

Determinación estructural y cuantificación de componentes volátiles en muestras monovarietales de txakoli

(Structural determination and quantification of volatile components in univarietal components of "txakoli" wine)

Escobal González, Ana
Univ. del País Vasco.
Fac. de Ciencias
Dpto. de Química Orgánica
Apdo. 644
48080 Bilbao

BIBLID [1137-4411 (1999), 5; 83-108]

El objetivo del presente trabajo es la determinación de los componentes volátiles en el Txakoli de Bizkaia. Se han estudiado los componentes mayoritarios y minoritarios. Se han analizado muestras de Txakoli de Bizkaia elaboradas con una o dos variedades. Se han estudiado diferentes métodos cromatográficos y de concentración. Se ha elegido uno de los métodos de concentración para los compuestos minoritarios que permite después aplicar la cromatografía de gases. Se observa en los resultados obtenidos que el Txakoli de Bizkaia tiene un contenido en compuestos volátiles minoritarios típico de un vino joven para las variedades estudiadas.

Palabras Clave: Cromatografía. Gases-masas. Txakoli. Volátiles. Monovarietales.

Txosten honetan deskribatutako ikerlanak, Bizkaiko Txakolinaren osagai hegazkorren determinazioa du helburu - tza. Erabili diren laginak bariedade bat edo bi bariedadekin egindakoak izan dira, osagai hegazkor gehiengoak eta gu - txiengoak aztertuz. Metodo kromatografiko eta kontzentraziozko metodo ezberdinak erabili dira. Osagai gutxiengoan determinazioa egiteko aztertu diren metodoen artean bat aukeratu da gas kromatografia saiatzea baimentzen duelako. Bizkaiko Txakolinaren osagai hegazkor gutxiengoan edukin enaizengatik, edozein ardo gazte bezalakoak direla esan gendake bariedade berdinekin egindako ardo gazteak badira.

Giltz-Hitzak: Kromatografía. Gas-masak. Txakolina. Hegazkorak. Monobarietatak.

L'objectif de ce travail est la détermination des composants volatiles dans le Txakoli de Bizkaia. On a étudié les composants majoritaires et minoritaires. On a analysé échantillons de Txakoli de Bizkaia élaborés avec une ou deux variétés. On a étudié différentes méthodes chromatographiques et de concentration et on a choisi une méthode de concentration pour les composants minoritaires qui permet après appliquer la chromatographie gazeuse. On peut voir avec les résultats obtenus que le Txakoli a une teneur en composants volatiles minoritaires typiques d'un vin jeune pour toutes les variétés étudiés.

Mots Clés: Chromatographie. Gaz-masses. Txakoli. Volatiles. Monovariétales.

INTRODUCCION

La uva y el vino han sido muy apreciados desde la más remota antigüedad. Se ha considerado el fruto por sus características nutritivas y su sabor. En cuanto al vino se ha valorado especialmente su aroma, y sus propiedades organolépticas, euforizantes, e incluso medicinales.

El Txakoli es un vino característico del País Vasco y puede definirse como un vino joven, fresco, afrutado, y sensiblemente ácido, como consecuencia de las variedades empleadas y del microclima existente en la zona. Todo ello, confiere a este joven vino una personalidad propia, por lo que se encuentra entre los productos más tradicionales de Bizkaia.

Actualmente las variedades empleadas son básicamente autóctonas. En cuanto al proceso de elaboración se cuenta con medios técnicos cada vez más avanzados y personal más cualificado, aunque no se ha renunciado a los métodos artesanales, obteniéndose así un producto de fermentación natural y controlado de uva autóctona.

Siempre ha existido, por parte de los enólogos, un gran interés por conocer la composición aromática de los vinos, ya que son precisamente los componentes volátiles los que sensorialmente permiten emitir un juicio acerca de la calidad de un vino. Dicho interés se ha visto incrementado últimamente, por la exigencia del mercado hacia productos de calidad bien diferenciados. Por este motivo, el objeto de este trabajo ha sido llevar a cabo un estudio cualitativo y cuantitativo de los componentes volátiles del Txakoli, aplicando técnicas cromatográficas y espectroscópicas, al objeto de contribuir a la caracterización química.

El proceso de caracterización exige una selección de rasgos para diferenciar unos vinos de otros. En esto se basa el fundamento de las Denominaciones de Origen (D.O.) que actualmente amparan los vinos de calidad.

En cuanto al Txakoli, el 14 de Junio de 1994 se produjo la publicación en el B.O.P.V. de la concesión de la Denominación de Origen para el "Chacolí de Bizkaia-Bizkaiko Txakolina", estableciéndose así un Reglamento y su Consejo Regulador. Podemos hablar por tanto de un vino caracterizado en rasgos generales y diferenciado en base a su D.O.

La fracción volátil de un vino, o de modo general, su aroma, tiene gran importancia a la hora de diferenciar unos vinos de otros y caracterizarlos. Así mismo, dicha fracción volátil, puede poner en evidencia diferencias sutiles en la composición del sustrato antes de fermentar, así como las debidas al distinto metabolismo según las cepas de levaduras, o incluso las condiciones en las que se realizó la fermentación, ya que factores edafológicos, botánicos y climáticos, tales como la zona de crecimiento, variedad de la uva y grado de maduración, condiciones de fermentación, etc, determinaran la composición química del mosto, y la microflora que interviene en la fermentación espontánea influyendo en la composición aromática, tanto cualitativa como cuantitativamente.

1. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo que se pretende con el presente trabajo es el de caracterizar, el Txakoli Blanco de Bizkaia desde el punto de vista aromático. Esta caracterización, se realizará en base a la determinación de los compuestos volátiles presentes en el mismo.

El interés por conocer la composición del aroma de los vinos está sustentado en base a dos motivos fundamentales. En primer lugar, por la importancia del aroma a la hora de eva-

luar la calidad de un vino, y por tanto su aceptación por parte del consumidor. Y en segundo lugar, debido a la capacidad de discriminación varietal que parecen tener estos compuestos, ya que en base a su concentración y aplicando métodos estadísticos más o menos complejos, es posible diferenciar vinos desde un punto de vista objetivo y no en base al análisis sensorial, siempre sujeto a un grado de subjetividad.

El trabajo que se llevará a cabo constará de una primera etapa de determinación cuantitativa de los componentes volátiles mayoritarios presentes en muestras de Txakoli Blanco monovarietal, pertenecientes a la cosecha de 1996, comparándose los resultados con aquellos obtenidos en cosechas anteriores. En una segunda etapa se procederá a la determinación a nivel cualitativo de los compuestos volátiles conocidos como minoritarios. Con este fin se aplicará uno de los pretratamientos mencionados en la sección anterior, en concreto, la extracción líquido-líquido sobre muestras de Txakoli Blanco monovarietal de la cosecha 1996. El pretratamiento elegido, nos permitirá aproximarnos al conocimiento del tipo de compuestos que forman parte del aroma como componentes volátiles minoritarios. Partiendo de la información que suministre ésta técnica, en un futuro se aplicarán otros métodos de concentración para llegar de este modo, a conocer en profundidad la fracción volátil minoritaria que constituye parte del aroma del Txakoli de Bizkaia.

Tanto la determinación de compuestos volátiles mayoritarios, así como la de minoritarios se llevará a cabo empleando la técnica de Cromatografía de Gases, empleando como detectores FID (Detector de ionización de llama), y EM (Espectrómetro de masas).

Esta técnica requiere la optimización de los parámetros de operación, de modo que, previamente a la inyección de las muestras se pondrá a punto el método cromatográfico que mejor permita resolver los distintos compuestos presentes en las muestras, tanto de vino, como de los productos del pretratamiento.

En base a la información obtenida se procurará detectar posibles diferencias varietales entre las muestras objeto de estudio. Así mismo, se discutirá la presencia de los compuestos detectados y su posible origen biogénico.

La confirmación de la presencia de los compuestos identificados se realizará en base a la bibliografía existente sobre compuestos previamente detectados en vinos.

2. ORIGEN DEL AROMA

El aroma del vino es el resultado global de una larga secuencia biológica, bioquímica y tecnológica, que comienza en la planta y finaliza en el momento de la cata.

A la hora de describir el aroma de un vino, se hace necesaria una clasificación previa del mismo. Esta clasificación estará basada en los diferentes estadios por los que atraviesa el fruto hasta convertirse en el producto final.

Se pueden diferenciar los siguientes "aromas":

Aroma primario o varietal

Está formado por compuestos que proceden de la uva y llegan al vino sin experimentar transformaciones. Es propio de la variedad empleada, aunque está influenciado por el grado de maduración o el estado fitosanitario del fruto. Hay variedades de uva con aromas muy característicos y personales que pueden diferenciarlos del resto. Aunque existen compues-

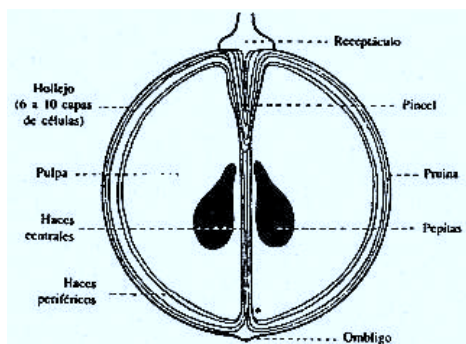


Figura 2.1. Corte esquemático de un grano de uva

tos específicos de la variedad de uva empleada, también los hay no específicos, como es el caso de los ácidos grasos insaturados linoléico y el ácido linolénico que dan lugar a ciertos alcoholes y aldehídos durante la fermentación (Hidalgo, 1986).

La presencia de estos compuestos en el fruto no es uniforme, siendo la parte periférica del mismo la que presenta un mayor contenido. Se localizan fundamentalmente en las capas de células más internas del hollejo existiendo también en menor cantidad en la pulpa, a excepción de algunas variedades como Moscatel o Malvasía que poseen pulpa aromática.

Las pepitas también pueden llegar a ceder al vino algunas sustancias aromáticas. (Figura 2.1).

Pueden encontrarse en el fruto en forma libre (moléculas odorantes), o bien combinados (moléculas odorígenas), es decir, asociados con otras moléculas orgánicas, entre las que se encuentran azúcares como glucosa, ramnosa o arabinosa, de los que pueden hidrolizarse en diferentes reacciones enzimáticas.

En general, podría decirse que el aroma primario o varietal está constituido principalmente por derivados terpénicos y algunos alcoholes de seis átomos de carbono. Numerosos estudios han revelado que los componentes terpénicos forman parte esencial en el bouquet del vino, el cual es típico, de la variedad empleada, por tanto estos compuestos podrían ser empleados para una caracterización varietal.

Aroma secundario o fermentativo

Está integrado por los compuestos producidos durante la fermentación, la cual tiene lugar espontáneamente en el mosto por desarrollo de las levaduras que acompañan a la uva o que se encuentran en el aire.

Es durante la fermentación cuando se producen mayor número de compuestos volátiles. Se sintetizan numerosos alcoholes, ésteres y ácidos grasos, además de otros muchos compuestos de naturaleza diversa. Su producción depende en gran medida de la especie y cepa de levadura que interviene en la fermentación, pero también de las condiciones físico-químicas del mosto y las condiciones de fermentación, tales como el pH o la temperatura.

Los procesos de formación de estos compuestos son muy variados y en muchos casos complicados, teniendo como precursores sustancias diversas como azúcares, aminoácidos, pectinas, etc. El esquema de las transformaciones supone al menos una treintena de reacciones sucesivas en las que intervienen un gran número de enzimas.

Aroma terciario o postfermentativo

Se desarrolla lentamente durante el periodo de envejecimiento del vino. Son aromas de elevada complejidad, con una gran riqueza de matices, característicos de los vinos de crianza. El aroma terciario también es llamado "bouquet".

En esta etapa de envejecimiento se producen numerosas transformaciones, siendo una de las más importantes la fermentación maloláctica, en la cual el ácido málico pasa a ácido láctico por acción bacteriana. A la hora de decidir si la fermentación maloláctica es siempre aconsejable es preciso distinguir entre vinos tintos y blancos. Si se pretende conseguir vinos jóvenes, frescos y afrutados, esta fermentación no es conveniente, pero si se busca cuerpo y vinosidad, y un carácter de cierto envejecimiento puede ser aconsejable. Los vinos blancos suelen estabilizarse con dosis relativamente elevadas de SO_2 , con lo que se impide la acción de las bacterias lácticas.

En general, la etapa de envejecimiento, o añejamiento, es beneficiosa para el vino, en el sentido que mejora sus cualidades organolépticas, se produce un enriquecimiento sobre todo en el aroma, y el vino toma lo que se llama "cuerpo".

En la Figura 2.2 se puede observar la secuencia que atraviesa el fruto hasta convertirse en el producto de fermentación que es el vino, así como la aparición de los aromas a lo largo de dicha secuencia.

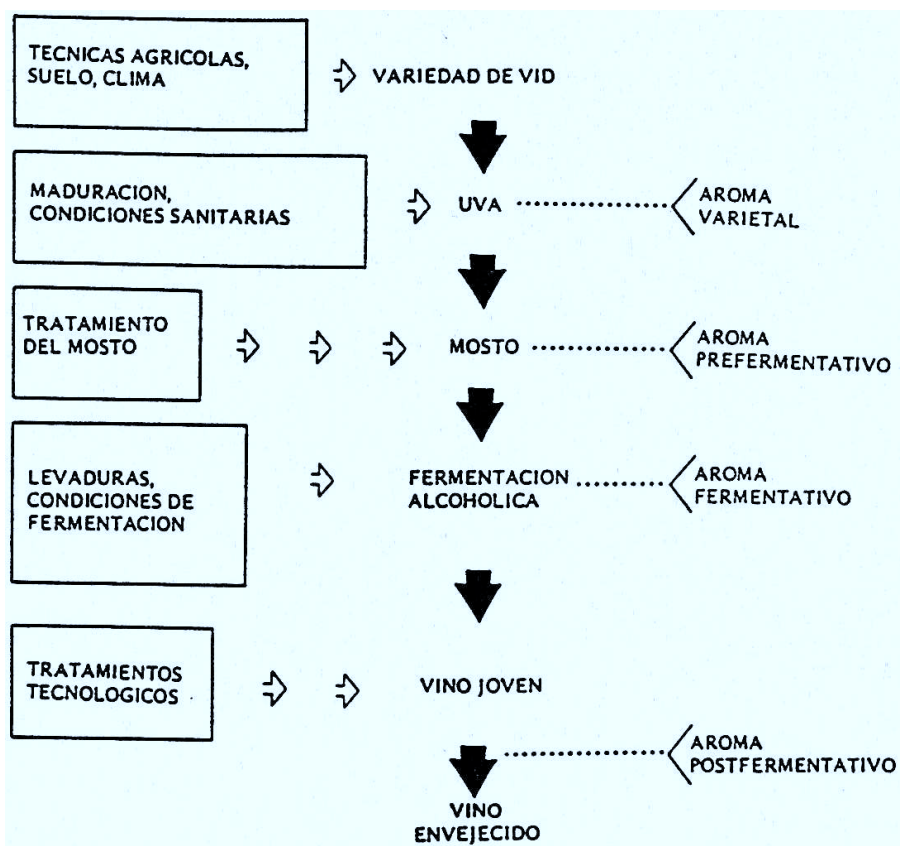


Figura 2.2. Secuencia de elaboración del vino. Formación de los aromas.

En los vinos jóvenes, como es el caso del Txakoli, los aromas más importantes son el primario y secundario.

3. COMPOSICION QUIMICA DE LOS AROMAS

La composición química de los aromas de los vinos es extremadamente compleja. Rapp, en 1976 ya apuntó la presencia de 600 a 800 compuestos volátiles orgánicos, determinados algunos de ellos en forma de trazas.

La concentración total de compuestos aromáticos en vinos es aproximadamente de 0.8-1.2 mg/l, lo que viene a ser un 1% de la concentración de etanol, compuesto mayoritario en los vinos.

La naturaleza de dichos compuestos es muy dispar, abarcando un amplio intervalo de polaridades y puntos de ebullición. La variedad de compuestos es tal, que podría decirse que en el aroma del vino están representados todo tipo de grupos funcionales orgánicos.

Dentro de la gran variedad de compuestos orgánicos que participan en el aroma de los vinos, se pueden diferenciar ciertos grupos, es decir, es posible clasificarlos.

Los grupos más importantes se indican a continuación:

- A. Alcoholes
- B. Compuestos carbonílicos
- C. Acidos y Esteres
- D. Otros compuestos
 - D.1. *Compuestos Sulfurados y Nitrogenados*
 - D.2. *Terpenos*
 - D.3. *Fenoles*
 - D.4. *Lactonas*
 - D.5. *Hidrocarburos*

En los siguientes párrafos se describirán los compuestos más importantes que forman cada uno de estos grupos, así como la procedencia de cada uno de ellos.

A. Alcoholes

Su origen es esencialmente fermentativo. Las levaduras que intervienen en la fermentación juegan un papel esencial en el contenido de algunos alcoholes aunque también influye la variedad de uva empleada en la elaboración y el grado de abono nitrogenado de las plantas.

En general, en el aroma del vino podemos encontrar las siguientes familias de alcoholes:

A.1 *Alcoholes sencillos*

Son alcoholes que contienen de 1 a 5 átomos de carbono en la cadena principal. : metanol, etanol, propanol e isopropanol, butanol, pentanol y alcoholes isoamílicos (2- metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol).

El *etanol* es el alcohol que se encuentra en mayor concentración, siendo el producto fundamental de la fermentación alcohólica. El rendimiento de la transformación de azúcares en etanol es aproximadamente del 50%, el resto de los azúcares dan lugar a otros productos de fermentación. El contenido en etanol en vinos puede variar en un amplio rango, normalmente entre 7 y 20° (% vol), que, en el caso del Txakoli, según el reglamento que lo regula, no será inferior a 9.5°. Aunque este alcohol no contribuye de forma directa en el aroma del vino, sí es soporte de otros aromas, contribuyendo a exaltar o aminorar el olor global.

El *metanol* tiene su origen en la demetilación de las pectinas por acción de enzimas presentes en los hollejos. El *propanol*, *isobutanol* e *isoamilicos* conocidos como *alcoholes superiores*, se sintetizan a partir de aminoácidos o de carbohidratos.

Los alcoholes de cadena corta, como el 1-butanol, 2-butanol y 1-pentanol se encuentran en cantidades muy bajas en vinos de uvas sanas, bien elaborados. En vinos que presentan pH elevados, el 1-butanol puede llegar a encontrarse en cantidades superiores a 1 mg/l, lo cual es indicativo de crecimiento de *Clostridium*, lo que también se confirma con la presencia de 1-pentanol.

A.2. Alcoholes de cadena larga

Son alcoholes que contienen más de cinco átomos de carbono en la cadena principal. En este grupo podemos destacar: 1-Hexanol, 1-Octanol y 1-Decanol. La formación de estos alcoholes, así como la de otros de mayor peso molecular tiene lugar por reducción de los aldehídos del sustrato durante la fermentación alcohólica. (Herraiz, 1989).

En ocasiones se ha detectado la presencia de estos alcoholes en el fruto, con lo que, podrían englobarse dentro del grupo de compuestos responsables del aroma primario.

A.3. Dioles y Polioles

Los más abundantes son la glicerina y el 2,3-butanodiol. La glicerina es producida por las levaduras durante la fermentación. Esta producción depende de la cepa de levadura (Mayer y Pause, 1970), y la temperatura de fermentación (Ough y col, 1972).

En el caso del 2,3-butanodiol, su origen es exclusivamente fermentativo, y se caracteriza por su gran estabilidad frente al ataque de bacterias.

Tanto la glicerina, como el 2,3-butanodiol no son compuestos que influyan propiamente en el aroma de los vinos, pero juegan un papel esencial en la sensación de suavidad que comunican a los mismos.

A.4. Alcoholes aromáticos

El compuesto más abundante dentro de este grupo es el feniletanol y se presenta en concentraciones muy variables, siendo su origen esencialmente fermentativo. Respecto a su contribución al aroma, podría decirse que es indirecta, ya que es un éster de este alcohol, el éster acético, el que contribuye de modo más significativo al aroma del vino, comunicándole notas florales. Se ha atribuido a este alcohol cualidades diferenciadoras a la hora de la caracterización varietal de un vino. (Wing-On, 1980).

También puede encontrarse el 2-feniletanol, como parte de la fracción de volatilidad media del aroma de los vinos.

Otro alcohol aromático que se encuentra en ocasiones en los vinos es el alcohol bencílico, que generalmente se presenta en concentraciones muy bajas.

B. Compuestos carbonílicos

En este grupo consideraremos a los aldehídos y las cetonas como compuestos volátiles que contribuyen al aroma de los vinos.

Dentro del grupo de los aldehídos destaca el acetaldehído como compuesto mayoritario, llegando a suponer el 90% del total de aldehídos presentes en los vinos. En general, la formación de aldehídos puede tener lugar, bien por oxidación de los alcoholes o por descarboxilación de α -cetoácidos. Sin embargo, lo normal durante la fermentación es la reducción de los aldehídos a sus correspondientes alcoholes, siendo este hecho una de las razones del pequeño número de aldehídos encontrados habitualmente en el vino. (Herraiz,1989). Podemos citar como algunos de los aldehídos presentes en la fracción de volatilidad media del aroma de los vinos el trans-2-hexanal, el aldehído cinámico o el benzaldehído.

Dentro del grupo de las cetonas cabe destacar, desde el punto de vista del aroma, la 2,3-butanodiona y la 2,3-pentanodiona, debido al bajo umbral sensorial que presentan. Estas dicetonas son habituales en vinos, cerveza y bebidas alcohólicas en general.

C. Ácidos y Esteres

A pesar de la gran variedad de ácidos orgánicos presentes en los vinos, no tienen una influencia directa en el aroma de éstos. Este es el caso de los ácidos considerados como fijos: tartárico, succínico, láctico, málico y cítrico.

En general, los ácidos de mayor aportación al aroma de los vinos son los ácidos monocarboxílicos. Dentro de este grupo el ácido que se encuentra en mayor concentración es el ácido acético. Casi todos los ácidos monocarboxílicos, desde el ácido fórmico hasta el ácido esteárico (C₁₈), se han identificado en bebidas alcohólicas, encontrándose en pequeñas concentraciones.

Como grupo integrante de los ácidos monocarboxílicos se encuentran los ácidos grasos (C > 4). Su formación tiene lugar a través de la biosíntesis normal de ácidos grasos, con intervención del complejo enzimático ácido graso sintetasa, a partir del Acetil-CoA.

De este modo se sintetizan ácidos tanto de cadena media como larga. Debido a que en cada paso de la síntesis se incorporan dos átomos de carbono, los ácidos grasos obtenidos son de número par de átomos de carbono y por ello son los que más abundan en los productos de fermentación alcohólica (Herraiz y col., 1988). Los ácidos grasos de número impar de átomos de carbono también se han detectado en productos de fermentación, aunque en cantidades muy inferiores, originándose por iniciación de la biosíntesis con propionil-CoA en la condensación inicial con malonil-CoA.

Aunque existen ácidos grasos que provienen del propio fruto y de las pepitas, durante la fermentación se forman ácidos grasos volátiles.

Además de los ácidos monocarboxílicos, también se encuentran presentes en los vinos los siguientes tipos de ácidos:

Hidroxiácidos: siendo el más importante el ácido Láctico, que se presenta en sus dos formas enantioméricas D- y L-. Mientras que la forma L- es originada por las bacterias durante la fermentación, el enantiómero D- se forma principalmente por las levaduras.

Ácidos Urónicos y aldónicos: Como por ejemplo el ácido ascórbico o el ácido glucónico.

Oxo- y cetoácidos: Son compuestos tales como el ácido pirúvico o el acetoacético, intermedios en la formación de compuestos aromáticos

Ácidos di- y tricarboxílicos: Entre ellos se encuentran los ácidos fijos, tales como ácido cítrico, succínico, tartárico, láctico o málico.

Los ácidos no inciden directamente en el aroma de los vinos. no obstante, sí influyen de modo indirecto al esterificarse con los distintos alcoholes presentes en el medio. Así, los ésteres presentes en los vinos son muy variados y contribuyen de modo significativo en el aroma de los vinos, a pesar de no encontrarse en elevada concentración.

Los ésteres más abundantes son los derivados del alcohol mayoritario presente en el vino, esto es, el etanol. Los ésteres de mayor aportación la aroma de los vinos son los derivados de los ácidos monocarboxílicos, de los hidroxi y oxoácidos, y los ésteres de ácidos di- y tricarboxílicos.

Los ésteres de los ácidos monocarboxílicos, son quizás, los que contribuyen en mayor medida al aroma de los vinos. La síntesis de ésteres de cadena corta y media están muy condicionada por requerimientos metabólicos y ayuda a regular el metabolismo intermedio de la levadura (Thurston y col., 1982).

Existen ésteres de cadena corta y larga. Entre los ésteres de cadena corta destaca el acetato de etilo, que puede llegar a encontrarse en cantidades apreciables en vinos. Se considera un compuesto no deseado por el modo negativo en que afecta al aroma. Respecto a los ésteres de ácidos monocarboxílicos de cadena larga, se suele considerar el hexanoato de etilo como el primero de la serie, y éste junto con los ésteres de los ácidos C₈, C₁₀ y C₁₂, así como el acetato de 2-feniletilo, son los más abundantes de la fracción del aroma de volatilidad media.

Por último, entre los derivados de ácidos dicarboxílicos, el succinato de dietilo y el malato de dietilo son los ésteres más representativos.

Como ejemplo, en la Figura 3.1 podemos observar al contribución esencial que aportan determinados ésteres al aroma característico de ciertos alimentos.

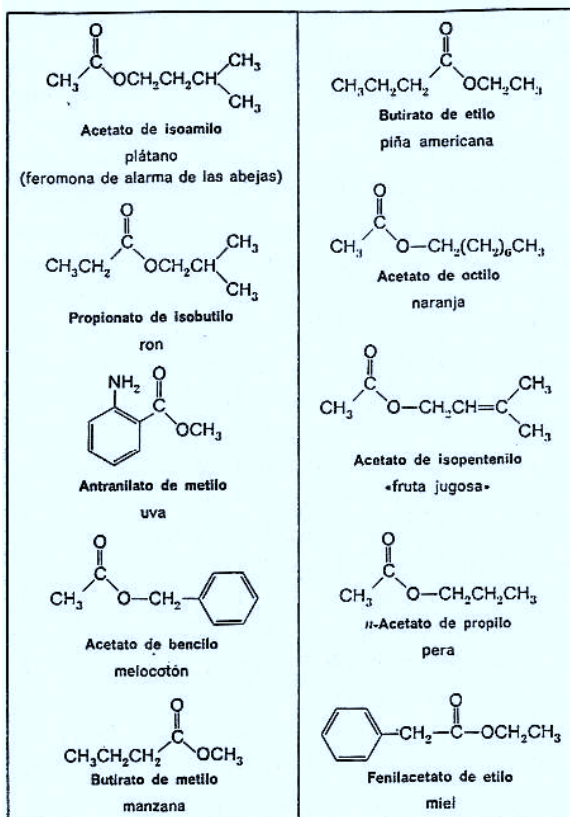


Figura 3.1. Contribución esencial de ésteres al aroma característico de ciertos alimentos.

D. Otros compuestos

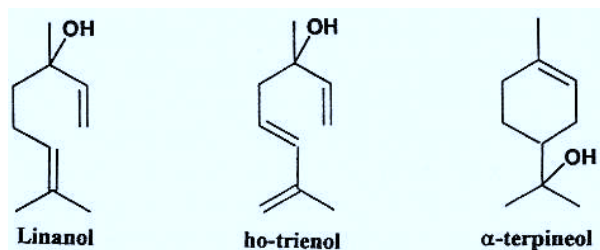
En este grupo englobaremos distintas familias de compuestos que, si bien en ocasiones pueden tener importancia en el aroma de los vinos, no es tan significativa como la de los grupos mencionados con anterioridad.

D.1. Compuestos Sulfurados y Nitrogenados

Si la técnica de elaboración del vino es la adecuada, no es previsible que estos compuestos aparezcan en cantidades preocupantes. Una elevada concentración pondría de manifiesto alteraciones en la fermentación. Dado que sus umbrales de detección son bajos, cantidades superiores a dicho umbral, le comunicarían olores muy desagradables.

D.2. Terpenos

Son compuestos que provienen de la propia uva, y en este sentido se engloban dentro del aroma primario. Entre los más abundantes se encuentran los alcoholes monoterpénicos tales como linalol, ho-trienol, y α -terpineol.



D.3. Fenoles

Los compuestos fenólicos más estudiados son los no volátiles, por su incidencia en el color de los vinos. Su presencia en muestras de Txakoli de distintas variedades ha sido estudiado por Elejalde (1996). También se encuentran en el vino compuestos fenólicos volátiles, como fenoles propiamente dichos, ácidos y aldehídos fenólicos. La mayoría de los compuestos fenólicos volátiles no están presentes en las bayas, sino que son originados por levaduras, bacterias o por hidrólisis de fenoles superiores. El 4-vinil guaiacol y el 4-vinil fenol pueden originarse a partir del ácido cinámico, cumárico o ferúlico mediante descarboxilación enzimática o térmica (Albagnac, 1975).

D.4. Lactonas

Las lactonas mejor conocidas en vinos son las γ - y δ -lactonas. Proviene de la deshidratación de los 4- y 5- hidroxiaácidos correspondientes. Por ejemplo, las γ -lactonas son de especial interés en vinos de Jerez, ya que contribuyen a su aroma característico.

D.5. Hidrocarburos

Se han encontrado en vinos, en muy pequeñas concentraciones hidrocarburos tales como dodecano, tetradecano, hexadecano, etc. También se encuentran referenciados en la bibliografía hidrocarburos con número superior a 20 átomos de carbono.

4. TECNICAS DE CONCENTRACION

La determinación de los compuestos volátiles presentes en los vinos se lleva a cabo de forma diferente en función del tipo de compuestos a estudiar. Así, se pueden clasificar dichos compuestos en dos grandes grupos, atendiendo a la concentración en la que dichos compuestos se encuentran presentes en los vinos:

Compuestos volátiles mayoritarios: Concentración superior a 5mg/l

Compuestos volátiles minoritarios: Concentración inferior a 5mg/l

Debido a la gran variedad de compuestos que intervienen en el aroma de los vinos, el estudio de los compuestos volátiles es complicado, en especial cuando se pretende determinar componentes minoritarios que se presentan en concentraciones muy débiles, pudiendo llegar a décimas de mg/l. El análisis de estos compuestos requiere de una técnica que sea capaz de diferenciar e identificar el mayor número posible de sustancias presentes. La técnica que, por el momento permite la determinación de compuestos volátiles tanto mayoritarios como minoritarios es la Cromatografía de Gases.

La Cromatografía de Gases se aplicó por primera vez en el análisis del aroma de los vinos a finales de los años 50. Desde esta fecha ha sido decisivo el impulso y evolución que experimentó esta técnica en el estudio de compuestos volátiles. La gran variedad de rellenos cromatográficos, y especialmente la introducción de columnas capilares de alta eficacia, así como la sensibilidad de los detectores ha facilitado la tarea de determinar los compuestos orgánicos existentes en una matriz tan compleja como es el vino.

Si bien algunos compuestos volátiles, los llamados mayoritarios, son susceptibles de ser identificados y determinados por simple inyección directa en un cromatógrafo de gases, los compuestos minoritarios requieren un tratamiento previo a su análisis.

Los compuestos volátiles minoritarios tienen una especial importancia, dentro de los compuestos aromáticos, ya que se les atribuye un papel muy destacado como principales responsables en la diferenciación de unos vinos de otros. Este hecho es debido a que las diferencias más interesantes entre las distintas variedades de uva se refieren a compuestos que se encuentran en pequeñas concentraciones.

Los compuestos volátiles minoritarios presentan las siguientes propiedades (Bemenmans, 1979):

- a) Se presentan en baja concentración
- b) Grandes diferencias de concentración entre ellos
- c) Grandes diferencias de umbrales de detección
- b) Amplio rango de puntos de ebullición
- c) Alta reactividad y labilidad química de alguno de estos compuestos

Cuando se pretende determinar compuestos volátiles minoritarios se hace imprescindible recurrir a técnicas previas de recuperación y concentración. Entre las técnicas que actualmente se utilizan para el aislamiento de los compuestos volátiles minoritarios se encuentran las siguientes:

- 4.1. Extracción líquido-líquido
- 4.2. Extracción sólido-líquido
- 4.3. Técnicas de espacio de cabeza
- 4.4. Destilación de la muestra
- 4.5. Desmixture

La elección del método estará en función del grupo de volátiles que interese estudiar, esto es, de sus propiedades físicas y químicas, así como polaridad y puntos de ebullición. Podría decirse que ningún método es apto para todos los compuestos pero una combinación de los mismos puede suministrar mucha información.

A continuación se describirán brevemente las características de cada método, así como las posibilidades de análisis que ofrecen.

4.1. Extracción líquido-líquido

La extracción mediante un solvente no miscible es el método más utilizado para concentrar los compuestos volátiles de los vinos. Este método se basa en un coeficiente de distribución favorable del disolvente extractante frente a la mezcla hidroalcohólica en la que se encuentran disueltos los compuestos volátiles. Se pueden utilizar sucesivamente o paralelamente distintos extractantes, cada uno adecuado para un grupo de componentes de la mezcla, con lo que se consigue una mayor selección en la extracción. La extracción puede tener lugar de modo continuo o discontinuo en embudos de decantación.

Estos métodos permiten concentrar los compuestos volátiles después de la evaporación del disolvente, cuyo punto de ebullición conviene sea lo más bajo posible, y de gran pureza, puesto que las impurezas también se concentran falseando los resultados.

Han sido utilizados numerosos disolventes para la extracción de aromas, empleando normalmente mezclas: éter-pentano (Mesias y col, 1986), pentano-diclorometano 7:3 (Laminkara, 1986), pentano-diclorometano 2:1 (Baumes y col., 1986), Freón 11 (Strauss y col., 1988). La mezcla más utilizada está formada por diclorometano-pentano, en distintas proporciones en función de los compuestos que interese aislar.

Algunos autores han elegido disolventes con punto de ebullición muy bajo, tales como CO₂ (Schultz y Randall, 1970) o Freón 12 (Blakesley y col., 1977). El uso de estos disolventes no es aconsejable si lo que se pretende es extraer compuestos de bajo punto de ebullición, ya que tienden a evaporarse con el disolvente en la etapa de concentración.

También se ha probado el gas carbónico en estado supercrítico. La ventaja reside en la posibilidad de modificar la polaridad del disolvente en ese estado en función de la presión que se le aplique, aunque se consiguen resultados poco reproducibles.

Se ha recomendado el uso de Freón 11 (triclorofluorometano) como un disolvente adecuado para la extracción de aromas en alimentos, especialmente en bebidas alcohólicas (Rapp y col., 1976).. Recientemente se ha desarrollado un método rápido para analizar volátiles en vinos, basado en una microextracción con Freon 113 (Ferreira y col., 1993).

4.2. Extracción sólido-líquido

Se trata de un método adecuado para aislar los compuestos volátiles de muestras muy diluidas, o lo que es lo mismo, para aislar compuestos minoritarios.

Se emplean dispositivos que consisten en un tubo relleno con un adsorbente a través del cual pasa la disolución, siendo el factor más importante el tipo de adsorbente utilizado. En el adsorbente quedan retenidos los compuestos de interés, que posteriormente son eluidos mediante un disolvente adecuado, reducción de presión, aumento de temperatura, o desplazamiento. La elución se lleva a cabo en función del tipo de interacción que se establezca entre la matriz, los analitos y el empaquetamiento.

Dentro de la gran variedad de adsorbentes existentes en el mercado, los más utilizados son polímeros sintéticos como Porapack, Tenax y algunos tipos de Chromosorb. Estos adsorbentes difieren en grados de polaridad así como en área superficial, la cual es proporcional a su capacidad.

Se han empleado también resinas tales como la Amberlite XAD-2, de baja polaridad, para estudiar compuestos volátiles presentes en vinos en bajas concentraciones, con posterior elución de los mismos empleando dietil-éter (Charles y Bemelmans, 1990).

En la actualidad se ha extendido el uso de cartuchos de C18 en fase reversa para aislar compuestos volátiles en alimentos (Rendberg y Linstrom, 1981; Laencina, 1989). Los cartuchos de fase reversa C18 extraen compuestos de baja o nula polaridad de muestras acuosas, permitiendo que analitos polares atraviesen la fase sin ser retenidos.

4.3. Técnicas de espacio de cabeza

Para el estudio de los compuestos volátiles responsables del olor de alimentos y bebidas, el análisis por espacio de cabeza (Headspace), puede resultar muy útil ya que revela la identidad y concentración de la fase vapor de aquellos compuestos que son directamente responsables del aroma del alimento. Sin embargo, en productos líquidos es muy difícil relacionar la concentración en la fase vapor con la existente en el producto.

Existen dos tipos de análisis Headspace: estático y dinámico, también llamado de purga y trampa. En el primero se analiza por CG una fracción de la fase gaseosa, que se toma directamente de un vial sellado que ha sido previamente calentado. En el segundo, se hace pasar una corriente de gas a través de la disolución, la cual arrastra de modo continuo los compuestos volátiles extrayéndolos de la disolución. La corriente de gas se hace pasar por una trampa que retiene los analitos. Estos pueden ser retenidos en la trampa de dos modos básicos, por criocondensación o por adsorción. La desorción se provoca mediante el calentamiento de la trampa, tras lo cual los analitos se introducen en el Cromatógrafo de Gases.

De modo particular, el Headspace estático resulta muy útil para el análisis de compuestos de muy bajo punto de ebullición, ya que estos compuestos suelen perderse en los procesos de aislamiento y sobre todo en la etapa de evaporación del disolvente.

El Headspace dinámico se emplea cuando lo que pretende es aislar compuestos de alto punto de ebullición o bien alcanzar un elevado grado de concentración de los compuestos volátiles presentes en el alimento en muy baja concentración.

Los inconveniente que plantea esta metódica es la gran cantidad de tiempo que se requiere en la etapa de recuperación de los compuestos, pudiendo variar desde 6h hasta 5 días.

4.4. Destilación

La destilación es uno de los métodos más adecuados para el aislamiento de compuestos volátiles. Los métodos de extracción y adsorción aíslan los compuestos volátiles de interés junto con otros que no interesan, de modo que en la etapa de aislamiento se requiere algún tipo de destilación.

La técnica acoplada más interesante es la Extracción-Destilación simultánea (SDE) (De Frutos y col., 1988; Blanch y col. 1992). Suele emplearse el dispositivo empleado por Likens y Nickerson (1966), en el que la muestra acuosa y el disolvente se mantienen en recipientes

separados y se calientan de modo independiente. Los vapores de ambos condensan en una rama central, y tras la condensación del agua en una sección intermedia ambas fases vuelven a sus respectivos recipientes. El empleo de éste método para vinos tiene precedentes recientes (Villén y col., 1995), y se ha venido utilizando desde hace algunos años (Killian y Ough, 1979; Mesías y Ough, 1984). El inconveniente que se presenta en su empleo es que puede requerir someter a las muestras a elevadas temperaturas con lo que pueden producirse modificaciones químicas de compuestos termolábiles.

4.5. Desmixtura

La desmixtura es un método de separación que consiste en la adición al vino de una fuerte cantidad de sales, con lo que se provoca una sobresaturación y se originan dos fases a partir de una mezcla homogénea. La fase orgánica originada está constituida principalmente por etanol y compuestos más solubles en etanol que en agua como compuestos fenólicos o ésteres. Este método ha sido utilizado por distintos autores que emplean diferentes sales para el proceso de sobresaturación (Mesías y col., 1981).

La adición de sales facilita la extracción con disolventes (Singleton, 1961), así como también aumenta la volatilidad de algunas sustancias, por lo que se ha aprovechado esta propiedad en algunos análisis de espacio de cabeza (Jennings, 1977).

5. METODOLOGÍA

El trabajo experimental se llevó a cabo sobre un grupo de cinco muestras de Txakoli Blanco monovarietal y bivarietal, procedentes de la cosecha de 1996. Las variedades objeto de estudio se indican a continuación

Numero muestra	Variedad
1	Riesling
2	Folle Blanche
3	Hondarrabi Zuri
4	70% Hondarrabi Zuri + 30% Folle Blanche
5	50% Hondarrabi Zuri + 50% Folle Blanche

Estas variedades componen un conjunto homogéneo de muestras y representan las variedades básicas empleadas en la elaboración del Txakolí de Bizkaia, siendo las variedades Hondarrabi Zuri y la Folle Blanche las preferentes según el Reglamento de la D.O.

La determinación de compuestos volátiles efectuada se puede clasificar en dos categorías:

- Determinación de compuestos volátiles mayoritarios
- Determinación de compuestos volátiles minoritarios

5.1. Determinación de volátiles mayoritarios

La determinación de los compuestos volátiles mayoritarios se efectúa sin tratamiento previo de las muestras, empleando como técnica de análisis la Cromatografía de Gases, asociada al detector de ionización de Llama

5.1.1. Optimización de parámetros cromatográficos

Las variables que influyen de manera decisiva en la separación de los componentes de una mezcla mediante esta técnica son el tipo de columna cromatográfica empleada, el gradiente de temperaturas y el caudal de gas portador. Se ensayaron columnas cromatográficas con diferente tipo de relleno, llevando a cabo los análisis en diferentes condiciones, a fin de encontrar aquella que ofreciera mejores resultados.

La columna cromatográfica elegida contiene el tipo de relleno cromatográfico que nos permitirá determinar la fracción de compuestos más polares susceptibles de ser determinados por inyección directa.

El método cromatográfico definitivo empleado en la determinación tanto cualitativa como cuantitativa se indica a continuación:

Método 1

Cromatógrafo de Gases : Hewlett-Packard HP-5890
Columna: HP-20M (30m x 0.53 mm d.i -1.33 μ m d.f.)
Gas portador: Nitrógeno
Caudal de gas portador: 1.5 ml/min
Temperatura del inyector: 200 °C
Temperatura del detector :250 °C
Gradiente de Temperatura: 55°C (15 min) 3 $^{\circ}$ /min 150° C (10 min)
Detector: FID
Volumen de inyección: 1 μ l

5.1.2. Identificación

La identificación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de Txakoli Blanco monovarietal y bivariedad se llevó a cabo empleando soluciones estándar de los compuestos puros. En la Figura 5.1. se puede observar el cromatograma de los componentes volátiles identificados en las muestras de Txakoli.

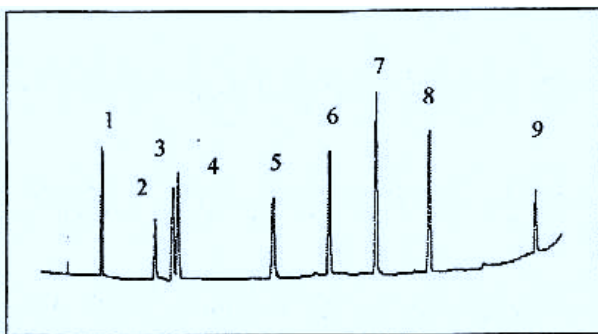


Figura 5.1. Cromatograma de los componentes volátiles identificados en muestras de Txakoli Blanco. Asignación de picos: 1.Acetaldehído. 2.Metanol. 3.Etanol. 4.Isopropanol. 5.Propanol. 6. Isobutanol. 7.Butanol (P.I.). 8.Isoamílicos. 9.Ac. acético

5.1.3. Técnicas de cuantificación

En cromatografía de gases existen diversos métodos de cuantificación siendo los más habituales:

- Método del patrón interno
- Método del patrón externo
- Normalización de áreas

El método del patrón externo requiere un volumen de inyección de muestra perfectamente controlado. En función de ese volumen se efectuarán los cálculos necesarios para construir la curva de calibración que nos permitira con posterioridad realizar la cuantificación de los compuestos de interés. La exactitud en la medida del volumen de inyección está controlado únicamente en el caso de disponer de un inyector automático. Bajo otras circunstancias el error cometido es considerable, lo que impide realizar una correcta cuantificación.

En el caso del método de normalización de áreas el problema reside en considerar que todos los compuestos responden de la misma manera en las condiciones de operación, es decir, sería adecuado si pretendemos cuantificar compuestos de las mismas características, por ejemplo una familia de compuestos.

Para la cuantificación de los compuestos volátiles mayoritarios se puso a punto el procedimiento que se basa en el método del patrón interno para lo cual debe elegirse un compuesto que reúna los requisitos necesarios para llevar a cabo dicha función de referencia. El factor de calibración para cada uno de los compuestos viene definido por la siguiente expresión:

$$F = M_i S_p / M_p S_i$$

Donde:

- M_p cantidad de patrón interno añadido a la muestra
- S_p Area del pico cromatográfico del patrón interno
- M_i cantidad del compuesto i presente en la muestra
- S_i Area del pico cromatográfico del compuesto i

La calibración se efectuó dentro del intervalo de concentraciones esperado en muestras de Txakoli, para cada compuesto. La adición de patrón interno se realizó por pesada del mismo, debido a la fuente de error que pueden suponer las medidas volumétricas, la cuales necesitan una posterior conversión a unidades de masa, empleando los valores de densidad para cada compuesto.

El compuesto elegido como patrón interno fue 1-butanol, principalmente porque cumple uno de los requisitos fundamentales para actuar como tal, es decir, no está presente en la muestra objeto de estudio y en las condiciones cromatográficas elegidas se resuelve perfectamente del resto de compuestos presentes en la muestra, por añadidura no interacciona con los compuestos que forman parte de la matriz original, es decir, el vino.

5.2. Determinación de compuestos volátiles minoritarios

El método de pretratamiento de muestra elegido fue una extracción líquido-líquido en continuo. Los compuestos volátiles minoritarios presentes en los extractos se analizaron empleando como técnica de análisis la Cromatografía de gases. La puesta a punto del método cromatográfico se llevó a cabo empleando como detector FID (Detector de ionización de

Llama), mientras que la identificación se llevó a cabo mediante la elucidación estructural de los compuestos, empleando para ello la Espectrometría de masas.

A continuación se detallan tanto el método de pretratamiento como el método cromatográfico empleado posteriormente.

5.2.1. Extracción líquido-líquido en continuo

En primer lugar se aplicó esta técnica sobre distintas muestras de vino de cosechas diferentes, empleando para ello dos tipos de extracción en continuo. La primera empleando una extracción de 6 horas + 8 horas (Di Stefano, 1996) y la segunda aplicando una extracción de 24 horas (González, 1989). Esta experiencia previa se llevó a cabo con el fin de elegir el método de extracción que ofreciera mejores resultados. Dichos resultados permitieron seleccionar la extracción en continuo la extracción en continuo de 24 horas proporcionaba mayor información. Partiendo de este hecho se procedió a aplicar dicha extracción sobre las cinco muestras de Txakoli Blanco de la cosecha de 1996.

5.2.1.a. Material y Reactivos

Equipo de extracción:

- Extractor líquido-líquido de 150 ml
- Balón de 250 ml
- Refrigerante de serpentín
- Tapones de vidrio
- Baño de agua

Equipo de concentración:

- Columna Vigreux de 20 cm
- Cabeza de columna
- Balón de 50 ml
- Balón de 100 ml
- Adaptador

Reactivos:

- Pentano 99% extrapuro
- Diclorometano 99% extra puro (estabilizado con amileno)
- Sulfato sódico anhidro

5.2.1.b. Procedimiento

El proceso de extracción se llevó a cabo empleando un extractor líquido-líquido de 150 ml de capacidad para disolventes menos densos que el agua. El extractante escogido fue una mezcla de diclorometano: pentano (1:2) (González, 1989; Baumes y col., 1986; Scherier y col., 1981; Moret y col., 1981). Las condiciones de extracción se detallan a continuación:

- Volumen de muestra: 150 ml de vino
- Disolvente de extracción: Pentano: Diclorometano (2:1)
- Volumen de extracción: 30 ml
- Temperatura del baño: 38 °C
- Tiempo de extracción: 24 horas

El esquema del montaje puede observarse en la Figura 5.2

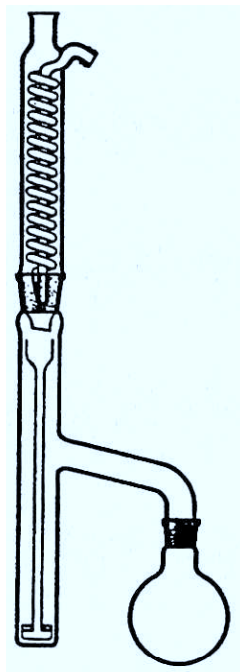


Figura 5.2: Extractor líquido-líquido para disolventes menos densos que el agua

El extracto obtenido transcurridas las 24 horas fue secado con sulfato sódico anhidro, como paso previo a la etapa de concentración. Cada uno de los extractos se concentró empleando para ello una destilación con columna Vigreux de 20 cm de longitud, en baño de agua a 45°C, hasta un volumen final de 0.5-1 ml. El empleo de columnas Vigreux en la etapa de concentración ha sido ampliamente recomendado (Gil, 1996; Ferreira, 1995; Herraiz, 1991). Cada uno de los extractos, ya concentrados se conservaron en viales con cierre de rosca hermético a 0°C hasta el momento de su inyección en el cromatógrafo de gases.

Las extracciones se efectuaron en ausencia de patrones, tanto de extracción como cromatográficos, debido al desconocimiento de la composición tanto a nivel cualitativo como cuantitativo de los extractos, y con el fin de evitar un posible solapamiento de los mismos con los compuestos aromáticos extraídos.

El procedimiento de extracción se aplicó sobre las cinco muestras de Txakoli Blanco disponibles, obteniendo los extractos cuya nomenclatura se indica a continuación:

Tabla 5.2. Nomenclatura de los extractos obtenidos de cada variedad

VARIEDAD	EXTRACTO
Riesling	1E24
Folle Blanche	2E24
Hondarrabi	3E24
70% Hondarrabi zuri + 30% Folle Blanche	4E24
50% Hondarrabi Zuri + 50% Folle Blanche	5E24

En discusiones posteriores nos referiremos a los extractos empleando dicha nomenclatura

5.2.2. Análisis cromatográfico

Los extractos se analizaron empleando la técnica de CG acoplada a Espectrometría de Masas. Del mismo modo que en el caso de los compuestos volátiles mayoritarios, la separación de los compuestos se efectuó mediante Cromatografía de Gases, previa optimización del método cromatográfico. En este punto cabe decir que dada la complejidad de los extractos, es muy complicado encontrar las condiciones cromatográficas nos permitan resolver todos y cada uno de los picos cromatográficos presentes.

La Espectrometría de Masas nos permitirá identificar los compuestos presentes en base a los espectros de masas de los mismos, por comparación con los almacenados en la librería de la estación de trabajo del sistema.

Método 2

Condiciones cromatográficas: CG/FID
 Cromatógrafo de Gases : Hewlett-Packard HP-5890
 Columna: Ultra 2 (50 m x 0.32mm d.i. x 0.52µm d.f.)
 Gas portador: Nitrógeno
 Caudal de gas portador: 1 ml/min
 Gradiente de Temperatura: 70°C (5 min) 0.57/min 90° C
 90°C (5 min)10%/min 180°C (10 min)
 Temperatura del inyector: 200 °C
 Temperatura del detector:250 °C
 Volumen de inyección: 2 µl

Condiciones cromatográficas: CG/ EM:

Idénticas condiciones CG que en el caso anterior.
 Condiciones de operación del Espectrómetro de Masas:
 Impacto electrónico (EI) 70 eV
 Temperatura de la fuente: 250°C
 Temperatura del cuadrupolo: 100°C

6. RESULTADOS

6.1. Compuestos volátiles mayoritarios

Los resultados obtenidos mediante la aplicación del Método cromatográfico 1 para la determinación de los compuestos volátiles mayoritarios en las cinco muestras de Txakoli Blanco monovarietal y bivarietal se presentan en la Tabla 6.1.1.

Tabla 6.1.1. Compuestos volátiles mayoritarios determinados en muestras de Txakoli Blanco monovarietal y bivarietal procedentes de la cosecha de 1996

Compuestos volátiles	1	2	3	4	5
Acetaldehído (mg/l)	25.70	7.90	15.76	28.50	11.70
Acetato de metilo(mg/l)	*	*	*	*	*
Isopropanol (mg/l)	*	0.04	*	*	0.08
Propanol (mg/l)	*	56.99	*	46.78	55.40
Isobutanol (mg/l)	15.10	23.70	41.22	38.54	28.31
Isoamílicos (mg/l)	92.70	85.00	122.82	107.77	103.60
Ac.acético (g/l)	0.61	0.78	0.99	0.99	0.97
Etanol (%vol)	11.5	11.05	10.6	12.6	12.3

(*) Presentes en concentración inferior al L.D.M. o no detectables en las condiciones de trabajo cromatográficas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para el total de muestras disponibles de Txakoli Blanco procedentes de la cosecha de 1996, indicándose los valores de concentración máximo, mínimo y medio del conjunto de muestras.

Tabla 6.1.2. Resultados obtenidos para el conjunto de muestras Txakoli Blanco de la cosecha de 1996

Compuestos volátiles	Valor medio	Valor Máximo	Valor Mínimo
Acetaldehído (mg/l)	19.46	28.50	7.90
Acetato de metilo(mg/l)	81.91	81.91	81.91
Isopropanol (mg/l)	0.07	0.09	0.04
Propanol (mg/l)	53.06	56.99	46.78
Isobutanol (mg/l)	31.42	41.65	15.10
Isoamílicos (mg/l)	106.04	127.34	85.00
Ac.acético (g/l)	0.91	1.15	0.61
Etanol (%vol)	11.58	12.60	10.60

6.2. Compuestos volátiles minoritarios

La técnica de extracción líquido-líquido tal y como se describe en el capítulo 5, se aplicó sobre las cinco muestras de Txakoli Blanco Monovarietal y Bivarietal, pertenecientes a la cosecha de 1996. Los compuestos identificados en los extractos se recogen en las Tablas que se presentan a continuación.

Tabla 6.2.1. Extracto 1E24 correspondiente a la variedad Riesling

Compuestos Identificados	Tiempo de retención	Tiempo de Retención Relativo ^(a)
Hexanol	14.871	0.296
Acetato de isoamilo	15.574	0.310
Furan tetrahidro-3-metil	18.935	0.377
Acido hexanoico	26.658	0.531
Acetato de hexilo	29.331	0.585
Alcohol bencílico	31.350	0.625
Feniletanol	50.155	1.000
Hexanoato de etilo	56.400	1.124
Acido Octanoico	57.338	1.143
2-propenoico-3-(2-hidroxifenil)-E	58.309	1.163
Acetato de 2-feniletilo	60.123	1.198
Malato de dietilo	60.453	1.205
Acido decanoico	64.308	1.282
9-Decenoato de etilo	65.223	1.300
Decanoato de etilo	65.560	1.307
1H-indol-3-etanol	67.764	1.351

(a) El tiempo de retención relativo está calculado tomando como referencia el pico de feniletanol

Tabla 6.2.2. Extracto 2E24 correspondiente a la variedad Folle Blanche

Compuestos Identificados	Tiempo de retención	Tiempo de Retención Relativo ^(a)
1-Hexanol	14.530	0.293
Acetato de isoamilo	15.223	0.307
Furan tetrahidro-3-metil	18.570	0.375
Acido Hexanoico	25.749	0.520
Acetato de hexilo	28.935	0.584
Alcohol bencílico	30.946	0.625
Feniletanol	49.515	1.000
Hexanoato de etilo	55.935	1.129
Acido Octanoico	57.201	1.155
Acetato de 2-feniletilo	59.454	1.201
Malato de dietilo	60.319	1.218
Acido Decanoico	64.120	1.295
9-Decenoato de etilo	65.223	1.306
Decanoato de etilo	65.567	1.299
1H-indol-3-etanol	67.594	1.365

(a) El tiempo de retención relativo está calculado tomando como referencia el pico de feniletanol

Tabla 6.2.3. Extracto 3E24 correspondiente a la variedad Hondarrabi

Compuestos Identificados	Tiempo de retención	Tiempo de Retención Relativo ^(a)
1-Hexanol	14.862	0.296
Acetato de isoamilo	15.546	0.309
Furan tetrahidro-3-metil	18.918	0.377
Acido Hexanoico	27.218	0.542
Acetato de hexilo	30.025	0.598
Alcohol bencílico	31.780	0.633
1-Octanol	41.420	0.825
Feniletanol	50.202	1.000
Hexanoato de etilo	56.048	1.116
Acido Octanoico	56.248	1.120
2-propenoico-3(2hidroxifenil)-E	58.310	1.161
Acetato de 2-feniletilo	60.115	1.197
Malato de dietilo	60.446	1.204
Acido Decanoico	64.249	1.280
9-Decenoato de etilo	65.223	1.306
Decanoato de etilo	65.530	1.299
1H-indol-3-etanol	67.057	1.336

(a) El tiempo de retención relativo está calculado tomando como referencia el pico de feniletanol

Tabla 6.2.4. Extracto 4E24 correspondiente a la variedad 70%HZ + 30% FB

Compuestos Identificados	Tiempo de retención	Tiempo de Retención Relativo ^(a)
1-Hexanol	14.821	0.297
Acetato de isoamilo	15.525	0.311
Furan tetrahidro-3-metil	18.871	0.378
Acido Hexanoico	26.104	0.523
Acetato de hexilo	29.256	0.586
Alcohol bencílico	31.350	0.628
Feniletanol	49.931	1.000
Hexanoato de etilo	56.187	1.125
Acido Octanoico	57.305	1.148
2-propenoico-3(2hidroxifenil)-E	58.281	1.167
Acetato de 2-feniletilo	60.100	1.204
Malato de dietilo	60.425	1.210
Acido Decanoico	64.257	1.287
9-Decenoato de etilo	65.223	1.306
Decanoato de etilo	65.531	1.312
1H-indol-3-etanol	67.705	1.356

(a) El tiempo de retención relativo está calculado tomando como referencia el pico de feniletanol

Tabla 6.2.5. Extracto 5E24 correspondiente a la mezcla de variedades 50%HZ+50%FB

Compuestos Identificados	Tiempo de retención	Tiempo de Retención Relativo ^(a)
1-Hexanol	14.835	0.297
Acetato de isoamilo	15.535	0.311
Furan tetrahidro-3-metil	18.880	0.378
Acido Hexanoico	26.091	0.522
Acetato de hexilo	29.270	0.586
Alcohol bencílico	31.350	0.628
Feniletanol	49.932	1.000
Hexanoato de etilo	56.078	1.123
Acido Octanoico	57.307	1.147
2-propenoico-3(2hidroxifenil)-E	58.281	1.167
Acetato de 2-feniletilo	60.105	1.204
Malato de dietilo	60.429	1.210
Acido Decanoico	64.209	1.286
9-Decenoato de etilo	65.223	1.306
Decanoato de etilo	65.537	1.312
1H-indol-3-etanol	67.709	1.356

(a) El tiempo de retención relativo está calculado tomando como referencia el pico de feniletanol

A continuación en las Figuras 6.2.1 a 6.2.3 se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos tras la aplicación del método cromatográfico 2 sobre los extractos obtenidos tras el proceso de extracción en continuo que se efectuó sobre las muestras de Txakoli.

La identificación de los compuestos presentes en los extractos se realizó en base a los espectros de masas de los mismos. Algunos de los espectros de masas de los compuestos más característicos de muestran en las Figuras 6.2.4 y 6.2.5.

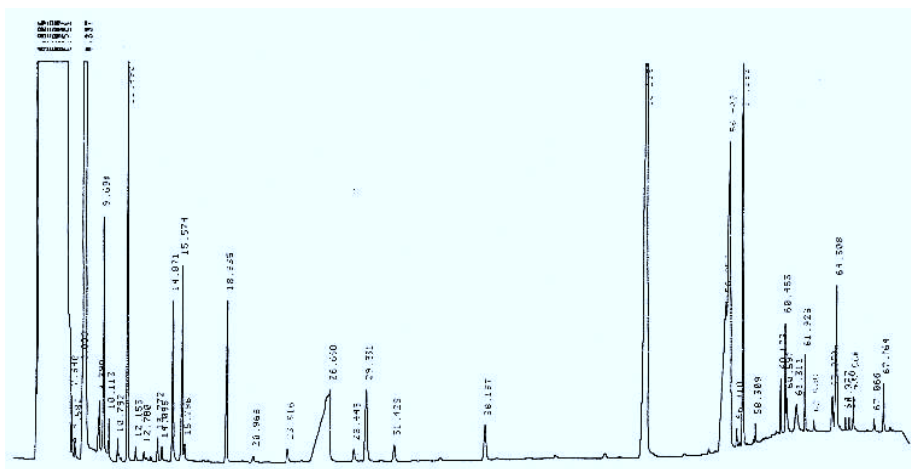


Figura 6.2.1. Cromatograma obtenido mediante aplicación del método cromatográfico 2 sobre el extracto 1E24 (variedad Riesling)

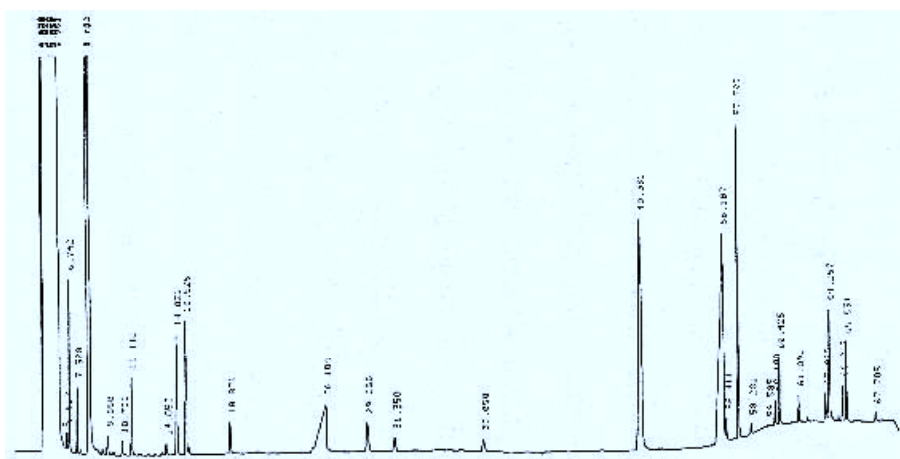


Figura 6.2.2. Cromatograma obtenido mediante aplicación del método cromatográfico 2 sobre el extracto 4E24 (mezcla de variedades 70% HZ + 30% FB)

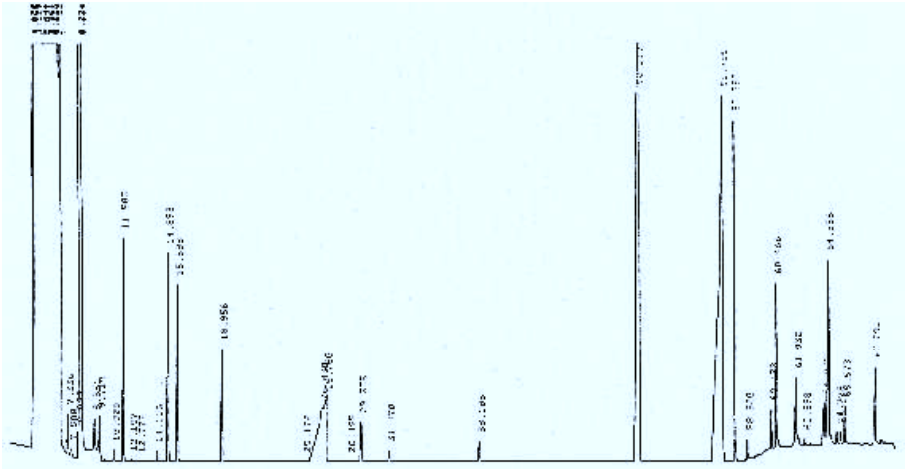


Figura 6.2.3. Cromatograma obtenido mediante aplicación del método cromatográfico 2 sobre el extracto 5E24 (mezcla de variedades 50% HZ + 50% FB)

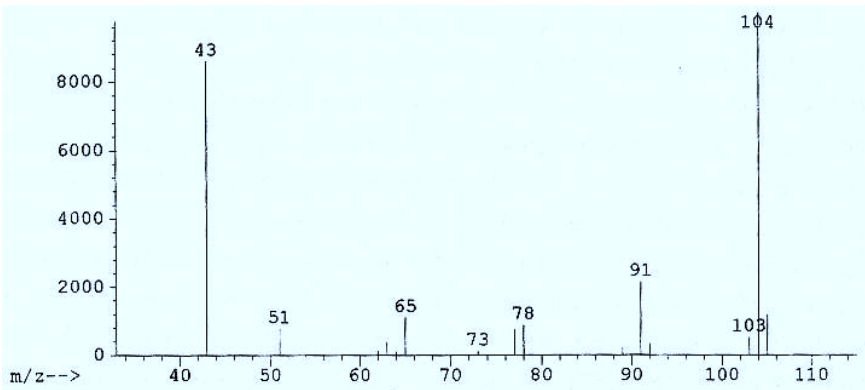


Figura 6.2.4. Espectro de masas correspondiente al acetato de 2-feniletilo

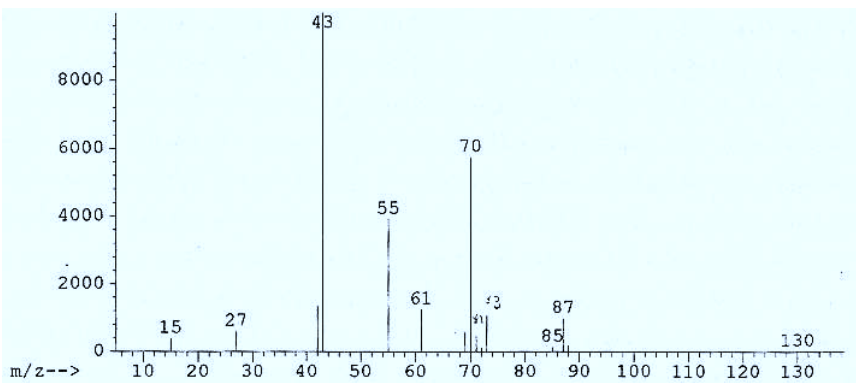


Figura 6.2.5. Espectro de masas correspondiente al acetato de isoamilo

A la vista de los resultados obtenidos, en lo que a compuestos volátiles minoritarios se refiere, puede destacarse la presencia de ésteres etílicos de ácidos grasos $C_{6:0}$, $C_{8:0}$, y $C_{10:0}$, y de ésteres de alcoholes superiores, compuestos volátiles producidos durante la fase fermentativa, como ejemplo podemos citar el acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, octanoato de etilo o acetato de 2-feniletilo. Estos ésteres producen aromas afrutados, los cuales armonizan con los aromas primarios de la uva.

Respecto a las proporciones en las que se encuentran presentes los compuestos volátiles minoritarios, hacer notar que, a pesar de que el perfil cromatográfico es muy similar en todos los casos, existen variaciones en la cantidad en la que se encuentran presentes cada uno de ellos.

Los resultados obtenidos para los compuestos volátiles mayoritarios concuerdan con los obtenidos en cosechas anteriores para las mismas variedades. En base a este hecho podemos afirmar que los compuestos volátiles minoritarios determinados en las muestras de Txakoli Blanco estudiadas componen un conjunto representativo ya que provienen de muestras con las características propias del Txakoli.

7. CONCLUSIONES

1) La optimización de un método de extracción líquido-líquido, técnica de pretratamiento previo de la muestra, ha permitido concentrar los componentes minoritarios para su posterior análisis, que no sería posible por inyección directa.

2) La puesta a punto de diferentes métodos cromatográficos así como la cromatografía de gases acoplada con la Espectrometría de Masas nos ha permitido separar y realizar la identificación estructural de componentes volátiles minoritarios presentes en las muestras monovarietales y bivarrietales del Txakoli de Bizkaia.

3) Los componentes volátiles mayoritarios cuantificados en este trabajo para la cosecha del 96 ponen de manifiesto concentraciones similares a las encontradas en estudios anteriores para las mismas variedades y diferente cosecha. En base a este hecho podemos afirmar que los compuestos volátiles minoritarios que se determinaron en las muestras de Txakoli Blanco estudiadas componen un conjunto representativo ya que provienen de muestras con las características del Txakoli de Bizkaia.

4) Los componentes volátiles minoritarios identificados se encuentran presentes tanto en las muestras monovarietales como bivarrietales, apreciándose solo ligeras diferencias. Puede destacarse la presencia de ésteres etílicos de ácidos grasos $C_{6:0}$, $C_{8:0}$, y $C_{10:0}$, y de ésteres de alcoholes superiores, compuestos volátiles producidos durante la fase fermentativa, como ejemplo podemos citar el acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, octanoato de etilo o acetato de 2-feniletilo. Estos ésteres producen aromas afrutados, los cuales armonizan con los aromas primarios de la uva.

5) Se han observado ligeras variaciones en la proporción de los compuestos volátiles minoritarios, si bien el perfil cromatográfico obtenido es similar en todos los casos, lo que evidencia una composición similar en su aroma.

6) Los componentes volátiles identificados son típicos del aroma de un vino joven y afrutado.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALBAGNAC G., Ann. Technol. Agric.,1975, 24:133
- BAUMES R.; CORDONIER R.; NITZ, S.; DRAWERT, F. Sci. Food Agric.,1986, 37:927
- BLAKESLEY C. y LOOTS J., J. Agric. Food Chem, 1977, 25:963
- BLANCH G.P.; TABER J.; HERRAIZ M.; REGLERO G.; 1992, J. Agric. Food Chem., 40:1046
- BEMELMANS J., Progress in Flavour Research. de. Lang, G. y Nursten H. Applies Science Publishers LTD, 1979, 79.
- CHARLES G.; BEMELMANS R.B.; J. Agric. Food Chem., 1990, 38:216
- ELEJALDE E., Tesis de Licenciatura, 1996, Facultad de Ciencias, Universidad del Pais Vasco.
- DI STEFANO R., Riv. Vitic. Enol., 1986, 9:412
- DE FRUTOS M.; SANZ J.; MARTÍNEZ CASTRO Y., Chromatographia, 1988, 25:861
- FERREIRA V.; RAPP A.; CACHO F.; HASTRICH H.; YAVAS Y., J. Agric. food Chem, 1993, 41: 1413
- GONZÁLEZ E., Tesis Doctoral, 1989, Universidad de Zaragoza.
- HERRAIZ T.; REGLERO G.; HERRAIZ M., Food Chem., 1988, 29:177
- HERRAIZ T., Alim. Equip. y Tecnol., 1989,Nov-Dic, 105.
- HERRAIZ T.; MARTÍN ALVAREZ P.J.; REGLERO G.; HERRAIZ M., J. Sci. Food Agric., 1991, 55:103
- HIDALGO L.; Conferencia Internacional de Enología. ENOMAQ, 1986, 86:23
- JENNINGS W., FILSOOF M., J. Agric. Food Chem, 1977, 25:440
- KILLIAN E. y OUGH C.S., Am .J. Enol. Vitic. 1979, 30:301
- LAENCINA J.; NUNEZ E.; NUNEZ J.M.; DE GODOS A., Proceedings of the Sixth International Citrus Congress., Ed Goren R., Tel-Aviv, Israel,1989, 1725
- LAMINKARA O., Food Chem., 1986, 19:299
- LIKENS S.T.; NICKERSON G.B.; J. Chromatogr., 1966, 21:1
- MAYER K.; PAUSE G., Schweiz. Z. Obst-Weinbau, 1970, 106:490
- MESÍAS J.; MAYNAR J.; MARECA Y., Rev. Agroquim. Technol. Aliment.,1981, 21:114
- MESÍAS J.L. y OUGH C.S., La Sem. Vitivin., 1984, (39): 3857
- MORET Y.; SCARPONI G.: GESCON P., J. Sci. Food Chem., 1981, 35:1004
- OUGH C.S.; FONG D.; AMERINE M.A., Am. J. Enol. Vitic., 1972, 23:1
- RAPP A., HASTRICH H., ENGEL L., Vitis, 1976, 15:29
- RENDERBERG L. y LINSTROM K., J. Chromatog., 1981, 24:331
- SCHULTZ W. y RANDALL J., Food Techn., 1970, 24:1282
- SCHERIER P.: JASTEIN, H., Z. Lebensm. Unter. Forsch., 1981, 1
- SINGLETON, V. L., Am J. Enol. Vitic., 1961, (12):1
- STRAUSS C.; WILSON B.; WILLIAMS P., J. Agric. Food Chem., 1988, 36:569
- THURSTON P.A.; QUAIN D.E.; TUBB R., J.of Inst. Brew.,1982, 88:90
- VILLÉN J.; SENORANS F.J.; REGLERO G.; HERRAIZ M., J. Agric. Food Chem, 1995, 43:717
- WING-ON, K., J. Agric. Food Chem, 1980, (28):356