



Escola Universitària d'Enginyeria  
Tècnica Industrial de Barcelona  
Consorci Escola Industrial de Barcelona

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

**Volumen IV**  
PFC1

PROYECTO FINAL DE CARRERA



# “Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación”

PFC presentado para optar al título de Ingeniería  
Técnica Industrial, especialidad Química  
por **Ana Belén Casares Faulín**

Barcelona, 17 de Junio de 2010

Tutor proyecto: Ramon Oliver  
Departamento de Química  
Universidad Politécnica de Catalunya (UPC)

# ÍNDICE PFC1

ÍNDICE PFC1 .....	1
Resumen .....	5
<b>CAPÍTULO 1. EL VINO .....</b>	<b>7</b>
1.1. La Uva.....	8
1.1.1. Morfología .....	8
1.1.2. El raspón.....	9
1.1.3. Hollejo .....	9
<b>CAPÍTULO 2. ELABORACIÓN DEL VINO .....</b>	<b>11</b>
2.1. Introducción.....	12
2.2. Elaboración del vino .....	12
2.2.1. Vinos blancos.....	13
2.2.2. Vinos rosados .....	14
2.2.3. Vinos tintos .....	15
2.2.4. Vinos espumosos .....	16
<b>CAPÍTULO 3. COMPOSICIÓN DE LA UVA, MOSTO Y VINO .....</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO 4. PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS.....</b>	<b>25</b>
4.1. Color.....	26
4.2. Sabor y aroma .....	26
<b>CAPÍTULO 5. CLASIFICACIÓN DEL VINO.....</b>	<b>29</b>
5.1. Clasificación según su proceso de elaboración y sus controles .....	30
5.1.1. Vinos de Calidad Producidos en Regiones Determinadas (VCPRD):	
30	
Son los de mayor calidad debido a la exigencia y control que se establece en	
la producción.....	30
5.1.2. Vinos de Mesa (VDM): .....	31
5.2. Clasificación por envejecimiento y sus características. ....	31
5.3. Clasificación según color .....	32
5.3.1. Vinos Tintos: .....	32
5.3.2. Vinos Blancos .....	32
5.3.3. Vinos Rosados .....	32
<b>CAPÍTULO 6. POLIFENOLES .....</b>	<b>33</b>
6.1. Origen de los polifenoles en plantas .....	34
6.2. Clasificación de los polifenoles vegetales.....	35
6.2.1. Distribución de polifenoles en las plantas .....	37
6.2.2. Funciones de los polifenoles en los vegetales .....	38

6.3.	Mecanismos de acción de los polifenoles .....	39
6.4.	Polifenoles del vino tinto .....	40
6.5.	Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino .....	40
6.6.	Acciones terapéuticas de los polifenoles .....	41
6.6.1.	Arteriosclerosis y cáncer.....	42
6.6.2.	Resveratrol y quercetina, los flavonoides del vino tinto mas estudiados .....	43
6.6.3.	Efectos diferenciales de los componentes del vino: etanol y/o polifenoles .....	44
<b>CAPÍTULO 7. MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>		<b>47</b>
7.1.	Cromatografía líquida de alta eficacia .....	48
7.1.1.	Principal.....	48
7.1.2.	Tipos de HPLC.....	49
7.1.3.	Parámetros.....	51
7.2.	Elección del Solvente.....	53
7.3.	Filtración y Desgasificación de solventes .....	53
7.3.1.	Métodos de Filtración de Solventes en HPLC .....	54
7.3.2.	Métodos de Desgasificación de Solventes en HPLC.....	54
7.3.3.	Bombas .....	54
7.3.4.	Programación del Solvente .....	54
7.3.5.	Sistemas de Inyección de muestra .....	55
7.3.6.	Columnas y Fases Estacionarias .....	55
7.3.7.	Detección .....	55
7.3.8.	Problemas más comunes encontrados en HPLC .....	57
7.4.	Electroforesis capilar .....	58
7.4.1.	Procedimiento experimental.....	59
7.4.2.	Fundamentos de la separación .....	60
7.4.3.	Aspectos Instrumentales en CE .....	63
<b>CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFIA.....</b>		<b>67</b>
<b>CAPÍTULO 9. DIAGRAMA DE GANT .....</b>		<b>69</b>



## **RESUMEN**

Este proyecto consiste en el aprendizaje de conocimientos sobre diferentes técnicas de separación de los polifenoles en el vino.

Para ello se ha realizado un estudio teórico del vino, los polifenoles y los métodos de separación.



# **CAPÍTULO 1.**

## **EL VINO**

Existen muchas formas de definir el vino. Una de las más sencillas probablemente sea definirlo como una bebida alcohólica producida por la fermentación del jugo de la uva. Otra más compleja y técnica sería definirlo como una solución hidroalcohólica, con cientos de componentes (algunos de ellos aún nos son desconocidos), la mayoría en cantidades muy pequeñas. Y desde luego para llegar a la definición que nos da el código internacional de prácticas enológicas de la OIV: "El vino es el resultado de la fermentación biológica y natural de la uva entera o de su mosto, llevada a cabo por microorganismos presentes en el medioambiente de la bodega o en la superficie de la propia uva", se ha debido andar mucho camino. Pero Quizás la definición más completa es la que se establece en la ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y el Vino en nuestro País. "El vino es el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva".

## 1.1. La Uva

Las uvas son el elemento esencial por el cual se elabora finalmente el vino. La uva que produce el vino pertenece a la familia biológica conocida como *vitaceae*, que son una clasificación de plantas con tendencia a trepar por las superficies fijas. Esta familia posee once géneros diferentes, pero tan sólo la *vitis* es interesante como fruta vitivinícola. Dentro del género *vitis* existen 60 especies, pero tan sólo la vinífera es la que proporciona vino (de origen indoeuropeo).

### 1.1.1. Morfología

La uva contiene en su interior todos los elementos necesarios para la elaboración del vino, es por esta razón que comprender la morfología del fruto puede ayudar a comprender el resultado final del vino. Esta morfología es semejante a una división concéntrica de zonas sin solución de continuidad que empieza por las semillas que ocupan una posición interior cerca de su centro. :

1. **Primera zona** - En el interior las semillas se encuentran rodeadas de una muy alta concentración de azúcares (la mayor zona de concentración se encuentra rodeando las semillas), en esta zona hay azúcares y ácido málico (a veces este ácido se convierte en un azúcar mediante gluconeogénesis). Esta zona suele tener unas ligeras tonalidades verdes.
2. **Segunda zona** - En la siguiente zona, concéntrica a la anterior, la concentración de azúcares disminuye progresivamente y aumenta la presencia de ácido tartárico. El segundo componente químico en la uva, tras los azúcares, es la presencia de estos dos ácidos: a. málico y a. tartárico. Ambos ácidos juegan un papel importante en la elaboración de los vinos y los vinicultores son los que deciden modificar la presencia de cualquiera de ellos en el producto final.
3. **Tercera zona** - En ella se encuentran las sales minerales, principalmente potasio. Los polifenoles como pueden ser los taninos (ubicados principalmente en la piel exterior), antocianinas (responsables de los colores colorados en los vinos), los aromas, etc. Los sabores



característicos de la uva se almacenan en esta tercera zona, en el interior de la piel.

De las uvas las partes que interesan para la elaboración de vinos destilados son el hollejo y la pulpa. Si efectuamos un corte transversal en una uva se observan 3 zonas: el hollejo formado por el epicarpio, la pulpa por el mesocarpio y endocarpio que a su vez recubre las semillas o pepitas.

### *1.1.2. El raspón*

El raspón también llamado raspa o escobajo, forma la estructura o el esqueleto del racimo. Su estudio, desde el punto de vista enológico tiene gran importancia ya que permite conocer qué sustancias pueden incorporarse al vino cuando los raspones están presentes durante la fermentación. El raspón puede llegar a la bodega en dos estados: verde o maduro (lignificado).

El raspón verde tiene un gran contenido en agua, clorofila, taninos, ácidos málico y tartárico, y sales minerales. Durante la fermentación le confieren al vino un sabor vegetal o herbáceo.

Los raspones maduros contienen menos agua, taninos, y ácidos libres, y tienen, por el contrario, mayor proporción de sales ácidas.

Durante la fermentación de los tintos, una parte de estas sustancias se incorporan a los vinos, aumentando fundamentalmente su acidez y su contenido en taninos, de forma que se hacen más duros y astringentes. En el caso de fermentaciones defectuosas o largamente encubadas, los raspones pueden ceder al vino sabores desagradables y herbáceos.

### *1.1.3. Hollejo*

También llamado piel. Está formado por 6 u 8 capas de células, en cuyo interior están los pigmentos que le dan el color a las uvas. Contiene: ácido linoleico, oleico, palmítico y esterarico, compuestos aromáticos, que contribuyen al aroma de las uvas que en algunos casos es característico de la variedad y compuestos fenólicos que en algunos casos es característico de la variedad y compuestos fenólicos que dan cuerpo, color y gusto en el vino.

En esta parte se encuentran la mayor parte de los compuestos colorantes del vino (antocianos) y de los taninos de la uva que aporta una sensación de astringencia al vino. Las sustancias aromáticas que identifican la variedad de uva se encuentran en la parte interna del hollejo.



# **CAPÍTULO 2. ELABORACIÓN DEL VINO**

## 2.1. Introducción

El clima y el suelo son fundamentales para conseguir vinos de calidad, pero no menos importante es el proceso de vinificación. Tanto es así que dependiendo de los procedimientos enológicos empleados en la elaboración, de la mejor uva puede salir un mal vino y de una uva deficiente un vino correcto.

Salvo excepciones, desde primeros de septiembre hasta mediados de octubre tiene lugar la vendimia, donde ya se hace una primera selección separando los racimos dañados.

Seguidamente la uva sana es transportada al lagar de la forma menos agresiva posible, poniendo especial cuidado en que el grano no se deteriore por una excesiva presión, provocando una fermentación prematura. La experiencia ha ido imponiendo que el transporte se realice en cajas o pequeños cestos que no sobrepasen los 15 Kg. de capacidad.

La descarga de la uva se realiza sobre la "tolva de recepción", una especie de pirámide invertida que a modo de embudo, irá depositando la uva sobre un "sin fin" que la conducirá directamente a la estrujadora, previo análisis del fruto para determinar su estado sanitario y su contenido en azúcares y ácidos. La estrujadora presionará el grano lo justo para evitar que pepitas y raspones o escobajos (soporte estructural del racimo) se rompan y contaminen el mosto.

La pasta resultante es trasladada por medio de la "bomba de impulsión de pastas" hasta las prensas, sin entrar en contacto con el aire para impedir el inicio de la fermentación. Si se trata de un vino tinto, antes de proceder al prensado hay que despallillar la pasta. A partir de aquí el proceso tomará distintos caminos bien se trate de tintos, blancos o rosados, por no hablar de cavas o espumosos.

## 2.2. Elaboración del vino

El proceso de obtención de la pasta para iniciar el proceso de fermentación consta de cuatro etapas:

1. **Vendimia.** Una vez que la uva ha alcanzado la maduración deseada se realiza la recogida de la uva, normalmente en los meses de septiembre u octubre en Europa. Es importante realizar una selección del fruto sano separándolo del dañado.
2. **Transporte a la bodega.** Es un momento delicado que debe realizarse de la forma menos agresiva, evitando que el grano de uva sufra presiones excesivas y se rompa, provocando fermentaciones tempranas.
3. **Descarga.** Se realiza sobre la "tolva de recepción", una especie de pirámide truncada invertida, que irá acumulando la uva sobre una cinta "sin fin" que la transportará a la estrujadora. En la tolva se analiza el fruto para determinar su estado sanitario y su contenido en azúcares y ácidos.

4. **Estrujado.** La estrujadora rompe por presión el grano, pero lo justo para que no se rompan las partes duras del racimo (pepitas, raspones y hollejos) y contaminen el mosto. La pasta viscosa resultante se trasladada mediante diversos métodos a las prensas, evitando que entre en contacto con el aire para evitar una fermentación prematura de la fermentación.

A partir de aquí el proceso de elaboración sigue distintos pasos según el tipo de vino a elaborar:

- Vinos blancos
- Vinos rosados
- Vinos tintos
- Vinos espumosos

### *2.2.1. Vinos blancos*

1. Desvinado o separación de mostos. Tras el prensado la pasta con el hollejo y el raspón se traslada a las jaulas y se deja escurrir lentamente por gravedad o mediante prensas (preferiblemente neumáticas) se van realizando diferentes presiones, obteniéndose mostos de distinta calidad: Mosto yema, de flor o mosto lágrima: son los de más calidad, los más ligeros y finos, aromáticos, suaves y afrutados. Son logrados por gravedad.  
Primeras, segundas y terceras o mostos de prensa: son el resultado de presiones ligeras, medias y fuertes, respectivamente. A mayor presión, menor calidad.

Cada una de estas calidades fermentará por separado dando lugar a diferentes tipos de vino. Con los restos que quedan en prensa se pueden elaborar orujos dulces o frescos o aguardiente de orujo.

2. Desfangado. Para eliminar las partículas sólidas en suspensión se dejan reposar los mostos durante un tiempo para que se vayan depositando, por decantación, en el fondo del depósito. También se realiza este proceso de limpieza de forma mecánica.
3. Fermentación. Es el proceso por el cual los azúcares que contiene el mosto se transforman en alcohol, por acción de las levaduras que, al quedarse sin aire, metabolizan los azúcares en alcohol y gas carbónico.

El control de la temperatura de fermentación, mantenida entre 18 y 22 ° C, determina la cantidad de azúcar que queda en el mosto. La fermentación se desarrolla en dos fases, una tumultuosa y otra rápida, y dura normalmente entre 10 y 15 días. Según el contenido de azúcar se distingue entre:

- Vino Seco: no tiene más de 5 gramos por litro.
- Vino Semi-seco: tiene entre 15-30 grs/litro.

· Vino Dulce: más de 50 grs. /litro

4. Trasiegos. Para eliminar los restos sólidos procedentes de la fermentación se pasa el vino de un recipiente a otro. Se somete a dos o tres trasiegos entre los meses de noviembre y enero (en Europa). Después se seleccionan los vinos según las calidades.

5. Clarificación. Mediante unas sustancias clarificantes se arrastran al fondo del recipiente los restos sólidos que todavía hayan quedado en el vino.

6. Filtrado. Con igual propósito se hace pasar el vino por un elemento poroso o una membrana, desde filtros de tierra hasta los modernos esterilizantes amicróbicos, para retener las materias en suspensión.

7. Embotellado. El vino se embotella para su comercialización.

### 2.2.2. *Vinos rosados*

La elaboración es similar a la del vino blanco, pero se utiliza uva tinta o una mezcla de blanca y tinta. Se usan solamente mosto yema y mosto primera.

1. Maceración. Tras la eliminación del escobajo las uvas se estrujan y se trasladan a un depósito donde el mosto se somete a una corta maceración en frío con el hollejo, sin que llegue a fermentar. Pasado ese tiempo el mosto toma color, entonces se realiza el "sangrado" o separación del mosto y la pasta sólida.

2. Desfangado y fermentación. Se realiza la separación de las materias sólidas del mosto del mismo modo que en los vinos blancos. La fermentación se lleva a cabo a temperaturas controladas para obtener vinos frescos o afrutados.

3. Remontado. El gas carbónico desprendido durante la fermentación empuja hacia arriba los hollejos que forman una barrera superior denominada "sombbrero". Esta capa hay que ir remojándola con el mosto para activar la extracción de color. El hollejo debe removerse periódicamente, lo que se conoce como "trasiego".

4. Descubre. Una vez conseguido el color en la maceración, el líquido se trasiega a otro depósito separándolo de las materias sólidas.

5. Fermentación maloláctica. En el segundo depósito finaliza la fermentación, en un proceso denominado fermentación lenta. En esta se transforma el ácido málico, fuerte y vegetal, en otro más suave y untuoso, el láctico, que confiere al vino finura y suavidad.

6. Trasiegos. Concluidas las fermentaciones, el vino se somete a diversos trasiegos y tratamientos de clarificación y estabilización.

7. Selección por calidades y embotellados en el caso de los jóvenes, o se pasan a barricas para la crianza en madera.

8. Crianza en barricas de roble: se realiza para los vinos de mayor calidad a los que se les quiere dar una crianza. La elección del tipo de roble (americano o francés) y el tostado de las duelas es muy importante. No existe un roble mejor que otro. Lo importante es la sabiduría del enólogo para realizar un ensamblaje adecuado entre el fruto y la madera.

### *2.2.3. Vinos tintos*

La elaboración de los vinos tintos se realiza a partir del mosto de uvas tintas que no han fermentado junto con las partes sólidas de la uva (hollejo y pepitas). El proceso es el siguiente:

1. Despalillado. La pasta resultante del estrujado se lleva a un depósito donde se separa el grano del raspón para que durante la maceración no se transmitan olores y sabores herbáceos desagradables.

2. Fermentación. Los azúcares se desdoblán en alcohol y desprenden anhídrido carbónico mientras las materias colorantes del hollejo se disuelven en el mosto.

3. Remontado. El gas carbónico desprendido durante la fermentación empuja hacia arriba los hollejos que forman una barrera superior denominada "sombbrero". Esta capa hay que ir remojándola con el mosto para activar la extracción de color. El hollejo debe removerse periódicamente, lo que se conoce como "trasiego".

4. Descubre. Una vez conseguido el color en la maceración, el líquido se trasiega a otro depósito separándolo de las materias sólidas.

5. Fermentación maloláctica. En el segundo depósito finaliza la fermentación, en un proceso denominado fermentación lenta. En esta se transforma el ácido málico, fuerte y vegetal, en otro más suave y untuoso, el láctico, que confiere al vino finura y suavidad.

6. Trasiegos. Concluidas las fermentaciones, el vino se somete a diversos trasiegos y tratamientos de clarificación y estabilización.

7. Selección por calidades y embotellados en el caso de los jóvenes, o se pasan a barricas para la crianza en madera.

8. Crianza en barricas de roble: se realiza para los vinos de mayor calidad a los que se les quiere dar una crianza. La elección del tipo de roble (americano o francés) y el tostado de las duelas es muy importante. No existe un roble mejor que otro. Lo importante es la sabiduría del enólogo para realizar un ensamblaje adecuado entre el fruto y la madera.

#### 2.2.4. Vinos espumosos

Son aquellos vinos que contienen el gas carbónico consecuencia de una segunda fermentación en botella.

Segunda fermentación. Una vez obtenido los vinos base (vinos limpios y afrutados) se realiza un "coupage" o mezcla entre ellos, tarea fundamental del enólogo y se le añade un "licor de tiraje", una mezcla de levaduras y azúcar que causarán una segunda fermentación dentro de la botella.

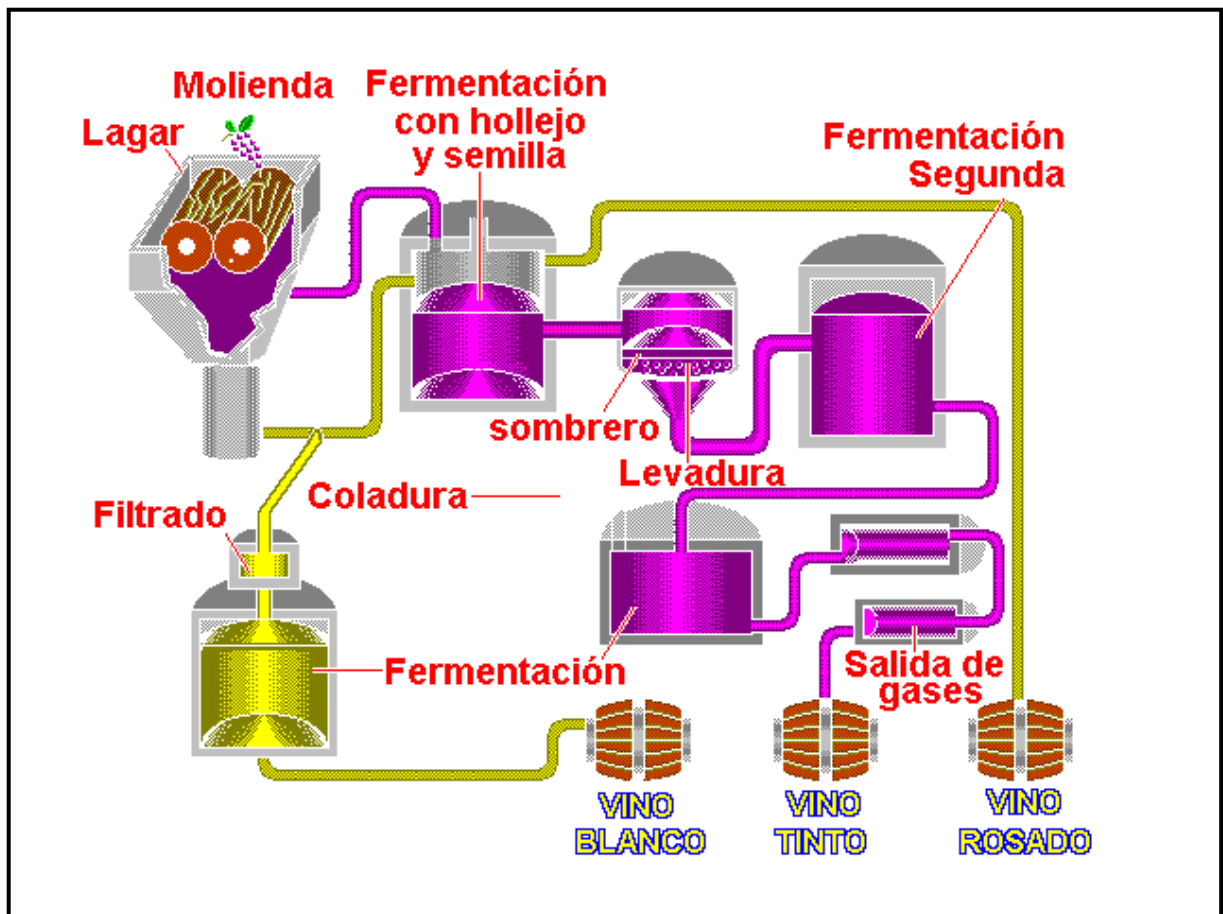


Figura1. Esquema de la elaboración del vino



## **Método tradicional o "champenoise".**

La segunda fermentación tiene lugar en la botella. Son los de mayor calidad y son típicos de la región de Champagne y de los cavas españoles. El proceso realizado durante la segunda fermentación es el siguiente:

Fase de rima: Las botellas se apilan en posición horizontal para que la segunda fermentación tenga lugar en esta posición. Las botellas se conservan en naves, generalmente subterráneas, con una temperatura y humedad uniformes, durante un mínimo de nueve meses.

Removido: Una vez se acerca el final del periodo de crianza, las botellas se trasladan hasta los pupitres donde se colocan en posición inclinada hacia abajo. Allí se van girando e inclinando hasta que las levaduras se concentran en el cuello de la botella. De esta forma el líquido de la botella queda estable, trasparente y limpio.

Degüelle: Las botellas se pasan por un sistema de refrigeración que congela el cuello de la botella. Se destapa para que salgan los restos de las levaduras en un pequeño bloque de hielo. Después, si se trata de un *brut nature*, se embotella directamente para la venta. Si el cava no es un *nature* se le añade licor de expedición, vino generalmente viejo muy estable, aportándole diferentes dosis de azúcar (*brut*, *semi-seco*, *dulce*).

## **Granvás.**

En este método la segunda fermentación se lleva a cabo en depósitos de acero inoxidable durante unos 20 días. Produce un espumoso de mucha menor calidad.



# **CAPÍTULO 3. COMPOSICIÓN DE LA UVA, MOSTO Y VINO**

Para comprender lo que es el vino desde el punto de vista de sus componentes hay que distinguir la composición de los compuestos cuando es una uva, al ser mosto y posteriormente vino. El mosto antes de la fermentación se compone principalmente de agua y azúcares, así como ácidos (málico y tartárico), además otros componentes químicos en menor cantidad son responsables de la composición final del vino. La fermentación alcohólica transformará gran parte de los azúcares del mosto en alcohol etílico, pero dejará otros compuestos interesantes: glicerina. Algunos de estos compuestos, que están presentes en menos medida, dan un cierto carácter a la cata de vino, tal y como es la presencia de taninos, los taninos se encuentran en las pieles de las uvas y se pueden considerar como un conservante natural que permite a los vinos envejecer por más de cinco años.

Otros elementos se añaden al vino de forma artificial y componen lo que se denomina aditivos del vino, estos aditivos tienen por objeto estabilizar algunos compuestos (proteínas, cristales de tartarato, etc) , reducir el nivel de ácidos, agentes antioxidantes (ácido ascórbico), agentes antimicrobianos (dióxido de azufre, ácido sórbico, sorbatos, ácido benzoico, ácido fumárico).

### **(a) Azúcares**

Los principales azúcares presentes en el mosto son la glucosa y la fructosa, otros azúcares se encuentran en la uva pero en proporciones insignificantes. La concentración de azúcar en la uva o en el mosto se suele medir en EEUU en °Brix, mientras que en Europa se hace en grados Baumé. La concentración de azúcares es crítica para el desarrollo de las levaduras durante la fermentación, la principal levadura del vino (*Saccharomyces cerevisiae*) se alimenta principalmente de glucosa y fructosa. Los azúcares no consumidos tras la fermentación se suelen denominar azúcares residuales (suelen ser pentosas como la arabinosa, la ramnosa y la xilosa). La concentración de estos azúcares residuales puede aumentar durante la maduración en madera debido a la escisión de moléculas de glucósidos presentes en la madera.

El azúcar residual es importante en la tonalidad dulce de un vino, mientras que la presencia de azúcares no residuales afecta sólo a la fermentación. La presencia de azúcares residuales en los vinos da lugar a una clasificación entre *vinos secos* y *vinos dulces*. Por regla general la presencia de una concentración de azúcares de menos de 1.5 g/litro hace que el paladar no detecte el sabor dulce, por encima de un 0.2% del volumen los sentidos empiezan a detectar el sabor dulce del vino. La mayoría de la gente detecta un dulzor si alcanza una concentración de un 1%. La presencia de taninos, ácidos así como el etanol. Durante el madurado algunos azúcares sufren un cambio estructural y acaban dando pigmentos oscuros al vino, este es el caso de la melanoidina detectada en vinos generosos como el jerez, madeiras, etc. Se trata de una variante de la reacción de Maillard.

### **(b) Alcoholes**

Uno de los efectos nocivos del consumo del vino, debido a su contenido de etanol, es el alcoholismo.

La fermentación alcohólica es un proceso metabólico anaeróbico (en ausencia de oxígeno) que permite a las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) consumir los azúcares del mosto para liberar dióxido de carbono y alcohol etílico (etanol de fórmula  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ) que permanece en disolución el vino final. La concentración de alcohol se suele medir en porcentaje de volumen total. El contenido de alcohol etílico varía dependiendo del tipo de uva y de las condiciones, por ejemplo en los vinos de mesa está entre los 7%-14%, en los espumosos: 11%-13%, en el jerez y otros vinos *encabezados* 16%-18% y en el oporto así como en vinos de postre suele estar por debajo de 17%. La forma más común para averiguar el contenido de alcohol en un vino es medir el punto de ebullición.

Los vinos poseen además pequeñas cantidades de otros alcoholes como puede ser alcohol metílico ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), no son resultado directo de la fermentación, sino de la hidrolización de las pectinas (existente en la piel de la uva) mediante acción enzimática. Debido a que la pectina se encuentra más en la piel que en el mosto, los vinos blancos contienen mucho menos alcohol metílico que los vinos tintos. En algunas ocasiones se pre-calienta el mosto para que elimine este contenido metílico y quede en concentraciones por debajo de las 30 ppm. Informes del contenido de metanol en vinos de todo el mundo indican concentraciones de 60 mg/litro (en un rango que va desde 40-120 mg/litro) para los vinos blancos y 150 mg/litro (en un rango de 120-250 mg/litro) para los vinos tintos. A pesar de ser el metanol tóxico, las cantidades que poseen el vino no son del todo malignas ya que las dosis letales de 340 ml/kg de peso, hace que una persona media de 70 kg tenga que tomar aproximadamente dos centenas de litros.

Existen además otros alcoholes en muy pequeña concentración, como pueden ser los polialcoholes, uno de los más importantes tri-alcoholes es el glicerol (glicerina) y su concentración está relacionado directamente con la temperatura de fermentación, con el contenido global de alcoholes (mayor alcohol, mayor cantidad de glicerol) y con el color del vino (mayor en vinos tintos que blancos). La concentración de este alcohol es mayor en los vinos de mesa. El contenido medio de glicerina en los vinos suele estar entre los 15-25 g/litro. La glicerina se sintetiza en gran parte gracias al hongo *Botrytis cinerea*, aunque hay cierta presencia en las uvas sanas. Suele haber un mayor contenido de glicerol en las fermentaciones a alta temperatura (esta es la razón por la que los vinos tintos suelen tener un mayor contenido de glicerol). El glicerol es un líquido denso y con un sabor dulce (aprox. 70% de la glucosa) y su presencia aporta dulzura y una sensación de llenado en boca. Se detecta fácilmente por dejar una especie de *lágrimas* en las paredes interiores de las copas.

Otro poli-alcohol presente en el vino es el eritritol y su concentración depende de la cepa de la levadura que fermenta el vino, por ejemplo la *Saccharomyces cerevisiae* tiene menos efecto en la concentración de eritritol que por ejemplo la levadura salvaje denominada *kloeckera apiculata* (se trata de una levadura que no tolera concentraciones de alcohol y muere en los primeros pasos de la fermentación). El arabitol, el manitol, el sorbitol (hexa-alcohol isómero del manitol), el inositol (hexa-alcohol frecuente en frutas). Casi todos estos polialcoholes aportan dulzura al vino y poseen la característica de ser resaltadas sus concentraciones cuando la podredumbre noble de la uva está presente.

### **(c) Ácidos**

Los ácidos tienen una capacidad de conservante del vino, resulta necesario en aquellos vinos que se diseñan para añejar. La presencia de una cierta cantidad de ácidos hace que se refuercen de forma natural otros sabores del vino en la cata. Casi la mitad del aporte de acidez lo tiene la presencia del ácido málico, su misión es la de detener la maduración de la fruta en especial durante el periodo caluroso. Su concentración en la uva es uno de los indicadores de la época de vendimia. El ácido tartárico es otro de los ácidos presentes en la uva, por regla general reacciona con el potasio de la uva dando lugar a tartaratos potásicos. El a. tartárico se encuentra presente en muchas frutas pero su concentración es mayor en la *vitis vinifera* (y en el fruto del tamarindo).

Durante la fermentación las levaduras generan pequeñas cantidades de ácido acético (un vino suele tener menos de 300 mg/litro) y su concentración refuerza los olores y sabores, proporcionando "complejidad". La presencia de acético hace que se sinteticen ésteres de acetato que proporcionan aromas afrutados. Los ácidos en el vino tienen un efecto antimicrobiano ya que muchas variedades no crecen en ambientes de pH bajo. El ácido succínico está presente en el vino debido a la fermentación, posee un sabor mezcla entre salado/agrio. El ácido láctico está presente en pequeñas cantidades a no ser que se haya forzado la fermentación malo-láctica a costa de consumir ácido málico (lo que hace que el pH global aumente).

### **(d) Ésteres**

Los alcoholes juegan un papel muy importante en la operación de maduración, tras la fermentación, ya que reaccionan con los ácidos naturales de la uva para formar ésteres (esterificación). De todos los grupos funcionales existentes en el vino, los ésteres son los más abundantes: identificados cerca de 160 diferentes. Los esterres se suelen categorizar en enología en dos categorías: los que provienen de reacciones enzimáticas (butanoato, exanoato) y aquellos que se forman químicamente por esterificación. Los esterres son los principales componentes responsables de aportar al vino un bouquet.

Muchos ésteres tienen un aroma característico a frutas, lo que hace que rememoren a fragancias de frutas durante la cata. Existen no obstante otras clasificaciones de ésteres orientadas a la cata de vinos, y se dividen en ésteres volátiles y no-volátiles. Uno de los ésteres volátiles más importantes y que se encuentra presente en el vino es el acetato de etilo. Por regla general los vinos jóvenes suelen tener una mayor concentración de ésteres volátiles. Cada éster posee un umbral por debajo del cual no es perceptible por la mayoría de los humanos.

### **(e) Compuestos nitrogenados**

Los compuestos nitrogenados son fundamentales en el mosto para que sea posible la correcta fermentación. Entre los aminoácidos predominantes en las uvas está la prolina y la arginina. La razón de prolina/arginina varía significativamente en las diversas variedades de la *vitis vinifera*. La prolina forma parte importante del metabolismo del nitrógeno en las levaduras. Como segundo grupo de aminoácidos dominante se tiene la glutamina y la alanina. Tal y como es de suponer el contenido de aminoácidos es menor tras la fermentación:

debido en parte a que la mayoría de ellos de una forma u otra entran en el metabolismo de las levaduras.

Entre los compuestos nitrogenados que posee el vino se encuentra las proteínas, en concentraciones de mosto que van desde los 100 mg/l a los 840 mg/l. Durante la fermentación el contenido de proteína puede descender casi un 40%. Las proteínas actúan como zwitteriones, bajo ciertas circunstancias pueden coagular dando lugar a inestabilidad en el vino. Quitar estas proteínas inestables del vino es uno de los objetivos de la clarificación, uno de los agentes más empleados es la bentonita y el otro es el gel de sílice.

### **(f) Compuestos fenólicos**

Los compuestos químicos en forma de polifenoles son abundantes en el vino y es quizás uno de los compuestos que proporciona más atributos al vino. Es importante remarcar que tras los carbohidratos y los ácidos son el tercer compuesto más importante. Se tratan en muchos casos de un metabolito secundario de la uva que se concentran en la piel y en las semillas (*pepitas*). Los polifenoles afectan directamente a los sabores, a los olores y otras capacidades sensitivas del vino, es por esta razón por la que los viticultores cuidan en detalle de su evolución durante las fases de vinificación. La concentración de polifenoles en el mosto depende en gran medida de la variedad de *vitis vinífera* y del clima en el que se haya cultivado. La concentración y ratio de los diferentes polifenoles depende igualmente en gran medida de la forma en que se haya procesado la uva. Por ejemplo, en los vinos blancos que han tenido poco contacto con los hollejos de la uva hay unas concentraciones diferentes de las observadas en los vinos tintos.

Uno de los compuestos son los taninos, son compuestos fenólicos muy reactivos. en solución pueden reaccionar con las proteínas y precipitar. Otro compuesto fenólico son las antocianinas que aportan color a los vinos, estos colorantes naturales pueden blanquearse (perder su color) por la acción de diversos agentes u operaciones químicas tales como la oxidación o la reducción, en muchos casos la acidez mantiene el color (viraje). Los fenoles ocupan un papel muy importante en los procesos de oxidación del vino (oxidación fenólica) y es una de las reacciones más habituales en la maduración de los vinos tintos.

### **(g) Constituyentes inorgánicos**

En la analítica vinícola se analiza a veces el contenido de cenizas, que resulta ser los restos inorgánicos existentes en el vino. La mayoría de los compuestos son carbonatos y óxidos. El metal más abundante en las frutas de la *vitis vinífera* es el potasio. En muchos casos el contenido de potasio se ve afectado por las condiciones climáticas, por ejemplo los climas cálidos poseen mayor contenido en potasio que los fríos. Durante la fermentación se acumula en forma de gas el dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) en una proporción que va desde 12 hasta 64 mg/litro y es empleado como fumigante de las cubas. Ocasionalmente se han detectado trazas de plomo debido a las cápsulas de las botellas, que han migrado su contenido a través del tapón de corcho.





# **CAPÍTULO 4. PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS**

El vino posee ciertos atributos que inciden de forma grata en la mayoría de los sentidos (todos excepto el oído y el tacto). Por ejemplo: los aromas afectan a los sentidos del olor, los diferentes sabores presentes en el vino al gusto, los colores a la vista. Todos ellos suelen tener un origen químico que se ha ido identificando poco a poco a lo largo de finales del siglo XX y comienzos del XXI. La cata de vinos arroja una variedad de propiedades como pueden ser el color, el sabor (dentro del sabor está una amplia gama de propiedades como la longitud, el retrogusto, etc.), el olor (que se compone de aroma, bouquet, cuerpo, etc.).

## 4.1. Color

Las antocianinas son las responsables principales del color rojo en el vino. Las antocianinas se encuentran en diversas frutas cumpliendo una misión similar. Este compuesto químico se encuentra en la capa exterior de la piel de la uva y durante el proceso de maceración se extrae antes que los taninos. La mayoría de los mostos (incluso los de uvas negras) son incoloros, así que la maceración es un proceso importante en la coloración de los vinos. Existen variedades de vitis vinífera que se clasifican como teinturier por aportar ya en el mosto un color rojizo (unas de las más conocidas son la Alicante Bouschet, Saperavi y Dunkelfelder), pero estas variedades son una excepción. En algunas ocasiones los vinicultores introducen pequeñas cantidades de estas variedades teinturier con el objeto de potenciar el color rojo de sus vinos. El color rojo o rosado depende, por completo, de la forma en que se extrae los antocianinas de la piel de la uva durante el proceso de fermentación.

Las antocianinas son un grupo de glicósidos de la cianidina (azul), la delphinidina (azul, puede verse en berenjenas, granadas, fruta de la pasión), la malvidina (púrpura), la pelargonidina (rojo), la peonidina (rosado) y la petunidina. Durante la maceración la proporción de antocianinas azules cambia hasta virar desde colores púrpura-rojizos a anaranjados. En los vinos jóvenes el color es debido principalmente a las antocianinas, pero como son compuestos químicos no estables se van enlazando con los taninos formando polímeros más estables y con capacidad de pigmentación.

## 4.2. Sabor y aroma

Los principales componentes de sabor en la uva son los azúcares, los ácidos y los polifenoles. Estos tres compuestos proporcionan al vino tres de los cinco sabores básicos: dulce, ácido y amargo. De todas formas existe una gran cantidad de sustancias en las uvas que acaban proporcionando un sabor, estas sustancias se presentan en cantidades ínfimas (medidas a veces en partes por millón, e incluso en partes por billón, o por trillón). Todas estas sustancias dan a la uva un sabor característico denominado *sabor primario*. El *sabor primario* caracteriza a la variedad de la vitis vinífera. La mayoría de los componentes de sabor se encuentran ubicados en la parte interior de la piel de la uva, es por esta razón por la que el prensado ocupa un proceso fundamental a la hora de proporcionar sabores primarios al vino. En algunos vinos generosos como el jerez, o el fino, existe un pequeño "toque" de sabor salado debido al ambiente salino que rodea la maduración.

En enología existe una distinción entre aroma y bouquet. El aroma es un olor específico proveniente de la variedad de uva empleada, mientras que el bouquet es un olor característico de la forma de procesar el vino. De esta forma, por ejemplo, dos vinos de la misma uva poseen el mismo aroma, pero distinto bouquet (si se han madurado de forma distinta). En muchos vinos los aromas de las uvas con un fuerte tono floral es debido a la presencia de un grupo de sustancias denominados monoterpenoides, los monoterpenoides son un subgrupo de un gran número de compuestos denominados terpenoides, todos ellos derivados de la unidad isopreno ( $[C_5H_8]$ ). Por ejemplo, la uva moscatel posee una gran cantidad de monoterpenos, otras variedades con contenidos en terpenos derivados de la uva moscatel son la Gewürztraminer, la Moscatel de Alejandría, etc. Entre los compuestos que proporcionan aroma se encuentran los glucósidos. En los vinos basados en la uva moscatel se suele hacer que el mosto incremente su contacto con los hollejos (que son las zonas con mayor contenido de terpenoides). Los aromas vegetales (*aromas herbáceos*) en el vino provienen de las pirazinas (otros alimentos que contienen pirazinas son: el café, la cerveza, los espárragos, etc).

Algunas variedades procedentes de América como son: *vitis labrusca* y la *vitis rotundifolia* (así como sus híbridos) poseen un aroma característico que durante muchos años se ha denominado "foxy" (zorrito). Se ha detectado que ese olor corresponde al compuesto: metil antranilato ( $C_8H_9NO_2$ ).



# **CAPÍTULO 5. CLASIFICACIÓN DEL VINO**

La ley del año 2003 -Ley de la Viña y el Vino- y el reglamento sobre los Vinos de la Tierra establecen las distintas clasificaciones, tanto por control y características, como por envejecimiento del vino.

## 5.1. Clasificación según su proceso de elaboración y sus controles

La clasificación de los vinos españoles, para adaptarse a la normativa europea, se divide en dos grandes grupos: los Vinos de Calidad Producidos en Regiones Determinadas (VCPRD) y los Vinos de Mesa (VDM).

### 5.1.1. Vinos de Calidad Producidos en Regiones Determinadas (VCPRD):

Son los de mayor calidad debido a la exigencia y control que se establece en la producción.

- **Vinos con Denominación de Origen Calificada (DOCa)**  
Los vinos de máxima calidad y además mantenida durante un largo periodo de tiempo:
  - Que hayan transcurrido, al menos, diez años desde su reconocimiento como Denominación de Origen.
  - Se comercialice todo el vino embotellado desde bodegas inscritas y ubicadas en la zona geográfica delimitada.
  - Cuenten con un sistema de control desde la producción hasta la comercialización respecto a calidad y cantidad, que incluya un control físico-químico y organoléptico por lotes homogéneos de volumen limitado.
  - Está prohibida la coexistencia en la misma bodega con vinos sin derecho a la DOCa, salvo vinos de pagos calificados ubicados en su territorio.
  - Ha de disponer de una delimitación cartográfica, por municipios, de los terrenos aptos para producir vinos con derecho a la DOCa.
- **Vinos con Denominación de Origen (DO)**  
Vinos con prestigio que proceden de una zona determinada y reglamentado por un Consejo Regulador:
  - Haber sido elaborados en la región, comarca, localidad o lugar determinados con uvas procedentes de los mismos;
  - Disfrutar de un elevado prestigio en el tráfico comercial en atención a su origen.
  - Que su calidad y características se deban fundamental o exclusivamente al medio geográfico que incluye los factores naturales y humanos.
  - Además, han de haber transcurrido, al menos, cinco años desde su reconocimiento como vino de calidad con indicación geográfica.
- **Vinos de Calidad con Indicación Geográfica**

Son vinos elaborados en una región determinada, con uvas procedentes de la misma y cuya calidad, reputación o características se deben al "medio geográfico, al factor humano o a ambos, en lo que se refiere a la producción de la uva, a la elaboración del vino o a su envejecimiento. Se identificarán mediante la mención Vino de calidad de..., seguida del nombre del lugar donde se produzcan".

- **Vinos de Pago**

Nueva categoría dentro de la clasificación de vinos. Son los originarios de un pago" entendiéndose por tal el paraje o sitio rural con características edáficas y de microclima propias que lo diferencian y distinguen de otros de su entorno, conocido con un nombre vinculado de forma tradicional y notoria al cultivo de los viñedos de los que se obtienen vinos con rasgos y cualidades singulares y cuya extensión máxima será limitada reglamentariamente por la Administración competente, de acuerdo con las características propias de cada Comunidad Autónoma, y no podrá ser igual ni superior a la de ninguno de los términos municipales en cuyo territorio o territorios, si fueren más de uno, se ubique.

### *5.1.2. Vinos de Mesa (VDM):*

Vinos de una calidad teóricamente inferior, pero que en ocasiones alcanzan niveles iguales o superiores:

- Vinos de la Tierra. Vinos de determinadas zonas que son perfectamente identificables y con marcadas características locales, siguiendo una normativa vinícola y enológica no tan exigente como la de las DO.
- Vinos de Mesa

## **5.2. Clasificación por envejecimiento y sus características.**

- **Vino Gran reserva:**
  - Los vinos tintos con un periodo mínimo de 60 meses de envejecimiento de los que al menos 18 serán en madera.
  - Los vinos blancos y rosados con periodo de 48 meses, 6 de ellos en madera.
  - Los vinos espumosos de calidad pueden utilizar las indicaciones "premium" y "reserva" y se denominan "gran reserva" los amparados por la denominación cava con un periodo mínimo de envejecimiento de 30 meses desde el tiraje hasta el degüelle.
- **Vino Reserva:**
  - Son los tintos con un periodo mínimo de envejecimiento de 36 meses con al menos 12 en madera y el resto en botella.

- Los vinos blancos y rosados con un periodo de 18 meses, 6 de ellos en madera.
- **Vino de crianza:**
  - Los vinos tintos con un periodo de envejecimiento mínimo de 24 meses de los que al menos 6 serán en madera de roble de 330 litros de capacidad máxima.
  - Los vinos blancos y rosados con un periodo mínimo de 18 meses.
- **Vino de crianza:**
  - Los vinos tintos con un periodo de envejecimiento mínimo de 24 meses de los que al menos 6 serán en madera de roble de 330 litros de capacidad máxima.
  - Los vinos blancos y rosados con un periodo mínimo de 18 meses.
- **Vino viejo:**
  - Vinos con un periodo mínimo de envejecimiento de 36 meses y con un marcado carácter oxidativo debido a la acción de la luz, del oxígeno, del calor o del conjunto de estos factores.
- **Vino añejo:**
  - Vinos con un periodo mínimo de envejecimiento de 24 meses en total en recipiente de madera de roble con una capacidad máxima de 600 litros o en botella.
- **Vino noble:**
  - Vinos con un periodo mínimo de envejecimiento de 18 meses en total en recipientes de madera de roble o en botella.

## 5.3. Clasificación según color

### 5.3.1. Vinos Tintos:

El color del vino proviene del color de la piel de la uva, donde el mosto es dejado en contacto con la piel de la uva hasta que se alcance un color deseado. Para hacer vino tinto, las uvas rojas se aplastan y el mosto pasa a la totalidad del periodo de fermentación y, en muchos casos, a un período de maceración previo o posterior a la fermentación, en contacto con las pieles u hollejos. Toda la materia colorante, además de múltiples compuestos saborizados y taninos, se encuentran en los hollejos de las uvas y la fermentación y maceración se encargan de liberarlos. Esta liberación se intensifica a menudo por técnicas de activación mecánica (remontado), o batido (bazuqueado), durante estos periodos.

### 5.3.2. Vinos Blancos

Son aquellos producidos a partir de uvas verdes o blancas, o también a partir de uvas negras aunque en estos casos nunca se deja al mosto en contacto con la piel de las uvas. El color obtenido en los vinos blancos es de tono verdoso o amarillento.

### 5.3.3. Vinos Rosados

Son producidos dejando el mosto en contacto por un tiempo breve con la piel de las uvas. Suele producirse utilizando uvas rojas que permanecen en contacto con los hollejos (piel de la uva) por breves periodos. Con menor frecuencia se produce mezclando vinos tintos y blancos.



# **CAPÍTULO 6.**

# **POLIFENOLES**

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

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

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

## 6.1. Origen de los polifenoles en plantas

En la formación de polifenoles, participan dos rutas metabólicas, la vía de los policétidos, minoritaria en plantas superiores, y la vía del ácido siquímico. A veces, ambas vías pueden participar conjuntamente en la formación de fenoles complejos. La vía de los policétidos discurre de un modo similar a la de los ácidos grasos; sobre una molécula de arranque, o cebador, que en la mayoría de los casos es el acetil CoA se van adicionando sucesivamente unidades de malonilCoA, con pérdida de un átomo de carbono, de modo que por cada malonil utilizado se integran dos átomos de carbono. Las enzimas que participan se hallan asociadas, formando un complejo multienzimático que cataliza todos los pasos de la biosíntesis, y los compuestos que abandonan el complejo son los ácidos policétidos íntegramente formados. Pero estas estructuras, donde se da una alternancia de átomos con y sin oxígeno, son muy inestables, y en las plantas se estabilizan originando compuestos aromáticos de tipo fenólico.

La ruta del ácido siquímico (figura 2), que es dependiente de luz, se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa 4-P con el fosfoenolpiruvato (PEP), y por diversas modificaciones se obtiene el ácido siquímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en los vegetales. Pero la vía del ácido siquímico normalmente prosigue, y la incorporación de una segunda molécula de PEP conduce a la formación de fenilalanina, que por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en el ácido

transcinámico. Posteriormente, el ácido cinámico es transformado en ácido *p*-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático y la acción de una CoA ligasa lo transforma en *p*-cumaroilCoA, que es el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los polifenoles del vino.

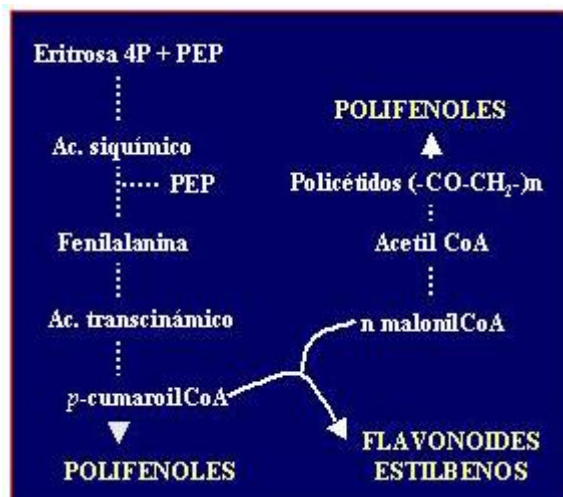


Figura 2. Esquema de la biosíntesis de polifenoles en plantas

La acción del PAL es fundamental para la vida de las plantas y por ello está estrictamente modulada. Entre otros factores, esta enzima es activada por la luz, y depende además de la concentración de diferentes hormonas vegetales. También, en general, la actividad PAL aumenta cuando a los vegetales se les somete a situaciones de estrés, como la falta de agua, infecciones fúngicas o bacterianas y radiaciones UV. Otro factor que activa la enzima PAL es el frío, y por ello, las plantas sometidas a bajas temperaturas suelen presentar coloraciones rojizas en tallos y hojas. También es conocido que al florecer las plantas en primavera que siguen a inviernos muy fríos, las flores desarrollan colores muy intensos.

## 6.2. Clasificación de los polifenoles vegetales

Los fenoles se clasifican en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática que se encuentra sustituyendo el núcleo bencénico; así, podemos encontrar compuestos de tipo C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, derivados del ácido benzoico, como los polímeros del ácido gálico, compuestos que en general se encuentran unidos a azúcares y constituyen el grupo de los taninos hidrolizables (figura 3). De menor significación son los compuestos de tipo C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>, derivados del ácido fenilacético; citamos como ejemplo el ácido homogentísico. El grupo de fenoles simples más extenso es el C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, que constituyen los cinamoil derivados. Estos compuestos, junto con los de tipo C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> y C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>, suelen acumularse en estructuras periféricas del vegetal, como las glándulas de esencias, pues son componentes de los aceites esenciales. Dentro de este grupo, los C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, se encuentran también las cumarinas que son compuestos de tipo bicíclico y están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, de las que se han aislado más de 1000 estructuras diferentes.

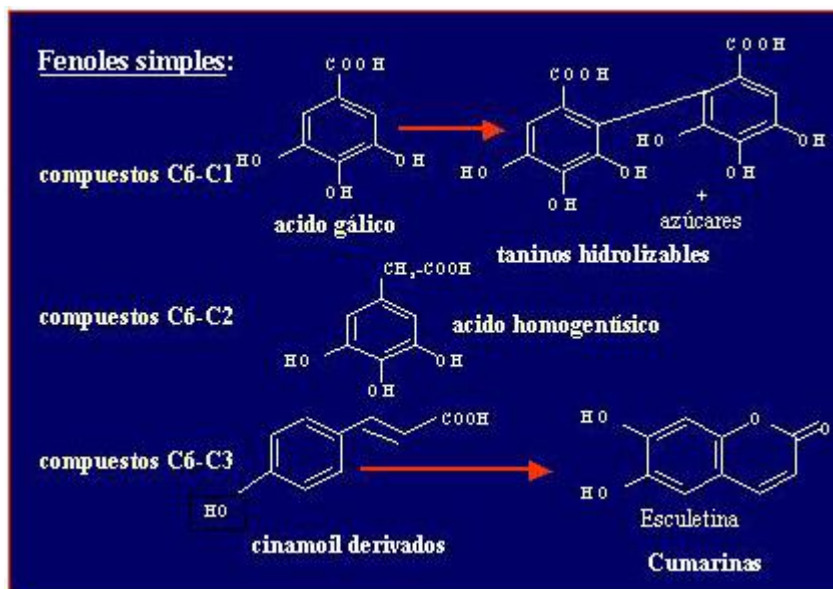


Figura 3. Clasificación de los fenoles simples

Pero en las plantas, con frecuencia, aparecen fenoles de estructuras más complejas como las ligninas, polímeros de alto peso molecular de una distribución universal en las plantas superiores, donde se encuentran reforzando la pared de las células. Por el contrario, aunque el número de estructuras de estilbenos (figura 3) no sea muy amplio (unos 200), estas estructuras se encuentran en un gran número de especies vegetales, localizándose principalmente en la médula del tronco de especies arbóreas como el pino o el eucalipto. La forma molecular más extendida de este grupo es el resveratrol, muy característico de las familias *Pinaceae* y *Vitaceae*. En esta última familia, a diferencia de la mayoría de vegetales, concretamente en el género *Vitis*, el resveratrol se encuentra en tejidos vivos que forman parte de diferentes órganos como las hojas o los frutos. Por ejemplo, en la uva el resveratrol se acumula principalmente en la epidermis, y por ello, las uvas y el vino constituyen una fuente casi exclusiva de resveratrol, en la dieta humana.

Fenoles complejos son también los flavonoides e isoflavonoides, grupo que comprende más de 4000 estructuras químicas ampliamente representadas en la mayoría de las plantas superiores (figura 4). Estos compuestos, están principalmente unidos a azúcares, aunque también se pueden encontrar sus formas libres. La presencia de muchos de ellos es fácilmente reconocible como pigmentos de flores y frutos. En la mayoría de los flavonoides la cadena carbonada que une los anillos A y C se cicla por acción de una isomerasa creando el núcleo del flavano.

Los flavonoides se clasifican en función del grado de oxidación del anillo central (B), siendo las flavonas con 650 estructuras químicas y los flavonoles con más de 1000, las formas moleculares más frecuentes. Este grupo también incluye las proantocianidinas que pueden formar polímeros, que son las catequinas o taninos condensados, pero estos compuestos a diferencia de los polímeros del ácido gálico, no experimentan hidrólisis. En general, los flavonoides son

pigmentos cuya gama de colores comprende del blanco al rojo y los tonos violáceos, aunque hay algunos que no presentan coloraciones.

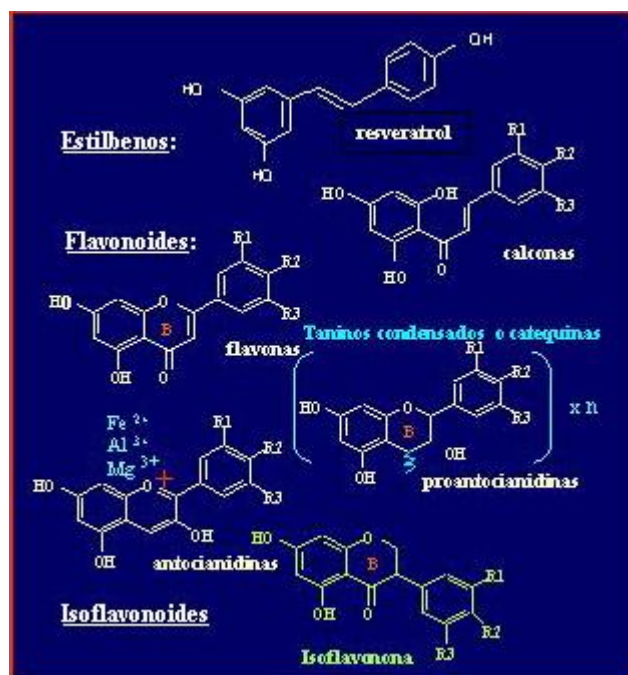


Figura 4. Estructura de los fenoles complejos

De particular interés es el grupo de las antocianidinas, pigmentos muy abundantes en los vinos tintos, pues son responsables de las coloraciones rojas, azules y violetas; en general a pH ácido estos compuestos presentan coloraciones rojizas, mientras que a pH más básicos presentan tonos azulados. Las antocianidinas son especialmente complejas en la familia *Vitaceae*, donde se encuentran de 5 a 6 aglicones y la mayoría están como mono- o di-glucósidos, muchos de ellos acilados en diferentes posiciones. Estos compuestos pasan en parte al vino durante su proceso de elaboración, mayoritariamente en los vinos tintos, y pueden sufrir modificaciones durante el envejecimiento del vino, generando entre otros factores, sabores amargos.

Por migración del anillo C, de la posición 2 a 3 del anillo B se obtiene el grupo de los isoflavonoides que integra más de 230 estructuras, estos compuestos son importantes para los vegetales, porque defienden a las plantas del ataque de patógenos.

### 6.2.1. Distribución de polifenoles en las plantas

Como se ha indicado previamente, los polifenoles no son compuestos exclusivos del vino. La distribución de polifenoles en las plantas es muy amplia y se han encontrado en más del 60% de las especies vegetales donde se ha investigado su presencia. Además, aunque con frecuencia se piense que los flavonoides son pigmentos exclusivos de flores y frutos, también pueden encontrarse en todo el vegetal, incluidas la raíz, el tallo o las hojas.

Obviamente, dada su amplia distribución, muchos de estos compuestos son ingeridos por el hombre pues son componentes de alimentos y bebidas; por ejemplo en Estados Unidos el consumo medio de flavonoides es de 1 g/día y su

procedencia es por este orden: el cacao, los refrescos de cola, el café, la cerveza y el vino. Aunque no se dispone de datos, en España, donde la dieta es más rica en frutas, verduras y el consumo de vino es más habitual, seguramente la ingesta de flavonoides es muy superior.

### 6.2.2. Funciones de los polifenoles en los vegetales

Los fenoles desempeñan importantes funciones fisiológicas en los vegetales, en general y debido a su condición de polifenoles se oxidan con mucha facilidad y actúan como antioxidantes. También de una forma bastante general, los fenoles actúan como inhibidores del crecimiento de las plantas, aunque se han encontrado algunas estructuras, que de forma específica lo activan, al inhibir la degradación de una hormona vegetal que es la auxina. Particularmente, las semillas acumulan importantes cantidades de fenoles en sus cubiertas que actúan como un filtro para que el oxígeno no llegue al embrión, inhibiendo su germinación.

Además, como hemos indicado los fenoles suelen acumularse en las capas más superficiales de los vegetales y captan hasta el 90% de las radiaciones UV, impidiendo los efectos nocivos de estas radiaciones en los tejidos internos de la planta.

Pero las acciones más características de estos compuestos son establecer relaciones químicas de las plantas con su entorno (figura 5). Es decir las relaciones entre plantas, las relaciones con insectos o vertebrados y las relaciones con microorganismos.



Figura 5. Funciones ecológicas de los polifenoles en plantas

Los fenoles, como hemos indicado son componentes de esencias y pigmentos de las flores que confieren aromas y coloraciones atractivas de insectos, con lo que se favorece el proceso de floración, en las plantas polinizadas por insectos. Del mismo modo, los fenoles también confieren aromas y colores a los frutos que los hacen apetecibles para los herbívoros, con lo que se favorece la dispersión de semillas con las heces.

Las plantas compiten entre ellas para preservar sus territorios y en esta lucha (alelopatía), participan los fenoles, como el ácido salicílico, que sintetizan algunas especies vegetales y son tóxicas para otras, impidiendo por ello su desarrollo.

A nivel de microorganismos, las plantas se defienden del ataque de patógenos sintetizando fitoalexinas, mayoritariamente polifenoles, que son tóxicos para los microorganismos y su presencia previene las infecciones. En el género *Vitis* este papel lo desempeña principalmente el resveratrol que es un estilbeno, mientras que en la mayoría del resto de vegetales las fitoalexinas son principalmente isoflavonoides.

También los fenoles protegen a las plantas generando sabores (principalmente amargos) o texturas (los taninos) que resultan desagradables para los herbívoros, por lo que este tipo de animales se nutren de otras plantas.

### 6.3. Mecanismos de acción de los polifenoles

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

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

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

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

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

Cada polifenol actuará por uno o más de estos mecanismos según sus propiedades particulares. En contraste con muchas frutas y verduras, cada una rica en uno o dos polifenoles en particular, en el vino hay muchos polifenoles diferentes. La gran variedad de polifenoles que posee el vino tinto y sus diversas características estructurales, posibilitan distintas propiedades de solubilidad y su

acción como antioxidante para combatir distinto tipo de agentes oxidantes que se generan *in vivo*. Lo anterior, sumado a la capacidad de algunos polifenoles de inhibir o activar enzimas específicas en el organismo contrarias a la oxidación, explica las evidencias epidemiológicas relativas al consumo de polifenoles antioxidantes como protectores de enfermedades crónicas que hoy son la preocupación principal de la salud pública mundial.

## 6.4. Polifenoles del vino tinto

El consumo habitual y moderado de vino, especialmente de vino tinto, puede producir efectos beneficiosos adicionales sobre la morbilidad y mortalidad cardiovascular comparados a los que producirían la misma cantidad de alcohol pero en otras bebidas. El vino tinto es rico en polifenoles, particularmente en quercitinas y resveratrol, los que son buenos candidatos para explicar el supuesto efecto protector del vino. Estudios epidemiológicos que relacionan la ingestión de polifenoles y el riesgo de cáncer y cardiopatía coronaria en humanos se inclinan por lo conveniente de esta práctica.

La concentración de compuestos polifenólicos del vino varía entre 1,80 y 1,06 g/L, con un promedio de 2,57 g para el vino tinto y entre 0,16 y 0,30 g/L para el blanco. Como el contenido total de fenoles de alimentos y bebidas se correlaciona muy fuertemente con su actividad antioxidantes, por su composición en polifenoles y en términos del poder antioxidante, un vaso de vino tinto (150 mL) equivale a 12 de vino blanco, o a 2 tazas de té, 4 manzanas, 5 porciones de cebolla, 3 ½ vasos de cerveza, a 7 de jugo de naranjas o 20 de manzanas.

Sin embargo, la concentración y variedad de los compuestos fenólicos en el vino depende de numerosos factores: clima y terreno, una cosecha temprana o tardía, los diferentes procedimientos del procesado de la uva y del tiempo de fermentación del mosto.

Los compuestos fenólicos del vino incluyen, entre otros, a los ácidos fenólicos (cumarínico, cinámico, cafeico, gentísico, ferúlico y vanílico) y flavonoides (catequinas, quercitina y resveratrol), los que son sintetizados por una vía metabólica común a partir de la fenilalanina. Todos provienen de las uvas moradas, particularmente de su piel, que los producen como una forma de protección contra las relativamente altas temperaturas a que están expuestas.

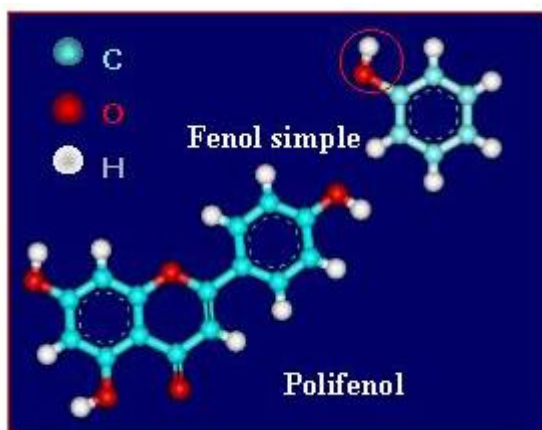
## 6.5. Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino

Actualmente, existe un creciente interés por los polifenoles del vino, pues muchos de estos compuestos han demostrado tener importantes acciones biológicas no sólo en las plantas, sino también en el hombre, por lo que cada vez más, los términos vino y salud intentan asociarse. El vino contiene cantidades relativamente altas de polifenoles de estructuras variadas que proceden principalmente de los hollejos y las semillas, pero la mayoría de estos compuestos no son exclusivos del vino, sino que podemos encontrarlos



en otros vegetales que también se incluyen en la dieta humana.

Los fenoles están representados en las plantas, por un grupo muy amplio de estructuras químicas, más de 8000, y se caracterizan por presentar, todos ellos, el núcleo aromático de benceno, sustituido, como mínimo, con una función hidroxilo (figura 6). Pero en general, los fenoles vegetales presentan estructuras más complejas y pueden ser reconocidos con facilidad como componentes de la madera y pigmentos de flores y frutos.



*Figura 6. Esquema comparativo de la estructura tridimensional de un fenol simple y un polifenol*

## 6.6. Acciones terapéuticas de los polifenoles

Muchos polifenoles presentan actividades terapéuticas y por ello, se han utilizado desde la antigüedad en fitoterapia. Los taninos, por ejemplo, confieren a las plantas que los poseen propiedades astringentes, vasoconstrictoras y antiinflamatorias, pudiéndose utilizar en el tratamiento de las hemorroides. Las antraquinonas son laxantes, algunas calconas actúan como antihelmínticos y muchos isoflavonoides, furanocumarinas y estilbenos son antibacterianos y antifúngicos. Además al igual que en las plantas, en el hombre los polifenoles ingeridos formando parte de alimentos pueden actuar como antioxidantes y algunos estilbenos e isoflavonoides tienen actividad estrogénica dada su similitud estructural con el estrógeno de síntesis dietilestilvestrol. Finalmente destacar que muchos de estos compuestos que se encuentran en proporciones variables en los diferentes tipos de vinos, podrían ser responsables del efecto preventivo que tiene el consumo moderado de vino sobre las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y otras enfermedades degenerativas.

### 6.6.1. Arteriosclerosis y cáncer

Muchos de los componentes del vino han mostrado fuerte actividad antioxidante in vitro.

La oxidación de las LDL mediada por macrófagos es un marcador de la arteriosclerosis temprana y depende del estado oxidativo de las LDL y del de los macrófagos.

Parte de la actividad biológica de los polifenoles se debe a su capacidad de formar parte del sistema antioxidante celular.

La relación inversa entre el consumo de polifenoles de la dieta y enfermedades cardiovasculares puede ser debida a la capacidad de estos compuestos de atenuar la oxidación de las LDL, la formación de las células espumosas y con ello de la arteriosclerosis.

Los polifenoles pueden reducir la peroxidación de los lípidos de las LDL barriendo radicales libres, o provocando quelación de metales de transición, de efectos prooxidantes reconocidos ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ), o economizando a la vitamina E y caretenoides que son los antioxidantes asociados con estas lipoproteínas. Algunos estudios han abordado la posibilidad de que los polifenoles del vino tinto puedan ser incorporados en las LDL y le confiera protección contra el daño oxidativo en la fase posprandial inmediata. Ensayos in vivo sobre el consumo de productos abundantes en polifenoles como el vino tinto encontraron un enriquecimiento posprandial de las LDL con flavonoides polifenólicos y la reducción de forma marcada de su tendencia a la oxidación; además se produjo una disminución de la susceptibilidad de estas lipoproteínas a la agregación, otra modificación que las hace aterogénicas y aún en una comida con carnes rojas (que favorecería la peroxidación de los componentes de las LDL por el carácter prooxidante del hierro), si se acompaña de vino, provoca una reducción en la oxidación de las LDL aún mayor que en condiciones de ayuno.

Por su lado, los macrófagos enriquecidos con compuestos polifenólicos a partir de ensayos in vitro o in vivo también reducen su estado oxidativo y como consecuencia la oxidación de las LDL mediada por estas células.

Sin embargo, otros estudios similares que han utilizado vino o productos fenólicos derivados han presentado resultados negativos y no han logrado elevar la capacidad antioxidante del plasma o la resistencia a la oxidación químicamente inducida de las LDL.

La agregación plaquetaria contribuye tanto al desarrollo de la arteriosclerosis como a la formación aguda de trombos, seguida de embolización y reducción cíclica del flujo sanguíneo en arterias coronarias dañadas. Investigadores de la Universidad de Wisconsin encontraron una reducción en la agregación plaquetaria del 49 % en una experiencia ex vivo en arterias coronarias caninas después de la administración intragástrica de jugo de uvas, no así con el jugo de naranja o toronjas. También el jugo de uvas moradas aumentó la capacidad antioxidante del suero y la protección a las LDL de la oxidación, por lo que el jugo de uvas, aún con la mitad de la cantidad de flavonoides que el vino, puede ser útil como alternativa a este, con la ventaja de no contener alcohol. Se ha señalado que el efecto beneficioso del vino tinto sobre el infarto del miocardio pudiera ser debido en parte a sus propiedades vasodilatadoras, sin embargo, el vino tinto a concentraciones similares a las que se alcanzan por un consumo moderado no producen relajación de las arterias coronarias del conejo, y aunque

la quercetina, uno de sus flavonoides, provoca una marcada relajación endotelio-independiente, lo hace a concentraciones a las que no se llega con un consumo moderado del vino. El efecto vasodilatador dependiente del endotelio (dependiente de óxido nítrico) parece ser específico para vinos producidos "en barrique", posiblemente debido a su alto contenido en sustancias polifenólicas, lo que nos ejemplifica por qué no se puede tener una visión única de los efectos de cualquier tipo de vino tinto.

Algunos de los compuestos polifenólicos del vino reducen el crecimiento tumoral y la carcinogénesis en diferentes modelos experimentales. Mecanismos para estos efectos incluyen la inhibición de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, ciclooxigenasa, fosfodiesterasa y varias proteínas quinasa vinculadas a la señalización celular, además el vino tinto es una de las fuentes importantes de flavonoides dietéticos, los que son probablemente responsables de sus propiedades antimutagénicas asociadas con estos alimentos.

Estos compuestos o sus metabolitos son excretados por la orina, donde protegen a las células de la vejiga de carcinógenos, particularmente en sujetos fumadores, efecto protector que es posible en otras localizaciones.

#### *6.6.2. Resveratrol y quercetina, los flavonoides del vino tinto mas estudiados*

Se ha planteado que la única propiedad cardioprotectora del vino tinto radica en la acción de sus flavonoides, mínimos en el vino blanco, no así en la Champaña. Los mejores flavonoides investigados son el resveratrol y la quercetina, con propiedades antioxidantes más potentes que el alfa tocoferol.

El resveratrol es una fitoaloxina con varias propiedades biológicas y farmacológicas y del que depende el color característico del vino.

In vitro el resveratrol ha mostrado ser un fuerte antioxidante, un fitoestrógeno, un inhibidor de la tumorigénesis, un vasorelajador, un inhibidor de la agregación plaquetaria, un inhibidor de la ciclooxigenasa 2 y de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos.

In vivo también se ha comprobado el efecto antioxidante del resveratrol con LDL de mujeres posmenopáusicas, el efecto antiinflamatorio y antiaterogénico al inhibir la expresión de moléculas de adhesión al endotelio en un modelo experimental murino, que tiene un efecto citostático sobre células tumorales colónicas a través de una supuesta inhibición de la ciclooxigenasa 2 y un efecto como antiagregante plaquetario en conejos hipercolesterolémicos y voluntarios humanos sanos.

Algunos estudios epidemiológicos han puntualizado la función crucial del flavonoide quercetina en la prevención de enfermedades cardiovasculares dada su capacidad antioxidante mostrada en experimentos in vitro. Quercetina es el flavonoide más estudiado y además de otros compuestos de este tipo, modula la

biosíntesis de eicosanoides provocando con ello efectos antiinflamatorios, protege además a las LDL de la oxidación, evita la agregación plaquetaria y promueve la relajación del músculo liso vascular.

También in vitro se ha mostrado que la quercetina tiene propiedades antiproliferativas y antimutagénicas, sin embargo, los datos in vivo sobre su absorción, biodisponibilidad y metabolismo después de su administración en humano son escasos y contradictorios para esclarecer si puede ser útil como agente protector o curativo después de su ingestión. Sólo por poner un ejemplo, la absorción después de la administración por vía oral ha sido reportada entre 0 y más del 50 %, inconsistencias que podrían ser parcialmente atribuidas a la carencia de una metodología analítica lo suficientemente sensible y específica, por lo que los datos disponibles son aún insuficientes para aclarar si la quercetina tiene algún efecto protector como parte de los componentes del vino tinto y otros productos vegetales.

### *6.6.3. Efectos diferenciales de los componentes del vino: etanol y/o polifenoles*

El vino contiene esencialmente agua, etanol, ácidos orgánicos, aldehidos, cetonas, ésteres y compuestos fenólicos. La biodisponibilidad del etanol se conoce muy bien, y la de los diferentes compuestos fenólicos también ha sido ampliamente estudiada, pero todavía no se ha relacionado con los efectos saludables o perjudiciales del vino.

#### **Etanol**

El consumo excesivo de etanol tiene **efectos tóxicos** sobre el sistema cardiovascular y causa hipertensión arterial, arritmias cardíacas, muerte súbita y una afectación del miocardio que se conoce como **miocardiopatía alcohólica**. No obstante, el alcohol no produce los mismos efectos sobre todos los pacientes, de modo que algunos sujetos parecen ser más sensibles a los efectos tóxicos del alcohol como las mujeres (Urbano-Márquez A, et al, 1995) o los familiares de pacientes con miocardiopatía alcohólica (Estruch R, 1995). Estos resultados sugieren que existen diferencias genéticas en la población que condicionaría una mayor o menor susceptibilidad a los efectos beneficiosos de las bebidas alcohólicas.

#### **Polifenoles**

Los polifenoles contenidos en el vino se dividen en:

- 1). No flavonoides, que incluye fenoles no carboxílicos, ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos) y estilbenos, con el resveratrol como máximo representante
- 2). Flavonoides, que incluyen flavonas (apigenina), flavanoles (catequina y proantocianidina), flavonoles (quercetina, kaempferol y myrecitina) y antocianidinas. Estos productos proceden de la piel de la uva y tienen gran importancia enológica al dar el color, esencia y sabor al vino (tinto). Desde el punto de vista biológico, se ha comprobado que en estudios tanto in vitro como ex vivo que estos compuestos (polifenoles) tienen un efecto antioxidante muy superior a la vitamina E (Diaz MN, et al.1997). En este mismo sentido, las propiedades antioxidantes de los polifenoles podrían retrasar el inicio de la

aterogénesis al reducir la oxidación de las partículas de LDL, un paso fundamental en la aterogénesis. En este mismo sentido, se ha observado que el consumo moderado de vino en humanos (Reaven PD, et al. 1993) o la administración de polifenoles a animales de experimentación (Steinberg D, et al.1997) retrasa la oxidación de las LDL, reduce la concentración de malon dialdehído en plasma y en las propias partículas de LDL (un parámetro muy sensible sobre el estado de oxidación), e incluso reduce la progresión de distintos aspectos de la arteriosclerosis aórtica en animales extremadamente sensibles a esta enfermedad.

Sin embargo, los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de los compuestos fenólicos in vivo dependen de su absorción, metabolismo y capacidad de excreción en el organismo. Todavía se conoce poco sobre la biodisponibilidad de los fenoles de la dieta y si pueden ser absorbidos por el organismo para ejercer su acción protectora donde sea necesario. Los polifenoles, que han demostrado un papel fisiológico, en estudios llevados a cabo in vitro, sólo podrán ser verdaderamente efectivos si pueden llegar a los tejidos en concentraciones suficientes que den lugar a un efecto biológico. Por consiguiente, es esencial conocer la absorción, el metabolismo y acumulación de estos polifenoles del vino en el organismo humano y estudiar las bases científicas que sustenten los mecanismos implicados en su potencial beneficio para la salud así como en la prevención de enfermedades, mediante estudios de biodisponibilidad in vivo. El resveratrol es uno de los compuestos fenólicos más ampliamente estudiado ya que se considera el principal responsable de los efectos beneficiosos del vino en la salud humana. Además este compuesto nos puede servir como indicador del consumo de vino (Raul-Zamora et al. 2009). El resveratrol también puede encontrarse en uva, cacahuets pistachos y frutos del bosque pero como las cantidades son muy inferiores a las encontradas en vino la medida de resveratrol y sus metabolitos en orina se considera como un biomarcador óptimo del consumo de vino tinto (Raul-Zamora et al. 2009)

Con el objetivo de investigar si los efectos beneficiosos del vino tinto se debían a la presencia de etanol o de compuestos fenólicos se diseñó el siguiente estudio: se analizaron los efectos de una dosis moderada de vino tinto (30 gramos al día durante 1 mes) y de la misma cantidad de etanol en forma de ginebra (bebida alcohólica con un contenido indetectable de polifenoles) en 40 varones sanos. En este estudio se comprobó que el consumo de ginebra se acompañó de aspectos positivos (reducción de la tensión arterial y la concentración de fibrinógeno, y aumento del HDL -colesterol bueno-, entre otros) pero también negativos (reducción del ácido fólico sérico y aumento de la expresión de determinadas moléculas de adhesión LFA-1, VLA-4 e ICAM-1). En cambio, después del consumo del vino tinto sólo se apreciaron cambios positivos para el sistema cardiovascular (reducción del fibrinógeno, aumento del HDL-colesterol, disminución del estado de oxidación sérica, entre otros). Estos resultados sugieren que el vino tiene un mayor efecto protector sobre el sistema cardiovascular que la ginebra y que el consumo moderado de vino tinto tiene un efecto anti-inflamatorio sobre el sistema cardiovascular. Sin embargo se desconoce hasta qué punto este efecto es debido al etanol o a los compuestos fenólicos que contiene.



# **CAPÍTULO 7. MÉTODOS ANALÍTICOS**

## 7.1. Cromatografía líquida de alta eficacia

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

### 7.1.1. Principal

En la *HPLC isocrática* el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como *elución en gradiente*. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. En el ejemplo, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas por tal de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.



### 7.1.2. Tipos de HPLC

#### a) Cromatografía de fase normal

La cromatografía de fase normal o "Normal phase HPLC" (NP-HPLC) fue el primer tipo de sistema HPLC utilizado en el campo de la química, y se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención.

La fuerza de interacción no sólo depende de los grupos funcionales del compuesto de interés, sino también en factores estéricos de forma que los isómeros estructurales a menudo se pueden diferenciar el uno del otro. La utilización de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención de los compuestos mientras que los disolventes más hidrofóbicos tienden a aumentar el tiempo de retención.

La NP-HPLC cayó en desuso a los años setenta con el desarrollo del HPLC de fase reversa o *Reversed-phase HPLC* debido a la falta de reproductibilidad de los tiempos de retención puesto que los disolventes prácticos cambiaban el estado de hidratación de la sílica o alúmina de la cromatografía.

#### b) Cromatografía de fase reversa

La HPLC de fase reversa (RP-HPLC) consiste en una fase inmóvil apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con  $\text{RMe}_2\text{SiCl}$ , donde la R es una cadena alquil tal como  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  ó  $\text{C}_8\text{H}_{17}$ . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta

con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida.

Aparte de la hidrofobicidad de la fase móvil, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como que la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón como el fosfato de sodio para controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquiera resto de silica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

Las columnas de fase reversa se echan a perder con menor facilidad que las columnas de silica normales. Aun así, muchas columnas de fase reversa están formadas por silica modificada con cadenas alquil y no se deben utilizar nunca con bases en medio acuoso puesto que éstas podrían dañar el esqueleto de silica subyacente. Las columnas se pueden utilizar en ácidos en medio acuoso pero no deberían estar expuestas demasiado tiempo al ácido porque puede corroer las partes metálicas del aparato de HPLC.

#### c) Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular, también conocida como cromatografía por filtración en gel, separa las partículas de la muestra en función de su tamaño. Generalmente se trata de una cromatografía de baja resolución de forma que se suele utilizar en los pasos finales del proceso de purificación. También es muy útil para la determinación de la estructura terciaria y la estructura cuaternaria de las proteínas purificadas.

La cromatografía de filtración molecular es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso molecular, o más precisamente, según su radio de Stokes.

En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. A los fines prácticos, la columna se empaqueta con pequeñas partículas esféricas formadas por esos polímeros entrecruzados. En consecuencia, estas partículas son porosas, y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar a esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta.

#### d) Cromatografía de intercambio iónico

En la cromatografía de intercambio iónico, la retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase

estacionaria. Los iones de la misma carga son excluidos mientras que los de carga opuesta son retenidos por la columna. Algunos tipos de intercambiadores iónicos son: i) Resinas de poliestireno, ii) intercambiadores iónicos de celulosa y dextranos (geles) y iii) Silica porosa o vidrio de tamaño de poro controlado. En general los intercambiadores iónicos favorecen la unión de iones elevada carga y radio pequeño. Un incremento en la concentración del contraión (respeto a los grupos funcionales de la resina) reduce el tiempo de retención. Un incremento en el pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio catiónico mientras que una disminución del pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio aniónico. Este tipo de cromatografía es ampliamente utilizado en las siguientes aplicaciones: purificación de agua, concentración de componentes traza, *Ligand-exchange chromatography*, *Ion-exchange chromatography of proteins*, *High-pH anion-exchange chromatography of carbohydrates and oligosaccharides*, etc.

e) Cromatografía basada en bioafinidad

Este tipo de cromatografía se basa en la capacidad de las sustancias biológicamente activas de formar complejos estables, específicos y reversibles. La formación de estos complejos implica la participación de fuerzas moleculares como las interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre las partículas de la muestra y la fase estacionaria.

### 7.1.3. Parámetros

f) Diámetro interno

El diámetro interno de una columna de HPLC es un aspecto crítico que determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna y también influye en su sensibilidad. Las columnas de diámetro interno más grande (>10 mm) se utilizan normalmente en la purificación de compuestos para su utilización posterior. En cambio, las columnas de diámetro interno menor (4-5 mm) se utilizan en el análisis cuantitativo de las muestras, y se caracterizan por el aumento la sensibilidad y la minimización del consumo de disolventes que conllevan. Estas columnas se suelen denominar columnas de rango analítico y normalmente están asociadas a un detector UV-VIS. Aparte, existen otros tipos de columnas, como las de tipo capilar, con un diámetro inferior a 0.3 mm, utilizadas principalmente en espectrometría de masas.

g) Medida de las partículas

La mayoría de HPLC tradicionales se realizan con una fase estacionaria unida al exterior de partículas esféricas de silica. Estas partículas pueden tener diferentes medidas, siendo las de 5 μm de diámetro las más utilizadas. Partículas más pequeñas ofrecen una mayor superficie y una mejor separación, pero la presión que se requiere por obtener una velocidad lineal óptima aumenta de forma inversamente proporcional al cubo del diámetro de la partícula. Esto significa que disminuir la medida de las partículas a la mitad, aumentaría la resolución de la columna, pero a la vez, aumentaría la presión necesaria en un factor de ocho.

h) Tamaño de poro

Muchas fases estacionarias son porosas para proporcionar una mayor superficie. Los poros pequeños proporcionan una mayor superficie mientras que los poros

de mayor medida proporcionan una cinética mejor, especialmente para los compuestos de tamaño más grande; por ejemplo, una proteína que sea ligeramente más pequeña que el tamaño de los poros puede entrar, pero difícilmente saldrá con facilidad.

i) Presión de la bomba

La presión de las bombas es variable según el modelo y fabricante, pero su rendimiento se mide en su habilidad para generar un flujo constante y reproducible. La presión puede lograr valores de hasta 40 MPa (o unas 400 atmósferas). Los aparatos más modernos de HPLC incorporan mejoras para poder trabajar a presiones más altas y, por lo tanto, poder utilizar partículas de tamaño más pequeño en las columnas (< 2 micrometros). Estos nuevos aparatos, denominados *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) pueden trabajar con valores de hasta 100 MPa de presión (unas 1000 atmósferas). (Hay que tener en cuenta que las siglas UPLC son una marca registrada de Waters Corporation aunque a veces se utilizan de forma general para designar este tipo de aparatos.)

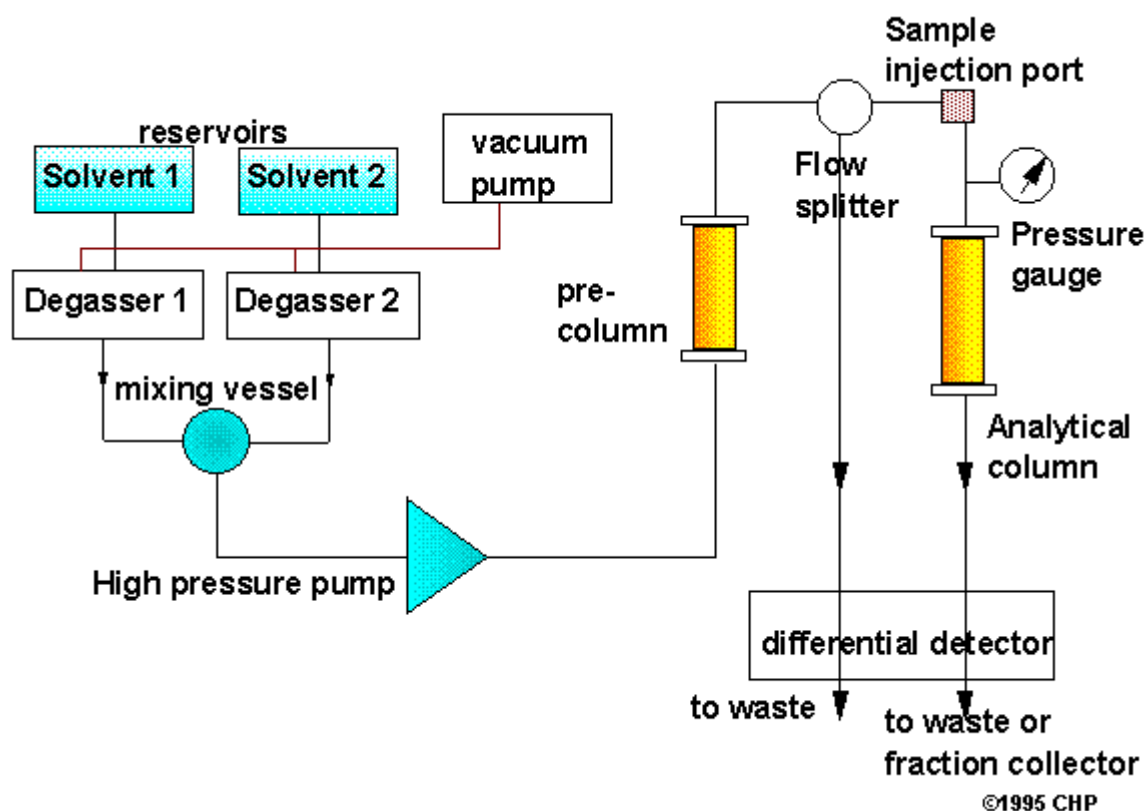


Figura 7. Diagrama Básico de un sistema de HPLC

## 7.2. Elección del Solvente

Características:

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

## 7.3. Filtración y Desgasificación de solventes

En la actualidad HPLC ha llegado a ser una de las Técnicas del Laboratorio Moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. Como en todas las técnicas analíticas, los pequeños problemas a la larga pueden llegar a tener un mayor impacto en la exactitud y durabilidad del sistema. Aun con la evolución de los cromatografos líquidos en la era de la computadora, hay aun problemas que ésta no puede resolver.

Hasta los Solventes para HPLC, todos filtrados cuidadosamente en la fábrica, pueden acumular partículas en suspensión que pueden ser perjudicial a los componentes del sistema HPLC. Estas partículas en suspensión pueden venir de varias fuentes, incluso de la exposición al polvo en el aire durante el trasegado de solvente en el depósito para solvente, la exposición a particulares del aire durante el almacenamiento del solvente en el depósito del solvente, la degradación lenta del recipiente solvente, o de condensación y polimerización del solvente. Las partículas pueden ocasionar costosos daños a la bomba HPLC, al guarda columnas, y en general causar desgaste del sistema de HPLC. Los fabricantes de los instrumentos tienen en cuenta este problema y recomiendan que se filtre y desgasifique los solventes HPLC antes de usarlos.

En el instante que se abre una nueva botella de solvente para HPLC se expone el interior del solvente a la atmósfera y empieza a acumular gases disueltos que se encuentran en la atmósfera. El trasegado del solvente en el depósito solvente y su almacenamiento en estos depósitos más este fenómeno. El Oxígeno Disuelto que constituye el 21% de la atmósfera puede producir mayor interferencia en los

detectores de fluorescencia y electroquímicos. El Nitrógeno Disuelto es el otro componente de la atmósfera que puede producir burbujas en la columna de HPLC y cuando el solvente entra al detector produce picos falsos y desviaciones de la línea base. El Dióxido de Carbono disuelto algunas veces puede ser la causa de los cambios de pH en el sistema de solvente.

### *7.3.1. Métodos de Filtración de Solventes en HPLC*

Hay tres (3) métodos comunes que se utilizan hoy para la filtración previa de los Solventes en HPLC:

Filtro a la Entrada del Solvente

Filtración al Vacío

Filtración en Línea

### *7.3.2. Métodos de Desgasificación de Solventes en HPLC*

Existen cuatro (4) métodos comunes usados para desgasificar solventes en HPLC previos a su uso:

Sonificación

Burbujear Helio

Desgasificación Electrónica en la Línea del Flujo

Desgasificación al Vacío en Línea

### *7.3.3. Bombas*

Requisitos o aspectos más importantes que debe reunir una bomba o sistema de bombeo:

- Debe producir presiones estables hasta 6000 psi.
- Mantener el flujo libre de pulsaciones
- Generar intervalos de caudales de flujo (0,1 a 10 ml/min)
- Control y reproducibilidad del flujo de solvente
- Componentes de la bomba resistentes a la corrosión

Las bombas que se usan en HPLC se pueden clasificar según su funcionamiento y diseño en:

- Mecánicas
  - Recíprocantes
  - De desplazamiento continuo
- Neumáticas

### *7.3.4. Programación del Solvente*

Existen dos métodos de programación de Solvente en HPLC:

- Isocrático
- Gradiente de Elución. Es un término que se utiliza para describir el proceso mediante el cual se cambia la composición de la fase móvil. Pueden efectuarse de dos maneras:
  - A baja presión
  - A alta presión

Cuando se desarrolla un análisis usando el método de gradiente se debe tener presente dos objetivos:

- Obtener la mejor resolución de los componentes de la muestra en el menor tiempo posible.
- Asegurar alta precisión y exactitud.

Para obtener buenos resultados con el método de gradiente debemos seguir 5 pasos fundamentales:

- Determinar la composición inicial y final del solvente
- Ajustar el tiempo del gradiente
- Determinar la forma del gradiente (lineal, cóncava o convexa)
- Ajustar la velocidad del flujo para mejorar la resolución
- Regresar a las condiciones iniciales la columna.

### *7.3.5. Sistemas de Inyección de muestra*

Estos sistemas han variado durante la historia del sistema de HPLC, en un principio se utilizaba la inyección de la muestra con jeringas de alta presión, las cuales ya están de desuso. Hoy se utiliza el sistema de Válvulas inyectoras.

### *7.3.6. Columnas y Fases Estacionarias*

Tipos de Columna:

Fuentes de daño de una columna de HPLC:

- Obstrucción por partículas pequeñas en los solventes o fases móviles
- Obstrucción por materiales no eluidos en las muestras
- Variación de las características de retención por incremento de materiales no eluidos

### *7.3.7. Detección*

La eficiencia de un detector cromatográfico depende de la relación entre la cantidad física medida y la composición del efluente, así como también de las características de la señal de transferencia.

Los tipos de detectores en HPLC se clasifican en:

- Detectores basados en una propiedad de la fase móvil . *Ejemplo: Detector de Índice de Refracción*
- Detectores basados en una propiedad de la sustancia a separar. *Ejemplo: Detector de Fluorescencia, Detector Ultravioleta*

Los detectores más utilizados en HPLC son:

- Detector UV. Hay básicamente tres tipos:
  - Detector de Longitud de Onda Fija
  - Detector de Longitud de Onda Variable
  - Detector de Arreglo de Diodos
- Detector de Índice de Refracción. Existen muchos diseños de estos detectores, pero solamente existen ahora dos tipos:
  - Tipo Deflexión
  - Tipo Fresnel
- Detector de Fluorescencia. Este detector solamente puede detectar compuestos que tengan fluorescencia nativa o inducida por derivación.
- Detector de Fluorescencia Inducida por Laser
  - Según la Fuente de Excitación
  - Según el sistema óptico
- Detectores Electroquímicos. Pueden ser clasificados en tres tipos:
  - Detector Amperométrico
  - Detector Conductimétrico
  - Detector Potenciométrico

Se deben tener algunas precauciones con los detectores electroquímicos para asegurarse análisis reproducibles:

- Chequear que estén conectados adecuadamente a tierra la bomba, el detector y registrador (integrador).
- Usar bombas reciprocantes de doble pistón
- Mantener en todo momento el flujo de la fase móvil en el detector.
- Operar con el voltaje adecuado
- Monitorear la altura de los picos para observar cambios en la eficiencia que nos indique la necesidad de reacondicionar los electrodos.



- Tener electrodos de referencias extras en solución 3M de NaOH y reemplazar el electrodo de referencia en la celda 1 ó 2 veces a la semana.
- Desconectar el detector electroquímico cuando este limpiando las columnas.
- Utilizar agua, buffers y solventes orgánicos de alta pureza.

### 7.3.8. Problemas más comunes encontrados en HPLC

Esta es una lista de los problemas normalmente encontrados en HPLC, sus posibles causas posibles, y cómo solucionarlos.

- Presión Alta
  - *Posible causa:* Obstrucción de la Columna de HPLC o Guarda Columna por partículas.
  - *Solución:* Invierta la Columna y Enjuagar con solvente, teniendo la columna desconectada del detector. Si esto no funciona reemplace el fritado a la entrada de la columna. Si la presión sigue alta reemplace la columna.
  - *Solución a largo plazo:* Asegúrese que todas las fases móviles se filtren propiamente antes que entren a la bomba de HPLC. También filtre todas las muestras antes de inyectarlas.
- Pérdida de la Resolución
  - *Posible causa:* Obstrucción de la Columna de HPLC ó del Guarda Columna por partículas.
  - *Solución:* vea la sección de Presión Alta
  - *Solución a largo plazo:* Filtrar todo antes que se introduzcan las fases móviles en el sistema de HPLC.
- Picos Hendidos
  - *Posible causa:* Obstrucción de la Columna de HPLC o del Guarda Columna por partículas.
  - *Solución:* Marcha atrás columna roja con presión baja está al lado de abre. Si es necesario reemplace el fritado de la entrada o la columna.
  - *Solución a largo plazo:* Filtrar todo antes que se introduzcan las fases móviles en el sistema de HPLC.
- Variación en los Tiempos de Retención
  - *Posible causa:* Aire atrapado en la bomba debido a gases disueltos en fase móvil.
  - *Solución:* Bomba primera y está fases seguras tan móviles es propiamente [degassed]

- *Solución a larga plazo:* Asegúrese fase tan móvil está propiamente y adecuadamente desgasificada. Si usa desgasificación electrónica en línea asegura esa cadencia del flujo no es demasiado alto para evita [degassing] completo.
- Variaciones de la Línea Base
  - *Posible causa:* Burbujas del aire atrapados en la celda del detector debido a una mala desgasificación de los solventes de la fase móvil.
  - *Solución:* Asegúrese que todas las fases móviles estén debidamente desgasificadas y considerar el uso de un restrictor de la presión a toma de corriente del detector.
- Línea Base con mucho Ruido
  - *Posible causa:* Aire atrapado en celda del detector o en la bomba.
  - *Solución:* Enjuague el sistema y purgue la bomba de HPLC. Use Solventes desgasificados adecuadamente para mantener constante la velocidad de flujo de la fase móvil del sistema.
- Picos Falsos (Detectores Electroquímicos y de Fluorescencia)
  - *Posible causa:* Oxígeno Disuelto
  - *Solución:* Desgasificar adecuadamente las fases móviles para reducir la concentración de oxígeno disuelto.
  - *Solución a largo plazo:* Agregar un sistema de filtración al vacío en línea. Periódicamente chequear el nivel de oxígeno disuelto.
- Baja ó Ninguna Presión
  - *Posible causa:* Trabajar con bombas, sellos ó pistones expuestos por mucho tiempo a partículas en suspensión en la fase móvil.
  - *Solución:* Reemplace los sellos o pistones, si es necesario.

## 7.4. Electroforesis capilar

La *electroforesis capilar* es una técnica de separación utilizada en distintas áreas (química, bioquímica, etc.) para separar las diferentes moléculas presentes en una disolución de acuerdo a la relación masa/carga de las mismas. La separación se lleva a cabo en un tubo hueco de diámetro muy pequeño, de ahí que reciba el nombre de capilar. Dentro de este capilar se encuentran la disolución que contiene los analitos o las moléculas a separar y el tampón o medio electrolítico que es el encargado de conducir la corriente. Como se ha dicho la separación se lleva a cabo según la relación masa/carga de las distintas moléculas. Para que esto sea posible es necesario aplicar una diferencia de potencial entre los dos extremos del capilar que hará que las moléculas se muevan hacia un extremo u otro del capilar (movilidad electroforética) (las moléculas cationicas hacia el polo negativo y las anionicas hacia el polo positivo) y que se vayan separando entre sí. Además existe dentro del capilar otro fenómeno denominado flujo electroosmótico que se da debido a que la superficie interna del capilar está

cargada. El flujo electroosmótico es el mismo dentro de todo el capilar y afecta de igual forma a todas las moléculas arrastrándolas hacia uno de los extremos. Así la separación se verá afectada por el flujo electroosmótico y por la movilidad electroforética de cada una de las moléculas.

La eficacia y la velocidad de la separación se pueden mejorar mediante la optimización de diferentes factores como son la temperatura, el voltaje aplicado, el medio de separación, el disolvente en el que se encuentra disuelta la muestra, etc. Generalmente se obtienen tiempos de análisis bastante bajos si se compara con otras técnicas separativas como la cromatografía de gases o la de líquidos. Además el consumo de muestra y reactivos es muchísimo menor por lo que se la puede considerar una técnica más limpia. Es muy versátil ya que se puede emplear para separar cualquier tipo de compuesto eligiendo bien el detector.

Se puede acoplar a un detector UV, de fluorescencia, un espectrómetro de masas, etc.

#### *7.4.1. Procedimiento experimental*

La electroforesis capilar es una técnica de separación basada en la diferente velocidad de migración de las distintas especies cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. Como ya se ha comentado, la separación se lleva a cabo en un capilar de sílice fundida de diámetro muy pequeño (10-200µm). El uso de estos capilares conlleva múltiples ventajas:

- Los capilares son anticonvectivos en sí mismos y, por tanto, no es necesaria la utilización de un gel soporte como medio.
- El calor generado al pasar la corriente eléctrica (efecto Joule), que daría lugar a problemas de gradientes de temperatura no uniformes, cambios locales de viscosidad, es fuertemente reducido, ya que la disipación de calor es muy efectiva.
- En consecuencia, pueden aplicarse altos voltajes y, por tanto, se consigue una reducción del tiempo de análisis y altas eficiencias.
- Se tiene la posibilidad de realizar la detección en columna.

Un esquema del instrumento utilizado en CE se muestra en la figura 8. La instrumentación básica es muy simple, constando de una fuente de voltaje, un capilar, recipientes de muestra y tampón, y un detector. Ésta puede ser mejorada gracias a la automatización, control de temperatura en muestras y capilar, muestreador automático, software para el tratamiento de datos, etc. Siguiendo el esquema de la figura 8 se puede observar como el capilar está en contacto con los viales de entrada (inlet) y salida (outlet), los cuales a su vez contienen los electrodos entre los que se aplica la diferencia de potencial. El capilar está lleno con la misma solución contenida en ambos viales. A esta solución se le denomina electrólito de fondo (BGE, de background electrolyte) y

constituye el medio de conducción de la corriente eléctrica. El BGE suele ser un tampón adecuado a las necesidades del tipo de muestra a analizar.

La muestra es inyectada en el interior del capilar reemplazando el vial de entrada por el de la muestra y posteriormente es reemplazado de nuevo por el vial de entrada para aplicar la diferencia de potencial entre ambos extremos del capilar. La separación tiene lugar a lo largo del tiempo y los distintos analitos son habitualmente detectados a través de la pared del capilar.

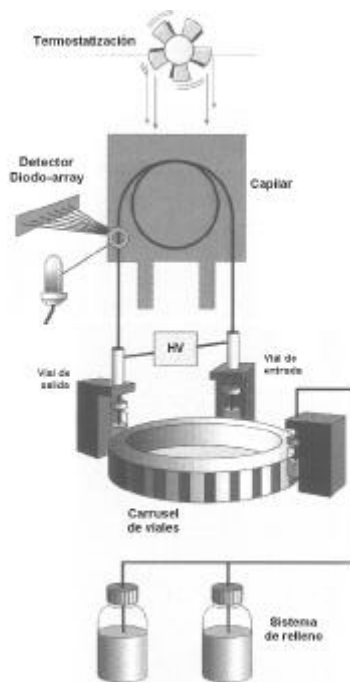


Figura 8. Esquema de un instrumento de electroforesis capilar

#### 7.4.2. Fundamentos de la separación

La velocidad de un ión sometido a la acción de un campo eléctrico viene dada por la expresión:

$$v = \mu_{ep} E \quad (1)$$

donde  $\mu_{ep}$  es la movilidad electroforética del ión, y E el campo eléctrico aplicado.  $\mu_{ep}$  depende a su vez de la carga del ión (q), de su radio (r) y de la viscosidad de la solución ( $\eta$ ), según la expresión:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

La velocidad con la que viaja un determinado ión es mayor cuanto mayor es su carga y menor su radio. Si la sustancia está presente en solución en diferentes formas en equilibrio dinámico (por ejemplo, debido a un equilibrio ácido-base), la movilidad electroforética es una combinación de las movilidades de las i posibles especies en equilibrio ponderada por la fracción molar de cada i especie ( $\alpha_i$ ).

$$\mu_{ep} = \sum_{i=0}^n \alpha_i \mu_i \quad (3)$$

No obstante la movilidad electroforética real no coincide con lo predicho por la ecuación 2 debido a la existencia del flujo electrosmótico (EOF). El EOF es el flujo de líquido en el interior del capilar originado por la carga eléctrica negativa existente en la pared interna del capilar. En el caso de capilares de sílice fundida esta superficie de carga es generada por la ionización de los grupos silanol.

La carga en la superficie interna del capilar atrae hacia sí iones positivos que forman una capa adyacente fija por adsorción (capa de Stern), y una capa difusa y móvil, también positiva (capa de Gouy-Chapman).

Los iones de la capa difusa experimentan una fuerza paralela a la superficie y migran hacia el cátodo al aplicar una diferencia de potencial entre los extremos del capilar. Estos iones, al estar solvatados, generan un movimiento global del fluido hacia el cátodo. Este movimiento del fluido constituye el EOF (figura 8).

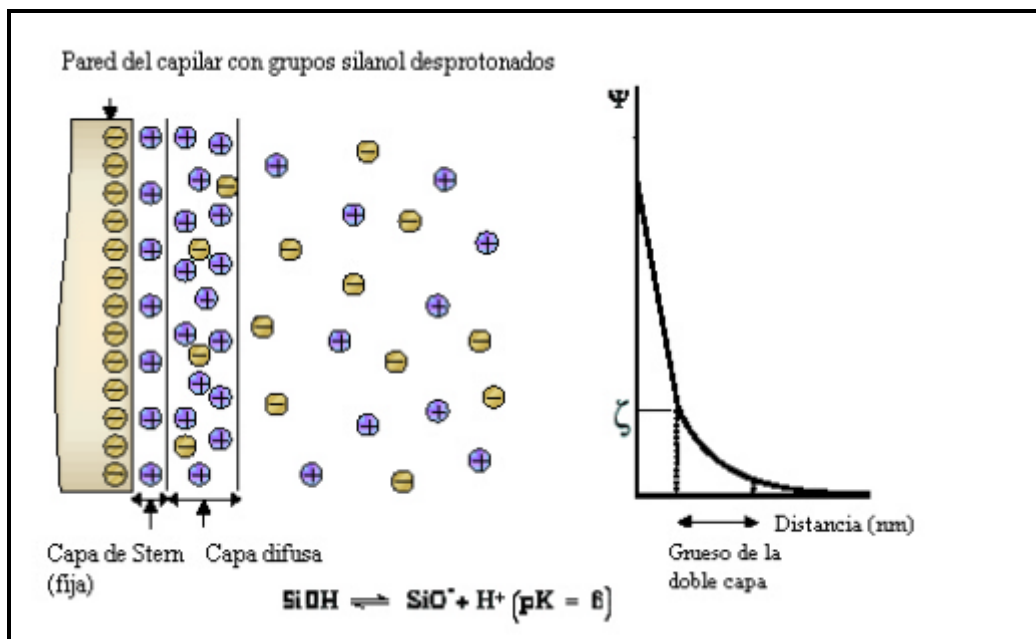


Figura 8. Formación de la doble capa electroquímica que genera el EOF.

La movilidad electrosmótica ( $\mu_{eo}$ ) viene dada por la siguiente expresión:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad (4)$$

Donde  $\eta$  y  $\epsilon$  son la viscosidad y la constante dieléctrica de la solución, respectivamente, y el llamado potencial zeta. El potencial zeta es el potencial existente en el plano de separación de ambas capas, y depende esencialmente de la naturaleza y cantidad de iones en la superficie interna del capilar. Este potencial decrece de forma lineal dentro de la capa de Stern, pero decrece exponencialmente dentro de la capa difusa (figura 9).

El perfil del EOF es plano como consecuencia de que la doble capa es muy delgada y la fuerza conductora está uniformemente distribuida a lo largo de todo el capilar. El ensanchamiento de banda debido a la a la transferencia de masa es mínimo lo que permite obtener altas resoluciones en la separación. En los sistemas conducidos por presión (HPLC, por ejemplo) el perfil del flujo es parabólico, dando lugar a picos más anchos, como se aprecia en la figura 9.

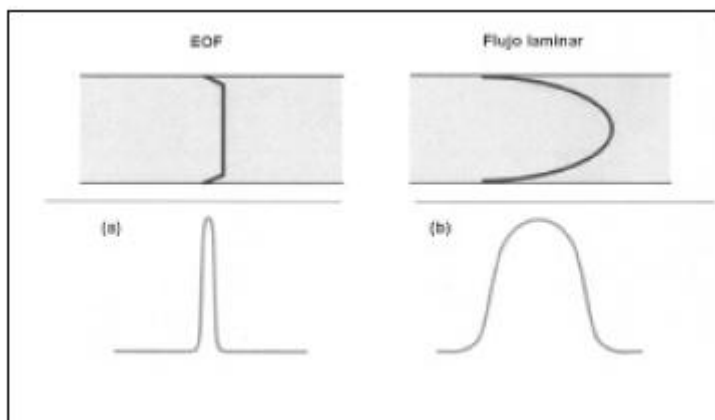


Figura 9. Perfil del flujo en CE (a) y HPLC (b)

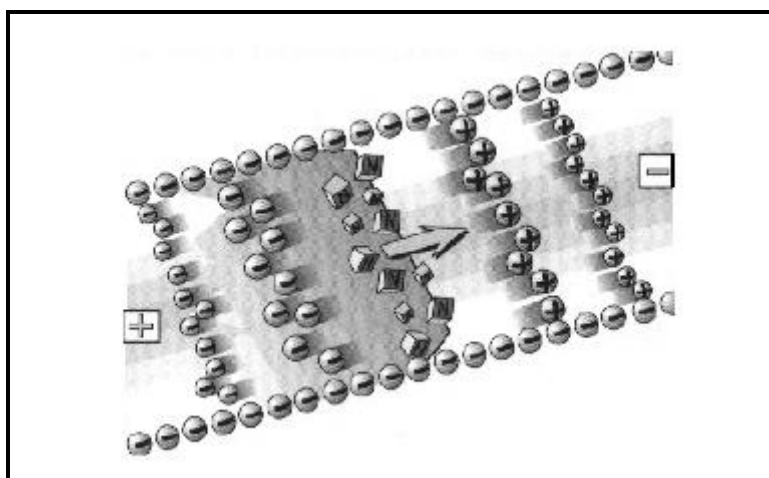
El EOF puede controlarse de varias maneras; también puede ser suprimido e incluso invertido, en función de las necesidades de la separación. En el caso de que exista EOF se modifica la velocidad total con la que los iones se mueven a través del capilar de la forma:

$$v = (\mu_{eo} \pm \mu_{ep})E \quad (5)$$

El termino  $\mu_{eo} \pm \mu_{ep}$  se denomina movilidad aparente ( $\mu_a$ ) y puede calcularse a partir de datos experimentales según:

$$\mu_a = \frac{L}{tV} \quad (6)$$

Siendo  $l$  la longitud efectiva medida desde el extremo del *inlet* a la ventana de detección,  $L$  la longitud total del capilar,  $t$  el tiempo de migración del analito y  $V$  el voltaje aplicado. Si el EOF es mayor que las movilidades electroforéticas ( $\mu_{ep}$ ) de los aniones, éstos se pueden separar en una misma inyección junto a los cationes y las moléculas neutras contenidas en la muestra. Todos ellos se mueven hacia el cátodo, si la carga de la pared del capilar es negativa. Los cationes son atraídos electroforéticamente hacia el polo negativo y a esta velocidad se le suma la del EOF, en el mismo sentido. Todas las moléculas neutras migran a la velocidad del EOF y, por último, los aniones migran con una velocidad igual a la diferencia entre la velocidad del EOF y sus velocidades electroforéticas hacia el ánodo. La diferencia en los tiempos de migración dentro del grupo de los cationes o dentro del de los aniones viene dada por la por la diferencia en sus movilidades electroforéticas. El esquema de movimiento de las diversas moléculas superpuesto con el del EOF se presenta en la figura 10.



*Figura 10. Movimiento de las especies en función de su relación carga-radio*

### *7.4.3. Aspectos Instrumentales en CE*

A continuación se van a describir con más detalle algunos aspectos instrumentales característicos de la técnica.

#### 1. Capilares

Idealmente, los capilares deben disipar bien el calor, ser química y eléctricamente inertes, transparentes al UV-VIS, ya que facilitarán la detección on-line, flexibles, robustos y de precio económico. Los capilares de sílice fundida son los que mejor cumplen estas condiciones y por ello son los más ampliamente utilizados.

Para aumentar su flexibilidad y resistencia son recubiertas de una capa externa de poliamida. Una pequeña sección del recubrimiento de poliamida (ventana de detección) es eliminada para hacer viable la detección.

Esta sección del capilar es cilíndrica y sus dimensiones oscilan entre 50 y 100 cm de longitud y entre 10 y 200  $\mu\text{m}$  de diámetro interno. Algunos capilares se derivan, funcionalizando las paredes internas con polímeros como el polivinilalcohol (PVA). Este recubrimiento reduce la adsorción de compuestos catiónicos. El análisis de aminas o proteínas en este tipo de capilares está libre de las colas de pico que aparecen en los capilares sin tratar químicamente<sup>1</sup>. Además se suprime el EOF con lo que se mejora la reproducibilidad de los tiempos de migración. No obstante, estos capilares presentan la desventaja de una menor estabilidad frente al pH con lo que el intervalo de pH útil se reduce respecto a una capilar convencional. Aunque la sílice es el material más utilizado también se pueden utilizar otros materiales como el pyrex o el teflón.

## 2. Sistema de inyección

Las cantidades de muestra inyectadas en CE son muy pequeñas (del orden de los nanolitros), debido a las reducidas dimensiones del capilar. Las pequeñas cantidades inyectadas, son una ventaja de la técnica cuando se dispone de poca muestra. Sin embargo, resulta un inconveniente en cuanto al aspecto de la sensibilidad. Los pequeños volúmenes de muestras inyectados provocan que sea necesario un sistema de inyección diferente a los que se usan en otros métodos cromatográficos basados principalmente en jeringas o bucles de inyección. Los dos métodos de inyección más habituales en CE son la inyección electrocinética y la hidrodinámica. Estos métodos de inyección y sus variante han sido esquematizados en la figura 11.

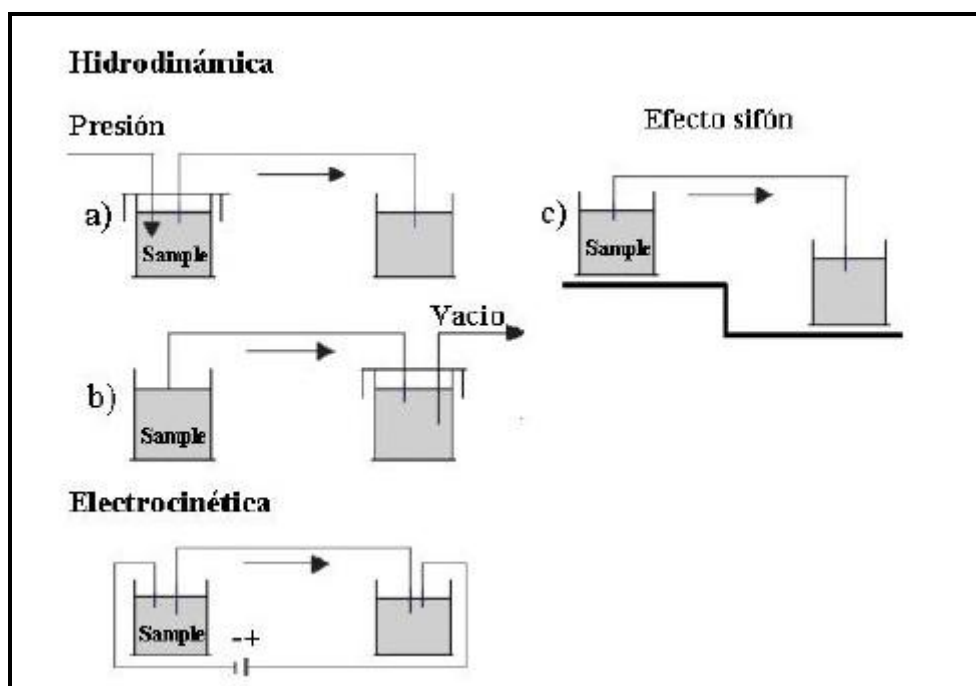


Figura 11. Esquema de los sistemas de inyección hidrodinámicos aplicando presión en el inlet (a), vacío en el outlet (b) o por diferencias de altura (c). Esquema del sistema inyección electrocinética



### Inyección hidrodinámica

Es el modo de inyección más extensamente utilizado y se puede realizar : por aplicación de una presión en el *inlet*, realizando el vacío en el *oulet* o por efecto sifón, al elevar el vial de muestra respecto al vial de tampón situado en el extremo contrario al de inyección (figura 11). Instrumentalmente, la aplicación de presión en el *inlet* es la solución más sencilla y la que adoptan la mayoría de equipos. Este tipo de inyección presenta la ventaja que la cantidad de cada analito inyectada es independiente la movilidad electroforética de cada analito.

La presión aplicada y el tiempo que se aplica esta presión (tiempo de inyección) son los dos parámetros que controla el analista para variar el volumen de inyección (vol) que puede ser calculado según la ecuación de Hagen-Poiseuille.

$$\text{vol} = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L} \quad (7)$$

El volumen inyectado es función de la presión aplicada ( $\Delta P$ ), el tiempo de inyección ( $t$ ), la viscosidad del capilar ( $\eta$ ) y características del capilar como la longitud del capilar ( $L$ ) o el diámetro interno ( $d$ ). Valores de inyección próximos a 250 mbar x s (ejemplo 50 milibares durante 5 segundos) son habituales en CE.

Con este sistema de inyección, la precisión del área de pico es del orden del 2% (medida como coeficiente de variación).

### Inyección electrocinética

En este modo de inyección el vial de muestra reemplaza al vial del inlet y a continuación se aplica una diferencia de potencial entre los extremos del capilar, que suele ser de 3 a 5 veces inferior al utilizado en la separación, durante un tiempo determinado. Los diferentes solutos se introducen en el capilar por el efecto conjunto de su migración electroforética y del EOF, por lo que cada analito será inyectado en distinta cantidad en función de su movilidad electroforética. La cantidad de analito inyectada puede ser calculada según:

$$Q = \frac{(\mu_e - \mu_{eof}) V r^2 \pi C t}{L} \quad (8)$$

Donde  $\mu_e$  es la movilidad electroforética del analito,  $\mu_{eof}$  es la movilidad del EOF,  $V$  es el voltaje aplicado,  $t$  el tiempo de inyección,  $C$  la concentración del analito y  $r$  y  $L$  el radio y longitud del capilar respectivamente.

El hecho que la concentración de analito inyectado dependa de su movilidad electroforética es un inconveniente en el caso de querer determinar un analito de baja movilidad mientras que para analitos con una alta movilidad constituye un efectivo método de preconcentración. Una desventaja de este modo de inyección

es que se ve afectado por la conductividad de la muestra. Es decir, si dos muestras tienen la misma concentración de un ión determinado pero presentan conductividades diferentes, la cantidad de ese ión inyectada será diferente para cada muestra. Debido a este fenómeno, este método de inyección no es habitual, aunque resulta muy útil cuando los capilares utilizados están rellenos de geles o de un medio demasiado viscoso donde la inyección hidrodinámica resulta menos efectiva.

# **CAPÍTULO 8.**

# **BIBLIOGRAFIA**

[http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16\\_2\\_02/ali07202.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_2_02/ali07202.pdf)

<http://es.wikipedia.org/wiki/Vino>

<http://frutas.consumer.es/documentos/frescas/uva/intro.php>

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

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

<http://www.diccionariodelvino.com/index.php/polifenoles/>

<http://www.infoagro.com/viticultura/vino.htm><http://wiki.verema.com/elaboracion-del-vino>

<http://www.quiminet.com>

<http://www.rivadaviamedoza.gov.ar/ProyEducativos/muestra2001/1-059a/bodega.gif>

[http://www.spanish-gourmet.com/vinos/e\\_vino2.html](http://www.spanish-gourmet.com/vinos/e_vino2.html)

[http://www.tesisenxarxa.net/TESIS\\_UAB/AVAILABLE/TDX-0406103-215825//ivm02de14.pdf](http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0406103-215825//ivm02de14.pdf)

# **CAPÍTULO 9.**

# **DIAGRAMA DE GANT**

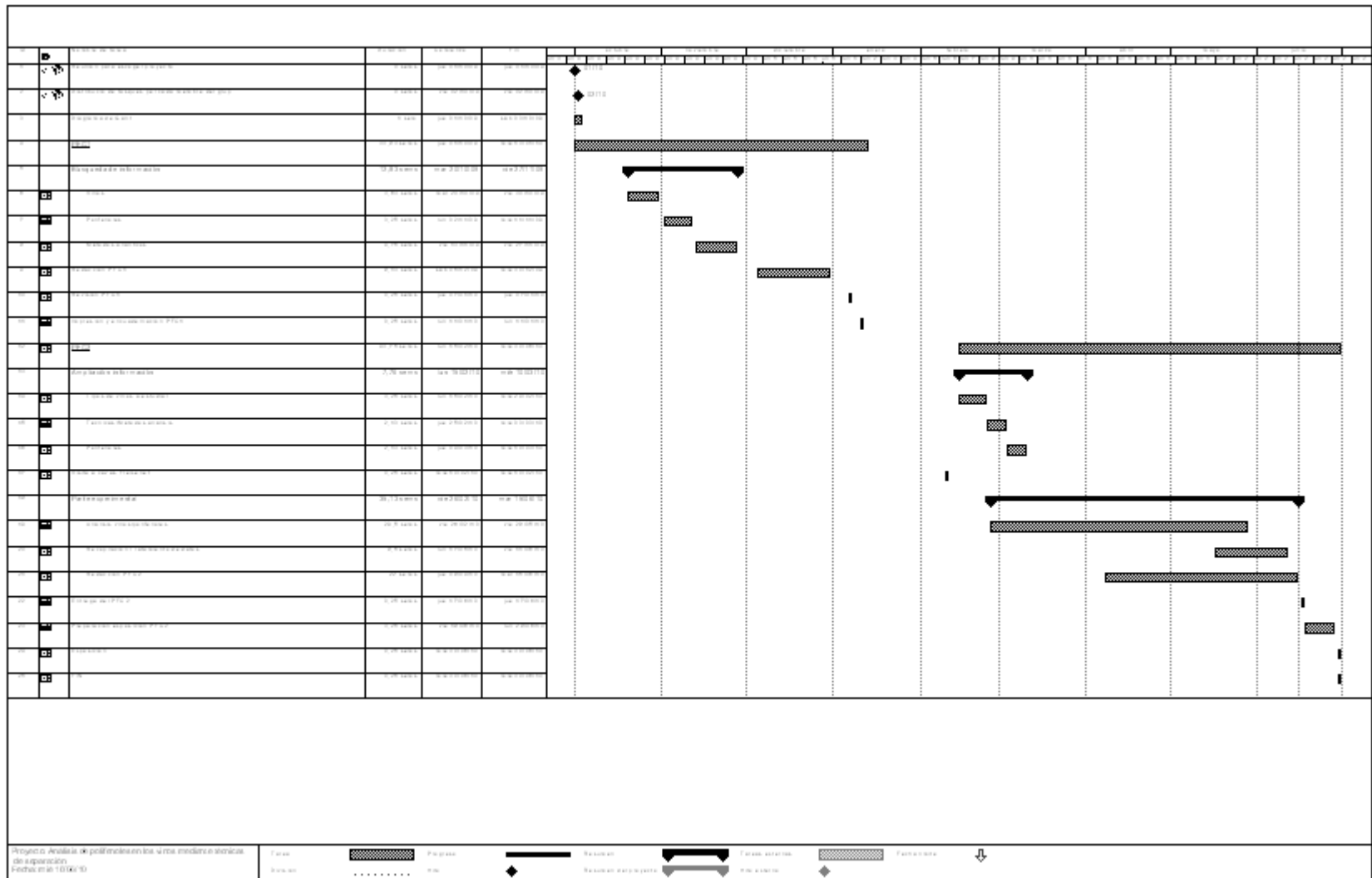


Figura 12. Diagrama de Gantt de Proyecto final de carrera.