Mundi Prensa, 2ª ed. Madrid, España. 136-137, 218-219.
18. Rebolo, S. (2006). *Estudio de la Composición Polifenólica de Vinos tintos Gallegos con D.O.: Ribeiro, Valdeorras y Ribeira Sacra*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Univ Santiago de Compostela. España, 9-19.
19. Lasanta, C. (2009) *Estudio y aplicación de nuevos procesos para la mejora de la elaboración de vinos tintos en zonas de clima cálido*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Universidad de Cadiz. España, 13-21.
20. Tomasso, D.; et. al. (1998). Identification and Quantitation of Hydroxytyrosol in Italian Wines. *J. High Resol. Chromatography*: 21 (10), 549-553.
21. Cheynier, V. et. al. (2000). *Enología Fundamentos científicos y tecnológicos* Ediciones Madrid, 136-144.
22. Paladino, C. (2011). *Actividad Antioxidante de los Compuestos Fenólicos Contenidos en las Semillas de la VID (*Vitis vinífera*)*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Universidad La Rioja. España.
23. Andujar, M.V. ; Moreno, A.; et.al. (2009). Analytical performance of three commonly used extraction methods for the gas chromatography–mass spectrometry analysis of wine volatile compounds. *J. of Chromatography A*, 1216, 7351–7357.
24. Aznar, O.; Checa, A.; et. al. (2011). Determination of polyphenols in wine by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection. *J. of Separation Science*: 34, 527-535.

25. Viñas, P.; Campillo, N.; et. al. (2009). Solid-phase microextracción on fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography-mass spectrometry. *J. of Chromatography A*: 1216, 1279-1284.
26. Pawliszyn, J. (1997). *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. 1ª ed. Edit. Wiley-Vch, EUA, 1-41.
27. Pitarch, E. (2001). Desarrollo de Metodología analítica par la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas. *National Institute of Public Health and the Environment (RIVM)*: 21, 53-60.
28. Supelco, Sigma-Aldrich.
Consultado en: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/supelco-analytical/about-supelco.html>. Noviembre 2012.
29. Claude, S.; Delhomme, O.; et. al. (2009). Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta*: 77, 1473-1480.
30. Prieto, A.; Basauri, O.; et. al. (2010). Stir-bar sortive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potencial solutions. *J of Chromatography A*: 1217, 2642-2666.
31. Peñalver, A. (2002). Aplicación de la Microextracción en Fase Sólida al análisis medioambiental. Tesis doctoral Universitat Rovira I Virgili. Terragona, 25-27.
32. Higson, S. (2007). *Química analítica*. 1ª ed. McGraw Hill. India.
33. Skoog, D.; Holler J.; Hieman T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. 5ª ed. McGraw Hill. Madrid. 101-105.

34. Harris, D. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo*. 2ª ed. Reverte. Barcelona, España. 655-668.
35. Molina, R. (2000). *Teoría de la Clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas*. Ediciones Mundi-Prensa. 1ª ed. Madrid, España. 959-970.
36. González, G. et. al. (2011). Potencial polifenólico de la uva: índices propuestos y posibles aplicaciones. *Comunicata Scientiae*: 2(2), 57-69.
37. Ojeda, H. (2007) Los compuestos fenólicos de la uva. *Enología*: No. 4. 1-11.
38. Camussoni, G. y Carnevali, E. (2004). Determinación Comparativa del Contenido de Polifenoles en Vinos Tintos de Origen Argentino. *Invenio*: 7 (13), 151-159.