

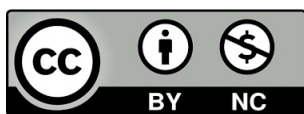
Elayma Sánchez Acevedo

Estudios sobre la calidad
aromática potencial de la uva.
Cinéticas de acumulación de
aromas varietales y estrategias
metabolómicas para la
identificación de las moléculas
precursoras

Director/es

Ferreira González, Vicente
López Gómez, Ricardo Javier

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

ESTUDIOS SOBRE LA CALIDAD AROMÁTICA
POTENCIAL DE LA UVA. CINÉTICAS DE
ACUMULACIÓN DE AROMAS VARIETALES Y
ESTRATEGIAS METABOLÓMICAS PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE LAS MOLÉCULAS
PRECURSORAS

Autor

Elayma Sánchez Acevedo

Director/es

Ferreira González, Vicente
López Gómez, Ricardo Javier

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ciencia Analítica en Química

2024



Universidad
Zaragoza

1542

Tesis Doctoral

**Estudios sobre la calidad aromática
potencial de la uva.
Cinéticas de acumulación de aromas
varietales y estrategias metabólicas
para la identificación de las moléculas
precursoras.**

Autora:

Elayma Sánchez Acevedo

Directores:

Ricardo López Gómez
Vicente Ferreira González

Facultad de Ciencias
Departamento de Química Analítica
Diciembre 2023

A mis padres, por su apoyo incondicional

A Jose, mi compañero, mi pilar...

***“El vino es la única obra de arte
que se puede beber”***

Robert Louis Stevenson

La presente tesis doctoral ha dado lugar a la publicación de un artículo y otros dos se encuentran en redacción.

Artículo publicado:

- **Kinetics of aroma formation from grape-derived precursors: Temperature effects and predictive potential**

Elayma Sánchez-Acevedo, Ricardo Lopez, Vicente Ferreira

Food Chemistry 438 (2024) 137935

DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137935

Factor de impacto de la revista 2023 (JCR ISI): 8.8

Artículos en preparación:

- Fractionation strategies and untargeted UHPLC-MS for the identification of aromatic precursors in winemaking grapes.
- Identification of several glycosidic aroma precursors in six varieties of winemaking grapes and assessment of their aroma potential by acid hydrolysis.

Índice

Presentación y estructura de la tesis	1
Introducción	7
1. El aroma del vino.....	7
1.1 El aroma varietal.....	8
2. Precusores específicos en las uvas	11
2.1 Precusores cisteínicos, glutatiónicos y otros específicos de tioles varietales..	12
2.2 Precusores glicosídicos	15
2.3 Determinación y análisis de precusores glicosídicos	16
2.3.1 Determinación indirecta	17
2.3.2 Determinación directa.....	21
3. Referencias	29
Capítulo 1. Cinética de formación de aromas a partir de sus precusores presentes en las uvas.....	43
1. Introducción.....	43
2. Materiales y métodos.....	44
2.1. Muestras de uvas	44
2.1.1. Preparación de mistelas	44
2.1.2 Fracciones fenólicas aromáticas (FFAs).....	45
2.2. Hidrólisis ácida en anoxia a tres temperaturas	45
2.3. Cuantificación del aroma liberado por hidrólisis ácida	46
2.3.1. Análisis de compuestos volátiles minoritarios y trazas mediante GC-MS	46
2.3.2. Análisis de mercaptanos polifuncionales mediante UHPLC-QqQ-MS....	47
2.4. Algunas consideraciones teóricas. Modelos cinéticos de primer orden para interpretar gráficos experimentales de concentración vs. tiempo.....	48

2.4.1. Moléculas de aroma estables	48
2.4.2. Moléculas de aroma inestables	49
3. Resultados.....	52
3.1. Evolución de compuestos de aroma a tres temperaturas diferentes	52
3.1.1. Moléculas de aroma lábiles (k_d grande) derivadas de moléculas precursoras lábiles (k_h grande)	57
3.1.2. Moléculas de aroma estables (k_d pequeña) derivadas de moléculas precursoras lábiles (k_h grande)	59
3.1.3. Moléculas de aroma estables (k_d pequeña) derivadas de moléculas precursoras bastante estables (k_h pequeña).....	61
a) Moléculas de aroma estables (k_d pequeña) derivadas de moléculas precursoras estables (k_h pequeña) con pequeños efectos de la temperatura...	61
b) Moléculas de aroma estables (k_d pequeña) derivadas de moléculas precursoras estables (k_h pequeña) con efectos moderados de temperatura	62
c) Moléculas de aroma estables (k_d pequeña) derivadas de moléculas precursoras estables (k_h pequeña) con efecto extremo de la temperatura	64
4. Conclusiones.....	66
5. Referencias	67

Capítulo 2. Evaluación de la hidrólisis ácida acelerada a 75°C como método para la predicción del aroma potencial en uvas Garnacha y Tempranillo..... 73

1. Introducción.....	73
2. Materiales y métodos.....	75
2.1 Muestras de uvas	75
2.2 Preparación de mistelas y sus respectivas Fracciones Fenólicas y Aromáticas (FFAs).....	75
2.3. Hidrólisis ácida en anoxia.....	75
2.4. Cuantificación del aroma liberado por hidrólisis ácida	76
3. Resultados.....	77

3.1. ¿Puede la hidrólisis acelerada a 75°C predecir el potencial aromático de la uva?.....	77
3.1.1 Diferencias varietales y de hidrólisis. Análisis de componentes principales (PCA).....	77
3.1.2. Correlación entre la hidrólisis acelerada y lenta.....	83
4. Conclusiones.....	87
5. Referencias	88

Capítulo 3. Evaluación de un procedimiento de fermentación rápida para la preparación de muestra en estudios del aroma varietal producido por hidrólisis ácida de precursores aromáticos 93

1. Introducción.....	93
2. Materiales y métodos.....	94
2.1 Preparación de muestras	94
2.1.1. Preparación de mistela desalcoholizada	94
2.1.2 Extracción de la Fracción Fenólica Aromática (FFA)	94
2.2 Fermentaciones	94
Condiciones fermentación estándar.....	95
Condiciones fermentación rápida	95
2.3 Envejecimiento acelerado mediante hidrólisis ácida en anoxia	96
2.4 Evaluación del aroma generado en la fermentación y luego por hidrólisis ácida	96
2.4.1 Cuantificación de compuestos mayoritarios.....	97
2.4.2 Cuantificación de compuestos minoritarios y trazas	97
2.4.3 Cuantificación de mercaptanos polifuncionales	98
3. Resultados.....	98
3.1 Evaluación del aroma generado por hidrólisis ácida de fermentados y FFAs reconstituidas	99

3.1.1 Aromas varietales	99
3.1.2. Estudio de los aromas mayoritarios.....	113
4. Conclusiones.....	120
5. Referencias	121

Capítulo 4. Fraccionamiento semipreparativo para el aislamiento y caracterización de precursores aromáticos 127

1. Introducción.....	127
2. Materiales y métodos.....	129
2.1 Preparación de muestras	129
2.1.1 Mistelas.....	130
2.1.2 Fracciones fenólicas aromáticas (FFAs).....	130
2.2 Fraccionamiento	130
2.2.1 Fraccionamiento en Toyopearl	130
2.2.2 Fraccionamiento en gel de sílice	131
2.2.2.1 Selección por aroma de fracciones del gel de sílice	131
2.2.2.2 Análisis cualitativo SPME-GC-MS de las fracciones seleccionadas por aroma en el gel de sílice	132
2.3 Análisis UHPLC-QTOF-MS de las fracciones sin hidrolizar seleccionadas en el análisis SPME-GC-MS.....	133
3. Resultados.....	133
3.1 Fraccionamiento con el gel Toyopearl.....	134
3.2 Fraccionamiento en columna de sílica de la F1	136
3.2.1 Análisis SPME-GC-MS.....	138
3.3 Análisis UHPLC-QTOF-MS/MS	140
3.3.1 Identificación de posibles precursores del aroma.....	144
4. Conclusiones.....	153
5. Referencias	154

Capítulo 5. Variabilidad aromática intervarietal como herramienta para la identificación de precursores glicosídicos del aroma en uvas mediante estrategias metabolómicas.....	159
1. Introducción.....	159
2. Materiales y Métodos	160
2.1 Preparación de muestras	160
2.2 Fermentación rápida	160
2.3 Evaluación del aroma	161
2.3.1 Envejecimiento acelerado mediante hidrólisis ácida en anoxia	162
2.3.2 Cuantificación de aromas trazas y minoritarios	162
2.3.3 Cuantificación de mercaptanos polifuncionales	162
2.4 Análisis SPE-UHPLC-QTOF-MS de los vinos recién fermentados.....	162
3. Resultados.....	163
3.1 Variabilidad aromática asociada a la variedad de uva y al tiempo de hidrólisis	165
3.1.1 Estudio de la diversidad aromática de las distintas variedades	168
3.2 Análisis UHPLC-MS de los vinos jóvenes.....	180
3.2.1 Tratamiento y selección de los features detectados	181
3.2.2 Identificación de posibles precursores del aroma.....	182
4. Conclusiones.....	203
5. Referencias	205
Conclusiones generales.....	211
Anexos.....	215
Anexo I. Material suplementario sobre los métodos analíticos empleados.....	215
Anexo II. Aplicación de la metodología de hidrólisis acelerada para la predicción del aroma potencial en uvas de Garnacha. Estudio del impacto de la edad del viñedo y el deshojado en este potencial aromático.	221

Anexo III. Preevaluación de la fermentación rápida de mostos de uva para el estudio de los aromas varietales derivados de hidrólisis ácida de precursores	235
Anexo IV. Perfiles de intensidad en las fracciones sin hidrolizar del análisis UHPLC-MS de los potenciales precursores identificados en el capítulo 4.	245

Presentación y estructura de la tesis

Presentación y estructura de la tesis

Esta tesis ha sido financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España, mediante la beca predoctoral PRE-2018-084968 asociada al proyecto AGL2017-87373-C3-1-R y el trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (LAAE). El objetivo principal fue la evaluación del potencial aromático en las uvas mediante el estudio y caracterización de las moléculas implicadas en este potencial.

La memoria está estructurada de la forma siguiente:

Introducción: En esta sección se hace un repaso al estado del arte en lo referente al origen del aroma varietal, presentando el contexto actual sobre los precursores presentes en las uvas y su determinación, haciendo énfasis en los precursores glicosídicos.

Capítulo 1. Cinética de formación de aromas a partir de sus precursores presentes en las uvas: En este capítulo se estudia la cinética de liberación de aromas varietales a partir de sus precursores en fracciones reconstituidas en vino sintético de uvas de Garnacha. Para ello, se estudia la acumulación de los aromas mediante su liberación por hidrólisis ácida a tres temperaturas 35, 50 y 75°C.

Capítulo 2. Evaluación de la hidrólisis ácida acelerada a 75°C como método para la predicción del aroma potencial en uvas Garnacha y Tempranillo: Basados en los resultados del capítulo 1, en este capítulo se evaluó la hidrólisis ácida acelerada a 75°C durante 24 horas para la predicción del aroma potencial de las uvas. Para ello, se realizaron estudios de correlación entre la acumulación de aromas mediante una hidrólisis suave a 50°C y la propuesta a 75°C, en doce fracciones de precursores extraídas de uvas de Garnacha y Tempranillo. Este capítulo además tiene asociado el anexo “Aplicación de la metodología de hidrólisis acelerada para la predicción del aroma potencial en uvas de Garnacha. Estudio del impacto de la edad del viñedo y el deshojado en este potencial aromático” donde se utiliza esta metodología de hidrólisis para estudiar las diferencias aromáticas que pueden introducir, por un lado, la edad del viñedo y por otro el deshojado en dos momentos distintos del desarrollo de la uva en muestras de la variedad Garnacha.

Capítulo 3. Evaluación de un procedimiento de fermentación rápida para la preparación de muestra en estudios del aroma varietal producido por hidrólisis ácida de precursores aromáticos: El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de una metodología de fermentación rápida en la evaluación del aroma varietal derivado de precursores, tanto frente a la estrategia empleada en los capítulos 1 y 2, basada en la extracción de fracciones fenólicas y aromáticas (FFAs), como frente a una fermentación en condiciones estándares. Además, en el anexo “Preevaluación de la fermentación rápida de mostos de uva para el estudio de los aromas varietales derivados de hidrólisis ácida de precursores” se definen los parámetros de la fermentación rápida y se hace una evaluación previa del aroma liberado por hidrólisis ácida frente a la FFA.

Capítulo 4. Fraccionamiento semipreparativo para el aislamiento y caracterización de precursores aromáticos: En este capítulo se aborda una estrategia de fraccionamiento semipreparativo para simplificar la enorme complejidad que presentan las muestras de uvas en los análisis directos de este tipo de moléculas por UHPLC-MS, con el fin de obtener e identificar los precursores glicosídicos de forma individual y establecer asociaciones más unívocas con los aromas de los que son precursores. Este capítulo incluye el anexo “Perfiles de intensidad en las fracciones sin hidrolizar del análisis UHPLC-MS de los potenciales precursores identificados en el capítulo 4” en el que aparecen reflejados los perfiles de intensidad de cada uno de los potenciales precursores identificados en este capítulo.

Capítulo 5. Variabilidad aromática intervarietal como herramienta para la identificación de precursores glicosídicos del aroma en uvas, empleando diversas estrategias metabolómicas: En este último capítulo el objetivo es la identificación de precursores aromáticos glicosídicos en seis variedades de uvas. Para ello, se emplea un análisis metabolómico por UHPLC-QTOF-MS/MS. Además, se estudian las posibles correlaciones que puedan existir entre estos precursores y los aromas liberados mediante hidrólisis ácida en seis fermentados monovarietales envejecidos, obtenidos mediante la metodología descrita en el capítulo 3, como una herramienta que permita un nivel más de confirmación en la identificación y caracterización de estas moléculas precursoras.

Conclusiones: En este apartado se resumen las conclusiones más importantes de esta tesis.

Anexos: Además de los anexos descritos anteriormente y asociados a los capítulos 2, 3 y 4, se presenta un anexo (Anexo I) que contiene información suplementaria sobre los métodos analíticos empleados.

Introducción

Introducción

1. El aroma del vino

El aroma del vino desempeña un papel crucial en la manera en la que los consumidores lo aprecian o prefieren, ya que este producto se disfruta principalmente por el placer sensorial que ofrece, siendo su aroma la primera impresión que deja. La formación de este aroma es un proceso complejo en el que intervienen la uva, la levadura y una serie de mecanismos químicos y enzimáticos desde las etapas previas a la fermentación hasta el envejecimiento del vino (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

La complejidad del aroma del vino se debe en parte a su origen, pues surge de un proceso extenso que abarca aspectos biológicos, bioquímicos y tecnológicos, comenzando desde la vid hasta llegar a la copa. Además, esta complejidad se atribuye al gran número de compuestos orgánicos volátiles con distintas naturalezas químicas y variadas características sensoriales que pueden encontrarse en concentraciones que van desde miligramos por litro hasta nanogramos por litro.

Los componentes volátiles que constituyen el aroma del vino provienen de distintas familias químicas, lo que permite agruparlos según esta característica. La clasificación propuesta por Cordonnier y Bayonove en 1981 (Cordonnier & Bayonove, 1981) es una de las más empleadas a pesar de inducir a error al estar basada en diversos criterios no bien definidos. En efecto, la clasificación se basa pretendidamente en el origen de estos compuestos y los agrupa en aromas primarios, que son aquellos relacionados con la uva, secundarios, que son los aromas que se producen durante la fermentación como consecuencia de la acción de levaduras y bacterias, y terciarios o *bouquet*: que se forman durante el envejecimiento del vino en barrica y botella.

El problema de esta clasificación es que mezcla el criterio de origen con el de aparición temporal. Al hacerlo y denominar primario al aroma de la uva, no es fiel al hecho de que una gran parte del aroma varietal se forma a lo largo del envejecimiento, por lo que lo incluye dentro del *bouquet*. Por ello, en nuestro caso, la clasificación se basará en aromas varietales y aromas fermentativos, fundamentalmente.

1.1 El aroma varietal

Una parte importante y altamente valorada del aroma del vino está estrechamente ligada a la uva, y es la que denominamos aroma varietal. El aroma varietal va más allá de lo que los enólogos tradicionalmente han considerado como aroma primario, es decir, el que abarca únicamente las moléculas de aroma presentes en las uvas. En cambio, el aroma varietal del vino debería incluir todas las moléculas de aroma cuya cadena de carbono principal fue sintetizada en la uva, puesto que se ha demostrado que la variedad de uva puede llegar a influir en los volátiles fermentativos a través de su perfil característico de aminoácidos, ácidos grasos e incluso de polifenoles (Ferreira & Lopez, 2019).

Sin embargo, si nos limitamos a lo que podríamos llamar aroma varietal primario, este describe a moléculas aromáticas cuya construcción se realizó fundamentalmente en la uva. Se trata mayoritariamente de precursores no volátiles y por tanto, inodoros que liberan el aroma por diversos procesos espontáneos. Dado que las bayas de uva carecen de estructuras anatómicas para almacenar compuestos orgánicos volátiles lipofílicos, tienden a almacenarlos como glicósidos solubles en agua o en conjugación con aminoácidos como la cisteína, en el caso de moléculas azufradas (Peyrot des Gachons et al., 2000). Son estos precursores los que, a través de una serie de procesos químicos espontáneos y de diverso grado de simplicidad, como la hidrólisis, deshidratación, ciclación o esterificación, forman finalmente la molécula de aroma en algún momento de la producción y/o almacenamiento del vino (Ferreira & Lopez, 2019).

Debido a que estos procesos pueden llevar mucho tiempo, una parte significativa del aroma varietal del vino ha sido tradicionalmente clasificada como "aroma terciario", "aroma de evolución" o "*bouquet* de envejecimiento", como se comentó anteriormente. Esto es particularmente evidente en las uvas neutras que se utilizan con mayor frecuencia para producir vinos secos. En estas uvas, la mayoría de los compuestos del aroma están presentes como precursores no volátiles, entre las que se incluyen formas poliólicas (Williams et al., 1980), precursores cisteínicos, glutatiónicos, precursores conjugados de cisteína-glicina y glutamil-cisteína (Bonnaffoux et al., 2017, 2018; Cibaka et al., 2017; Fedrizzi et al., 2009; Tominaga et al., 1998), precursores de sulfuro de dimetilo (DMS) (Loscos et al., 2008; Segurel et al., 2005) y precursores glicosídicos (Y. Z. Gunata et al., 1985; Hayasaka, Dungey, et al., 2010; Schneider et al., 2001; Williams et al., 1982a). La relevancia de todo este conjunto de precursores del aroma comenzó a confirmarse en

estudios antiguos que establecieron una estrecha relación entre la calidad aromática del vino y la presencia de estos precursores en las uvas (Francis et al., 1992).

Los compuestos derivados de las uvas tienen un papel fundamental en la manifestación de los aromas característicos de cada variedad. El término aroma varietal no implica necesariamente que cada variedad de uva tenga compuestos volátiles específicos que la diferencien cualitativamente de otras variedades. Generalmente, cualquier aroma o precursor se encuentra en los mostos y vinos de diferentes variedades de uva y lo que realmente puede diferir son los contenidos de estos compuestos entre las distintas variedades. Estas diferencias de concentración pueden ser de varios ordenes de magnitud y, por tanto, muy relevantes desde el punto de vista sensorial.

A continuación, se mencionan las principales familias químicas y compuestos implicados en el aroma varietal, junto con los vinos en los que estos aromas son más característicos:

- Mercaptanos polifuncionales: principalmente 3-mercaptohexanol y 4-mercapto-4-metil-2-pentanona son determinantes en los aromas de pomelo y boj de los vinos de Sauvignon blanc. El acetato de 3-mercaptohexilo (MHA) es el responsable de del olor a fruta de la pasión de los vinos de Verdejo (Mateo-Vivaracho et al., 2010).
- Terpenos: linalol y geraniol, que determinan el olor floral de los vinos de Moscatel (Ribereau-Gayon et al., 1975), mientras que el óxido de rosa produce el aroma de lichi de los vinos de la variedad Gewürztraminer (Guth, 1997; Ong & Acree, 1999),
- Norisoprenoides: β -damascenona que es importante en los vinos de Pedro Ximénez (Campo et al., 2008) y en general, en vinos elaborados con uvas sobremaduras, β -ionona en algunos vinos de Syrah (Loscos et al., 2010), y TDN responsable del aroma de queroseno observado en algunos vinos de Riesling durante su envejecimiento (Dein et al., 2021; Simpson & Miller, 1983).
- Fenoles volátiles: eugenol, isoeugenol, guaiacol y siringol. Estos están relacionados con el gusto a humo en vinos elaborados con uvas expuestas a incendios (Caffrey et al., 2019; Hayasaka, Baldock, et al., 2010; Ristic et al., 2017).
- Derivados de la vainillina: vainillina, acetovanillona, vanillato de metilo. Estos compuestos están más asociados al envejecimiento del vino en barrica

(Hernández-Orte et al., 2014; Spillman et al., 1997) aunque también se han reportado bajas concentraciones en uvas neutras, aunque muy por debajo de aquellas que se pueden formar por el contacto del vino con la barrica (Ferreira & Lopez, 2019).

- Derivados del ácido cinámico: cinamato de etilo y dihidrocinamato de etilo, se caracterizan por un aroma frutal y balsámico dulce, y se han reconocido como aromas de impacto en vinos de Pinot Noir de Borgoña (Moio & Etievant, 1995).
- Dimetilsulfuro (DMS), su presencia en vinos de Grenache Noir y Syrah del valle de Rhone en Francia, fue estudiada y se demostró que aporta notas a trufa y aceituna negra, además de incrementar las notas afrutadas en estos vinos (Segurel et al., 2004).
- Piperitonas de olor mentolado que pueden estar presentes en grandes vinos de Burdeos (Picard et al., 2016),
- Furaneol, el cual aporta notas a caramelo en vinos rosados de Garnacha (Ferreira et al., 2002) y en vinos de Msalais, típicos de la región de Región Autónoma Uigur de Xinjiang (XUAR) en China. Este es un vino tradicional producido mediante la fermentación espontánea del mosto hervido de la uva local *Vitis vinifera* *Hetianhong*, por lo que entre otros factores en la concentración del furaneol se encuentran implicadas las reacciones de Maillard (Zhu et al., 2019).
- Masoia lactona, que evoca a aromas a coco e higos secos tanto en mostos como en vinos tintos caracterizados por sabores a frutos secos (Pons et al., 2017)
- Alquilmtoxipirazinas que imparten el característico olor a pimiento verde encontrado en algunos vinos de Cabernet y Carmenère (Belancic & Agosin, 2007),
- Rotundona responsable del olor a pimienta negra de vinos de Syrah o Graciano producidos en climas húmedos (Geffroy et al., 2020)
- y por último compuestos implicados en el verdor observados en vinos elaborados con uvas que no han alcanzado la madurez (compuestos tipo C9 y C6 como el 2,6-nonadial y (E)-2-hexenal) (Ferreira & Lopez, 2019) .

La mayoría de estos aromas, a excepción de las alquilmtoxipirazinas, rotundona y los compuestos del verdor, se acumulan en forma de precursores específicos en las uvas. Por precursor específico nos referimos a que el compuesto aromático se formará mediante la

simple incubación del conjunto de precursores extraídos de la uva a un pH normal del vino, o alternativamente, mediante la incubación en presencia de una enzima. De esta categoría quedan excluidas aquellas moléculas precursoras que solo pueden transformarse en compuestos aromáticos mediante una acción metabólica compleja de levaduras, bacterias u otros microorganismos. Por ejemplo, la isoleucina puede ser metabolizada por *Saccharomyces* produciendo ácido isovalérico, alcohol isoamílico y acetato de isoamilo. En este caso, la isoleucina no puede considerarse como un precursor específico para estos importantes compuestos aromáticos, porque sus niveles finales están extraordinariamente limitados por los requerimientos metabólicos de la levadura. De hecho, la levadura es capaz de producir todos esos compuestos incluso sin haber isoleucina en el medio de fermentación. Es por ello que se consideraría más bien como un precursor no específico de la molécula aromática. Esta diferenciación tiene una importancia fundamental para definir el potencial aromático de la uva.

Específicamente, compuestos claves como los terpenos, norisoprenoides y fenoles, se encuentran en forma glicosilada en las uvas (Caffrey et al., 2019; Schneider et al., 2001; Strauss et al., 1988; Ugliano & Moio, 2008; Williams et al., 1982a). Sin embargo, los mercaptanos polifuncionales, se encuentran principalmente en forma de precursores de tipo cisteínicos y glutatiónicos, entre otros (Bonnaffoux et al., 2018).

A continuación, se comentarán aspectos relevantes de las moléculas precursoras que están presentes en las uvas de vinificación y de su determinación.

2. Precursores específicos en las uvas

En términos generales, las uvas utilizadas para la elaboración de vino son aromáticamente neutras y su sutil aroma y sabor se deben a la presencia en pequeñas cantidades de compuestos aromáticos como pueden ser: furaneol, β -damascenona, terpenoles, bencenoides, fenoles, entre otros. Existe una clasificación de las uvas que se basa principalmente en la concentración total de monoterpenos como criterio para clasificar las variedades en: aromáticas o florales y no aromáticas o neutras (Y. Z. Gunata et al., 1985). Las variedades florales o aromáticas son aquellas que presentan concentraciones de monoterpenos totales de alrededor de 1 mg/L o incluso superiores como pueden ser Moscatel de Alexandria, Moscatel de Frontignan o Gewurztraminer, y las no aromáticas

o neutras son aquellas que contienen pequeñas cantidades de estos compuestos, por ejemplo: Chardonnay, Sauvignon Blanc, Merlot, Garnacha, Tempranillo, entre otras.

En las uvas neutras, se han detectado cantidades mensurables de compuestos C6 y bajos niveles de algunos alcoholes, cetonas, ésteres y terpenos (Ferrandino et al., 2012; Genovese, Gambuti, et al., 2013; Gómez et al., 1995). Sin embargo, esta fracción de aroma libre no contiene suficiente concentración de compuestos aromáticos como para tener un alto impacto en el aroma. La razón radica en que como se comentaba anteriormente, las uvas, al ser frutas con alto contenido de agua, no cuentan con estructuras específicas para almacenar de manera segura moléculas no polares, como los compuestos aromáticos. Las moléculas hidrofóbicas presentes en muchos componentes aromáticos se unen en la pulpa y la piel mediante enlaces covalentes con moléculas polares, como azúcares o aminoácidos. Por lo tanto, la uva de vinificación contiene un potencial aromático elevado en forma de precursores no volátiles y por tanto inodoros. Estos precursores pueden transformarse en compuestos aromáticos durante todo el proceso de elaboración del vino y su envejecimiento (Swiegers et al., 2005). De este modo, los compuestos derivados de las uvas juegan un rol fundamental en el desarrollo del aroma final y contribuyen al llamado aroma varietal del vino.

Aunque existen diferentes tipos de precursores como se ha mencionado antes, en esta introducción se hará referencia principalmente a dos tipos: los precursores cisteínicos, glutatiónicos y otros relacionados, específicamente con los tioles varietales y los precursores glicosídicos.

2.1 Precursores cisteínicos, glutatiónicos y otros específicos de tioles varietales

Los precursores cisteínicos y glutatiónicos, como el cisteína-3-mercaptohexan-1-ol (CYS-MH), cisteína-4-mercapto-4-metilpentanona (CYS-MP), glutatión-3-mercaptohexanol (GLUMH) y glutatión-4-mercapto-4-metil-pentanona (GLU-MP), son precursores de la 4-mercapto-4-metil-2-pentanona (MP) y el 3-mercaptohexanol (MH) (Des Gachons et al., 2002; Fedrizzi et al., 2009; Peyrot des Gachons et al., 2000; Tominaga et al., 1998). La MP es responsable de notas a boj y grosella negra (Darriet et al., 1995) mientras que el MH y su correspondiente acetato (MHA) aportan notas a pomelo y fruta de la pasión respectivamente (Tominaga et al., 1998). También se han identificado otros precursores como son conjugados de dipéptidos del MH, como el (S)-

3-hexan-1-ol-cisteinil-glicina (CysGly-MH) y (S)-3-hexan-1-ol- γ -glutamil-cisteína (γ GluCys-MH), así como de la 4MMP, como el (S)-4mercapto-4-metilpentanona-l-cisteinil-glicina (CysGly-MP) y S-4-mercapto-4-metilpentanona-N-(1- γ -glutamil)-l-cisteína (γ GluCys-MP) (Bonnaffoux et al., 2017, 2018; Capone et al., 2011; Cordente et al., 2015). En la figura 1, se observan las estructuras de estos tioles varietales y sus mencionados precursores.

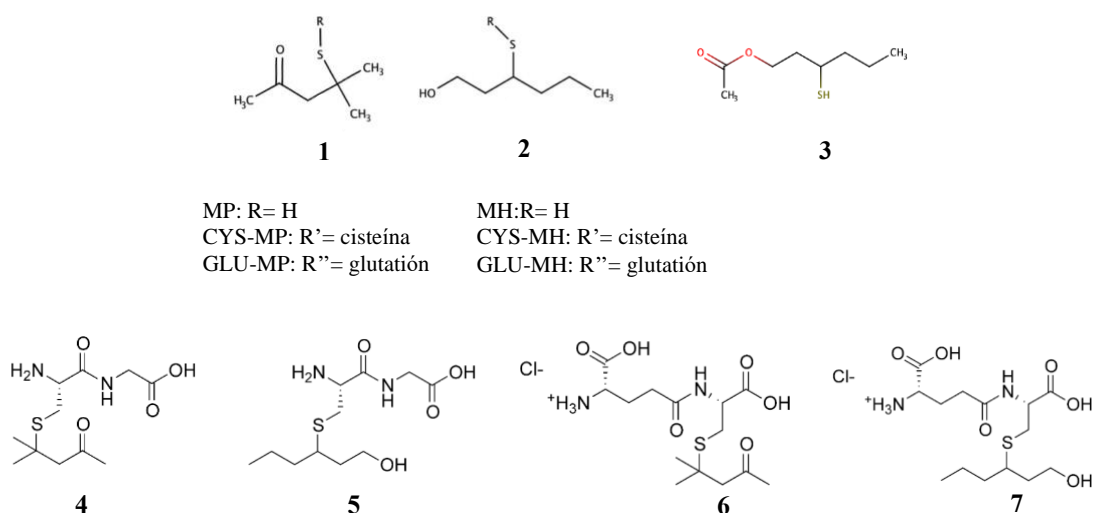


Fig. 1 Estructura de los tioles varietales y sus precursores mencionados anteriormente.

1R: MP, 1R': CYS-MP, 1R'': GLU-MP, 2R: MP, 2R': CYS-MH, 2R'': GLU-MH, 3: MHA, 4: CysGly-MP, 5: CysGly-MH, 6: γ GluCys-MP y 7: γ GluCys-MH.

Se ha observado que los precursores de la MP están presentes en concentraciones menores en comparación con los precursores del MH (Concejero et al., 2016), siendo el GLUMH el precursor más abundante (Capone et al., 2010). La ubicación de estas moléculas en la baya (ya sea en la piel o la pulpa) influye en su extracción durante la elaboración del vino, afectada por procesos como el contacto con la piel y el prensado (Maggu et al., 2007). Además, con la maduración aumenta la concentración de precursores desde el envero hasta la vendimia (Peyrot des Gachons et al., 2000; Roland et al., 2010).

La generación de estos tioles varietales, de reconocida importancia en vinos de variedades como el Sauvignon Blanc (Mateo-Vivaracho et al., 2010), a partir de estos precursores implica una acción de la levadura a través de transportadores de aminoácidos y glutatión (GSH) en la membrana plasmática de las células (Cordente et al., 2015; Subileau et al., 2008a, 2008b). Dentro del citoplasma, el GLUMH se descompone en CysGly-MH en la

vacuola de la levadura por la acción de la enzima ECM38, que también puede catalizar la formación de CYSMH a partir del dipéptido precursor γ GluCys-MH (Cordente et al., 2015; Santiago & Gardner, 2015). El GLUMH podría degradarse mediante la eliminación del glutatión por una γ -glutamyl transferasa (Grzam et al., 2007) o mediante la eliminación del residuo de glicina por una carboxipeptidasa (Wolf et al., 1996) lo que produciría el CysGly-MH y el γ GluCys-MH, respectivamente. Luego, el CysGly-MH (o γ GluCys-MH) podría ser degradado por una carboxipeptidasa (o γ -glutamyl transferasa) para obtener el Cys-MH. Aún es desconocida la carboxipeptidasa responsable de romper el dipéptido CysGly-MH en CYSMH y la ruta de degradación de GLUMP para producir MP.

Una vez asimilados desde el mosto o formados por la degradación de sus precursores glutatiónicos y dipéptidos, las enzimas de la levadura con actividad β -liasa rompen el enlace carbono-azufre, liberando así el mercaptano correspondiente y, por ende, el aroma (Tominaga et al., 1998). El mecanismo de liberación de los mercaptanos polifuncionales se exploró inicialmente para la MP mediante la eliminación de genes codificantes de las liasas carbono-azufre de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Howell et al., 2005). En *Saccharomyces cerevisiae*, al menos dos genes, IRC7 y STR3, están involucrados en la liberación de mercaptanos polifuncionales de los conjugados de cisteína (Holt et al., 2011; Roncoroni et al., 2011).

Por otra parte, los mercaptanos polifuncionales se encuentran en el vino en concentraciones de ng/L, mientras que sus precursores presentes en la uva y el mosto se encuentran en μ g/L, lo que implica una concentración del compuesto aromático hasta 1000 veces menor que la de sus precursores. Investigaciones anteriores han indicado que parte de los precursores está directamente relacionados con el aroma, pero solo una pequeña fracción se libera formando el compuesto durante la fermentación (Bonnafox et al., 2018; Concejero et al., 2016; Peyrot des Gachons et al., 2000; Roland et al., 2010).

En otra vía de formación elucidada en 2006, el MH puede producirse en la adición de un grupo donador del grupo tiol al (E)-2-hexenal durante la fermentación alcohólica (Schneider et al., 2006). Se ha sugerido que el H₂S podría ser uno de los donantes de azufre (Harsch et al., 2013). Se ha teorizado que podrían ser también los ácidos sulfónicos en base a su estructura, pero aún no se han identificado (Duhamel et al., 2015).

2.2 Precursores glicosídicos

Los precursores glicosídicos son moléculas compuestas por una o más unidades de azúcar enlazadas mediante un enlace glicosídico a una aglicona. Estos fueron inicialmente identificados en las uvas por (Cordonnier & Bayonove, 1974). Aunque no se ha esclarecido completamente el papel directo de los glicósidos en las plantas se ha sugerido que forman parte de la "quimiodiversidad" esencial para su supervivencia (Caputi et al., 2012). Su distribución en la uva es bastante variable entre variedades, y depende principalmente de la estructura de la aglicona, aunque generalmente, los hollejos contienen mayores contenidos tanto de aromas libres como de las formas conjugadas (Baumes, 2009). También se han encontrado precursores glicosídicos en hojas de vid (Y. Z. Gunata et al., 1986; Skouroumounis & Winterhalter, 1994; Wirth et al., 2001), especialmente altos niveles de glicósidos de norisoprenoides, posiblemente debido a una mayor presencia de sus precursores, los carotenoides. No obstante, las diferencias en los patrones de norisoprenoides sugieren variaciones en las vías metabólicas entre las hojas y las uvas (Wirth et al., 2001).

En general, los precursores glicosídicos se presentan mayoritariamente en forma de diglicósidos, también en forma de monoglicósidos (Z. Gunata et al., 1988; Williams et al., 1982a) y recientemente, se ha informado de hasta tres azúcares en la estructura de algunos glicósidos en las uvas (Godshaw et al., 2019; Hjelmeland et al., 2015). En la figura 2 se muestran ejemplos de algunos fragmentos de azúcares de precursores glicosídicos.

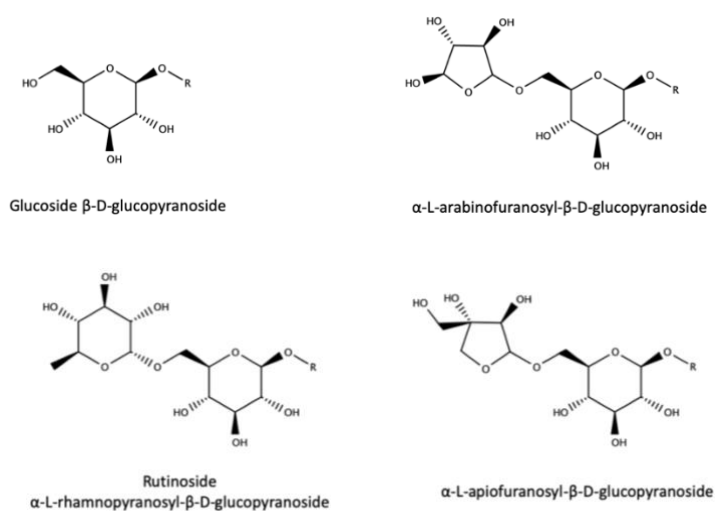


Fig. 2 Fragmentos de azúcares de precursores glicosídicos. Adaptado de Hjelmeland et al. (Hjelmeland & Ebeler, 2015)

Respecto a sus estructuras, se creía generalmente que una glucopiranososa (hexosa) era siempre el azúcar primario unido a la aglicona; sin embargo, la reciente identificación tentativa de glicósidos de sesquiterpenos en uvas Moscatel de Alejandría y glicósidos de uvas Cabernet Sauvignon expuestas al humo, ha demostrado que es posible que otros azúcares estén unidos directamente a la aglicona (Caffrey et al., 2019, 2020).

Los glicósidos son la principal forma en la que se presentan los aromas en las uvas y por tanto, una fuente potencial de volátiles aromáticos que contribuyen al perfil aromático del vino (Arévalo-Villena et al., 2007; Cabaroglu et al., 2003; Rodríguez-Bencomo, Cabrera-Valido, et al., 2011; Rodríguez-Bencomo, Muñoz-González, et al., 2011), de ahí que su estudio y caracterización resulten vitales para la industria vinícola.

2.3 Determinación y análisis de precursores glicosídicos

Como se comentó anteriormente, la estructura de estos precursores está formada por uno o más azúcares unidos mediante un enlace O-glicosídico a una aglicona. Esta aglicona puede liberarse durante la vinificación, gracias a la acción de levaduras (Delfini et al., 2001; Denat, Pérez, Heras, Querol, et al., 2021; Fernández-González & Di Stefano, 2004; Hernández-Orte et al., 2008). Este proceso puede ser mediado por glicosidasas exógenas o endógenas (Günata et al., 1990; Sánchez Palomo et al., 2005) o por hidrólisis ácida (López et al., 2004; Skouroumounis & Sefton, 2000; Ugliano & Moio, 2008; Williams et al., 1982b).

Históricamente, los métodos de determinación de precursores del aroma han estado basados en la determinación indirecta de los volátiles liberados, debido al gran número y complejidad de las combinaciones de agliconas y azúcares que dificultan su determinación como precursores intactos. A esto se añade su baja concentración en la uva y la ausencia de patrones, por lo que no es de extrañar que la determinación indirecta fuera la única posibilidad a la que tenían acceso los investigadores. Sin embargo, a raíz de la mejora de los equipos de cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC) y su acoplamiento a analizadores de masas de última generación, el panorama está cambiando en los últimos años y se están empezando a publicar los primeros trabajos basados en la determinación de los precursores glicosídicos intactos. A continuación, se proporciona una visión general de los estudios llevados a cabo utilizando ambas estrategias, tanto la indirecta como la directa, para la determinación de estos precursores.

2.3.1 Determinación indirecta

Con el tiempo, se han desarrollado diferentes métodos para el aislamiento y la evaluación cuantitativa del conjunto de precursores de aroma basados principalmente en la hidrólisis enzimática y la hidrólisis ácida. Después de obtener la fracción glicosídica de la muestra de uva o vino, esta puede ser hidrolizada y las agliconas liberadas pueden ser analizadas utilizando técnicas de cromatografía de gases (GC).

Hidrólisis enzimática

Algunos autores, con el objetivo principal de comprender la naturaleza de la aglicona de los precursores glucosídicos, han preferido la hidrólisis enzimática de la fracción de precursores (Schneider et al., 2001).

La hidrólisis enzimática depende en gran medida de la elección de la enzima. Los monosacáridos en la uva pueden ser hidrolizados por endo- o exo-glicosidasas. Las enzimas endoglicosidasas son capaces de hidrolizar el enlace glicósido-aglicona, independientemente del número de grupos de azúcar, es decir, que tendrán actividad tanto en monosacáridos como en disacáridos, a diferencia de las exo-glicosidasas, que solo son capaces de romper los enlaces azúcar-azúcar, como se muestra en la figura 3. Los glicósidos disacáridos solo se hidrolizarán completamente para liberar el aroma, de manera escalonada utilizando dos o más enzimas, o mediante el uso de una endoglicosidasa.

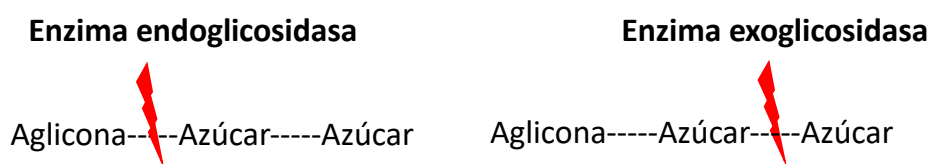


Fig.3 Acción de las enzimas endo- y exo-glicosidasas sobre los glicósidos. Adaptada de (Hjelmeland & Ebeler, 2015)

Shoseyov et al (Shoseyov et al., 1988) aislaron y purificaron una endoglicosidasa de *Aspergillus niger* cultivado en un medio que contenía glicósidos de monoterpenos. Si bien la enzima fue térmicamente estable y tuvo una actividad óptima a pH 3,4, consistente con las condiciones típicas de pH de la uva y el vino, la actividad de la enzima disminuyó

con porcentajes de etanol superiores al 9%. Además, la actividad fue inhibida en gran medida por la glucosa. La inhibición de las glicosidasas por el etanol y la glucosa es un problema para muchas preparaciones enzimáticas y muchas además, tienen pH óptimos de trabajo fuera del rango relevante para las uvas y el vino (Aryan et al., 1987; Günata et al., 1990).

Además, aunque los estudios han indicado que durante la hidrólisis enzimática pueden ocurrir menos reordenamientos de la aglicona liberada (Cordonnier & Bayonove, 1974; Y. Z. Gunata et al., 1985; Mateo & Jiménez, 2000), aún podrían producirse artefactos a través de la oxidación enzimática (Hampel et al., 2014; Winterhalter & Skouroumounis, 1997). Estos hallazgos sugieren que es probable que la hidrólisis enzimática no pueda liberar una gran cantidad de agliconas y posiblemente conduzca a la identificación de estructuras de agliconas que son en realidad artefactos.

La limitación de este enfoque es que no puede proporcionar una evaluación confiable del potencial aromático, ya que muchas moléculas de aroma derivadas de precursores no están presentes como agliconas, sino que derivan de la transformación química de la aglicona. Esto es especialmente evidente en precursores norisoprenoides, como la β -damascenona o 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN) (Strauss et al., 1986). En la figura 4, se puede observar el ejemplo del reordenamiento propuesto para la formación de la β -damascenona a partir del triol alénico proveniente de la degradación del carotenoide neoxantina (Daniel et al., 2008). Es por esta razón que, para evaluar este tipo de compuestos aromáticos, se prefiere la hidrólisis ácida (Loscos et al., 2009; Slaghenaufi & Ugliano, 2018; Williams et al., 1989).



Fig. 4. Formación de la β -damascenona a partir del triol alénico. Adaptada de Daniel et al (Daniel et al., 2008)

Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es un proceso más rápido y económico que la hidrólisis enzimática. En un estudio comparativo entre ambos tipos de hidrólisis (Loscos et al., 2009), la hidrólisis enzimática liberó más terpenos en cinco de siete variedades de uvas pero la hidrólisis ácida produjo concentraciones de norisoprenoides 10 veces mayores en todas ellas. Se sugiere que la hidrólisis ácida en las bayas de uva es la vía principal para liberar monoterpenos de sus glicósidos, ya que las glicosidasas endógenas son fuertemente inhibidas por la glucosa (Aryan et al., 1987; Günata et al., 1990; Williams et al., 1982b).

Williams et al. (Williams et al., 1982b) evaluaron la hidrólisis de glicósidos monoterpénicos tanto con una enzima glicosidasa como su hidrólisis en condiciones de hidrólisis ácida. Se observó que la hidrólisis ácida generó una mayor diversidad de compuestos en comparación con la hidrólisis enzimática. Además, la fracción de glicósidos extraída de las uvas tratadas con ácido mostró una mayor semejanza con el perfil aromático de la baya de uva que la muestra hidrolizada con enzimas.

Aunque la hidrólisis ácida puede ofrecer una representación más fiel del aroma de la uva y el vino que la enzimática, esta disparidad dificulta la identificación del precursor glicosídico íntegro. Por ejemplo, a un pH de 3,0, los glicósidos de linalilo, geraniilo y nerilo produjeron predominantemente linalol y α -terpineol como productos (Williams et al., 1982b).

En resumen, la hidrólisis ácida puede reflejar mejor lo que sucede durante la elaboración del vino, aunque es un poco más reducida la información que permite obtener sobre la estructura del precursor glicosídico. Ambas técnicas de hidrólisis, enzimática y ácida, poseen ventajas y limitaciones, y en última instancia, la elección depende de los objetivos específicos del trabajo del investigador.

Un factor importante a tener en cuenta en la hidrólisis ácida es la temperatura y el tiempo. Con fines cuantitativos, se ha utilizado a menudo una hidrólisis ácida a 100°C (Ibarz et al., 2006; Loscos et al., 2009). Sin embargo, en estas condiciones de temperatura, moléculas de aroma lábiles, como el linalol y el geraniol, se degradan rápidamente (Hampel et al., 2014), y los modelos hidrolizados muestran matices con poca intensidad aromática. Se obtienen mejores propiedades aromáticas si la hidrólisis de la fracción de precursores se lleva a cabo a temperaturas suaves (Francis et al., 1992), lo que requiere semanas e

incluso meses. Sin embargo, algunos descriptores de aroma como miel o té desarrollados durante la hidrólisis de extractos de precursores purificados sugieren que ocurren procesos de oxidación en estas condiciones (Francis et al., 1992; López et al., 2004).

Parte de esta oxidación se puede evitar si la hidrólisis se lleva a cabo en completa anoxia (Oliveira & Ferreira, 2019) y, particularmente, si el extracto de precursores no se purifica e incluye polifenoles de la uva o del vino (Alegre, Arias-Pérez, et al., 2020). Bajo estas condiciones, incluso a 75°C y en tan solo 24 horas, se obtienen perfiles sensoriales congruentes con los matices olfativos del vino no oxidado y relacionados con la variedad de uva (Alegre, Sáenz-Navajas, et al., 2020). Esto sugiere que la hidrólisis ácida en condiciones de anoxia podría ser una herramienta prometedora para el estudio del potencial aromático en las uvas utilizadas para la elaboración del vino.

En la tabla 1, al final de esta introducción, a modo de resumen se muestra información relativa a la presencia de aromas en hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis enzimática, ácida fuerte o ácida suave (a largo plazo). Como se puede observar, ninguno de los norisoprenoides se encuentra en los hidrolizados enzimáticos, solo en caso de uvas congeladas antes del análisis o en uvas pasas. En el caso de los terpenos, fenoles volátiles y derivados de la vainilla, la hidrólisis enzimática, en general, produjo niveles mucho más altos que la hidrólisis ácida fuerte. En contraste, la mayoría de los compuestos se encuentran a niveles razonables en los hidrolizados obtenidos por la hidrólisis ácida a largo plazo. También se observan grandes diferencias entre compuestos en cuanto al patrón de acumulación durante el envejecimiento: el linalool y el geraniol alcanzan niveles máximos inmediatamente después de la fermentación o tras un breve período de envejecimiento, para luego decaer drásticamente. La β -damascenona y la β -ionona también alcanzan niveles máximos después de un período relativamente corto de envejecimiento, pero sus niveles disminuyen lentamente o se mantienen estables. En contraste, el TDN y la mayoría de los fenoles volátiles y derivados de la vainilla aumentan constantemente durante el envejecimiento. Los vinilfenoles (4-vinilfenol y 4-vinilguaiacol) muestran evoluciones más complejas con al menos dos máximos, probablemente debido al número de precursores que poseen y su reactividad química. Los datos resumidos en esta tabla también revelan la existencia de variabilidades enormes en los niveles de la mayoría de los compuestos, en función de la variedad, la añada, la ubicación o la madurez.

En resumen, estas técnicas indirectas de determinación de glicósidos, ya sea a través de la hidrólisis enzimática o ácida de las fracciones de precursores y la posterior determinación de la aglicona por técnicas de Cromatografía de Gases, constituyen una herramienta muy útil para el estudio de los precursores del aroma en las uvas, especialmente la hidrólisis ácida. Sin embargo, constituyen una determinación indirecta de estas moléculas y su utilidad está enfocada en una evaluación del potencial aromático global, ya que no tienen en cuenta la existencia de distintos precursores para una misma aglicona y que estos presentan distintas estabilidades, por lo que tienen también distintos tiempos de hidrólisis.

2.3.2 Determinación directa

Los problemas, desde el punto de vista analítico, para la determinación directa de estos compuestos son abundantes. Como se ha indicado más arriba, su diversidad, baja concentración y falta de patrones analíticos son dificultades importantes. Por otra parte, su detectabilidad viene limitada porque la mayoría no suelen tener grupos cromóforos en su estructura que permitan su análisis mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detección por espectroscopía de luz ultravioleta visible o fluorescencia. Por tanto, el único detector realmente válido para acoplar a la cromatografía líquida de estos compuestos debe ser un espectrómetro de masas. En el caso de necesitar identificar los precursores se utilizan los analizadores de alta resolución como el de tiempo de vuelo (TOF), preferiblemente acoplados a cuadrupolo (QTOF) para disponer de la posibilidad de realizar espectrometría de masas en tándem. A pesar de la gran capacidad de estos analizadores, en muchos casos la alta complejidad de los cromatogramas obtenidos hace inevitable un fraccionamiento previo de las muestras. En el caso de la cuantificación de precursores ya identificados, sería preferible el uso de analizadores triple cuadrupolo por su mayor sensibilidad y productividad. Estos avances instrumentales han permitido la medición directa de glicósidos en estudios recientes, lo que ofrece un conocimiento más detallado de cómo varían sus perfiles durante el desarrollo de cultivos o en procesos de elaboración de vino y cerveza.

En la tabla 1, en la columna de determinación directa, se mencionan algunos ejemplos de glicósidos identificados por algunos autores como potenciales moléculas precursores de los aromas mencionados.

Caffrey et al. (Caffrey et al., 2022) realizaron la identificación de algunos glicósidos, potenciales precursores aromáticos, en muestras de lúpulos empleando un fraccionamiento cromatográfico en una columna de fenil-hexilo (fase reversa) y realizaron la determinación de los glicósidos aislados por UHPLC-MS con una columna de carbono poroso grafitizado (PGC), la cual separa los analitos basándose en mecanismos mixtos, por ejemplo: interacciones dispersivas, tamaño/forma y polarizabilidad del analito (West et al., 2010). La determinación de las agliconas fue realizada empleando la hidrólisis enzimática. Los autores concluyeron que la combinación de las diferentes fases fue clave para la identificación potencial de numerosos glicósidos de diferentes familias de aromas, pero que un análisis más exhaustivo con otras técnicas de elucidación estructural podría ser necesario.

Por otro lado, Okasaka et al. (Okasaka et al., 2008) emplearon también la estrategia de fraccionamiento combinando gel de sílice, Toyopearl HW-40, Sephadex LH-20 y Amberlite XAD-2 para la identificación de glicósidos de monoterpénos en extractos de raíces de *Paeonia hybrida*. La determinación estructural se realizó por técnicas espectroscópicas como espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) y resonancia magnética nuclear (RMN) ^1H y ^{13}C , pudiendo identificar nuevos glicósidos en esta planta.

Por su parte, Schievano et al. (Schievano et al., 2013) emplearon también la RMN para la identificación estructural de precursores del aroma en mosto de Moscato Giallo mediante un fraccionamiento previo en la resina Amberlite-XAD y la posterior determinación de las fracciones por UHPLC-MS. Los autores comentan que las técnicas de LC-MS y LC-MS/MS permiten asignaciones estructurales tentativas de los glicósidos, aunque, la confirmación de estas asignaciones iniciales solo es posible a través de una caracterización adicional mediante RMN. Sin embargo, dada la cantidad de analito purificado requerida para obtener señales mensurables con esta técnica, su aplicabilidad a la identificación de precursores aromáticas queda limitada a aquellos pocos que pueden ser localizados en concentraciones altas en los extractos de plantas.

Es indudable que las técnicas de determinación directa de los precursores glicosídicos ofrecen ventajas significativas en comparación con los métodos tradicionales de GC-MS, a pesar de sus limitaciones, principalmente causadas por la falta de estándares analíticos, lo que dificulta la identificación precisa de estas moléculas y por tanto, su cuantificación

(Caffrey et al., 2019, 2020; Godshaw et al., 2019; Hjelmeland et al., 2015; Wei et al., 2021). En especial, la identificación de agliconas es un reto en el análisis por UHPLC-MS debido a la abundancia de isómeros posibles, la diversidad de combinaciones de azúcares y los bajos niveles presentes en las uvas. Esto dificulta enormemente la confirmación de sus estructuras. (Caffrey et al., 2020; D'Ambrosio, 2019; Flamini et al., 2018; Godshaw et al., 2019; Hjelmeland et al., 2015).

En resumen, tal y como se puede deducir de todo lo expuesto anteriormente, los precursores del aroma que se encuentran en las uvas tienen una gran repercusión en la calidad aromática del vino. Un mejor conocimiento de su naturaleza y comportamiento durante todas las etapas de producción del vino es imprescindible para avanzar en la evaluación del aroma potencial proveniente de las uvas. Nuestra apuesta en esta tesis es la identificación de estos analitos intactos utilizando aproximaciones metabolómicas y combinarlas con métodos de análisis más habituales basados en la determinación de los volátiles liberados. Durante esta memoria se van a presentar estos métodos de análisis aplicados a diversos experimentos relacionados con la cinética y evolución de estas moléculas.

Tabla 1. Resumen de la determinación de aromas de relevancia en el vino de forma indirecta (Ferreira & Lopez, 2019) a través de las hidrólisis enzimática y ácida (fuerte o moderada/leve) y directa de precursores glicosídicos, en esta última se hace referencia a los glicósidos identificados.

Familia	Aroma	Determinación indirecta de precursores			Determinación directa de precursores
		Hidrólisis enzimática	Hidrólisis ácida fuerte	Hidrólisis ácida suave o moderada	
Norisoprenoides	β -damascenona	No encontrado, aunque sí en uvas pasas [1, 2] y congeladas [3]; no encontrado en vinos [4]; 0,17-0,5 ppb en uvas congeladas [5]	26 ppb [6]; detectado por GC-O [7]; 4-28 ppb dependiendo de la variedad; 2-4,5 ppb dependiendo de la variedad [5]	Detectado por GC-O [8]; máximo (3,3 ppb) después de un breve período de envejecimiento y luego decrece [9]; continuo incremento en muestras fermentadas durante todo el envejecimiento [10] máximo 7,1-7,3 ppb después de un eun envejecimiento medio en muestras control no fermentadas [10]; Se forma pronto y es estable, presenta un máximo de 17 ppb [11]; id con máximo de 7 ppb [12]	3-hidroxi-5,6-epoxi- β -ionona-3-O- β -D-glucopiranosido; 4,5-dihidrovomifoliol-9-O- β -D-glucopiranosido; vomifoliol-9-O- β -D-glucopiranosido [25] 3,4-dihidroxi-7,8-dihidro- β -ionona-3-O-rutinósido;
	β -ionona	No encontrado; sí en uvas congeladas [3]; no en vinos [4]; < 0.11 ppb en uvas congeladas [5]	Generalmente sí; No [5]	máximo (1,9 ppb) después de un breve período de envejecimiento estable con el tiempo [9] Se forma pronto y estable durante un tiempo, máximo 7.7 ppb [11]	3,4-dihidroxi-7,8-dihidro- β -ionona-3-O- β -D-glucopiranosido [26]
	TDN	No encontrado; sí en uvas congeladas [3]; no en vinos [4]; 1-6 ppb (5-30% de los niveles encontrados por hidrólisis ácida fuerte) en uvas congeladas [5]	8 ppb [6] GC-O [139] 1-35 ppb dependiendo de la variedad [13], 8-89 ppb dependiendo de la variedad [5]	Incremento lineal con el tiempo, máximo de 140 ppb [10]; Id, máximo a 61 ppb [11]; Id[12]	3,4-dihidroxi-7,8-dihidro- β -ionol-hexose; 3,4-dihidroxi-7,8-dihidro- β -ionol-hexosa-hexosa; 3-hidroxi-7,8-dehidro- β -ionol-hexosa-hexosa [27] 3-Oxo- α -ionol/3-hidroxi- β -damascenona-pentosa-hexosa;

Familia	Aroma	Determinación indirecta de precursores			Determinación directa de precursores
		Hidrólisis enzimática	Hidrólisis ácida fuerte	Hidrólisis ácida suave o moderada	
					3-Oxo- α -ionol/3-hidroxi- β -damascenona-deoxihexosa-hexosa; vomifoliol-deoxihexosa-hexosa; vomifoliol-pentosa-hexosa [28]
Terpenos	Linalol	Generalmente presente. No encontrado en uvas tintas portuguesas [13]. No encontrado en Melon B [14] No encontrado en Shiraz [15] Encontrado en bajos niveles (1% del total de terpenos) [15]	3% de los niveles encontrados en hidrólisis enzimática [6]; 10-50% de los niveles encontrados en hidrólisis enzimática [5]	Encontrado solo en hidrólisis ácida moderada [14]; máximo después de fermentación, marcado decrecimiento con el envejecimiento [9]; En Garnacha, máxima después de un breve envejecimiento [10]; se forma rápidamente y luego decrece drásticamente [11,12]	linalol-3-O-[α -L-arabinofuranósil-(1-6)-1- β -D-glucopiranosido]; linalol-3-O-[α -L-apirofuranósil-(1-6)-1- β -D-glucopiranosido]; linalol-3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1-6)-1- β -D-glucopiranosido [29]
	Geraniol	Se encuentra siempre; valores por encima del 10% del total de terpenos en Shiraz, 14% in Moscatel [15]	No [138]; 3-30% de los niveles encontrados en hidrólisis enzimática [5]	Máximo en la fermentación, decrecimiento marcado con el envejecimiento [9,10] se forma rápidamente y luego decrece drásticamente [11,12]	geraniol-1-O-[α -L-arabinofuranósil-(1-6)-1- β -D-glucopiranosido]; geraniol-1-O-[α -L-ramnopiranosil-(1-6)-1- β -D-glucopiranosido] [29]
	(Z)-óxido de rosa	11-29 ppb en Moscatel, dependiendo del estado de maduración [16]	0.04 ppb en Moscatel, 0.01 ppb en Garnacha. No encontrado en Verdejo, Tempranillo, Chardonnay, Cabernet Sauvignon o Merlot [5]		
Fenoles volátiles	Guaiacol	No encontrado [17]; solamente en Brachetto, no en Aleático, Malvasía o Moscatel [22]; < 2 ppb [18]; hasta 60 ppb en vino Rojal [4]; 0-41 ppb [23]; 10-76 ppb dependiendo de la añada [19]; 15-44 dependiendo de la añada [20]; 17 ppb en Syrah [15]; 0,4-2,3 ppb dependiendo de la variedad [5]	Detectado por GC-O [139]; < 0.61 ppb, no relacionado con los niveles en la hidrólisis enzimática [5]	Detectado por GC-O [8]; aumento constante en el tiempo 4,3 ppb [9]; idem, máximo 6,3 ppb [10]; idem, máximo 14 ppb [11]	Guaiacol-hexosa; guaicol-pentosa-hexosa [30,31] guaiacol-pentosa; guaicol-hexosa-hexosa [31]

Familia	Aroma	Determinación indirecta de precursores			Determinación directa de precursores
		Hidrólisis enzimática	Hidrólisis ácida fuerte	Hidrólisis ácida suave o moderada	
	Eugenol	1-8,3 ppb [17,22]; no encontrado [18]; hasta 33 ppb en vino Rojal [4]; presente en menos de la mitad de las variedades, hasta 16 partes por mil millones (ppb) [23]; 84-216 ppb dependiendo de la cosecha [19]; 12-20 en Bobal dependiendo de la cosecha [20]; nd-9,4 ppb dependiendo de la variedad [13]; 2,7-18 ppb dependiendo de la ubicación [13]; 10 ppb en Syrah [15]; 0,4-7 ppb dependiendo de la variedad [5].	Detectado por GC-O [7]; < 0,36 ppb, no relacionado con los niveles en la hidrólisis enzimática [5]	Aumento constante, máximo 1,25 ppb [11]	eugenol/isoeugenol-deoxihexosa [30] eugenol-/isoeugenol-hexosa; eugenol-/isoeugenol-pentosa; eugenol-/isoeugenol-hexosa-hexosa [31]
	Isoeugenol	hasta 14 ppb en vino Rojal [4]; 7,6-26 ppb dependiendo de la añada [19]; 5-25 ppb dependiendo de la añada [20]; 0,4-4,8 ppb dependiendo de la variedad [5].	<0,58 ppb, no relacionado con los niveles en la hidrólisis enzimática [5]	Detectado por GC-O [8]	
	Siringol	3-60 ppb [22]; nd-13 ppb dependiendo de la variedad [5]	nd-5,5 ppb dependiendo de la variedad [5]	Detectado por GC-O [8]; aumento constante con el tiempo, máximo de 33 ppb [9]; Id, máximo de 142 ppb [11].	siringol-hexosa [30,31] siringol-pentosa; siringol- pentosa-hexosa; siringol- pentosa-pentosa [31]

Familia	Aroma	Determinación indirecta de precursores			Determinación directa de precursores
		Hidrólisis enzimática	Hidrólisis ácida fuerte	Hidrólisis ácida suave o moderada	
	4-vinilguaiacol	65-357 ppb [21]; <24 ppb [23]; 56-378 ppb dependiendo de la añada [19]; 56-64 ppb dependiendo de la añada en Bobal [20]; 2-114 ppb dependiendo de la variedad [13]; 2-178 ppb dependiendo de la ubicación [13]; 21 ppb en Syrah [15]; 39-162 ppb dependiendo de la variedad [5]	el 40% de la enzimática [6]; detectado por GC-O [7]; 10-38 ppb dependiendo de la variedad, sin relación con la enzimática [5]	un máximo (21 ppb) después de un breve envejecimiento, luego disminución y aumento constante [9]; aumento continuo, máximo de 5,5 ppm [10]; formado pronto y estable, máximo de 1,3 ppm [11]	4-vinilguaiacol-hexosa; 4-vinilguaiacol-pentosa; 4-vinilguaiacol-hexosa-hexosa [31]
	4-vinilfenol	28-266 ppb [23]; 5-222 ppb dependiendo de la variedad [13]; 19-310 ppb dependiendo de la ubicación [13]; 6 ppb en Syrah [15]; 121-1739 ppb dependiendo de la variedad [5].	9-21 ppb dependiendo de la variedad, no relacionado con la enzimática [5]	máximo después de un breve envejecimiento (45 ppb), luego disminución y luego un aumento constante, máximo de 80 ppb [9]; aumento continuo, máximo de 4,4 ppm [10]; se forma muy pronto, luego disminución constante, máximo a 102 ppb [11].	4-vinilfenol-pentosa-pentosa [31]
Derivados de la vainillina	Vainillina	27-42 ppb [22]; 361 ppb en la piel de uva di Troia [18]; 31-61 ppb [137]; < 37 ppb [23]; 48-68 ppb dependiendo de la añada [19]; 60-160 ppb dependiendo de la añada en Bobal [20]; 31 ppb en Syrah [15]; 40 ppb en Moscatel [15]; < 4.1 ppb [5]	50% de la enzimática [6]; Detectado por GC-O [7]; < 1.5 ppb[5]	Detectado por GC-O [8]; Aumento lineal con el tiempo, máximo 45 ppb [9]; idem, máximo 91 ppb [10]; Idem, máximo 123 ppb [11]	vainillina-hexosa vainillina-pentosa vainillina-hexosa-hexosa vainillina-pentosa-hexosa [31]
	Acetovainillona	Hasta 205 y 260 ppb en los vinos Rojal y Tortosí [4]; 1-12 ppb dependiendo de la añada [19]; 42 ppb en Moscatel, no en	Detectado por GC-O [139]; < 2.5 ppb, no relacionado con la enzimática [12]	Patrón poco claro [144]; 5 ppb en mostos de Chardonnay [149]	acetovainillona-hexosa acetovainillona-pentosa [31]

Familia	Aroma	Determinación indirecta de precursores			Determinación directa de precursores
		Hidrólisis enzimática	Hidrólisis ácida fuerte	Hidrólisis ácida suave o moderada	
		Syrah [15]; 8-34 ppb dependiendo de la variedad [5].			
Derivados del ácido cinámico	Cinamato de etilo	7 ppb solo en la pulpa de Uva di Troia [18]; < 0,8 ppb [5]; Su posible precursor, el ácido cinámico, se ha encontrado hasta 7 ppb en fracciones de vino, niveles que dependen de la añada [4,19, 20].	12 ppb [6]; < 0.11 ppb [5]	Detectado por GCO [8,10]; aumento constante con el tiempo en algunas variedades, máximo de 3,3 ppb [9]; máximo de 3,3 ppb después de un breve envejecimiento [10]	
Lactona	Masoia lactona			Detectado por GC-O [11]; disminuye con el envejecimiento en vinos de Tempranillo [24]	

Referencias:

[1] (Wang et al., 2017)	[7] (Botelho et al., 2010)	[13] (Cabrita et al., 2006)	[19] (García-Carpintero, Sánchez-Palomo, & González-Viñas, 2011)	[23] (García-Carpintero, Sánchez-Palomo, Gallego, et al., 2011)	[26] (Gök et al., 2022)
[2] (Wang et al., 2015)	[8] (López et al., 2004)	[14] (Schneider et al., 2001)	[20] (Gracia-Moreno et al., 2015)	[24] (Denat, Pérez, Heras, Sáenz-Navajas, et al., 2021)	[27] (Caffrey et al., 2020)
[3] (Carlomagno et al., 2016)	[9] (Loscos et al., 2010)	[15] (Torchio et al., 2016)	[21] (Picard et al., 2016)	[25] (Skouroumounis & Winterhalter, 1994)	[28] (Wei et al., 2021)
[4] (Gómez García-Carpintero et al., 2012)	[10] (Oliveira & Ferreira, 2019)	[16] (Crespo et al., 2018)	[22] (Sefton et al., 1993)		[29] (Schievano et al., 2013)
[5] (Loscos et al., 2009)	[11] (Wirth et al., 2001)	[17] (D’Onofrio et al., 2017)			[30] (Caffrey et al., 2019)
[6] (Ugliano & Moio, 2008)	[12] (Slaghenaufi & Ugliano, 2018)	[18] (Genovese, Lamorte, et al., 2013)			[31] (Barnaba et al., 2018)

3. Referencias

- Alegre, Y., Arias-Pérez, I., Hernández-Orte, P., & Ferreira, V. (2020). Development of a new strategy for studying the aroma potential of winemaking grapes through the accelerated hydrolysis of phenolic and aromatic fractions (PAFs). *Food Research International*, 127, 108728. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108728>
- Alegre, Y., Sáenz-Navajas, M. P., Hernández-Orte, P., & Ferreira, V. (2020). Sensory, olfactometric and chemical characterization of the aroma potential of Garnacha and Tempranillo winemaking grapes. *Food Chemistry*, 331, 127207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127207>
- Arévalo-Villena, M., Úbeda Iranzo, J., & Briones Pérez, A. (2007). Enhancement of Aroma in White Wines Using a β -Glucosidase Preparation From *Debaryomyces pseudopolymorphus* (A-77). *Food Biotechnology*, 21(2), 181-194. <https://doi.org/10.1080/08905430701410605>
- Aryan, A. P., Wilson, B., Strauss, C. R., & Williams, P. J. (1987). The Properties of Glycosidases of *Vitis vinifera* and a Comparison of Their β -Glucosidase Activity with that of Exogenous Enzymes. An Assessment of Possible Applications in Enology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(3), 182-188. <https://doi.org/10.5344/ajev.1987.38.3.182>
- Barnaba, C., Larcher, R., Nardin, T., Dellacassa, E., & Nicolini, G. (2018). Glycosylated simple phenolic profiling of food tannins using high resolution mass spectrometry (Q-Orbitrap). *Food Chemistry*, 267, 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.048>
- Baumes, R. (2009). Wine Aroma Precursors. En *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 251-274). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_14
- Belancic, A., & Agosin, E. (2007). Methoxypyrazines in Grapes and Wines of *Vitis vinifera* cv. Carmenere. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(4), 462-469. <https://doi.org/10.5344/ajev.2007.58.4.462>
- Bonnaffoux, H., Delpech, S., Rémond, E., Schneider, R., Roland, A., & Cavelier, F. (2018). Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis. *Food Chemistry*, 268, 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.061>
- Bonnaffoux, H., Roland, A., Rémond, E., Delpech, S., Schneider, R., & Cavelier, F. (2017). First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay. *Food Chemistry*, 237, 877-886. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.116>
- Botelho, G., Mendes-Faia, A., & Clímaco, M. C. (2010). Characterisation of free and glycosidically bound odourant compounds of Aragonez clonal musts by GC-O. *Analytica Chimica Acta*, 657(2), 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.030>
- Cabaroglu, T., Selli, S., Canbas, A., Lepoutre, J. P., & Günata, Z. (2003). Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(5), 581-587. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00179-0)

Cabrita, M. J., Freitas, A. M. C., Laureano, O., & Stefano, R. D. (2006). Glycosidic aroma compounds of some Portuguese grape cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(6), 922-931. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2439>

Caffrey, A. J., Lafontaine, S., Dailey, J., Varnum, S., Lerno, L. A., Zweigenbaum, J., Heymann, H., & Ebeler, S. E. (2022). Characterization of Humulus lupulus glycosides with porous graphitic carbon and sequential high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high performance liquid chromatography fractionation. *Journal of Chromatography A*, 1674, 463130. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463130>

Caffrey, A. J., Lerno, L. A., Zweigenbaum, J., & Ebeler, S. E. (2020). Direct Analysis of Glycosidic Aroma Precursors Containing Multiple Aglycone Classes in Vitis vinifera Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(12), 3817-3833. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08323>

Caffrey, Lerno, L., Rumbaugh, A., Girardello, R., Zweigenbaum, J., Oberholster, A., & Ebeler, S. E. (2019). Changes in smoke-taint volatile-phenol glycosides in wildfire smoke-exposed cabernet sauvignon grapes throughout winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 70(4), 373-381. <https://doi.org/10.5344/ajev.2019.19001>

Campo, E., Cacho, J., & Ferreira, V. (2008). The Chemical Characterization of the Aroma of Dessert and Sparkling White Wines (Pedro Ximénez, Fino, Sauternes, and Cava) by Gas Chromatography–Olfactometry and Chemical Quantitative Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2477-2484. <https://doi.org/10.1021/jf072968l>

Capone, D. L., Pardon, K. H., Cordente, A. G., & Jeffery, D. W. (2011). Identification and quantitation of 3- S -cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc grape juice by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11204-11210. <https://doi.org/10.1021/jf202543z>

Capone, D. L., Sefton, M. A., Hayasaka, Y., & Jeffery, D. W. (2010). Analysis of precursors to wine odorant 3-mercaptohexan-1-ol using HPLC-MS/MS: Resolution and quantitation of diastereomers of 3-S-cysteinylhexan-1-ol and 3-S-glutathionylhexan-1-ol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1390-1395. <https://doi.org/10.1021/jf903720w>

Caputi, L., Malnoy, M., Goremykin, V., Nikiforova, S., & Martens, S. (2012). A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land. *The Plant Journal*, 69(6), 1030-1042. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04853.x>

Carlomagno, A., Schubert, A., & Ferrandino, A. (2016). Screening and evolution of volatile compounds during ripening of ‘Nebbiolo,’ ‘Dolcetto’ and ‘Barbera’ (Vitis vinifera L.) neutral grapes by SBSE–GC/MS. *European Food Research and Technology*, 242(8), 1221-1233. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2626-4>

Cibaka, M.-L. K., Tran, T. T. H., Gros, J., Robiette, R., & Collin, S. (2017). Investigation of 2-Sulfanylethyl Acetate Cysteine- S -Conjugate as a Potential Precursor of Free Thiols in Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 75(3), 228-235. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-3276-01>

- Concejero, B., Hernandez-Orte, P., Astrain, J., Lacau, B., Baron, C., & Ferreira, V. (2016). Evolution of polyfunctional mercaptans and their precursors during Merlot alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 770-776. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.018>
- Cordente, A. G., Capone, D. L., & Curtin, C. D. (2015). Unravelling glutathione conjugate catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of glutathione/dipeptide transporters and vacuolar function in the release of volatile sulfur compounds 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), 9709-9722. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6833-5>
- Cordonnier, R., & Bayonove, C. (1974). Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *CR Acad. Sci. Paris*, 278, 3387-3390.
- Cordonnier, R., & Bayonove, C. L. (1981). Etude de la phase préfermentaire de la vinification: Extraction et formation de certains composés de l'arôme; cas des terpenols, des aldehydes et des alcools en C₆ *. *OENO One*, 15(4), Article 4. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1981.15.4.1365>
- Crespo, J., Rigou, P., Romero, V., García, M., Arroyo, T., & Cabellos, J. M. (2018). Effect of seasonal climate fluctuations on the evolution of glycoconjugates during the ripening period of grapevine cv. Muscat à petits grains blancs berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1803-1812. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8656>
- D'Ambrosio, M. (2019). Advances in the Dereplication of Aroma Precursors from Grape Juice by Pretreatment with Lead Acetate and Combined HILIC- and RP-HPLC Methods. *Foods*, 8(1), 28. <https://doi.org/10.3390/foods8010028>
- Daniel, M. A., Puglisi, C. J., Capone, D. L., Elsey, G. M., & Sefton, M. A. (2008). Rationalizing the formation of damascenone: Synthesis and hydrolysis of damascenone precursors and their analogues, in both aglycone and glycoconjugate forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9183-9189. <https://doi.org/10.1021/jf8018134>
- Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J.-N., & Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour and Fragrance Journal*, 10(6), 385-392. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730100610>
- Dein, M., Kerley, T., & Munafo, J. P. (2021). Characterization of Odorants in a 10-Year-Old Riesling Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(38), 11372-11381. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C04196/ASSET/IMAGES/LARGE/JF1C04196_0006.JPEG
- Delfini, C., Cocito, C., Bonino, M., Schellino, R., Gaia, P., & Baiocchi, C. (2001). Definitive Evidence for the Actual Contribution of Yeast in the Transformation of Neutral Precursors of Grape Aromas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5397-5408. <https://doi.org/10.1021/jf010613a>
- Denat, M., Pérez, D., Heras, J. M., Querol, A., & Ferreira, V. (2021). The effects of *Saccharomyces cerevisiae* strains carrying alcoholic fermentation on the fermentative and varietal

aroma profiles of young and aged Tempranillo wines. *Food Chemistry: X*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100116>

Denat, M., Pérez, D., Heras, J. M., Sáenz-Navajas, M. P., & Ferreira, V. (2021). Impact of two yeast strains on Tempranillo red wine aroma profiles throughout accelerated ageing. *OENO One*, 55(4), Article 4. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.4.4732>

Des Gachons, C. P., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002). Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: Identification of S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 4076-4079. <https://doi.org/10.1021/jf020002y>

D'Onofrio, C., Matarese, F., & Cuzzola, A. (2017). Study of the terpene profile at harvest and during berry development of *Vitis vinifera* L. aromatic varieties Aleatico, Brachetto, Malvasia di Candia aromatica and Moscato bianco. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(9), 2898-2907. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8126>

Duhamel, N., Piano, F., Davidson, S. J., Larcher, R., Fedrizzi, B., & Barker, D. (2015). Synthesis of alkyl sulfonic acid aldehydes and alcohols, putative precursors to important wine aroma thiols. *Tetrahedron Letters*, 56(13), 1728-1731. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.02.084>

Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Elsey, G. M., & Jeffery, D. W. (2009). First identification of 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 991-995. <https://doi.org/10.1021/jf802799w>

Fernández-González, M., & Di Stefano, R. (2004). Fractionation of glycoside aroma precursors in neutral grapes. Hydrolysis and conversion by *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT - Food Science and Technology*, 37(4), 467-473. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.11.003>

Ferrandino, A., Carlomagno, A., Baldassarre, S., & Schubert, A. (2012). Varietal and pre-fermentative volatiles during ripening of *Vitis vinifera* cv Nebbiolo berries from three growing areas. *Food Chemistry*, 135(4), 2340-2349. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.061>

Ferreira, V., & Lopez, R. (2019). The actual and potential aroma of winemaking grapes. *Biomolecules*, 9(12), 818. <https://doi.org/10.3390/biom9120818>

Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R., & Cacho, J. (2002). Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 4048-4054. <https://doi.org/10.1021/jf0115645>

Flamini, R., Menicatti, M., De Rosso, M., Gardiman, M., Mayr, C., Pallecchi, M., Danza, G., & Bartolucci, G. (2018). Combining liquid chromatography and tandem mass spectrometry approaches to the study of monoterpene glycosides (aroma precursors) in wine grape. *Journal of Mass Spectrometry*, 53(9), 792-800. <https://doi.org/10.1002/JMS.4212>

Francis, I. L., Sefton, M. A., & Williams, P. J. (1992). Sensory descriptive analysis of the aroma of hydrolysed precursor fractions from semillon, chardonnay and sauvignon blanc grape juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59(4), 511-520. <https://doi.org/AlegreAlegre>

- García-Carpintero, E. G., Sánchez-Palomo, E., Gallego, M. A. G., & González-Viñas, M. A. (2011). Volatile and sensory characterization of red wines from cv. Moravia Agria minority grape variety cultivated in La Mancha region over five consecutive vintages. *Food Research International*, 44(5), 1549-1560. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.022>
- García-Carpintero, E. G., Sánchez-Palomo, E., & González-Viñas, M. A. (2011). Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region. *Food Research International*, 44(1), 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.013>
- Geffroy, O., Kleiber, D., & Jacques, A. (2020). Key facts about rotundone and practical ways to pepper your wine with this fascinating aroma compound: Sourced from the review article “May peppery wines be the spice of life?” (OENO One, 2020). Original language of the article: English. *IVES Technical Reviews, Vine and Wine*. <https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2020.4483>
- Genovese, A., Gambuti, A., Lamorte, S. A., & Moio, L. (2013). An extract procedure for studying the free and glycosilated aroma compounds in grapes. *Food Chemistry*, 136(2), 822-834. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.061>
- Genovese, A., Lamorte, S. A., Gambuti, A., & Moio, L. (2013). Aroma of Aglianico and Uva di Troia grapes by aromatic series. *Food Research International*, 53(1), 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.051>
- Godshaw, J., Hjelmeland, A. K., Zweigenbaum, J., & Ebeler, S. E. (2019). Changes in glycosylation patterns of monoterpenes during grape berry maturation in six cultivars of *Vitis vinifera*. *Food Chemistry*, 297, 124921. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.195>
- Gök, R., Selhorst, P., Noske, T., Ziegler, M., Fischer, U., & Winterhalter, P. (2022). *Molecules Target-Guided Isolation of Progenitors of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) from Riesling Wine by High-Performance Countercurrent Chromatography †*. 1961-2019. <https://doi.org/10.3390/molecules27175378>
- Gómez, E., Martínez, A., & Laencina, J. (1995). Changes in volatile compounds during maturation of some grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(2), 229-233. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740670213>
- Gómez García-Carpintero, E., Sánchez-Palomo, E., Gómez Gallego, M. A., & González-Viñas, M. A. (2012). Free and bound volatile compounds as markers of aromatic typicalness of Moravia Dulce, Rojal and Tortosí red wines. *Food Chemistry*, 131(1), 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.035>
- Gracia-Moreno, E., Lopez, R., & Ferreira, V. (2015). Determination of 2-, 3-, 4-methylpentanoic and cyclohexanecarboxylic acids in wine: Development of a selective method based on solid phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry and its application to different wines and alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 1381, 210-218. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.074>
- Grzam, A., Martin, M. N., Hell, R., & Meyer, A. J. (2007). Gamma-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. *FEBS Letters*, 581(17), 3131-3138. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.071>

Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., & Cordonnier, R. E. (1985). The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *Journal of Chromatography A*, 331, 83-90. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(85\)80009-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(85)80009-1)

Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., & Cordonnier, R. E. (1986). Changes in free and bound fractions of aromatic components in vine leaves during development of muscat grapes. *Phytochemistry*, 25(4), 943-946. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(86\)80032-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(86)80032-2)

Günata, Y. Z., Bayonove, C. L., Tapiero, C., & Cordonnier, R. E. (1990). Hydrolysis of Grape Monoterpenyl β -D-Glucosides by Various β -Glucosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5), 1232-1236. <https://doi.org/10.1021/jf00095a016>

Gunata, Z., Bittour, S., Brillouet, J. M., Bayonove, C., & Cordonnier, R. (1988). Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydrate Research*, 184, 139-149. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80012-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80012-0)

Guth, H. (1997). Identification of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3022-3026. <https://doi.org/10.1021/JF9608433>

Hampel, D., Robinson, A. L., Johnson, A. J., & Ebeler, S. E. (2014). Direct hydrolysis and analysis of glycosidically bound aroma compounds in grapes and wines: Comparison of hydrolysis conditions and sample preparation methods. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(3), 361-377. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12087>

Harsch, M. J., Benkwitz, F., Frost, A., Colonna-Ceccaldi, B., Gardner, R. C., & Salmon, J. M. (2013). New precursor of 3-mercaptohexan-1-ol in grape juice: Thiol-forming potential and kinetics during early stages of must fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(15), 3703-3713. <https://doi.org/10.1021/jf3048753>

Hayasaka, Y., Baldock, G. A., Parker, M., Pardon, K. H., Black, C. A., Herderich, M. J., & Jeffery, D. W. (2010). Glycosylation of Smoke-Derived Volatile Phenols in Grapes as a Consequence of Grapevine Exposure to Bushfire Smoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(20), 10989-10998. <https://doi.org/10.1021/JF103045T>

Hayasaka, Y., Dungey, K. A., Baldock, G. A., Kennison, K. R., & Wilkinson, K. L. (2010). Identification of a beta-D-glucopyranoside precursor to guaiacol in grape juice following grapevine exposure to smoke. *Analytica chimica acta*, 660(1-2), 143-148. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2009.10.039>

Hernández-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., & Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry*, 107(3), 1064-1077. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.032>

Hernández-Orte, P., Franco, E., Huerta, C. G., García, J. M., Cabellos, M., Suberviola, J., Orriols, I., & Cacho, J. (2014). Criteria to discriminate between wines aged in oak barrels and macerated with oak fragments. *Food Research International*, 57, 234-241. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.044>

- Hjelmeland, A. K., & Ebeler, S. E. (2015). Glycosidically bound volatile aroma compounds in grapes and wine: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(1), 1-11. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14104>
- Hjelmeland, A. K., Zweigenbaum, J., & Ebeler, S. E. (2015). Profiling monoterpene glycoconjugation in *Vitis vinifera* L. cv. Muscat of Alexandria using a novel putative compound database approach, high resolution mass spectrometry and collision induced dissociation fragmentation analysis. *Analytica Chimica Acta*, 887, 138-147. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.026>
- Holt, S., Cordente, A. G., Williams, S. J., Capone, D. L., Jitjaroen, W., Menz, I. R., Curtin, C., & Anderson, P. A. (2011). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* to release 3-Mercaptohexan-1-ol during fermentation through overexpression of an *S. cerevisiae* Gene, STR3, for improvement of wine aroma. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), 3626-3632. <https://doi.org/10.1128/AEM.03009-10>
- Howell, K. S., Klein, M., Swiegers, J. H., Hayasaka, Y., Elsey, G. M., Fleet, G. H., Høj, P. B., Pretorius, I. S., & de Barros Lopes, M. A. (2005). Genetic determinants of volatile-thiol release by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5420-5426. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5420-5426.2005>
- Ibarz, M. J., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Loscos, N., & Cacho, J. (2006). Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 217-229. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.020>
- López, R., Ezpeleta, E., Sánchez, I., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry*, 88(1), 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.025>
- Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2009). Comparison of the suitability of different hydrolytic strategies to predict aroma potential of different grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2468-2480. <https://doi.org/10.1021/jf803256e>
- Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2010). Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine ageing. *Food Chemistry*, 120(1), 205-216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.008>
- Loscos, N., Ségurel, M., Dagan, L., Sommerer, N., Marlin, T., & Baumes, R. (2008). Identification of S-methylmethionine in Petit Manseng grapes as dimethyl sulphide precursor in wine. *Analytica Chimica Acta*, 621(1), 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.033>
- Maggu, M., Winz, R., Kilmartin, P. A., Trought, M. C. T., & Nicolau, L. (2007). Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10281-10288. <https://doi.org/10.1021/jf072192o>
- Mateo, J. J., & Jiménez, M. (2000). Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A*, 881(1), 557-567. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01342-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01342-4)

- Mateo-Vivaracho, L., Zapata, J., Cacho, J., & Ferreira, V. (2010). Analysis, occurrence, and potential sensory significance of five polyfunctional mercaptans in white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10184-10194. <https://doi.org/10.1021/jf101095a>
- Moio, L., & Etievant, P. X. (1995). Ethyl Anthranilate, Ethyl Cinnamate, 2,3-Dihydrocinnamate, and Methyl Anthranilate: Four Important Odorants Identified in Pinot noir Wines of Burgundy. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(3), 392-398. <https://doi.org/10.5344/ajev.1995.46.3.392>
- Okasaka, M., Kashiwada, Y., Kodzhimatov, O. K., Ashurmetov, O., & Takaishi, Y. (2008). Monoterpene glycosides from *Paeonia hybrida*. *Phytochemistry*, 69(8), 1767-1772. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.016>
- Oliveira, I., & Ferreira, V. (2019). Modulating Fermentative, Varietal and Aging Aromas of Wine Using non- *Saccharomyces* Yeasts in a Sequential Inoculation Approach. *Microorganisms*, 7(6), 164. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060164>
- Ong, P. K. C., & Acree, T. E. (1999). Similarities in the Aroma Chemistry of Gewürztraminer Variety Wines and Lychee (*Litchi chinesis* Sonn.) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 665-670. <https://doi.org/10.1021/jf980452j>
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2000). Measuring the Aromatic Potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc Grapes by Assaying S-Cysteine Conjugates, Precursors of the Volatile Thiols Responsible for Their Varietal Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3387-3391. <https://doi.org/10.1021/jf990979b>
- Picard, M., Lytra, G., Tempere, S., Barbe, J.-C., de Revel, G., & Marchand, S. (2016). Identification of Piperitone as an Aroma Compound Contributing to the Positive Mint Nuances Perceived in Aged Red Bordeaux Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(2), 451-460. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04869>
- Pons, A., Allamy, L., Lavigne, V., Dubourdieu, D., & Darriet, P. (2017). Study of the contribution of massoia lactone to the aroma of Merlot and Cabernet Sauvignon musts and wines. *Food Chemistry*, 232, 229-236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.151>
- Ribereau-Gayon, P., Boidron, J. N., & Terrier, A. (1975). Aroma of Muscat grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(6), 1042-1047. <https://doi.org/10.1021/jf60202a050>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Donèche, B., Glories, Y., Maujean, A., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of enology. Vol. 2: The chemistry of wine stabilization and treatments : Pascal Ribereau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu* (2. ed). John Wiley.
- Ristic, R., van der Hulst, L., Capone, D. L., & Wilkinson, K. L. (2017). Impact of Bottle Aging on Smoke-Tainted Wines from Different Grape Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(20), 4146-4152. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01233>
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Cabrera-Valido, H. M., Pérez-Trujillo, J. P., & Cacho, J. (2011). Bound aroma compounds of Gual and Listán blanco grape varieties and their influence in the

elaborated wines. *Food Chemistry*, 127(3), 1153-1162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.117>

Rodríguez-Bencomo, J. J., Muñoz-González, C., Andújar-Ortiz, I., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., & Pozo-Bayón, M. Á. (2011). Assessment of the effect of the non-volatile wine matrix on the volatility of typical wine aroma compounds by headspace solid phase microextraction/gas chromatography analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2484-2494. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4494>

Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Rigou, P., & Schneider, R. (2010). Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4406-4413. <https://doi.org/10.1021/jf904164t>

Roncoroni, M., Santiago, M., Hooks, D. O., Moroney, S., Harsch, M. J., Lee, S. A., Richards, K. D., Nicolau, L., & Gardner, R. C. (2011). The yeast IRC7 gene encodes a β -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiology*, 28(5), 926-935. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.002>

Sánchez Palomo, E., Díaz-Maroto Hidalgo, M. C., González-Viñas, M. Á., & Pérez-Coello, M. S. (2005). Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases. *Food Chemistry*, 92(4), 627-635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.025>

Santiago, M., & Gardner, R. C. (2015). Yeast genes required for conversion of grape precursors to varietal thiols in wine. *FEMS Yeast Research*, 15(5), fov034. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov034>

Schievano, E., D'Ambrosio, M., Mazzaretto, I., Ferrarini, R., Magno, F., Mammi, S., & Favaro, G. (2013). Identification of wine aroma precursors in Moscato Giallo grape juice: A nuclear magnetic resonance and liquid chromatography-mass spectrometry tandem study. *Talanta*, 116, 841-851. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.049>

Schneider, R., Charrier, F., Razungles, A., & Baumes, R. (2006). Evidence for an alternative biogenetic pathway leading to 3-mercaptohexanol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wines. *Analytica Chimica Acta*, 563(1), 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.01.057>

Schneider, R., Razungles, A., Augier, C., & Baumes, R. (2001). Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines. *Journal of Chromatography A*, 936(1-2), 145-157. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01150-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01150-5)

Sefton, M. A., Francis, I. L., & Williams, P. J. (1993). The Volatile Composition of Chardonnay Juices: A Study by Flavor Precursor Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 359-370. <https://doi.org/10.5344/ajev.1993.44.4.359>

Segurel, M. A., Razungles, A. J., Riou, C., Salles, M., & Baumes, R. L. (2004). Contribution of dimethyl sulfide to the aroma of syrah and grenache noir wines and estimation of its potential in grapes of these varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 7084-7093. <https://doi.org/10.1021/jf049160a>

- Segurel, M. A., Razungles, A. J., Riou, C., Trigueiro, M. G. L., & Baumes, R. L. (2005). Ability of possible DMS precursors to release DMS during wine aging and in the conditions of heat-alkaline treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2637-2645. <https://doi.org/10.1021/jf048273r>
- Shoseyov, O., Bravdo, B.-A., Ikan, R., & Chet, I. (1988). Endo- β -glucosidase from *Aspergillus niger* grown on a monoterpene glycoside-containing medium. *Phytochemistry*, 27(7), 1973-1976. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80080-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80080-3)
- Simpson, R. F., & Miller, G. C. (1983). Aroma composition of aged Riesling wine. *VITIS - Journal of Grapevine Research*, 22(1), 51-51. <https://doi.org/10.5073/VITIS.1983.22.51-63>
- Skouroumounis, G. K., & Sefton, M. A. (2000). Acid-catalyzed hydrolysis of alcohols and their β -D-glucopyranosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2033-2039. <https://doi.org/10.1021/jf9904970>
- Skouroumounis, G. K., & Winterhalter, P. (1994). Glycosidically Bound Norisoprenoids from *Vitis vinifera* Cv. Riesling Leaves. *J. Agric. Food Chem*, 42, 1068-1072.
- Slaghenaufi, D., & Ugliano, M. (2018). Norisoprenoids, sesquiterpenes and terpenoids content of Valpolicella wines during aging: Investigating aroma potential in relationship to evolution of tobacco and balsamic aroma in aged wine. *Frontiers in Chemistry*, 6, 66. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00066>
- Spillman, P. J., Pollnitz, A. P., Liacopoulos, D., Skouroumounis, G. K., & Sefton, M. A. (1997). Accumulation of Vanillin during Barrel-Aging of White, Red, and Model Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2584-2589. <https://doi.org/10.1021/jf970034z>
- Strauss, C. R., Dimitriadis, E., Wilson, B., & Williams, P. J. (1986). Studies on the Hydrolysis of Two Megastigma-3,6,9-triols Rationalizing the Origins of Some Volatile C13 Norisoprenoids of *Vitis vinifera* Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(1), 145-149. <https://doi.org/10.1021/jf00067a039>
- Strauss, C. R., Wilson, B., & Williams, P. J. (1988). Novel Monoterpene Diols and Diol Glycosides in *Vitis vinifera* Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(3), 569-573.
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J.-M., & Degryse, E. (2008a). New insights on 3-mercaptopentanol (3MH) biogenesis in Sauvignon Blanc wines: Cys-3MH and (E)-hexen-2-al are not the major precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9230-9235. <https://doi.org/10.1021/jf801626f>
- Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J.-M., & Degryse, E. (2008b). Nitrogen catabolite repression modulates the production of aromatic thiols characteristic of Sauvignon Blanc at the level of precursor transport. *FEMS Yeast Research*, 8(5), 771-780. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00400.x>
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139-173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>

- Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., & Dubourdieu, D. (1998). A New Type of Flavor Precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5215-5219. <https://doi.org/10.1021/jf980481u>
- Torchio, F., Giacosa, S., Vilanova, M., Río Segade, S., Gerbi, V., Giordano, M., & Rolle, L. (2016). Use of response surface methodology for the assessment of changes in the volatile composition of Moscato bianco (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Food Chemistry*, 212, 576-584. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.191>
- Ugliano, M., & Moio, L. (2008). Free and hydrolytically released volatile compounds of *Vitis vinifera* L. cv. Fiano grapes as odour-active constituents of Fiano wine. *Analytica Chimica Acta*, 621(1), 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.03.002>
- Wang, D., Cai, J., Zhu, B.-Q., Wu, G.-F., Duan, C.-Q., Chen, G., & Shi, Y. (2015). Study of free and glycosidically bound volatile compounds in air-dried raisins from three seedless grape varieties using HS-SPME with GC-MS. *Food Chemistry*, 177, 346-353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.018>
- Wang, D., Duan, C.-Q., Shi, Y., Zhu, B.-Q., Javed, H. U., & Wang, J. (2017). Free and glycosidically bound volatile compounds in sun-dried raisins made from different fragrance intensities grape varieties using a validated HS-SPME with GC-MS method. *Food Chemistry*, 228, 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.153>
- Wei, Y., Chen, Z., Zhang, X.-K. K., Duan, C.-Q. Q., & Pan, Q.-H. H. (2021). Comparative Analysis of Glycosidic Aroma Compound Profiling in Three *Vitis vinifera* Varieties by Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Frontiers in Plant Science*, 12, 694979. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.694979>
- West, C., Elfakir, C., & Lafosse, M. (2010). Porous graphitic carbon: A versatile stationary phase for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217(19), 3201-3216.
- Williams, P. J., Sefton, M. A., & Wilson, B. (1989). *Nonvolatile Conjugates of Secondary Metabolites as Precursors of Varietal Grape Flavor Components* (pp. 35-48). <https://doi.org/10.1021/bk-1989-0388.ch004>
- Williams, P. J., Strauss, C. R., & Wilson, B. (1980). Hydroxylated Linalool Derivatives as Precursors of Volatile Monoterpenes of Muscat Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(4), 766-771. <https://doi.org/10.1021/jf60230a037>
- Williams, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B., & Massy-Westropp, R. A. (1982a). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry*, 21(8), 2013-2020. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(82\)83034-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(82)83034-3)
- Williams, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B., & Massy-Westropp, R. A. (1982b). Studies on the Hydrolysis of *Vitis vinifera* Monoterpene Precursor Compounds and Model Monoterpene β -d-Glucosides Rationalizing the Monoterpene Composition of Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(6), 1219-1223. <https://doi.org/10.1021/jf00114a054>
- Winterhalter, P., & Skouroumounis, G. K. (1997). Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, role and biotechnological transformation. En R. G. Berger, W. Babel, H. W. Blanch,

Ch. L. Cooney, S.-O. Enfors, K.-E. L. Eriksson, A. Fiechter, A. M. Klibanov, B. Mattiasson, S. B. Primrose, H. J. Rehm, P. L. Rogers, H. Sahn, K. Schügerl, G. T. Tsao, K. Venkat, J. Villadsen, U. von Stockar, & C. Wandrey (Eds.), *Biotechnology of Aroma Compounds* (pp. 73-105). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/BFb0102063>

Wirth, J., Guo, W., Baumes, R., & Günata, Z. (2001). Volatile Compounds Released by Enzymatic Hydrolysis of Glycoconjugates of Leaves and Grape Berries from *Vitis vinifera* Muscat of Alexandria and Shiraz Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2917-2923. <https://doi.org/10.1021/jf001398l>

Wolf, A. E., Dietz, K. J., & Schröder, P. (1996). Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Letters*, 384(1), 31-34. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00272-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00272-4)

Zhu, L.-X., Zhang, M.-M., Liu, Z., Shi, Y., & Duan, C.-Q. (2019). Levels of Furaneol in Msalais Wines: A Comprehensive Overview of Multiple Stages and Pathways of Its Formation during Msalais Winemaking. *Molecules*, 24(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/molecules24173104>

Capítulo 1

Capítulo 1. Cinética de formación de aromas a partir de sus precursores presentes en las uvas

1. Introducción

Se ha demostrado que los precursores del aroma tienen una gran relevancia debido a su estrecha relación con la calidad aromática del vino (Francis et al., 1992). A lo largo del tiempo, se han desarrollado diversos métodos para aislar y evaluar cuantitativamente este conjunto de precursores aromáticos.

Algunos investigadores, con el objetivo principal de comprender la naturaleza de la fracción aglicona de los precursores glucosídicos, han empleado la hidrólisis enzimática (Schneider et al., 2001). La limitación de este enfoque es que no puede proporcionar una evaluación fiable del potencial aromático, ya que muchas moléculas de aroma derivadas de precursores no están presentes como agliconas, sino que derivan de la transformación química de esta. Esto es especialmente evidente en precursores de norisoprenoides, como β -damascenona o TDN. Para evaluar este tipo de compuestos aromáticos, se prefiere la hidrólisis ácida (Loscos et al., 2009; Slaghenaufi & Ugliano, 2018; Williams et al., 1989). Con fines cuantitativos, se ha utilizado a menudo una hidrólisis rápida a 100°C ((Ibarz et al., 2006; Loscos et al., 2009). Sin embargo, en estas condiciones, moléculas de aroma lábiles, como el linalool y el geraniol, se degradan rápidamente (Hampel et al., 2014), y los modelos hidrolizados muestran matices pobres y poco diversos de olor.

Se obtienen mejores propiedades aromáticas si la hidrólisis de la fracción de precursores se lleva a cabo a temperaturas suaves, como demostraron Francis et al. (Francis et al., 1992). Sin embargo, algunos descriptores de aroma desarrollados durante la hidrólisis de extractos de precursores purificados, como miel o té (Francis et al., 1992; López et al., 2004), sugieren que ocurren procesos de oxidación y degradación térmica en estas condiciones. Parte de esta oxidación se puede evitar si la hidrólisis se lleva a cabo en completa anoxia (Oliveira & Ferreira, 2019) y, particularmente, si el extracto no se purifica e incluye polifenoles de la uva o del vino (Alegre, Sáenz-Navajas, et al., 2020). Bajo estas condiciones, incluso a 75°C, se obtienen perfiles sensoriales fiables y

congruentes con los matices olfativos del vino no oxidado y relacionados con la variedad de uva (Alegre, Sáenz-Navajas, et al., 2020).

La mayoría de estos estudios consideran un número limitado de puntos de muestreo o no permiten la comparación entre diferentes temperaturas. Esto hace que aún persistan incertidumbres acerca de la cinética de acumulación del aroma durante el envejecimiento del vino y sobre los efectos de la temperatura en dicha cinética.

Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo principal estudiar y comparar la cinética de acumulación de las moléculas de aroma derivadas de precursores en las uvas a tres temperaturas diferentes.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestras de uvas

Se recolectaron dos muestras de uvas de la variedad Garnacha. La primera, proveniente de los viñedos de Bodegas Ramón Bilbao, que se denominará G1 y la otra, denominada G2, se obtuvo de Bodegas y Viñedos Ilurce, ambas bodegas pertenecen a la D.O.Ca. Rioja, en el norte de España.

2.1.1. Preparación de mistelas

A partir de un kg de cada una de estas muestras se prepararon dos mistelas siguiendo el procedimiento descrito por Alegre et al. (Alegre, Arias-Pérez, et al., 2020). Para ello, las uvas se despeduncularon y luego se estrujaron en presencia de 50 mg de metabisulfito de potasio (Panreac, España) y 190 mL de etanol (Merck, Alemania). La mezcla se pasó a una garrafa de Polietileno Tereftalato (PET) de 1,5 L y se desplazó el aire restante que quedaba en el espacio de cabeza, estrujando la garrafa. Luego se dejó la mezcla en maceración a 13°C durante 2 semanas con agitación diaria. Después de este período de tiempo, se separó el líquido por decantación y se prensaron los sólidos, recogiendo todo el líquido en otra garrafa de PET de 1 L que nuevamente se estrujó para desplazar el oxígeno del espacio de cabeza y se dejó decantar a 5°C durante 7 días. Después de la decantación se realizó el trasiego, donde se separó el líquido del sólido decantando en

frío. Las mistelas resultantes se embotellaron y almacenaron a 4°C hasta su posterior utilización.

2.1.2 Fracciones fenólicas aromáticas (FFAs)

Para la obtención de las FFAs se realizó una extracción en Fase sólida (SPE) en resina C18 según lo descrito también por Alegre et al. (Alegre, Arias-Pérez, et al., 2020) y para ello, las mistelas primeramente, se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 min a 10°C. Luego se desalcoholizaron en el rotavapor a 24°C y a una presión de 20 mbar hasta alcanzar contenidos inferiores al 2% (v/v) en etanol. Este volumen fue percolado en un cartucho de 10 g de Sep Pak C18 (Waters, Irlanda), que previamente se acondicionó con 44 mL de metanol (Merck, Alemania) seguido de 44 mL de agua milli-Q con un 2% de etanol. Luego, se realizó un lavado con 88 mL de agua milli-Q ácida (pH = 3,5) donde fueron eliminados azúcares, aminoácidos, ácidos e iones. El cartucho se secó a vacío y se eluyó posteriormente con etanol hasta recoger 100 mL de la FFA.

2.2. Hidrólisis ácida en anoxia a tres temperaturas

Después de llevar a cabo el proceso descrito en la Sección 2.1.2, cada una de las FFAs se reconstituyó hasta 100 mL con agua que contenía 5 g/L de ácido tartárico para formar un vino modelo con un 13.3% (v/v) de etanol y pH ajustado a 3.5.

Las FFAs reconstituídas se introdujeron en la cámara de anoxia (Jacomex P-Box, Dagneux, Francia) y se introdujeron en viales de SPME roscados (Merck, Alemania) dejando el mínimo espacio de cabeza, para el análisis de cada método (minoritarios y trazas: 2 viales de 20 mL, una réplica x cada muestra) y mercaptanos polifuncionales: 2 viales de 10 mL, una réplica x cada muestra). Los viales cerrados se colocaron dentro de una bolsa plástico termosellada (Coimbra Pack, S.L, Zaragoza, España), certificadas con permeabilidad al oxígeno [valor medio de 9 cm³/(m²·día)]. Luego, esta primera bolsa se colocó dentro de otra del mismo tipo y entre ellas se añadió carbón activado con un eliminador de oxígeno (AnaeroGenTM de ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) como describe Vela et al. (Vela et al., 2017).

Para la evaluación de la cinética de liberación de compuestos aromáticos, se hidrolizaron las dos muestras de Garnacha (G1 y G2) a tres temperaturas diferentes: a 35°C (durante

1,5, 3,5, 6 y 9 meses), a 50°C (durante 3,5, 7, 14, 35, 49, 70 y 98 días) y a 75°C (durante 1, 2, 6, 24, 48 y 96 horas) y a tiempo inicial (t_0).

2.3. Cuantificación del aroma liberado por hidrólisis ácida

Los compuestos aromáticos liberados por la hidrólisis ácida en cada temperatura y tiempo se analizaron mediante dos métodos analíticos. Un método para la evaluación de compuestos aromáticos minoritarios y trazas en el vino y otro para los mercaptanos polifuncionales. A continuación, se detalla información de cada uno de estos métodos de análisis empleados.

2.3.1. Análisis de compuestos volátiles minoritarios y trazas mediante GC-MS

El método para la extracción de compuestos volátiles minoritarios y trazas liberados por la hidrólisis ácida se llevó a cabo según lo descrito por López et al. (López et al., 2002). Para este fin, en un matraz aforado de 15 mL se colocó la muestra de la FFA hidrolizada con 100 μ L de una disolución de estándares internos (2-octanol, 3-octanona y 3,4-dimetilfenol). En un cartucho de 1 mL con 70 mg de resina Isolute ENV+ (Biotage, Symta, España) previamente acondicionado con 2 mL de diclorometano, seguido de 2 mL de metanol y 2 mL de una disolución hidroalcohólica al 13%, se cargó la muestra. Una vez pasada la muestra se lavó con una disolución acuosa con metanol (30 %, v/v) que contenía un 1 % (p/v) de bicarbonato de sodio, el cartucho se secó a vacío y los analitos retenidos fueron finalmente eluidos con 800 μ L de diclorometano que contenía un 5 % (v/v) de metanol. Posteriormente, 2 μ L del extracto obtenido se inyectaron en un cromatógrafo de gases QP2010 equipado con un detector de espectrómetro de masas de simple cuadrupolo (Shimadzu, Japón). La columna fue una DB-WAXetr de (Agilent, EE. UU.), de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y con un espesor de fase de 0,5 μ m, precedida por una precolumna no recubierta de 3m x 0.25 mm. El método cromatográfico empleado fue el propuesto por Oliveira et al. (Oliveira & Ferreira, 2019). El gas portador fue helio a 1,26 mL/min. El horno cromatográfico se inició a 40°C durante 5 minutos, la temperatura se aumentó a una velocidad de 1°C/min hasta 65°C y luego se elevó a 220°C a 2°C/min y se mantuvo durante 50 minutos. Se utilizó un inyector SPL (split/splitless) a una temperatura de 250°C. La inyección se realizó en modo splitless, se inyectaron 2 μ L de muestra utilizando un pulso de presión para asegurar un flujo de columna de 4,50 mL/min durante 1,5 minutos, momento en el cual se abrió la válvula de splitless. La temperatura

de la fuente de iones se mantuvo a 220°C y la interfase a 230°C. La adquisición se hizo en modo Selected Ion Monitoring (SIM). El listado completo de m/z seleccionadas para la identificación de cada compuesto se muestra la tabla A1 del Anexo I.

2.3.2. Análisis de mercaptanos polifuncionales mediante UHPLC-QqQ-MS

El método utilizado para la determinación de mercaptanos polifuncionales fue el propuesto por Vichi et al. (Vichi et al., 2015) con algunas modificaciones que fueron llevadas a cabo y optimizadas por el Dr. Alexis Marsol y el Dr. Ignacio Ontañón Alonso, ambos del LAAE.

El método consistió en la extracción y derivatización de los mercaptanos polifuncionales mediante un reactivo que contenía selenio, el 2-fenil-1,2-benziselenazol-3(2H)-ona (Ebselen, TCI, pureza > 98%) en condiciones anóxicas. El mecanismo de reacción ebselen-tiol consiste en la ruptura del enlace Se-N del Ebselen por el grupo SH del tiol y la formación del correspondiente enlace selenil sulfuro Se-S. Después de la adición de los estándares internos deuterados (d_5 -3-mercaptohexanol, d_{10} -4-mercapto-4-metilpentan-2-ona y d_5 -acetato de 3-mercaptohexilo), se introdujeron 10 mL de muestra en la cámara anóxica, se añadió el Ebselen (0,1 mM en DCM) y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Fuera de la cámara, las muestras se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 min y se recuperó 1 mL de la fase orgánica, que se llevó a sequedad bajo un flujo de nitrógeno. Se resuspendió en 100 μ L de metanol (grado LC-MS) y se filtró a través de filtros de jeringa de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 μ m.

Se analizaron 7 μ L del extracto mediante LC-QqQ-MS con una columna Intensity Solo C18-2 (Bruker Daltonics) de 100 mm de longitud, 2,1 mm de diámetro y 2 μ m de espesor de fase que se mantuvo a 40°C. El solvente A fue agua y el B metanol, ambos con formiato de amonio (10 mM). El flujo se estableció en 0,5 mL/min, el análisis duró 17 minutos y el gradiente de B fue: 0 min, 60%; 2 min, 60%; 10 min, 78 %; 10,1 min, 100 %; 15,1 min, 100 %; 15,2 min, 60%; 17 min, 60%. Los parámetros de la fuente fueron los siguientes: Voltaje de pulverización positiva: 4500,0 V; Amp positivo de pulverización: 100,0 μ A; Presión de cono: 25,0 PSI; Presión de sonda: 25,0 PSI; Presión de nebulizador: 60,0 PSI; Voltaje de pulverización negativa: 4000,0 V; Amp negativo de pulverización: 100,0 μ A; Temperatura de cono: 250,0°C; Temperatura de sonda: 450,0°C; Escape activado: verdadero. Se seleccionaron dos transiciones para cada analito en el monitoreo de

reacción múltiple (MRM) en modo positivo como se muestra en la tabla A2 del Anexo I. En todos los casos, el área de los picos de los analitos se normalizó por el área del IS y se convirtió en un valor de concentración mediante un factor de respuesta que se obtuvo mediante el análisis de una mezcla de muestras con una cantidad conocida de analitos añadidos.

2.4. Algunas consideraciones teóricas. Modelos cinéticos de primer orden para interpretar gráficos experimentales de concentración vs. tiempo

2.4.1. Moléculas de aroma estables

Si la molécula de aroma es estable y no hay procesos de degradación, la evolución con el tiempo de la concentración de la molécula de aroma formada por la hidrólisis de un precursor seguirá funciones matemáticas del tipo:

$$C_a^t = C_p^o \cdot (1 - e^{-k_h t})$$

donde C_a^t es la concentración de la molécula de aroma en el tiempo t ; C_p^o es la concentración del precursor del aroma al principio (tiempo 0), k_h es la constante cinética de la hidrólisis del precursor y t es el tiempo. Estos tipos de gráficos se pueden observar en la Fig. 1.1. Estos gráficos tienen la propiedad de que la representación del logaritmo natural de $\left(1 - \frac{C_a^t}{C_p^o}\right)$ vs. tiempo es una línea recta cuya pendiente es $-k_h$. En los casos en los que existen varios precursores con diferencias en la concentración y en las constantes cinéticas de hidrólisis, estas representaciones pueden dejar de ser lineales, especialmente si las diferencias entre las constantes de hidrólisis son grandes.

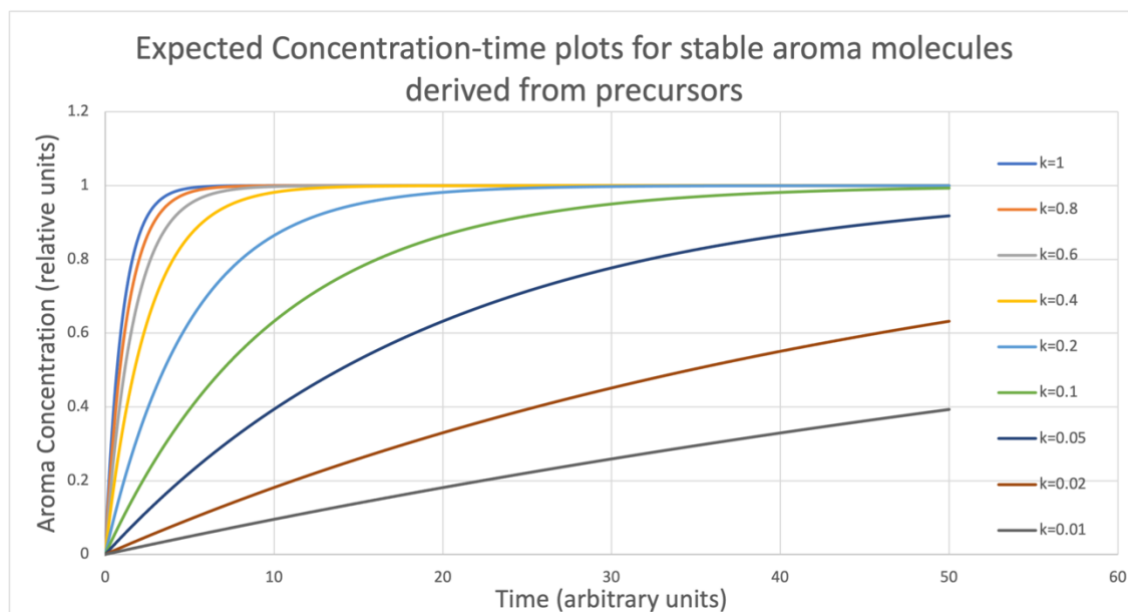


Fig.1.1. Gráficos que representan la evolución con el tiempo de moléculas de aroma estables producidas a partir de la hidrólisis de un precursor. Las hidrólisis en todos los casos siguen una cinética de primer orden y la concentración inicial del precursor fue de 1 unidad. Diferentes gráficos representan diferentes constantes cinéticas, entre $k_h=1$ ($t_{1/2} = 0.69$) y $k_h=0.01$ ($t_{1/2}=69.3$).

2.4.2. Moléculas de aroma inestables

Si la molécula de aroma es inestable y reacciona con agua u otro componente del vino, entonces la evolución con el tiempo será la combinación del proceso de hidrólisis del precursor y el de la degradación de la molécula de aroma. Aquí, como primera aproximación, también asumiremos que los procesos de degradación del aroma siguen cinéticas de primer orden: en el caso de hidrólisis espontánea o reordenamiento molecular de la molécula, o cinéticas de pseudo-primer orden: en el caso de reacción con otros componentes del vino.

En el caso de las cinéticas de pseudo-primer orden, las constantes de hidrólisis diferirán entre vinos. La degradación seguirá la ley:

$$C_a^t = C_a^o \cdot e^{-k_a t}$$

donde C_a^t es la concentración de la molécula de aroma en el tiempo t, C_a^o es la concentración inicial de la molécula de aroma, y k_a es la constante cinética del proceso

de degradación. La combinación de los procesos de hidrólisis y degradación permite estimar los gráficos que representan las cantidades acumuladas de molécula de aroma vs. tiempo. Para ello, la cantidad de molécula de aroma producida por la hidrólisis del precursor en el tiempo t es:

$$-dC_p^t = dC_{a(hyd)}^t = C_p^t \cdot k_h \cdot dt$$

Mientras que la cantidad de molécula de aroma degradada en ese punto temporal es:

$$-dC_{a(deg)}^t = C_a^t \cdot k_d \cdot dt$$

Luego, mediante un análisis diferencial o utilizando una hoja de cálculo, es posible generar diferentes tipos de gráficos considerando las magnitudes relativas de las constantes cinéticas de hidrólisis y degradación. Algunas de estas representaciones se muestran en la Fig. 1.2.

En la figura 1.3, se muestra un breve tutorial que explica cómo se obtuvieron las funciones combinadas utilizando una hoja de cálculo de Excel.

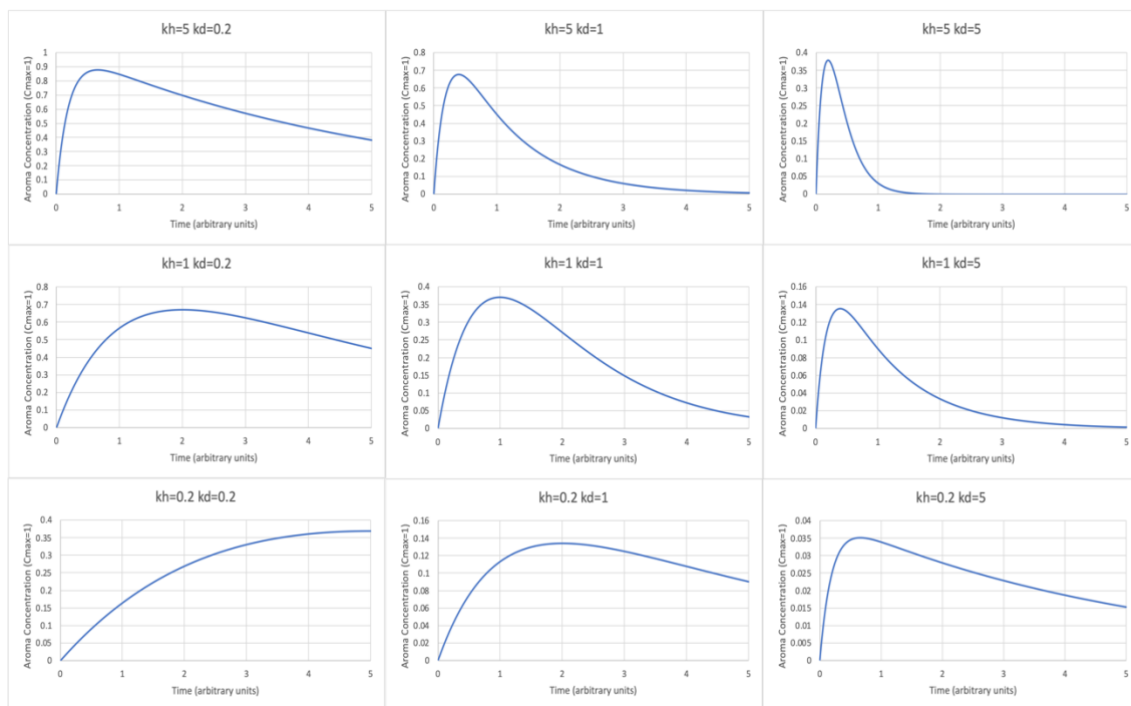


Fig. 1.2. Gráficos que muestran la evolución esperada de un compuesto de aroma inestable producido por la hidrólisis de un precursor inicialmente presente a una unidad de concentración. El precursor se hidroliza siguiendo una cinética de primer orden, siendo k_h la constante cinética. El aroma se degrada también siguiendo una cinética de primer orden, siendo k_d la constante cinética. Los diferentes gráficos muestran una gama de casos seleccionados con ambas constantes tomando valores entre 0,2 y 5.

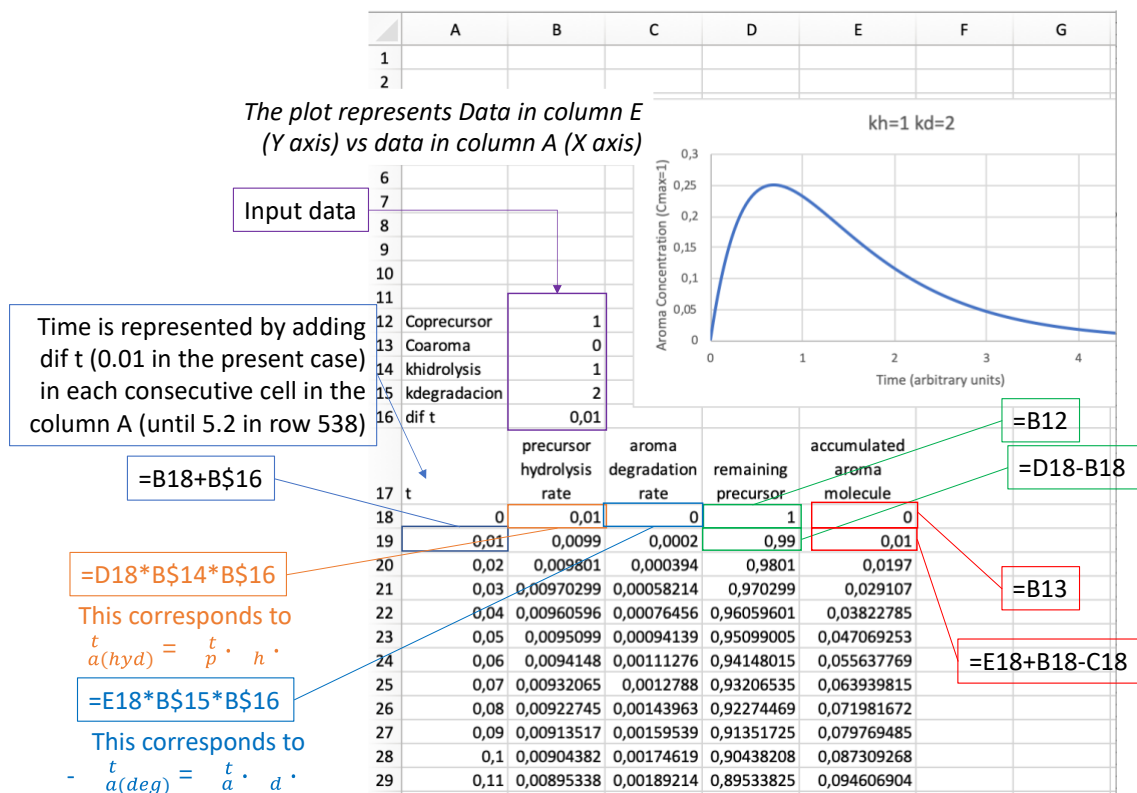


Fig. 1.3. Tutorial para la generación de funciones combinadas de reacciones de hidrólisis y degradación con una hoja de cálculo de Excel.

3. Resultados

3.1. Evolución de compuestos de aroma a tres temperaturas diferentes

Extractos de dos muestras diferentes de uvas Garnacha (G1 y G2) se hidrolizaron en completa anoxia a tres temperaturas distintas: 35, 50 y 75°C. Las muestras a 35 °C se tomaron durante 9 meses, a 50°C durante 98 días (3,2 meses) y a 75°C durante 96 horas.

Para facilitar la interpretación y evaluar la relación entre las velocidades de reacción a diferentes temperaturas, las representaciones a 35 y 50°C de algunos compuestos seleccionados que mostraban máximos o mesetas claramente identificables a las tres temperaturas se reescalaron de manera que, en promedio, las representaciones fueran superponibles a las obtenidas a 75°C. Los datos de concentraciones con los que se elaboraron aparecen en las tablas 1.1 y 1.2. Los compuestos utilizados para hacer estos ajustes fueron linalool, geraniol, Riesling acetal, α -terpineol y β -damascenona, y la mejor

solución de compromiso se obtuvo cuando 21,7 días a 50°C y 5,0 meses a 35°C equivalían a 50 horas a 75°C. Todas las representaciones mostradas en las figuras 1.4-1.8 se presentan utilizando esta escala de tiempo. Estos factores de escala proporcionan una primera aproximación de las relaciones entre las velocidades de reacción a las tres temperaturas.

En base a estos valores, se puede estimar aproximadamente que las velocidades de reacción aumentan en factores de 6,9 y 72 cuando la temperatura aumenta de 35 a 50 o 75°C, respectivamente. Si se representan los logaritmos naturales de estos factores vs. $1/T$, donde T es la temperatura absoluta correspondiente, la línea de regresión del gráfico de Arrhenius obtenido tiene un coeficiente de determinación $R^2 = 0,997$, significativo a $P < 0,05$, lo que permite establecer que, aproximadamente y en general, los procesos químicos relacionados con la acumulación de las moléculas de aroma seleccionadas a partir de la hidrólisis de precursores específicos son, a 75 °C, ligeramente más de 460 veces más rápidos que a 20°C, y a 50°C, aproximadamente 37 veces más rápidos y a 35°C, 6,5 veces más rápidos que a 20°C.

Tabla 1.1 Concentraciones promedio y desviaciones estándar (n=2) de los compuestos de aroma (expresados en µg/L) evaluados en el estudio cinético para la FFA G1, a tres temperaturas diferentes (35, 50 y 75°C).

Compuestos	t0	35°C				50°C							75°C						
		1.5m	3.5m	6m	9m	3.5d	7d	14d	35d	49d	70d	98d	1h	2h	6h	12h	24h	48h	96h
3-mercaptophexanol	0.0887 ± 0.0027	0.159 ± 0.004	0.174 ± 0.005	0.238 ± 0.007	0.212 ± 0.007	3.63 ± 0.04	3.82 ± 0.07	4.25 ± 0.19	5.59 ± 0.16	7.30 ± 0.36	9.34 ± 0.26	10.8 ± 0.4	3.21 ± 0.04	3.29 ± 0.04	5.70 ± 0.01	5.93 ± 0.06	6.00 ± 0.07	10.2 ± 0.4	17.4 ± 0.8
γ-nonalactona	0.479 ± 0.010	0.699 ± 0.009	0.765 ± 0.008	0.839 ± 0.01	0.880 ± 0.009	0.697 ± 0.012	0.827 ± 0.008	0.856 ± 0.009	0.894 ± 0.012	0.903 ± 0.01	0.905 ± 0.014	0.875 ± 0.010	0.517 ± 0.006	0.537 ± 0.009	0.602 ± 0.012	0.657 ± 0.011	0.782 ± 0.008	0.832 ± 0.017	0.886 ± 0.01
masoia lactona	1.64 ± 0.03	2.46 ± 0.08	2.53 ± 0.03	2.82 ± 0.07	3.27 ± 0.07	2.97 ± 0.05	2.85 ± 0.06	2.84 ± 0.03	3.10 ± 0.11	3.18 ± 0.02	3.62 ± 0.06	3.94 ± 0.17	1.81 ± 0.12	1.84 ± 0.01	2.03 ± 0.13	1.99 ± 0.08	1.92 ± 0.02	2.30 ± 0.11	2.95 ± 0.02
β-damascenona	0.597 ± 0.022	2.44 ± 0.08	2.55 ± 0.04	2.65 ± 0.15	2.95 ± 0.04	2.06 ± 0.01	2.24 ± 0.08	2.59 ± 0.05	3.21 ± 0.09	3.44 ± 0.11	3.84 ± 0.05	3.91 ± 0.11	0.453 ± 0.005	0.597 ± 0.022	1.28 ± 0.02	2.10 ± 0.10	2.75 ± 0.01	3.45 ± 0.13	4.78 ± 0.03
Riesling acetal	0.0606 ± 0.0004	4.44 ± 0.08	5.32 ± 0.24	7.15 ± 0.31	7.66 ± 0.16	2.34 ± 0.05	3.82 ± 0.01	5.99 ± 0.04	7.86 ± 0.25	7.25 ± 0.08	5.78 ± 0.07	3.73 ± 0.08	0.109 ± 0.005	0.132 ± 0.005	0.68 ± 0.02	2.36 ± 0.08	4.92 ± 0.04	6.96 ± 0.30	6.53 ± 0.02
TDN	0.0937 ± 0.0131	2.61 ± 0.05	3.58 ± 0.13	7.65 ± 0.21	12.7 ± 0.2	1.30 ± 0.01	2.47 ± 0.15	5.53 ± 0.17	19.2 ± 0.9	27.9 ± 0.1	42.6 ± 2.9	51.5 ± 0.7	0.191 ± 0.005	0.235 ± 0.008	0.545 ± 0.024	2.16 ± 0.10	8.70 ± 0.34	21.3 ± 1.0	49.9 ± 0.4
vitispiranos	0.0937 ± 0.0094	11.7 ± 0.2	15.5 ± 0.3	27.8 ± 0.7	38.2 ± 0.8	4.48 ± 0.07	8.45 ± 0.07	17.0 ± 0.4	36.3 ± 1.1	42.7 ± 0.2	44.9 ± 1.9	48.0 ± 2.8	0.149 ± 0.006	0.187 ± 0.02	1.39 ± 0.04	6.91 ± 0.29	23.2 ± 0.3	37.5 ± 1.1	58.9 ± 0.4
α-terpineol	0.454 ± 0.018	3.69 ± 0.13	4.22 ± 0.16	4.25 ± 0.12	3.96 ± 0.10	7.61 ± 0.08	10.5 ± 0.1	13.8 ± 0.1	15.2 ± 0.1	13.5 ± 0.1	10.0 ± 0.02	6.78 ± 0.01	1.14 ± 0.01	1.42 ± 0.03	3.37 ± 0.06	8.13 ± 0.22	16.4 ± 0.2	19.3 ± 0.5	18.9 ± 0.4
geraniol	0.718 ± 0.039	2.01 ± 0.05	1.49 ± 0.04	0.708 ± 0.019	0.237 ± 0.011	2.63 ± 0.03	2.40 ± 0.02	1.64 ± 0.06	0.573 ± 0.012	0.329 ± 0.011	0.219 ± 0.002	0.159 ± 0.004	1.15 ± 0.04	1.16 ± 0.08	1.96 ± 0.03	2.82 ± 0.02	2.27 ± 0.02	1.35 ± 0.06	0.429 ± 0.007
linalool	0.911 ± 0.043	6.37 ± 0.15	5.03 ± 0.24	2.59 ± 0.09	1.38 ± 0.04	8.36 ± 0.02	7.38 ± 0.03	4.79 ± 0.04	1.60 ± 0.01	0.997 ± 0.009	0.588 ± 0.016	0.421 ± 0.06	1.59 ± 0.01	1.62 ± 0.01	5.78 ± 0.18	8.01 ± 0.03	5.43 ± 0.1	3.29 ± 0.01	1.40 ± 0.05
óxido de linalool	0.221 ± 0.01	1.97 ± 0.01	2.41 ± 0.01	3.90 ± 0.15	5.40 ± 0.04	1.06 ± 0.01	1.67 ± 0.1	2.65 ± 0.02	5.11 ± 0.08	6.45 ± 0.01	8.43 ± 0.11	9.98 ± 0.22	0.256 ± 0.005	0.254 ± 0.003	0.607 ± 0.038	1.54 ± 0.01	3.12 ± 0.09	5.61 ± 0.24	9.87 ± 0.15
acetovainillona	13.4 ± 0.2	14.8 ± 0.3	15.0 ± 0.6	16.2 ± 0.4	16.7 ± 0.3	16.2 ± 0.1	16.5 ± 0.3	16.3 ± 0.3	17.9 ± 0.5	18.3 ± 0.2	19.1 ± 0.1	19.9 ± 0.6	13.7 ± 0.1	14.5 ± 0.1	13.6 ± 0.5	14.2 ± 0.3	15.7 ± 0.3	15.9 ± 0.1	17.8 ± 0.2
vainillina	34.1 ± 0.5	39.1 ± 0.4	41.6 ± 0.1	41.0 ± 0.8	54.0 ± 0.4	48.5 ± 3.0	51.2 ± 1.3	50.9 ± 1.2	53.2 ± 0.7	54.4 ± 0.1	53.9 ± 0.2	56.1 ± 0.9	32.6 ± 1.2	38.7 ± 0.8	37.7 ± 0.4	44.1 ± 1.0	46.8 ± 0.3	47.7 ± 1.7	53.8 ± 3.3
4-vinilguaicol	0.995 ± 0.097	1.25 ± 0.11	1.31 ± 0.12	1.08 ± 0.04	1.01 ± 0.05	6.89 ± 0.16	7.22 ± 0.02	6.61 ± 0.15	10.2 ± 0.2	11.1 ± 0.1	20.9 ± 0.1	63.4 ± 3.3	2.70 ± 0.16	2.47 ± 0.03	6.62 ± 0.17	10.3 ± 0.8	31.5 ± 0.3	45.6 ± 1.1	176 ± 3
4-vinilfenol	1.80 ± 0.19	2.07 ± 0.21	2.37 ± 0.11	1.97 ± 0.07	2.10 ± 0.11	14.7 ± 0.1	14.9 ± 0.5	15.1 ± 0.9	26.1 ± 3.6	32.2 ± 1.3	64.9 ± 0.2	176 ± 5	10.2 ± 1.4	10.2 ± 0.4	30.6 ± 0.1	39.9 ± 1.0	93.2 ± 1.8	113 ± 2	313 ± 2
guaiaicol	0.820 ± 0.092	3.64 ± 0.08	4.22 ± 0.01	5.68 ± 0.02	7.62 ± 0.25	2.26 ± 0.05	2.95 ± 0.07	4.11 ± 0.1	8.34 ± 0.18	9.03 ± 0.01	11.7 ± 0.1	14.8 ± 0.2	0.865 ± 0.031	1.09 ± 0.03	1.24 ± 0.03	1.89 ± 0.02	3.41 ± 0.04	5.69 ± 0.15	10.4 ± 0.4
metoxieugenol	11.4 ± 0.4	43.8 ± 0.6	53.6 ± 2.8	72.9 ± 1.6	92.2 ± 1.1	43.2 ± 0.6	53.0 ± 0.9	69.1 ± 0.7	112 ± 2	137 ± 1	175 ± 1	217 ± 2	26.1 ± 1.5	26.4 ± 0.2	28.8 ± 0.6	42.1 ± 1.2	68.6 ± 0.1	97.6 ± 0.4	165 ± 5
syringol	0.268 ± 0.011	0.629 ± 0.017	0.688 ± 0.039	0.820 ± 0.003	1.03 ± 0.01	0.463 ± 0.008	0.547 ± 0.009	0.718 ± 0.015	1.45 ± 0.03	1.57 ± 0.02	2.06 ± 0.01	2.57 ± 0.01	0.276 ± 0.036	0.299 ± 0.034	0.416 ± 0.021	0.407 ± 0.001	0.731 ± 0.031	1.76 ± 0.06	1.94 ± 0.06
eugenol	0.108 ± 0.004	0.131 ± 0.003	0.139 ± 0.005	0.146 ± 0.003	0.154 ± 0.004	0.131 ± 0.003	0.139 ± 0.003	0.149 ± 0.004	0.150 ± 0.005	0.153 ± 0.004	0.152 ± 0.005	0.155 ± 0.004	0.112 ± 0.004	0.128 ± 0.003	0.142 ± 0.005	0.146 ± 0.005	0.145 ± 0.006	0.153 ± 0.005	0.156 ± 0.005
cinamato de etilo	0.102 ± 0.008	0.191 ± 0.011	0.204 ± 0.011	0.238 ± 0.013	0.277 ± 0.009	0.191 ± 0.001	0.212 ± 0.005	0.236 ± 0.001	0.279 ± 0.013	0.322 ± 0.032	0.352 ± 0.007	0.400 ± 0.030	0.145 ± 0.013	0.148 ± 0.005	0.153 ± 0.008	0.178 ± 0.003	0.182 ± 0.003	0.21 ± 0.01	0.275 ± 0.022

Tabla 1.2 Concentraciones promedio y desviaciones estándar (n=2) de los compuestos de aroma (expresados en µg/L) evaluados en el estudio cinético para la FFA G2, a tres temperaturas diferentes (35, 50 y 75°C).

Compuestos	t0	35°C				50°C							75°C						
		1.5m	3.5m	6m	9m	3.5d	7d	14d	35d	49d	70d	98d	1h	2h	6h	12h	24h	48h	96h
3-mercaptophexanol	0.0302 ± 0.0009	0.0274 ± 0.0008	0.0291 ± 0.0009	0.0279 ± 0.0009	0.0133 ± 0.0004	2.16 ± 0.02	2.37 ± 0.01	2.72 ± 0.01	3.30 ± 0.06	3.53 ± 0.10	4.87 ± 0.01	4.77 ± 0.03	1.81 ± 0.17	1.77 ± 0.05	1.91 ± 0.24	2.13 ± 0.30	2.32 ± 0.14	2.97 ± 0.03	4.91 ± 0.17
γ-nonolactona	0.700 ± 0.011	0.814 ± 0.009	0.866 ± 0.008	0.881 ± 0.009	1.01 ± 0.01	0.828 ± 0.018	0.963 ± 0.018	0.944 ± 0.020	0.960 ± 0.019	0.993 ± 0.019	1.03 ± 0.02	1.04 ± 0.02	0.722 ± 0.014	0.728 ± 0.012	0.761 ± 0.014	0.796 ± 0.019	0.923 ± 0.016	0.902 ± 0.018	1.03 ± 0.02
masoia lactona	1.58 ± 0.03	2.03 ± 0.06	2.17 ± 0.10	2.18 ± 0.09	2.50 ± 0.07	2.56 ± 0.06	2.42 ± 0.03	2.60 ± 0.04	2.62 ± 0.09	2.79 ± 0.05	3.04 ± 0.15	3.44 ± 0.01	1.73 ± 0.01	1.76 ± 0.13	1.56 ± 0.13	1.76 ± 0.04	1.89 ± 0.02	2.09 ± 0.10	2.41 ± 0.02
β-damascenona	0.726 ± 0.003	5.10 ± 0.29	5.22 ± 0.27	4.65 ± 0.36	4.63 ± 0.24	3.85 ± 0.09	4.19 ± 0.02	4.63 ± 0.07	5.15 ± 0.06	5.68 ± 0.01	5.93 ± 0.21	6.23 ± 0.15	1.01 ± 0.12	2.68 ± 0.01	2.68 ± 0.13	3.85 ± 0.04	5.33 ± 0.18	5.65 ± 0.23	7.59 ± 0.14
Riesling acetil	0.155 ± 0.004	12.7 ± 0.3	16.7 ± 0.8	24.1 ± 1.1	25.0 ± 0.9	7.44 ± 0.34	13.1 ± 0.2	22.1 ± 1.4	26.8 ± 1.0	24.5 ± 0.2	19.6 ± 0.5	11.8 ± 0.1	0.247 ± 0.010	0.401 ± 0.022	2.25 ± 0.01	6.38 ± 0.04	18.4 ± 0.1	23.1 ± 0.4	21.8 ± 0.5
TDN	0.264 ± 0.018	8.04 ± 0.13	11.8 ± 0.3	30.1 ± 0.3	51.3 ± 0.8	4.21 ± 0.07	10.3 ± 0.5	29.8 ± 1.3	75.2 ± 2.4	145 ± 4	198 ± 5	296 ± 16	0.428 ± 0.034	0.443 ± 0.041	1.17 ± 0.02	5.00 ± 0.10	42.6 ± 1.8	81.8 ± 0.2	233 ± 3
vitispiranos	0.232 ± 0.004	22.9 ± 0.6	31.7 ± 0.7	64.3 ± 1.8	86.3 ± 3.4	11.2 ± 0.4	24.4 ± 1.6	54.1 ± 1.4	89.8 ± 3.2	117 ± 6	128 ± 9	129 ± 2	0.383 ± 0.038	0.514 ± 0.048	3.35 ± 0.04	12.2 ± 0.4	65.7 ± 1.5	93.8 ± 2.1	142 ± 1
α-terpineol	0.301 ± 0.038	3.88 ± 0.24	4.34 ± 0.30	4.67 ± 0.20	3.98 ± 0.08	8.44 ± 0.01	12.3 ± 0.2	15.9 ± 0.2	16.0 ± 0.2	13.4 ± 0.1	9.87 ± 0.24	6.25 ± 0.03	1.39 ± 0.07	1.69 ± 0.04	4.05 ± 0.33	7.71 ± 0.24	16.6 ± 0.1	19.0 ± 0.04	18.1 ± 0.1
geraniol	0.448 ± 0.104	2.46 ± 0.03	1.75 ± 0.03	0.634 ± 0.010	0.206 ± 0.003	3.48 ± 0.12	2.96 ± 0.04	1.77 ± 0.01	0.757 ± 0.024	0.427 ± 0.009	0.298 ± 0.009	0.244 ± 0.003	1.24 ± 0.01	1.38 ± 0.01	2.56 ± 0.03	3.57 ± 0.13	2.67 ± 0.01	1.47 ± 0.01	0.605 ± 0.010
linalool	0.965 ± 0.045	8.10 ± 0.05	5.74 ± 0.17	2.61 ± 0.21	1.23 ± 0.03	10.9 ± 0.2	8.69 ± 0.20	5.12 ± 0.03	2.21 ± 0.01	1.20 ± 0.13	0.764 ± 0.052	0.618 ± 0.068	2.13 ± 0.02	2.43 ± 0.01	7.41 ± 0.29	9.67 ± 0.10	5.95 ± 0.08	3.43 ± 0.02	1.55 ± 0.01
óxido de linalool	0.246 ± 0.020	1.91 ± 0.06	2.43 ± 0.02	4.17 ± 0.21	5.69 ± 0.24	1.04 ± 0.01	1.72 ± 0.01	2.99 ± 0.08	4.81 ± 0.21	6.72 ± 0.10	8.4 ± 0.5	10.3 ± 0.1	0.247 ± 0.007	0.309 ± 0.033	0.616 ± 0.032	1.38 ± 0.04	3.97 ± 0.05	6.10 ± 0.10	9.84 ± 0.01
acetovanillona	12.8 ± 0.9	15.3 ± 0.2	16.2 ± 0.8	14.9 ± 0.7	15.7 ± 0.5	15.1 ± 0.1	15.3 ± 0.6	15.0 ± 0.4	16.8 ± 0.2	16.8 ± 0.1	17.9 ± 0.1	20.2 ± 0.1	12.8 ± 0.5	13.2 ± 0.2	13.8 ± 0.5	13.6 ± 1.1	15.1 ± 0.2	15.3 ± 0.9	17.1 ± 0.3
vainillina	29.1 ± 0.2	41.6 ± 1.4	42.0 ± 0.8	41.7 ± 0.6	43.0 ± 0.7	42.4 ± 0.9	43.1 ± 0.3	43.2 ± 0.7	46.6 ± 0.5	45.9 ± 0.2	51.0 ± 0.5	62.1 ± 2.1	29.8 ± 0.5	32.5 ± 1.1	37.0 ± 1.6	40.4 ± 1.5	41.8 ± 0.5	42.5 ± 1.7	47.3 ± 1.3
4-vinilguaiaacol	1.12 ± 0.09	1.59 ± 0.17	2.02 ± 0.12	1.34 ± 0.10	1.56 ± 0.13	9.88 ± 1.37	8.31 ± 0.30	7.79 ± 1.02	9.24 ± 1.07	13.2 ± 0.8	23.9 ± 0.5	34.3 ± 0.4	3.36 ± 0.06	4.55 ± 0.27	9.92 ± 0.38	16.2 ± 0.9	70.6 ± 1.6	87.7 ± 2.6	249 ± 3
4-vinilfenol	2.06 ± 0.11	3.32 ± 0.20	4.19 ± 0.31	2.87 ± 0.16	3.40 ± 0.16	19.4 ± 3.6	19.7 ± 1	20.5 ± 0.3	31.6 ± 3.2	56.8 ± 3.2	111 ± 2	152 ± 8	14.7 ± 0.1	22.2 ± 0.7	56.4 ± 0.1	84.4 ± 4.1	238 ± 4	263 ± 6	544 ± 7
guaiaacol	0.455 ± 0.021	3.28 ± 0.02	4.35 ± 0.11	5.93 ± 0.21	8.04 ± 0.03	1.91 ± 0.01	2.60 ± 0.07	3.61 ± 0.02	5.49 ± 0.06	7.62 ± 0.03	9.86 ± 0.01	13.3 ± 0.1	0.765 ± 0.012	0.799 ± 0.012	0.969 ± 0.036	1.54 ± 0.04	3.48 ± 0.05	5.23 ± 0.01	9.23 ± 0.10
metoxieugenol	0.216 ± 0.010	0.577 ± 0.008	0.651 ± 0.016	0.906 ± 0.005	1.18 ± 0.02	0.424 ± 0.014	0.542 ± 0.021	0.726 ± 0.007	1.16 ± 0.01	1.69 ± 0.03	2.24 ± 0.02	2.94 ± 0.02	0.237 ± 0.017	0.274 ± 0.003	0.342 ± 0.01	0.363 ± 0.019	0.767 ± 0.030	1.1 ± 0.1	2.02 ± 0.08
syringol	4.29 ± 0.25	40.1 ± 0.9	51.0 ± 0.6	79.8 ± 0.3	107 ± 1	34.2 ± 0.1	43.6 ± 1.0	58.5 ± 0.1	83.1 ± 1.0	112 ± 1	141 ± 3	187 ± 2	21.9 ± 0.3	21.3 ± 1.0	23.7 ± 0.5	33.3 ± 0.8	60.8 ± 2.2	86.8 ± 0.8	140 ± 1
eugenol	0.113 ± 0.003	0.163 ± 0.005	0.171 ± 0.006	0.173 ± 0.005	0.183 ± 0.006	0.153 ± 0.004	0.165 ± 0.007	0.176 ± 0.005	0.185 ± 0.004	0.185 ± 0.004	0.182 ± 0.006	0.181 ± 0.005	0.129 ± 0.004	0.148 ± 0.006	0.169 ± 0.008	0.176 ± 0.004	0.173 ± 0.007	0.183 ± 0.005	0.185 ± 0.008
cinamato de etilo	0.086 ± 0.006	0.149 ± 0.006	0.172 ± 0.016	0.212 ± 0.012	0.253 ± 0.011	0.158 ± 0.003	0.164 ± 0.014	0.215 ± 0.030	0.236 ± 0.011	0.311 ± 0.047	0.308 ± 0.019	0.39 ± 0.02	0.182 ± 0.001	0.192 ± 0.015	0.168 ± 0.001	0.169 ± 0.002	0.198 ± 0.015	0.224 ± 0.010	0.292 ± 0.008

Como es evidente al comparar las representaciones a las tres temperaturas, los tiempos de muestreo no son equivalentes. Aquellos a 50°C fueron, relativamente, los más largos, por lo que esta temperatura se ha utilizado preferentemente para establecer el patrón de evolución de los diferentes compuestos.

Para interpretar los diferentes gráficos Concentración vs. tiempo presentados en las figuras 1.4-1.8, hay algunos aspectos básicos a considerar. En primer lugar, las moléculas de aroma se forman a partir de diferentes precursores de aroma específicos a través de una serie de procesos espontáneos a pH del vino. Algunas de las moléculas de aroma son inestables o bastante reactivas, por lo que al monitorear la evolución con el tiempo de la concentración de las moléculas de aroma derivadas de los precursores de aroma, el resultado puede no representar solo la reacción a través de la cual se forma la molécula de aroma, que aquí se denominará como el proceso de hidrólisis, sino la combinación de esta reacción con todas las demás en las que la molécula de aroma podría estar involucrada, que aquí se denominará como el proceso de degradación.

Como primera aproximación, ambos procesos reactivos se han interpretado mediante cinéticas de primer orden, como se detalla en la sección de materiales y métodos 2.4 y en las figuras 1.1-1.3. Los parámetros críticos que gobiernan esos modelos son las constantes cinéticas correspondientes: k_h para la hidrólisis del precursor y k_d para la degradación de la molécula de aroma. Se presentan representaciones típicas obtenidas utilizando diferentes combinaciones de valores de k_h y k_d en las figuras. 1.1 y 1.2 y se utilizan para discutir los resultados experimentales.

Basándonos en todas las consideraciones anteriores, las moléculas de aroma derivadas de precursores específicos pueden clasificarse en tres categorías básicas diferentes, siendo la última subdividida en otras tres subcategorías:

1. Moléculas de aroma lábiles (k_d grande) derivadas de moléculas precursoras lábiles (k_h grande).
2. Moléculas de aroma estables (k_d pequeña) derivadas de moléculas precursoras lábiles (k_h grande)
3. Moléculas de aroma estables (k_d pequeña) derivadas de moléculas precursoras bastante estables (k_h pequeña). Aquí, surgen tres subcategorías diferentes atendiendo al papel desempeñado por la temperatura:

- a) Pequeño: las consideraciones cinéticas anteriores se aplican aproximadamente.
- b) Moderado: las consideraciones cinéticas anteriores ya no son válidas.
- c) Extremo: a 35°C las reacciones casi no tienen lugar.

En las siguientes subsecciones, se presentarán y discutirán los diferentes patrones.

3.1.1. Moléculas de aroma lábiles (k_d grande) derivadas de moléculas precursoras lábiles (k_h grande)

Estos son el geraniol, linalool, Riesling acetal y α -terpineol que se muestran en la figura 1.4. Como se puede observar, las evoluciones de estos cuatro componentes de aroma se caracterizaron por la presencia de un máximo, aunque en los casos del Riesling acetal y α -terpineol, los máximos solo se observaron claramente en la representación a 50°C. Estos patrones son característicos de compuestos de aroma lábiles derivados de moléculas precursoras lábiles, como se puede ver en la figura 1.2.

En los casos de linalool y geraniol, los máximos se observaron en los primeros puntos de muestreo tomados a 35 y 50°C (1,5 meses y 3,5 días, respectivamente), en concordancia con informes anteriores (Williams et al., 1980). Solo los puntos de muestreo a 75°C fueron suficientes para ubicar con precisión los máximos, que se encontraron en ambos casos en el tercer punto de muestreo (12h). Las representaciones obtenidas para estos dos compuestos fueron similares a la tercera proporcionada en la figura 1.2 (obtenida con $k_h = 5$ y $k_d = 5$), lo que corresponde a procesos de hidrólisis y degradación muy rápidos, lo cual es consistente con los resultados de Carlin et al. (Carlin et al., 2022).

El Riesling acetal y α -terpineol alcanzaron los máximos significativamente más tarde, en el sexto punto de muestreo a 75°C (25,7 horas), el cuarto a 50°C (14 días) y el cuarto o quinto a 35°C (6 o 9 meses), aunque a esta temperatura los máximos no se observaron claramente. Las representaciones de ambos compuestos fueron similares a las del medio de la figura 1.2 (obtenidas con $k_h = 1$ y $k_d = 1$), lo que sugiere que para estos dos compuestos tanto la hidrólisis del precursor como la degradación de la molécula fueron reacciones químicas más lentas que las de linalool y geraniol.

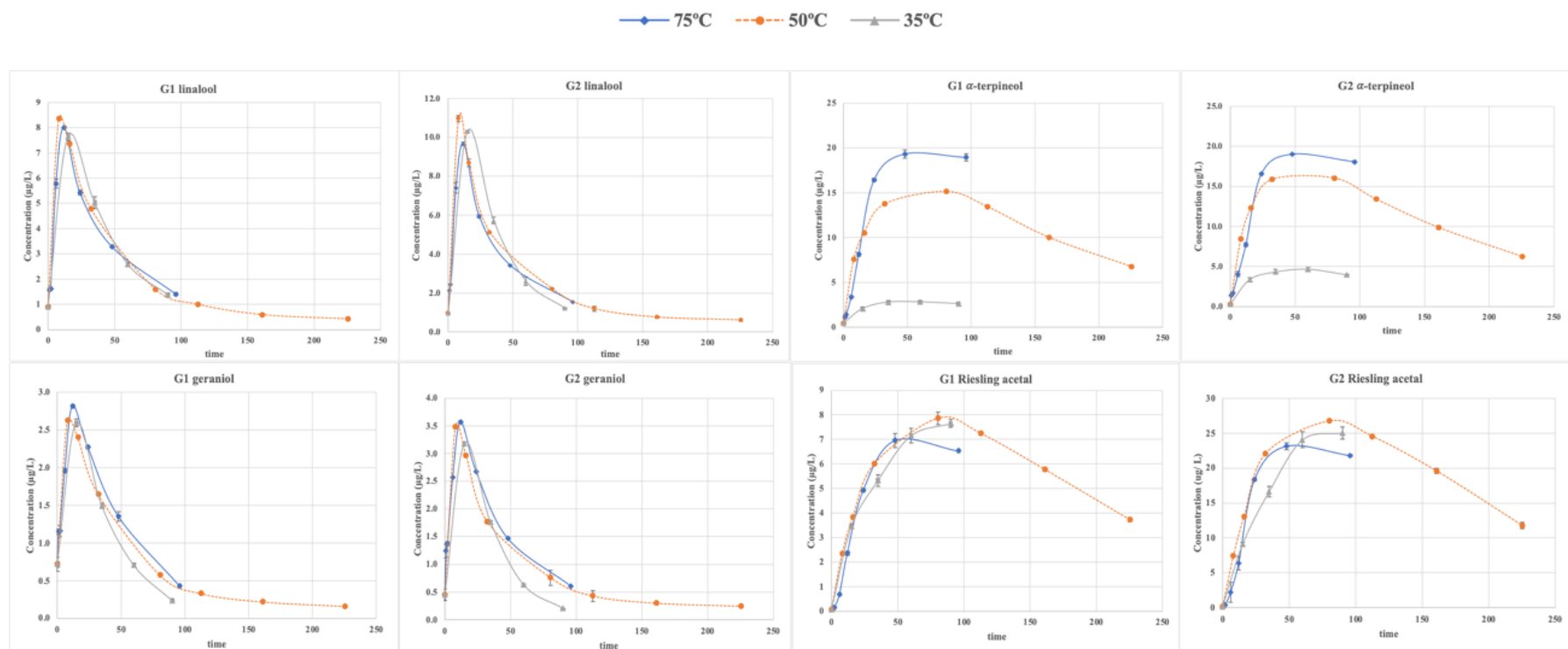


Fig. 1.4 Evolución con el tiempo de los niveles de linalol, geraniol, Riesling acetal y α -terpineol durante la incubación anóxica de dos modelos de vino que contienen extractos polifenólicos y aromáticos de dos lotes diferentes de uvas Garnacha. Para facilitar la comparación, las escalas de tiempo se han normalizado. Los datos a 75°C se expresan directamente en horas, los datos a 50°C, divididos por 2.3, son días (la coordenada 100 = 43,5 días), y los datos a 35°C, divididos por 10, son meses (la coordenada 50 = 5,0 meses). Las barras de error representan el error estándar de la media.

Resulta interesante que, en el caso del α -terpineol, hubo un marcado efecto de la temperatura en la acumulación de la molécula de aroma. Los niveles máximos se observaron en ambas muestras a 75°C, y los niveles mínimos a 35°C. Dado que los puntos de muestreo a 35°C y 75°C no habían sido suficientes para observar completamente la disminución de las concentraciones en tiempos más largos, no fue posible realizar un diagnóstico preciso de la razón de esto.

Como se muestra en la figura 1.2, las moléculas de aroma se acumulan más si las constantes de hidrólisis son más altas y las constantes de degradación son más pequeñas. En base a esta observación, se podría pensar que las temperaturas más altas tienen un mayor efecto en la reacción de hidrólisis del precursor que en la reacción de degradación de la molécula de aroma. Sin embargo, también se sabe que el α -terpineol es un subproducto de la degradación de otros terpenos (Maicas & Mateo, 2005), por lo que la dependencia específica de la temperatura de este compuesto podría explicarse bien porque a temperaturas más altas hay un mayor nivel de degradación de otros terpenos. Sin embargo, esta mayor degradación no se observa para el linalool y el geraniol.

3.1.2. Moléculas de aroma estables (k_d pequeña) derivadas de moléculas precursoras lábiles (k_h grande)

Este grupo incluye dos norisoprenoides: β -damascenona y vitispiranos, y dos derivados de la vainillina o fenilpropanoides: vainillina y acetovanillona. La figura 1.5 muestra la evolución de estos compuestos. Es notable que en los dos norisoprenoides, las moléculas de aroma se acumularon a niveles ligeramente pero significativamente más altos a 75°C, lo que podría estar relacionado con el hecho conocido de que estos compuestos de aroma son productos de la descomposición de los carotenoides (Daniel et al., 2008). Aunque las mesetas no se observaron claramente, todas las representaciones tuvieron tasas máximas de acumulación en los primeros puntos de muestreo y las tasas de acumulación disminuyeron progresivamente; por lo tanto, se puede sugerir que, en todos los casos, las representaciones son similares a las reportadas en la figura 1.1, relacionadas con compuestos estables derivados de la hidrólisis de moléculas precursoras. Se ha informado que la β -damascenona se degrada en presencia de SO₂ (Sefton et al., 2011), pero este antioxidante no estaba presente en los modelos de vino. La existencia de mesetas en las evoluciones de la β -damascenona y vitispiranos se ha observado previamente (Carlin et al., 2022; Slaghenaufi & Ugliano, 2018)

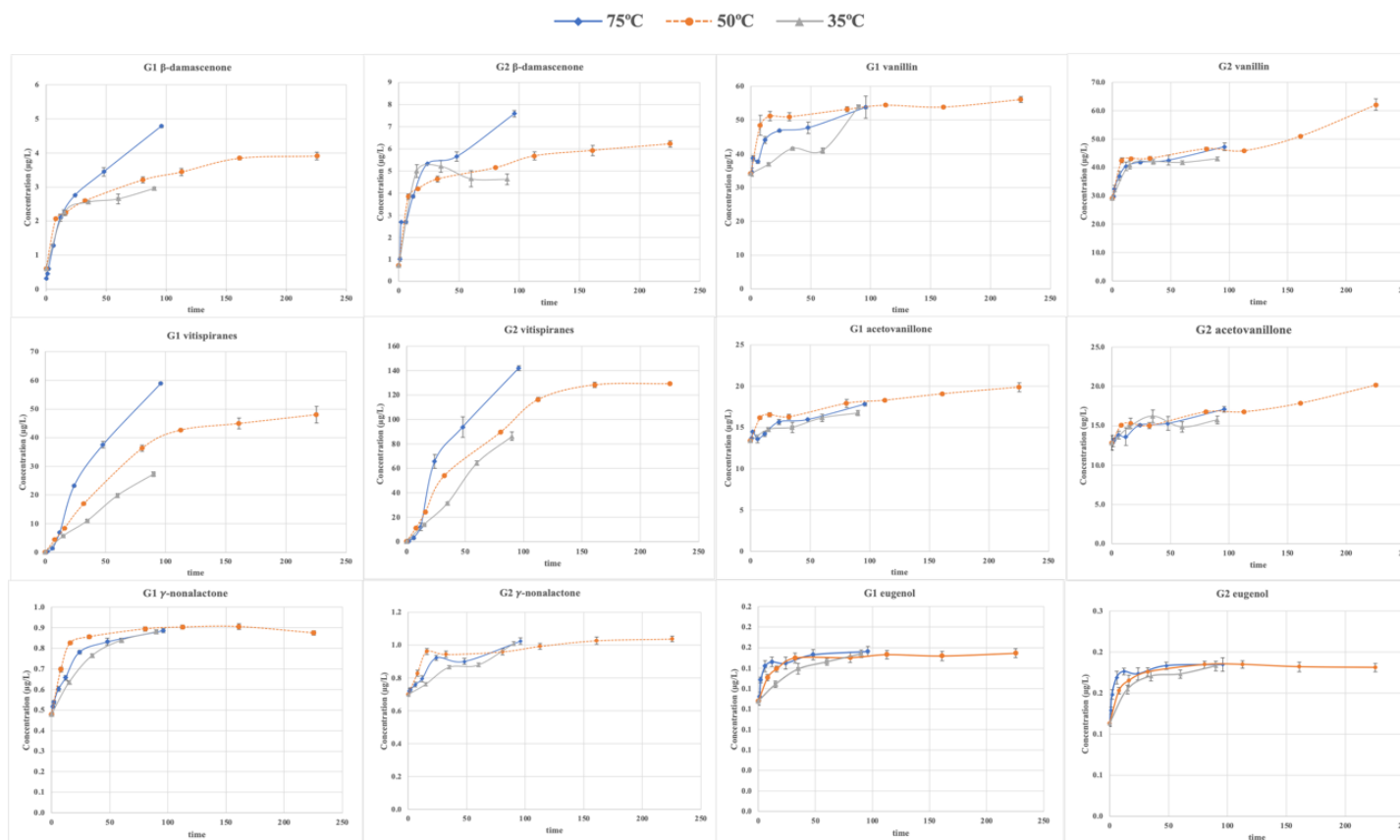


Fig. 1.5 Evolución con el tiempo de los niveles de β -damascenona, vitispiranos, vainillina, acetovainillona, γ -nonalactona y eugenol durante la incubación anóxica de dos modelos de vino que contienen extractos polifenólicos y aromáticos de dos lotes diferentes de uvas Garnacha. Para facilitar la comparación, las escalas de tiempo se han normalizado. Los datos a 75°C se expresan directamente en horas, los datos a 50°C, divididos por 2,3, son días (la coordenada 100 = 43,5 días), y los datos a 35°C, divididos por 10, son meses (la coordenada 50 = 5,0 meses). Las barras de error representan el error estándar de la media.

3.1.3. Moléculas de aroma estables (k_a pequeña) derivadas de moléculas precursoras bastante estables (k_h pequeña)

a) Moléculas de aroma estables (k_a pequeña) derivadas de moléculas precursoras estables (k_h pequeña) con pequeños efectos de la temperatura

Los compuestos en esta categoría son guaiacol, cinamato de etilo y masoia lactona, cuyos patrones de evolución se muestran en la figura 1.6.

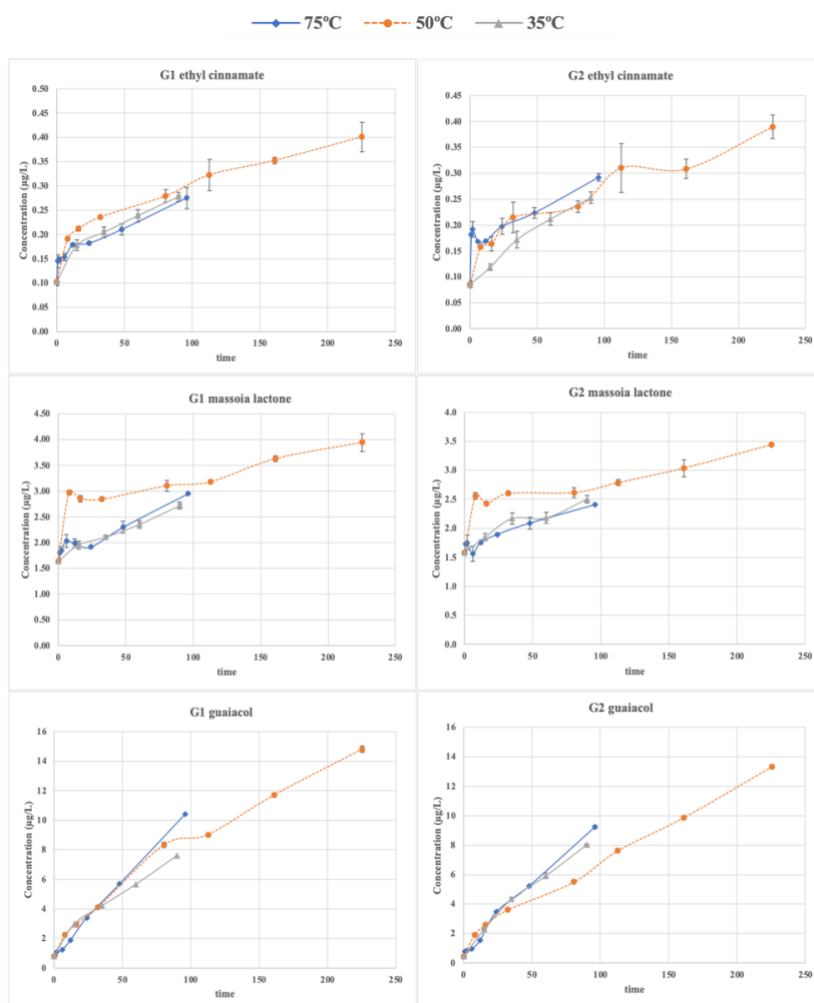


Fig. 1.6 Evolución con el tiempo de los niveles de cinamato de etilo, masoia lactona y guaiacol durante la incubación anóxica de dos modelos de vino que contienen extractos polifenólicos y aromáticos de dos lotes diferentes de uvas Garnacha. Para facilitar la comparación, las escalas de tiempo se han normalizado. Los datos a 75°C se expresan directamente en horas, los datos a 50°C, divididos por 2,3, son días (la coordenada 100 = 43,5 días), y los datos a 35°C, divididos por 10, son meses (la coordenada 50 = 5,0 meses). Las barras de error representan el error estándar de la media.

Al menos en estos dos últimos casos, las vías de formación incluyen más pasos que la hidrólisis de un precursor glicosídico. El cinamato de etilo se forma por esterificación del ácido cinámico con etanol, y el ácido cinámico proviene al menos en parte de un precursor glicosídico. De hecho, se han encontrado dos glicósidos de derivados del ácido cinámico en vinos elaborados con moras negras coreanas (Cho et al., 2014). Por su parte, la masoia lactona se forma a través de la esterificación interna del correspondiente ácido γ -hidroxiácido. Considerando que se han descrito varios precursores glicosídicos de las whisky lactonas estructuralmente equivalentes en la madera de roble (Hayasaka et al., 2010; Wilkinson et al., 2013), también podrían existir glicósidos del precursor del hidroxiácido para la masoia lactona. Finalmente, el guaiacol se produce por la hidrólisis de precursores glicosídicos, como lo describen Hayasaka et al. (Hayasaka et al., 2010); además, la hidrólisis ácida de uvas expuestas a humo y vinos de las mismas, resultó en un aumento de varias veces en el guaiacol libre (Singh et al., 2011).

b) Moléculas de aroma estables (k_d pequeña) derivadas de moléculas precursoras estables (k_h pequeña) con efectos moderados de temperatura

Los compuestos en esta categoría son TDN, siringol, óxido de linalool y metoxieugenol, cuyas evoluciones en el tiempo siguieron los patrones que se muestran en la figura 1.7. Las tres primeras moléculas son muy diferentes en estructuras químicas y en origen bioquímico. El TDN es un norisoprenoide, el óxido de linalool es un terpeno y el metoxieugenol y el siringol son fenoles y a su vez, compuestos relacionados con la vainillina (fenilpropanoides). En todos los casos, se han descrito previamente precursores glicosídicos (Coulter et al., 2022; Schievano et al., 2013). Los cuatro compuestos de aroma en esta categoría tienen en común que parecen ser el punto final de rutas de degradación química complejas de las tres familias diferentes de componentes: norisoprenoides, fenilpropanoides y terpenos. Esto estaría en acuerdo con su acumulación continua, sin evidencias que sugieran que las tasas de acumulación disminuyan. Los efectos de la temperatura fueron más o menos evidentes en todos los casos y, en general, revelaron tasas de acumulación más altas a temperaturas más altas, lo que sugiere que las reacciones mediante las cuales se producen estos compuestos tienen energías de activación mucho más altas que las de las reacciones de los compuestos en las categorías anteriores, la mayoría de ellas son hidrólisis de enlaces glicosídicos.

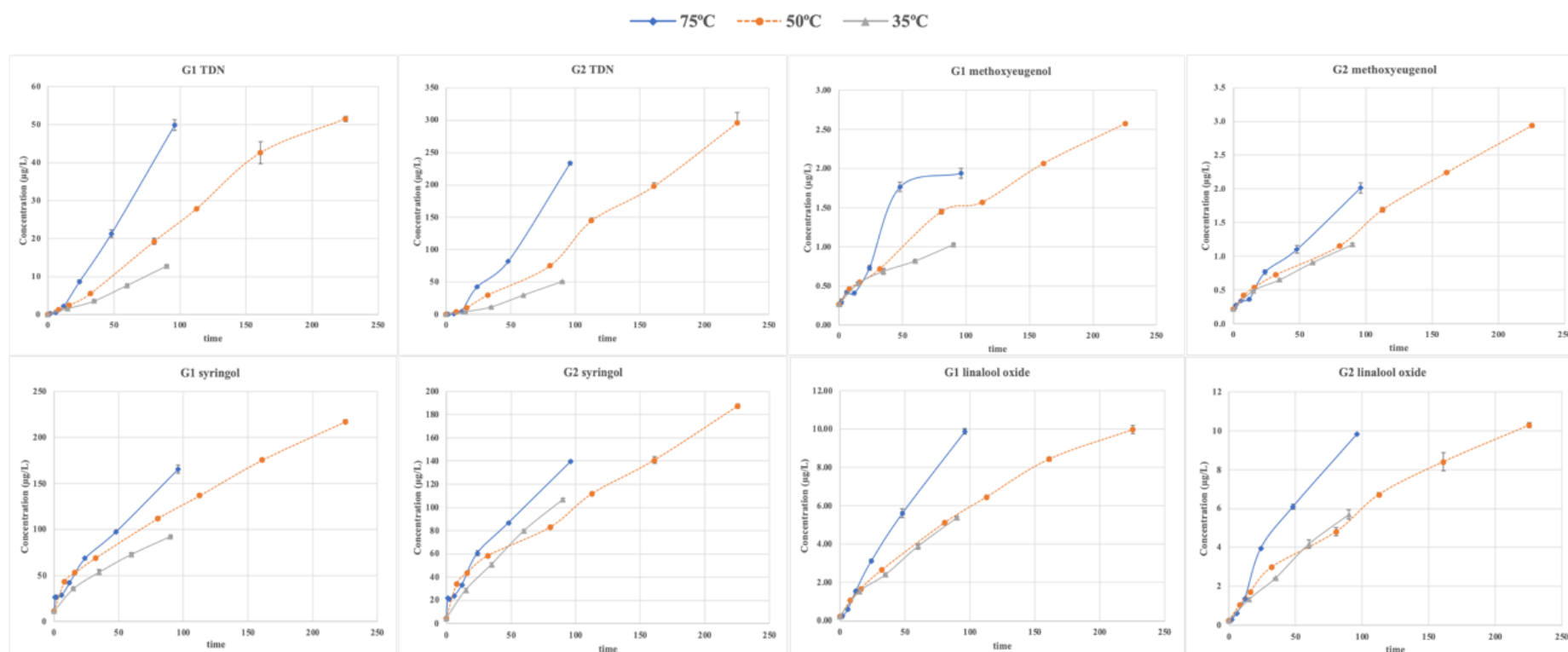


Fig. 1.7 Evolución con el tiempo de los niveles de TDN, syringol, metoxieugenol y óxido de linalool durante la incubación anóxica de dos modelos de vino que contienen extractos polifenólicos y aromáticos de dos lotes diferentes de uvas Garnacha. Para facilitar la comparación, las escalas de tiempo se han normalizado. Los datos a 75°C se expresan directamente en horas, los datos a 50°C, divididos por 2,3, son días (la coordenada 100 = 43,5 días), y los datos a 35°C, divididos por 10, son meses (la coordenada 50 = 5,0 meses). Las barras de error representan el error estándar de la media

c) Moléculas de aroma estables (k_d pequeña) derivadas de moléculas precursoras estables (k_h pequeña) con efecto extremo de la temperatura

Tres compuestos pertenecen a esta categoría: 4-vinilguaiacol, 4-vinilfenol y 3-mercaptohexanol (MH), cuya evolución en el tiempo siguió los patrones dados en la figura 1.8.

Como se puede observar, la característica más destacada de las evoluciones de estos compuestos fue el fuerte efecto de la temperatura. Dejando de lado al MH en G2, en los otros cinco casos, las tasas de acumulación de aroma a 75 °C fueron mucho mayores y, en los seis casos, las tasas de acumulación del compuesto de aroma a 35 °C fueron simplemente residuales en comparación con las observadas a temperaturas más altas. Esto sugiere fuertemente que la energía de activación de las reacciones de hidrólisis de los precursores correspondientes fue grande, por lo que se requerían altas temperaturas para hidrolizar al precursor. Esto se habría esperado en el caso de los diferentes precursores de MH, en los que se tiene que romper un enlace tioéter C-S.

En los casos de los vinilfenoles, esta explicación es menos convincente, ya que se espera que los precursores de estos compuestos sean glicósidos cuya hidrólisis no debería ser muy diferente a la de los otros fenoles medidos en este trabajo, como siringol, metoxieugenol o guaiacol, para los cuales los efectos de la temperatura fueron mucho más débiles. Por lo tanto, se puede especular que otras reacciones pueden estar teniendo lugar.

Los vinilfenoles son compuestos reactivos con un fuerte carácter electrofílico. Se sabe que reaccionan con nucleófilos como los mercaptanos (Naim et al., 1993), y también con antocianinas para formar piroantocianinas (Hillebrand et al., 2004). Se puede entonces hipotetizar que la escasa acumulación de estos compuestos a bajas temperaturas puede ser también, en parte, debido a una reacción competitiva con antocianinas, que a alta temperatura estarían involucradas en otras reacciones como la descarboxilación térmica del ácido p-cumárico y ferúlico para producir los vinilfenoles correspondientes (Tambawala et al., 2022).

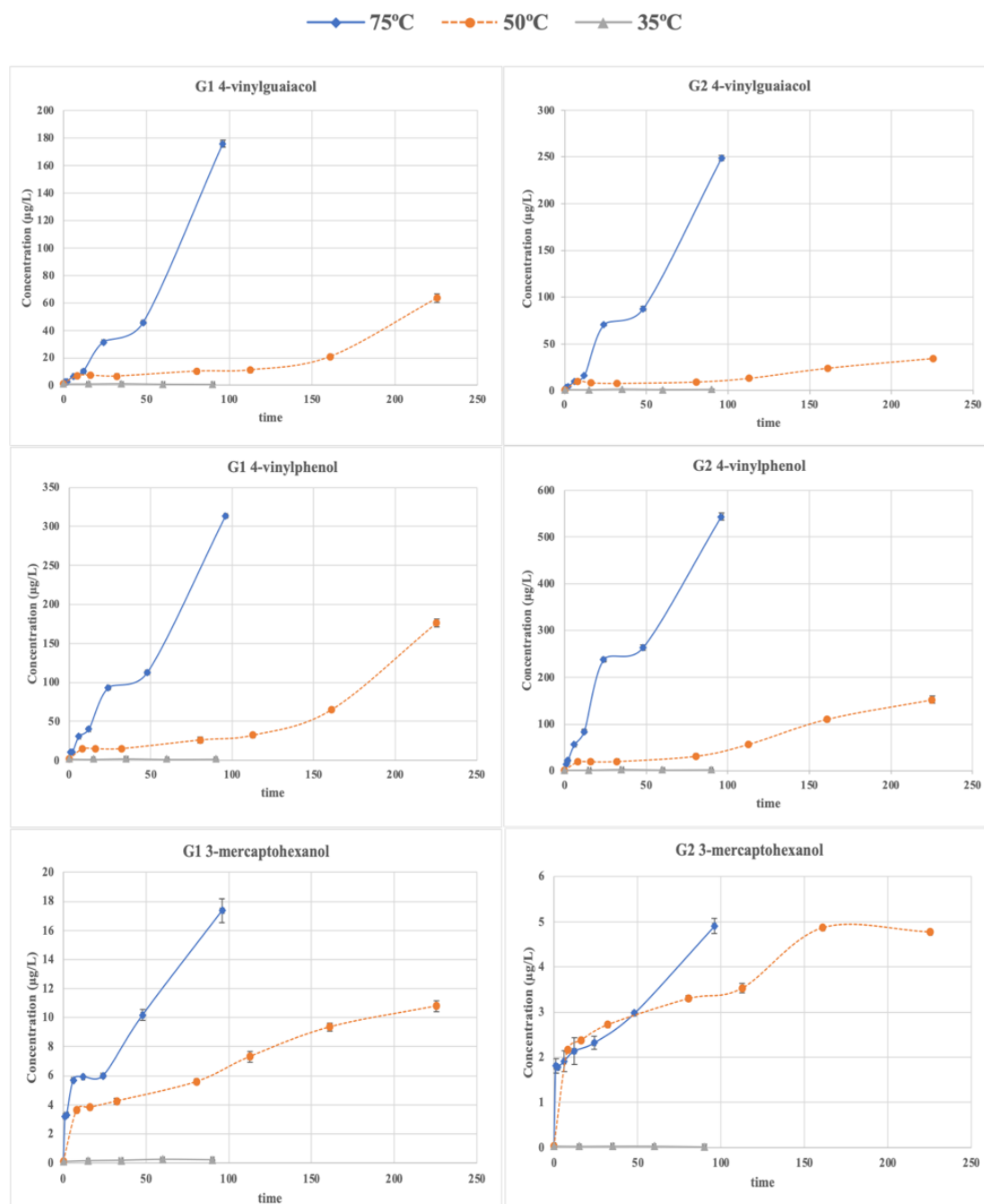


Fig. 1.8 Evolución con el tiempo de los niveles de 4-vinilguaiacol, 4-vinilfenol y 3-mercaptohexanol durante la incubación anóxica de dos modelos de vino que contienen extractos polifenólicos y aromáticos de dos lotes diferentes de uvas Garnacha. Para facilitar la comparación, las escalas de tiempo se han normalizado. Los datos a 75°C se expresan directamente en horas, los datos a 50°C, divididos por 2,3, son días (la coordenada 100 = 43,5 días), y los datos a 35°C, divididos por 10, son meses (la coordenada 50 = 5,0 meses). Las barras de error representan el error estándar de la media.

4. Conclusiones

Los modelos basados en cinéticas de primer orden parecen ser apropiados para interpretar la acumulación de moléculas de aroma derivadas de la hidrólisis de precursores, incluyendo también aquellas moléculas de aroma que sufren posterior degradación.

El estudio llevado a cabo a tres temperaturas diferentes ha permitido clasificar las moléculas de aroma derivadas de moléculas precursoras específicas presentes en las uvas en tres categorías según la estabilidad tanto de la molécula de aroma como del precursor: moléculas lábiles de precursores lábiles, moléculas estables de precursores lábiles y moléculas estables de precursores estables.

Para muchas moléculas de aroma derivadas de las uvas, los patrones de acumulación a las tres temperaturas fueron bastante similares, los niveles acumulados también fueron similares y, en promedio, las tasas de reacción aumentaron en factores de 6,9 y 72 cuando la temperatura se incrementó de 35 a 50 o 75°C, respectivamente.

El gráfico tipo Arrhenius ha permitido estimar que, para la mayoría de los compuestos de aroma, la hidrólisis rápida a 75°C fue 460 veces más rápida que la observada a 20 °C. Excepciones a este patrón fueron los vinilfenoles y el 3-mercaptohexanol, que apenas se acumularon a 35°C, lo que sugiere que sus hidrólisis tienen energías de activación muy altas. TDN, vitispiranos y α -terpineol también se acumularon más a temperaturas más altas.

5. Referencias

Alegre, Y., Arias-Pérez, I., Hernández-Orte, P., & Ferreira, V. (2020). Development of a new strategy for studying the aroma potential of winemaking grapes through the accelerated hydrolysis of phenolic and aromatic fractions (PAFs). *Food Research International*, 127, 108728. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108728>

Alegre, Y., Sáenz-Navajas, M. P., Hernández-Orte, P., & Ferreira, V. (2020). Sensory, olfactometric and chemical characterization of the aroma potential of Garnacha and Tempranillo winemaking grapes. *Food Chemistry*, 331, 127207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127207>

Carlin, S., Lotti, C., Correggi, L., Mattivi, F., Arapitsas, P., & Vrhovšek, U. (2022). Measurement of the Effect of Accelerated Aging on the Aromatic Compounds of Gewürztraminer and Teroldego Wines, Using a SPE-GC-MS/MS Protocol. *Metabolites*, 12(2), 180. <https://doi.org/10.3390/metabo12020180>

Cho, J. Y., Kim, S. J., Lee, H. J., & Moon, J. H. (2014). Two novel glycosyl cinnamic and benzoic acids from korean black raspberry (*Rubus coreanus*) wine. *Food Science and Biotechnology*, 23(4), 1081-1085. <https://doi.org/10.1007/S10068-014-0148-7>

Coulter, A., Baldock, G., Parker, M., Hayasaka, Y., Francis, I. L., & Herderich, M. (2022). Concentration of smoke marker compounds in non-smoke-exposed grapes and wine in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 28(3), 459-474. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12543>

Daniel, M. A., Puglisi, C. J., Capone, D. L., Elsey, G. M., & Sefton, M. A. (2008). Rationalizing the formation of damascenone: Synthesis and hydrolysis of damascenone precursors and their analogues, in both aglycone and glycoconjugate forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9183-9189. <https://doi.org/10.1021/jf8018134>

Francis, I. L., Sefton, M. A., & Williams, P. J. (1992). Sensory descriptive analysis of the aroma of hydrolysed precursor fractions from semillon, chardonnay and sauvignon blanc grape juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59(4), 511-520. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740590414>

Hampel, D., Robinson, A. L., Johnson, A. J., & Ebeler, S. E. (2014). Direct hydrolysis and analysis of glycosidically bound aroma compounds in grapes and wines: Comparison of hydrolysis conditions and sample preparation methods. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(3), 361-377. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12087>

Hayasaka, Y., Baldock, G. A., Parker, M., Pardon, K. H., Black, C. A., Herderich, M. J., & Jeffery, D. W. (2010). Glycosylation of Smoke-Derived Volatile Phenols in Grapes as a Consequence of Grapevine Exposure to Bushfire Smoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(20), 10989-10998. <https://doi.org/10.1021/JF103045T>

Hillebrand, S., Schwarz, M., & Winterhalter, P. (2004). Characterization of anthocyanins and pyranoanthocyanins from blood orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7331-7338. <https://doi.org/10.1021/jf0487957>

Ibarz, M. J., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Loscos, N., & Cacho, J. (2006). Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 217-229. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.020>

López, R., Aznar, M., Cacho, J., & Ferreira, V. (2002). Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 966(1-2), 167-177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00696-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00696-9)

López, R., Ezpeleta, E., Sánchez, I., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry*, 88(1), 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.025>

Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2009). Comparison of the suitability of different hydrolytic strategies to predict aroma potential of different grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2468-2480. <https://doi.org/10.1021/jf803256e>

Maicas, S., & Mateo, J. J. (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 322-335. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1806-0>

Naim, M., Wainish, S., Zehavi, U., Peleg, H., Rouseff, R. L., & Nagy, S. (1993). Inhibition by Thiol Compounds of Off-Flavor Formation in Stored Orange Juice. 1. Effect of L-Cysteine and N-Acetyl-L-cysteine on 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(9), 1355-1358. <https://doi.org/10.1021/jf00033a002>

Oliveira, I., & Ferreira, V. (2019). Modulating Fermentative, Varietal and Aging Aromas of Wine Using non- *Saccharomyces* Yeasts in a Sequential Inoculation Approach. *Microorganisms*, 7(6), 164. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060164>

Schievano, E., D'Ambrosio, M., Mazzaretto, I., Ferrarini, R., Magno, F., Mammi, S., & Favaro, G. (2013). Identification of wine aroma precursors in Moscato Giallo grape juice: A nuclear magnetic resonance and liquid chromatography-mass spectrometry tandem study. *Talanta*, 116, 841-851. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.049>

- Schneider, R., Razungles, A., Augier, C., & Baumes, R. (2001). Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines. *Journal of Chromatography A*, 936(1-2), 145-157. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01150-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01150-5)
- Sefton, M. A., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., & Taylor, D. K. (2011). Occurrence, sensory impact, formation, and fate of damascenone in grapes, wines, and other foods and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 9717-9746. <https://doi.org/10.1021/jf201450q>
- Singh, D. P., Chong, H. H., Pitt, K. M., Cleary, M., Dokoozlian, N. K., & Downey, M. O. (2011). Guaiacol and 4-methylguaiacol accumulate in wines made from smoke-affected fruit because of hydrolysis of their conjugates. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(2), S13-S21. <https://doi.org/10.1111/J.1755-0238.2011.00128.X>
- Slaghenaufi, D., & Ugliano, M. (2018). Norisoprenoids, sesquiterpenes and terpenoids content of Valpolicella wines during aging: Investigating aroma potential in relationship to evolution of tobacco and balsamic aroma in aged wine. *Frontiers in Chemistry*, 6, 66. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00066>
- Tambawala, H., Batra, S., Shirapure, Y., & More, A. P. (2022). Curcumin- A Bio-based Precursor for Smart and Active Food Packaging Systems: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(6), 2177-2208. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02372-x>
- Vela, E., Hernández-Orte, P., Franco-Luesma, E., & Ferreira, V. (2017). The effects of copper fining on the wine content in sulfur off-odors and on their evolution during accelerated anoxic storage. *Food Chemistry*, 231, 212-221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.125>
- Vichi, S., Cortés-Francisco, N., & Caixach, J. (2015). Analysis of volatile thiols in alcoholic beverages by simultaneous derivatization/extraction and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, 175, 401-408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.095>
- Wilkinson, K. L., Prida, A., & Hayasaka, Y. (2013). Role of glycoconjugates of 3-methyl-4-hydroxyoctanoic acid in the evolution of oak lactone in wine during oak maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(18), 4411-4416. <https://doi.org/10.1021/jf400175h>
- Williams, P. J., Sefton, M. A., & Wilson, B. (1989). *Nonvolatile Conjugates of Secondary Metabolites as Precursors of Varietal Grape Flavor Components* (pp. 35-48). <https://doi.org/10.1021/bk-1989-0388.ch004>
- Williams, P. J., Strauss, C. R., & Wilson, B. (1980). Hydroxylated Linalool Derivatives as Precursors of Volatile Monoterpenes of Muscat Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(4), 766-771. <https://doi.org/10.1021/jf60230a037>

Capítulo 2

Capítulo 2. Evaluación de la hidrólisis ácida acelerada a 75°C como método para la predicción del aroma potencial en uvas Garnacha y Tempranillo

1. Introducción

Como se ha comentado anteriormente existe una estrecha relación entre la calidad aromática del vino y el contenido de precursores de aroma en las uvas (Abbott et al., 1991; Francis et al., 1992). Por esta razón, se han llevado a cabo numerosos estudios tanto para la caracterización química de este conjunto de precursores, como para la elucidación de las vías biogénicas involucradas (Strauss et al., 1986; Williams et al., 1982; Winterhalter, 1991), así como para el desarrollo de métodos cuantitativos para la evaluación global o detallada de las fracciones de precursores presentes en la uva (Alegre, Arias-Pérez, et al., 2020; Concejero et al., 2014; Gunata et al., 1985; Ibarz et al., 2006; Mateo et al., 1997).

En general, los compuestos volátiles derivados de los precursores glicosídicos pueden ser liberados, durante el proceso de vinificación por la acción de enzimas glicosidasas endógenas y exógenas (Cabaroglu et al., 2003; Günata et al., 1990; Sánchez Palomo et al., 2005), por la acción de las levaduras en el mosto (Delfini et al., 2001; Denat et al., 2021; Oliveira & Ferreira, 2019), por bacterias lácticas (D’Incecco et al., 2004), o mediante hidrólisis ácida espontánea (López et al., 2004; Skouroumounis & Sefton, 2000; Williams et al., 1982). Los precursores de los tioles varietales, 3-mercaptohexanol (MH) y 4-mercapto-4-metil-pentanona (MP), relacionados con cisteína, glutatión, cisteína-glicina y γ -glutamil-cisteína (mencionados anteriormente), son liberados solo en una pequeña proporción durante la fermentación por acción de la enzima carbono-azufre β -liasa. El destino de la fracción de precursores remanentes al final de la fermentación alcohólica se desconoce, aunque se ha sugerido que podrían contribuir al envejecimiento del vino (Bonnaffoux et al., 2018)(Bonnaffoux et al., 2018) y los resultados obtenidos en el capítulo 1 han mostrado que la hidrólisis espontánea a la temperatura normal de almacenamiento del vino es una reacción excesivamente lenta.

La hidrólisis enzimática implica la ruptura del enlace glicosídico y no induce ninguna transformación adicional en la estructura química de la aglicona liberada (Sefton, 1998). Por esta razón, generalmente se prefiere la hidrólisis enzimática para la caracterización de compuestos volátiles naturalmente presentes en forma glicosídica.

En cambio, la hidrólisis ácida, implica la ruptura del enlace entre el azúcar y la aglicona, resultando en un carbocatión reactivo que puede producir una amplia variedad de productos (Sefton, 1998; Skouroumounis & Sefton, 2000). Por lo tanto, aunque la hidrólisis ácida no es útil para el análisis directo de la composición volátil de la fracción precursora (Williams et al., 1982), sí constituye una vía importante para la formación del aroma varietal del vino, especialmente durante el envejecimiento.

Para variedades neutras como Garnacha y Tempranillo, es esencial utilizar la hidrólisis ácida para obtener una representación válida del aroma potencial de la uva. En un estudio realizado por Loscos et al. (Loscos et al., 2009), se determinó que la hidrólisis ácida puede considerarse más adecuada para medir el potencial aromático de las uvas, lo que sugiere que las transformaciones que tienen lugar durante la fermentación incluyen reordenamientos moleculares en medios ácidos que se predicen mejor mediante hidrólisis ácida.

La hidrólisis acelerada en vino reconstituido con fracciones fenólicas y aromáticas extraídas de la uva ha sido propuesta y utilizada recientemente para evaluar el potencial aromático de muestras de estas variedades, aparentemente con resultados satisfactorios (Alegre, Sáenz-Navajas, et al., 2020). Sin embargo, aunque previamente se comparó una hidrólisis suave a 45°C (Alegre, Arias-Pérez, et al., 2020) con otra a 75°C, la comparación se basó en un número bastante limitado de muestras y no incluyó todos los analitos relevantes.

Dado los resultados prometedores obtenidos a partir del procedimiento de hidrólisis ácida en anoxia sobre las Fracciones Fenólicas Aromáticas (FFAs), y una vez estudiadas las cinéticas de formación de los principales aromas a partir de sus precursores en el capítulo 1 de esta tesis, el presente trabajo continuará explorando el efecto que tienen específicamente dos condiciones de hidrólisis ácida en anoxia en vinos modelos reconstituidos con FFAs.

Se estudiarán dos condiciones de hidrólisis ácida (lenta: a 50°C durante 5 semanas y acelerada: durante 24 horas a 75°C) en extractos de uvas de dos variedades Garnacha y Tempranillo, y se cuantificarán las moléculas de aroma generadas, con el objetivo de evaluar la capacidad de la hidrólisis acelerada para evaluar el potencial de aroma de la uva.

2. Materiales y métodos

2.1 Muestras de uvas

El estudio se realizó con un total de 12 muestras de uvas (6 de la variedad Garnacha (G) y 6 de Tempranillo (T)) obtenidas en estado de maduración. Específicamente, las muestras G1, G4, T3, T4, T5 y T6 fueron recolectadas de diferentes viñedos de Bodegas Ramón Bilbao. Las muestras G2, G3 y T1 se obtuvieron de Bodegas y Viñedos Ilurce. Estas últimas bodegas son de la D.O. Ca. La Rioja. Las muestras G5 y G6 provenían de Viñas del Vero de la D.O. Somontano, y la muestra T2 se obtuvo de Dominio Pingus de la D.O. Ribera del Duero.

2.2 Preparación de mistelas y sus respectivas Fracciones Fenólicas y Aromáticas (FFAs)

A partir de un kg de cada una de estas muestras se prepararon mistelas y de cada una se extrajo la FFA siguiendo los procedimientos descritos por Alegre et al. (Alegre, Arias-Pérez, et al., 2020) y que aparecen detallados en el apartado 2.2.1 y 2.2.2 del capítulo 1, respectivamente.

2.3. Hidrólisis ácida en anoxia

Para la reconstitución de las FFAs y el envasado en condiciones de anoxia para el proceso de la hidrólisis ácida, se siguió el procedimiento descrito en el apartado 2.3 del capítulo 1. Se evaluó la hidrólisis ácida en anoxia de cada una de las 12 muestras por duplicado en dos condiciones: a 50°C durante 5 semanas (hidrólisis lenta) y a 75°C durante 24 horas (hidrólisis acelerada).

2.4. Cuantificación del aroma liberado por hidrólisis ácida

Los compuestos aromáticos liberados por la hidrólisis ácida en ambas condiciones se analizaron mediante tres métodos analíticos. Un método para la evaluación de compuestos aromáticos minoritarios y trazas en el vino (sección 2.3.1 del capítulo 1), otro para mercaptanos polifuncionales (sección 2.3.2 del capítulo 1) y un tercero para el análisis de los aldehídos de Strecker.

Cuantificación de los aldehídos de Strecker

Los aldehídos de Strecker fueron analizados siguiendo el método optimizado y validado por Castejón-Musulén et al. (Castejón-Musulén et al., 2022), mediante su derivatización a oximas en condiciones de anoxia con O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina (PBHA), seguido de una extracción en fase sólida y el análisis por GC-MS. El procedimiento completo se describe a continuación.

Para el análisis de estos compuestos, las muestras se introdujeron en la cámara de anoxia. En viales de 20 mL roscados, se añadieron 12 mL de las muestras hidrolizadas y 50 μ L de la disolución de estándares internos 2-metilpentanal, 3-metilpentanal, metional- d_3 y fenil- d_5 -acetaldehído, 200 μ g/L cada uno). Los viales cerrados se sacaron de la cámara de anoxia y se incubaron a 50°C durante 6h para asegurar el equilibrio. Después, se añadieron 360 μ L de una solución de 10 g/L de O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina (PFBHA) y se dejó reaccionar a 35°C durante 12 h. Posteriormente, se realizó una extracción en fase sólida (SPE). Cartuchos de 1 mL, empacados con 30 mg de resinas LiChrolut-EN se acondicionaron con 2 mL de diclorometano, seguido de 2mL de metanol y final ente 2 mL de una disolución hidroalcohólica al 12 %. Se cargan 10 mL de la muestra derivatizada y una vez pasados se realiza un lavado con 10 mL de una disolución de agua:metanol al 60% (v/v), con un 1% de NaHCO₃. Se secaron los cartuchos a vacío y se eluyeron finalmente con 1,2 mL de hexano. Los cartuchos se lavaron con 10 mL de una solución que contenía 60% (v/v) de MeOH y 1% (p/p) de NaHCO₃, luego se secaron y finalmente se eluyeron con 1,2 mL de hexano.

El sistema cromatográfico fue un cromatógrafo de gases QP2010 equipado con un detector de espectrometría de masas de cuadrupolo de Shimadzu. La columna fue una DB-WAXetr (30 m x 0.25 mm i.d., 0.5 μ m de espesor de fase) de Agilent. El gas portador

fue helio a 1 mL/min. El horno cromatográfico se mantuvo a 40°C durante 4 minutos, luego se elevó a 250°C a 10 °C/min y se mantuvo durante 10 minutos. Se utilizó un inyector SPL (split/splitless) a una temperatura de 250°C. El tiempo de análisis cromatográfico fue 35 minutos. Se inyectaron 3 µL en modo splitless, con una presión de pulso de 40 psi durante 1,50 minutos. Las temperaturas de la fuente de iones y la interfaz se fijaron en 220 °C y 230 °C, respectivamente. El analizador de masas se configuró en SIM y la lista completa de relaciones m/z se muestra en la Tabla A3 del Anexo I. Las concentraciones se obtuvieron utilizando factores de respuesta calculados mediante el análisis de vinos de mesa fortificados con cantidades conocidas de analitos.

3. Resultados

3.1. ¿Puede la hidrólisis acelerada a 75°C predecir el potencial aromático de la uva?

En este estudio, vinos modelos que contenían Fracciones Fenólicas Aromáticas (FFAs) extraídos de 12 lotes diferentes de uvas en estado de maduración, 6 de la variedad Garnacha y 6 de la Tempranillo, fueron sometidos a hidrólisis en completa anoxia a 75°C durante 24 horas (hidrólisis acelerada) y a 50°C durante 5 semanas (hidrólisis lenta). Se determinaron 25 compuestos volátiles de importancia en el aroma del vino mediante el empleo de tres procedimientos analíticos diferentes y los resultados se resumen en las Tablas 2.1 y 2.2.

3.1.1 Diferencias varietales y de hidrólisis. Análisis de componentes principales (PCA)

La figura 2.1 resume los resultados del PCA de los compuestos volátiles cuantificados en este experimento. En el plano formado por los dos primeros componentes principales, que acumulan el 62 % de la varianza, las muestras se distribuyen principalmente por variedad de uva, con las muestras de Garnacha a la derecha y las muestras de Tempranillo, excepto T5, a la izquierda.

Como se puede observar, las muestras de Garnacha se caracterizaron por mayores cantidades de TDN, masoia lactona, vinilfenoles, aldehídos de Strecker y terpenoles, mientras que las de Tempranillo contenían cantidades más altas de fenoles.

Los resultados sobre los mercaptanos polifuncionales confirmaron que el 3-mercaptohexanol (MH) es un constituyente normal de los hidrolizados a 50 y 75°C, como previamente se había visto en el capítulo 1, donde a 35°C apenas se formaba este compuesto. Este se encontró en niveles superiores en los hidrolizados de Garnacha respecto a los de Tempranillo, lo cual concuerda con el papel conocido que este compuesto tiene en los vinos rosados de Garnacha (Ferreira et al., 2002).

También se observó que se encontraron pequeñas cantidades de tres aldehídos de Strecker: 3-metilbutanal, metional y fenilacetaldehído en los hidrolizados. El fenilacetaldehído ha sido detectado previamente en hidrolizados (Alegre, Sáenz-Navajas, et al., 2020; Loscos et al., 2009), lo cual es consistente con nuestros hallazgos, aunque el origen de estas moléculas en este tipo de muestras no está del todo claro. En cualquier caso, excluyendo el metional, los niveles de aldehídos de Strecker fueron significativamente más altos en los hidrolizados de Garnacha, lo que confirma resultados recientes sobre la mayor tendencia de esta variedad a acumular aldehídos de Strecker (Bueno-Aventín et al., 2021).

Por otro lado, el gráfico PCA muestra que el tipo de hidrólisis dominó el segundo componente, con las muestras obtenidas mediante la hidrólisis lenta a 50°C en la parte superior del gráfico y aquellas obtenidas a 75°C en la parte inferior. Como se puede observar, las condiciones utilizadas en el ensayo a 75°C resultaron en niveles más altos esencialmente de metional, fenilacetaldehído, geraniol y linalol, mientras que las condiciones utilizadas a 50°C produjeron niveles más altos de guaiacol, siringol, vitispirano y TDN.

Estos resultados están respaldados por el estudio ANOVA para evaluar los efectos de la hidrólisis y de la variedad de uva mostrados en la Tabla 2.3. El factor de hidrólisis solo fue significativo para 12 de los 25 compuestos determinados, mientras que la variedad fue significativa en todos los casos excepto el metional. Lo más notable es que la distribución de muestras que difieren únicamente en el tipo de hidrólisis es básicamente similar en todos los casos, como se puede ver en el gráfico. Por ejemplo, las muestras equivalentes de Tempranillo (codificadas con T) tienen aproximadamente las mismas coordenadas en el PC1, siendo la diferencia que las muestras hidrolizadas a 75°C tienen *scores* en PC2, de 2 a 3 unidades más pequeñas que aquellas hidrolizadas a 50°C. De manera similar, todas las muestras equivalentes de Garnacha (codificadas con G)

Tabla 2.1 Concentraciones promedio y desviaciones estándar (n=2) de los compuestos aromáticos (expresados en µg/L) evaluados en dos condiciones diferentes (5 semanas a 50°C y 24 horas a 75°C) en los 6 FFAs de Garnacha.

Compuestos	G1		G2		G3		G4		G5		G6	
	50°C	75°C	50°C	75°C	50°C	75°C	50°C	75°C	50°C	75°C	50°C	75°C
3-mercaptohexanol	5.59 ± 0.16	6.00 ± 0.08	3.29 ± 0.06	2.32 ± 0.14	5.11 ± 0.08	5.21 ± 0.02	18.2 ± 0.3	16.8 ± 1.2	19.6 ± 0.6	20.1 ± 0.2	17.1 ± 0.3	17.1 ± 1.9
isobutanal	1.76 ± 0.02	1.31 ± 0.02	2.09 ± 0.03	1.89 ± 0.19	1.16 ± 0.06	1.30 ± 0.03	1.81 ± 0.18	2.16 ± 0.07	2.56 ± 0.07	2.91 ± 0.15	1.95 ± 0.13	2.21 ± 0.10
2-metilbutanal	2.63 ± 0.16	2.86 ± 0.14	3.58 ± 0.08	3.19 ± 0.24	3.11 ± 0.15	2.80 ± 0.16	3.60 ± 0.20	4.08 ± 0.25	3.72 ± 0.03	3.68 ± 0.09	3.21 ± 0.19	3.47 ± 0.21
isovaleraldehído	2.16 ± 0.08	2.55 ± 0.01	1.93 ± 0.07	2.44 ± 0.05	1.72 ± 0.06	2.27 ± 0.02	2.82 ± 0.10	4.37 ± 0.17	4.21 ± 0.04	5.28 ± 0.01	1.97 ± 0.05	2.68 ± 0.03
metional	1.34 ± 0.04	2.11 ± 0.11	1.49 ± 0.05	2.30 ± 0.12	no detectado	1.72 ± 0.06	0.961 ± 0.042	1.76 ± 0.07	1.01 ± 0.05	1.82 ± 0.01	0.66 ± 0.03	1.59 ± 0.03
fenilacetaldéhído	5.98 ± 0.29	6.65 ± 0.22	5.28 ± 0.03	9.98 ± 0.04	1.65 ± 0.04	2.80 ± 0.11	2.63 ± 0.06	7.40 ± 0.30	1.60 ± 0.04	4.46 ± 0.05	1.26 ± 0.07	3.61 ± 0.05
γ-nonalactona	0.894 ± 0.012	0.782 ± 0.008	0.960 ± 0.019	0.923 ± 0.016	0.583 ± 0.037	0.527 ± 0.012	1.02 ± 0.02	0.887 ± 0.009	1.37 ± 0.06	0.890 ± 0.002	1.28 ± 0.18	1.20 ± 0.02
masoia lactona	3.10 ± 0.11	1.92 ± 0.02	2.62 ± 0.09	1.89 ± 0.02	6.22 ± 0.29	6.08 ± 0.15	8.91 ± 0.14	8.05 ± 0.01	4.67 ± 0.08	4.35 ± 0.09	51.6 ± 0.1	60.6 ± 2.5
β-damascenona	3.21 ± 0.09	2.75 ± 0.01	5.15 ± 0.06	5.33 ± 0.18	9.95 ± 0.65	9.76 ± 0.41	3.86 ± 0.01	3.40 ± 0.01	3.46 ± 0.11	2.83 ± 0.1	10.0 ± 0.12	13.2 ± 0.1
Riesling acetal	7.86 ± 0.25	4.92 ± 0.04	26.8 ± 1.0	18.4 ± 0.1	20.7 ± 0.7	11.2 ± 0.3	20.8 ± 0.4	13.8 ± 0.2	34.5 ± 0.8	24.0 ± 0.4	20.2 ± 0.7	14.7 ± 0.3
TDN	19.2 ± 0.9	8.70 ± 0.34	75.2 ± 2.4	42.6 ± 1.8	152 ± 18	44.6 ± 0.5	125 ± 2	69.6 ± 1.8	219 ± 4	151 ± 3	139 ± 1	81.3 ± 9.6
vitispiranos	36.3 ± 1.1	23.2 ± 0.3	89.8 ± 3.2	65.7 ± 1.5	83.7 ± 7.0	42.2 ± 0.1	80.7 ± 2.7	58.7 ± 1	120 ± 1	100 ± 1	83.1 ± 1.2	65.4 ± 4.1
α-terpineol	15.2 ± 0.1	16.4 ± 0.2	16.0 ± 0.2	16.6 ± 0.1	8.45 ± 0.25	7.25 ± 0.13	17.0 ± 0.3	18.8 ± 0.3	17.4 ± 0.2	21.3 ± 0.1	17.5 ± 0.1	20.6 ± 0.4
geraniol	0.573 ± 0.012	2.27 ± 0.02	0.757 ± 0.024	2.67 ± 0.10	0.351 ± 0.013	1.26 ± 0.01	0.653 ± 0.021	2.56 ± 0.03	0.509 ± 0.027	1.94 ± 0.03	0.466 ± 0.032	2.40 ± 0.03
linalool	1.60 ± 0.01	5.43 ± 0.10	2.21 ± 0.01	5.95 ± 0.08	2.22 ± 0.03	4.56 ± 0.07	3.18 ± 0.06	7.26 ± 0.02	2.36 ± 0.01	5.51 ± 0.02	2.48 ± 0.08	6.90 ± 0.10
óxido de linalool	5.11 ± 0.08	3.12 ± 0.09	4.81 ± 0.21	3.97 ± 0.05	10.9 ± 0.4	6.22 ± 0.27	15.8 ± 0.4	11.1 ± 0.2	16.9 ± 0.2	12.8 ± 0.1	22.2 ± 0.1	17.1 ± 0.2
acetovainillona	17.9 ± 0.5	15.7 ± 0.3	16.8 ± 0.2	15.1 ± 0.2	31.6 ± 0.9	30.8 ± 0.9	21.0 ± 0.5	19.4 ± 0.2	36 ± 1	35.8 ± 0.6	31.5 ± 0.7	31.2 ± 0.2
vainillina	53.2 ± 0.7	46.8 ± 0.3	46.6 ± 0.5	41.8 ± 0.5	71.3 ± 0.8	71.8 ± 0.6	81.4 ± 0.6	79.6 ± 1.6	77.4 ± 7.0	86.1 ± 3.4	108 ± 1	104 ± 1
4-vinilguaiaacol	10.2 ± 0.2	31.5 ± 0.3	9.24 ± 1.07	70.6 ± 1.6	79.8 ± 2.1	78.2 ± 2	21.3 ± 1.1	31.6 ± 3.6	50.9 ± 5.5	114 ± 1	27.7 ± 0.5	46.0 ± 1.6
4-vinilfenol	26.1 ± 3.6	93.2 ± 1.8	31.6 ± 3.2	238 ± 4	182 ± 1	235 ± 2	71.4 ± 2.7	113 ± 9	122 ± 16	297 ± 10	89.9 ± 5.6	171 ± 12
guaiaacol	8.34 ± 0.18	3.41 ± 0.04	5.49 ± 0.06	3.48 ± 0.05	6.95 ± 0.37	3.24 ± 0.02	7.41 ± 0.31	3.84 ± 0.11	9.10 ± 0.09	5.84 ± 0.02	15.3 ± 0.2	9.03 ± 0.03
metoxiugenol	1.45 ± 0.03	0.731 ± 0.031	1.16 ± 0.01	0.767 ± 0.03	1.49 ± 0.04	0.977 ± 0.045	1.11 ± 0.04	0.861 ± 0.007	2.00 ± 0.06	1.61 ± 0.04	2.03 ± 0.02	1.80 ± 0.002
siringol	112 ± 2	68.6 ± 0.1	83.1 ± 0.9	60.8 ± 2.2	124 ± 3	58.3 ± 0.6	110 ± 6	53.5 ± 0.4	88.2 ± 0.3	61.1 ± 0.6	129 ± 2	77.8 ± 0.1
eugenol	0.150 ± 0.005	0.145 ± 0.006	0.185 ± 0.004	0.173 ± 0.007	0.461 ± 0.022	0.456 ± 0.03	0.157 ± 0.008	0.162 ± 0.005	0.163 ± 0.005	0.203 ± 0.007	0.139 ± 0.007	0.151 ± 0.002
cinamato de etilo	0.279 ± 0.013	0.182 ± 0.003	0.236 ± 0.011	0.198 ± 0.015	0.097 ± 0.004	0.0649 ± 0.0021	0.155 ± 0.006	0.104 ± 0.002	0.254 ± 0.014	0.189 ± 0.003	0.252 ± 0.008	0.281 ± 0.009

Tabla 2.2. Concentraciones promedio y desviaciones estándar (n=2) de los compuestos aromáticos (expresados en µg/L) evaluados en dos condiciones diferentes (5 semanas a 50°C y 24 horas a 75°C) en las 6 FFAs de Tempranillo.

Compuestos	T1		T2		T3		T4		T5		T6	
	50°C	75°C	50°C	75°C	50°C	75°C	50°C	75°C	50°C	75°C	50°C	75°C
3-mercaptohexanol	1.17 ± 0.16	0.816 ± 0.018	2.44 ± 0.11	2.01 ± 0.04	1.07 ± 0.01	2.14 ± 0.04	1.03 ± 0.13	1.18 ± 0.03	4.59 ± 0.08	7.28 ± 0.15	3.87 ± 0.29	3.53 ± 0.02
isobutanal	0.815 ± 0.044	0.61 ± 0.01	1.09 ± 0.13	0.854 ± 0.031	1.15 ± 0.04	0.882 ± 0.016	1.73 ± 0.18	1.37 ± 0.05	2.10 ± 0.11	1.65 ± 0.08	1.95 ± 0.15	1.42 ± 0.06
2-metilbutanal	2.19 ± 0.09	1.42 ± 0.03	2.75 ± 0.15	1.59 ± 0.07	2.79 ± 0.03	1.78 ± 0.09	3.40 ± 0.10	2.21 ± 0.03	3.44 ± 0.26	2.77 ± 0.06	3.62 ± 0.23	2.24 ± 0.17
isovaleraldehído	0.541 ± 0.026	0.773 ± 0.047	0.753 ± 0.022	0.958 ± 0.02	0.932 ± 0.002	1.45 ± 0.02	1.11 ± 0.04	2.35 ± 0.05	2.73 ± 0.08	3.29 ± 0.01	1.38 ± 0.06	1.72 ± 0.10
metional	1.44 ± 0.05	1.56 ± 0.01	1.18 ± 0.02	1.48 ± 0.07	1.24 ± 0.06	1.52 ± 0.05	1.60 ± 0.02	1.38 ± 0.07	1.44 ± 0.06	1.66 ± 0.06	1.10 ± 0.04	1.48 ± 0.06
fenilacetaldéhid	no detectado	1.76 ± 0.07	no detectado	1.78 ± 0.04	no detectado	2.23 ± 0.01	no detectado	2.21 ± 0.01	1.65 ± 0.03	4.15 ± 0.02	no detectado	1.78 ± 0.01
γ-nonalactona	0.507 ± 0.005	0.438 ± 0.029	0.676 ± 0.021	0.614 ± 0.042	0.535 ± 0.057	0.526 ± 0.001	0.732 ± 0.076	0.729 ± 0.019	0.744 ± 0.047	0.708 ± 0.007	1.76 ± 0.06	1.57 ± 0.06
masoia lactona	3.51 ± 0.02	3.03 ± 0.01	3.27 ± 0.05	2.63 ± 0.19	3.75 ± 0.09	3.04 ± 0.02	4.28 ± 0.10	3.29 ± 0.01	3.13 ± 0.04	2.22 ± 0.06	13.3 ± 0.2	9.76 ± 0.34
β-damascenona	9.09 ± 0.15	10.7 ± 0.5	10.1 ± 0.1	12.3 ± 0.5	5.09 ± 0.33	6.14 ± 0.04	5.23 ± 0.12	5.3 ± 0.2	7.82 ± 0.11	8.81 ± 0.09	6.99 ± 0.07	6.09 ± 0.21
Riesling acetal	5.80 ± 0.06	3.29 ± 0.04	9.10 ± 0.16	6.71 ± 0.24	7.74 ± 0.33	6.65 ± 0.04	8.81 ± 0.13	4.31 ± 0.19	27.6 ± 0.4	20.0 ± 0.7	11.5 ± 0.2	5.40 ± 0.65
TDN	18.3 ± 2.1	7.31 ± 0.40	18.0 ± 0.3	12.3 ± 1.0	14.7 ± 0.5	14.7 ± 0.3	19.8 ± 0.3	4.08 ± 0.27	85.3 ± 2.1	49.8 ± 0.4	26.2 ± 0.6	7.71 ± 0.63
vitispiranos	41.3 ± 2.8	24.6 ± 0.3	54.7 ± 0.9	45.4 ± 4.5	40.2 ± 2.4	43.6 ± 0.2	45.9 ± 1.8	19.6 ± 0.3	100 ± 2	89.5 ± 0.4	63.2 ± 0.2	31.0 ± 2.5
α-terpineol	2.99 ± 0.01	2.40 ± 0.05	3.49 ± 0.07	3.42 ± 0.33	4.00 ± 0.07	4.87 ± 0.06	4.11 ± 0.07	3.31 ± 0.08	20.9 ± 0.1	23.2 ± 0.5	3.77 ± 0.04	2.49 ± 0.14
geraniol	no detectado	0.429 ± 0.016	no detectado	0.452 ± 0.009	no detectado	0.44 ± 0.01	no detectado	0.444 ± 0.01	0.580 ± 0.072	2.14 ± 0.03	no detectado	0.431 ± 0.018
linalool	0.434 ± 0.012	1.24 ± 0.02	0.565 ± 0.029	1.39 ± 0.09	0.589 ± 0.006	1.22 ± 0.02	0.692 ± 0.011	1.36 ± 0.06	1.85 ± 0.16	5.38 ± 0.04	0.670 ± 0.032	1.48 ± 0.05
óxido de linalool	2.57 ± 0.05	1.20 ± 0.02	2.05 ± 0.03	1.44 ± 0.12	2.23 ± 0.11	2.03 ± 0.01	2.61 ± 0.08	1.05 ± 0.04	5.58 ± 0.01	4.12 ± 0.09	3.21 ± 0.04	1.29 ± 0.09
acetovainillona	17.1 ± 0.2	15.6 ± 0.1	26.1 ± 0.2	24.7 ± 0.1	14.2 ± 0.1	13.2 ± 0.1	18.0 ± 0.2	16.5 ± 0.7	56.0 ± 0.6	52.1 ± 0.6	23.1 ± 0.1	21.2 ± 0.4
vainillina	84.5 ± 0.6	87.3 ± 0.4	78.9 ± 2.0	77.5 ± 2.8	99.5 ± 8.2	118 ± 1	139 ± 3	152 ± 1	208 ± 2	205 ± 8	135 ± 5	151 ± 4
4-vinilguaiaacol	7.01 ± 0.19	1.84 ± 0.10	3.25 ± 0.15	2.08 ± 0.1	8.28 ± 0.96	1.62 ± 0.06	4.11 ± 0.10	1.9 ± 0.2	38.4 ± 4.7	5.90 ± 0.13	5.65 ± 0.08	2.40 ± 0.29
4-vinilfenol	92.9 ± 4.8	7.52 ± 0.33	30.2 ± 3.5	7.51 ± 0.4	69.0 ± 6.7	9.04 ± 0.97	34.7 ± 0.8	8.84 ± 0.34	81.4 ± 4.0	18.6 ± 0.1	39.5 ± 1.6	9.07 ± 1.27
guaiaacol	9.28 ± 0.02	4.91 ± 0.02	11.1 ± 0.1	7.97 ± 0.17	8.57 ± 0.51	6.52 ± 0.01	13.5 ± 0.3	7.90 ± 0.25	11.1 ± 0.4	6.93 ± 0.22	13.0 ± 0.3	6.63 ± 0.09
metoxiugenol	4.57 ± 0.10	2.69 ± 0.12	9.22 ± 0.93	7.20 ± 0.29	3.92 ± 0.03	3.41 ± 0.05	4.97 ± 0.1	2.64 ± 0.01	3.18 ± 0.05	2.18 ± 0.03	7.86 ± 0.02	4.37 ± 0.14
siringol	205 ± 3	111 ± 1	177 ± 1	124 ± 2	168 ± 5	125 ± 1	212 ± 1	126 ± 3	111 ± 4	67.7 ± 1.1	160 ± 1.0	80.8 ± 0.9
eugenol	0.44 ± 0.01	0.395 ± 0.015	1.08 ± 0.03	1.07 ± 0.04	0.591 ± 0.036	0.613 ± 0.005	0.590 ± 0.023	0.487 ± 0.006	0.214 ± 0.006	0.204 ± 0.012	0.621 ± 0.002	0.511 ± 0.029

Capítulo 2

cinamato de etilo	0.147 ± 0.008	0.0321 ± 0.0017	0.156 ± 0.010	0.107 ± 0.006	0.117 ± 0.003	0.0356 ± 0.0004	0.173 ± 0.008	0.11 ± 0.01	0.257 ± 0.013	0.145 ± 0.007	0.175 ± 0.005	0.105 ± 0.005
--------------------------	---------------	-----------------	---------------	---------------	---------------	-----------------	---------------	-------------	---------------	---------------	---------------	---------------

Tabla 2.3 P-valores del estudio de ANOVA de dos factores (Variedad y Tipo de hidrólisis) para los compuestos volátiles estudiados.

Compuestos	p-valores		
	Variedad	Hidrólisis	Variedad*Hidrólisis
3-mercaptohexanol	<0.0001	0.932	0.827
isobutanal	<0.0001	0.350	0.145
2-metilbutanal	<0.0001	0.001	0.001
isovaleraldehído	<0.0001	0.021	0.608
metional	0.754	<0.0001	<0.0001
fenilacetaldehído	<0.0001	<0,0001	0.474
γ -nonalactona	0.140	0.294	0.658
masoia lactona	0.042	0.977	0.795
β -damascenona	0.057	0.537	0.746
Riesling acetal	0.001	0.008	0.425
TDN	<0.0001	0.007	0.106
vitispiranos	0.004	0.008	0.581
α -terpineol	<0.0001	0.632	0.664
geraniol	<0.0001	<0,0001	0.001
linalool	<0.0001	<0,0001	0.001
óxido de linalool	<0.0001	0.063	0.346
acetovainillona	0.900	0.657	0.914
vainillina	<0.0001	0.771	0.671
4-vinilguaiacol	<0.0001	0.103	0.004
4-vinilfenol	<0.0001	0.052	<0.0001
guaiacol	0.002	<0.0001	0.802
metoxieugenol	<0.0001	0.010	0.094
siringol	<0.0001	<0.0001	0.105
eugenol	<0.0001	0.768	0.697
cinamato de etilo	0.001	0.001	0.252

3.1.2. Correlación entre la hidrólisis acelerada y lenta

En términos generales, se observaron correlaciones muy buenas y significativas entre ambos tipos de hidrólisis ácida, con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,9 en 13 compuestos, y superiores a 0,7 en los otros 8 casos, como se puede observar en la Tabla 2.4.

Entre los terpenoides, las mejores correlaciones se encontraron para el α -terpineol ($R^2 = 0,9849$) y el óxido de linalool ($R^2 = 0,9814$), ambos productos finales de la degradación de terpenoles. Esto era esperado ya que, en ambos tipos de hidrólisis, el tiempo de hidrólisis, fue mucho más largo que el tiempo en el cual se observan los niveles máximos de los dos terpenos más relevantes, linalool y geraniol, según lo descrito en el capítulo 1 de esta tesis. A pesar de esto, la correlación para el geraniol fue alta ($R^2 = 0,96$), confirmando los efectos que tiene la temperatura en su evolución y que fueron observados anteriormente en el capítulo 1 (figura 1.4). Los niveles de α -terpineol fueron notablemente más altos a 75°C , lo que concuerda con una mayor degradación de linalool y otros monoterpenoles no cuantificados (Maicas & Mateo, 2005).

Es especialmente notable que al correlacionar la concentración de α -terpineol producida a 75°C con la suma del α -terpineol liberado a 50°C más la diferencia de concentraciones de linalool a ambas temperaturas, la pendiente de la curva de correlación obtenida fue de 1, lo que respalda que el linalool se transformó principalmente en α -terpineol.

En cuanto a los norisoprenoides, los datos confirmaron que la β -damascenona y el Riesling acetal estaban bien correlacionados, mientras que el TDN y los vitispiranos estaban menos correlacionados que el resto de esta familia. Estos resultados simplemente confirmaron que el tiempo de hidrólisis elegido a 75°C (24 h) fue demasiado corto para obtener un buen desarrollo de estos compuestos.

Algunos fenoles volátiles, como el eugenol y el metoxieugenol, también podrían predecirse satisfactoriamente mediante un procedimiento de hidrólisis acelerada. Sin embargo, el guaiacol solo podría predecirse pobremente, seguramente también debido a que el tiempo de hidrólisis a 75°C fue demasiado corto para este compuesto. Finalmente, como se esperaba, dada su compleja evolución observada en el estudio del capítulo 1, los niveles de 4-vinilfenol y 4-vinilguaiacol no podrían predecirse satisfactoriamente a partir de datos a 75°C . En contraste, los derivados de la vainillina, excepto el syringol, podrían predecirse de manera más adecuada, como se muestra en la Tabla 2.4.

La masoia lactona y la γ -nonalactona fueron bien predichas por la hidrólisis a 75°C ; sin embargo, su rango de variación fue muy corto, excepto una muestra (G6) con niveles mucho más altos de ambas lactonas, especialmente de la masoia lactona, lo que podría sugerir que las uvas de esta muestra habrían sufrido deshidratación (Pons et al., 2017).

En el caso de los aldehídos, los niveles encontrados a 50°C fueron en algunos casos demasiado bajos para ser cuantificados de manera confiable, lo que explica por qué solo el isovaleraldehído, el isobutanal y el fenilacetaldehído mostraron correlaciones significativas, mientras que el metional y el 2-metilbutanal no estaban correlacionados.

Finalmente, entre los mercaptanos polifuncionales, el potente odorante 3-mercaptohexanol se produjo en cantidades similares bajo ambas condiciones de hidrólisis, confirmando su producción a partir de FFAs en una hidrólisis suave, como se ha descrito previamente en estudios olfatométricos llevados a cabo por Alegre et. al (Alegre, Sáenz-Navajas, et al., 2020). Los niveles de MH liberados después de 5 semanas a 50°C aparecieron bien correlacionados con los obtenidos mediante hidrólisis acelerada después de 24h a 75°C, lo que confirma la validez del ensayo para predecir la liberación de este importante odorante a partir de FFAs.

Tabla 2.4. Correlaciones entre los contenidos de compuestos volátiles para cada FFA en hidrólisis lenta (50°C durante 5 semanas) e hidrólisis acelerada (75°C durante 24 horas), se muestra la pendiente, el coeficiente de correlación (R^2) y la significatividad.

Compuestos	Pendiente	R^2	p-valor
3-mercaptohexanol	1.0026	0.9779	<0.0001
isobutanal	0.6863	0.7682	0.0002
2-metilbutanal	0.3854	0.4578	0.0157
isovaleraldehído	0.7629	0.9279	<0.0001
metional	0.0971	0.0036	0.8533
fenilacetaldehído	0.6916	0.7940	0.0001
γ -nonalactona	1.1394	0.8986	<0.0001
masoia lactona	0.8314	0.9928	<0.0001
β -damascenona	0.7081	0.9358	<0.0001
Riesling acetal	1.3425	0.9616	<0.0001
TDN	1.4791	0.8772	<0.0001
vitispiranos	0.9366	0.8175	0.0001
α -terpineol	0.8232	0.9849	<0.0001
geraniol	0.3083	0.9626	<0.0001
linalool	0.3730	0.9208	<0.0001
óxido de linalool	1.2766	0.9814	<0.0001
acetovainillona	1.0218	0.9938	<0.0001
vainillina	0.9246	0.9695	<0.0001
4-vinilguaiacol	0.4219	0.4592	0.0155
4-vinilfenol	0.2184	0.2664	0.0858
guaiacol	1.2939	0.7942	0.0001
metoxieugenol	1.3627	0.9127	<0.0001
siringol	1.3594	0.7928	0.0001
eugenol	1.0366	0.9755	<0.0001
cinamato de etilo	0.7049	0.7122	0.0006

4. Conclusiones

Se analizó la composición volátil de hidrolizados obtenidos de FFAs extraídas de 12 lotes de uvas Tempranillo y Garnacha. Los hidrolizados de ambas variedades presentaron cantidades significativas de 3-mercaptohexanol incluso en condiciones de hidrólisis lenta, lo que confirmó que este compuesto es un constituyente normal de hidrolizados en estas condiciones de temperatura.

Los hidrolizados de Garnacha y Tempranillo mostraron distintas composiciones, pudiendo observarse una diferenciación varietal con ambos tipos de hidrólisis. Las muestras de Garnacha exhibieron niveles superiores de 3-mercaptohexanol, TDN, masoia lactona, vinilfenoles, aldehídos de Strecker y terpenoles, mientras que las de Tempranillo presentaron cantidades superiores de fenoles. La presencia predominante del 3-mercaptohexanol en los hidrolizados de Garnacha, confirmó su papel conocido en vinos rosados de esta variedad. También, los aldehídos de Strecker, como el fenilacetaldehído, fueron superiores los hidrolizados de Garnacha, corroborando la tendencia de esta variedad a acumular dichos aldehídos.

Los datos de correlación entre la hidrólisis lenta y la acelerada mostraron que, en general, existe una buena correlación entre ambos tipos de hidrólisis, con coeficientes de determinación mayores de 0,9 en 13 compuestos, incluyendo 3-mercaptohexanol, masoia lactona, β -damascenona, Riesling acetal, derivados de vainillina y algunos fenoles. En los casos de 4-vinilguaiacol y 4-vinilfenol, debido a su compleja evolución, la capacidad predictiva de la hidrólisis acelerada es más limitada.

La hidrólisis acelerada a 75°C representa un buen compromiso para obtener una representación satisfactoria del potencial aromático de la uva en un corto período de tiempo. Aunque algunos compuestos como el guaiacol, podrían ser más difíciles de predecir a 75°C y los compuestos lábiles, como el linalool y el geraniol, se predicen mejor a esta temperatura.

En resumen, estos hallazgos sugieren que la hidrólisis acelerada puede ser un método válido para predecir la liberación de compuestos clave en muestras de vino.

5. Referencias

- Abbott, N. A., Coombe, B. G., & Williams, P. J. (1991). The Contribution of Hydrolyzed Flavor Precursors to Quality Differences in Shiraz Juice and Wines: An Investigation by Sensory Descriptive Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(3), 167-174. <https://doi.org/10.5344/ajev.1991.42.3.167>
- Alegre, Y., Arias-Pérez, I., Hernández-Orte, P., & Ferreira, V. (2020). Development of a new strategy for studying the aroma potential of winemaking grapes through the accelerated hydrolysis of phenolic and aromatic fractions (PAFs). *Food Research International*, 127, 108728. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108728>
- Alegre, Y., Sáenz-Navajas, M. P., Hernández-Orte, P., & Ferreira, V. (2020). Sensory, olfactometric and chemical characterization of the aroma potential of Garnacha and Tempranillo winemaking grapes. *Food Chemistry*, 331, 127207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127207>
- Bonnaffoux, H., Delpech, S., Rémond, E., Schneider, R., Roland, A., & Cavelier, F. (2018). Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis. *Food Chemistry*, 268, 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.061>
- Bueno-Aventín, E., Escudero, A., Fernández-Zurbano, P., & Ferreira, V. (2021). Role of Grape-Extractable Polyphenols in the Generation of Strecker Aldehydes and in the Instability of Polyfunctional Mercaptans during Model Wine Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(50), 15290-15300. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05880>
- Cabaroglu, T., Selli, S., Canbas, A., Lepoutre, J. P., & Günata, Z. (2003). Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(5), 581-587. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00179-0)
- Castejón-Musulén, O., Manuel Aragón-Capone, A., Ontañón, I., Peña, C., Ferreira, V., & Bueno, M. (2022). Accurate quantitative determination of the total amounts of Strecker aldehydes contained in wine. Assessment of their presence in table wines. *Food Research International*, 162, Part B, 112125. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112125>
- Concejero, B., Peña-Gallego, A., Fernandez-Zurbano, P., Hernández-Orte, P., & Ferreira, V. (2014). Direct accurate analysis of cysteinylated and glutathionylated precursors of 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone and 3-mercaptohexan-1-ol in must by ultrahigh performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 812, 250-257. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.004>
- Delfini, C., Cocito, C., Bonino, M., Schellino, R., Gaia, P., & Baiocchi, C. (2001). Definitive Evidence for the Actual Contribution of Yeast in the Transformation of Neutral Precursors of Grape Aromas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5397-

5408. <https://doi.org/10.1021/jf010613a>

Denat, M., Pérez, D., Heras, J. M., Querol, A., & Ferreira, V. (2021). The effects of *Saccharomyces cerevisiae* strains carrying alcoholic fermentation on the fermentative and varietal aroma profiles of young and aged Tempranillo wines. *Food Chemistry: X*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100116>

D'Incecco, N., Bartowsky, E., Kassara, S., Lante, A., Spettoli, P., & Henschke, P. (2004). Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiology*, 21(3), 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.09.003>

Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R., & Cacho, J. (2002). Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 4048-4054. <https://doi.org/10.1021/jf0115645>

Francis, I. L., Sefton, M. A., & Williams, P. J. (1992). Sensory descriptive analysis of the aroma of hydrolysed precursor fractions from semillon, chardonnay and sauvignon blanc grape juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59(4), 511-520. <https://doi.org/AlegreAlegre>

Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., & Cordonnier, R. E. (1985). The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *Journal of Chromatography A*, 331, 83-90. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(85\)80009-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(85)80009-1)

Günata, Y. Z., Bayonove, C. L., Tapiero, C., & Cordonnier, R. E. (1990). Hydrolysis of Grape Monoterpenyl β -D-Glucosides by Various β -Glucosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5), 1232-1236. <https://doi.org/10.1021/jf00095a016>

Ibarz, M. J., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Loscos, N., & Cacho, J. (2006). Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 217-229. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.020>

López, R., Ezpeleta, E., Sánchez, I., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry*, 88(1), 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.025>

Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2009). Comparison of the suitability of different hydrolytic strategies to predict aroma potential of different grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2468-2480.

<https://doi.org/10.1021/jf803256e>

Mateo, J. J., Gentilini, N., Huerta, T., Jiménez, M., & Di Stefano, R. (1997). Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine. *Journal of Chromatography A*, 778(1-2), 219-224. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00566-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00566-9)

Oliveira, I., & Ferreira, V. (2019). Modulating Fermentative, Varietal and Aging Aromas of Wine Using non- *Saccharomyces* Yeasts in a Sequential Inoculation Approach. *Microorganisms*, 7(6), 164. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060164>

Pons, A., Allamy, L., Lavigne, V., Dubourdieu, D., & Darriet, P. (2017). Study of the contribution of massoia lactone to the aroma of Merlot and Cabernet Sauvignon musts and wines. *Food Chemistry*, 232, 229-236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.151>

Sánchez Palomo, E., Díaz-Maroto Hidalgo, M. C., González-Viñas, M. Á., & Pérez-Coello, M. S. (2005). Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases. *Food Chemistry*, 92(4), 627-635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.025>

Sefton, M. A. A. (1998). Hydrolytically-released volatile secondary metabolites from a juice sample of *Vitis vinifera* grape cvs Merlot and Cabernet Sauvignon. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4(1), 30-38. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1998.tb00132.x>

Skouroumounis, G. K., & Sefton, M. A. (2000). Acid-catalyzed hydrolysis of alcohols and their β -D-glucopyranosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2033-2039. <https://doi.org/10.1021/jf9904970>

Strauss, C. R., Dimitriadis, E., Wilson, B., & Williams, P. J. (1986). Studies on the Hydrolysis of Two Megastigma-3,6,9-triols Rationalizing the Origins of Some Volatile C13 Norisoprenoids of *Vitis vinifera* Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(1), 145-149. <https://doi.org/10.1021/jf00067a039>

Williams, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B., & Massy-Westropp, R. A. (1982). Studies on the Hydrolysis of *Vitis vinifera* Monoterpene Precursor Compounds and Model Monoterpene β -d-Glucosides Rationalizing the Monoterpene Composition of Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(6), 1219-1223. <https://doi.org/10.1021/jf00114a054>

Winterhalter, P. (1991). 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) Formation in Wine. 1. Studies on the Hydrolysis of 2,6,10,10-Tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-6-ene-2,8-diol Rationalizing the Origin of TDN and Related C13 Norisoprenoids in Riesling Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(10), 1825-1829. <https://doi.org/10.1021/jf00010a027>

Capítulo 3

Capítulo 3. Evaluación de un procedimiento de fermentación rápida para la preparación de muestra en estudios del aroma varietal producido por hidrólisis ácida de precursores aromáticos

1. Introducción

Estudios recientes basan la evaluación del potencial aromático de la uva en la extracción de su Fracción Fenólica Aromática (FFA) y su posterior reconstitución en vino sintético e hidrólisis ácida en anoxia. Este método ha demostrado ser de gran utilidad y potencialidad (Alegre, Arias-Pérez, et al., 2020; Alegre, Sáenz-Navajas, et al., 2020) y se ha empleado a lo largo de esta tesis. Sin embargo, este proceso de preparación de muestras incluye un paso de extracción en fase sólida en C18 que, además de encarecer el procedimiento, lo hace tedioso y lento, ya que requiere la desalcoholización en un rotavapor y la percolación de las muestras que puede demorarse en el posible caso de que se formen mucílago.

En la búsqueda de un método que pueda ser más conveniente para el estudio del potencial aromático de las uvas hemos verificado que es posible la fermentación en condiciones aceleradas y que, según estudios preliminares, ésta no afecta de manera evidente a los precursores del aroma ni a la producción de aromas por hidrólisis (*Anexo III: Preevaluación de la fermentación rápida de mostos de uva para el estudio de los aromas varietales derivados de hidrólisis ácida de precursores*).

La aceleración de la fermentación se consigue usando una temperatura más alta de la habitual y, sobre todo, una cantidad de levadura muy superior a la empleada normalmente. Se escogió la levadura QA23 ya que es considerada una cepa fermentativa rápida y robusta, con una contribución neutra al aroma del vino.

El objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia de la metodología de fermentación rápida en la evaluación del aroma varietal derivado de precursores tanto frente a la estrategia basada en la extracción de FFAs como frente a la vinificación estándar.

2. Materiales y métodos

2.1 Preparación de muestras

Se partió de dos kg de uvas de seis variedades diferentes, cuatro blancas: Riesling, Gewürztraminer, Chardonnay y Macabeo, obtenidas de la zona del Somontano y dos tintas: Garnacha y Tempranillo, que se obtuvieron de la zona de La Rioja. Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.1.1 del capítulo 1 se prepararon seis mistelas monovarietales.

2.1.1. Preparación de mistela desalcoholizada

De cada una de estas mistelas monovarietales se tomaron 125 mL para formar una mezcla de las seis variedades. Esta mezcla se desalcoholizó en un rotavapor hasta alcanzar un porcentaje de etanol menor del 2%. El volumen recogido de agua-etanol en la destilación en el balón recolector se midió en una probeta y se añadió a la mezcla desalcoholizada el equivalente en agua Milli-Q previamente esterilizada en una autoclave.

2.1.2 Extracción de la Fracción Fenólica Aromática (FFA)

De esta mistela desalcoholizada se tomaron 300 mL y se extrajo su FFA. Para la obtención de la misma se realizó una extracción en Fase sólida (SPE) en C18 según lo descrito por Alegre et al. (Alegre, Arias-Pérez, et al., 2020) y como se describe en el apartado 2.1.2 del capítulo 1, pero reescalando el proceso para la cantidad de muestra empleada. Los 40 mL de FFA obtenidos se guardaron en congelador hasta su posterior utilización en los análisis cuantitativos.

2.2 Fermentaciones

Se realizaron dos tipos de fermentaciones una estándar y otra rápida, ambas por triplicado empleando como fermentadores botes de Pyrex de 250 mL con una válvula Müller y un agitador. La levadura empleada en ambos casos fue Lalvin QA23™ (*Saccharomyces cerevisiae*, Lallemand Bio, Barcelona), la cual, previamente fue activada según las indicaciones del fabricante. Para la realización de cada tipo de fermentación se tomaron 150 mL de mistela desalcoholizada por cada réplica. Las fermentaciones se realizaron en agitación constante a 200 rpm y monitorearon mediante pesajes diarios. Estas se consideraron terminadas cuando la pérdida de peso entre dos días consecutivos fue menor

a 0,1 g. Una vez finalizadas las fermentaciones, los vinos obtenidos se dejaron decantar durante 6 horas a 4°C. Finalmente, se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 minutos, a 10°C en una centrífuga (Allegra™, EE. UU.)

Condiciones fermentación estándar

En la fermentación estándar todo el material empleado se esterilizó previamente en una autoclave (AES-28, Raypa, España). La fermentación estándar se realizó por triplicado y se llevó a cabo inoculando 30 g/hL de levadura Lalvin QA23™ previamente activada según el fabricante. Para ello, en viales de 5 mL se pesaron 0,045 g de levadura seca (cantidad necesaria para 150 mL de mosto) y se rehidrataron con 0,4 mL de agua estéril previamente calentada a 37°C. Se dejó activar durante 15 min la levadura. Pasado este tiempo se añadieron 2 mL del mosto previamente atemperado a 19°C (que es la temperatura que se empleó) en este tipo de fermentación y se agitó suavemente durante otros 15 min. Una vez transcurrido el tiempo de activación, se arrastró todo el contenido del vial al fermentador que contenía el mosto. El proceso de activación se hizo por igual para cada una de las tres réplicas de fermentación. Los fermentadores se colocaron en una incubadora a 19°C hasta el final de la fermentación.

Condiciones fermentación rápida

La fermentación rápida se llevó a cabo inoculando 250 g/hL de levadura QA23 previamente activada según el fabricante y como se describió anteriormente para la fermentación estándar. En este caso, se pesaron 0,375 g de levadura seca y se rehidrataron en 3,7 mL de agua a 37°C, en viales de 7,5 mL. Pasados los primeros 15 min de rehidratación se añadieron 3 mL de mosto previamente atemperado a 28°C (que es la temperatura que se empleó en este tipo de fermentación) y se agitó suavemente durante otros 15 min. Una vez transcurrido el tiempo de activación, se arrastró todo el contenido del vial al fermentador que contenía el mosto. El proceso de activación se hizo por igual para cada una de las tres réplicas de esta fermentación. Los fermentadores se colocaron en una incubadora a 28°C hasta el final de la fermentación.

2.3 Envejecimiento acelerado mediante hidrólisis ácida en anoxia

En el caso de los vinos recién fermentados una vez centrifugados se les ajustó el pH a 3,5 en cada una de sus tres réplicas.

En el caso de la muestra de FFA, esta se reconstituyó en 300 mL de vino sintético (5 g/L de ácido tartárico) y luego se ajustó el pH a 3,5.

Cada uno de los tipos de muestras (fermentación rápida, fermentación estándar y FFA) fueron hidrolizadas en anoxia durante varios tiempos: 0, 12, 24 y 96 horas a 75°C para el posterior análisis cuantitativo del aroma generado.

Para el proceso de envejecimiento anóxico acelerado, en la cámara de anoxia (Jacomex P-Box T2, Francia), se llenaron los viales correspondientes para el análisis por cada método dejando el mínimo espacio de cabeza. Para cada uno de los fermentados se realizó un análisis por cada réplica de fermentador y tiempo de hidrólisis. Para la FFA, se hicieron dos réplicas por cada tiempo. Los viales cerrados y divididos por tipo de muestra y tiempo se colocaron dentro de una bolsa plástico termosellada (Coimbra Pack, S.L, Zaragoza, España), certificadas con permeabilidad al oxígeno (valor medio de $9 \text{ cm}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{día})$). Luego, esta primera bolsa se colocó dentro de otra del mismo tipo y entre ellas se añadió carbón activado con un eliminador de oxígeno (AnaeroGen™ de ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) como describe Vela et al. (Vela et al., 2017). Las muestras de t_0 una vez fuera de la cámara de anoxia, se almacenaron en nevera a 4°C hasta su análisis, mientras que las muestras t_{12} , t_{24} y t_{96} fueron incubadas durante 12, 24 y 96 horas a 75°C en una estufa (Memmert GmbH, Alemania), respectivamente. Una vez terminado el proceso de incubación se almacenaron también a 4°C hasta su análisis.

2.4 Evaluación del aroma generado en la fermentación y luego por hidrólisis ácida

Para la evaluación del aroma en cada una de las tres muestras se evaluaron los compuestos del aroma por tres métodos diferentes que se describen a continuación.

2.4.1 Cuantificación de compuestos mayoritarios

En los vinos recién fermentados (t_0), se evaluaron los compuestos mayoritarios del vino, incluyendo diversos compuestos carbonílicos, alcoholes superiores y sus acetatos, así como ácidos grasos volátiles y sus ésteres etílicos. Este análisis se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Ortega et al. (Ortega et al., 2001), con ciertas adaptaciones. Para ello, inicialmente se añadieron 38 μL de una solución de estándares internos (2-octanol, 4-metil-2-pentanol, heptanoato de etilo y ácido heptanoico, a una concentración de 30 mg/L cada uno) a cada una de las muestras de vino en un matraz de 5 mL. Luego, en un tubo de centrifuga roscado de 10 mL, se añadieron 2,7 mL de la muestra con los estándares internos, 6,3 mL de agua Milli-Q, 4,1 g de sulfato de amonio (Sigma-Aldrich, Alemania) y 250 μL de diclorometano. Esta mezcla se agitó horizontalmente durante 90 minutos utilizando un agitador Promax 1020 (Heidolph, Alemania). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Centro-8-BL (J.P. Selecta, España). Finalmente, se extrajeron 100 μL de la fase orgánica utilizando una jeringa y se transfirieron a un vial de inserto de 200 μL . El análisis se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 (Palo Alto, EE. UU.) equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó una columna ZB-WAX (30m de longitud, 0,32mm de diámetro, con un espesor de 0.5 mm) suministrada por Phenomenex (Torrance, EE. UU.), la cual estuvo precedida por una pre-columna sin revestimiento (3m x 0,53mm de diámetro interno). El programa de temperatura del horno se inició a 40°C durante 5 minutos y luego se aumentó a 3°C/min hasta alcanzar 200°C. Se empleó hidrógeno como gas portador a un flujo de 3 mL/min. Se inyectaron 3 μL del extracto en modo split, utilizando un flujo de 30 mL/min. Las áreas de los picos de los analitos se normalizaron en relación con los del estándar interno correspondiente y se convirtieron en concentración mediante un factor de respuesta obtenido al analizar un vino sintético calibrado. Este vino se preparó con ácido tartárico (4 g/L), etanol (13%, v/v), glicerina (10 g/L), quinina (7 g/L), goma arábiga (70 g/L), ácido tánico (100 g/L) y se ajustó su pH a 3,5. Los patrones analíticos empleados para la cuantificación se muestran en la tabla A4 del Anexo I.

2.4.2 Cuantificación de compuestos minoritarios y trazas

Los compuestos minoritarios y trazas fueron evaluados tanto en la FFA reconstituida en vino sintético como en los vinos recién fermentados (t_0). Además, en los hidrolizados

tanto de FFA como de los vinos envejecidos mediante hidrólisis ácida en anoxia a 75°C, durante 12 (t_{12}), 24 (t_{24}) y 96 horas (t_{96}). El tratamiento de las muestras se realizó siguiendo el método descrito por López et al. (López et al., 2004) y el método de GC-MS seguido fue el descrito por (Oliveira & Ferreira, 2019) como se describe en el la sección 2.3.1 del capítulo 1.

2.4.3 Cuantificación de mercaptanos polifuncionales

También se analizaron los mercaptanos polifuncionales que fueron evaluados tanto en la FFA reconstituida en vino sintético como en los vinos recién fermentados (t_0) y a las 96h de envejecimiento acelerado de cada uno de los tres tipos de muestras (t_{96}), siguiendo el método descrito por Vichi et. al (Vichi et al., 2015) con las modificaciones descritas en el apartado 2.3.2 del capítulo 1.

3. Resultados

Este capítulo se enfocó en la evaluación de una metodología de fermentación rápida de mistelas, seguida de hidrólisis ácida en anoxia, como método para analizar el potencial aromático de las uvas de vinificación y en la comparación con otras metodologías de preparación de muestra como la hidrólisis directa de FFAs o tras su fermentación siguiendo un procedimiento estándar. Primeramente, se preparó una muestra combinando seis mistelas monovarietales de diferentes variedades de uva en igual proporción. El objetivo era obtener una muestra representativa y diversa de precursores aromáticos para el estudio.

A partir de esta mistela y tras su desalcoholización, por un lado, se extrajo su FFA y, por otro, se llevaron a cabo dos tipos de fermentaciones, cada una por triplicado. La primera se realizó en condiciones estándares de fermentación, mientras que la segunda, denominada "rápida", se llevó a cabo a una temperatura más alta y con una cantidad mayor de levadura que lo habitualmente empleado en las vinificaciones, como se recoge en el apartado 2.2. de este capítulo. Como era de esperar la fermentación fue más rápida a alta temperatura, ya que, mientras a la fermentación rápida le costó sólo 3 días llegar a su fin, la fermentación estándar tardó 7 días en terminar. El corto tiempo de la fermentación rápida coincide con lo observado en el experimento preliminar y se debe

atribuir tanto a la mayor temperatura de fermentación (Molina et al., 2007) como a la mayor cantidad de levadura sembrada.

3.1 Evaluación del aroma generado por hidrólisis ácida de fermentados y FFAs reconstituidas

Se analizó el aroma generado en los hidrolizados en anoxia a 75°C tanto de los fermentados como de la FFA reconstituida a cuatro tiempos: 0, 12, 24 y 96 horas. En el aroma se determinaron tanto compuestos fermentativos como varietales empleando tres métodos analíticos diferentes. Los aromas varietales se presentarán y discutirán en primer lugar, dada su mayor relevancia en el presente trabajo.

3.1.1 Aromas varietales

Una vez cuantificados estos aromas por los métodos descritos en los apartados 2.4.2 y 2.4.3, se realizó un ANOVA de un factor empleando los tres tipos de muestra (fermentación rápida, fermentación estándar y FFA) como niveles, a cada tiempo de análisis, para evaluar si existían diferencias significativas entre estos tratamientos. Además, se realizó una prueba de Tukey para saber exactamente entre qué tratamientos se observaban estas diferencias. En la tabla 3.1 se muestra el resultado de estos análisis y en rojo se dan los valores significativos (p -valor < 0,05).

Para todos los tiempos de análisis resultan significativos los siguientes compuestos:

- Derivados de la vainillina: acetovainillona y siringaldehído
- Fenoles volátiles: m-cresol, isoeugenol, eugenol, 4-vinilguaiacol, 4-vinilfenol y metoxieugenol
- Terpenos: cineol, óxido de rosa, β -citronelol y geraniol
- γ -nonalactona
- β -damascenona
- Mercaptanos polifuncionales: acetato de 3-mercaptohexilo 3-mercaptohexanol, bencilmercaptano y 4-mercapto-4-metil-2-pentanona (analizados solo a tiempos 0 y 96 horas de hidrólisis).

A continuación, se analizan estas diferencias en detalle.

Tabla 3.1 Concentraciones promedio ($\mu\text{g/L}$) y desviaciones estándares ($n=3$ para los fermentados y $n=2$ para la FFA) de los aromas minoritarios, trazas y mercaptanos polifuncionales analizados en los tres tiempos de análisis para cada tratamiento. Resultados del ANOVA de 1 factor (tratamiento) y prueba de Tukey en cada tiempo de análisis para los tres tratamientos de muestra*. Diferentes letras significa que pertenecen a diferentes grupos en la prueba Tukey.

Compuestos	t0				t12				t24				t96			
	FFA	F. rápida	F. estándar	p-valor	FFA	F. rápida	F. estándar	p-valor	FFA	F. rápida	F. estándar	p-valor	FFA	F. rápida	F. estándar	p-valor
vainillina	26.2 ± 0.68 a	4.7 ± 0.43 b	4 ± 0.18 b	5,70E-08	16 ± 3.9 a	8.2 ± 0.8 b	8.5 ± 0.3 b	1,07E-02	19 ± 2.9 a	6.5 ± 0.32 b	8.8 ± 0.89 b	4,80E-04	20 ± 5.9	17 ± 0.93	17.2 ± 0.54	4,49E-01
acetovainillona	3.3 ± 0.19 b	28 ± 1.6 a	26 ± 0.39 a	3,22E-06	3.9 ± 0.43 b	27.8 ± 0.14 a	27 ± 0.4 a	1,08E-08	3.97 ± 0.066 b	26.1 ± 0.36 a	27 ± 1.3 a	1,32E-06	4 ± 0.5 b	27 ± 1 a	28.7 ± 0.4 a	5,81E-07
siringaldehído	82 ± 4.6 a	7 ± 1.3 b	11 ± 1 b	6,23E-07	80 ± 7.1 a	26 ± 4.4 b	30 ± 4 b	1,39E-04	73 ± 5.5 a	16 ± 2.2 b	25 ± 5.1 b	6,33E-05	111 ± 11 a	76 ± 3.2 b	57 ± 2.9 c	3,31E-04
guaiacol	n.d. c	1.48 ± 0.033 b	1.77 ± 0.049 a	1,14E-07	1.7 ± 0.33 b	2.2 ± 0.16 ab	2.3 ± 0.12 a	4,60E-02	2.377 ± 0.0018 c	3.7 ± 0.55 b	4.9 ± 0.23 a	1,98E-03	6.8 ± 0.2 b	9.3 ± 0.31 a	8.4 ± 0.56 a	3,50E-03
o-cresol	0.336 ± 0.003 c	0.44 ± 0.012 a	0.392 ± 0.0089 b	2,10E-04	0.35 ± 0.023	0.4 ± 0.018	0.39 ± 0.02	7,80E-02	0.355 ± 0.0074 c	0.46 ± 0.01 a	0.415 ± 0.0078 b	1,60E-04	0.39 ± 0.039 b	0.499 ± 0.0057 a	0.46 ± 0.027 ab	1,40E-02
m-cresol	0.061 ± 0.0014 b	0.085 ± 0.0033 a	0.087 ± 0.0081 a	7,56E-03	0.076 ± 0.0028 b	0.104 ± 0.0041 a	0.108 ± 0.0037 a	5,46E-04	0.073 ± 0.0074 b	0.121 ± 0.0079 a	0.135 ± 0.0076 a	7,82E-04	0.105 ± 0.0015 b	0.22 ± 0.017 a	0.26 ± 0.014 a	2,02E-04
eugenol	0.31 ± 0.041 b	0.54 ± 0.068 a	0.61 ± 0.056 a	6,12E-03	0.29 ± 0.049 b	0.57 ± 0.046 a	0.62 ± 0.015 a	4,79E-04	0.284 ± 0.008 c	0.59 ± 0.017 b	0.75 ± 0.022 a	3,04E-06	0.305 ± 0.0055 c	0.71 ± 0.02 b	0.88 ± 0.057 a	4,27E-05
etilfenol	0.207 ± 0.0048 a	0.059 ± 0.0028 b	0.042 ± 0.0038 c	1,35E-07	0.174 ± 0.0052 a	0.081 ± 0.0095 b	0.066 ± 0.0068 b	5,03E-05	0.22 ± 0.024	0.16 ± 0.022	0.15 ± 0.025	5,70E-02	0.09 ± 0.011	0.2 ± 0.05	0.2 ± 0.051	8,06E-02
4-vinilguaiacol	0.65 ± 0.048 c	688 ± 43 b	1495 ± 58 a	8,69E-07	10 ± 2.5 c	368 ± 18 b	678 ± 37 a	3,03E-06	15 ± 0.34 c	301 ± 10 b	471 ± 23 a	1,86E-06	79.2 ± 0.94 b	387 ± 14 a	383 ± 15 a	3,14E-06
siringol	0.42 ± 0.049 c	1.6 ± 0.14 a	1.01 ± 0.099 b	2,54E-04	6 ± 1.8	7.8 ± 0.7	6.9 ± 0.33	3,29E-01	9.8 ± 0.62 b	14 ± 1 a	15 ± 1.1 a	4,60E-03	45 ± 1.5	39.8 ± 0.75	48 ± 4.5	5,10E-02
isoeugenol	6.83 ± 0.064 a	6.8 ± 0.44 a	5.7 ± 0.39 b	2,19E-02	3 ± 1 b	7.2 ± 0.75 a	6.7 ± 0.18 a	3,69E-03	3.9 ± 0.2 b	9 ± 1.5 a	10.2 ± 0.46 a	2,11E-03	5.7 ± 0.12 b	16.3 ± 0.69 a	17.02 ± 0.038 a	1,99E-06
4-vinilfenol	0.8 ± 0.07 c	60 ± 3.8 b	86 ± 3.4 a	2,72E-06	4.4 ± 0.54 c	46.1 ± 0.62 b	59 ± 1.2 a	4,12E-08	5.5 ± 0.14 c	40 ± 2.6 b	48 ± 0.69 a	2,85E-06	11.4 ± 0.04 b	44.8 ± 0.8 a	46 ± 2 a	2,21E-06
metoxieugenol	n.d. b	0.7 ± 0.11 a	0.6 ± 0.054 a	3,61E-04	0.5 ± 0.19 b	1.2 ± 0.19 a	1.26 ± 0.064 a	5,50E-03	0.5499 ± 0.00019 b	1.5 ± 0.19 a	1.7 ± 0.2 a	1,75E-03	2.1 ± 0.14 c	4.9 ± 0.24 b	5.8 ± 0.37 a	9,34E-05
γ -nonalactona	0.312 ± 0.0015 c	2.1 ± 0.23 a	1.3 ± 0.15 b	2,90E-04	0.4 ± 0.01 c	3.53 ± 0.028 a	2.4 ± 0.073 b	3,54E-08	0.408 ± 0.0048 c	3.44 ± 0.077 a	2.5 ± 0.11 b	6,60E-07	0.48 ± 0.012 c	3.81 ± 0.051 a	2.734 ± 0.0083 b	3,34E-09
masoia lactona	2.6 ± 0.18	2 ± 0.16	2.8 ± 0.44	7,65E-02	4.3 ± 0.69 a	2.98 ± 0.092 b	3.1 ± 0.15 b	1,60E-02	4.3 ± 0.18 b	3.7 ± 0.38 b	5.1 ± 0.2 a	4,77E-03	5.13 ± 0.053 a	4.7 ± 0.17 b	5.5 ± 0.11 a	2,83E-03
vitispiranos	n.d.	n.d.	n.d.	-	4.7 ± 0.86	4.4 ± 0.78	3.8 ± 0.5	4,13E-01	10.1 ± 0.5	13 ± 2.4	13.3 ± 0.94	1,65E-01	42 ± 2.9	54 ± 2.3	47 ± 10	2,34E-01
Riesling acetal	n.d.	n.d.	n.d.	-	1.5 ± 0.18	1.5 ± 0.15	1.4 ± 0.11	6,21E-01	2.72 ± 0.032	3.2 ± 0.23	3.1 ± 0.12	5,81E-02	6.2 ± 0.13 b	8 ± 0.38 a	8.5 ± 0.19 a	6,81E-04

Tabla 3.1 Concentraciones promedio ($\mu\text{g/L}$) y desviaciones estándares ($n=3$ para los fermentados y $n=2$ para la FFA) de los aromas minoritarios, trazas y mercaptanos polifuncionales analizados en los tres tiempos de análisis para cada tratamiento. Resultados del ANOVA de 1 factor (tratamiento) y prueba de Tukey en cada tiempo de análisis para los tres tratamientos de muestra*. Diferentes letras significa que pertenecen a diferentes grupos en la prueba Tukey.

Compuestos	t0				t12				t24				t96			
	FFA	F. rápida	F. estándar	p-valor	FFA	F. rápida	F. estándar	p-valor	FFA	F. rápida	F. estándar	p-valor	FFA	F. rápida	F. estándar	p-valor
TDN	n.d. b	0.34 \pm 0.036 a	n.d. b	1,47E-05	1.6 \pm 0.29 ab	2.2 \pm 0.26 a	1.5 \pm 0.23 b	2,91E-02	4.3 \pm 0.086	6 \pm 1.2	5.5 \pm 0.75	2,23E-01	33.2 \pm 0.83 c	47 \pm 2.4 a	42 \pm 1.7 b	1,63E-03
β -damascenona	n.d. c	0.61 \pm 0.067 a	0.32 \pm 0.019 b	6,62E-05	6.9 \pm 0.11 b	7.02 \pm 0.088 b	7.5 \pm 0.24 a	2,87E-02	8.2 \pm 0.1 ab	7.8 \pm 0.79 b	9.6 \pm 0.48 a	3,37E-02	7.9 \pm 0.34 b	9 \pm 0.3 a	9.4 \pm 0.23 a	5,42E-03
óxido de rosa	0.185 \pm 0.0051 b	0.6 \pm 0.075 a	0.71 \pm 0.096 a	1,71E-03	0.361 \pm 0.0049 c	0.58 \pm 0.036 b	0.86 \pm 0.028 a	2,19E-05	0.42 \pm 0.021 b	0.6 \pm 0.11 b	0.85 \pm 0.043 a	3,11E-03	0.31 \pm 0.014 c	0.59 \pm 0.022 b	0.83 \pm 0.02 a	2,64E-06
óxido de linalool	n.d. b	0.9 \pm 0.16 a	0.86 \pm 0.043 a	4,48E-04	4.2 \pm 0.62	4.7 \pm 0.45	4.5 \pm 0.37	5,06E-01	6.63 \pm 0.044 b	8.9 \pm 0.71 a	9.4 \pm 0.22 a	3,10E-03	27.5 \pm 0.69 b	34 \pm 1.1 ab	39 \pm 3.8 a	9,75E-03
dihidromircenol	n.d. b	0.178 \pm 0.0069 a	0.18 \pm 0.025 a	1,13E-04	0.258 \pm 0.0067	0.3 \pm 0.46	0.087 \pm 0.0089	6,17E-01	0.256 \pm 0.0062	0.24 \pm 0.058	0.25 \pm 0.019	8,52E-01	0.13 \pm 0.013 a	0.081 \pm 0.0078 b	0.071 \pm 0.0055 b	2,07E-03
linalool	0.186 \pm 0.0032 c	3.8 \pm 0.21 a	1.58 \pm 0.017 b	2,14E-06	21.2 \pm 0.92	22.6 \pm 0.75	22.1 \pm 0.64	2,21E-01	24.53 \pm 0.032 b	27 \pm 1.9 ab	29.3 \pm 0.6 a	2,27E-02	14.97 \pm 0.047 c	20.4 \pm 0.073 b	22.6 \pm 0.24 a	1,31E-07
α -terpineol	n.d. c	0.32 \pm 0.011 a	0.193 \pm 0.0024 b	2,20E-07	3.5 \pm 0.46	3.7 \pm 0.35	3.3 \pm 0.21	5,01E-01	5.9 \pm 0.22 b	7.4 \pm 0.75 a	7.4 \pm 0.18 ab	4,00E-02	16.25 \pm 0.072 b	20.9 \pm 0.53 a	21.4 \pm 0.83 a	6,02E-04
β -citronelol	0.65 \pm 0.067 c	10.5 \pm 0.25 a	6 \pm 0.45 b	1,43E-06	0.37 \pm 0.075 c	9.6 \pm 0.38 a	5.3 \pm 0.58 b	8,97E-06	0.43 \pm 0.086 b	9 \pm 3.4 a	4.9 \pm 0.72 ab	1,70E-02	0.24 \pm 0.053 c	4.4 \pm 0.11 a	3 \pm 0.36 b	2,04E-05
nerol	2.37 \pm 0.055 c	3.6 \pm 0.11 a	3.1 \pm 0.16 b	4,13E-04	2.72 \pm 0.027 b	3.2 \pm 0.12 a	3 \pm 0.12 ab	1,06E-02	2.77 \pm 0.079 b	3.2 \pm 0.2 a	3.33 \pm 0.038 a	1,55E-02	1.3 \pm 0.19 c	2.23 \pm 0.062 b	2.555 \pm 0.0065 a	7,42E-05
geraniol	13.14 \pm 0.053 b	13.9 \pm 0.21 b	17.8 \pm 0.53	4,85E-05	16.1 \pm 0.19 b	20 \pm 1.1 a	22 \pm 0.43 a	9,84E-04	20.6 \pm 0.34 b	21 \pm 1.1 b	24 \pm 1.1 a	1,17E-02	12.3 \pm 0.2 c	16.6 \pm 0.53 b	20 \pm 1 a	2,20E-04
acetato de 3-mercaptohexilo	n.d. c	298 \pm 18 b	351 \pm 13 a	3,25E-06									5.3 \pm 0.45 c	147 \pm 15 b	304 \pm 24 a	2,51E-05
3-mercaptohexanol	n.d. c	221 \pm 17 a	115 \pm 8.2 b	1,47E-05									2181 \pm 210 b	1283 \pm 110 c	4296 \pm 270 a	2,54E-05
bencilmercaptano	n.d. b	n.d. b	0.15 \pm 0.011 a	2,61E-06									0.49 \pm 0.034 b	2.3 \pm 0.32 a	2.3 \pm 0.12 a	4,97E-04
furfuritiol	n.d.	n.d.	n.d.	-									1.64 \pm 0.041 c	108 \pm 13 b	210 \pm 23 a	1,09E-04
4-mercapto-4-metil-2-pentanona	n.d. b	0.43 \pm 0.052 a	0.37 \pm 0.049 a	3,29E-04									0.85 \pm 0.067 c	2.3 \pm 0.4 b	3.5 \pm 0.31 a	8,26E-04

n.d.: no detectado
 *Los mercaptanos polifuncionales (4-mercapto-4-metilpentanona, acetato de 3-mercaptohexilo, 3-mercaptohexanol, furfuriol y bencilmercaptano) solo se analizaron a t0 y t96 y su concentración está expresada en ng/L.

Derivados de la vainillina

En la figura 3.1 se puede observar la evolución con el tiempo de los tres derivados de la vainillina estudiados. En ellas puede observarse que la fermentación tiene un importante efecto sobre los niveles, y en algunos casos también, sobre la evolución de los tres componentes. En el caso de la acetovainillona, la FFA contuvo niveles muy inferiores a los alcanzados en ambos fermentados durante todo el envejecimiento. Éstos dos últimos no mostraron diferencias significativas. Estas diferencias eran previsibles, dado que en estudios previos ya se ha acreditado que la acetovanillona es mayoritariamente producida durante la fermentación (Denat et al., 2021). Es de observar que no parece producirse un precursor glicosídico de este componente, ya que no hay acumulación del mismo durante la hidrólisis.

Por el contrario, la FFA contiene niveles superiores tanto de siringaldehído como de vainillina. En el primer caso, la diferencia se mantiene durante todo el envejecimiento, mientras que, en el segundo caso, los niveles de vainillina de los fermentados van convergiendo con los observados en la FFA. Las diferencias entre los fermentados son significativas en algún punto, pero en todos los casos son muy pequeñas. Es también muy llamativo que, en ambos casos, siringaldehído y vainillina, la FFA tiene niveles altos en el punto 0, lo que indica que la molécula libre ya existía en la mistela desaromatizada y sugiere que ambas moléculas son transformadas durante la fermentación. La hidrólisis ácida del precursor con acumulación del aroma, solo se observa con claridad en las muestras fermentadas.

Tanto el siringaldehído como la vainillina pueden ser producidos por la degradación de la lignina (Baldwin et al., 1967) y son moléculas que contribuyen al aroma de vinos envejecidos en barricas de roble (Fernández de Simón et al., 2003; Jarauta et al., 2005). Sin embargo, las uvas contienen precursores capaces de liberar niveles significativos de estos compuestos, aunque estos niveles no pueden igualar a aquellos liberados por algunos tipos de barricas (Ferreira & Lopez, 2019).

En cualquier caso, los resultados muestran que la FFA no es un medio apropiado para evaluar la capacidad de liberación de acetovainillona y que la fermentación rápida no da resultados diferentes de la estándar.

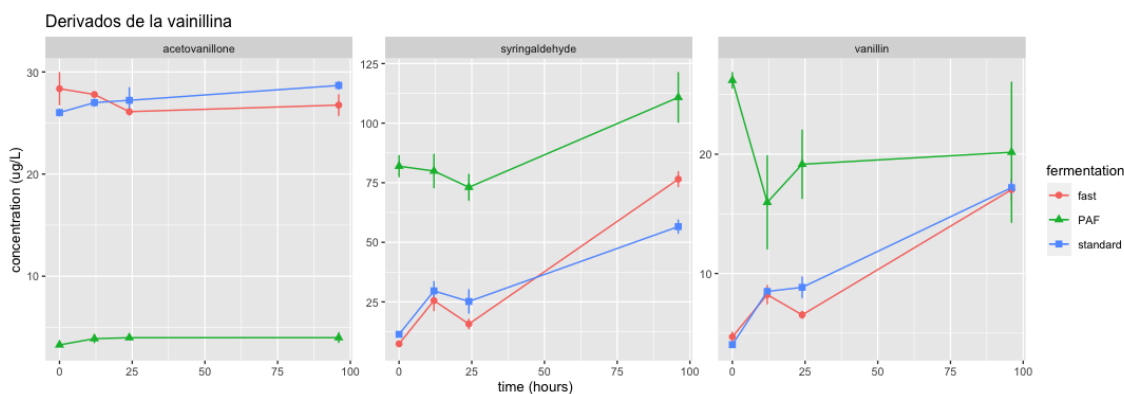


Fig. 3.1. Liberación de los derivados de la vainillina en el tiempo en la FFA (PAF), la fermentación rápida (fast) y la fermentación estándar (estándar)

Fenoles

Respecto a los fenoles, como se observa en la figura 3.2, los niveles en la FFA son claramente menores en prácticamente todos los casos (excepto etilfenol, guaiacol y siringol), mientras que las muestras fermentadas siguen evoluciones bastante paralelas, si bien con diferencias iniciales relevantes en los niveles de vinilfenoles. En efecto, los vinilfenoles se producen más a t_0 en la fermentación estándar que en la rápida, mientras que en la FFA a t_0 apenas se producen. Esto se debe a que, además de los precursores aromáticos, la levadura juega un papel fundamental en su formación mediante la descarboxilación de los ácidos cumárico y ferúlico presentes en las uvas a través de la cinamato descarboxilasa (Chatonnet et al., 1992). Respecto a la evolución de los vinilfenoles con la hidrólisis en el tiempo, en la FFA se observa un continuo incremento en la concentración probablemente debido a la hidrólisis de sus precursores. Este comportamiento difiere de la evolución seguida en ambos fermentados, en los que se observa una disminución. Es evidente que los procesos de degradación de vinilfenoles en los fermentados son predominantes, este fenómeno no es sorprendente debido a la alta reactividad química de estos compuestos que son fuertemente electrófilos y por tanto reaccionarán con especies nucleófilas como mercaptanos y sulfito (Denat et al., 2022). Es destacable que, aunque los niveles producidos en la fermentación estándar en t_0 son significativamente mayores a los de la fermentación rápida, la degradación es mayor, llegando a alcanzar niveles similares a las 96h en ambos fermentados.

Los niveles de eugenol, isoeugenol y metoxieugenol presentan perfiles similares que se caracterizan por una menor acumulación en el hidrolizado de FFA. Esto podría sugerir, o bien que algunos de sus precursores se pierdan en la extracción con C18 que se realiza en la obtención de la FFA, o bien y menos probable, que durante la fermentación se generen más precursores.

Los niveles a to de 4-etilfenol en la FFA, que es un compuesto presente en muy bajas concentraciones, a diferencia del resto de esta familia, son mayores que en los fermentados. Además, mientras la evolución en los fermentados durante la hidrólisis consiste en un incremento, en la FFA decrece. Dadas las condiciones del experimento, se puede descartar su formación a partir de la reducción del 4-vinilfenol por la acción de la enzima vinilfenol reductasa (Chatonnet et al., 1992).

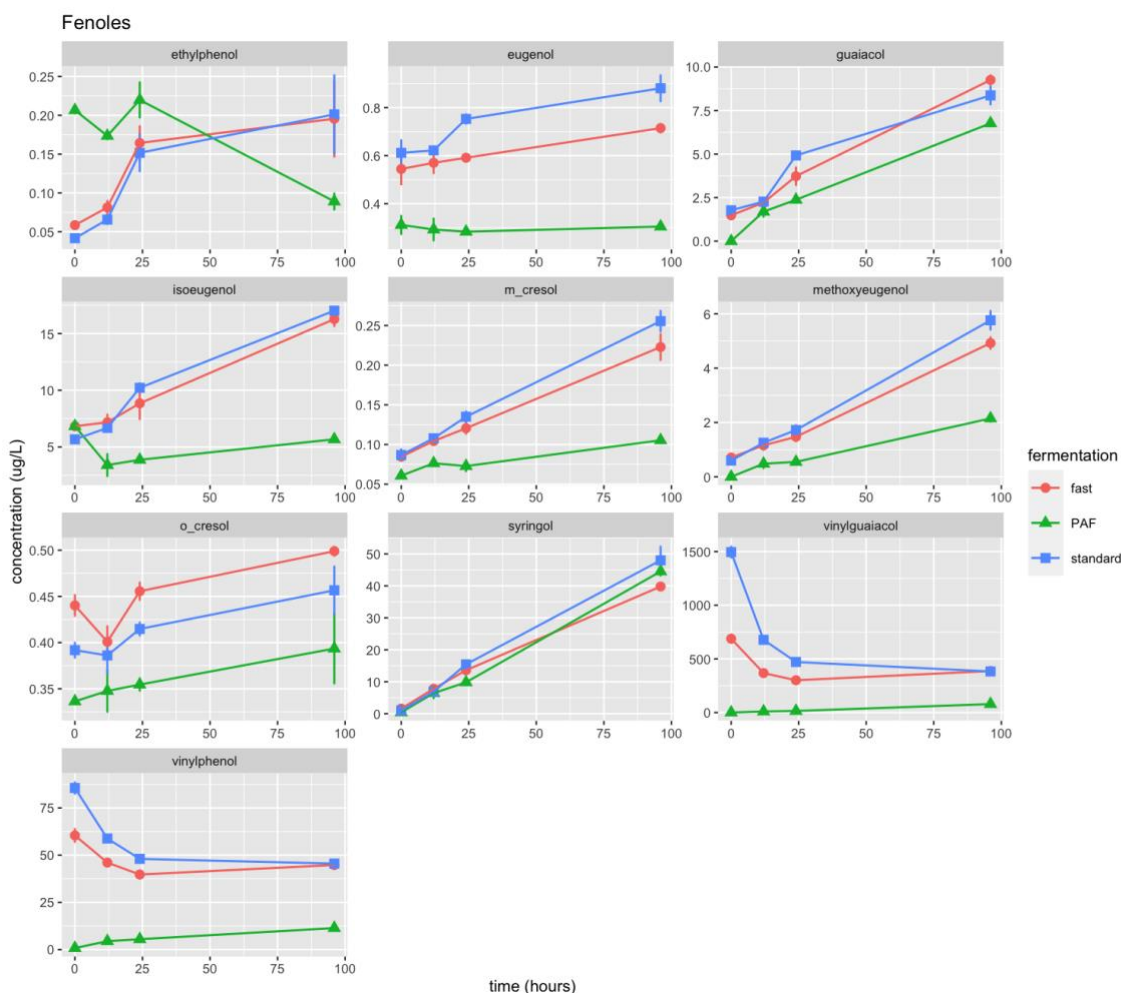


Fig. 3.2. Liberación de los fenoles volátiles en el tiempo en la FFA (PAF), la fermentación rápida (fast) y la fermentación estándar (estándar)

Terpenos:

Respecto a los terpenos, se observa en la figura 3.3 que la evolución en la hidrólisis es prácticamente la misma. Se observa también en todos los casos que los niveles alcanzados en la FFA son menores que en los fermentados, especialmente para citronelol y óxido de rosa, aunque las concentraciones en este último son muy bajas.

En el vino joven (t_0), las cantidades liberadas de estos compuestos en los fermentados son significativamente mayores que en la FFA, lo que hace suponer que en ambos casos la levadura ha actuado sobre los precursores de estos aromas, liberándolos mediante hidrólisis enzimática. Sin embargo, a medida que ocurre la hidrólisis en el tiempo, los niveles de la FFA no llegan a alcanzar nunca los de los fermentados, lo que pudiera sugerir que durante el proceso de extracción en C18 se pudieran perder parte de estos precursores.

La evolución global de los terpenos confirma lo obtenido en experimentos previos. Existe un óptimo de liberación que es función del tiempo (y de la temperatura) como competencia entre los procesos de liberación por hidrólisis y degradación por la temperatura. Por ejemplo, en el caso de linalool se observa el óptimo a 24h, mientras que en su óxido de linalool el crecimiento es continuo desde cero al inicio, debido a su producción por degradación del linalool. Lo mismo sucede con el α -terpineol que es un producto de degradación de los otros terpenos.

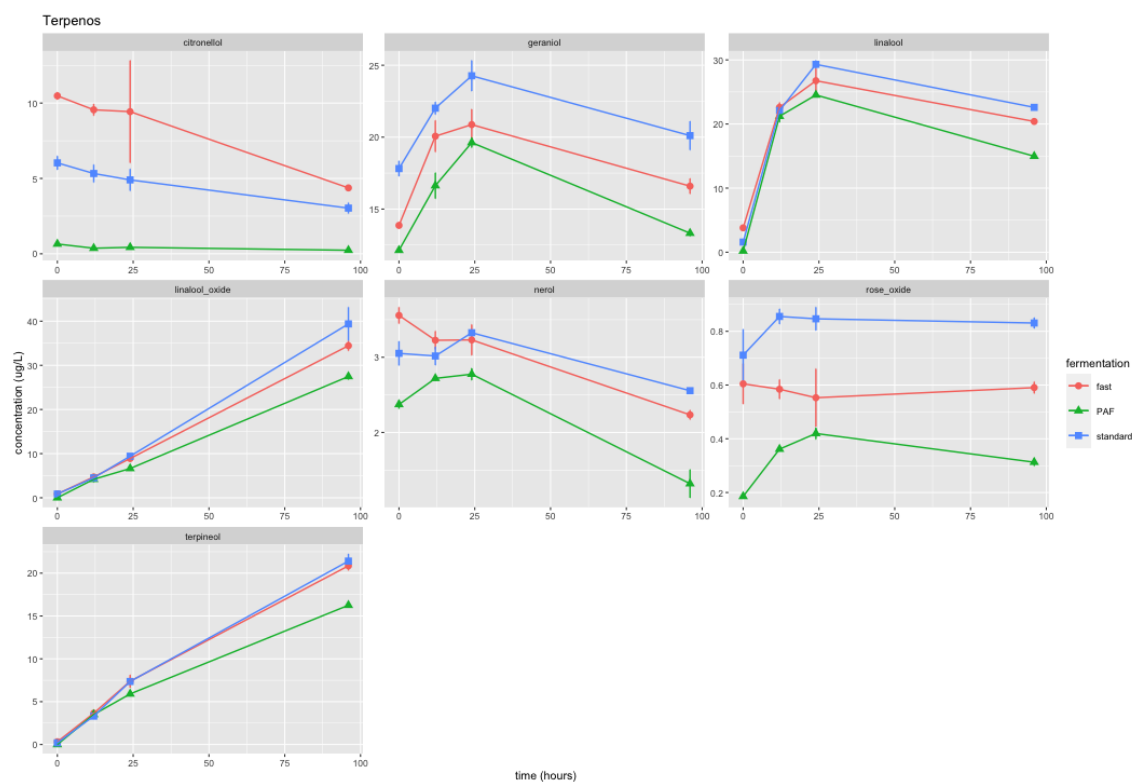


Fig. 3.3. Liberación de los terpenos en el tiempo en la FFA (PAF), la fermentación rápida (*fast*) y la fermentación estándar (*estándar*)

Norisoprenoides:

Otra familia importante de aromas son los norisoprenoides que tienen un gran número de precursores diferentes (Ferreira & Lopez, 2019). En este caso, se observa en la figura 3.4 que la evolución en el tiempo es prácticamente la misma e incluso los niveles alcanzados son similares en algunos casos, sobre todo entre ambos fermentados. Quizás la diferencia más notoria comienza a observarse a partir de las 24h de hidrólisis, sobre todo en el Riesling acetal y el TDN, donde o bien la velocidad de la hidrólisis en la FFA es menor o lo es el contenido de precursores en esta, debido a la posible pérdida de algunos precursores en la extracción de la misma.

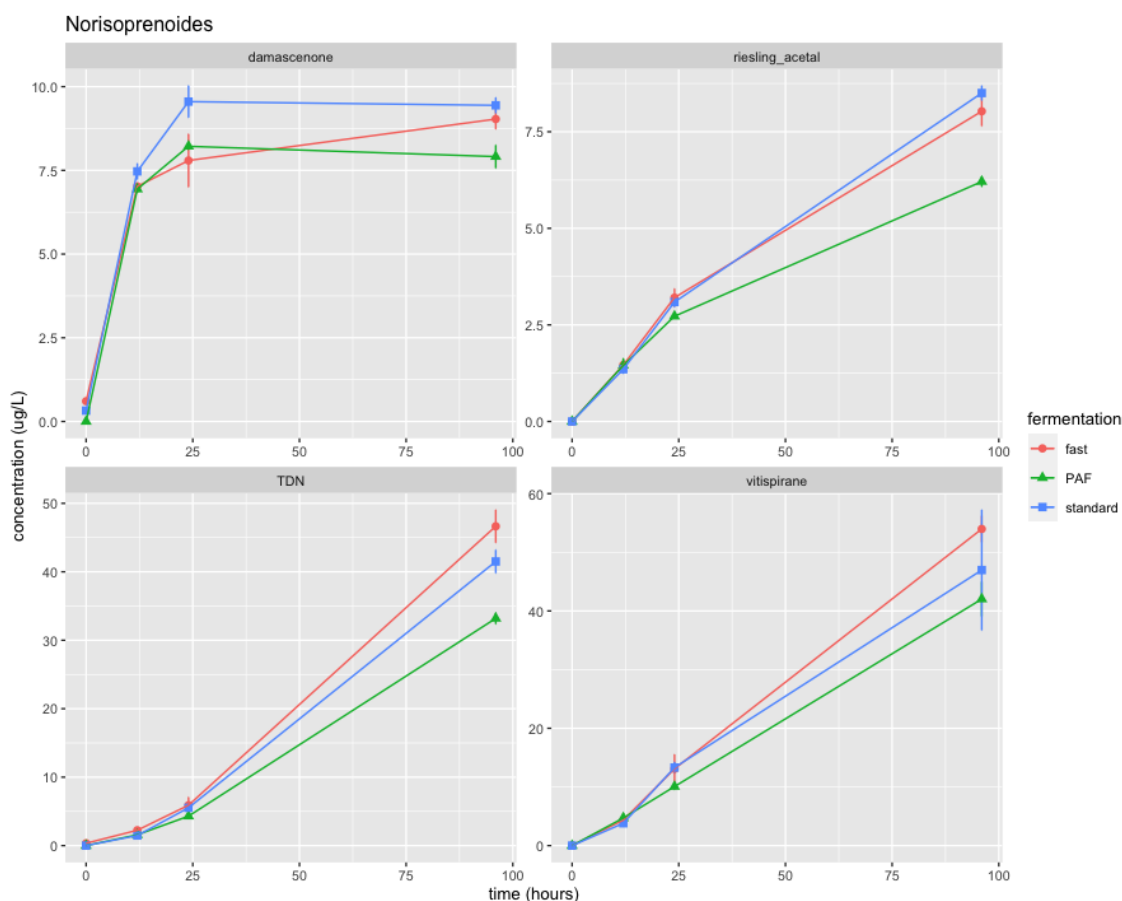


Fig. 3.3. Liberación de los norisoprenoides en el tiempo en la FFA (PAF), la fermentación rápida (fast) y la fermentación estándar (estándar)

Lactonas:

Aunque la existencia de precursores glicosídicos para estas lactonas no ha sido demostrada explícitamente, hay autores que describen su presencia en hidrolizados de la fracción de precursores (Alegre, Sáenz-Navajas, et al., 2020; Loscos et al., 2009; Sánchez-Acevedo et al., 2024). Es por ello que quizás no se deba descartar la presencia de precursores glicosídicos de los correspondientes hidroxiácidos, que generen estas moléculas (Ferreira & Lopez, 2019).

En la figura 3.4 se observa la liberación de ambos compuestos en el tiempo. En la FFA, la γ -nonalactona se mantiene prácticamente constante en el tiempo y en niveles muy bajos respecto a aquellos encontrados en los fermentados, lo que sugiere que este compuesto tiene una importante influencia de la fermentación en su formación. Estos resultados

coinciden con los encontrados por Loscos et al. (Loscos et al., 2007) y con los de Denat (Denat, 2022), que sugiere que el tipo de levadura también tiene influencia en su formación. Respecto a la masa lactona los niveles en la FFA y los fermentados son similares y variables durante la hidrólisis, registrando un aumento del doble desde el t_0 a las 96h de hidrólisis.

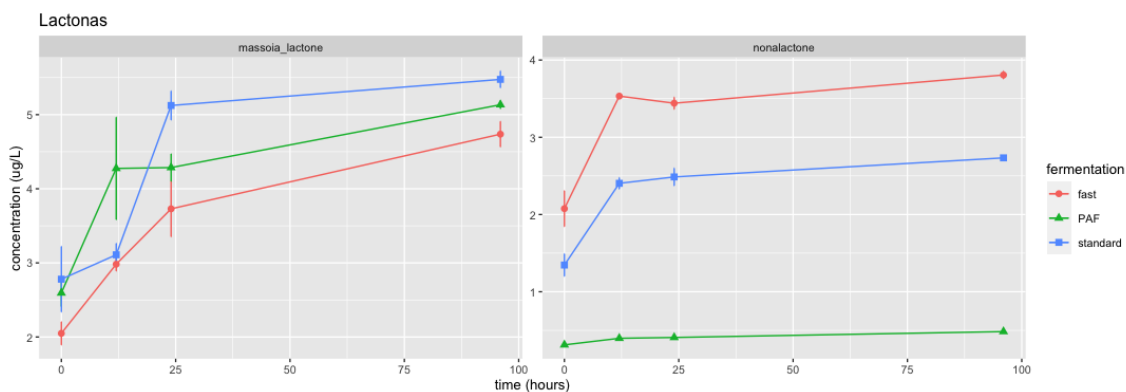


Fig. 3.4. Liberación de las lactonas en el tiempo en la FFA (PAF), la fermentación rápida (fast) y la fermentación estándar (estándar)

Mercaptanos polifuncionales:

Los mercaptanos polifuncionales solo fueron estudiados a dos tiempos t_0 y t_96 . El 3-mercaptohexanol (MH) y la 4-mercapto-4-metil-pentanona (MP) en los fermentados a t_0 se encuentran en cantidades apreciables. Los precursores mayoritarios de estos compuestos están formados por uniones con moléculas de cisteína (Tominaga et al., 1998), glutatión (Des Gachons et al., 2002; Fedrizzi et al., 2009) y, específicamente para el MH, cisteína-glicina (Capone et al., 2011) y γ -glutamyl-cisteína (Bonnaffoux et al., 2017). Las levaduras son capaces de liberar solo una pequeña fracción de precursores a través de la actividad carbono-azufre β -liasa durante la fermentación. Existen también otras rutas de generación, menos estudiadas. Harsh et al. (Harsch et al., 2013) señalan al (E)-2-hexenal como posible precursor del MH, por la reacción con el H_2S o bien con otros compuestos que aporten el grupo tiol.

Como se puede observar en la figura 3.5 y en la tabla 3.1, la FFA no presenta niveles detectables de ninguno de los compuestos de este grupo, hasta que no es sometida al proceso de hidrólisis. Una vez hidrolizada, la FFA presenta los niveles más bajos, a

excepción del (MH), donde el nivel alcanzado es incluso mayor que el de la fermentación rápida.

Destacan también los niveles muy bajos de acetato de 3-mercaptohexilo (MHA) y furfuriltiol (FFT) en la FFA. Se ha demostrado que, durante la fermentación, el MHA se forma a partir del MH por la acción de la alcohol acetiltransferasa formadora de ésteres de levadura, codificada por el gen ATF1 (Swiegers et al., 2006), lo que justifica su presencia en mayores niveles en los fermentados que en la FFA.

Por su parte el FFT, se puede formar en vinos envejecidos en barricas de madera por la reacción química directa entre el furfural, proveniente de la barrica y el sulfuro de hidrógeno (H₂S) formado durante la fermentación (Blanchard et al., 2001), pero en este caso no se usó barrica en la fermentación. También podría formarse a partir del furfural en presencia de fuentes de azufre como la L-cisteína o el H₂S (Shibamoto & Russell, 1977). Se ha sugerido también un origen fermentativo en el Baijiu¹, donde se generó este compuesto con el furfural y la L-cisteína como precursores (Zha et al., 2017). Todo ello pudiera justificar el bajo nivel de FFT en la FFA, donde tanto los niveles de cisteína como de H₂S son muy bajos, producto de la extracción en C18 y por la falta de la acción de la levadura.

El origen del bencilmercaptano (BM) no es del todo conocido, pero se pudiera formar por la reacción entre el benzaldehído y el H₂S, como sucede con el FFT, lo que justificaría su presencia en mayor cantidad en los fermentados.

En la fermentación rápida, a excepción del BM, no se producen los mismos niveles a 96h que los alcanzados en la fermentación estándar.

¹El Baijiu es una bebida alcohólica tradicional china que se destila principalmente a partir de granos como el arroz, el maíz, el trigo o la cebada y que se produce mediante un proceso de fermentación, destilación y envejecimiento que puede variar según las regiones y las técnicas utilizadas.

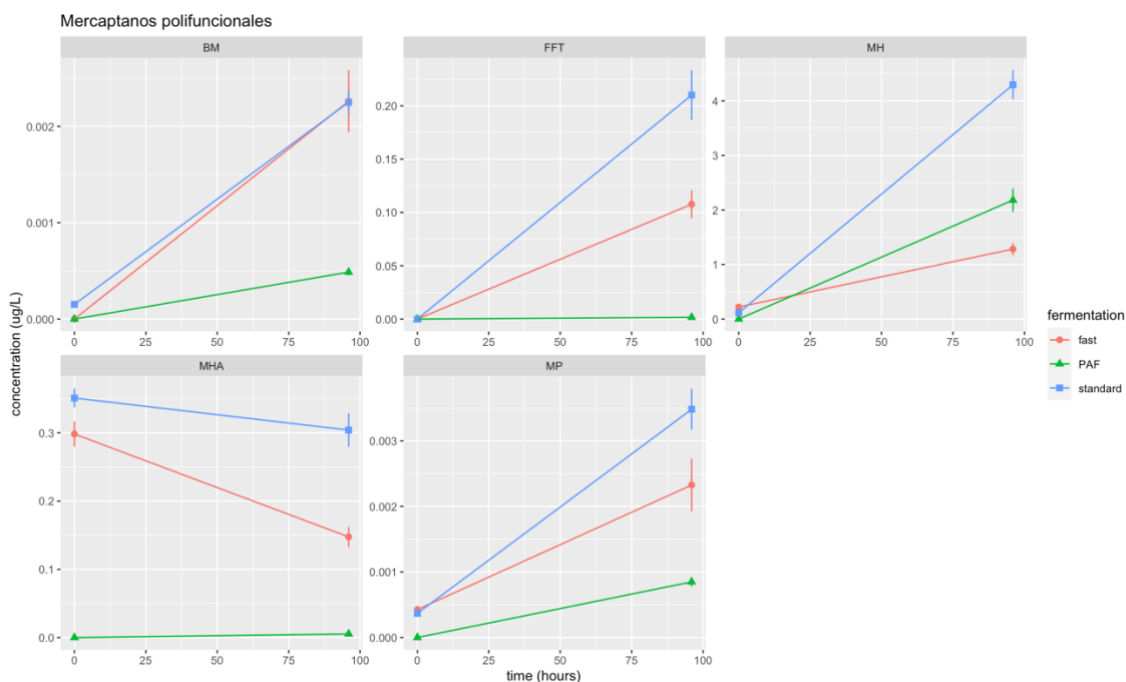


Fig. 3.5. Liberación de los mercaptanos polifuncionales en el tiempo en la FFA (PAF), la fermentación rápida (fast) y la fermentación estándar (estándar)

Análisis de Componentes Principales (PCA)

En la figura 3.6 se muestra el PCA obtenido en la comparación de los tres tipos de tratamiento de muestras: FFA, fermentación rápida y fermentación estándar, solo incluyendo aquellos compuestos de mayor importancia para el estudio de los precursores del aroma.

A modo de confirmación de lo que habíamos analizado anteriormente, se observa, que la FFA se distingue totalmente de ambos fermentados y se encuentra separada, fundamentalmente, por el eje PC2. Por otro lado, el eje PC1, separa las muestras por el tiempo de hidrólisis, donde las muestras más diferentes son todos los hidrolizados a 96h, especialmente por los altos contenidos de TDN, Riesling acetal, vitispiranos, 3-mercaptohexanol, 4-mercapto-4-metil-2-pentanona y algunos fenoles como guaiacol, siringol y metoxieugenol. Los únicos compuestos que destacan en las muestras de FFA a las 96h de hidrólisis, son precisamente vainillina y siringaldehído, los cuales serían mejor determinados con esta matriz.

Por otro lado, aunque los fermentados son muy similares entre sí, se observa la mayor diferencia en la generación de algunos mercaptanos polifuncionales, en particular el MH y el MHA, donde se producen niveles más bajos en la fermentación rápida. Esto ocurre incluso después de la hidrólisis ácida, lo que sugiere que, en la fermentación estándar, ya sea debido a la cantidad de levadura utilizada o a la temperatura, la metabolización de los precursores conocidos de estos compuestos, mencionados anteriormente, podría ser más factible que en la fermentación rápida.

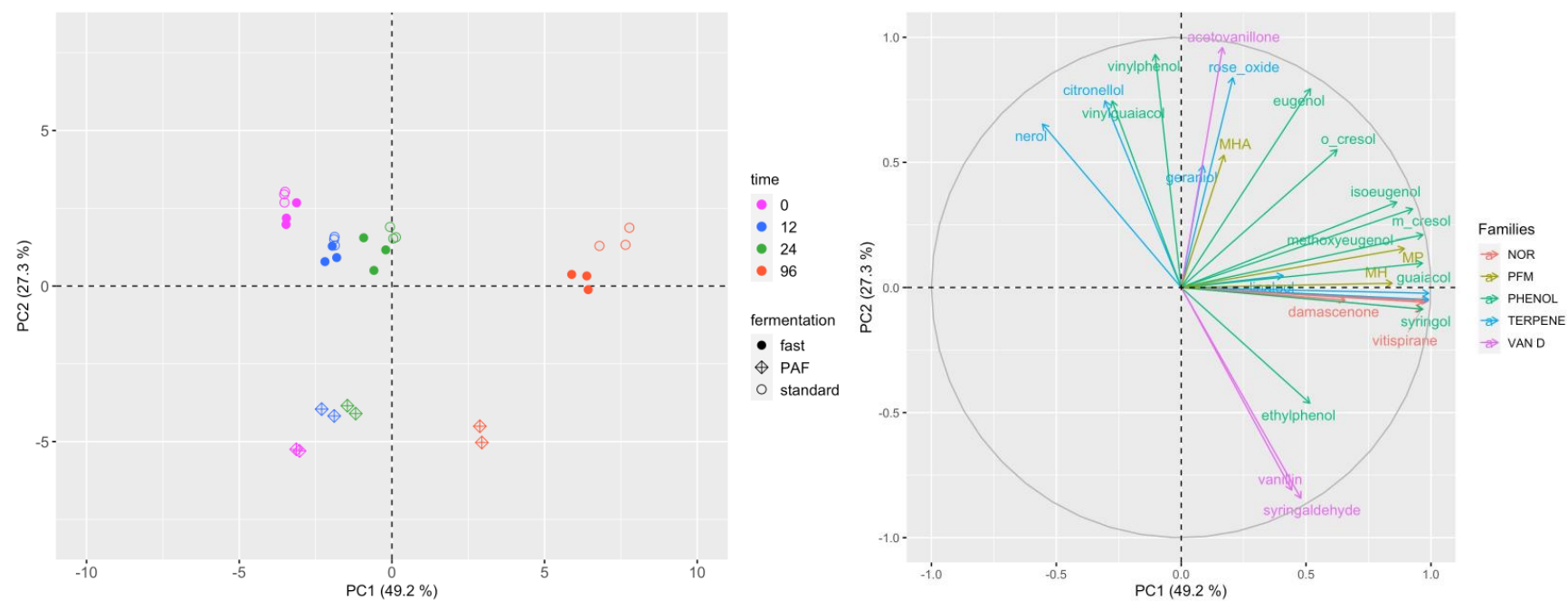


Fig.3.6. Análisis de Componentes Principales (PCA). A la izquierda: Distribución de cada tratamiento de muestra a los cuatro tiempos estudiados. FFA (PAF), fermentación rápida (fast) y fermentación estándar (standard). A la derecha: Distribución de los compuestos aromáticos por familias. Las familias se dividen en NOR: norisoprenoides, PHENOL: fenoles, TERPENE: terpenos, VAN D: derivados de la vainillina y PFM: mercaptanos polifuncionales

3.1.2. Estudio de los aromas mayoritarios

Aunque la formación de la mayor parte de estos aromas en el vino está directamente asociada al proceso de fermentación y por tanto no son claves para el estudio de precursores del aroma, se realizó una evaluación de estos en ambas fermentaciones para entender las principales diferencias introducidas por la fermentación rápida.

En la tabla 3.2 se muestran las concentraciones obtenidas a t_0 para cada uno de los compuestos analizados por el método descrito en el apartado 2.4.1 de este capítulo y además otros compuestos, específicamente ésteres, que a pesar de que se analizaron por el método de minoritarios y trazas (apartado 2.4.2), precisamente por ser productos de fermentación se comentarán en este epígrafe. También, en esta tabla, se muestra el resultado de la prueba ANOVA de un factor que se realizó para evaluar las diferencias significativas entre los niveles obtenidos de estos compuestos en cada fermentado.

Como cabía esperar, dada la disparidad en cantidad de levadura y temperatura, las fermentaciones produjeron cantidades significativamente diferentes en ambos fermentados para casi todos los compuestos, a excepción de tres alcoholes (butanol, alcohol isoamílico y alcohol bencílico), dos acetatos (acetato de isobutilo y acetato de β -feniletilo) y un éster etílico (2-metilbutirato de etilo). Es llamativo que, en general, los volátiles cuyo origen es el metabolismo de los aminoácidos se encuentran en mayores cantidades en la fermentación rápida, mientras que aquellos cuyo origen es el metabolismo de los lípidos predominan en la fermentación estándar.

Tabla 3.2. Concentraciones promedio (mg/L) y desviaciones estándares (n=3) de los aromas mayoritarios analizados en cada fermentado a tiempo t0. Resultados del ANOVA de un factor.

Compuestos	Fermentación rápida	Fermentación estándar	p-valor
acetaldehído	8.93 ± 0.88	0.97 ± 0.06	0,0001
acetato de etilo	69.9 ± 2.3	94.5 ± 8.9	0,0098
acetato de hexilo	0.00689 ± 0.00117	0.00976 ± 0.00065	0,0205
acetato de isoamilo	3.57 ± 0.16	5.99 ± 0.76	0,0057
acetoína	3.09 ± 0.14	0.248 ± 0.021	0,0000
ácido acético	432 ± 24	283 ± 25	0,0018
ácido butírico	1.25 ± 0.04	1.49 ± 0.09	0,0107
ácido decanoico	0.672 ± 0.056	1.33 ± 0.23	0,0082
ácido hexanoico	1.51 ± 0.02	2.99 ± 0.03	0,0000
ácido isobutírico	3.51 ± 0.18	0.754 ± 0.049	0,00001
ácido isovalérico	1.82 ± 0.11	0.982 ± 0.139	0,0013
ácido octanoico	2.01 ± 0.06	5.03 ± 0.34	0,0001
alcohol bencílico	0.785 ± 0.004	0.818 ± 0.049	0,3169
alcohol isoamílico	178 ± 3	189 ± 14	0,2570
butanol	1.14 ± 0.03	1.04 ± 0.13	0,2831
butirato de etilo	0.137 ± 0.003	0.247 ± 0.041	0,0093
butirolactona	0.669 ± 0.022	0.405 ± 0.024	0,0001
decanoato de etilo	0.13 ± 0.01	0.297 ± 0.019	0,0001
diacetilo	0.346 ± 0.033	0.198 ± 0.01	0,0017
feniletanol	15.2 ± 0.3	11.4 ± 0.4	0,0002
hexanoato de etilo	0.26 ± 0.02	0.728 ± 0.057	0,0002
hexanol	0.0635 ± 0.0035	0.048 ± 0.004	0,0089
isobutanol	41.9 ± 1.6	23.1 ± 1.8	0,0002
lactato de etilo	0.58 ± 0.03	0.365 ± 0.047	0,0025
metionol	1.13 ± 0.07	0.411 ± 0.038	0,0001
octanoato de etilo	0.257 ± 0.017	0.806 ± 0.052	0,0001
propanoato de etilo	0.109 ± 0.004	0.0654 ± 0.010	0,0022
succinato de dietilo	0.0665 ± 0.004	0.0266 ± 0.0062	0,0007
isobutirato de etilo*	10 ± 1.4	2.7 ± 0.43	0,0008
acetato de isobutilo*	45 ± 5.6	38.3 ± 0.99	0,1135
2-metilbutirato de etilo*	0.28 ± 0.031	0.27 ± 0.041	0,7893
isovalerato de etilo*	1 ± 0.11	0.5 ± 0.11	0,0076
leucato de etilo*	5.6 ± 0.44	2.8 ± 0.54	0,0021
acetato de de β-feniletilo*	300 ± 41	359 ± 11	0,0733

*Ésteres analizados con el método de minoritarios y trazas (apartado 2.4.2). Sus concentraciones aparecen expresadas en ug/L

En general, la fermentación rápida produce niveles superiores de los carbonilos: acetaldehído, acetoína y diacetilo, de los isoácidos: isobutírico e isovalérico y de alcoholes como metionol, feniletanol e isobutanol. Estos alcoholes y ácidos son producidos por la levadura a través de la vía de Ehrlich a partir de los aminoácidos valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y metionina (Ehrlich, 1907). Los aminoácidos primero son transaminados en α -cetoácidos, descarboxilados en aldehídos y luego reducidos en alcoholes, o alternativamente, oxidados en ácidos, dependiendo del estado redox de la célula.

Por su parte, la fermentación estándar produce niveles superiores de acetatos, especialmente acetato de etilo y de isoamilo. La levadura puede transformar alcoholes superiores producidos a través de la vía de Ehrlich en acetatos, mediante una esterificación intracelular catalizada enzimáticamente por acetiltransferasas, que requieren acetyl-CoA (Nordström, 1962).

También induce niveles superiores de ésteres etílicos de cadena lineal. Estos se forman mediante la condensación enzimática entre ácido graso-CoA y etanol (Ramey & Ough, 1980). Ya que los ácidos grasos son inhibidores de la fermentación, las levaduras *S. cerevisiae* pueden formar ésteres etílicos como un mecanismo de desintoxicación, y probablemente también como semioquímicos para comunicarse con otras especies. Los ácidos grasos de cadena corta (C2-C4) y de cadena media (C6-C12) derivan de la formación de acetyl-CoA por las levaduras. Son intermediarios de los ácidos grasos de cadena larga, a su vez precursores para la síntesis de lípidos que se forman para construir la membrana plasmática de la levadura (Mbuyane et al., 2021). Su formación implica primero la transformación del acetyl-CoA en malonil-CoA a través de la acetyl-CoA carboxilasa, y luego la condensación repetitiva de acetyl-CoA (o propionil-CoA para ácidos grasos con número impar de carbonos) y malonil-CoA por parte de las sintetasas de ácidos grasos (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Si hacemos referencia a los compuestos por individual, lo más remarcable son las diferencias observadas en los niveles de acetaldehído, acetoína, ácido acético, ácido isobutírico, ácido isovalérico, isobutanol, metionol, isobutirato de etilo y leucato de etilo, siendo el doble o incluso más, en la fermentación rápida en comparación con la fermentación estándar. Entre ellos cobran aún más importancia desde el punto de vista sensorial el ácido acético y el acetaldehído, ya que, especialmente el acetaldehído en la

fermentación rápida se encuentra en concentraciones muy superiores a su umbral de olfacción, calculado en 500 µg/L por Guth (Guth, 1997).

El acetaldehído es uno de los compuestos carbonílicos desde el punto de vista sensorial, más significativos en la vinificación y representa más del 90% del contenido total de aldehídos en el vino (Nykänen, 1986). En niveles moderados, puede aportar al vino matices frutales, mientras que en concentraciones más altas su perfil aromático evoca los frutos secos (Waterhouse et al., 2016). Sin embargo, en niveles aún más elevados, este compuesto genera un perfil olfativo desagradable con notas verdes, herbáceas o que recuerdan a manzana (Liu & Pilone, 2000). Aunque el nivel alcanzado de acetaldehído por la fermentación rápida es mayor al que se alcanzó en la fermentación estándar, sus niveles siguen estando en línea con los encontrados en otros vinos, que oscilan entre 4-212 mg/L para tintos y 11-493 mg/L para blancos (Liu & Pilone, 2000). La disparidad en los niveles de este compuesto, partiendo del mismo mosto al inicio del proceso de fermentación, puede atribuirse a la mayor cantidad de levadura utilizada en la fermentación rápida. Durante la fase de crecimiento de la levadura, se produce principalmente la liberación de acetaldehído (M. A. Amerine & C. S. Ough, 1964; Ribéreau-Gayon et al., 1956), y al haber una mayor población de levaduras en el entorno, se espera un aumento en la excreción de acetaldehído. Asimismo, esta discrepancia podría explicarse por la elevada temperatura empleada, ya que Romano et al. (Romano et al., 1994) en un estudio llevado a cabo con 86 levaduras, observaron un incremento en la formación de acetaldehído en la fermentación tanto de mostos sintéticos como de mostos reales a 30°C en comparación con temperaturas de 12 o 24°C.

El ácido acético también se encuentra en valores superiores a su umbral de olfacción calculado en 200 µg/L por Guth (Guth, 1997) y aporta notas de vinagre en el vino además de aportar acidez. Su formación se ve significativamente afectada, entre otros factores, por la temperatura de fermentación incrementando sus niveles (Chidi et al., 2018). Además, se produce principalmente durante la fase de crecimiento de la levadura (Scutaraşu et al., 2021) por lo que como en el caso del acetaldehído el empleo de una cantidad mayor de levadura puede producir mayores contenidos de este compuesto.

Los mayores niveles sobre todo de estos compuestos (acetaldehído y ácido acético) en la fermentación rápida hacen que el vino obtenido no sea adecuado para su evaluación desde

el punto de vista sensorial, lo que se traduce en una desventaja de esta metodología frente a la de la FFA.

En la figura 3.7 se presentan los diagramas de caja para los compuestos mayoritarios analizados y en la figura 3.8 se muestran también los de aquellos ésteres analizados por el método de minoritarios y trazas, señalados en la tabla 3.2 con un asterisco (*). Como se puede observar ambas fermentaciones son bastante reproducibles en la producción de los compuestos analizados.

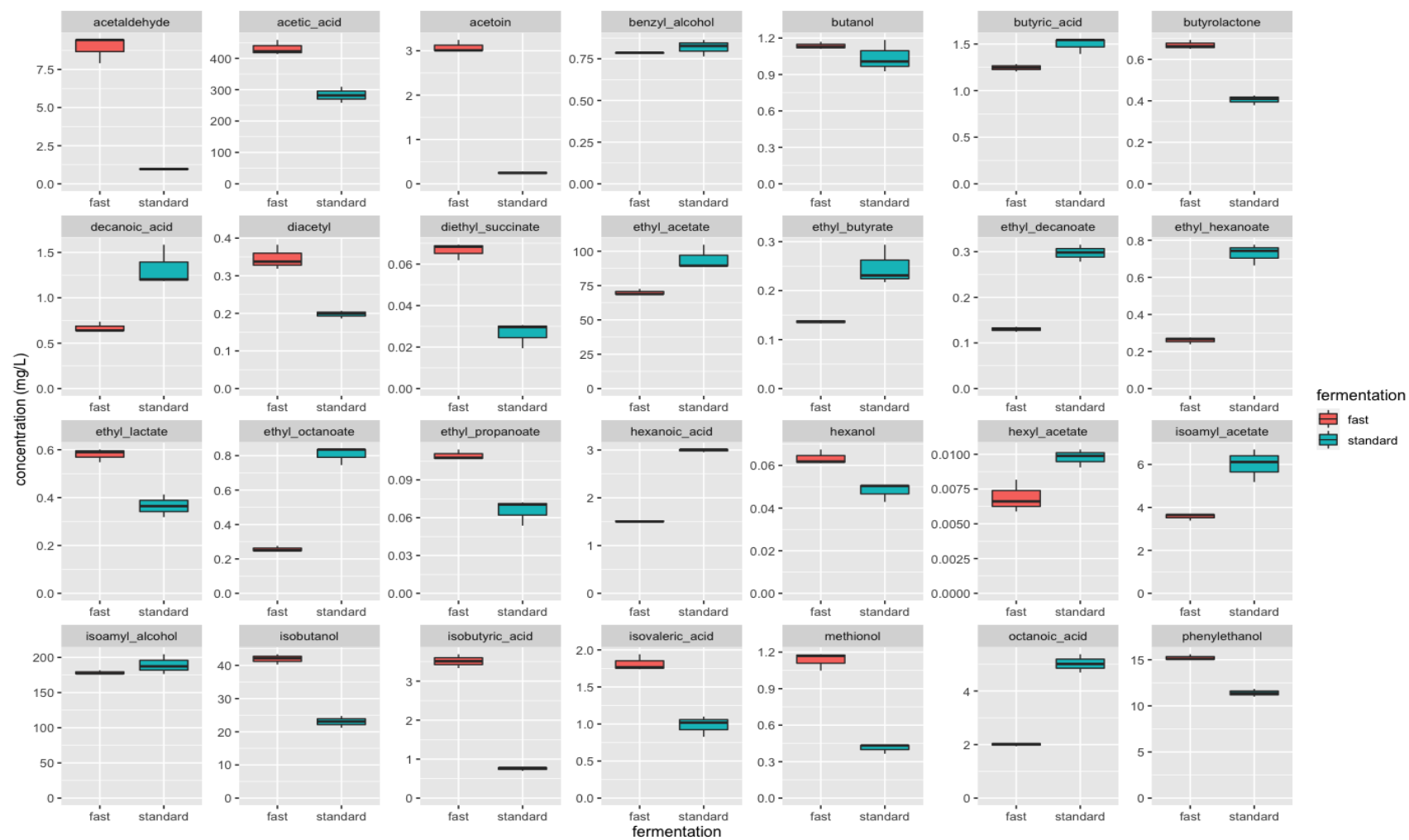


Fig. 3.7. Diagramas de caja de los aromas mayoritarios en la fermentación estándar (standard) y la fermentación rápida (fast)

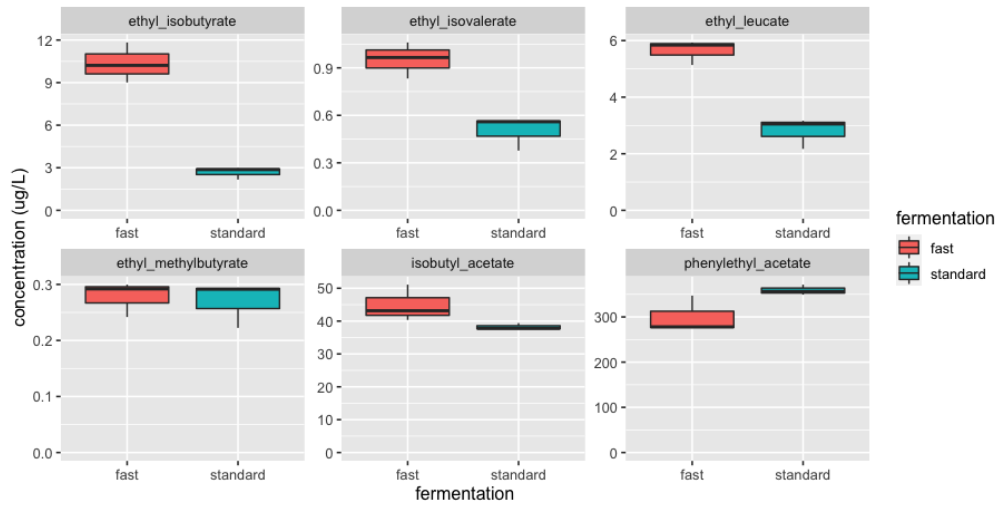


Fig. 3.8. Diagramas de caja de los ésteres analizados por el método de minoritarios y trazas en la fermentación estándar (standard) y la fermentación rápida (fast)

4. Conclusiones

En este trabajo se estudió la efectividad de la fermentación rápida seguida de hidrólisis ácida en anoxia para la evaluación del potencial aromático de las uvas de vinificación. Los resultados han mostrado que la fermentación rápida tan solo introduce diferencias menores con respecto a una fermentación estándar, y que permite la evaluación satisfactoria de la mayor parte de los componentes del aroma varietal, por lo que puede ser propuesta como una técnica alternativa para la preparación de muestra en la evaluación del aroma potencial mediante hidrólisis.

No obstante, los elevados niveles de acetaldehído, ácido acético y alcoholes superiores obtenidos en la fermentación rápida la descartan para la evaluación sensorial del potencial aromática, particularmente en comparación con los hidrolizados de FFA reconstituida.

5. Referencias

- Alegre, Y., Arias-Pérez, I., Hernández-Orte, P., & Ferreira, V. (2020). Development of a new strategy for studying the aroma potential of winemaking grapes through the accelerated hydrolysis of phenolic and aromatic fractions (PAFs). *Food Research International*, 127, 108728. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108728>
- Alegre, Y., Sáenz-Navajas, M. P., Hernández-Orte, P., & Ferreira, V. (2020). Sensory, olfactometric and chemical characterization of the aroma potential of Garnacha and Tempranillo winemaking grapes. *Food Chemistry*, 331, 127207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127207>
- Baldwin, Sidney., Black, R. Arthur., Andreasen, A. A., & Adams, S. Lyle. (1967). Aromatic congener formation in maturation of alcoholic distillates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15(3), 381-385. <https://doi.org/10.1021/jf60151a012>
- Blanchard, L., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2001). Formation of Furfurylthiol Exhibiting a Strong Coffee Aroma during Oak Barrel Fermentation from Furfural Released by Toasted Staves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4833-4835. <https://doi.org/10.1021/jf010539w>
- Bonnaffoux, H., Roland, A., Rémond, E., Delpech, S., Schneider, R., & Cavelier, F. (2017). First identification and quantification of S-3-(hexan-1-ol)- γ -glutamyl-cysteine in grape must as a potential thiol precursor, using UPLC-MS/MS analysis and stable isotope dilution assay. *Food Chemistry*, 237, 877-886. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.116>
- Capone, D. L., Pardon, K. H., Cordente, A. G., & Jeffery, D. W. (2011). Identification and quantitation of 3- S -cysteinylglycinehexan-1-ol (Cysgly-3-MH) in Sauvignon blanc grape juice by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11204-11210. <https://doi.org/10.1021/jf202543z>
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J., & Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(2), 165-178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>
- Chidi, B. S., Bauer, F. F., & Rossouw, D. (2018). The Impact of Changes in Environmental Conditions on Organic Acid Production by Commercial Wine Yeast Strains. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 39(2), 297-304. <https://doi.org/10.21548/39-2-2820>
- Denat, M. (2022). *Innovative analytical platforms for screening the ability of micro-organisms to produce high impact aroma compounds in fermentative processes.*
- Denat, M., Pérez, D., Heras, J. M., Sáenz-Navajas, M. P., & Ferreira, V. (2021). Impact of two yeast strains on Tempranillo red wine aroma profiles throughout accelerated ageing. *OENO*

One, 55(4), Article 4. <https://doi.org/10.20870/oenone.2021.55.4.4732>

Denat, M., Ontañón, I., Querol, A., & Ferreira, V. (2022). The diverse effects of yeast on the aroma of non-sulfite added white wines throughout aging. *LWT*, 158, 113111. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113111>

Des Gachons, C. P., Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2002). Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: Identification of S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 4076-4079. <https://doi.org/10.1021/jf020002y>

Ehrlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 40(1), 1027-1047. <https://doi.org/10.1002/cber.190704001156>.

Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Elsey, G. M., & Jeffery, D. W. (2009). First identification of 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 991-995. <https://doi.org/10.1021/jf802799w>

Fernández de Simón, B., Cadahía, E., & Jalocho, J. (2003). Volatile Compounds in a Spanish Red Wine Aged in Barrels Made of Spanish, French, and American Oak Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7671-7678. <https://doi.org/10.1021/jf030287u>

Ferreira, V., & Lopez, R. (2019). The actual and potential aroma of winemaking grapes. *Biomolecules*, 9(12), 818. <https://doi.org/10.3390/biom9120818>

Guth, H. (1997). Identification of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3022-3026. <https://doi.org/10.1021/JF9608433>

Harsch, M. J., Benkwitz, F., Frost, A., Colonna-Ceccaldi, B., Gardner, R. C., & Salmon, J. M. (2013). New precursor of 3-mercaptohexan-1-ol in grape juice: Thiol-forming potential and kinetics during early stages of must fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(15), 3703-3713. <https://doi.org/10.1021/jf3048753>

Jarauta, I., Cacho, J., & Ferreira, V. (2005). Concurrent Phenomena Contributing to the Formation of the Aroma of Wine during Aging in Oak Wood: An Analytical Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4166-4177. <https://doi.org/10.1021/jf0481960>

Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). *Yeast and its importance to wine aroma*. <https://scholar.sun.ac.za/items/2338f879-9ea5-4d2f-8ddb-7947f22e4dd4>

Liu, S.-Q., & Pilone, G. J. (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food*

Science & Technology, 35(1), 49-61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00341.x>

López, R., Ezpeleta, E., Sánchez, I., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004). Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry*, 88(1), 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.025>

Loscos, N., Hernandez-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from nonfloral grape odorless flavor precursors fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6674-6684. <https://doi.org/10.1021/jf0702343>

Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2009). Comparison of the suitability of different hydrolytic strategies to predict aroma potential of different grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2468-2480. <https://doi.org/10.1021/jf803256e>

M. A. Amerine & C. S. Ough. (1964). Studies with Controlled Fermentation. viii. Factors Affecting Aldehyde Accumulation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 15(1), 23. <https://doi.org/10.5344/ajev.1964.15.1.23>

Mbuyane, L. L., Bauer, F. F., & Divol, B. (2021). The metabolism of lipids in yeasts and applications in oenology. *Food Research International*, 141, 110142. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110142>

Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S., & Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3), 675-687. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1194-3>

Nordström, K. (1962). Formation of Ethyl Acetate in Fermentation with Brewer's Yeast. Iii. Participation of Coenzyme A. *Journal of the Institute of Brewing*, 68(5), 398-407. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1962.tb01882.x>

Nykänen, L. (1986). Formation and Occurrence of Flavor Compounds in Wine and Distilled Alcoholic Beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(1), 84-96. <https://doi.org/10.5344/ajev.1986.37.1.84>

Oliveira, I., & Ferreira, V. (2019). Modulating Fermentative, Varietal and Aging Aromas of Wine Using non- *Saccharomyces* Yeasts in a Sequential Inoculation Approach. *Microorganisms*, 7(6), 164. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060164>

Ortega, C., López, R., Cacho, J., & Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds. *Journal of Chromatography A*, 923(1-2), 205-214. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)00972-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)00972-4)

Ramey, D. D., & Ough, C. S. (1980). Volatile Ester Hydrolysis or Formation During Storage of Model Solutions and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(5), 928-934. <https://doi.org/10.1021/jf60231a021>

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., & Lafon, M. (1956). Investigations on the Origin of Secondary Products of Alcoholic Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 7(3), 112-118. <https://doi.org/10.5344/ajev.1956.7.3.112>

Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L., & Polsinelli, M. (1994). Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 118(3), 213-218. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06830.x>

Sánchez-Acevedo, E., Lopez, R., & Ferreira, V. (2024). Kinetics of aroma formation from grape-derived precursors: Temperature effects and predictive potential. *Food Chemistry*, 438, 137935. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137935>

Scutarașu, E. C., Teliban, I. V., Zamfir, C. I., Luchian, C. E., Colibaba, L. C., Niculaua, M., & Cotea, V. V. (2021). Effect of Different Winemaking Conditions on Organic Acids Compounds of White Wines. *Foods*, 10(11), 2569. <https://doi.org/10.3390/foods10112569>

Shibamoto, T., & Russell, G. F. (1977). A study of the volatiles isolated from a D-glucose-hydrogen sulfide-ammonia model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(1), 109-112. <https://doi.org/10.1021/jf60209a054>

Swiegers, J. H., Willmott, R., Hill-Ling, A., Capone, D. L., Pardon, K. H., Elsey, G. M., Howell, K. S., de Barros Lopes, M. A., Sefton, M. A., Lilly, M., & Pretorius, I. S. (2006). Modulation of volatile thiol and ester aromas by modified wine yeast. En W. L. P. Bredie & M. A. Petersen (Eds.), *Developments in Food Science* (Vol. 43, pp. 113-116). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(06\)80027-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(06)80027-0)

Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., & Dubourdieu, D. (1998). A New Type of Flavor Precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5215-5219. <https://doi.org/10.1021/jf980481u>

Vela, E., Hernández-Orte, P., Franco-Luesma, E., & Ferreira, V. (2017). The effects of copper fining on the wine content in sulfur off-odors and on their evolution during accelerated anoxic storage. *Food Chemistry*, 231, 212-221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.125>

Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry*. John Wiley & Sons.

Zha, M., Yin, S., Sun, B., Wang, X., & Wang, C. (2017). STR3 and CYS3 Contribute to 2-Furfurylthiol Biosynthesis in Chinese Sesame-Flavored Baijiu Yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(27), 5503-5511. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01359>

Capítulo 4

Capítulo 4. Fraccionamiento semipreparativo para el aislamiento y caracterización de precursores aromáticos

1. Introducción

Gran parte de la calidad aromática del vino está relacionada con los precursores aromáticos, mayoritariamente glicosídicos no volátiles, presentes en la uva (Abbott et al., 1991; Francis et al., 1992). Históricamente, la determinación de estos compuestos se basaba principalmente en la detección de su aglicona ya sea por hidrólisis enzimática o ácida, puesto que otras técnicas como la HPLC-UV no son útiles en este caso debido a que raramente contienen grupos cromóforos. La aglicona se liberaba por hidrólisis y mediante técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas se determinaba su estructura (Günata et al., 1990; Loscos et al., 2009; Williams et al., 1982). Esta estrategia tiene varios inconvenientes, entre otros su elevado coste y alta carga de trabajo. Además, se trata de una determinación indirecta, que no tiene en cuenta la existencia de distintos precursores para una misma molécula aromática. Esto es común en la química de los precursores, ya que una misma aglicona puede unirse a un amplio rango de azúcares, y, además, en algunos casos, son varias las agliconas las que pueden actuar como precursoras de una única molécula aromática. Entonces, la determinación indirecta resulta conveniente para la evaluación de la calidad global, pero presenta al menos dos limitaciones relevantes. Por un lado, no tiene en cuenta el hecho de que los distintos precursores de una misma molécula pueden tener distintas estabilidades y por tanto hidrolizarse a tiempos diferentes. Esto implica que la cantidad de aroma liberado a un único tiempo de hidrólisis podría no ser comparable entre muestras con distribuciones de precursores diferentes. Por otro lado, el conocimiento exacto de la molécula precursora es requerido para tener información realista acerca de los procesos metabólicos implicados en la síntesis y acumulación de precursores.

Actualmente, con el avance de la cromatografía de líquidos con espectrometría de masas como detector, la determinación directa de este tipo de moléculas ha pasado a ser posible. El análisis cuantitativo, sin embargo, no está exento de dificultades, ya que no hay

estándares analíticos comerciales, lo que dificulta la identificación inequívoca de estas moléculas, y la calibración adecuada de los métodos. El hecho ya comentado de que las agliconas, como por ejemplo los terpenos, suelen ser compuestos que presentan un gran número de isómeros dificulta la confirmación de la identificación (Barnaba et al., 2017; Barnaba, Dellacassa, et al., 2018; Caffrey et al., 2019, 2020; Flamini et al., 2014; Hjelmeland et al., 2015; Wei et al., 2021). Por otro lado, la baja concentración a la que se encuentran estos componentes, bastante por debajo de la de otros metabolitos secundarios de la uva, como los polifenoles, que además ionizan mucho mejor, dificulta la obtención de señales y sugiere la existencia de problemas de supresión iónica.

Recientemente, se han reportado algunos métodos combinados de separación y aislamiento mediante cromatografía líquida semipreparativa que han permitido comprender mejor la estructura de aglicona de los glicósidos. Schievano et al. (Schievano et al., 2013) realizaron la identificación y caracterización de precursores del aroma presentes en el mosto de uva Moscatel Giallo, utilizando una combinación de resonancia magnética nuclear (RMN) y LC-MS. Para ello, llevaron a cabo una separación preliminar de múltiples fracciones mediante la adsorción en resina Amberlite XAD y cromatografía RP-HPLC (cromatografía de líquidos de fase reversa). Posteriormente, mediante UHPLC-MS, identificaron mono y disacáridos unidos a terpenos, utilizando además técnicas de MS-MS para determinar qué tipo de glicósidos estaban presentes y, en ocasiones, el tipo de terpeno. La RMN fue esencial para la correcta identificación y caracterización de 12 glicósidos de terpenos, aunque este análisis solo fue factible para aquellas fracciones suficientemente concentradas y con pocos componentes que pudieran ser interferencias.

En un trabajo posterior, D'Ambrosio et al. (D'Ambrosio, 2019) proponen un método basado en el reportado anteriormente, realizando separaciones cromatográficas con un sistema de interacción hidrofílica (HILIC) y otro de fase reversa (RP-HPLC) y empleando la RMN para la determinación estructural de precursores glicosídicos en mostos de Moscatel Rosa. Los autores concluyen que la separación cromatográfica de estos compuestos se puede lograr tanto con fases estacionarias de HILIC como de RP-HPLC y que ambos métodos ofrecen un rendimiento de separación distintivo, pudiendo ser utilizados en secuencia para mejorar los resultados de estudios futuros.

Por otro lado, Caffrey et al. (Caffrey et al., 2022) presentan un método para separar precursores glicosídicos en lúpulos. Inicialmente, se fraccionó la muestra utilizando una columna de fenil-hexilo. Posteriormente, cada fracción se sometió a hidrólisis enzimática y se analizó mediante GC-MS, además de analizarse sin hidrolizar utilizando un sistema HPLC-qTOF-MS con una columna de Carbón Poroso Grafitizado (PGC) para identificar un total de 21 glicósidos. Estos incluyen norisoprenoides, monoterpen-polioles, fenoles volátiles y alcoholes alifáticos.

En nuestro caso, y por la disponibilidad de equipamiento, hemos decidido emplear fraccionamientos semipreparativos combinando estrategias de exclusión por tamaños (cromatografía con gel Toyopearl) con separaciones sobre sílica clásica (cromatografía en fase normal). La presencia de moléculas de precursores aromáticos se ha detectado realizando la hidrólisis ácida de las fracciones y los análisis GC-MS correspondientes, lo que nos permite incluir un número de precursores superior al que se detectaría empleando hidrólisis enzimática que emplean otros autores.

El objetivo principal de este capítulo es diseñar una estrategia de fraccionamiento semipreparativo que permita simplificar la enorme complejidad que presentan las muestras de uvas en los análisis UHPLC-MS con el fin de obtener e identificar los precursores glicosídicos de forma individual y establecer asociaciones más unívocas con los aromas que forman, ya sea por hidrólisis directa o tras procesos de rearrreglo molecular.

2. Materiales y métodos

2.1 Preparación de muestras

Para que el estudio fuera lo más simple posible se partió de una variedad bastante conocida que es la Garnacha. Para ello, se tomaron muestras de uvas en estado óptimo de maduración; 12 de la D.O. Ca Rioja y 15 de la D.O. Campo de Borja.

2.1.1 Mistelas

Primeramente, se prepararon mistelas de cada una de las muestras anteriormente mencionadas siguiendo el protocolo descrito por Alegre et al. (Alegre et al., 2020) y que se describe detenidamente en la sección 2.1.1 del capítulo 1.

2.1.2 Fracciones fenólicas aromáticas (FFAs)

Para la obtención de las FFAs se realizó una extracción en Fase sólida (SPE) en C18 según lo descrito también por Alegre et al. (Alegre et al., 2020) y que se detalla en la sección 2.1.2 del capítulo 1.

2.2 Fraccionamiento

Para el proceso de fraccionamiento se empleó una muestra compuesta por una mezcla de las 27 FFAs, tomando 2 mL de cada una de las mistelas. Luego, 18 mL de la mezcla de FFAs de Garnacha se llevó a sequedad en el rotavapor y se redisolvió en 18 mL de vino sintético, preparado a partir de una disolución hidroalcohólica al 12% etanol (v/v), 5 g/L de ácido tartárico y ajustando el pH a 3,5.

2.2.1 Fraccionamiento en Toyopearl

Este primer fraccionamiento se hizo con la colaboración de la Dra. Marivel Gonzalez y la Dra. María Pilar Sáenz del equipo del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) de Logroño, siguiendo la metodología descrita por Sáenz-Navajas et al. (Sáenz-Navajas et al., 2017) con algunas modificaciones.

Procedimiento:

En este procedimiento, se realizó una separación con una columna preparativa Vantage L HW-50F de Millipore (Bedford, MA) (280 mm × 44 mm de diámetro interno) empacada con gel Toyopearl (HW 50F) y donde se inyectó todo el volumen de muestra (18 mL) y se recogió un total de 4 fracciones. Una primera fracción (F1) fue eluida con 2600 mL de etanol/agua/ácido fórmico (55:45:1, v/v/v) a un flujo de 10 mL/min. La segunda fracción (F2) se obtuvo mediante la elución con 770 mL de acetona (100%). La tercera (F3) y cuarta (F4) se eluyeron con 295 y 840 mL de acetona/agua (80:20) y (60:40),

respectivamente. Los disolventes presentes en las cuatro fracciones se evaporaron a vacío y las fracciones se liofilizaron.

Selección por aroma de fracciones del Toyopearl

Para la selección de las fracciones recogidas de la columna de Toyopearl que serían sometidas al fraccionamiento en gel de sílice, cada una de las cuatro fue redisuelta en 18 mL de etanol. Luego, se tomaron 1,5 mL de cada una, se llevaron a sequedad en el rotavapor y se redisolviéron en 10 mL de vino sintético como se explicó anteriormente. Posteriormente, se realizó la hidrólisis ácida en anoxia a 75°C durante 24h. Los hidrolizados de las cuatro fracciones obtenidas de la Toyopearl fueron sometidos a una evaluación sensorial para la detección de la presencia o ausencia de odorantes. Para ello, se pidió a un panel de 6 jueces, miembros del grupo de investigación, con amplia formación y experiencia en análisis sensorial que olieran cada uno de los cuatro viales ordenados al azar y señalaran cuáles de las fracciones presentaban aromas, sin indicar intensidad ni descriptores, solo presencia o ausencia.

2.2.2 Fraccionamiento en gel de sílice

Procedimiento

Para llevar a cabo el fraccionamiento, 10 mL de las fracciones seleccionadas se concentraron por evaporación haciendo pasar una corriente de nitrógeno hasta que se redujo el volumen a 5 mL. Posteriormente, se llevó a cabo el fraccionamiento en una columna empacada con sílica gel de 45 cm de longitud, 2,5 cm de diámetro y un tamaño de partícula de sílice entre 0,04 y 0,06 mm. Se hicieron pasar 150 mL de 8 composiciones de fase móvil, partiendo de acetato etilo con un 30% de metanol (FM1), incrementando a 43% (FM2), 62% (FM3) y a 100% metanol (FM4); luego se pasaron mezclas de metanol y agua, partiendo de un 5% de agua (FM5) e incrementando a 15% (FM6), 50 % (FM 7) y hasta el 100% de agua mili-Q a pH 3,5 (FM8). Para cada composición de fase móvil se recogieron 7 fracciones de 20 mL y una de 10 mL. En total se recogieron 64 fracciones.

2.2.2.1 Selección por aroma de fracciones del gel de sílice

Siguiendo el procedimiento empleado anteriormente con las fracciones obtenidas de la columna de Toyopearl (Sección 2.2.1), cada una de las 64 fracciones resultantes del

fraccionamiento en sílica fueron secadas con corriente de nitrógeno, redisueltas en vino sintético e hidrolizadas a 75°C durante 24 horas. Las fracciones que tenían algún aroma según el panel de jueces fueron seleccionadas para los pasos siguientes.

2.2.2.2 Análisis cualitativo SPME-GC-MS de las fracciones seleccionadas por aroma en el gel de sílice

Cada uno de los hidrolizados de las fracciones que se seleccionaron por el panel fueron sometidos a un análisis semicuantitativo por SPME-GC-MS basado en el método desarrollado por Ferreira et al. (Ferreira et al., 2015).

Según este procedimiento, 250 µL del hidrolizado se pusieron en un vial SPME estándar de 20 mL, se agregaron 4,80 mL de salmuera y 20 µL de la disolución de estándares internos y el vial se cerró con la encapsuladora. El vial se incubó a 60°C durante 1 minuto en el incubador de muestras. Después de esto, los compuestos volátiles se extrajeron del espacio de cabeza con una fibra de divinilbenceno-carboxeno-polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS) con recubrimiento de 50/30 µm, calibre 24 y 2 cm de largo (Supelco, Bellefonte, EE.UU.), previamente acondicionada según las recomendaciones del fabricante (270°C × 10 min). El tiempo de extracción fue de 60 minutos y todos los experimentos se realizaron a una velocidad de agitación constante de 250 rpm. Los compuestos extraídos se desorbieron a 270°C.

El sistema de GC-MS empleado fue el cromatógrafo de gases QP2010 equipado con un detector de espectrómetro de masas de cuadrupolo (Shimadzu, Japón). La columna empleada fue una DB-WAXetr (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm) (Agilent, EE. UU.). El gas portador fue helio a 1,25mL/min. El programa del horno cromatográfico se inició a 50°C durante 3 minutos, la temperatura aumentó a una velocidad de 1°C/min hasta 65°C y luego se elevó a 230°C a 4°C/min y se mantuvo durante 20 minutos. La adquisición se hizo en modo Selected Ion Monitoring (SIM). El listado completo de m/z seleccionadas para la identificación y cuantificación de cada compuesto es el mismo que se emplea en el método de compuestos minoritarios y trazas y que se muestra en la Tabla A1 del Anexo I.

2.3 Análisis UHPLC-QTOF-MS de las fracciones sin hidrolizar seleccionadas en el análisis SPME-GC-MS

Primeramente, 3 mL de cada fracción seleccionada sin hidrolizar se llevaron a sequedad empleando una corriente de nitrógeno y luego fueron redisueltas en 200 μ L de metanol (grado LC-MS) y filtradas por filtros de jeringa de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 μ m de tamaño de poro y 0,13 mm de diámetro (Filter-Bio (ALDO), Madrid, España).

El análisis cromatográfico por UHPLC-QTOF-MS se basó en el descrito por Flamini et al. (Flamini et al., 2014) con algunas modificaciones. Siete μ L de cada fracción se inyectaron y se analizaron en un equipo UHPLC(ESI)-TIMS-QTOF-MS de Bruker Daltonics (Billerica, EE. UU.). Las muestras se mantuvieron a 4°C en el autosampler durante todo el análisis. La columna empleada fue una C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μ m) de Waters (Milford, EE. UU.), que se mantuvo durante todo el análisis a 35°C. Las fases móviles empleadas fueron agua milliQ (solvente A) y acetonitrilo (solvente B) (grado LC-MS, Fisher Scientific, Madrid, España), ambos con un 0,1% de ácido fórmico (grado LC-MS, Fisher Scientific, Madrid, España). El tiempo total del análisis fue de 18,7 minutos y el flujo empleado de 0,3 mL/min. El programa cromatográfico establecido fue el siguiente: se comienza con 5% de la fase B manteniéndolo durante 3,5 min, luego en 5,2 min se va incrementando hasta 45% hasta alcanzar el min 8,7 de análisis, donde se comienza a incrementar hasta 65% que se alcanza en 2,6 min, a partir de este tiempo se aumenta el porcentaje de B hasta el 90% lo que se alcanza en 2,1 min y se mantiene hasta el final del análisis. Las fracciones se analizaron en modo ESI negativo. Se utilizó nitrógeno como gas de secado en la fuente a un flujo de 10 L/min y 220°C. La presión del nebulizador fue de 2,2 bar y el voltaje en el capilar 3600 V. Las condiciones de la fuente fueron las mismas tanto para los análisis de MS como para los de MS/MS. El rango de masas empleado fue de m/z 50-1300 y la adquisición fue de 12 espectros por segundo.

3. Resultados

En este estudio, se prepararon 27 mistelas de Garnacha, que fueron desalcoholizadas hasta alcanzar cerca de un 2% de etanol para la posterior preparación de sus respectivas FFAs. Debido a que cada muestra de uvas tenía un rendimiento diferente, el grado alcohólico de

partida de su correspondiente FFA era por tanto diferente. Para asegurar que todas las muestras tuvieran un contenido de alcohol similar al inicio de la desalcoholización, se ajustó su concentración al máximo rendimiento obtenido entre las muestras (830 mL por Kg de uva), diluyendo cada mistela con agua miliQ hasta este volumen. Esto permitió unificar el contenido alcohólico inicial y fijar la desalcoholización hasta un mismo nivel (450 mL), asegurando una concentración de alcohol remanente equivalente en todas las muestras.

3.1 Fraccionamiento con el gel Toyopearl

Para el fraccionamiento en Toyopearl se partió de 18 mL de una mezcla equitativa de las 27 FFAs de Garnacha, que fue reconstituida en vino sintético. En este fraccionamiento se recogieron cuatro fracciones bien caracterizadas en cuanto a su composición fenólica según lo descrito por Sáenz-Navajas et al. (Sáenz-Navajas et al., 2017). La F1 está compuesta en esencia por compuestos fenólicos de bajo peso molecular como los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico y sus ésteres, monómeros y dímeros de flavanoles y flavonoles, y glicósidos. Por otra parte, las fracciones F2, F3 y F4 contienen compuestos de alto peso molecular desde trímeros hasta decámeros de flavanoles. Las fracciones una vez obtenidas se destilaron en el rotavapor para eliminar los disolventes orgánicos y se liofilizaron. En la figura 1 se muestra el sistema empleado en el ICVV para realizar el procedimiento.

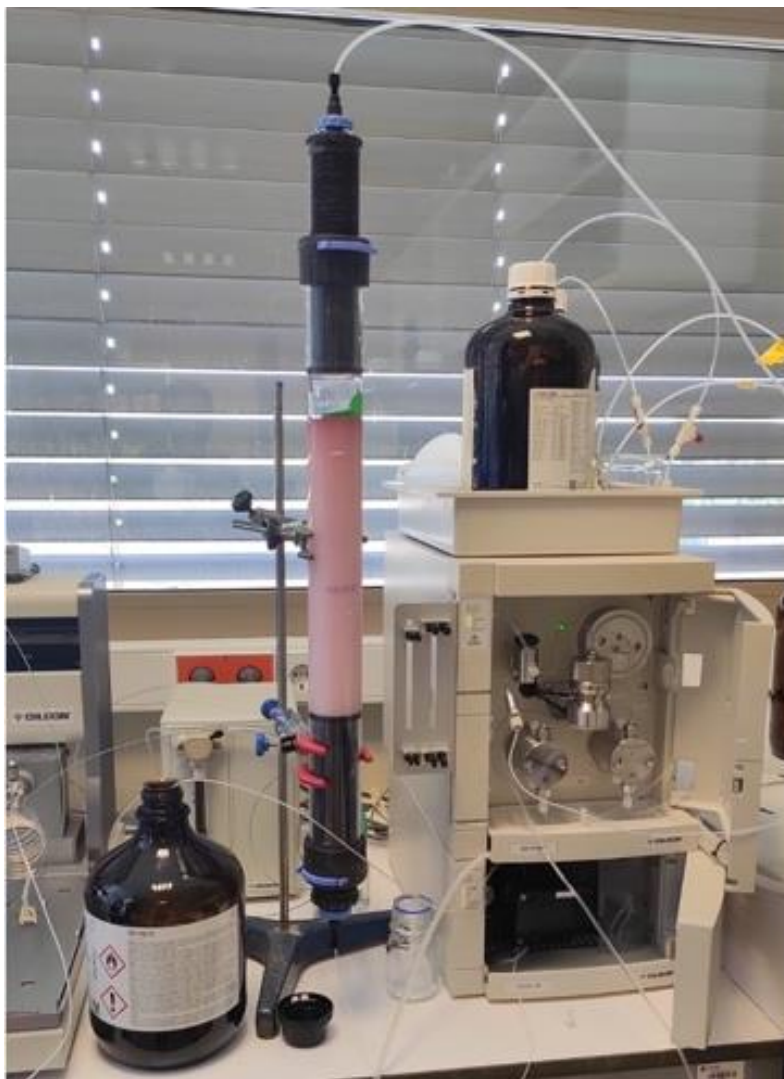


Fig.4.1. Sistema cromatográfico empleado para el fraccionamiento con el gel Toyopearl

Selección sensorial de fracciones de Toyopearl

Una vez obtenidos los crudos de las fracciones, el objetivo perseguido era localizar en qué fracciones podrían estar los precursores glicosídicos. Para evaluar esto, las cuatro fracciones se redisolvió en etanol. Se tomaron 1,5 mL de cada una, se secaron y reconstituyeron en 10 mL de vino sintético y se hidrolizaron en anoxia durante 24 horas a 75°C. Las cuatro fracciones hidrolizadas se analizaron sensorialmente por un panel de 6 jueces entrenados, que indicaron que la primera fracción (F1) olía muy similar a los reconstituidos de FFA (que antes se habían estudiado en nuestro laboratorio) y que el resto no presentaba aromas. De esta forma, se pudo confirmar que los precursores objetivo estaban en la F1, como cabía esperar, según el contenido de esta fracción.

3.2 Fraccionamiento en columna de sílica de la F1

Una vez identificada F1 como la fracción de interés se partió de esta para realizar otro fraccionamiento con el objetivo de separar todo lo posible esos precursores de aromas. En la figura 2 se muestra el sistema empleado para el fraccionamiento en gel de sílice. Se recogieron 64 fracciones producto de la recolección de 8 fracciones por cada una de las 8 fases móviles empleadas, en las que aumentaba progresivamente la polaridad y la fuerza de elución. En la figura 2, del lado derecho, se puede observar claramente una separación de colores en el lecho cromatográfico indicando una separación de compuestos con color, lo que nos puede dar idea de que también están siendo separados nuestros compuestos objetivo, los precursores glicosídicos.



Fig.4.2. Sistema cromatográfico empleado para el fraccionamiento con sílica. En el lado izquierdo se muestra el sistema a poco de comenzar el análisis y en la derecha transcurrido un tiempo.

Selección sensorial de las fracciones de sílica

Las 64 fracciones obtenidas fueron estudiadas por separado para saber si podrían contener precursores del aroma. Esto se realizó siguiendo el mismo procedimiento que con las

fracciones de la Toyopearl: realizando una reconstitución de las fracciones llevándolas a sequedad y redisolviéndolas en vino sintético para posteriormente hidrolizarlas en anoxia durante 24h a 75°C.

La evaluación del panel de jueces arrojó como resultado que 41 del total de fracciones contenían algún aroma. En la figura 4.3 se muestran las 64 fracciones y en rojo aparecen señaladas las 41 fracciones seleccionadas por los jueces del panel. Como se observó antes en la figura 4.2, se pueden apreciar también las diferencias de color que existen entre las fracciones y entre las distintas fases móviles.

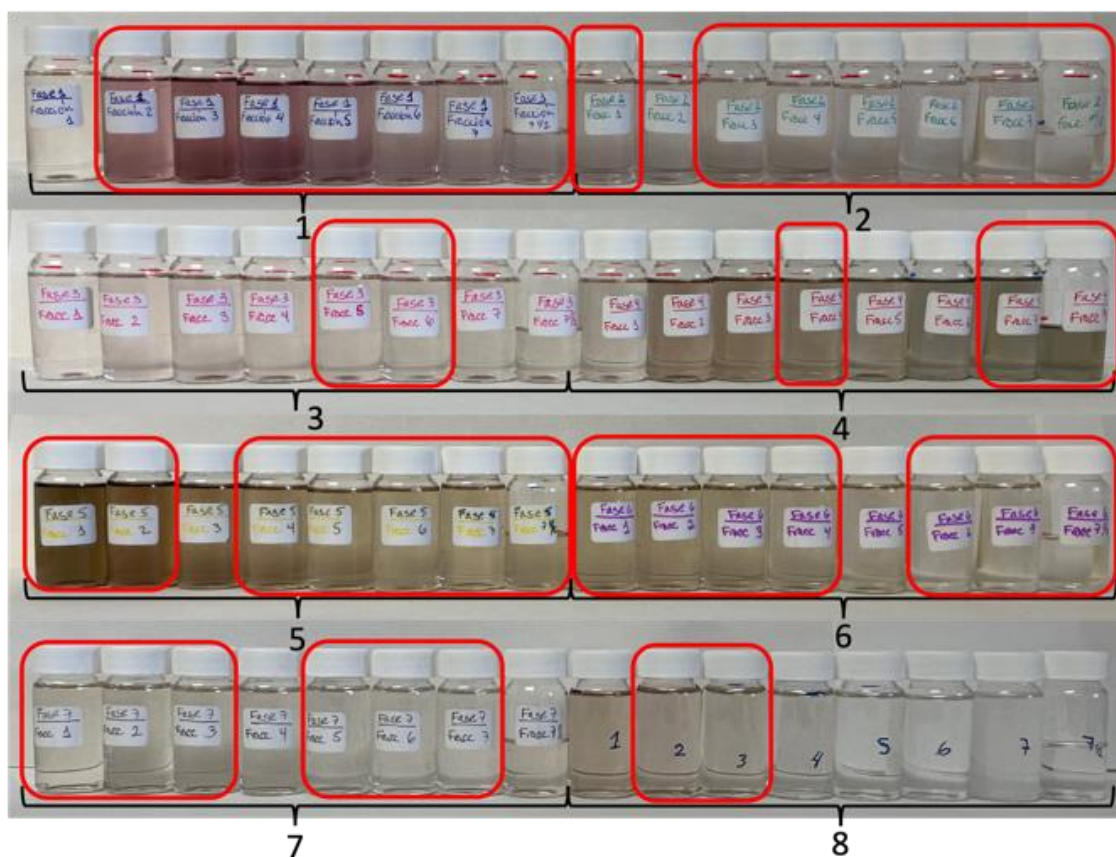


Fig. 4.3. Fracciones obtenidas de la separación en sílica gel. Los números del 1-8 representan las distintas composiciones de fase móvil. En rojo, las fracciones seleccionadas por los jueces porque contenían aromas

3.2.1 Análisis SPME-GC-MS

Los 41 hidrolizados de las fracciones que presentaban aromas fueron analizadas por SPME-GC-MS para identificar cuáles contenían compuestos de interés (norisoprenoides, terpenos, fenoles volátiles y otros).

En la figura 4.4 se muestra el gráfico de distribución, del área relativa al estándar interno de cada compuesto de interés en las 41 fracciones hidrolizadas analizadas.

Distribución de los aromas de interés por zonas

- Los resultados encontrados sugieren que existe una primera zona, a la que denominaremos zona 1, correspondiente a la fase móvil de menor fuerza empleada en el fraccionamiento, donde se concentraban mayoritariamente los aromas de algunos norisoprenoides: vitispiranos, TDN, Riesling acetal y β -damascenona. En esta zona también se encontraban algunos terpenos (linalol, óxido de linalol, α -terpineol y, aunque de manera no tan clara el geraniol. También aparecen algunos fenoles como los vinilfenoles y el guaiacol.
- Luego existe otra zona de fuerza media, denominada zona 2, donde se encontró casi exclusivamente, aunque en muy baja intensidad, el cinamato de etilo.
- Por último, procedente de las fracciones eluidas con la fase móvil más polar se encontraban algunos fenoles (m-cresol y 4-etilfenol) y los isómeros α - y β -ionona, ambos en muy bajas cantidades. Esta zona será denominada zona 3.

Es relevante destacar que algunos aromas se encontraron en más de una zona, como por ejemplo el 4-vinilfenol y el linalol. Esto pudiera deberse a la presencia de precursores con estructuras distintas, bien en las agliconas, bien en la parte glicosídica, en cualquier caso, con una polaridad lo suficientemente diferente como para que se separen en la columna de sílica.

A pesar de las bajas intensidades detectadas, lo que era de esperar dadas las bajas concentraciones a las que se encuentran los precursores, se pudo establecer que el área de mayor intensidad y presencia de compuestos es la fase inicial del fraccionamiento. Esto sugiere que quizás se podría haber comenzado con fases de menor fuerza para mejorar la separación. En futuros desarrollos esta modificación habrá de ser considerada.

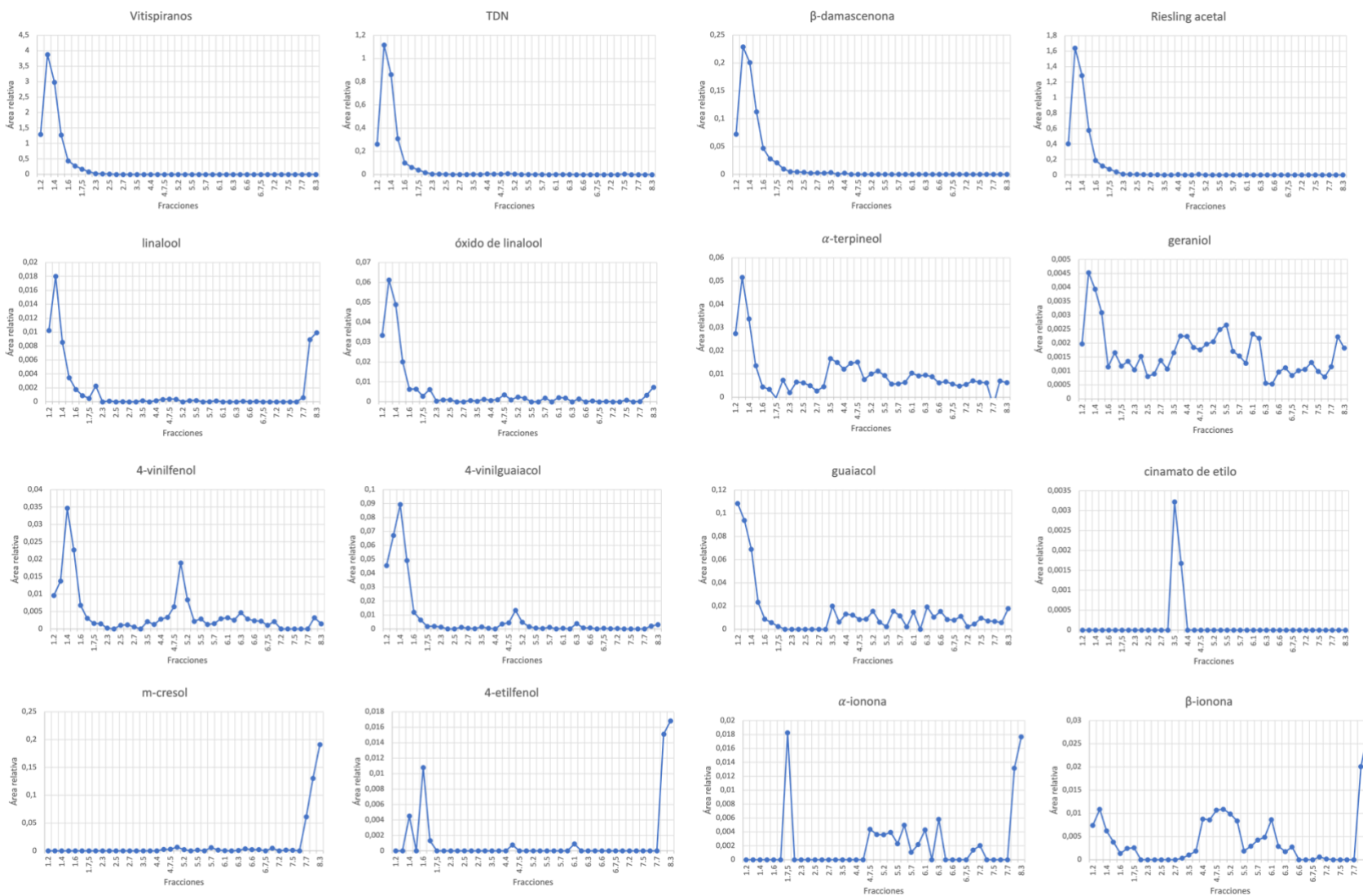


Fig. 4.4 Evolución del área relativa de cada compuesto en las fracciones estudiadas

3.3 Análisis UHPLC-QTOF-MS/MS

Una vez conocido el comportamiento de los compuestos aromáticos de interés y su distribución por zonas en cada una de las fracciones, empleamos un análisis UHPLC-qTOF-MS para intentar identificar los precursores glicosídicos responsables de cada aroma en cada fracción.

Tratamiento de los datos y flujo de trabajo seguido

Una vez realizados los análisis se procedió a tratar los resultados con el software Metaboscape (Bruker, Alemania) que permite obtener una tabla de todos los “*features*” detectados en el set de muestras. Así se hizo para cada una de las tres zonas indicadas anteriormente.

Para ello, dividimos los análisis de las fracciones por grupos asociados a las tres zonas donde se detectaron mayoritariamente los aromas de interés. El objetivo era aprovechar la distribución de aromas entre las distintas fracciones consecutivas de cada grupo -en forma de pico cromatográfico, tal y como se vio en la figura anterior- para centrar nuestra atención en aquellos picos o *features* que siguieran una distribución entre las fracciones lo más similar posible a la observada en los distintos aromas; o sea, que la fracción con mayor intensidad en un tipo de aroma coincidiera con la fracción en la que el *feature* (posible candidato de precursor) tuviera su máxima intensidad. El parámetro empleado fue el coeficiente de correlación entre la serie de señales del precursor medido en las fracciones de cada zona y la del aroma presente en ellas.

Esta estrategia resultó ser bastante complicada ya que por una parte existía un número bastante considerable de *features* en cada una de las tres zonas analizadas y por otro lado es de considerar el hecho de que el aroma medido era el aroma total en cada fracción y este podría ser el resultado de la hidrólisis tanto directa o por reordenamiento de uno o más precursores. Por ello esta estrategia se ha empleado como criterio no exclusivo, no habiéndose empleado para descartar un posible precursor solo por no cumplir el perfil del aroma en cuestión.

Una vez considerado este hecho, se siguió un flujo de trabajo que nos permitiera tratar el gran volumen de datos y acotar todo lo posible el número de posibles precursores.

Primeramente, se elaboraron unas bases de datos o *Target Lists*. La primera contenía la masa exacta y la fórmula molecular de todas las posibles combinaciones de azúcares, incluidos los monosacáridos (pentosa, hexosa y deoxihexosa) y todas las posibles combinaciones resultantes de disacáridos y trisacáridos, con cada uno de los aromas de los compuestos que se determina en el método de SPME-GC-MS empleado anteriormente y otros aromas de interés que se referencian en la bibliografía (Tabla 4.1) que, en principio, por su estructura (un grupo -OH libre) pudieran formar un enlace glicosídico con un azúcar. Además, se incluyó en esta lista también la m/z del posible aducto con fórmico que se conoce que forman estos glicósidos. Además, se hizo otra base de datos donde se incluyeron varios precursores que se han reportado anteriormente por Barnaba et al. (Barnaba et al., 2017; Barnaba, Dellacassa, et al., 2018), Caffrey et al. (Caffrey et al., 2019, 2020), Flamini et al. y Wei et al. (Wei et al., 2021). Estas bases de datos se introdujeron en el software de Metaboscape para detectar qué features podían ser por su masa exacta un posible precursor, lo que hizo posible descartar, del total inicial, un número considerable de features que no cumplían estas condiciones.

El próximo paso era la obtención de los respectivos espectros de masas/masas para poder comprobar la estructura de cada posible precursor. Para ello, se empleó el método de las listas de precursores (SPL: Scope Precursor List) que permiten obtener el patrón de fragmentación de las m/z buscadas en un tiempo acotado.

Una vez obtenidos los espectros MS^2 de una gran parte de los posibles precursores pasamos a comprobar su estructura. Para la comprobación de la estructura se hizo uso de la presencia de los fragmentos: $[M-H]^-$ y/o $[M+HCOOH-H]^-$ (aducto con fórmico), el fragmento de la aglicona (Tabla 4.1), los correspondientes a los azúcares simples, disacáridos y trisacáridos (Tabla 4.2) y a los resultantes de las pérdidas neutras de los mismos. El criterio aceptado de error para la masa experimental de los fragmentos fue de ± 5 ppm respecto a la masa teórica.

Tabla 4.1. Listado de los fragmentos [M-H]⁻ de las agliconas de los compuestos de la base de datos

Familia	Compuesto	[M-H] ⁻ (m/z)
Terpenos	óxido de linalol	169,1234
	citronelol /dihidromircenol	155,1441
	linalol/ α -terpineol/ nerol/ geraniol	153,1285
	geranic acid	167,1077
	ipsdienol	151,1184
	hidroxicitronelol	173,1547
	hidroxi-dihidro-linalol	171,139
	dihidroxi-dihidro-linalol	187,1339
Norisoprenoides	Riesling acetal	225,1495
	Grupo 1: 3-hidroxi-7,8-dehidro- β -ionol/ 3-oxo- α -ionol/ 3-oxo-retro- α -ionol/ 4-oxo- β -ionol/3-hidroxi- β -ionona	207,1390
	Grupo 2: 3-hidroxi- β -ionol/ 3-oxo-4,5-dihidro- α -ionol/ 3-oxo-7,8-dihidro- α -ionol/ 4-oxo-7,8-dihidro- β -ionol/ 8-hidroxitaspirano	209,1547
	Grupo 3: 3-hidroxi-7,8-dihidro- β -ionol/ 3-oxomegastigman-9-ol	211,1703
	Grupo 4: 3,4-dihidroxi- β -ionona/3-hidroxi-5,6-epoxi- β -ionona/ 3,4-dihidro-3-oxoactinidol/ vomifoliol/ 3,5-dihidroxi-6,7-megastigmadien-9-ona	223,1339
	3,4-dihidroxi-7,8-dihidro- β -ionol	227,1653
	3-hydroxy-TDN	189,1285
	Fenoles volátiles	guaiacol
4-metilguaiacol		137,0608
cresol		107,0502
eugenol/isoegenol		163,0765
4-vinilfenol		119,0502
4-vinilguaiacol		149,0608
siringol		153,0557
etilfenol		121,0659
metoxieugenol		193,087
Derivados de la vainillina	vainillina	151,0401
	acetovanillone	165,0557
	siringaldehído	181,0506
	ácido vainílico	167,0349
Mercaptanos polifuncionales	3-mercaptohexanol	133,0692
Derivados del ácido cinámico	ácido cinámico	147,0451
	ácido monohidroxicinámico	163,04
	ácido dihidroxicinámico	179,0349

Tabla 4.1. Listado de los fragmentos [M-H]⁻ de las agliconas de los compuestos de la base de datos

Familia	Compuesto	[M-H] ⁻ (m/z)
	ácido monohidroximetoxicinámico	193,0506
Derivados del ácido benzoico	ácido monohidroxibenzoico	137,0244
	ácido dihidroxibenzoico	153,0193
	ácido trihidroxibenzoico	169,0142
	ácido monohidroxidimetoxibenzoico	197,0455
Otros	monohidroximetoxiacetofenona	149,0608
	monohidroxidimetoxiacetofenona	195,0662

Tabla 4.2. Fragmentos característicos que indican la presencia de los diferentes azúcares en la estructura del precursor

Azúcares	Fragmentos (m/z)
pentosa	131,0350
	149,0455
hexosa	161,0455
	179,0561
deoxihexosa	145,0506
	163,0612
pentosa-hexosa	293,0878
	311,0983
hexosa-hexosa	323,0984
	341,1089
hexosa-deoxihexosa	307,1035
	325,1140
pentosa-pentosa	263,0772
	281,0878
hexosa-hexosa-pentosa	455,1406
	473,1511
hexosa-hexosa-hexosa	485,1511
	503,1617
pentosa-pentosa-hexosa	425,1300
	443,1406
pentosa-hexosa-deoxihexosa	439,1457
	457,1562

3.3.1 Identificación de posibles precursores del aroma

Siguiendo las estrategias antes descritas, se comprobó la estructura de todos los posibles features previamente seleccionados como posibles precursores de los cuales se pudo obtener su espectro de MS². Como resultado, se obtuvieron 49 potenciales precursores que se recogen en la Tabla 4.3, ordenados por zonas y entre ellas por tiempo de retención, 26 de estos potenciales precursores glicosídicos del aroma se reportan por primera vez.

En el Anexo se muestran para cada posible candidato de la tabla 4.3, los gráficos del perfil de intensidades en las fracciones.

Zona 1

Cabe destacar que, al estar la mayoría de los aromas en la que hemos denominado zona 1, se centraron más los esfuerzos en obtener espectros de masas-masas para estas fracciones. En esta zona debíamos buscar posibles precursores de algunos fenoles como guaiacol y los vinilfenoles, terpenos y norisoprenoides.

Potenciales precursores de fenoles volátiles:

En específico, para el guaiacol se encontraron cuatro posibles precursores (No.: 1, 5, 8 y 22) que cumplían en mayor o menor medida con el perfil del compuesto en las fracciones. Tres de estos potenciales precursores presentaron una correlación positiva con la intensidad del guaiacol en las fracciones hidrolizadas analizadas por SPME-GC-MS, como se muestra en la tabla 4.3. pero no fue posible obtener sus correspondientes patrones de fragmentación (5, 8 y 22). Esto se debe principalmente a la baja intensidad de las señales, en todos los casos del orden de 10³ cuentas, ya que experimentalmente se determinó que si en el análisis LC-MS la intensidad del feature era menor o muy cerca de 10⁴ cuentas, no era posible obtener espectros de MS² porque la intensidad de los iones precursores es demasiado baja.

Se encontró también un posible precursor del 4-etilguaiacol (No. 6) y dos del 4-metilguaiacol (No. 2 y 4), pero solo fue posible justificar la estructura de estos últimos por la presencia de fragmentos en sus espectros de MS². Por otro lado, fue posible determinar que existían para ellos, correlaciones positivas con el guaiacol.

En el caso del 4-vinilfenol, se encontraron algunos posibles candidatos que fueron descartados por su espectro de masas/masas ya que se encontraron fragmentos que descartaban la estructura propuesta. Sin embargo, se identificó un posible precursor (No. 23) que, aunque no cumple exactamente con el perfil de intensidades observado en las fracciones y por lo tanto no presenta una correlación positiva con el 4-vinilfenol en las fracciones hidrolizadas, contiene fragmentos que justifican su estructura, incluida la aglicona.

Potenciales precursores de terpenos:

En el caso de los terpenos se identificaron 18 posibles candidatos de los cuales además fue posible obtener sus respectivos espectros de masas-masas que justifican la estructura propuesta y para 14 de ellos existen correlaciones positivas con el aroma de terpenos en las fracciones hidrolizadas. Entre estos potenciales precursores se encuentran:

- dos disacáridos del ácido geránico (No.: 35 y 36), el cual no se determinó en el análisis por SPME-GC-MS, pero asumimos que su comportamiento podría ser similar a la de otros terpenos.
- 6 disacáridos de monoterpenoles (No.: 29-34), de los cuales cuatro son de pentosa-hexosa. En este caso, aunque en el nombre para generalizar lo hemos señalado como linalol, también están incluidos sus isómeros: α -terpineol, nerol y geraniol, como se describe en la tabla 4.1.
- 5 disacáridos también de pentosa-hexosa de óxido de linalol (No: 10, 13, 19, 21 y 25).
- un disacárido de monoterpendiol (No. 18), un disacárido de hidroxicitronelol (No. 24), dos de monoterpentriol (No.: 16 y 17) e incluso uno de tetraol (No. 3) que ya fue identificado por primera vez en uvas de las variedades Riesling y Moscatel de Alejandría por Caffrey et al. (Caffrey et. al, 2020).

Como se puede observar en algunos casos y más adelante también se verá, se encontraron para la misma aglicona más de un precursor con la misma estructura de azúcares, por ejemplo: hexosa-pentosa, debido a la existencia de diversos isómeros de hexosas y pentosas que existen en la naturaleza, de los cuales no podemos explicar su estructura exacta mediante el método empleado.

Además, aunque en general, se creía que una glucopiranososa (hexosa = glucosa) era siempre el azúcar principal unido a la aglicona (Winterhalter & Skouroumounis, 1997); recientemente, se han identificado tentativamente glicósidos sesquiterpénicos en uvas moscatel de Alejandría y glicósidos relacionados con el “smoke taint” (gusto a humo) en uvas Cabernet Sauvignon expuestas al humo, donde se ha evidenciado que es posible que puedan presentar otras estructuras de azúcares unidas directamente a la aglicona (Caffrey et al., 2019, 2020).

Potenciales precursores de norisoprenoides:

Para los norisoprenoides se encontraron 10 posibles precursores con sus respectivos espectros de masas-masas que justifican en mayor o menor medida la estructura propuesta. Siete de estos potenciales precursores presentan correlaciones positivas con el aroma de norisoprenoides en las fracciones hidrolizadas.

En el caso de las moléculas de esta familia analizadas en el método de GC-MS, solo el Riesling acetal posee un -OH libre, que pudiera permitir que existan precursores directos de este compuesto, no así para el TDN, vitispiranos y β -damascenona, los cuales necesitan de deshidrataciones y reordenamientos para formarse. En estos casos, recurrimos a la literatura para encontrar las agliconas de las que potencialmente derivan, tal y como han señalado algunos autores (Caffrey et al., 2020; Gök et al., 2022). En la tabla 4.1 se muestran los fragmentos de estas posibles agliconas.

Para el Riesling acetal se encontraron 4 posibles precursores; dos monosacáridos (No.: 15 y 20) y dos disacáridos (No.: 11 y 14). Cabe destacar que en los cuatro casos se encontró el fragmento de la aglicona correspondiente.

Los restantes 6 posibles precursores (No.: 7, 12, 26, 27 y 28) se corresponden con norisoprenoides de los grupos 1, 2 y 4 (Tabla 4.1) tanto monosacáridos como disacáridos.

Zona 2

En esta zona encontramos exclusivamente el cinamato de etilo del cual no se conoce mucho de sus precursores, pero que pudiera formarse a través de la esterificación del ácido cinámico, el cual al tener un grupo -OH pudiera formar enlaces glicosídicos con azúcares. Por lo que, en este caso, hicimos una Target List con las combinaciones del ácido cinámico y los distintos azúcares.

Primeramente, era necesario que los potenciales precursores cumplieran con el error en la masa experimental de ± 5 ppm respecto a la masa teórica y, en segundo lugar, que cumplieran en alguna medida con el perfil de intensidad del cinamato de etilo en las fracciones hidrolizadas. Esto redujo el número de posibles candidatos a 10 que aparecen enumerados en la tabla 4.3 y señalados dentro de la zona 2.

Entre los potenciales precursores identificados se encuentran cuatro trisacáridos y el resto disacáridos. Los espectros de MS^2 de estos candidatos no se pudieron obtener debido a la baja intensidad de las señales en todo caso del orden de 10^3 cuentas, como se explicó anteriormente. Para un potencial disacárido de pentosa-deoxihexosa (No. 45) se encontró una correlación positiva con el cinamato de etilo.

Zona 3

En esta última zona se buscaban precursores relacionados con el m-cresol y los isómeros α - y β -ionona. Para estos últimos, fue imposible obtener ningún candidato viable ya que las intensidades de las señales en esta zona eran demasiado bajas.

En el caso del m-cresol se encontraron 3 posibles candidatos de monosacáridos, señalados dentro de la zona 3 en la tabla 4.3, pero en ningún caso se pudo obtener el espectro de masas que justificara una estructura. Uno de ellos, un potencial monosacárido de deoxihexosa (No. 49), presenta una correlación positiva con el aroma del m-cresol en las fracciones hidrolizadas.

Tabla 4.3 Identificación de potenciales precursores en las fracciones

No.	Zona ^(a)	Tr. (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion detectado	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. ^(b)	R ² ^(c)
1	Z1	3,71	guaiacol-hexosa	C13H18O7	286,1051	331,1033	[M+HCOOH-H] ⁻	125,0246, 161,0457 y 179,0561		(1)	
2	Z1	6,07	4-metilguaiacol-hexosa	C14H20O7	300,1207	345,1187	[M+HCOOH-H] ⁻	299,1135, 143,0349, 161,0456 y 179,0565	137,0608		guaiacol: 0,83**
3	Z1	6,14	dihidro-monoterpen-tetraol-hexosa	C16H30O9	366,1886	411,1865	[M+HCOOH-H] ⁻	365,1807 y 161,0455	203,1285		
4	Z1	6,20	4-metilguaiacol-pentosa-hexosa	C19H28O11	432,1632	431,1559	[M-H] ⁻	119,0350, 125,0242, 131,0350, 149,0450, 161,0453 y 179,057		(1)	guaiacol: 0,88**
5	Z1	6,28	guaiacol-pentosa-pentosa	C17H24O10	388,1369	433,1351	[M+HCOOH-H] ⁻				guaiacol: 0,79**
6	Z1	6,3	4-etilguaiacol-hexosa-hexosa-hexosa	C27H42O17	638,2413	683,2395	[M+HCOOH-H] ⁻				guaiacol: 0,98***
7	Z1	7,03	norisoprenoide grupo 4-pentosa-hexosa	C24H38O12	518,2362	517,2289	[M-H] ⁻	563,2343, 131,0353, 149,0457, 161,0452, 293,0877, 311,0979, 205,1238, 385,1861 (pérdida de pentosa)	223,1339	(2)	TDN: 0,75*/Riesling acetal: 0,76*/ β-damascenona: 0,76*
8	Z1	7,04	guaiacol-pentosa	C12H16O6	256,0944	255,0871	[M-H] ⁻			(3)	guaiacol: 0,85**
9	Z1	7,08	norisoprenoide grupo 4-hexosa	C19H30O8	386,1938	431,192	[M+HCOOH-H] ⁻	385,1859, 161,0460, 179,0560, 153,0923, 205,1230		(2)	
10	Z1	7,11	óxido de linalol-pentosa-hexosa 1	C21H36O12	464,2254	509,2237	[M+HCOOH-H] ⁻	463,2178, 131,0351, 149,0451, 161,0453, 179,0559, 293,0875, 311,0981 y 331,1759		(2)	óxido de linalol: 0,58*/ geraniol: 0,81**
11	Z1	7,12	Riesling acetal-pentosa-hexosa	C25H42O11	520,2506	565,2496	[M+HCOOH-H] ⁻	519,2437, 131,0355, 149,0452, 161,0454, 179,0558, 293,0880, 311,0980, 387,2020, 223,1336, 207,1384	225,1506		TDN: 0,82*/Riesling acetal: 0,83***/ β-damascenona: 0,84***/vitispiranos: 0,88**
12	Z1	7,13	norisoprenoide grupo 4-hexosa-deoxihexosa	C25H40O12	532,252	577,2501	[M+HCOOH-H] ⁻	531,2440, 161,0461, 179,0559, 163,0612, 145,0504, 307,1040, 325,1133, 205,1224		(4)	

Tabla 4.3 Identificación de potenciales precursores en las fracciones

No.	Zona ^(a)	Tr. (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion detectado	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. ^(b)	R ² ^(c)
13	Z1	7,27	óxido de linalol-pentosa-hexosa 2	C21H36O13	464,2254	509,2236	[M+HCOOH-H] ⁻	463,2180, 311,0985, 293,0877, 161,0456, 149,0456, 131,0355		(2)	óxido de linalol: 0,64*
14	Z1	7,44	Riesling acetal-hexosa-deoxihexosa	C25H42O12	534,2679	533,2606	[M-H] ⁻	579,2649, 161,0450, 179,0560, 163,0615, 325,1131, 307,1043, 387,2023 (pérdida de deoxihexosa)	225,1499		
15	Z1	7,48	Riesling acetal-hexosa 1	C19H32O9	388,2091	433,2075	[M+HCOOH-H] ⁻	387,2020, 161,0455, 179,0561, 153,0921, 205,1234		(2)	Riesling acetal: 0,71*/ β-damascenona: 0,74*/vitispiranos: 0,77**
16	Z1	7,53	monoterpentriol-pentosa-hexosa	C21H36O12	480,2206	525,2185	[M+HCOOH-H] ⁻	479,2126, 131,0350, 149,0455, 161,0454, 293,0875 y 311,0982	185,1183	(2)	geraniol: 0,73*/ α-terpineol: 0,65*
17	Z1	7,57	monoterpentriol-hexosa-deoxihexosa	C22H38O12	494,2349	539,23316	[M-H] ⁻	493,2289, 347,1699 (pérdida de deoxihexosa), 307,1040, 161,0456, 163,0612, 145,0507	185,1180	(2)	linalol: 0,94***/ α-terpineol: 0,93***
18	Z1	7,58	dihidro-monoterpendiol-pentosa-hexosa	C21H38O11	466,2403	511,2388	[M+HCOOH-H] ⁻	465,2334, 131,0351, 149,0456, 161,0461, 179,0559, 293,0882 y 311,0987		(2)	
19	Z1	7,64	óxido de linalol-pentosa-hexosa 3	C21H36O14	464,2253	509,2235	[M+HCOOH-H] ⁻	463,2183, 131,0351, 149,0455, 161,0454, 179,0562, 293,0874, 331,1758 y 311,0989	169,1234	(2)	óxido de linalol: 0,95***/linalol: 0,9***/geraniol: 0,83**
20	Z1	7,77	Riesling acetal-hexosa 2	C19H32O8	388,2091	433,2073	[M+HCOOH-H] ⁻	387,2023, 161,0458, 179,0558	225,1496	(2)	TDN: 0,78*/Riesling acetal: 0,79***/ β-damascenona: 0,79***/vitispiranos: 0,85**
21	Z1	7,79	óxido de linalol-pentosa-hexosa 4	C21H36O11	464,2254	509,2237	[M+HCOOH-H] ⁻	463,2178, 131,0351, 149,0455, 161,0454, 179,0562, 293,0874 y 311,0989		(2)	

Tabla 4.3 Identificación de potenciales precursores en las fracciones

No.	Zona ^(a)	Tr. (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion detectado	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. ^(b)	R ² ^(c)
22	Z1	7,79	guaiacol-pentosa-deoxihexosa	C18H26O10	402,1513	447,1495	[M+HCOOH-H] ⁻				guaiacol: 0,91***
23	Z1	7,83	4-vinilfenol-hexosa-deoxihexosa	C20H28O10	428,1679	473,1661	[M+HCOOH-H] ⁻	427,1597, 161,0458 y 307,1027	119,0505		
24	Z1	7,84	hidroxicitronelol-pentosa-hexosa	C21H40O11	468,2564	513,2547	[M+HCOOH-H] ⁻	467,2493, 131,0353, 149,0459, 161,0453, 179,0564, 293,0878, 467,2492, 335,2075 (pérdida de pentosa)	173,1546		
25	Z1	7,98	óxido de linalol-pentosa-hexosa 5	C21H36O15	464,2253	509,2235	[M+HCOOH-H] ⁻	463,2183, 131,0349, 149,0453, 161,0455, 179,0558, 293,0879 y 311,0980		(2)	óxido de linalol: 0,95***/ geraniol: 0,68*
26	Z1	8,05	norisoprenoide grupo 2-pentosa-hexosa	C25H42O13	504,2566	549,2544	[M+HCOOH-H] ⁻	503,2494, 131,0349, 149,0453, 161,0456, 179,0559, 293,0879, 311,0980 y 371,2076 (pérdida de pentosa)	209,1542		TDN: 0,82*/Riesling acetal: 0,85***/ β-damascenona: 0,90***/vitispiranos: 0,79**
27	Z1	8,09	norisoprenoide grupo 1-pentosa-hexosa	C24H38O11	502,2409	547,2391	[M+HCOOH-H] ⁻	501,2342, 131,0351, 149,0455, 161,0454, 179,0563, 293,0880 y 311,0982	207,1386		TDN: 0,80*/Riesling acetal: 0,84***/ β-damascenona: 0,87***/vitispiranos: 0,77**
28	Z1	8,34	norisoprenoide grupo 1-hexosa	C19H30O7	370,1988	415,197	[M+HCOOH-H] ⁻	161,0456, 179,0563	207,1394		TDN: 0,79*/Riesling acetal: 0,80***/ β-damascenona: 0,81***/vitispiranos: 0,80**
29	Z1	8,64	linalol-hexosa-hexosa	C22H38O11	478,2409	477,2336	[M-H] ⁻	161,0456, 179,0556 y 341.1099			linalol: 0,70*/ α-terpineol: 0,62*
30	Z1	8,78	linalol-pentosa-hexosa 1	C21H36O10	448,2303	493,2289	[M+HCOOH-H] ⁻	447,2230, 149,0453, 161,0456, 293,0864 y 315,1808 (pérdida de pentosa)		(5)	geraniol: 0,81***

Tabla 4.3 Identificación de potenciales precursores en las fracciones

No.	Zona ^(a)	Tr. (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion detectado	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. ^(b)	R ² ^(c)
31	Z1	8,98	linalol-pentosa-hexosa 2	C21H36O10	448,2304	493,2286	[M+HCOOH-H] ⁻	447,2229, 131,0350, 149,0455, 161,0455 y 293,0877		(5)	linalol: 0,65*
32	Z1	9,09	linalol-hexosa-deoxihexosa	C22H38O10	462,2461	507,2443	[M+HCOOH-H] ⁻	461,2389, 163,0611, 179,0558 y 205,0714		(5)	linalol: 0,58*
33	Z1	9,21	linalol-pentosa-hexosa 3	C21H36O10	448,2304	493,2287	[M+HCOOH-H] ⁻	447,2239, 131,0351, 149,0454, 161,0457, 179,0559, 293,0878 y 311,0982		(5)	linalol: 0,76*/ α -terpineol: 0,68*
34	Z1	9,3	linalol-pentosa-hexosa 4	C21H36O10	448,2305	447,2233	[M-H] ⁻	131,0346, 149,0454, 161,0451, 179,0558, 315,1806		(5)	linalol: 0,72*/ α -terpineol: 0,82**/geraniol:0,89**
35	Z1	9,31	ácido geránico-hexosa-deoxihexosa	C22H36O11	476,2258	521,2238	[M+HCOOH-H] ⁻	475,2180, 163,0612, 145,0506, 307,1033 y 325,1130	167,1076	(4)	linalol: 0,77**/ α -terpineol: 0,70* geraniol: 0,8**/ linalol: 0,94***/ α -terpineol: 0,98**
36	Z1	9,37	ácido geránico-pentosa-hexosa	C21H34O11	462,2096	507,2082	[M+HCOOH-H] ⁻	461,2028, 131,0348, 149,0457, 161,0453, 293,0879, 311,0979 y 299,1503 (pérdida de hexosa)	167,1078	(4)	linalol: 0,94***/ α -terpineol: 0,98**
37	Z2	6,4	ácido cinámico-deoxihexosa-hexosa-pentosa 1	C26H36O15	588,2052	587,1980	[M-H] ⁻				
38	Z2	6,58	ácido cinámico-hexosa-hexosa 1	C21H28O12	472,1577	517,1559	[M+HCOOH-H] ⁻				
39	Z2	6,96	ácido cinámico-pentosa-deoxihexosa 1	C20H26O10	426,1538	425,1465	[M-H] ⁻				
40	Z2	7,23	ácido cinámico-deoxihexosa-hexosa-pentosa 2	C26H36O15	588,2045	587,1972	[M-H] ⁻				
41	Z2	7,45	ácido cinámico-deoxihexosa-hexosa-pentosa 3	C26H36O15	588,2043	587,1970	[M-H] ⁻				
42	Z2	7,49	ácido cinámico-hexosa-hexosa-hexosa	C27H38O17	634,2103	633,2030	[M-H] ⁻				
43	Z2	7,58	ácido cinámico-hexosa-hexosa 2	C21H28O12	472,1571	471,1498	[M-H] ⁻				

Tabla 4.3 Identificación de potenciales precursores en las fracciones

No.	Zona ^(a)	Tr. (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion detectado	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. ^(b)	R ² ^(c)
44	Z2	7,8	ácido cinámico-pentosa-pentosa 1	C19H24O10	412,1363	457,1346	[M+HCOOH-H] ⁻				
45	Z2	7,86	ácido cinámico-pentosa-deoxihexosa 2	C20H26O10	426,1539	425,1466	[M-H] ⁻				cinamato de etilo: 0,96**
46	Z2	7,95	ácido cinámico-pentosa-pentosa 2	C19H24O10	412,1362	457,13443	[M+HCOOH-H] ⁻				
47	Z3	7,79	o-/m-cresol-pentosa	C12H16O5	240,0996	285,09789	[M+HCOOH-H] ⁻				
48	Z3	7,93	o-/m-cresol-deoxihexosa 1	C13H18O5	254,1153	299,11353	[M+HCOOH-H] ⁻				
49	Z3	8,85	o-/m-cresol-deoxihexosa 2	C13H18O5	254,1157	253,1084	[M-H] ⁻				m-cresol: 0,91*

^(a) Zona de fracciones en la que se identificó el precursor

^(b) Publicaciones en las que se han reportado estos precursores:

- (1) Caffrey et al., 2019
- (2) Caffrey et al., 2020
- (3) Barnaba, Larcher, et al., 2018
- (4) Wei et al., 2021
- (5) Hjelmeland et al., 2015

^(c) Coeficiente de correlación con el aroma correspondiente en las fracciones y significatividad de esta correlación: * p < 0,05, ** p < 0,01 y *** p < 0,001

4. Conclusiones

En este capítulo, se ha desarrollado una estrategia que facilita el aislamiento de precursores glicosídicos del aroma en muestras de uvas de Garnacha, a través de la combinación de un primer fraccionamiento semipreparativo en gel de Toyopearl, que permite eliminar compuestos de alta masa molecular, y seguidamente otro fraccionamiento en sílica gel para separar los potenciales precursores del aroma.

El análisis sensorial de las cuatro fracciones obtenidas de la Toyopearl reveló que los precursores glicosídicos de interés estaban presentes en la primera fracción (F1). El refraccionamiento de la F1 en la columna de gel de sílice, permitió la obtención de 64 fracciones, de las cuales 41 fueron identificadas por un panel de jueces como contenedoras de algún aroma.

El análisis SPME-GC-MS de estas fracciones hidrolizadas que presentaron algún aroma en el análisis sensorial, reveló la distribución de los compuestos aromáticos de interés en tres zonas fundamentales. La primera zona, mostró una concentración mayoritaria de norisoprenoides y algunos terpenos y fenoles volátiles. La zona 2 presentó únicamente el cinamato de etilo, mientras que la zona 3 contenía en menor cantidad los isómeros de α - y β -ionona y m-cresol.

La identificación se basó, en parte, en la presencia de fragmentos en sus espectros de MS/MS, proceso que resultó desafiante debido a la baja intensidad de señales en algunos casos, lo que dificultó la obtención de espectros de masas-masas para justificar las estructuras propuestas.

Por otro lado, el análisis SPE-GC-MS de las fracciones de sílica gel hidrolizadas y el análisis en paralelo por UHPLC-MS de estas fracciones sin hidrolizar permitió el establecimiento de correlaciones positivas entre las intensidades del aroma correspondiente en la fracción hidrolizada y la del potencial precursor, lo cual resultó ser una herramienta de gran potencial para la identificación de estos precursores.

En general, fue posible la identificación de 49 posibles precursores glicosídicos, de los cuales 26 no habían sido nunca descritos en la bibliografía. Entre estos destacan potenciales precursores glicosídicos de fenoles volátiles como guaiacol y 4-vinilfenol, monoterpenoles, así como norisoprenoides como Riesling acetal y TDN.

5. Referencias

Abbott, N. A., Coombe, B. G., & Williams, P. J. (1991). The Contribution of Hydrolyzed Flavor Precursors to Quality Differences in Shiraz Juice and Wines: An Investigation by Sensory Descriptive Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(3), 167-174. <https://doi.org/10.5344/ajev.1991.42.3.167>

Alegre, Y., Arias-Pérez, I., Hernández-Orte, P., & Ferreira, V. (2020). Development of a new strategy for studying the aroma potential of winemaking grapes through the accelerated hydrolysis of phenolic and aromatic fractions (PAFs). *Food Research International*, 127, 108728. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108728>

Barnaba, C., Dellacassa, E., Nicolini, G., Giacomelli, M., Roman Villegas, T., Nardin, T., & Larcher, R. (2017). Targeted and untargeted high resolution mass approach for a putative profiling of glycosylated simple phenols in hybrid grapes. *Food Research International*, 98, 20-33. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.01.011>

Barnaba, C., Dellacassa, E., Nicolini, G., Nardin, T., Serra, M., & Larcher, R. (2018). Non-targeted glycosidic profiling of international wines using neutral loss-high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1557, 75-89. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2018.05.008>

Barnaba, C., Larcher, R., Nardin, T., Dellacassa, E., & Nicolini, G. (2018). Glycosylated simple phenolic profiling of food tannins using high resolution mass spectrometry (Q-Orbitrap). *Food Chemistry*, 267, 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.048>

Caffrey, A. J., Lafontaine, S., Dailey, J., Varnum, S., Lerno, L. A., Zweigenbaum, J., Heymann, H., & Ebeler, S. E. (2022). Characterization of Humulus lupulus glycosides with porous graphitic carbon and sequential high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high performance liquid chromatography fractionation. *Journal of Chromatography A*, 1674, 463130. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463130>

Caffrey, A. J., Lerno, L. A., Zweigenbaum, J., & Ebeler, S. E. (2020). Direct Analysis of Glycosidic Aroma Precursors Containing Multiple Aglycone Classes in Vitis vinifera Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(12), 3817-3833. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08323>

Caffrey, Lerno, L., Rumbaugh, A., Girardello, R., Zweigenbaum, J., Oberholster, A., & Ebeler, S. E. (2019). Changes in smoke-taint volatile-phenol glycosides in wildfire smoke-exposed cabernet sauvignon grapes throughout winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 70(4), 373-381. <https://doi.org/10.5344/ajev.2019.19001>

D'Ambrosio, M. (2019). Advances in the Dereplication of Aroma Precursors from Grape Juice by Pretreatment with Lead Acetate and Combined HILIC- and RP-HPLC Methods. *Foods*, 8(1),

28. <https://doi.org/10.3390/foods8010028>

Ferreira, V., Herrero, P., Zapata, J., & Escudero, A. (2015). Coping with matrix effects in headspace solid phase microextraction gas chromatography using multivariate calibration strategies. *Journal of Chromatography A*, 1407, 30-41. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2015.06.058>

Flamini, R., De Rosso, M., Panighel, A., Dalla Vedova, A., De Marchi, F., & Bavaresco, L. (2014). Profiling of grape monoterpene glycosides (aroma precursors) by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UHPLC/QTOF). *Journal of Mass Spectrometry*, 49(12), 1214-1222. <https://doi.org/10.1002/jms.3441>

Francis, I. L., Sefton, M. A., & Williams, P. J. (1992). Sensory descriptive analysis of the aroma of hydrolysed precursor fractions from semillon, chardonnay and sauvignon blanc grape juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59(4), 511-520. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740590414>

Gök, R., Selhorst, P., Noske, T., Ziegler, M., Fischer, U., & Winterhalter, P. (2022). *Molecules Target-Guided Isolation of Progenitors of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) from Riesling Wine by High-Performance Countercurrent Chromatography †*. 1961-2019. <https://doi.org/10.3390/molecules27175378>

Günata, Y. Z., Bayonove, C. L., Tapiero, C., & Cordonnier, R. E. (1990). Hydrolysis of Grape Monoterpenyl β -D-Glucosides by Various β -Glucosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5), 1232-1236. <https://doi.org/10.1021/jf00095a016>

Hjelmeland, A. K., Zweigenbaum, J., & Ebeler, S. E. (2015). Profiling monoterpene glycoconjugation in *Vitis vinifera* L. cv. Muscat of Alexandria using a novel putative compound database approach, high resolution mass spectrometry and collision induced dissociation fragmentation analysis. *Analytica Chimica Acta*, 887, 138-147. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.026>

Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2009). Comparison of the suitability of different hydrolytic strategies to predict aroma potential of different grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2468-2480. <https://doi.org/10.1021/jf803256e>

Sáenz-Navajas, M. P., Avizcuri, J. M., Ferrero-del-Teso, S., Valentin, D., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2017). Chemo-sensory characterization of fractions driving different mouthfeel properties in red wines. *Food Research International*, 94, 54-64. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.02.002>

Schievano, E., D'Ambrosio, M., Mazzaretto, I., Ferrarini, R., Magno, F., Mammi, S., & Favaro, G. (2013). Identification of wine aroma precursors in Moscato Giallo grape juice: A nuclear magnetic resonance and liquid chromatography-mass spectrometry tandem study. *Talanta*, 116,

841-851. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.049>

Wei, Y., Chen, Z., Zhang, X.-K. K., Duan, C.-Q. Q., & Pan, Q.-H. H. (2021). Comparative Analysis of Glycosidic Aroma Compound Profiling in Three *Vitis vinifera* Varieties by Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Frontiers in Plant Science*, 12, 694979. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.694979>

Williams, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B., & Massy-Westropp, R. A. (1982). Studies on the Hydrolysis of *Vitis vinifera* Monoterpene Precursor Compounds and Model Monoterpene β -d-Glucosides Rationalizing the Monoterpene Composition of Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(6), 1219-1223. <https://doi.org/10.1021/jf00114a054>

Winterhalter, P., & Skouroumounis, G. K. (1997). Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, role and biotechnological transformation. En R. G. Berger, W. Babel, H. W. Blanch, Ch. L. Cooney, S.-O. Enfors, K.-E. L. Eriksson, A. Fiechter, A. M. Klibanov, B. Mattiasson, S. B. Primrose, H. J. Rehm, P. L. Rogers, H. Sahm, K. Schügerl, G. T. Tsao, K. Venkat, J. Villadsen, U. von Stockar, & C. Wandrey (Eds.), *Biotechnology of Aroma Compounds* (pp. 73-105). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/BFb0102063>

Capítulo 5

Capítulo 5. Variabilidad aromática intervarietal como herramienta para la identificación de precursores glicosídicos del aroma en uvas mediante estrategias metabolómicas

1. Introducción

En el capítulo anterior, se demostró que es factible identificar los precursores del aroma combinando el fraccionamiento preparativo de extractos de uvas, primero sobre Toyo Pearl seguido de sílica gel con el análisis simultáneo de los aromas liberados durante la hidrólisis ácida de dichas fracciones y el análisis UHPLC-MS de estas mismas fracciones sin hidrolizar.

La identificación se facilitó sobremanera mediante el establecimiento de correlaciones entre los contenidos de precursor en cada fracción medidos por UHPLC-MS y los contenidos de aromas liberados en estas fracciones mediante la hidrólisis ácida. La existencia de perfiles de elución prácticamente coincidentes resultó esencial para atribuir con más seguridad el carácter de precursor aromático al *feature* de m/z compatible con una estructura glicosídica relacionada con el aroma en cuestión.

Existen numerosos trabajos que hacen referencia a la variabilidad aromática en fracciones y vinos de distintas variedades de uvas ya sean blancas o tintas (Alegre, Sáenz-Navajas, et al., 2020; Carlin et al., 2022; Guth, 1997; Loscos et al., 2010; Oliveira & Ferreira, 2019). Incluso, recientemente, hay autores que han desarrollado trabajos sobre las diferencias entre los contenidos de precursores glicosídicos del aroma en distintas variedades. Caffrey et al. (Caffrey et al., 2020) identificó numerosos precursores glicosídicos en las variedades de Riesling y Moscatel de Alejandría y demostró que las dos variedades eran distinguibles en función de las abundancias relativas de los glicósidos que presentaban. Wei et al. (Wei et al., 2021) evaluó también las diferencias entre precursores glicosídicos entre diferentes clones de Riesling, Chardonnay y Moscatel evidenciando que, los patrones de glicosilación de los compuestos aromáticos muestran una diferencia importante entre las variedades e incluso que existe una diferencia notable también entre las concentraciones de estos compuestos entre clones de la misma variedad.

Dada la complejidad de los estudios de identificación de los precursores aromáticos, resulta esencial apoyarse no sólo en los datos UHPLC-MS, sino en el estudio de cómo los distintos features compatibles con moléculas de precursor, se correlacionan con los niveles de aroma generados por hidrólisis, en conjuntos de muestras con un nivel suficientemente diferenciado de aromas.

Sin embargo, hasta ahora no se ha llevado a cabo ningún estudio para determinar cuáles de las decenas de miles de moléculas detectables en extractos de uvas mediante UHPLC-MS están correlacionadas con los niveles de compuestos aromáticos varietales desarrollados en vinos envejecidos. En el presente capítulo, aprovecharemos la diferenciación introducida por la variedad de la uva para establecer dichas correlaciones externas.

El principal objetivo del presente trabajo es identificar precursores aromáticos glicosídicos en seis variedades de uvas utilizando un análisis metabolómico por UHPLC-QTOF-MS empleando la existencia de correlaciones positivas con los aromas liberados mediante hidrólisis ácida de fermentados monovarietales envejecidos, como una herramienta que permita un nivel adicional de confirmación en la identificación y caracterización de estas moléculas precursoras.

2. Materiales y Métodos

2.1 Preparación de muestras

Se partió de dos kg de uvas de seis variedades diferentes, cuatro blancas: Riesling, Gewürztraminer, Chardonnay y Macabeo, obtenidas de la Denominación de Origen Somontano y dos tintas: Garnacha y Tempranillo, que se obtuvieron de la Denominación de Origen Calificada Rioja. Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.3.1.1 del capítulo 4 se prepararon seis mistelas monovarietales.

2.2 Fermentación rápida

Cada mistela monovarietal se desalcoholizó en un rotavapor hasta reducir el contenido de etanol a menos de un 2% como describe Alegre et al. (Alegre, Arias-Pérez, et al., 2020). Una vez desalcoholizadas, se midió el volumen recogido de agua-etanol en el matraz de

recolección y se volvió a añadir esta cantidad a la mistela desalcoholizada, pero esta vez solo de agua conteniendo una concentración de 0,75 g/L de NH_4^+ en formato de sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Posteriormente, se añadieron 280 mL de cada mistela desalcoholizada en tres frascos Pyrex de 500 mL con una válvula Müller, que sirvieron de fermentadores como se observa en la figura 5.1. Se inoculó la cantidad correspondiente a 250 g/hL de levadura Lalvin QA23™ (*Saccharomyces cerevisiae*, Lallemand Bio, Barcelona), previamente activada según las indicaciones del fabricante. Los fermentadores se colocaron en una incubadora a 28°C durante 3 días hasta el final de la fermentación.



Fig 5.1 Fermentación rápida por triplicado de las seis variedades de uva. De izquierda a derecha aparecen en este orden: Gewürztraminer, Macabeo, Chardonnay, Garnacha, Riesling y Tempranillo

2.3 Evaluación del aroma

Para el estudio del aroma de cada variedad se evaluaron los compuestos del aroma minoritarios y trazas en el vino recién fermentado (t_0) y en los vinos envejecidos mediante hidrólisis ácida en anoxia a 75°C, durante 12 (t_{12}) y 96 h (t_{96}). También se analizaron los mercaptanos polifuncionales que solo fueron evaluados en el vino recién fermentado (t_0) y a las 96 h de envejecimiento (t_{96}).

2.3.1 Envejecimiento acelerado mediante hidrólisis ácida en anoxia

Para el envejecimiento de cada uno de los fermentados monovarietales se ajustó su pH a 3,5 en cada una de sus tres réplicas. En la cámara de anoxia, se llenaron los viales correspondientes, dejando el mínimo espacio de cabeza, para el análisis de cada método (compuestos minoritarios y trazas: 3 viales de 20 mL, uno por cada réplica de cada variedad y mercaptanos polifuncionales: 3 viales de 10 mL). Los viales cerrados se colocaron dentro de una bolsa plástico termosellada (Coimbra Pack, S.L, Zaragoza, España), certificadas con permeabilidad al oxígeno (valor medio de $9 \text{ cm}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{día})$). Luego, esta primera bolsa se colocó dentro de otra del mismo tipo y entre ellas se añadió carbón activado con un eliminador de oxígeno (AnaeroGenTM de ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) como describe Vela et al. (Vela et al., 2017). Las muestras de t_0 se almacenaron en nevera a 4°C hasta su análisis, mientras que las muestras t_{12} y t_{96} fueron incubadas durante 12 y 96 horas a 75°C en una estufa (Mettler GmbH, Alemania), respectivamente. Una vez terminado el proceso de incubación se almacenaron también a 4°C hasta su análisis.

2.3.2 Cuantificación de aromas trazas y minoritarios

Se evaluaron estos aromas siguiendo el método referenciado en la sección 2.3.1 del capítulo 1. Para ello se analizaron las tres réplicas de fermentador para cada variedad en cada tiempo t_0 , t_{12} y t_{96} , para un total de 54 análisis.

2.3.3 Cuantificación de mercaptanos polifuncionales

Estos compuestos se evaluaron siguiendo el método antes descrito en el apartado 2.3.2 del capítulo 1. Para ello se analizaron también las tres réplicas de fermentador para cada variedad en los tiempos t_0 y t_{96} , para un total de 36 análisis.

2.4 Análisis SPE-UHPLC-QTOF-MS de los vinos recién fermentados

Para este análisis se evaluaron los vinos recién fermentados (t_0) mediante un método no dirigido por LC-MS. Se tomaron 25 mL de cada réplica de fermentador, se desalcoholizaron en el rotavapor y una vez desalcoholizados se añadió 2 mg/L de β -fenil-D-glucopiranosido como estándar interno y finalmente se ajustó el volumen final con

agua milliQ en un matraz de 25 mL. Posteriormente, se realizó una extracción en fase sólida (SPE) siguiendo el método desarrollado por Alegre et al. (Alegre, Arias-Pérez, et al., 2020) con algunas modificaciones y reescalados. Se emplearon cartuchos de 500 mg de Sep-Pak C18 (Waters, Ireland) que se acondicionaron previamente con 2,2 mL de metanol seguidos de 2,2 mL de agua milliQ y se cargaron 10 mL de vino previamente desalcoholizado como se describió anteriormente (2 réplicas de los 25 mL del vino desalcoholizado, 10 mL x réplica). Se realizó un lavado con 4,4 mL de agua miliQ a pH=3,5, la resina se secó a vacío y se eluyó con 5 mL de metanol (grado LC-MS). Los extractos se llevaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno, se redisolvió en 250 μ L de metanol (grado LC-MS) y filtraron a través de un filtro de jeringa de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 μ m de tamaño de poro y 0,13 mm de diámetro (Filter-Bio (Aldo), Madrid, España).

De cada extracto filtrado se tomaron 50 μ L para la preparación de la muestra control (Quality Control (QC)) que es una muestra promedio, ya que contenía alícuotas equivalentes de todas las muestras, que fue utilizada para controlar el análisis. Las muestras se inyectaron aleatoriamente.

El método de UHPLC-QTOF-MS empleado aparece descrito en el apartado 4.3.4 *del capítulo 4*. Los mostos también se extrajeron también mediante el mismo método SPE y se analizaron por el mismo método y tanto estos como el QC y los vinos t_0 se emplearon para la obtención de espectros de MS² siguiendo el modo de adquisición DDA (data-dependent acquisition). El tratamiento de los datos obtenidos en este análisis se realizó empleando el software Metaboscape (Bruker Daltonics, Germany).

3. Resultados

El esquema general de trabajo seguido aparece resumido en la figura 5.2 para una mejor comprensión. En este estudio se prepararon mostos, obtenidos a partir de mistelas monovarietales desalcoholizadas, de seis variedades de uva. Estos se fermentaron empleando el método rápido descrito en el capítulo 3, que implicó la adición de una cantidad significativamente mayor de levadura QA23 (equivalente a aproximadamente 10 veces más, de lo habitualmente empleado en la vinificación comercial) y una temperatura mayor ($T= 28^{\circ}\text{C}$) que la comúnmente empleada. Esta estrategia de

fermentación ha mostrado ser muy reproducible y respetar de manera prácticamente total los precursores aromáticos. Los vinos jóvenes resultantes (t_0) fueron, por una parte, sometidos a un envejecimiento acelerado empleando la hidrólisis en anoxia a 75°C durante 12 y 96 horas. Se cuantificaron los compuestos minoritarios y trazas y los mercaptanos polifuncionales volátiles del aroma presentes tanto en los vinos recién fermentados como aquellos liberados en el envejecimiento acelerado de los mismos fueron analizados.

Además, los vinos jóvenes fueron analizados por un método no dirigido de SPE-UHPLC-QTOF-MS. Los mostos de partida (previamente extraídos con el mismo método SPE) y los QC se analizaron también por UHPLC-QTOF-MS/MS en modo DDA (Data-Dependent Acquisition), con el objetivo de buscar los patrones de fragmentación de las señales que pudieran estar asociadas a precursores.

Este estudio consta de dos partes principales:

1. El análisis de los compuestos aromáticos liberados durante los distintos tiempos de hidrólisis y su variabilidad entre las distintas variedades (Apartado 3.1 de este capítulo)
2. El análisis metabolómico no dirigido por UHPLC-QTOF-MS para identificar precursores glicosídicos presentes en los vinos y aquellos cuyos niveles estén específicamente correlacionados con los niveles de compuestos aromáticos formados en las muestras (Apartado 3.2 de este capítulo).

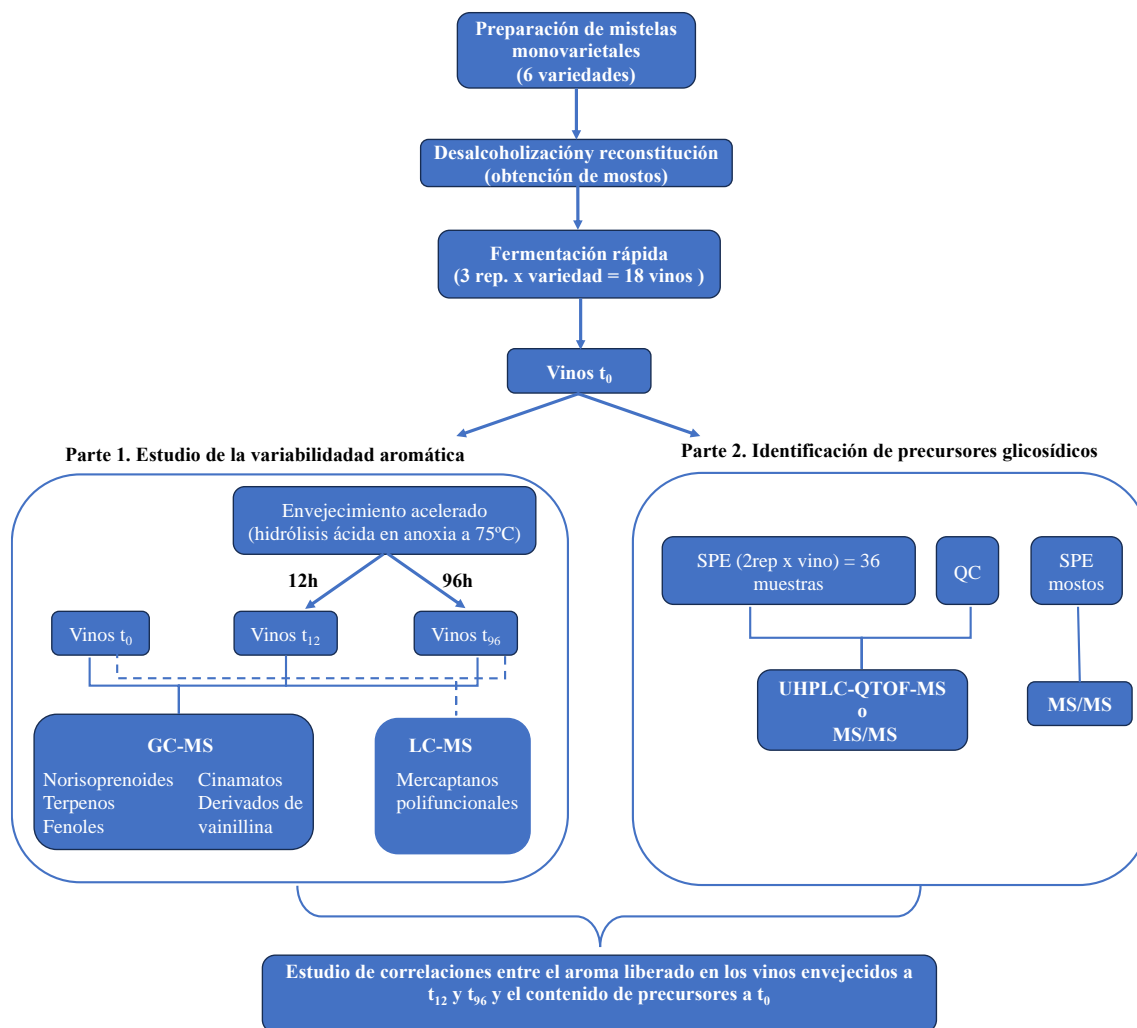


Fig. 5.2. Esquema resumido de la metodología de trabajo empleada

3.1 Variabilidad aromática asociada a la variedad de uva y al tiempo de hidrólisis

Para el análisis de la variabilidad aromática asociada a la variedad y al tiempo de hidrólisis se realizaron diferentes análisis. Primeramente, los vinos jóvenes y los hidrolizados a 75°C de 12 y 96 horas fueron analizados por el método de GC-MS descrito en el apartado 2.3.2 de este capítulo para la determinación de los compuestos trazas. Por otro lado, también los vinos jóvenes y los hidrolizados de 96h se analizaron por el método descrito en el apartado 2.3.3 de este capítulo para la determinación de los mercaptanos funcionales.

En la Tabla 5.1 se muestran las concentraciones de cada uno de los aromas analizados para cada variedad en los tres tiempos de análisis.

Tabla 5.1. Concentraciones (µg/L) y desviaciones estándares (n=3) de los aromas analizados en los tres tiempos de análisis para cada variedad *.

Compuestos	t0						t12						t96					
	Tempranillo	Garnacha	Riesling	Gewürztraminer	Chardonnay	Macabeo	Tempranillo	Garnacha	Riesling	Gewürztraminer	Chardonnay	Macabeo	Tempranillo	Garnacha	Riesling	Gewürztraminer	Chardonnay	Macabeo
dihidrocinnamato de etilo	0.286 ± 0.018	0.325 ± 0.012	0.347 ± 0.013	0.355 ± 0.007	0.348 ± 0.021	0.325 ± 0.02	0.291 ± 0.035	0.332 ± 0.023	0.349 ± 0.022	0.614 ± 0.014	0.624 ± 0.016	0.507 ± 0.026	0.349 ± 0.029	0.409 ± 0.033	0.464 ± 0.009	0.761 ± 0.033	0.943 ± 0.029	0.743 ± 0.018
cinamato de etilo	0.766 ± 0.084	0.637 ± 0.036	0.345 ± 0.061	0.779 ± 0.056	0.475 ± 0.016	0.530 ± 0.043	0.489 ± 0.041	0.508 ± 0.091	0.45 ± 0.01	0.301 ± 0.005	0.664 ± 0.029	0.515 ± 0.038	1.07 ± 0.11	1.61 ± 0.06	1.86 ± 0.05	0.892 ± 0.119	3.09 ± 0.09	2.34 ± 0.15
acetato de β-feniletilo	1170 ± 38	1320 ± 149	925 ± 80	1380 ± 58	1020 ± 38	1140 ± 61	1010 ± 52	1130 ± 70	702 ± 11	1180 ± 5	678 ± 23	851 ± 42	557 ± 11	427 ± 26	85.7 ± 5.7	715 ± 44	77.2 ± 2.2	208 ± 12
leucato de etilo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.95 ± 0.19	5.99 ± 0.46	10.1 ± 0.7	3.67 ± 0.06	10.3 ± 0.7	7.58 ± 0.13	12.7 ± 0.7	20.8 ± 0.6	39.2 ± 1.6	11.3 ± 0.2	60.1 ± 3.7	37.6 ± 0.8
γ-nonolactona	1.08 ± 0.05	2.32 ± 0.15	1.79 ± 0.05	2.06 ± 0.02	2.15 ± 0.09	3.11 ± 0.03	1.71 ± 0.16	3.29 ± 0.15	2.18 ± 0.04	2.58 ± 0.06	1.72 ± 0.08	2.57 ± 0.05	2.34 ± 0.06	3.77 ± 0.22	2.49 ± 0.13	3.97 ± 0.04	2.59 ± 0.03	4.02 ± 0.07
masoia lactona	0.705 ± 0.021	1.30 ± 0.02	n.d.	1.31 ± 0.16	1.98 ± 0.27	17.3 ± 1.1	0.913 ± 0.087	2.17 ± 0.07	0.391 ± 0.103	1.29 ± 0.16	1.73 ± 0.06	12.7 ± 0.4	2.07 ± 0.22	4.06 ± 0.28	0.889 ± 0.07	1.36 ± 0.09	2.73 ± 0.06	18.6 ± 0.7
vitispiranos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.37 ± 0.07	4.84 ± 0.39	22.2 ± 0.6	0.680 ± 0.007	3.55 ± 0.09	7.33 ± 0.64	29.6 ± 1.3	60.7 ± 2.7	111 ± 4.761	17.9 ± 0.9	18.4 ± 0.1	93.5 ± 3.4
TDN	0.208 ± 0.009	0.121 ± 0.012	0.389 ± 0.067	0.397 ± 0.033	0.174 ± 0.055	0.105 ± 0.021	0.645 ± 0.264	1.79 ± 0.09	12.8 ± 0.3	1.01 ± 0.01	3.03 ± 0.14	3.22 ± 0.19	14.9 ± 0.9	58.3 ± 2.1	277 ± 21.425	14.5 ± 0.4	49.9 ± 0.7	153 ± 5
Riesling Acetal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.418 ± 0.050	1.67 ± 0.05	6.56 ± 0.16	0.154 ± 0.009	0.492 ± 0.010	2.36 ± 0.04	4.38 ± 0.24	8.72 ± 0.65	11.8 ± 0.4	1.62 ± 0.12	0.615 ± 0.043	9.24 ± 0.47
β-damasconona	0.0745 ± 0.0059	0.157 ± 0.014	0.473 ± 0.006	0.0986 ± 0.0028	0.357 ± 0.033	0.203 ± 0.002	1.33 ± 0.15	1.43 ± 0.13	1.43 ± 0.03	0.923 ± 0.03	0.587 ± 0.031	0.438 ± 0.017	2.29 ± 0.10	2.02 ± 0.15	2.06 ± 0.06	2.25 ± 0	1.59 ± 0.03	0.915 ± 0.024
β-ionona	0.0859 ± 0.0132	0.104 ± 0.010	0.103 ± 0.007	0.0794 ± 0.0034	0.0629 ± 0.0077	0.109 ± 0.003	0.0846 ± 0.0064	0.141 ± 0.028	0.115 ± 0.014	0.0727 ± 0.0039	0.0589 ± 0.0046	0.0713 ± 0.0102	0.253 ± 0.024	0.312 ± 0.021	0.352 ± 0.031	0.148 ± 0.003	0.171 ± 0.02	0.164 ± 0.011
4-vinilfenol	91 ± 11	24.3 ± 0.8	33.4 ± 5.0	2.29 ± 0.15	13.7 ± 0.3	15.7 ± 0.2	59.3 ± 1.7	20.7 ± 2.1	31.8 ± 2.6	7.52 ± 0.14	10.6 ± 0.3	11.3 ± 1.4	102 ± 1	27.8 ± 0.4	70.9 ± 0.8	20 ± 0.67	16.7 ± 1.4	6.01 ± 0.25
4-vinilguaicol	21.4 ± 2.5	71.6 ± 4.1	286 ± 77	93.9 ± 6.0	29.6 ± 1.4	109 ± 5	61.5 ± 2.8	110 ± 7	327 ± 32	338 ± 11	37.9 ± 1.9	88.1 ± 3.3	186 ± 6	366 ± 7	1050 ± 3.337	1280 ± 16	134 ± 5	192 ± 7
siringol	19.3 ± 0.1	0.453 ± 0.046	0.322 ± 0.016	0.412 ± 0.015	0.295 ± 0.02	0.365 ± 0.03	48.4 ± 1.3	14.3 ± 0.6	0.409 ± 0.023	0.447 ± 0.033	0.288 ± 0.046	0.415 ± 0.071	197 ± 3	67.3 ± 0.8	0.974 ± 0.07	1.11 ± 0.13	0.644 ± 0.009	0.933 ± 0.073
o-cresol	0.346 ± 0.016	0.677 ± 0.016	0.285 ± 0.009	0.859 ± 0.02	0.367 ± 0.022	0.815 ± 0.014	0.409 ± 0.019	0.652 ± 0.014	0.309 ± 0.008	0.916 ± 0.063	0.399 ± 0.028	0.837 ± 0.001	0.514 ± 0.007	0.799 ± 0.02	0.457 ± 0.016	1.24 ± 0.01	0.389 ± 0.046	0.923 ± 0.059
metoxieugenol	1.21 ± 0.05	0.999 ± 0.057	0.268 ± 0.010	1.22 ± 0.06	0.489 ± 0.068	0.325 ± 0.016	1.95 ± 0.12	1.59 ± 0.16	0.400 ± 0.005	1.50 ± 0.05	1.65 ± 0.04	0.455 ± 0.033	6.60 ± 0.21	6.14 ± 0.15	1.44 ± 0.06	3.57 ± 0.04	11.6 ± 0.7	2.18 ± 0.15
m-cresol	0.0827 ± 0.0025	0.172 ± 0.013	0.0708 ± 0.0043	0.113 ± 0.007	0.0844 ± 0.0089	0.0557 ± 0.0021	0.0938 ± 0.0111	0.191 ± 0.007	0.0891 ± 0.0047	0.141 ± 0.011	0.115 ± 0.005	0.0777 ± 0.0088	0.192 ± 0.004	0.327 ± 0.009	0.281 ± 0.013	0.217 ± 0.007	0.221 ± 0.005	0.198 ± 0.011
trans-isoeugenol	6.02 ± 0.31	9.43 ± 0.51	4.50 ± 0.25	18.1 ± 1.3	2.41 ± 0.26	3.84 ± 0.50	5.32 ± 0.19	12.3 ± 0.6	5.94 ± 0.25	16.2 ± 0.3	2.49 ± 0.09	4.18 ± 0.13	8.61 ± 0.26	29.1 ± 0.3	19.1 ± 1	25.6 ± 0.5	6.42 ± 0.56	16.9 ± 0.9
guaiacol	4.48 ± 0.03	3.09 ± 0.14	0.491 ± 0.054	1.02 ± 0.06	0.511 ± 0.067	2.67 ± 0.13	9.37 ± 0.48	5.20 ± 0.31	0.701 ± 0.098	0.984 ± 0.077	0.474 ± 0.009	2.68 ± 0.22	34.8 ± 0.7	23.6 ± 0.5	2.84 ± 0.17	3.69 ± 0.3	1.25 ± 0.05	4.53 ± 0.22
eugenol	0.869 ± 0.009	0.349 ± 0.008	0.227 ± 0.011	2.82 ± 0.04	0.396 ± 0.008	0.109 ± 0.009	0.836 ± 0.011	0.377 ± 0.029	0.226 ± 0.008	2.76 ± 0.05	0.460 ± 0.017	0.121 ± 0.005	1.07 ± 0.04	0.469 ± 0.021	0.393 ± 0.01	3.37 ± 0.07	0.887 ± 0.016	0.223 ± 0.011
4-etilfenol	0.0408 ± 0.0051	0.0361 ± 0.0016	0.0701 ± 0.0053	0.0291 ± 0.0051	0.0548 ± 0.0025	0.0659 ± 0.0054	0.0415 ± 0.006	0.0434 ± 0.0022	0.0630 ± 0.0023	0.0383 ± 0.0048	0.0664 ± 0.0053	0.0584 ± 0.0062	0.121 ± 0.012	0.112 ± 0.015	0.179 ± 0.006	0.0627 ± 0.0087	0.118 ± 0.014	0.100 ± 0.004
α-terpineol	0.0614 ± 0.0022	0.0901 ± 0.0039	0.824 ± 0.014	0.379 ± 0.004	0.176 ± 0.005	0.086 ± 0.004	0.159 ± 0.014	0.495 ± 0.013	6.33 ± 0.08	3.57 ± 0.09	0.894 ± 0.033	0.449 ± 0.019	0.854 ± 0.027	2.12 ± 0.07	7.53 ± 0.34	34.2 ± 0.3	0.947 ± 0.006	1.25 ± 0.01
óxido de rosa	0.0172 ± 0.0028	0.0682 ± 0.0073	0.0481 ± 0.0019	3.36 ± 0.04	0.0174 ± 0.0012	0.0346 ± 0.0042	0.0265 ± 0.0025	0.0831 ± 0.0024	0.0619 ± 0.0074	3.19 ± 0.07	0.0204 ± 0.0016	0.032 ± 0.004	0.0298 ± 0.005	0.0934 ± 0.0057	0.0559 ± 0.0037	3.76 ± 0.23	0.0237 ± 0.0002	0.0418 ± 0.0017
nerol	1.41 ± 0.03	1.70 ± 0.02	1.79 ± 0.02	27.8 ± 0.6	1.08 ± 0.06	1.34 ± 0.01	0.92 ± 0.12	1.14 ± 0.04	2.78 ± 0.05	20.7 ± 0.2	0.403 ± 0.05	0.612 ± 0.005	0.429 ± 0.009	0.247 ± 0.034	0.205 ± 0.018	17.1 ± 0.1	0.635 ± 0.038	0.227 ± 0.022
óxido de linalool	n.d.	0.267 ± 0.017	0.94 ± 0.07	1.80 ± 0.04	0.518 ± 0.071	1.32 ± 0.06	0.362 ± 0.016	1.33 ± 0.09	8.95 ± 0.12	8.65 ± 0.06	2.46 ± 0.05	2.79 ± 0.27	1.73 ± 0.01	7.38 ± 0.28	45.6 ± 0.9	90.7 ± 1.4	15.7 ± 0.3	18.4 ± 0.3

Tabla 5.1. Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) y desviaciones estándares ($n=3$) de los aromas analizados en los tres tiempos de análisis para cada variedad *.

Compuestos	t_0						t_{12}						t_{96}					
	Tempranillo	Garnacha	Riesling	Gewürztraminer	Chardonnay	Macabeo	Tempranillo	Garnacha	Riesling	Gewürztraminer	Chardonnay	Macabeo	Tempranillo	Garnacha	Riesling	Gewürztraminer	Chardonnay	Macabeo
linalool	1.32 ± 0.03	1.65 ± 0.04	10.1 ± 0.1	4.41 ± 0.04	2.91 ± 0.20	1.26 ± 0.05	3.07 ± 0.13	5.71 ± 0.08	24.8 ± 0.6	54.9 ± 0.8	4.87 ± 0.07	4.45 ± 0.09	3.76 ± 0.02	2.89 ± 0.09	1.75 ± 0.17	146 ± 3.115	0.829 ± 0.095	0.996 ± 0.059
limoneno	16.4 ± 1.7	17.6 ± 0.7	18.6 ± 0.7	3.84 ± 0.05	4.28 ± 0.29	3.46 ± 0.13	2.14 ± 0.21	2.21 ± 0.20	2.67 ± 0.15	205 ± 7	194 ± 6	188 ± 17	14.7 ± 0.4	14.3 ± 0.4	14.6 ± 1	258 ± 16.209	268 ± 22	239 ± 16
geraniol	13.1 ± 0.3	15.1 ± 0.5	14.3 ± 0.3	114 ± 4	12.1 ± 0.5	11.8 ± 0.4	8.63 ± 0.54	10.9 ± 0.6	19.5 ± 0.4	116 ± 2	4.22 ± 0.05	5.74 ± 0.02	3.01 ± 0.11	2.19 ± 0.05	1.04 ± 0.1	129 ± 2	0.346 ± 0.026	0.392 ± 0.076
dihidromircenol	0.685 ± 0.078	0.721 ± 0.005	0.752 ± 0.029	0.583 ± 0.037	0.667 ± 0.073	0.58 ± 0.03	1.15 ± 0.09	1.19 ± 0.09	1.27 ± 0.13	1.01 ± 0.04	0.921 ± 0.047	0.939 ± 0.061	1.64 ± 0.05	1.56 ± 0.09	1.43 ± 0.17	1.01 ± 0.03	0.843 ± 0.046	0.818 ± 0.048
β -citronelol	4.68 ± 0.17	7.48 ± 0.35	7.36 ± 0.37	68.6 ± 1.6	4.74 ± 0.29	8.44 ± 0.29	4.35 ± 0.34	7.58 ± 0.26	6.08 ± 0.24	68.1 ± 2.5	3.96 ± 0.08	6.99 ± 0.12	3.50 ± 0.09	4.34 ± 0.21	1.05 ± 0.12	46.9 ± 1.6	0.513 ± 0.012	1.76 ± 0.06
1,8-cineol	0.206 ± 0.004	0.219 ± 0.015	0.255 ± 0.048	0.246 ± 0.029	0.291 ± 0.004	0.211 ± 0.039	0.263 ± 0.008	0.261 ± 0.053	0.613 ± 0.077	1.68 ± 0.03	1.66 ± 0.32	1.79 ± 0.19	0.807 ± 0.042	0.814 ± 0.091	1.84 ± 0.07	2.18 ± 0.1	2.08 ± 0.15	1.79 ± 0.25
vainillina	4.42 ± 0.07	2.60 ± 0.05	1.49 ± 0.05	0.996 ± 0.069	0.953 ± 0.088	0.966 ± 0.056	9.35 ± 0.44	9.75 ± 0.44	7.78 ± 3.6	2.40 ± 0.56	1.67 ± 0.32	2.51 ± 0.54	39.8 ± 0.9	38.1 ± 0.8	15.1 ± 1.1	8.87 ± 2.19	6.25 ± 1.78	7.31 ± 1.48
siringaldehído	218 ± 11	24.7 ± 1.5	6.59 ± 0.33	7.92 ± 0.43	7.31 ± 1.46	14.5 ± 0.9	508 ± 14	96.4 ± 5.3	10.9 ± 1.6	13.1 ± 1.4	7.85 ± 0.30	21.7 ± 2.3	2670 ± 79	874 ± 36	26.2 ± 1.6	47.0 ± 6.6	43.8 ± 13.7	84.7 ± 9.0
acetovainillona	26.2 ± 0.2	42.7 ± 1.2	23.4 ± 2.6	17.7 ± 1.9	6.86 ± 0.83	17.2 ± 2.7	24.9 ± 0.8	40.2 ± 0.6	29.6 ± 1.5	27.5 ± 2.1	7.99 ± 0.08	23.6 ± 2.9	28.9 ± 0.9	43.1 ± 0.3	33.7 ± 2.3	28.9 ± 1.1	10.5 ± 0.9	25.5 ± 1.5
4-mercapto-4-metil-2-pentanona	0.532 ± 0.047	1.51 ± 0.414	0.644 ± 0.335	0.935 ± 0.134	0.617 ± 0.222	2.06 ± 0.65							2.16 ± 0.54	3.51 ± 1.83	1.74 ± 0.47	1.73 ± 0.19	4.18 ± 0.75	3.52 ± 0.40
acetato de 3-mercaptohexilo	44.6 ± 1.2	726 ± 78	62.4 ± 10.1	162 ± 12	204 ± 23	656 ± 32							30.4 ± 1.5	477 ± 55	36.1 ± 6.6	117 ± 8	78.9 ± 6.1	312 ± 23
3-mercaptohexanol	105 ± 16	1028 ± 73	166 ± 57	357 ± 40	295 ± 31	1442 ± 73							662 ± 12	7965 ± 75	612 ± 13	1189 ± 24	2453 ± 56	6649 ± 76
furfuritiol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.							36.2 ± 10.4	76 ± 8	51 ± 5	65.5 ± 15.9	86.7 ± 11.8	29.9 ± 2.1
bencilmercaptano	0.0885 ± 0.0036	0.129 ± 0.055	0.126 ± 0.066	0.0969 ± 0.0322	0.163 ± 0.049	0.124 ± 0.04							0.247 ± 0.036	1.91 ± 0.18	2.66 ± 0.41	1.29 ± 0.1	4.22 ± 0.19	2.62 ± 0.27

*Los mercaptanos polifuncionales (4-mercapto-4-metil-2-pentanona, acetato de 3-mercaptohexilo, 3-mercaptohexanol, furfuriol y bencilmercaptano) solo se analizaron a t_0 y t_{96} y su concentración está expresada en ng/L .

3.1.1 Estudio de la diversidad aromática de las distintas variedades

Se realizó un ANOVA de dos factores (la variedad y el tiempo de envejecimiento) y a su vez se calculó la relación entre la concentración mínima y máxima de un compuesto en el mismo punto de tiempo entre las variedades, parámetro que en metabolómica se denomina comúnmente como “Fold Change” (FC)).

Los valores de FC se resumen en la figura 5.3, que muestra los compuestos del aroma por familias: en el lado izquierdo se indican los nombres de los compuestos y su significatividad ($p < 0,05$) en el ANOVA, donde *v* es la variedad, *t* es el tiempo de hidrólisis y * es el factor interacción entre la variedad y el tiempo de hidrólisis. La escala de intensidad de color señala el momento en el que la variabilidad es mayor para cada aroma.

Como se puede observar, para la mayoría de los compuestos, a excepción de la 4-mercapto-4-metil-2-pentanona (MP), todos los factores y su interacción son significativos. Del mismo modo, existe una gran variabilidad en la mayoría de los compuestos (con $FC > 5$ en la mayoría de los casos). Los valores más altos de FC están presentes en la familia de los terpenos y mercaptanos polifuncionales, a excepción, en el vino joven, del furfuriltiol (FFT) y bencil mercaptano (BM), quizás porque estos compuestos requieren un tiempo más largo para su formación, evidenciando así un gran aumento después de las 96h de hidrólisis.

De acuerdo con la figura, los componentes más diferenciadores son:

- masoia lactona, que parece ser característica de las uvas de Macabeo empleadas en este estudio,
- los norisoprenoides vitispiranos, TDN y Riesling acetal, que son particularmente altos en Riesling, seguido por Macabeo;
- los fenoles volátiles 4-vinilfenol, siringol y guaiacol, y el siringaldehído que son máximos en Tempranillo;
- el eugenol y los terpenos, excepto limoneno, que fueron máximos en Gewürztraminer.
- El limoneno diferencia Gewürztraminer, Chardonnay y Macabeo, de Tempranillo, Garnacha y Riesling.
- El 3MH fue particularmente alto en Garnacha y Macabeo, y particularmente bajo en Tempranillo y Riesling.

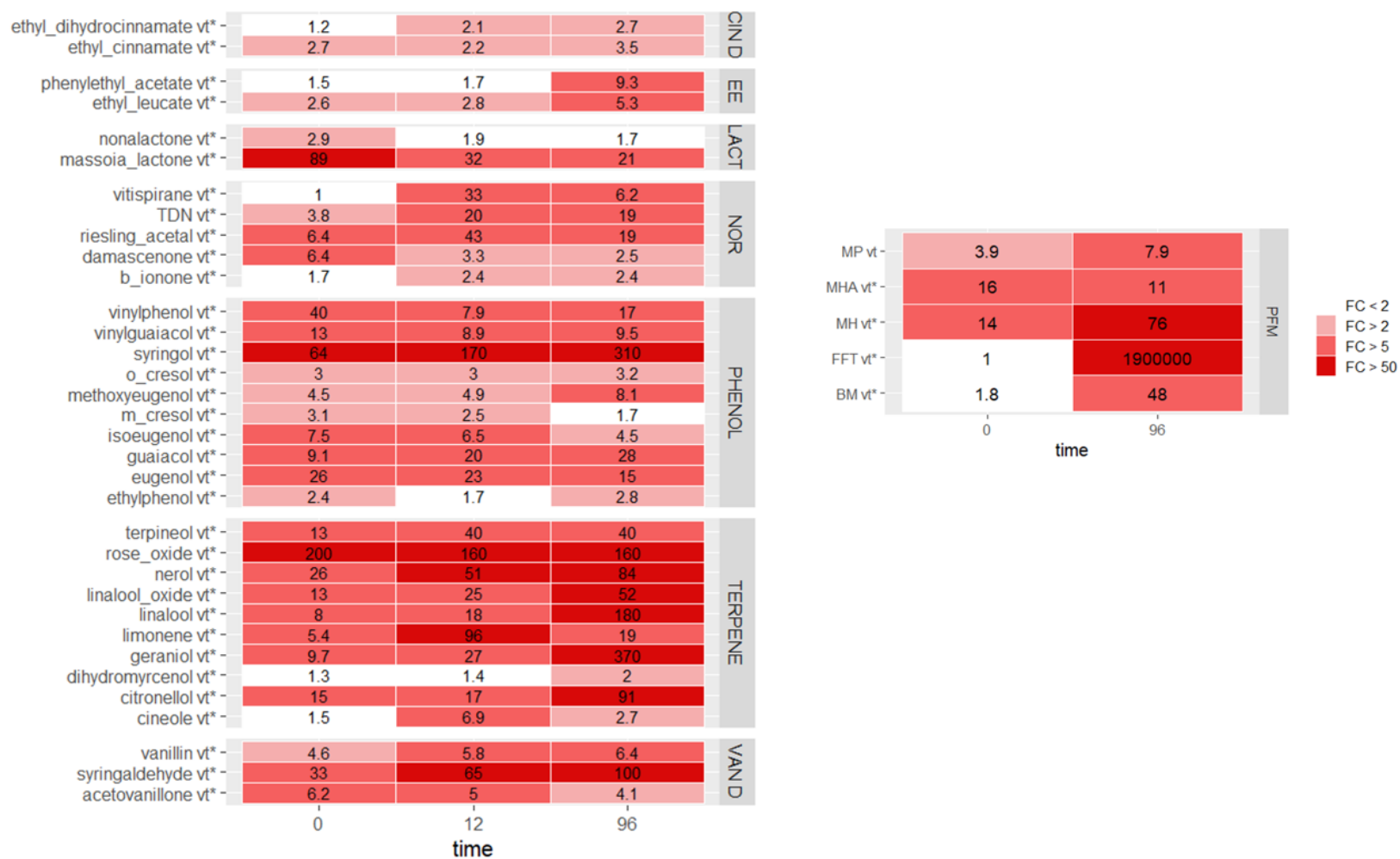


Fig. 5.3. Variabilidad de los compuestos aromáticos en los diferentes tiempos de envejecimiento entre variedades. Las familias se dividen en (CIN: derivados del ácido cinámico, EE: ésteres, NOR: norisoprenoides, PHENOL: fenoles, TERPENE: terpenos, VAN D: derivados de la vainillina y PFM: mercaptanos polifuncionales

En la figura 5.4 se observan los contenidos totales para cada variedad de las familias de los compuestos estudiados, específicamente a 12h para los terpenos y a 96h para el resto de las familias de aromas.

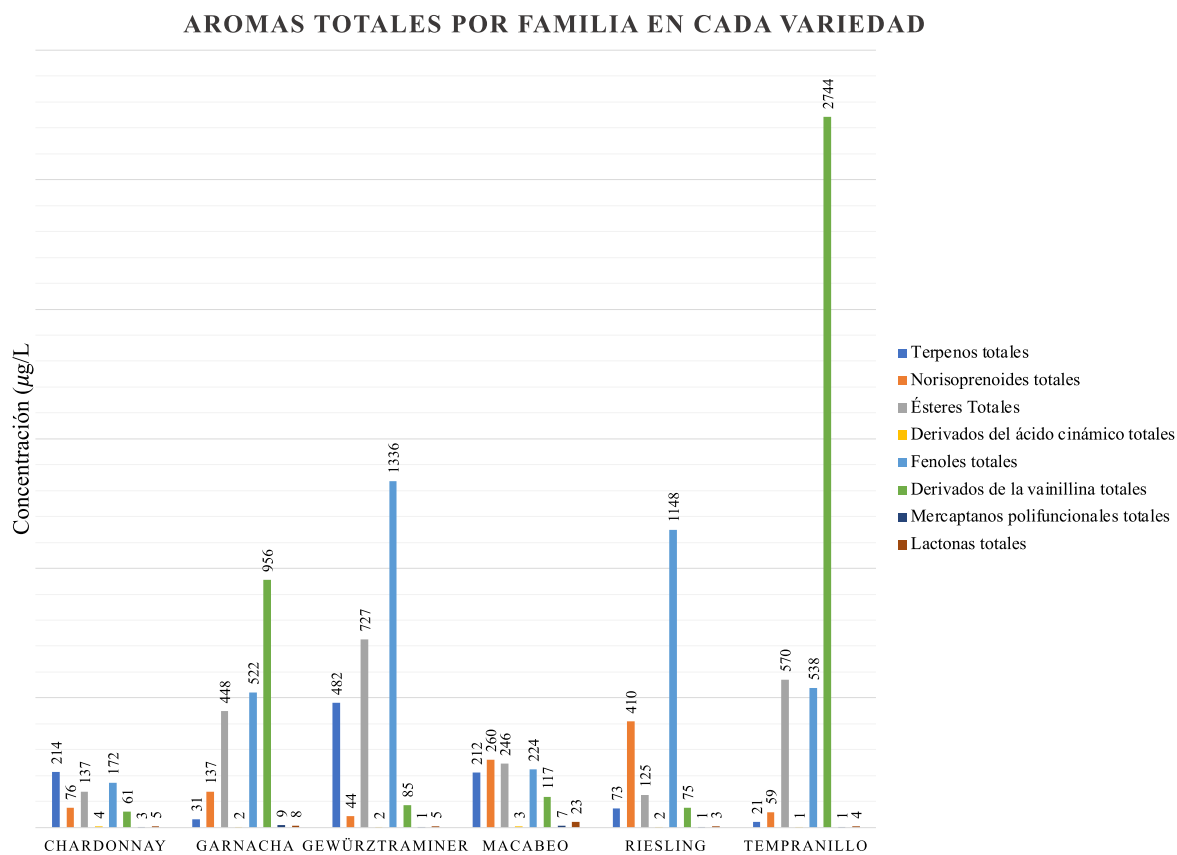


Figura 5.4 Concentraciones totales de aromas por familia en cada una de las seis variedades. Para terpenos a 12h y a 96h para el resto

A continuación, se hará un análisis del comportamiento de cada familia de compuestos en cada variedad durante el envejecimiento acelerado.

Derivados de la vainillina

Las variedades tintas: Tempranillo y Garnacha, son ricas en aromas derivados de la vainillina (Loscos et al., 2010), específicamente en vainillina y siringaldehído como se puede observar en la figura 5.5.

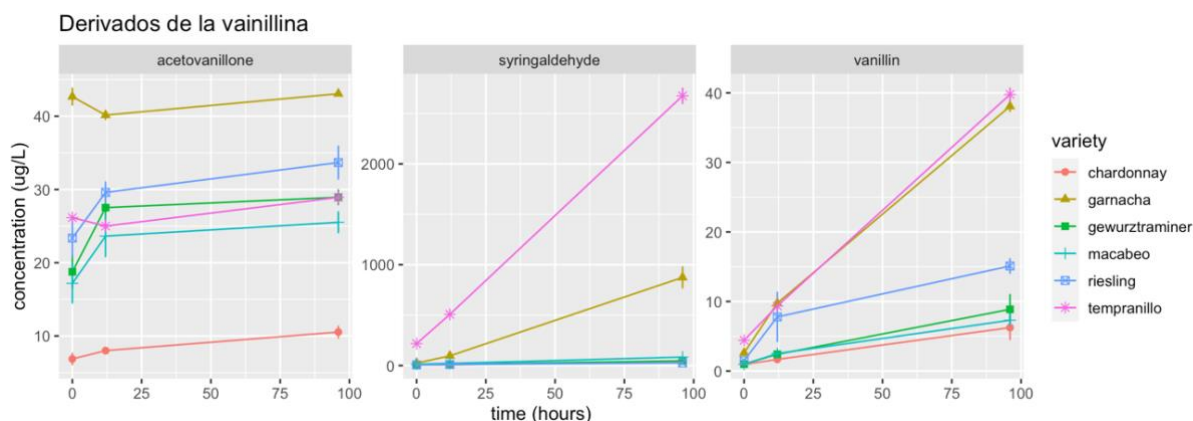


Fig.5.5. Evolución de derivados de la vainillina en el envejecimiento acelerado

Fenoles volátiles:

Sorprendentemente, la variedad con más contenido total de fenoles es la Gewürztraminer, principalmente por el alto contenido en eugenol, isoeugenol y 4-vinilguaiacol, este último aroma se ha identificado como característico y diferenciante de esta variedad (Furdíková et al., 2017). Sin embargo, Tempranillo presenta los contenidos mayores de otros fenoles como guaiacol y siringol. En la figura 5.6 se puede observar la evolución de estos compuestos con el envejecimiento en cada variedad.

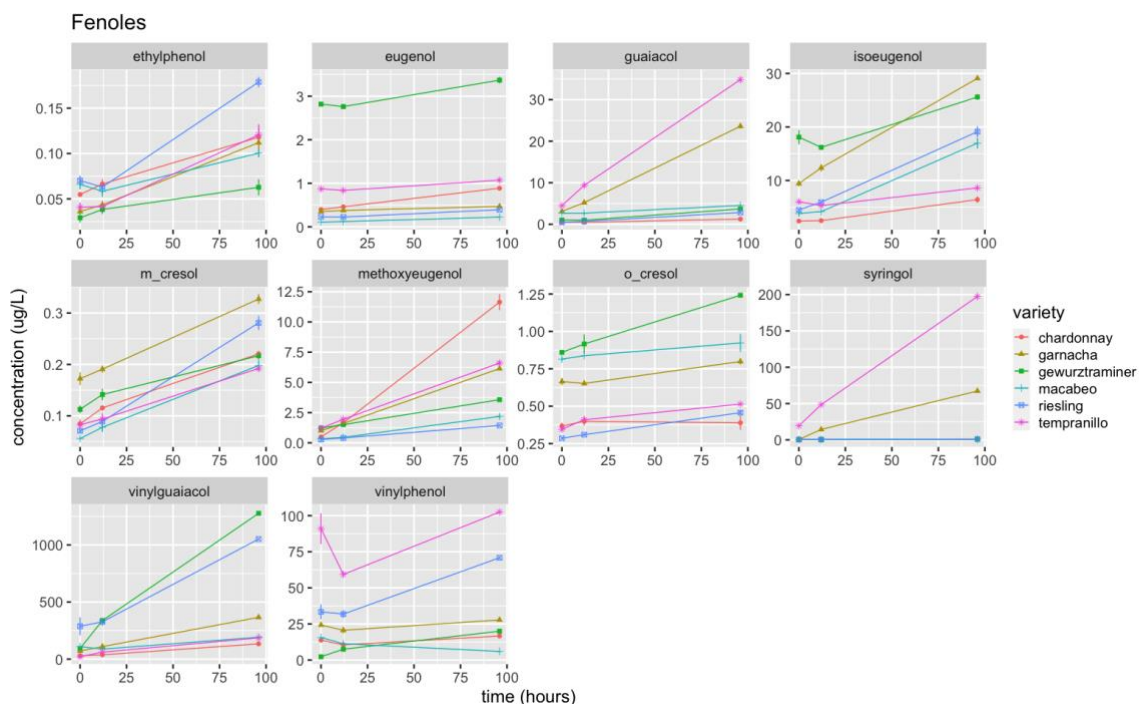


Fig.5.6. Evolución de los fenoles en el envejecimiento acelerado

Norisoprenoides:

Respecto a los norisoprenoides, cuya evolución durante el envejecimiento se encuentra representada en la figura 5.7, el mayor contenido total está presente en Riesling, debido a los altos niveles de TDN, Riesling acetal y vitispiranos de sus vinos envejecidos a 96h. Para la β -damascenona, los mayores niveles se encuentran en Tempranillo, Gewürztraminer, Riesling y Garnacha, en este orden. Los niveles de β -ionona son mayores en Riesling, Garnacha y Tempranillo. En general, esta familia de compuestos se caracteriza por un aumento durante el envejecimiento que contribuye además a una gran diferenciación entre variedades a las 96h.

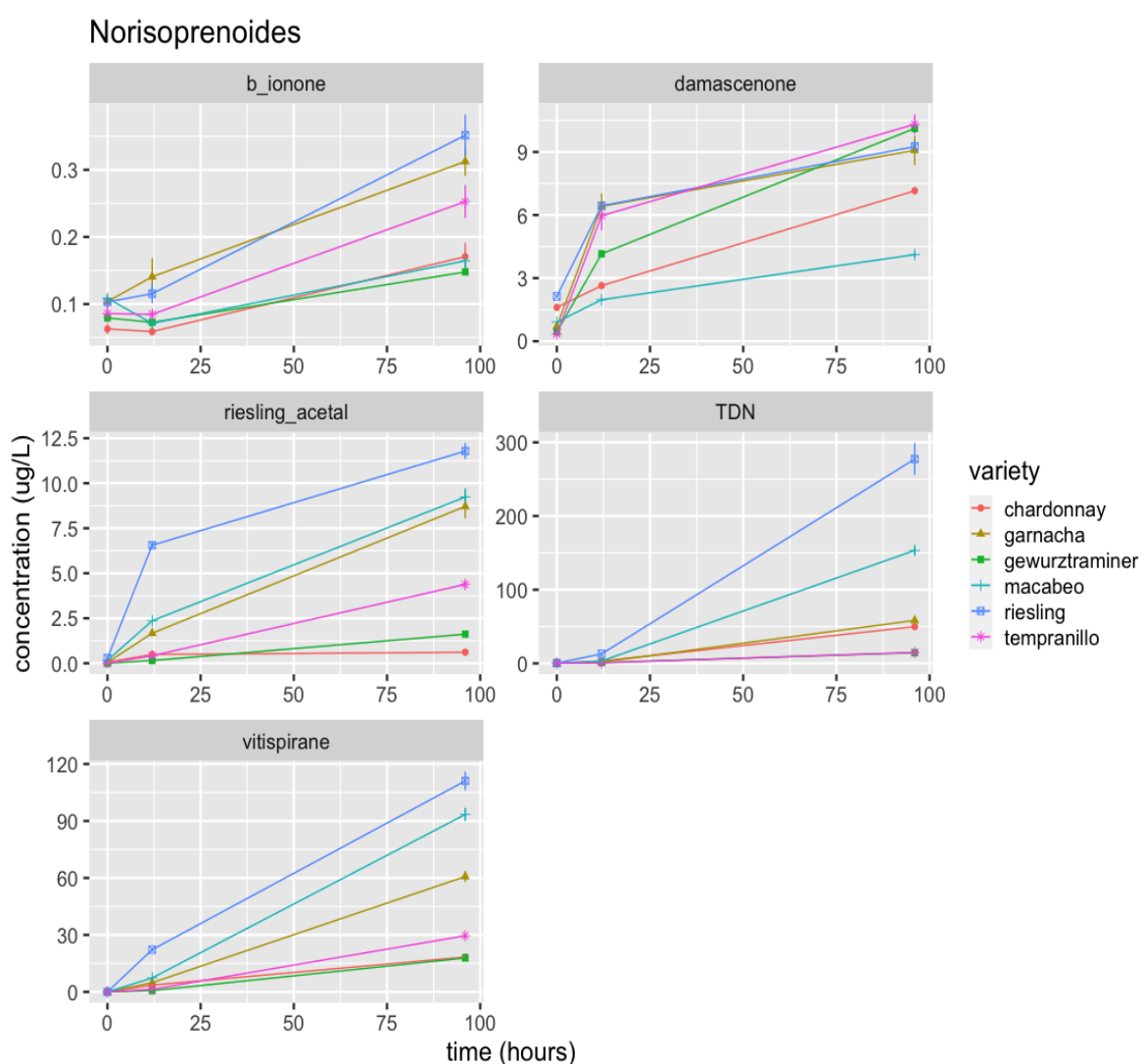


Fig.5.7. Evolución de norisoprenoides en el envejecimiento acelerado

Terpenos:

Los mayores niveles de terpenos totales se encuentran en Gewürztraminer. En la figura 5.8 se observa la evolución de estos aromas durante el envejecimiento acelerado. Gewürztraminer sobresale por sus niveles superiores de este tipo de compuestos, especialmente de óxido de rosa, que ha sido identificado previamente como un aroma característico e importante para esta variedad (Guth, 1997) y que se ha relacionado con el aroma a lichi característico de estos vinos (Ong & Acree, 1999). A pesar de que a las 12h comienzan a degradarse estos aromas, el linalool, en esta variedad, en lugar de degradarse sigue mostrando un incremento notable hasta las 96h. Esto sugiere la presencia de una reserva significativa de precursores en esta variedad. Riesling también destaca por su contenido en geraniol, linalool, nerol, óxido de linalool y terpineol (Skinkis et al., 2008). En el resto de las variedades los contenidos son variables siendo inferiores en Tempranillo y Macabeo.

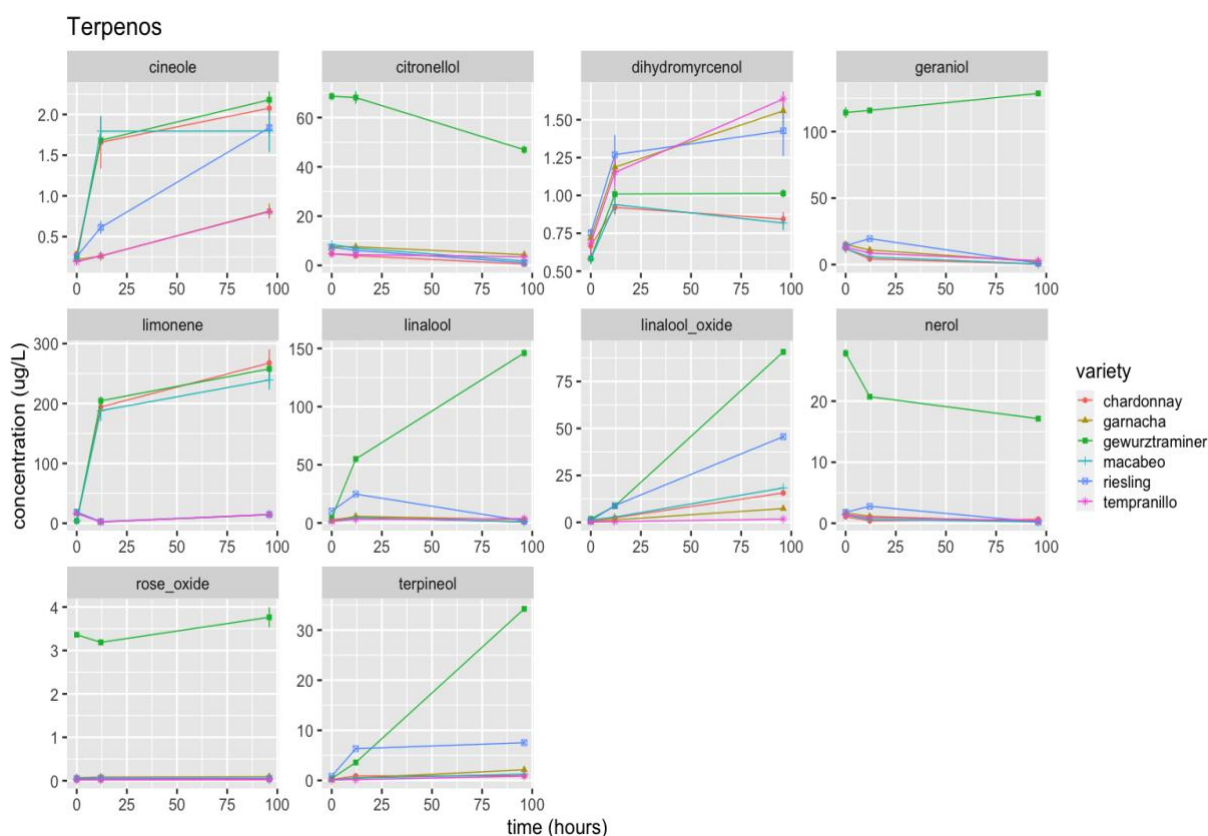


Fig.5.8. Evolución de norisoprenoides en el envejecimiento acelerado

Derivados de ácido cinámico:

Para los compuestos derivados del ácido cinámico (cinamato y dihidrocinaamato de etilo) los mayores contenidos se presentan en Chardonnay, como se muestra en la figura 5.9. Específicamente el cinamato de etilo ha sido descrito como uno de los compuestos claves para el aroma del Chardonnay (Jaffré et al., 2011; Moio et al., 1994). La variabilidad de estos compuestos es mayor en los vinos envejecidos durante 96h.

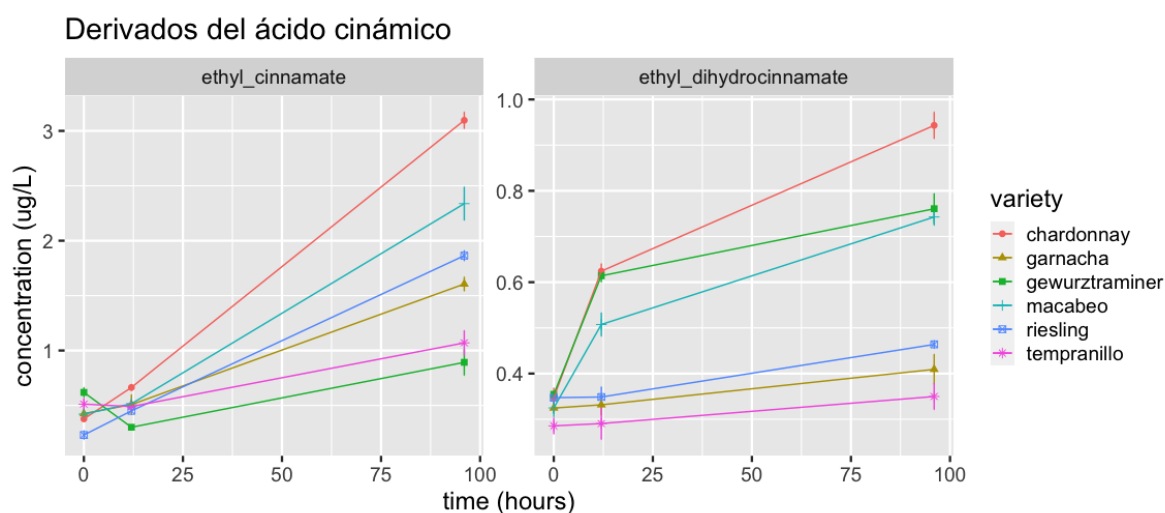


Fig.5.9. Evolución de derivados del ácido cinámico durante el envejecimiento acelerado

Lactonas:

El mayor contenido total de las lactonas analizadas en este trabajo, masoia lactona y γ -nonalactona, se observa en la variedad Macabeo, debido especialmente a la concentración muy superior de masoia lactona que presenta, como se puede observar en la figura 5.10, que coincide también con una alta concentración de γ -nonalactona. Los vinos envejecidos a 96h de Garnacha presentan una concentración de γ -nonalactona superior a la otra variedad tinta, el Tempranillo, lo que ha sido descrito anteriormente (Ferreira et al., 2000). En general, el mayor contenido de estas lactonas se encuentra a 96h.

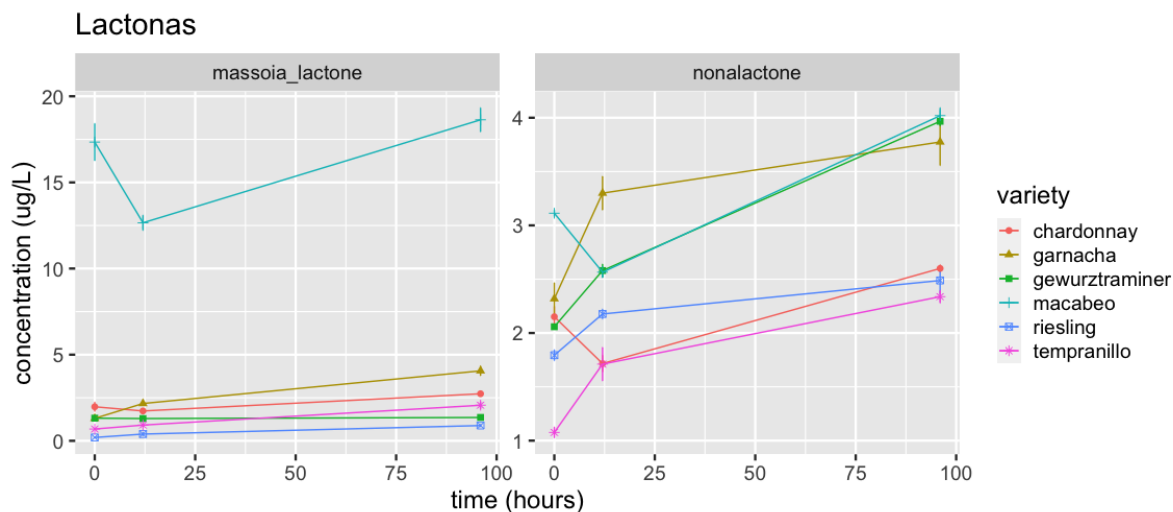


Fig.5.10. Evolución de lactonas en el envejecimiento acelerado

Mercaptanos polifuncionales:

En el caso de los mercaptanos polifuncionales, hay que diferenciar entre los varietales, y el resto. De los varietales, el más abundante es el MH, seguido de su acetato, el MHA. Ambos se encuentran en mayores niveles en Garnacha y Macabeo, como se puede observar en la figura 5.11. De estos compuestos, el MH es el único que tiene precursor directo, por lo que aumenta durante el envejecimiento, mientras que el MHA decrece al irse hidrolizando.

La MP igualmente se encuentra en mayores niveles en Garnacha y Macabeo, si bien en este caso, los vinos envejecidos de Chardonnay llegaron a tener cantidades máximas. Estos hallazgos coinciden con los resultados obtenidos por Capone et al. (Capone et al., 2018) en un estudio que respalda posible contribución significativa de estos compuestos al aroma del Chardonnay.

La mayor variabilidad en estos aromas se aprecia a las 96h, excepto en el caso del MHA, donde se observa una disminución debido a la hidrólisis de este compuesto para generar 3-mercaptohexanol, que se ha descrito como el mecanismo clave responsable de la desaparición del distintivo aroma a fruta de la pasión, producido por el MHA, en vinos de Sauvignon Blanc (Herbst-Johnstone et al., 2011).

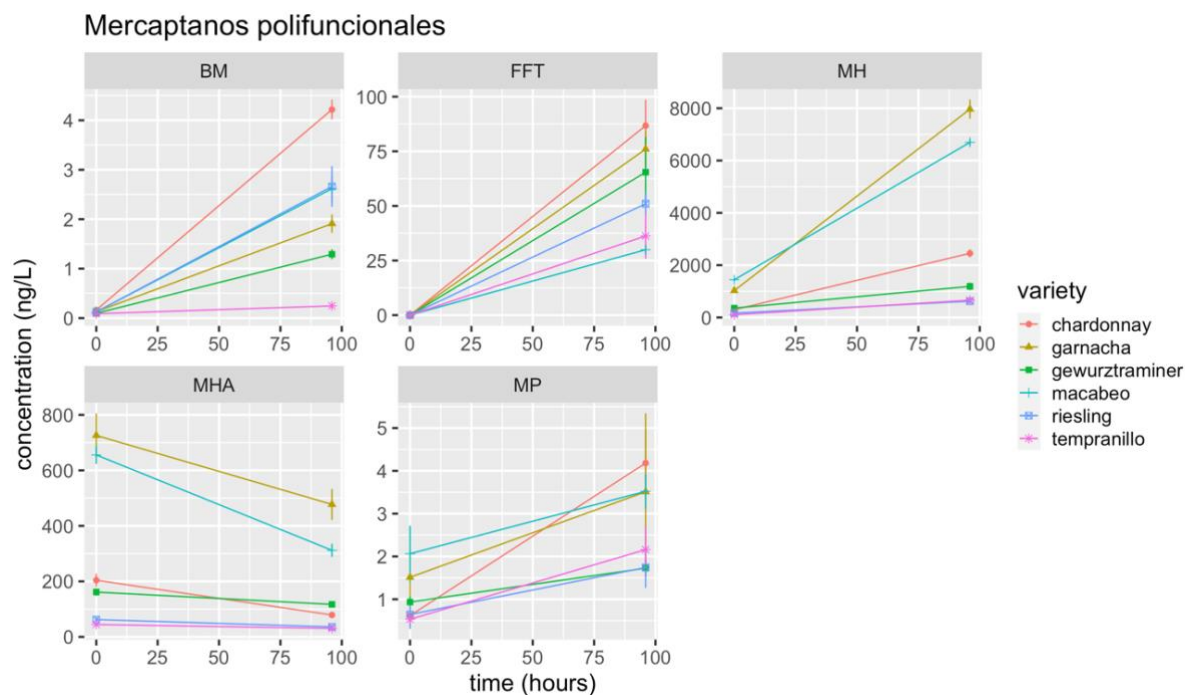


Fig.5.11. Evolución de los mercaptanos polifuncionales en el envejecimiento acelerado

Ésteres:

En el caso de los ésteres estudiados, por su parte, el leucato de etilo aumenta con el envejecimiento de los vinos (Denat et al., 2022) y presenta cantidades variables entre las muestras, como se aprecia en la figura 5.12. Los niveles más altos se encuentran en la variedad Chardonnay, seguida de Riesling y Macabeo.

El acetato de feniletilo no es un aroma varietal puro, ya que se forma mayoritariamente por la levadura y disminuye con el envejecimiento por hidrólisis (Denat et al., 2022; Oliveira & Ferreira, 2019). La variedad con el mayor contenido de este éster es Gewürztraminer.

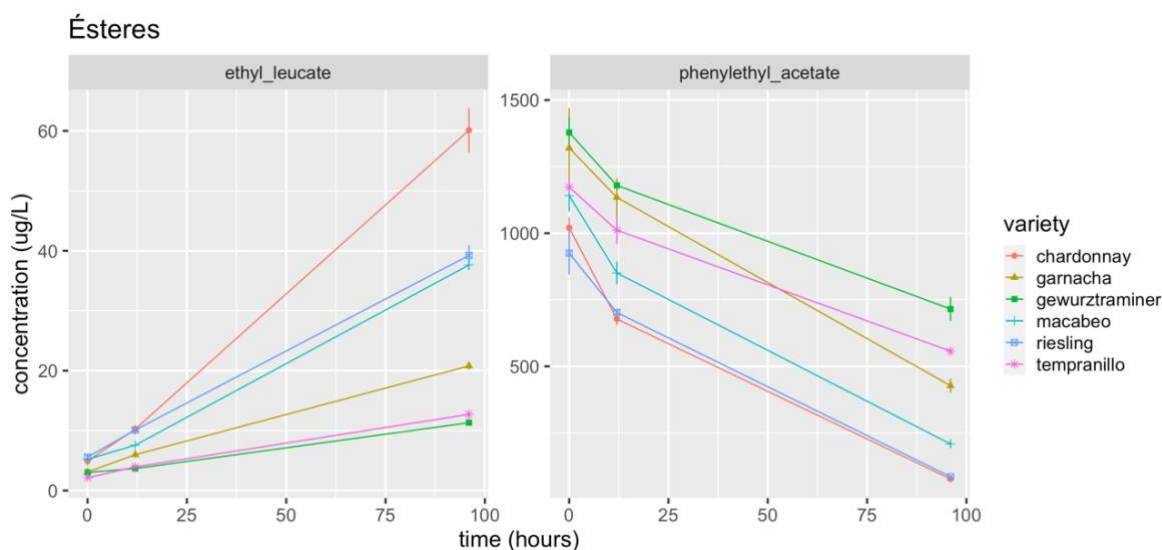


Fig.5.12. Evolución de los mercaptanos polifuncionales en el envejecimiento acelerado

Análisis de componentes principales (PCA)

Se realizó además un análisis de componentes principales (PCA) que se observa en la figura 5.13, en el que se muestra la distribución de las muestras según la variedad y el tiempo de envejecimiento (PCA-izquierda) y los compuestos aromáticos (PCA-derecha).

Como se puede observar, es evidente que la variedad más diferente es Gewürztraminer, la cual se encuentra separada del resto por el eje PC2. Esto se debe a que es una variedad rica en aromas de terpenos, que hacen que estas uvas y los vinos elaborados con ellas, tengan un característico aroma floral (Guth, 1997). Asimismo, el PCA evidencia que la siguiente variedad más diferente es la Tempranillo, que se diferencia del resto por su alto contenido en fenoles como 4-finilfenol, guaiacol y siringol y del aldehído siringaldehído (Alegre, Sáenz-Navajas, et al., 2020). Estas diferencias se hacen patentes a partir de las 12h y se intensifican a las 96h.

Por otro lado, el eje PC1 separa las muestras según el tiempo de envejecimiento. A la derecha, se encuentran los hidrolizados de 96h y a la izquierda, tanto los vinos recién fermentados como los hidrolizados durante 12h. Para el conjunto de variedades neutras Garnacha, Macabeo, Riesling y Chardonnay, solo se manifiestan diferencias varietales claras tras 96h, con el aumento en la formación de norisoprenoides, fenoles y mercaptanos polifuncionales, que son los compuestos de mayor variabilidad entre las muestras una vez transcurridas las 96h de

envejecimiento acelerado, ya requieren un mayor tiempo de hidrólisis. Los vinos jóvenes y las muestras de 12h, aunque están en el mismo lado del eje PC1 forman dos grupos bien diferenciados

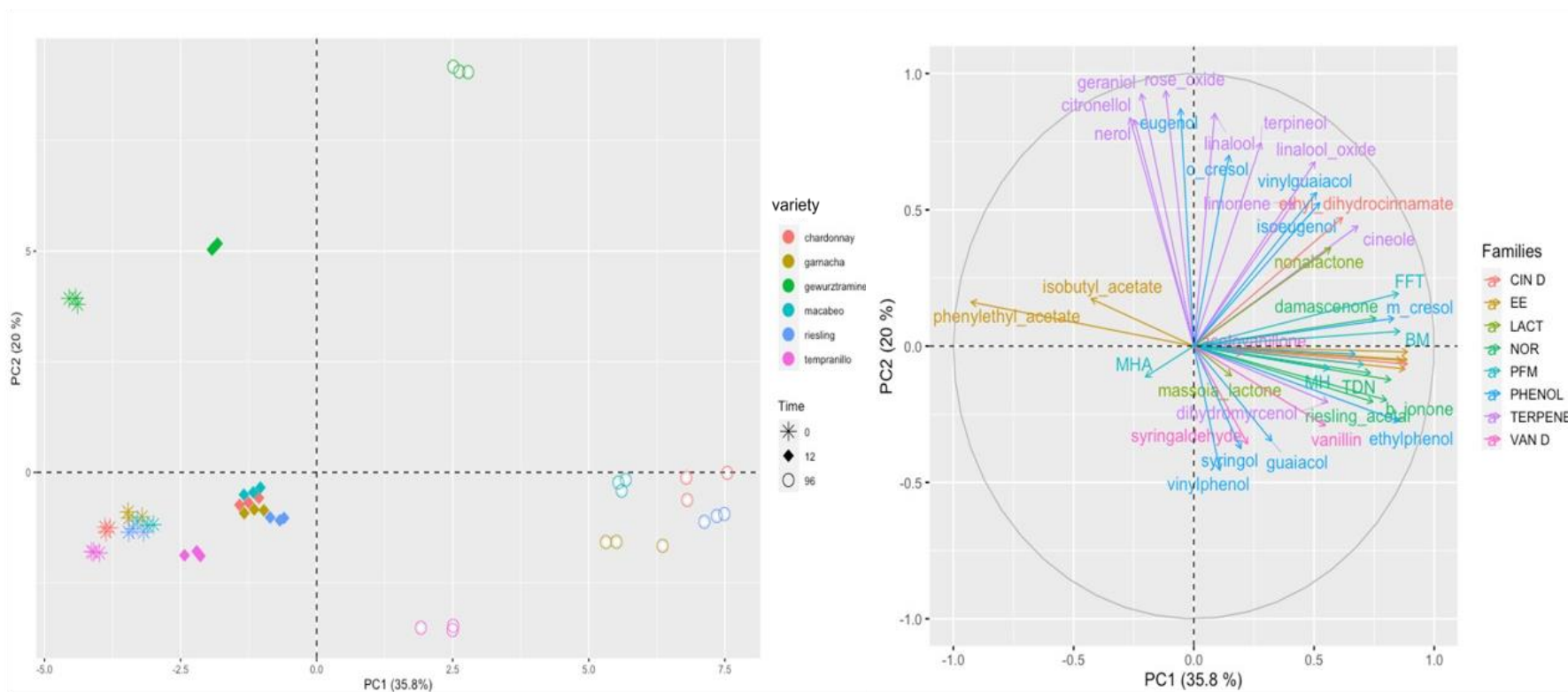


Fig.5.13. Análisis de Componentes Principales (PCA). A la izquierda: Distribución de las muestras de cada variedad a los tres tiempos estudiados. A la derecha: Distribución de los compuestos aromáticos

3.2 Análisis UHPLC-MS de los vinos jóvenes

Los extractos de los vinos t_0 de cada variedad fueron sometidos a un análisis metabolómico no dirigido por un método de UHPLC-MS. El tratamiento de datos se realizó en el software Metaboscape de Bruker, mediante el cual se obtuvo una tabla con 17598 features correspondientes a las 36 muestras analizadas (6 variedades de las que se hicieron 3 réplicas de fermentación y de cada fermentado se hicieron 2 réplicas de extracción SPE = 36 muestras).

En la figura 5.14 se muestra el PCA de la distribución de las muestras de vinos y los controles (QC). Los QC son muestras cuya función es evaluar la estabilidad y precisión del análisis y aportan un valor más significativo que la simple evaluación del rendimiento cromatográfico y de la espectrometría de masas. En el PCA estos (en rojo) se encuentran centrados formando un clúster, mientras que el resto de las 6 réplicas de cada variedad están formando sus propios clústeres por separado, lo que sugiere que el análisis ha transcurrido de forma correcta o sea que el equipo ha funcionado correctamente durante todo el análisis y que las diferencias encontradas se deberán a las muestras y no a errores de medición.

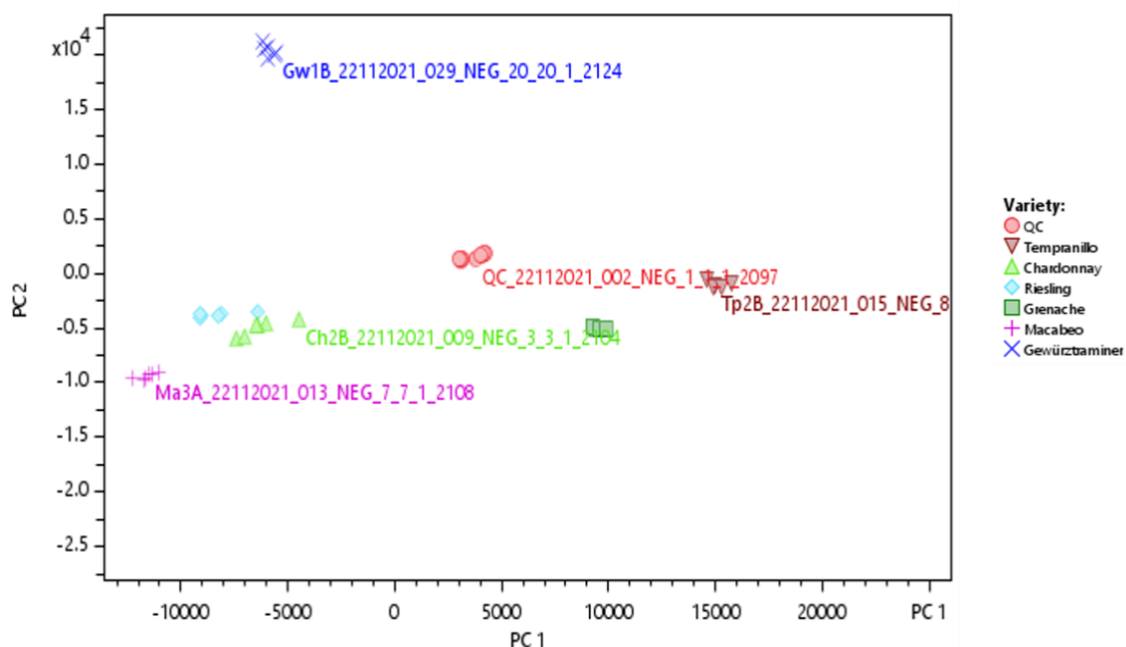


Fig. 5.14. PCA de los vinos a t_0 de las seis variedades y los QC en el análisis UHPLC-MS

Podemos apreciar también que las variedades que son más diferentes del resto son la Gewürztraminer y el Tempranillo, en clara coincidencia con los resultados del aroma varietal.

No sorprendentemente, también en este caso se evidencian las diferencias entre variedades tintas y blancas debido posiblemente a la presencia de polifenoles en las primeras.

No obstante, las coincidencias entre los PCAs obtenidos con los aromas y con los datos UHPLC-MS son sorprendentes, por cuanto los aromas derivan de componentes que, desde el punto de vista cuantitativo, representan menos del 1% de las señales obtenidas en el sistema UHPLC-MS. Esto indica, como ya se observó en un trabajo anterior (Alegre, Sáenz-Navajas, et al., 2020) (artículo Yohanna hidrólisis) que cada variedad tiene un patrón metabólico de metabolitos secundarios muy característico. Es muy llamativo que el color no sea el principal criterio de diferenciación.

3.2.1 Tratamiento y selección de los features detectados

El flujo de trabajo seguido para tratar con esta enorme cantidad de señales fue, primeramente, filtrar aquellas señales que, por su masa exacta coincidieran con las de los compuestos que aparecen las bases de datos elaboradas y mencionadas anteriormente en el capítulo 4.

Una vez filtrados los *features* en el software de Metaboscape, las señales de importancia se redujeron a 1117, que se encontraban dentro de un error en la masa exacta de ± 5 ppm respecto a la masa teórica. El próximo paso fue definir si estas señales podían cumplir o no con la estructura propuesta, para lo que realizamos una adquisición en modo *data dependent* (MS/MS) para intentar obtener los espectros de MS² de los *features*. Este análisis se hizo sobre el QC y los extractos de los mostos de cada variedad, ya que en estos últimos podrían encontrarse algunos precursores en mayor concentración. Una vez hechos estos análisis, para los *features* que no se obtuvo su espectro de fragmentación y específicamente para los extractos de los vinos to, se utilizó una lista de precursores (SPL-Scheduled Precursor List) que contenía información sobre los valores de m/z y los tiempos de retención, como se explicó anteriormente en el capítulo 4, para intentar de esta forma asegurar la adquisición de sus espectros MS². Además, se realizó una búsqueda de coincidencias con los precursores ya identificados anteriormente por el método de fraccionamiento descrito en el capítulo 4.

Por otro lado, se realizó en el programa Rstudio una búsqueda de correlaciones positivas significativas entre los features filtrados en el primer paso y los aromas en los vinos envejecidos durante 12 y 96 horas. Para los terpenos se seleccionó el aroma liberado a 12h para buscar correlaciones entre estos y sus posibles precursores, ya que conocemos que el punto máximo

de liberación por hidrólisis ácida a 75°C, de esta familia, es a las 12h porque luego ocurre mayormente su degradación, como se observó previamente en el estudio realizado en el capítulo 1 y aparece publicado en (Sánchez-Acevedo et al., 2024). Para el resto de los aromas entre los que se encuentran norisoprenoides, fenoles y otros, se empleó el tiempo de 96h.

3.2.2 Identificación de posibles precursores del aroma

Para la totalidad de señales analizadas (1117) fue posible obtener menos de un 20% del total espectros de masas/masas, esto se debe principalmente a la baja concentración en que se encuentran estas señales de potenciales precursores en los vinos, en muchos casos por debajo de 10^3 cuentas.

La identificación de los posibles precursores se hizo en diferentes niveles de confirmación:

- 1- Primera categoría: La estructura propuesta se justifica por los fragmentos presentes en el espectro MS^2 y existe una correlación significativa entre el contenido del precursor en la variedad y el aroma liberado en la hidrólisis.
- 2- Segunda categoría: El espectro de MS^2 presenta algún fragmento que justifica la estructura propuesta
- 3- Tercera categoría: Existe una correlación significativa entre el contenido del precursor en la variedad y el aroma liberado en la hidrólisis, pero no es posible justificar la estructura por el espectro de MS^2

En la tabla 5.2 se enumeran cada uno de los 192 potenciales precursores identificados en cada una de las categorías ordenados por tiempo de retención.

En la figura 5.15 se representa una visualización de cada categoría de identificación de los potenciales precursores, donde cada barra se divide en segmentos que representan los precursores previamente descritos en la bibliografía y aquellos encontrados como novedad en este trabajo.

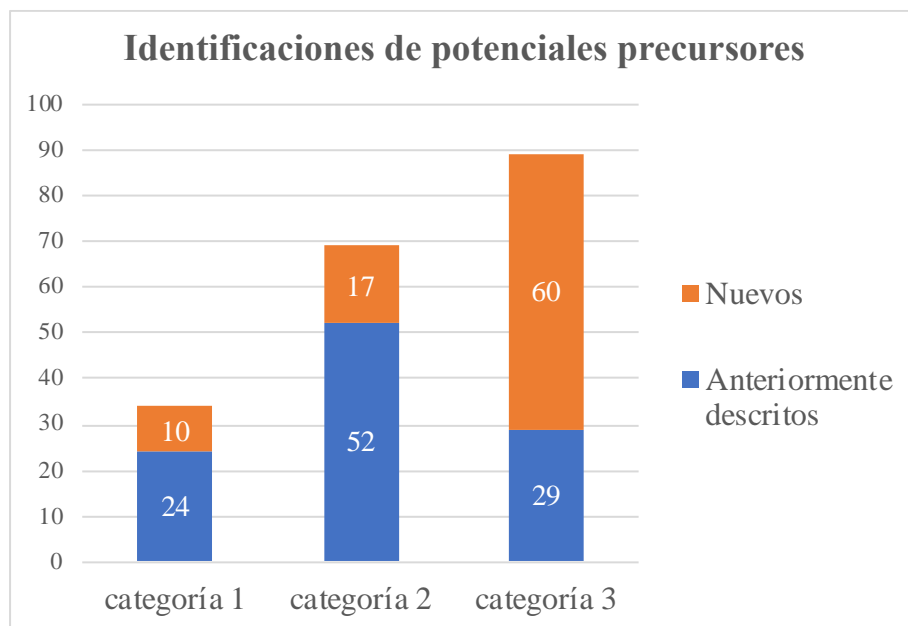


Fig. 5.15 Novedades en las identificaciones de los potenciales precursores glicosídicos por categorías

En la primera categoría se identificaron 34 precursores de los cuales 27 pertenecen a terpenos, 6 corresponden a precursores de norisoprenoides y 1 a un precursor de fenol. Esta es la categoría en la que hay mayor seguridad tanto en la identificación de las moléculas como de su implicación en la producción de aromas. De manera notable, 10 de estos precursores no habían sido descritos antes en la bibliografía. Entre ellos, se encuentran 6 potenciales precursores de terpenos y 4 de norisoprenoides. Destacan especialmente 4 posibles trisacáridos, el resto son disacáridos, en su mayoría de pentosa-hexosa, a excepción de un disacárido de hexosa-deoxihexosa de un norisoprenoide.

En la segunda categoría, encontramos 69 precursores. entre ellos 17 precursores de fenoles, 5 de la familia de los derivados de la vainillina, 15 de terpenos, 16 de norisoprenoides y el resto pertenecen a otros compuestos de la bibliografía como derivados del ácido cinámico y del ácido benzoico, entre otros.

Por último, en la tercera categoría encontramos 89 potenciales precursores que presentan correlaciones con el correspondiente aroma. Entre estos se encuentran 1 precursor de fenol, 2 de la familia de la vainillina, 16 de norisoprenoides y el resto pertenecen a terpenos. De estos, 64 no habían sido descritos previamente en la bibliografía.

Además, de la totalidad de las señales identificadas con los distintos niveles de confirmación, se encontraron 15 coincidencias con aquellos identificados en el fraccionamiento de las muestras de Garnacha (Capítulo 4), de los cuales 9, tienen además correlación con las fracciones, lo que contribuye a la identificación propuesta para estos precursores.

En general, la mayoría de las señales identificadas pertenecen a disacáridos de pentosa-hexosa, aunque también se proponen algunos trisacáridos. Para una gran mayoría de precursores se detectó la presencia del fragmento resultante del aducto con fórmico $[M+HCOOH-H]^-$, muy superior en intensidad al fragmento típico de pérdida de un protón $[M-H]^-$, lo cual había sido reportado anteriormente (Caffrey et al., 2020).

Del total detectado, 87 precursores no habían sido reportados anteriormente por otros autores. En la tabla 5.2 se muestra para los precursores ya identificados anteriormente los fragmentos (señalados en **negrita**) que no aparecen en la bibliografía.

En la figura 5.16, se muestran ejemplos de los diagramas de caja de precursores identificados en la categoría 1 para terpenos y norisoprenoides. En estos se puede observar la gran variabilidad del contenido que existe de estos precursores en las distintas variedades. Gewürztraminer es la variedad más rica en contenido de estos precursores de terpenos y así lo demuestra la alta concentración de estos aromas encontrada en sus vinos envejecidos a 12h (tabla 5.1), que es el mayor contenido de terpenos entre las seis variedades. La variedad Riesling destaca como la más rica en estos precursores de norisoprenoides, incluso Wei et al. (Wei et al., 2021) habían encontrado altas cantidades de algunos precursores de norisoprenoides en distintos clones de esta variedad. Esto explica el alto contenido de estos aromas encontrados en los vinos envejecidos a 96h (tabla 5.1) y que ya había sido reportado anteriormente por otros autores (Sacks et al., 2012).

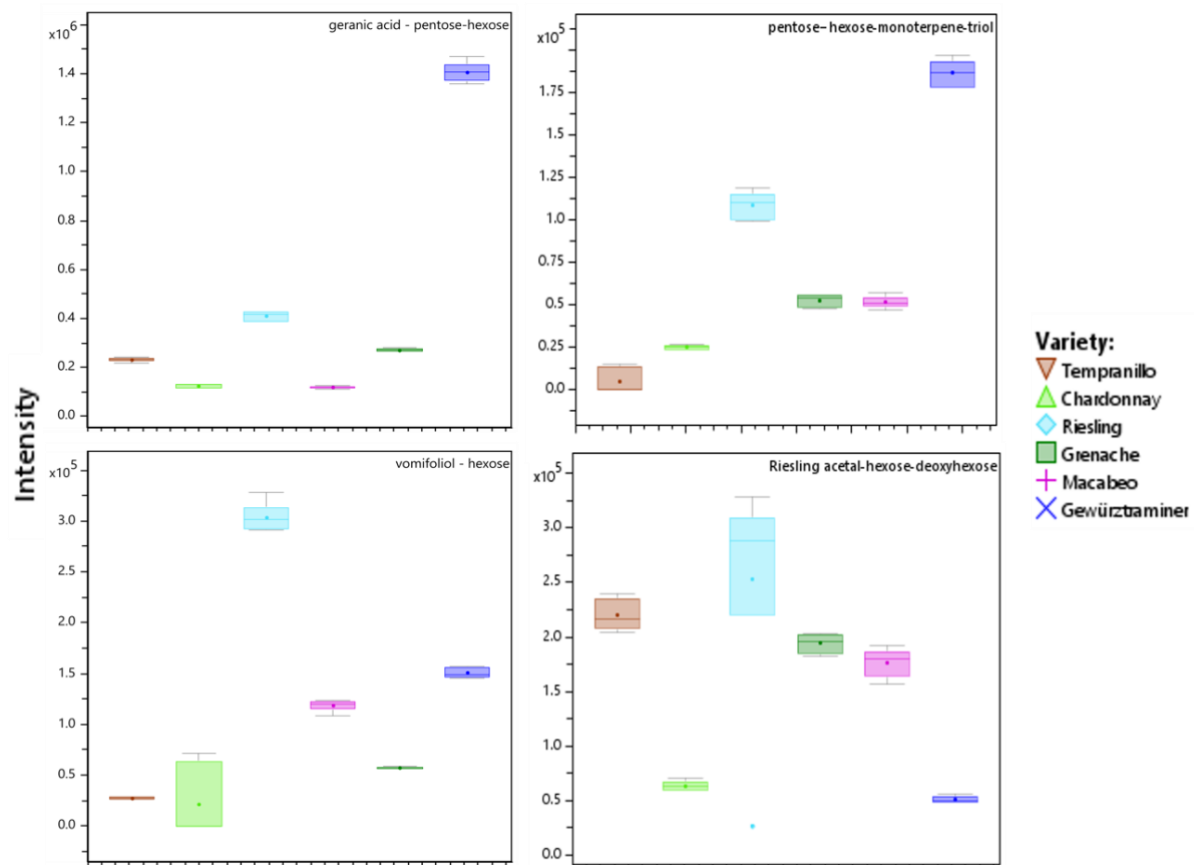


Fig 5.16. Diagramas de caja de potenciales precursores identificados en la primera categoría. Los dos superiores pertenecen a terpenos y los inferiores a norisoprenoides.

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr.(c)
1	2	1,59	trihydroxybenzoic acid hexose-hexose	C19H26O15	494,1272	493,1200	[M-H] ⁻	125,0246	169,0143	(1)		
2	2	1,79	hydroxy-C4-pentose-hexose	C15H28O11	384,1630	429,1612	[M+HCOOH-H] ⁻	383.1558, 251.1128, 161.0449, 131.0352		(2)		
3	2	2,12	dihydroxybenzoic acid hexose	C13H16O9	316,0794	315,0721	[M-H] ⁻	108,0216	153,0196	(1)		
4	3	2,63	guaiacol-hexose	C13H18O7	286,1055	331,1037	[M+HCOOH-H] ⁻			(3)	guaiacol: 0,99***/ siringol: 0,96**	
5	2	2,98	syringol-hexose-hexose	C20H30O13	478,1681	477,1609	[M-H] ⁻	323.0974, 161.0455, 315.1085 (pérdida hex)	153,0555			
6	2	3,17	monohydroxybenzoic acid hexose	C13H16O8	300,0846	299,0773	[M-H] ⁻	179,0357	137,0242	(1)		
7	2	3,54	monohydroxydimethoxybenzoic acid hexose	C15H20O10	360,1056	359,0983	[M-H] ⁻	161.0448 , 182.0222, 166.9987	197,0455	(1)		
8	2	3,59	monohydroxycinnamic acid-hexose-hexose	C20H26O11	488,1529	487,1456	[M-H] ⁻	325.0925, 323.0977 , 119.0504	163,0401	(1)		
9	2	4,03	dihydroxycinnamic acid hexose 1	C15H18O9	342,0951	341,0878	[M-H] ⁻	135,0453	179,0349	(1)		
10	2	4,22	monohydroxycinnamic acid hexose 1	C15H18O8	326,1002	371,0983	[M+HCOOH-H] ⁻	119.0502, 325.0939	163,0401	(1)		
11	2	4,29	vanillic acid hexose 1	C14H18O9	330,0949	329,0877	[M-H] ⁻	161.0450, 152.0110, 123.0451, 269.0666, 209.0455, 119.0349	167,0349	(4)		
12	2	4,43	syringaldehyde-hexose	C19H28O12	448,1579	447,1506	[M-H] ⁻	122,0371	181,0506			
13	2	5,46	monohydroxydimethoxybenzoic acid hexose	C15H20O10	360,1055	359,0982	[M-H] ⁻		197,046	(1)		
14	3	5,65	acetovanillone-hexose 1 ó syringaldehyde-deoxyhexose 1	C15H20O8	328,1155	373,1137	[M+HCOOH-H] ⁻			(4)	vainillina: 0,96**/ siringaldehído: 0,94**	
15	2	5,66	guaiacol-hexose-hexose-pentose 1	C24H36O16	580,2001	579,1928	[M-H] ⁻	311.0985, 417.1398				
16	3	5,79	hydroxydihydrolinalool-hexose-hexose 1	C22H40O12	496,2519	541,2501	[M+HCOOH-H] ⁻			(2)	óxido de rosa: 0,99***/ citronelol: 0,89***	
17	2	5,81	vanillin-hexose	C14H18O8	314,1014	313,0941	[M-H] ⁻		151,0398	(4)		

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
18	2	5,82	dihydroxybenzoic acid hexose-deoxyhexose	C19H26O13	462,1370	461,1297	[M-H] ⁻	179.0558 , 108.0211		(1)		
19	2	5,87	acetovanillone-hexose 2 ó syringaldehyde-deoxyhexose 2	C15H20O8	328,1156	327,1084	[M-H] ⁻		165,0557	(4)		
20	2	5,87	guaiacol-hexose-hexose-pentose 2	C24H36O16	580,1999	579,1926	[M-H] ⁻	149.0450, 161.0458, 179.0562, 293.0886, 323.0976, 341.1090, 417.1395 (pérdida de hex)				
21	2	5,93	ipsdienol-hexose-hexose-pentose	C28H46O16	638,2781	637,2710	[M-H] ⁻	1610458				
22	2	6,03	dihydroxycinnamic acid hexose 2	C15H18O9	342,0949	341,0876	[M-H] ⁻	135,0453	179,0349	(1)		
23	3	6,14	vanillin-hexose-hexose	C20H28O13	476,1529	521,1511	[M+HCOOH-H] ⁻					vainillina: 0,97***/ siringaldehído: 0,87*
24	2	6,15	4-methylguaiacol-hexose-pentose 1	C19H28O11	432,1628	477,1610	[M+HCOOH-H] ⁻	431.1559, 161.0453, 179.0559, 269.1027 (pérdida de hexosa), 293.0881 , 125.0244		(3)		
25	2	6,16	3,4-dihydroxy-7,8-dihydro-β-ionol-hexose-hexose	C25H44O13	552,2774	597,2757	[M+HCOOH-H] ⁻	551.2698, 161.0457 , 179.0561 , 341.1079 , 323.0988	227,0713	(2)		
26	2	6,18	guaiacol-pentose-hexose	C18H26O11	418,1473	417,1400	[M-H] ⁻	293.0876 , 311.0979 , 179.0568 , 161.0450, 149.0456, 131.0354, 143.0357		(3)		
27	3	6,19	dihydroxy-dihydrolinalool-hexose-pentose-pentose 1	C26H46O16	614,2782	659,2764	[M+HCOOH-H] ⁻					óxido de rosa: 0,99***/ citronelol: 0,923***
28	2	6,23	vanillic acid hexose 2	C14H18O9	330,0950	329,0877	[M-H] ⁻	152.0114, 123.0451	167,0349	(1)		
29	3	6,27	dihydroxy-dihydrolinalool-hexose 1	C16H30O8	350,1941	349,1869	[M-H] ⁻			(9)		óxido de rosa: 0,93**/ óxido de linalool: 0,84*/ linalool: 0,83**/ citronelol: 0,97**
30	1	6,27	dihydroxy-dihydrolinalool-pentose-hexose 1	C21H38O12	482,2362	527,2344	[M+HCOOH-H] ⁻	481.2288, 131.0348 , 149.0451 , 161.0450 ,	nf	(2)		óxido de rosa: 0,99***/

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
								179.0559, 293.0882, 311.0981, 349.1866 (pérdida pent)				citronelol: 0,92***
31	2	6,29	monohydroxycinnamic acid hexose 2	C15H18O8	326,1001	325,0929	[M-H] ⁻	179.0555, 119.0502	164,0001	(1)		
32	2	6,31	monohydroxydimethoxyacetophenone hexose	C16H22O9	358,1262	357,1189	[M-H] ⁻	161.0451, 179.0563, 180.0421	195,0662	(1)		
33	2	6,33	Riesling acetal-hexose-hexose 1	C25H42O13	550,2623	595,2604	[M+HCOOH-H] ⁻	549.25523, 161.0456, 179.0560, 341.1078, 387.2022 (pérdida de hexosa)	225,1496	(2)		
34	2	6,36	cresol-hexose-pentose-pentose	C23H34O14	534,1948	533,1875	[M-H] ⁻	161.0455, 325.0925 (pérdida de hexosa)		(3)		
35	3	6,41	dihydroxy-dihydrolinalool-pentose-hexose 2	C21H38O12	482,2361	527,2342	[M+HCOOH-H] ⁻			(2)		óxido de linalool: 0,96**
36	2	6,47	cresol-pentose -hexose 1	C18H26O10	402,1524	447,1507	[M+HCOOH-H] ⁻	401.1447, 161.0450, 293.0878, 269.1025 (pérdida pentosa), 131.0347, 239.0925 (pérdida hexosa)		(3)		
37	1	6,51	dihydroxy-dihydrolinalool-hexose-hexose-pentose	C27H48O17	644,2886	689,2886	[M+HCOOH-H] ⁻	643.2821, 149.0461, 161.0458, 179.0568, 293.0873, 481.2292 (pérdida de hexosa), 511.2383 (pérdida de pentose), 349.1866 (perdida de pent-hex)	187,1346			óxido de rosa: 0,99***/ citronelol: 0,95***
38	1	6,55	hydroxydihydrolinalool-hexose-hexose 2	C22H40O12	496,2517	541,2497	[M+HCOOH-H] ⁻	495.2444, 161.0450, 145.0504, 163.0611, 307.1031, 325.1138, 349.1864 (pérdida deoxihexosa)		(2)		óxido de rosa: 0,99***/ citronelol: 0,92***
39	2	6,57	4-methylguaiacol-hexose-pentose 2	C19H28O11	432,1631	431,1559	[M-H] ⁻	179.0567, 269.1030 (pérdida de hex), 299.1134 (pérdida de pent)		(3)		

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
40	3	6,58	dihydroxy-dihydrolinalool-hexose-pentose-pentose 2	C26H46O16	614,2783	659,2765	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,95**/ citronelol: 0,92**	
41	3	6,6	linalool oxide-hexose-hexose-hexose 1	C28H48O17	656,2891	655,2818	[M-H] ⁻				limoneno: 0,9*/ cineol: 0,95*	
42	2	6,62	monohydroxycinnamic acid hexose 3	C15H18O8	326,1000	325,0927	[M-H] ⁻	119,0503	163,0399	(1)		
43	2	6,66	cresol-pentose-hexose 2	C18H26O10	402,1524	447,1506	[M+HCOOH-H] ⁻	401.1450, 131.0353, 149.0459, 161.0455, 179.0555, 293.0889 , 269.1028 (pérdida de pentosa)		(3)		
44	2	6,68	norisoprenoid group 4- hexose-deoxyhexose 1	C25H40O12	532,2520	577,2498	[M+HCOOH-H] ⁻	531.2449, 325.1140, 307.1031, 179.0565, 163.0616, 161.0456, 369.1917 (pérdida de hex), 385.1863 (pérdida de hex)	223,1347	(5)		
45	2	6,7	ethoxymethylmethoxyphenol hexose	C16H24O8	344,1467	343,1397	[M-H] ⁻		181,0873	(1)		
46	3	6,71	dihydro-monoterpentetraol-hexose	C15H28O7	320,1832	365,1815	[M+HCOOH-H] ⁻			(2)	óxido de rosa: 0,94**/ linalool: 0,81**/ citronelol: 0,979**	
47	3	6,74	dihydroxy-dihydrolinalool-hexose 2	C16H30O8	350,1938	395,1921	[M+HCOOH-H] ⁻			(9)	óxido de linalool: 0,98**/ linalool: 0,91*/ terpineol: 0,92*	
48	2	6,77	ipsdienol-hexose-deoxyhexose 1	C21H34O9	430,2201	429,2128	[M-H] ⁻	267.1599, 179.0560, 161.0458,				
49	2	6,78	norisoprenoid group 4-pentose-hexose	C24H38O12	518,2362	563,2343	[M+HCOOH-H] ⁻	517.2295, 131.0353, 149.0459, 161.0459, 179.0558, 293.0880, 311.0992, 385.1870 (pérdida de pentosa)	223,1343	(2 y 11)		+
50	2	6,81	norisoprenoid group 4-hexose 1	C19H30O8	386,1939	431,1921	[M+HCOOH-H] ⁻	385.1867, 161.0454 , 179.0558 , 205.1231	223,134	(2)		+
51	3	6,82	hydroxycitronellol-hexose-hexose	C22H42O12	498,2695	543,2677	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/	

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
											citronelol: 0,92***	
52	3	6,84	hydroxydihydrolinalool-pentose 1	C15H28O6	304,1885	303,1813	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/ citronelol: 0,92***	
53	3	6,84	norisoprenoid group 2-deoxyhexose-hexose-pentose	C30H50O15	650,3130	649,3057	[M-H] ⁻				TDN: 0,82*	
54	1	6,86	Riesling acetal-pentose-hexose 1	C24H40O12	520,2511	565,2491	[M+HCOOH-H] ⁻	519.2443, 131.0349, 149.0456, 161.0455, 179.0562, 293.0873, 311.0975, 387.2021 (pérdida pentosa)	225,1491		vitispiranos: 0,86*/ TDN: 0,94**	
55	3	6,89	Riesling acetal-hexose-hexose-pentose	C30H50O17	682,3048	727,3030	[M+HCOOH-H] ⁻				TDN: 0,83*	
56	2	6,9	linalool oxide-hexose 1	C16H28O7	332,1834	377,1816	[M+HCOOH-H] ⁻	331.1763, 161.0460, 179.0557	169,1228	(9)		
57	2	6,9	linalool oxide-pentose-hexose 1	C21H36O11	464,2256	509,2238	[M+HCOOH-H] ⁻	463.2181, 131.0349, 149.0453, 161.0455, 179.0564, 293.0872, 311.0992, 331.1757	169,1236	(2)		+
58	2	6,91	norisoprenoid group 4-hexose-deoxyhexose 2	C25H40O12	532,2519	577,2502	[M+HCOOH-H] ⁻	531.2449, 325.1140, 307.1033, 179.0563, 163.0613, 161.0456, 369.1921 (pérdida de hex), 385.1863 (pérdida de hex)		(5)		+
59	3	6,94	norisoprenoid group 3-hexose-hexose-hexose	C31H54O17	698,3339	743,3321	[M+HCOOH-H] ⁻				Riesling acetal: 0,86*	
60	2	6,95	3,4-dihydroxy-7,8-dihydro-β-ionone-hexose-deoxyhexose	C25H42O12	534,2670	579,2653	[M+HCOOH-H] ⁻	161.0455, 163.0603, 179.0556				
61	3	6,96	hydroxycitronellol-hexose-hexose-hexose	C28H52O17	660,3213	659,3140	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,92**/citronelol: 0,89**	
62	1	6,98	hydroxydihydrolinalool-pentose-hexose	C21H38O11	466,2410	465,2337	[M-H] ⁻	149,0455		(2 y 10)	óxido de rosa: 0,95**/citronelol: 0,88**	

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
63	3	6,98	monoterpen-triol-hexose-deoxyhexose 1	C22H38O12	494,2356	539,2338	[M+HCOOH-H] ⁻			(2)	óxido de rosa: 0,96**/citronelol: 0,98**	
64	3	6,98	linalool oxide-hexose-pentose-pentose 1	C26H44O15	596,2674	641,2656	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,93**/citronelol: 0,938**	
65	2	7	3-hexen-1-ol-hexose-hexose	C18H32O11	424,1942	423,1869	[M-H] ⁻	261.1341 (pérdida de hex)		(2)		
66	3	7	linalool oxide-hexose-hexose-hexose 2	C28H48O17	656,2883	655,2810	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,98***/citronelol : 0,900***	
67	1	7,03	monoterpenol-pentose-hexose 1	C21H36O10	448,2306	493,2290	[M+HCOOH-H] ⁻	447.2235, 285.1704 (pérdida de hexosa), 293.0882, 149.0461 , 161.0452 , 179.0562		(6, 9 y 10)	óxido de rosa: 0,98***/citronelol : 0,94***	
68	3	7,03	monoterpenol-hexose-hexose-hexose 1	C28H48O16	640,2941	685,2923	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,92***	
69	2	7,05	Riesling acetal-pentose-hexose 2	C24H40O12	520,2514	565,2496	[M+HCOOH-H] ⁻	519.2449, 131.0355, 149.0455, 161.0454, 179.0559, 293.0882, 311.0995, 387.2023 (pérdida pent)	225,1496			
70	3	7,05	norisprenoide group 2-hexose-hexose-hexose	C31H52O17	696,3192	741,3175	[M+HCOOH-H] ⁻				vitispiranos: 0,92**/ Riesling acetal: 0,85*/ TDN: 0,83*	
71	3	7,06	hydroxycitronellol-pentose-deoxyhexose	C21H40O10	452,2619	497,2603	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,94***	
72	3	7,06	monoterpenol-hexose-hexose-pentose 1	C27H46O15	610,2825	609,2752	[M-H] ⁻			(6)	cineole: 0,89*	
73	3	7,06	hydroxycitronellol-deoxyhexose-hexose-pentose	C27H50O15	614,3150	613,3077	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,92***	
74	3	7,08	hydroxycitronellol-deoxyhexose-pentose-pentose	C26H48O14	584,3041	583,2968	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,88*/óxido de linalool: 0,89*/linalool: 0,89***/citronelol: 0,98*	

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
75	2	7,09	Riesling acetal-hexose 1	C19H33O8	388,2094	433,2077	[M+HCOOH-H] ⁻	387.2023, 161.0452 , 179.0563 , 207.1394	225,1496	(2)		
76	3	7,09	3,4-dihydroxy-7,8-dihydro-β-ionol-hexose	C19H34O8	390,2248	389,2175	[M-H] ⁻			(2)	vitispiranos: 0,83*/TDN: 0,82*	
77	2	7,11	linalool oxide-pentose-hexose 2	C21H36O11	464,2254	509,2238	[M+HCOOH-H] ⁻	463.2180, 311.0985 , 293.0877, 161.0456, 149.0456, 131.0355		(2 y 9)		
78	3	7,11	geranic acid-hexose-hexose-pentose 1	C27H44O16	624,2638	623,2565	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,91***	
79	3	7,12	norisoprenoid group 1-hexose-hexose-pentose	C30H48O16	664,2943	663,2870	[M-H] ⁻				vitispiranos: 0,84*/TDN: 0,98***	
80	3	7,15	geranic acid-pentose-hexose 1	C21H34O11	462,2095	461,2022	[M-H] ⁻			(5)	cincole: 0,89*	
81	3	7,18	Riesling acetal-deoxyhexose-hexose-pentose	C30H50O16	666,3095	665,3022	[M-H] ⁻				TDN: 0,91*	
82	1	7,2	norisoprenoid group 4-hexose 2	C19H30O8	386,1938	431,1921	[M+HCOOH-H] ⁻	385.1861, 161.0452 , 179.0558 , 205.1231	223,1335	(2)	TDN: 0,82*	
83	2	7,2	norisoprenoid group 4-hexose-deoxyhexose 3	C25H40O12	532,2514	577,2502	[M+HCOOH-H] ⁻	531.2441 , 325.1141, 307.1034, 179.0565 , 163.0610 , 161.0459 , 385.1861 (pérdida de hex)	223,1343	(5)		
84	3	7,2	citronellol-hexose-hexose-hexose	C28H50O16	642,3098	687,3079	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,97***/citronelol: 0,90**	
85	1	7,22	Riesling acetal-hexose-deoxyhexose	C25H42O12	534,2672	579,2654	[M+HCOOH-H] ⁻	533,2598, 161.0450, 163.0615, 325.1131, 307.1043, 387.2023 (pérdida de deoxihexosa)	225,1499		Riesling acetal: 0,84*	+
86	3	7,23	linalool oxide-hexose-hexose-pentose 1	C27H46O16	626,2783	671,2765	[M+HCOOH-H] ⁻			(5)	óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,93***	
87	2	7,24	4-ethylphenol-pentose-hexose	C19H28O10	416,1680	461,1662	[M+HCOOH-H] ⁻	415.1614, 131.0353, 149.0457, 161.0455, 179.0561, 293.0879 ,		(3)		

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
								311.0985, 283.1193 (pérdida de pentosa)				
88	1	7,26	Riesling acetal-hexose 2	C19H32O8	388,2092	433,2075	[M+HCOOH-H] ⁻	387.2018, 161.0452 , 179.0557 , 207.1385	225,1493	(2)	vitispiranos: 0,93**/TDN: 0,97**	
89	3	7,28	dihydroxy-dihydrolinalool-hexose-hexose	C22H40O13	512,2463	511,2391	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,96**/citronelol: 0,98**	
90	2	7,31	linalool oxide-hexose 2	C16H28O7	332,1833	377,1815	[M+HCOOH-H] ⁻	331.1763, 161.0460, 179.0557	169,1228	(9)		
91	1	7,32	monoterpene-triol-pentose-hexose	C21H36O12	480,2206	525,2186	[M+HCOOH-H] ⁻	479.2138, 293.0876, 311.0979 , 131.0347 , 149.0452 , 161.0453 , 317.1603 (pérdida de hexosa), 347.1711 (pérdida de pentosa)	185,1185	(2)	óxido de rosa: 0,86*/óxido de linalool: 0,89*/linalool: 0,89**/citronelol: 0,96*	++
92	3	7,32	dihydroxy-dihydrolinalool-hexose-hexose-hexose	C28H50O18	674,3013	673,2940	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,94**/linalool: 0,81**/citronelol: 0,97**	
93	3	7,34	monoterpenol-hexose-hexose 1	C22H38O11	478,2410	523,2391	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,95***	
94	3	7,35	geranic acid-hexose-hexose 1	C22H36O12	492,2201	537,2183	[M+HCOOH-H] ⁻			(5)	óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,92***	
95	2	7,36	4-ethylphenol-hexose-deoxyhexose 1	C20H30O10	430,1837	475,1819	[M+HCOOH-H] ⁻	429.1769, 325.1147 , 307.1047 , 145.0506, 163.0612 , 179.0563		(3)		
96	3	7,39	ipsdienol-pentose-hexose 1	C21H34O10	446,2153	445,2080	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,86*/citronelol: 0,82*	
97	1	7,39	dihydro-monoterpendiol-pentosa-hexosa	C21H38O11	466,2405	465,2332	[M-H] ⁻	511,2388 , 303.1807 (pérdida de pent), 131.0345 , 149.0453 , 179.0561		(2 y 10)	óxido de rosa: 0,95**/linalool: 0,80***/citronelol : 0,99**	++
98	2	7,39	monoterpen-triol-hexose-deoxyhexose 2	C22H38O12	494,2349	539,2332	[M+HCOOH-H] ⁻	493.2289, 307.1040, 161.0456 , 163.0612 ,	185,118	(2)		

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
								145.0507, 347.1699 (pérdida de deoxihexosa)				
99	3	7,4	hydroxydihydrolinalool-pentose 2	C15H28O6	304,1886	303,1813	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,91***	
100	3	7,41	geranic acid-pentose-hexose 2	C21H34O11	462,2101	461,2029	[M-H] ⁻			(5)	limoneno: 0,93*/cineole: 0,93*	
101	1	7,42	linalool oxide-pentose-hexose 3	C21H36O11	464,2253	509,2237	[M+HCOOH-H] ⁻	463.2182, 131.0350, 149.0454, 161.0453, 293.0885, 311.0982, 331.1756 (pérdida de pent)	169,123	(2 y 9)	óxido de rosa: 0,92**/óxido de linalool: 0,85*/linalool: 0,85***/citronelol : 0,99**	++
102	3	7,47	citronellol-hexose-hexose 1	C22H40O11	480,2560	525,2542	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,93*	
103	3	7,52	hydroxydihydrolinalool-hexose	C16H30O7	334,1989	379,1971	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,98***/citronelol : 0,95***	
104	3	7,53	3,4-dihydroxy-7,8-dihydro-β-ionol-hexose-hexose-pentose	C30H52O17	684,3194	729,3176	[M+HCOOH-H] ⁻				vitispiranos: 0,97**/Riesling acetal: 0,89*/TDN: 0,93**	
105	1	7,54	norisoprenoid group 3 pentose-hexose	C24H42O11	506,2720	551,2702	[M+HCOOH-H] ⁻	505.2654, 131.0352, 149.0458, 161.0452, 179.0563, 293.0874, 311.0986, 343.2130 (pérdida hexosa), 373.2228 (pérdida pentosa)	211,1704		vitispiranos: 0,82*	
106	1	7,54	linalool oxide-hexose-hexose-pentose 2	C27H46O16	626,2776	625,2703	[M-H] ⁻	161.0461, 179.0568, 463.2191 (pérdida de hexosa)		(5)	óxido de rosa: 0,98***/citronelol : 0,96***	
107	3	7,55	linalool oxide-hexose 3	C16H28O7	332,1835	377,1817	[M+HCOOH-H] ⁻			(9)	óxido de rosa: 0,93**/citronelol: 0,91**	

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
108	3	7,56	hydroxycitronellol-hexose-deoxyhexose	C22H42O11	482,2719	481,2646	[M-H] ⁻					óxido de rosa: 0,89*/óxido de linalool: 0,84*/linalool: 0,85**/citronelol: 0,96*
109	1	7,6	geranic acid-hexose-hexose 2	C22H36O12	492,2196	491,2123	[M-H] ⁻	179,0566 , 537,2184		(5)		óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,93***
110	3	7,6	monoterpen-triol-hexose-deoxyhexose 3	C22H38O12	494,2348	539,2330	[M+HCOOH-H] ⁻			(2)		óxido de rosa: 0,85*/óxido de linalool: 0,86*/linalool: 0,86**/citronelol: 0,92*
111	2	7,61	norisoprenoid group 3 -hexose-deoxyhexose	C25H44O11	520,2877	565,2858	[M+HCOOH-H] ⁻	519.2811, 325.1137, 161.0611, 161.0455	211,1703			
112	1	7,63	hydroxycitronellol-pentose-hexose 1	C21H40O11	468,2559	513,2545	[M+HCOOH-H] ⁻	467.2492, 131.0350, 149.0457, 293.0882, 335.2073 (pérdida de pentosa)				óxido de rosa: 0,96**/citronelol: 0,95** +
113	3	7,64	linalool oxide-hexose-pentose-pentose 2	C26H44O15	596,2660	641,2642	[M+HCOOH-H] ⁻					óxido de rosa: 0,86*/óxido de linalool: 0,88*/linalool: 0,88**/citronelol: 0,97*
114	1	7,64	linalool oxide-hexose-hexose-pentose 3	C27H46O16	626,2779	671,2767	[M+HCOOH-H] ⁻	625.2713, 131.0351 , 149.0450 , 161.0454 , 179.0566 , 293.0881, 463.2183 (pérdida de hexosa), 493.2285 (pérdida de pentosa), 331.1761 (pérdida de pent-hex)		(5)		óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,96***
115	3	7,67	hydroxycitronellol-pentose-pentose	C20H38O10	438,2458	437,2386	[M-H] ⁻					óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,91***
116	2	7,7	norisoprenoid grupo 1-pentose-hexose	C24H38O11	502,2409	547,2396	[M+HCOOH-H] ⁻	501.2342, 131.0349, 149.0456, 161.0460, 179.0564, 293.0873, 311.0983	207,1386	(5)		
117	1	7,72	hydroxycitronellol-pentose-hexose 2	C21H40O11	468,2564	513,2548	[M+HCOOH-H] ⁻	467.2493, 131.0353, 149.0459, 161.0453, 179.0564, 293.0878,	173,1546			óxido de rosa: 0,91*/óxido de linalool: 0,86*/linalool: 0,86***/citronelol: 0,99*

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
								467.2492, 335.2075 (pérdida de pentosa)				
118	2	7,73	norisoprenoid group 1- hexose-deoxyhexose	C25H40O11	516,2568	561,2549	[M+HCOOH-H] ⁻	515.2493, 163.0615, 179.0568, 307.1041, 325.1145		(5)		
119	1	7,74	4-ethylphenol-hexose-deoxyhexose 2	C20H30O10	430,1838	429,1765	[M-H] ⁻	161.0460, 179.0562		(3)	etilfenol: 0,83*	
120	2	7,76	ipsdienol-hexose-deoxyhexose 2	C21H34O9	430,2200	429,2127	[M-H] ⁻	161.0455, 179.0568, 267.1599 (pérdida de hex)				
121	1	7,78	linalool oxide-pentose-hexose 4	C21H36O11	464,2243	509,2238	[M+HCOOH-H] ⁻	463.2181, 131.0345 , 149.0455 , 161.0456 , 293.0870, 331.1760 (pérdida de pentosa),	169,1233	(2 y 9)	óxido de rosa: 0,90*/óxido de linalool: 0,87*/linalool: 0,87***/citronelol : 0,99*	++
122	3	7,81	Riesling acetal-pentose-pentose	C23H38O11	490,2421	489,2348	[M-H] ⁻				vitispiranos: 0,91*/ TDN: 0,96**	
123	1	7,86	norisoprenoid group 2 -pentose-hexose	C24H40O11	504,2566	549,2544	[M+HCOOH-H] ⁻	503.2493, 131.0348, 149.0455, 161.0454, 179.0557, 293.0877, 311.0981, 371.2071 (pérdida de pentosa)	209,1544		vitispiranos: 0,82*/ TDN: 0,87*	
124	2	7,87	geranic acid-hexose-hexose 3	C22H36O12	492,2204	491,2132	[M-H] ⁻	329.1584 (pérdida de hex), 179.0565		(5)		
125	2	7,88	norisoprenoid group 2- hexose-deoxyhexose 1	C25H42O11	518,2718	563,2702	[M+HCOOH-H] ⁻	517.2645, 163.0611, 161.0449, 179.0568, 307.1034, 325.1137, 371.2063 (pérdida de deoxihexosa)	209,154			
126	3	7,89	hydroxycitronellol-hexose	C16H32O7	336,2142	381,2124	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,95**/citronelol: 0,88**	
127	3	7,91	monoterpen-triol-hexose-deoxyhexose 4	C22H38O12	494,2353	539,2335	[M+HCOOH-H] ⁻			(2)	óxido de rosa: 0,84*/citronelol: 0,89*	
128	2	7,92	cresol-hexose-deoxyhexose	C19H28O10	416,1682	415,1610	[M-H] ⁻	161.0454, 179.0561		(3)		

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
129	3	7,93	geranic acid-pentose	C15H24O6	300,1573	299,1500	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,89***	
130	3	7,94	geranic acid-hexose-hexose 4	C22H36O12	492,2186	537,2168	[M+HCOOH-H] ⁻			(5)	óxido de rosa: 0,93**/citronelol: 0,80**	
131	3	7,97	geranic acid-pentose-hexose 3	C21H34O11	462,2102	507,2084	[M+HCOOH-H] ⁻			(5)	óxido de rosa: 0,96**/citronelol: 0,97**	
132	3	7,97	citronellol-hexose-hexose 2	C22H40O11	480,2562	525,2544	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,95**/citronelol: 0,95**	
133	3	8,07	dihydroxy-dihydrolinalool-hexose 3	C16H30O8	350,1941	349,1868	[M-H] ⁻			(9)	óxido de rosa: 0,98***/citronelol : 0,88***	
134	2	8,1	norisprenoid group 2-hexose	C19H32O7	372,2141	417,2123	[M+HCOOH-H] ⁻	371.2069, 161.0449, 179.0574				
135	2	8,12	norisprenoid group 1- hexose	C19H30O7	370,1990	415,1972	[M+HCOOH-H] ⁻	369.1917, 161.0460, 179.0561				
136	3	8,13	geranic acid-hexose-deoxyhexose 1	C22H36O11	476,2257	475,2184	[M-H] ⁻			(5)	óxido de rosa: 0,93**/citronelol: 0,84**	
137	3	8,16	monoterpenol-hexose-hexose- hexose 2	C28H48O16	640,2944	639,2872	[M-H] ⁻				óxido de linalool: 0,90*	
138	3	8,17	citronellol-deoxyhexose-hexose- pentose 1	C27H48O14	596,3040	595,2967	[M-H] ⁻				óxido de linalool: 0,89*	
139	1	8,27	monoterpenol-hexose-deoxyhexose 1	C22H38O10	462,2465	507,2447	[M+HCOOH-H] ⁻	461.2391, 161.0450 , 179.0560 , 299.1862 (pérdida de hex), 315.1820 (pérdida de deoxihexosa)		(6 y 10)	óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,91***	
140	3	8,29	ipsdienol-deoxyhexose-pentose- hexose	C26H42O14	578,2579	577,2507	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,92***	
141	2	8,3	linalool oxide-pentose-hexose 5	C21H36O11	464,2259	509,2241	[M+HCOOH-H] ⁻	463.2180, 331.1760, 311.0980 , 293.0875, 179.0558 , 161.0457		(2 y 9)		

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
142	3	8,35	dihydroxy-dihydrolinalool-pentose-hexose 3	C21H38O12	482,2357	481,2284	[M-H] ⁻			(2)	óxido de rosa: 0,85*/citronelol: 0,87*	
143	2	8,36	isopropiosiringone-hex	C17H24O9	372,1419	371,1346	[M-H] ⁻		209,0815	(7)		
144	3	8,36	ipsdienol-hexose-pentose-pentose	C27H44O15	608,2683	607,2610	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,92**/citronelol: 0,89*	
145	2	8,38	4-ethylphenol-deoxyhexose-hexose-pentose	C25H38O14	562,2264	561,2192	[M-H] ⁻	399.1663 (pérdida hex), 325.1152, 307.1033, 131.0350, 293.0885, 311.0991				
146	2	8,41	monoterpenol-hexose-pentose-pentose 1	C26H44O14	580,2723	625,2693	[M+HCOOH-H] ⁻	579.26475, 131.0347, 149.0453, 161.0457				
147	3	8,41	linalool oxide-hexose-hexose-hexose 3	C28H48O17	656,2901	655,2828	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,92*/óxido de linalool: 0,85***/citronelol: 0,99*	
148	1	8,44	citronellol-pentose-hexose 1	C21H38O10	450,2458	449,2385	[M-H] ⁻	287.1856 (pérdida hexosa)		(5)	óxido de rosa: 0,88*/óxido de linalool: 0,83*/linalool: 0,82***/citronelol: 0,93*	
149	3	8,48	citronellol-hexose-deoxyhexose 1	C22H40O10	464,2620	463,2547	[M-H] ⁻				limoneno: 0,91*/cineole: 0,92*	
150	3	8,49	ipsdienol-pentose-hexose 2	C21H34O10	446,2151	445,2078	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol: 0,92***	
151	3	8,49	monoterpenol-hexose-deoxyhexose 2	C22H38O10	462,2465	461,2392	[M-H] ⁻			(6 y 10)	cineole: 0,90*	
152	3	8,51	citronellol-deoxyhexose-hexose-pentose 2	C27H48O14	596,3036	595,2963	[M-H] ⁻				óxido de linalool: 0,97***/linalool: 0,99***/terpineol: 0,98***/nerol: 0,94*/geraniol: 0,89*	
153	3	8,58	3,4-dihydroxy-7,8-dihydro-β-ionol-pentose-hexose 2	C24H42O12	522,2660	567,2642	[M+HCOOH-H] ⁻				TDN: 0,851*	
154	2	8,6	monoterpenol-pentose-hexose 2	C21H36O10	448,2304	493,2290	[M+HCOOH-H] ⁻	447.2234, 131.0350, 149.0460, 161.0453 y 315.1809 (pérdida de pent)		(6, 9 y 10)		++

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
155	3	8,61	Riesling acetal-hexose-hexose 2	C25H42O13	550,2620	549,2547	[M-H] ⁻			(2)	vitispiranos: 0,87*	
156	3	8,63	3-hydroxy-TDN-hexose-deoxyhexose	C25H38O10	498,2464	543,2446	[M+HCOOH-H] ⁻			(8)	vitispiranos: 0,88*/TDN: 0,86*	
157	3	8,66	sesquiterpenol-pentose-hexose 1	C26H44O10	516,2943	515,2870	[M-H] ⁻			(2)	citronelol: 0,928***	
158	1	8,66	monoterpenol-hexose-pentose-pentose 2	C26H44O14	580,2736	625,2713	[M+HCOOH-H] ⁻	579.2653, 131.0352, 149.0451, 161.0457, 179.0566, 293.0882, 311.0994, 447.2222 (pérdida de pentosa), 263.0769 (pentosa-pentosa)			óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,96***	
159	1	8,75	monoterpenol-hexose-hexose-pentose 2	C27H46O15	610,2832	655,2824	[M+HCOOH-H] ⁻	609.2762, 315.1809 (pérdida de pent-hex), 285.1699 (pérdida de hex-hex), 447.2236 (pérdida de hex), 477.2344 (pérdida de pent), 131.0352, 149.0455, 161.0458, 179.0563, 293.0881, 311.0990		(6)	óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,95***	
160	3	8,78	ipsdienol-deoxyhexose-pentose-pentose 1	C27H44O14	592,2733	591,2660	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,96**/citronelol: 0,88**	
161	3	8,79	monoterpenol-hexose-pentose-pentose 3	C26H44O14	580,2731	579,2658	[M-H] ⁻				linalool: 0,97*/terpineol: 0,98*/nerol: 0,94*/geraniol: 0,89*	
162	1	8,8	monoterpenol-hexose-pentose-pentose 4	C26H44O14	580,2730	625,2713	[M+HCOOH-H] ⁻	579.2655, 131.0350, 149.0456, 161.0458, 179.0558, 311.0990, 447.2228 (pérdida de pentosa), 263.0780 (pent-pent)			óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,94***	

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr.(c)
163	2	8,81	eugenol/isoegenol-hexose-deoxyhexose	C22H32O11	472,1953	471,1881	[M-H] ⁻	161.0453, 179.0560, 309.1353 (pérdida hex)				
164	3	8,83	3,4-dihydroxy-7,8-dihydro-β-ionol-pentose-hexose 1	C24H42O12	522,2653	567,2635	[M+HCOOH-H] ⁻				vitispiranos: 0,84*/TDN: 0,87*	
165	3	8,95	sesquiterpenol-pentose-hexose 2	C26H44O10	516,2933	515,2861	[M-H] ⁻			(2)	linalool: 0,93*/terpineol:0,90*/nerol: 0,96**/geraniol: 0,94*	
166	3	8,96	geranic acid-hexose-pentose-pentose	C26H42O15	594,2523	639,2505	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,98***/citronelol : 0,94***	
167	3	8,98	geranic acid-hexose-hexose-pentose 2	C27H44O16	624,2623	669,2605	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,94***	
168	1	9,02	monoterpenol-pentose-hexose 3	C21H36O10	448,2300	493,2290	[M+HCOOH-H] ⁻	447.2237, 293.0877, 311.0985 , 315.1815 (pérdida de hexosa), 131.0350 , 149.0458 , 161.0456 , 179.0559		(6, 9 y 10)	óxido de rosa: 0,98***/citronelol : 0,97***	++
169	1	9,1	geranic acid-pentose-hexose 4	C21H34O11	462,2097	507,2082	[M+HCOOH-H] ⁻	461.2035 , 131.0354 , 149.0460 , 293.0884	167,1077	(5)	óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,95***	
170	3	9,11	monoterpenol-hexose-deoxyhexose 3	C22H38O10	462,2461	507,2443	[M+HCOOH-H] ⁻			(6 y 10)	linalool: 0,91*/terpineol: 0,89*/nerol: 0,98***/geraniol: 0,99***	
171	1	9,12	monoterpenol-pentose-hexose 4	C21H36O10	448,2306	493,2290	[M+HCOOH-H] ⁻	447,2235, 131.0350 , 149.0455 , 161.0451 , 179.0561 , 293.0885, 311.0978, y 315.1809 (pérdida de pentosa)		(6, 9 y 10)	óxido de rosa: 0,96**/citronelol: 0,98**	++
172	1	9,13	geranic acid-hexose-deoxyhexose 2	C22H36O11	476,2258	521,2239	[M+HCOOH-H] ⁻	475.2184 , 163.0612, 145.0505 , 307.1034, 325.1139 , 313.1656 (pérdida de hexosa)	167,1076	(5)	óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,93***	++
173	3	9,15	norisprenoic group 2-hexose-deoxyhexose 2	C25H42O11	518,2733	517,2660	[M-H] ⁻				vitispiranos: 0,87*/TDN: 0,92**	

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
174	2	9,17	citronellol-pentose-hexose 2	C21H38O10	450,2463	495,2447	[M+HCOOH-H] ⁻	449.2395, 131.0353, 149.0450, 161.0453, 179.0555, 293.0884, 311.0985	155,1446	(5)		
175	1	9,19	geranic acid-pentose-hexose 5	C21H34O11	462,2100	507,2082	[M+HCOOH-H] ⁻	461.2028, 311.0979, 293.0879, 149.0457, 131.0348, 161.0453, 299.1503 (pérdida de hexosa)	167,1078	(5)	óxido de rosa: 0,97**/citronelol: 0,96**	++
176	3	9,2	ipsdienol-deoxyhexose-pentose-pentose 2	C27H44O14	592,2727	591,2654	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,92***	
177	2	9,21	4-ethylphenol-deoxyhexose	C14H20O5	268,1311	267,1238	[M-H] ⁻		121,066	(3)		
178	1	9,24	citronellol-hexose-hexose-pentose	C27H48O15	612,2988	657,2975	[M+HCOOH-H] ⁻	611.2918, 131.0352, 161.0460, 323.1047, 449.402 (pérdida de hexosa), 479.2482 (pérdida de pentosa), 317.1971 (pérdida pentosa-hexosa)	155,1441		óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,92***	
179	3	9,25	hydroxydihydrolinalool-hexose-hexose-pentose	C27H48O16	628,2932	627,2859	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,96**/citronelol: 0,99**	
180	3	9,26	3,4-dihydroxy-7,8-dihydro-β-ionol-pentose	C18H32O7	360,2144	405,2126	[M+HCOOH-H] ⁻				TDN: 0,82*	
181	1	9,37	citronellol-pentose-hexose 3	C21H38O10	450,2465	495,2448	[M+HCOOH-H] ⁻	449.2390, 131.0349, 149.0457, 161.0453, 179.0560, 293.0878, 311.0985, 317.1967 (pérdida de pentosa)		(5)	óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,94***	
182	2	9,4	citronellol-deoxyhexose-hexose-pentose 3	C27H48O14	596,3036	595,2963	[M-H] ⁻	293.0873, 311.0981, 131.0349, 149.0456, 161.0449, 179.0560				
183	3	9,42	ipsdienol-pentose	C15H24O5	284,1626	283,1551	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,91***	

Tabla 5.2 Identificación de potenciales precursores en las seis variedades de uvas estudiadas

#	Id	Tr (min)	Precursor	Fórmula Molecular	Masa exp	m/z exp	Ion principal	Fragmentos MS/MS	Aglicona	Ref. (a)	R ² (b)	Fr. (c)
184	3	9,47	citronellol-hexose-deoxyhexose 2	C22H40O10	464,2619	509,2601	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,95***	
185	3	9,49	citronellol-pentose-hexose 4	C21H38O10	450,2467	449,2395	[M-H] ⁻			(5)	linalool: 0,96*/terpineol: 0,94*/nerol: 0,98**/geraniol: 0,97**	
186	1	9,51	monoterpenol-hexose	C16H28O6	316,1865	361,1866	[M+HCOOH-H] ⁻	315.1805, 179.0558		(6)	óxido de rosa: 0,99***/citronelol : 0,93***	
187	3	9,67	ipsdienol-hexose-deoxyhexose 3	C21H34O9	430,2195	429,2122	[M-H] ⁻				óxido de rosa: 0,95**/citronelol: 0,95**	
188	3	9,71	norisoprenoid group 3-pentose	C18H32O6	344,2198	343,2126	[M-H] ⁻				B-damascenona: 0,86*	
189	2	9,77	sesquiterpenol-pentose-hexose 3	C26H44O10	516,2932	515,2860	[M-H] ⁻	161.0460, 335.2227		(2)		
190	2	10,72	syringol-hexose	C16H28O6	316,1884	315,1811	[M-H] ⁻		153,0557	(3)		
191	3	13,86	citronellol-deoxyhexose	C16H30O5	302,2092	301,2020	[M-H] ⁻				óxido de linalool: 0,88*/linalool: 0,88*	
192	3	14,69	monoterpenol-hexose-hexose 2	C22H38O11	478,2394	523,2396	[M+HCOOH-H] ⁻				óxido de rosa: 0,87*/citronelol: 0,76*	

(a) Publicaciones en las que se han reportado estos precursores:

- (1) Barnaba, Dellacassa, et al., 2018
- (2) Caffrey et al., 2020
- (3) Caffrey et al., 2019
- (4) Barnaba, Larcher, et al., 2018
- (5) Wei et al., 2021
- (6) Hjelmeland et al., 2015

- (7) Barnaba et al., 2017
- (8) Gök et al., 2022
- (9) Schievano et al., 2013
- (10) Flamini et al., 2014
- (11) Cebrián-Tarancón et al., 2021

(b) Coeficiente de correlación con el aroma correspondiente y significatividad de esta correlación: * p < 0,05, ** p < 0,01 y *** p < 0,001

(c) Presencia de este precursor en el Fraccionamiento del capítulo 4: + identificado en el fraccionamiento y ++ además presenta correlación con el aroma correspondiente en las fracciones.

4. Conclusiones

La metodología propuesta, basada en la combinación del análisis no dirigido por UHPLC-QTOF-MS de los vinos y las correlaciones con los compuestos aromáticos liberados en el envejecimiento de estos, ha permitido la identificación de un gran número de potenciales precursores glicosídicos de compuestos aromáticos varietales.

El estudio de los aromas en los vinos y los liberados durante su envejecimiento mediante hidrólisis ácida a 75°C durante 12 y 96 horas, permitió confirmar la variabilidad aromática varietal existente entre las seis variedades de uva estudiadas. Estas diferencias aromáticas son evidentes desde un inicio (t_0), destacándose como más diferentes las variedades de Gewürztraminer y Tempranillo. Una vez envejecidas, las diferencias son más marcadas debido a la liberación de los distintos aromas de sus respectivos precursores, lo que es más evidente a 96h donde existe una mayor diferenciación de las variedades. El análisis metabolómico no dirigido por UHPLC-MS de los vinos (t_0) evidencia también esta variabilidad entre las muestras, debido a que existen marcadas diferencias entre los contenidos de precursores en las variedades de uva. Esta variabilidad aromática permitió establecer correlaciones positivas entre el contenido del precursor en el vino y el aroma en el vino hidrolizado.

Se identificaron en total 192 precursores del aroma, con distintos niveles de identificación, 87 de estos no habían sido reportados anteriormente en la bibliografía. Cabe destacar que, en 34 casos, la identificación incluye espectros MS/MS y una correlación positiva con la molécula de aroma correspondiente, 12 de estos precursores son descritos por primera vez. En otros 89 casos, existe una correlación positiva con el aroma correspondiente, pero no existen datos MS-MS que justifiquen la estructura propuesta, 61 de estos compuestos se reportan por primera vez.

Para la identificación de los potenciales precursores del aroma, en general, además de los espectros MS² han sido de gran utilidad los estudios de correlación entre el precursor en el vino y el aroma liberado en el vino envejecido a distintos tiempos. Los precursores potencialmente más importantes son aquellos que mejor se correlacionaron con los aromas de los vinos envejecidos.

Este trabajo demuestra que los estudios de correlación, con aromas en vinos envejecidos, pueden ser cruciales para identificar estas moléculas precursoras, especialmente cuando no se dispone de estándares analíticos para ellas.

5. Referencias

Alegre, Y., Arias-Pérez, I., Hernández-Orte, P., & Ferreira, V. (2020). Development of a new strategy for studying the aroma potential of winemaking grapes through the accelerated hydrolysis of phenolic and aromatic fractions (PAFs). *Food Research International*, *127*, 108728. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108728>

Alegre, Y., Sáenz-Navajas, M. P., Hernández-Orte, P., & Ferreira, V. (2020). Sensory, olfactometric and chemical characterization of the aroma potential of Garnacha and Tempranillo winemaking grapes. *Food Chemistry*, *331*, 127207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127207>

Barnaba, C., Dellacassa, E., Nicolini, G., Giacomelli, M., Roman Villegas, T., Nardin, T., & Larcher, R. (2017). Targeted and untargeted high resolution mass approach for a putative profiling of glycosylated simple phenols in hybrid grapes. *Food Research International*, *98*, 20-33. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.01.011>

Barnaba, C., Dellacassa, E., Nicolini, G., Nardin, T., Serra, M., & Larcher, R. (2018). Non-targeted glycosidic profiling of international wines using neutral loss-high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1557*, 75-89. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2018.05.008>

Barnaba, C., Larcher, R., Nardin, T., Dellacassa, E., & Nicolini, G. (2018). Glycosylated simple phenolic profiling of food tannins using high resolution mass spectrometry (Q-Orbitrap). *Food Chemistry*, *267*, 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.048>

Caffrey, A. J., Lerno, L. A., Zweigenbaum, J., & Ebeler, S. E. (2020). Direct Analysis of Glycosidic Aroma Precursors Containing Multiple Aglycone Classes in *Vitis vinifera* Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(12), 3817-3833. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08323>

Caffrey, Lerno, L., Rumbaugh, A., Girardello, R., Zweigenbaum, J., Oberholster, A., & Ebeler, S. E. (2019). Changes in smoke-taint volatile-phenol glycosides in wildfire smoke-exposed cabernet sauvignon grapes throughout winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, *70*(4), 373-381. <https://doi.org/10.5344/ajev.2019.19001>

Capone, D. I., Barker, A., Williamson, P. O., & Francis, I. I. (2018). The role of potent thiols in Chardonnay wine aroma. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *24*(1), 38-50. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12294>

Carlin, S., Lotti, C., Correggi, L., Mattivi, F., Arapitsas, P., & Vrhovšek, U. (2022). Measurement of the Effect of Accelerated Aging on the Aromatic Compounds of Gewürztraminer and Teroldego Wines, Using a SPE-GC-MS/MS Protocol. *Metabolites*, *12*(2), 180. <https://doi.org/10.3390/metabo12020180>

- Denat, M., Ontañón, I., Querol, A., & Ferreira, V. (2022). The diverse effects of yeast on the aroma of non-sulfite added white wines throughout aging. *LWT*, *158*, 113111. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113111>
- Ferreira, V., López, R., & Cacho, J. F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(11), 1659-1667.
- Furdíková, K., Bajnociová, L., Malík, F., & Špánik, I. (2017). Investigation of volatile profile of varietal Gewürztraminer wines using two-dimensional gas chromatography. *J. Food Nutr. Res.*, *56*.
- Gök, R., Selhorst, P., Noske, T., Ziegler, M., Fischer, U., & Winterhalter, P. (2022). *Molecules Target-Guided Isolation of Progenitors of 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) from Riesling Wine by High-Performance Countercurrent Chromatography †*. 1961-2019. <https://doi.org/10.3390/molecules27175378>
- Guth, H. (1997). Identification of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(8), 3022-3026. <https://doi.org/10.1021/JF9608433>
- Herbst-Johnstone, M., Nicolau, L., & Kilmartin, P. A. (2011). Stability of Varietal Thiols in Commercial Sauvignon blanc Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *62*(4), 495-502. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.11023>
- Hjelmeland, A. K., Zweigenbaum, J., & Ebeler, S. E. (2015). Profiling monoterpenol glycoconjugation in *Vitis vinifera* L. cv. Muscat of Alexandria using a novel putative compound database approach, high resolution mass spectrometry and collision induced dissociation fragmentation analysis. *Analytica Chimica Acta*, *887*, 138-147. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.026>
- Jaffré, J., Valentin, D., Meunier, J.-M., Siliani, A., Bertuccioli, M., & Le Fur, Y. (2011). The Chardonnay wine olfactory concept revisited: A stable core of volatile compounds, and fuzzy boundaries. *Food Research International*, *44*(1), 456-464. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.022>
- Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2010). Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine ageing. *Food Chemistry*, *120*(1), 205-216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.008>
- Moio, L., Schlich, P., & Etievant, P. (1994). Acquisition et analyse d'arômagrammes de vins de Bourgogne issus du cépage Chardonnay. *Sciences des aliments*, *14*(5), 601-608. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=3364291>

Oliveira, I., & Ferreira, V. (2019). Modulating Fermentative, Varietal and Aging Aromas of Wine Using non- Saccharomyces Yeasts in a Sequential Inoculation Approach. *Microorganisms*, 7(6), 164. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060164>

Ong, P. K. C., & Acree, T. E. (1999). Similarities in the Aroma Chemistry of Gewürztraminer Variety Wines and Lychee (Litchi chinesis Sonn.) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 665-670. <https://doi.org/10.1021/jf980452j>

Sacks, G. L. G. G. L., Gates, M. J. M., Ferry, F. X. F., Lavin, E. H. E. E. H., Kurtz, A. J. A., & Acree, T. E. (2012). Sensory threshold of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and concentrations in young Riesling and non-Riesling wines. *J. Agric. Food Chem*, 60(12), 2998-3004. <https://doi.org/10.1021/JF205203B>

Sánchez-Acevedo, E., Lopez, R., & Ferreira, V. (2024). Kinetics of aroma formation from grape-derived precursors: Temperature effects and predictive potential. *Food Chemistry*, 438, 137935. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137935>

Skinkis, P. A., Bordelon, B. P., & Wood, K. V. (2008). Comparison of Monoterpene Constituents in Traminette, Gewürztraminer, and Riesling Winegrapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(4), 440-445. <https://doi.org/10.5344/ajev.2008.59.4.440>

Vela, E., Hernández-Orte, P., Franco-Luesma, E., & Ferreira, V. (2017). The effects of copper fining on the wine content in sulfur off-odors and on their evolution during accelerated anoxic storage. *Food Chemistry*, 231, 212-221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.125>

Wei, Y., Chen, Z., Zhang, X.-K. K., Duan, C.-Q. Q., & Pan, Q.-H. H. (2021). Comparative Analysis of Glycosidic Aroma Compound Profiling in Three *Vitis vinifera* Varieties by Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Frontiers in Plant Science*, 12, 694979. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.694979>

Conclusiones generales

Conclusiones generales

Los modelos basados en cinéticas de primer orden parecen ser apropiados para interpretar la acumulación de moléculas de aroma derivadas de la hidrólisis de precursores, incluyendo también aquellas moléculas de aroma que sufren posterior degradación. Las moléculas de aroma derivadas de moléculas precursoras específicas presentes en las uvas se pueden clasificar en tres categorías según la estabilidad tanto del aroma como del precursor: moléculas lábiles de precursores lábiles, moléculas estables de precursores lábiles y moléculas estables de precursores estables. Para muchas moléculas de aroma derivadas de las uvas, los patrones de acumulación a las tres temperaturas fueron bastante similares, los niveles acumulados también fueron similares y, en promedio, las tasas de reacción aumentaron en factores de 6,9 y 72 cuando la temperatura se incrementó de 35 a 50 o 75°C, respectivamente. Para la mayoría de los compuestos de aroma, la hidrólisis ácida a 75°C fue 460 veces más rápida que la observada a 20°C.

La hidrólisis ácida acelerada a 75°C representa un buen compromiso para obtener una representación satisfactoria del potencial aromático de la uva en un corto período de tiempo. Aunque algunos compuestos como el guaiacol, podrían ser más difíciles de predecir a 75°C, pero otros compuestos lábiles, como el linalol y el geraniol, se predicen mejor a esta temperatura. En resumen, la hidrólisis acelerada puede ser un método válido para predecir la liberación de compuestos clave en muestras de vino.

La metodología de fermentación rápida desarrollada en esta tesis tan solo introduce diferencias menores con respecto a una fermentación estándar, y permite la evaluación satisfactoria de la mayor parte de los componentes del aroma varietal, por lo que puede ser propuesta como una técnica alternativa para la preparación de muestra en la evaluación del aroma potencial mediante hidrólisis. No obstante, los elevados niveles de acetaldehído, ácido acético y alcoholes superiores obtenidos en la fermentación rápida la descartan para la evaluación sensorial del potencial aromático, particularmente en comparación con los hidrolizados de FFA reconstituida.

La estrategia para aislar precursores glicosídicos del aroma en muestras de uvas de Garnacha, a partir de un fraccionamiento en dos etapas, primero en gel de Toyopearl para eliminar compuestos de alta masa molecular y luego en sílica gel para separar los precursores del aroma, permitió la identificación de numerosos potenciales precursores glicosídicos. Entre estos se

incluyen 26 no documentados previamente, como precursores de fenoles volátiles, monoterpenoles y norisoprenoides como el Riesling acetal y el TDN. El establecimiento de correlaciones positivas entre las intensidades del aroma correspondiente en la fracción hidrolizada y la del potencial precursor en la fracción sin hidrolizar resultó ser una herramienta de gran potencial para la confirmación de la identificación de algunos de estos precursores.

La metodología propuesta, basada en la combinación del análisis no dirigido por UHPLC-QTOF-MS de fermentados monovarietales y las correlaciones con los compuestos aromáticos liberados en el envejecimiento de estos, permitió la identificación de un gran número de potenciales precursores glicosídicos de compuestos aromáticos varietales. Se identificaron 192 precursores del aroma, de los cuales 87 no habían sido reportados anteriormente. En 34 casos la identificación incluye espectros MS/MS y una correlación positiva con la molécula de aroma correspondiente, 12 de estos precursores son descritos en esta tesis por primera vez. En otros 89 casos existe una correlación positiva con el aroma correspondiente, pero no se pudieron adquirir espectros MS/MS que justificaran la estructura propuesta, 61 de estos compuestos se reportan por primera vez.

En resumen, esta tesis contribuyó significativamente al entendimiento de la cinética de liberación de las moléculas responsables del potencial aromático de la uva, mediante el estudio de la liberación de los aromas vinculados a estos precursores y a la identificación de precursores glicosídicos del aroma a través de estrategias de fraccionamiento y metabólica.

Anexos

Anexos

Anexo I. Material suplementario sobre los métodos analíticos empleados

Tabla A1. Patrones analíticos, proveedores, pureza y CAS, de los analitos determinados en el análisis (GC-MS) de compuestos **minoritarios y trazas**. Se muestran también los valores de m/z empleados para su cuantificación (primer valor) y la confirmación de identificación.

Familia	Compuesto	Proveedor	Pureza (%)	CAS	m/z
acetatos	acetato de isobutilo	Chemservice	99	110-19-0	56, 101, 73
	acetato de β -feniletilo	Chemservice	98,5	103-45-7	89, 91
ésteres	isobutirato de etilo	Sigma-Aldrich	99	97-62-1	71, 116
	2-metilbutirato de etilo	Sigma-Aldrich	99	7452-79-1	57, 115, 102
	isovalerato de etilo	Sigma-Aldrich	98	108-64-5	88, 115, 70
	4-metilvalerato de etilo	Sigma-Aldrich	97	25415-67-2	88, 115, 101
	ciclohexanoato de etilo	Alfa Aesar	98	3289-28-9	83, 101, 156
	leucato de etilo	Fluka	99	10348-47-7	69, 117, 87
derivados del ácido cinámico	cinamato de etilo	Fluka	98	103-36-6	131, 103, 176
	dihidrocinamato de etilo	Fluka	98	2021-28-5	178, 149, 133
fenoles volátiles	4-vinilguaiacol	Lancaster	97	7786-61-0	150, 135
	4-vinilfenol	Lancaster	10	2628-17-3	120, 91
	o-cresol	Sigma-Aldrich	99	95-48-7	108, 107, 79
	m-cresol	Sigma-Aldrich	99	108-39-4	108, 90, 79
	4-etilguaiacol	Lancaster	98	2785-89-9	137, 122, 152
	4-etilfenol	Sigma-Aldrich	99	123-07-9	107, 122
	guaiacol	Sigma-Aldrich	97	90-05-1	109, 125, 124
	eugenol	Sigma-Aldrich	99	97-53-0	164, 149
	p-propylguaiacol	Lancaster	98	2785-87-7	137, 122, 166

Familia	Compuesto	Proveedor	Pureza (%)	CAS	m/z
	siringol	Sigma-Aldrich	99	91-10-1	154, 139
	trans-isoeugenol	Lancaster	98	97-54-1	164, 131, 149
	metoxieugenol	Sigma-Aldrich	90	6627-88-9	194, 179, 119
derivados de la vainillina	vainillina	Polyscience	99	121-33-5	152, 151, 123
	acetovainillona	Sigma-Aldrich	98	498-02-2	166, 151, 123
	siringaldehído	Sigma-Aldrich	98	134-96-3	182, 181, 167
lactonas	γ -nonalactona	Sigma-Aldrich	97	104-61-0	85, 128, 100
	masoia lactona	Sigma-Aldrich	95	54814-64-1	97, 139, 68
	cis/trans-whiskylactona	Sigma-Aldrich	98	39212-23-2	99, 128, 114
terpenos	linalol	Sigma-Aldrich	97	78-70-6	71, 93, 121
	nerol	Fluka	90	106-25-2	93, 121, 68
	geraniol	Fluka	98	106-24-1	69, 139, 123
	β -citronelol	Sigma-Aldrich	98	106-22-9	69, 81, 123
	(+)-cis/trans-óxido de rosa	Sigma-Aldrich	99	16409-43-1	139, 140, 154
	α -terpineol	Fluka	99	98-55-5	93, 121, 136
	cis/trans-linalool oxide (furan)	Sigma-Aldrich	98	60047-17-8	94, 59, 111
	dihydromyrcenol	Sigma-Aldrich	99	18479-58-8	59, 123, 55
	1,8-cineol	Merck	99	470-82-6	108, 139, 154
	limoneno	Sigma-Aldrich	97	5989-27-5	107, 136, 121
norisoprenoides	α -ionona	Sigma-Aldrich	90	127-41-3	121, 93, 192
	β -ionona	Sigma-Aldrich	98	201-224-3	177, 135, 192
	β -damascenona	Firmenich	98	23726-93-4	190, 175, 69
	TDN	Synchem UG&Co	80	30364-38-6	157, 142, 172
	Riesling acetal			129601-94-1	138, 125, 133
	vitispiranos			65416-59-3	192, 93, 136, 121

Familia	Compuesto	Proveedor	Pureza (%)	CAS	m/z
IS	3-octanona	Merck	99	106-68-3	57, 99
	2-octanol	Merck	99,5	5978-70-1	45, 55, 97
	3,4-dimetilfenol	Merck	99	95-65-8	107, 122

Tabla A2. Patrones analíticos, proveedores, pureza y CAS, de los analitos determinados en el análisis (UHPLC-MS) de **mercaptanos polifuncionales (MPFs)**. El primer valor de m/z se usó en el primer cuadrupolo y el segundo m/z en el tercer cuadrupolo. El valor de m/z 276 corresponde al grupo selenilo $[C_{13}H_{10}ONSe]^+$, resultante de la ruptura del enlace selenil-sulfuro.

	Compuestos	Proveedor	Pureza (%)	CAS	m/z (Q1)	m/z (Q3)
MPFs	MP	Lancaster	98	19872-52-7	452, 450	276, 274
	MH	Lancaster	98	51755-83-0	457, 455	276, 274
	MHA	Oxford Chemicals	98	136954-20-6	400, 398	276, 274
	BM	Fluka	98	100-53-8	405, 403	276, 274
	FFT	Lancaster	98	98-02-2	390, 388	276, 274
IS	MP-d10	Eptes	99.9		392, 390	276, 274
	MH-d5	Eptes	97		410, 408	276, 274
	MHA-d5	Eptes	98		415, 413	276, 274
	BM-d5	Eptes	99		408, 406	276, 274
	FFT-d2	Eptes	98		418, 416	276, 274

Tabla A3: Patrones analíticos, proveedores, pureza y CAS, de los analitos determinados en el análisis (GC-MS) de **aldehídos de Strecker**. El primer valor de m/z fue el utilizado para la cuantificación.

	Compuesto	Proveedor	Pureza (%)	CAS	m/z
Aldehídos de Strecker	isobutiraldehído	Sigma-Aldrich	99	78-84-2	250, 195, 239
	2-metilbutanal	Sigma-Aldrich	95	96-17-3	239, 253, 195
	3-metilbutanal	Sigma-Aldrich	97	590-86-3	239, 196, 266
	metional	Sigma-Aldrich	99	3268-49-3	299, 252, 181
	fenilacetaldehído	Sigma-Aldrich	90	122-78-1	297, 91, 181
IS	2-metilpentanal	Sigma-Aldrich	98	123-15-9	253, 266, 195
	metional-d3	Eptes	90	1849-29-2	302, 252, 181
	fenilacetaldehído-d5	Eptes	95		301, 96, 181

Tabla A4. Patrones analíticos, proveedores, pureza y CAS, de los analitos determinados en el análisis (GC-FID) de **compuestos mayoritarios**.

Familia	Compuesto	Proveedor	Pureza (%)	CAS
carbonilos	acetaldehído	Sigma-Aldrich	99	75-07-0
	diacetilo	Sigma-Aldrich	99	431-03-8
	acetoína	Sigma-Aldrich	98	513-86-0
ácidos	ácido acético	PanReac	99,5	64-19-7
	ácido butírico	Polyscience	99,5	107-92-6
	ácido hexanoico	Polyscience	99,5	142-62-1
	ácido octanoico	Polyscience	98,5	124-07-2
	ácido decanoico	Polyscience	99,5	334-48-5
	ácido isobutírico	Sigma-Aldrich	99	79-31-2
	ácido isovalérico	Sigma-Aldrich	99	503-74-2
alcoholes	1-butanol	PanReac	99,5	71-36-3
	1-hexanol	Sigma-Aldrich	99	111-27-3
	isobutanol	Merck	99	78-83-1
	alcohol isoamílico	Sigma-Aldrich	99	123-51-3
	2-feniletanol	Fluka	99	60-12-8
	metionol	Sigma-Aldrich	98	505-10-2
	cis-3-hexenol	Sigma-Aldrich	98	928-96-1
	alcohol bencílico	Sigma-Aldrich	99	100-51-6
acetatos	acetate de hexilo	Chemservice	99	142-92-7
	acetato de isoamilo	Chemservice	99	123-92-2
	acetato de etilo	Polyscience	99,5	141-78-6
ésteres	propanoato de etilo	Fluka	99	105-37-3
	butirato de etilo	Sigma-Aldrich	99	105-54-4
	hexanoato de etilo	Polyscience	99,5	123-66-0
	octanoato de etilo	Polyscience	99,5	106-32-1
	decanoato de etilo	Polyscience	99,5	110-38-3
	lactato de etilo	Sigma-Aldrich	99	97-64-3
	succinato de dietilo	Fluka	99	123-25-1
lactona	γ -butirolactona	Sigma-Aldrich	99	96-48-0
IS	2-octanol	Merck	98	123-96-6
	4-metil-2-pentanol	Merck	99	108-11-2
	heptanoate de etilo	Merck	99	106-30-9
	ácido heptanoico	Merck	99	111-14-8

Anexo II. Aplicación de la metodología de hidrólisis acelerada para la predicción del aroma potencial en uvas de Garnacha. Estudio del impacto de la edad del viñedo y el deshojado en este potencial aromático.

Como se concluyó en el capítulo 2 la hidrólisis ácida de la Fracción Fenólica Aromática (FFA) en condiciones de anoxia es una buena estrategia para evaluar el potencial aromático de las uvas. En este anexo, se detallan los resultados de la aplicación de esta metodología para explicar la influencia de dos factores relacionados con la ampelografía en las uvas de Garnacha. En el primer estudio se estudiará la influencia de la edad del viñedo y en el segundo el deshojado temprano y tardío.

En todos los casos se recolectaron las muestras de uvas (1 kg), se prepararon mistelas y se extrajeron las FFAs. Una vez extraídas se reconstituyeron en vino sintético y se sometieron a la hidrólisis ácida en anoxia a 75°C durante 24 horas para el análisis de los compuestos minoritarios y trazas y a 75°C durante 96 h para evaluar la liberación de los mercaptanos polifuncionales. Los métodos de preparación de muestras, hidrólisis ácida y análisis de compuestos volátiles se describen detalladamente en la sección de materiales y métodos del capítulo 1.

Edad del viñedo. “Garnachas Históricas Project”

Existe una creencia de que viñedos viejos producen vinos de más alta calidad. En Aragón, se inició en el año 2022 “Garnachas Históricas Project”, considerado un proyecto pionero en Europa, puesto en marcha por la DOP Campo de Borja con el fin de poner en valor la edad del viñedo y los vinos que de él se extraen, además de dar la importancia que merece a la conservación de las viñas históricas de esta variedad de uva en Aragón.

Partiendo de esta hipótesis y como grupo colaborador de dicho proyecto se tomaron muestras de uvas de la variedad Garnacha de la D.O.P. Campo de Borja dentro del contexto del proyecto, con el objetivo de evaluar si existían diferencias significativas desde el punto de vista del aroma generado entre uvas históricas y no históricas de esta denominación.

Para ello, se prepararon las correspondientes FFAs de 6 muestras de uvas de Garnacha catalogadas como históricas (entre 32-82 años) y 6 no históricas (entre 3-11 años). El muestreo se realizó en 6 distintas zonas y en cada una se seleccionó una muestra no histórica y otra histórica. Posteriormente, se realizó una hidrólisis a 75°C durante 24 h (para analizar el potencial aromático que presentaban de terpenos, norisoprenoides, vainillina y derivados, fenoles y otros) y otra a 96 h para evaluar los mercaptanos polifuncionales. Los resultados de concentraciones por cada muestra en cada zona se reflejan en la tabla 1.

Para el tratamiento de los resultados se realizó una prueba t de comparación de medias de los aromas analizados en los grupos Históricas y No históricas y comprobar si presentaban diferencias significativas. Además, se hizo una comparación también por familias de aromas (norisoprenoides, fenoles, terpenos y mercaptanos polifuncionales). Se calculó también la diferencia relativa porcentual entre las medias de ambos grupos. Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) * y desviaciones estándares (n=2) de los aromas analizados en cada par de muestra por zonas

Compuestos	Ainzón		Magallón		Fuendejalón		Pozuelo		Borja		Tabuena	
	No histórica	Histórica	No histórica	Histórica	No histórica	Histórica	No histórica	Histórica	No histórica	Histórica	No histórica	Histórica
limoneno	8,02 \pm 0,68	9,9 \pm 1,1	8,95 \pm 0,59	5,49 \pm 0,28	7,7196 \pm 0,0067	8,589 \pm 0,068	5,8 \pm 0,5	4,86 \pm 0,43	4,25 \pm 0,22	4,43 \pm 0,24	4,3 \pm 0,16	4,583 \pm 0,038
1,8-cineol	0,78 \pm 0,049	1 \pm 0,1	0,839 \pm 0,037	0,596 \pm 0,047	0,773 \pm 0,039	1,1 \pm 0,02	0,754 \pm 0,077	0,658 \pm 0,036	0,527 \pm 0,052	0,5029 \pm 0,0013	0,535 \pm 0,011	0,534 \pm 0,029
óxido de linalool	1,406 \pm 0,011	1,58 \pm 0,053	1,183 \pm 0,031	1,487 \pm 0,007	1,52 \pm 0,022	1,032 \pm 0,015	1,116 \pm 0,014	1,607 \pm 0,019	1,528 \pm 0,014	1,399 \pm 0,022	1,854 \pm 0,029	1,857 \pm 0,019
dihidromircenol	1,74 \pm 0,12	2,04 \pm 0,25	1,682 \pm 0,031	1,4 \pm 0,11	1,7053 \pm 0,0053	2,0983 \pm 0,0086	1,5 \pm 0,2	1,114 \pm 0,097	1,17 \pm 0,032	0,819 \pm 0,064	0,84 \pm 0,06	0,931 \pm 0,024
vitispiranos	11,15 \pm 0,14	13,913 \pm 0,026	18 \pm 1,3	25,71 \pm 0,61	21 \pm 0,27	8,706 \pm 0,054	22,98 \pm 0,14	22,17 \pm 0,12	15,86 \pm 0,29	14,38 \pm 0,59	20,198 \pm 0,016	20 \pm 1
linalool	4,03 \pm 0,15	5,45 \pm 0,28	3,036 \pm 0,096	101,2 \pm 0,19	3,257 \pm 0,015	4,227 \pm 0,027	2,76 \pm 0,13	3,1 \pm 0,2	4,025 \pm 0,014	2,045 \pm 0,043	7,25 \pm 0,06	5,107 \pm 0,016
Riesling acetal	3,1474 \pm 0,0064	3,657 \pm 0,011	4,264 \pm 0,068	5,851 \pm 0,041	4,8749 \pm 0,0052	2,5953 \pm 0,0015	5,211 \pm 0,071	5,994 \pm 0,069	4,26 \pm 0,22	3,28 \pm 0,19	5,95 \pm 0,15	5,33 \pm 0,23
α -terpineol	3,063 \pm 0,013	6,558 \pm 0,016	4,1022 \pm 0,0049	2,482 \pm 0,023	3,0027 \pm 0,0073	4,651 \pm 0,018	2,482 \pm 0,016	2,313 \pm 0,056	3,34 \pm 0,028	2,2 \pm 0,01	5,5969 \pm 0,0065	4,311 \pm 0,053
TDN	4,37 \pm 0,051	4,84 \pm 0,17	6,04 \pm 0,26	7,89 \pm 0,31	7,03 \pm 0,06	3,395 \pm 0,032	8,1 \pm 0,36	8,82 \pm 0,16	7,12 \pm 0,22	4,47 \pm 0,24	8,249 \pm 0,022	7,97 \pm 0,14
β -citronelol	0,438 \pm 0,038	0,529 \pm 0,076	0,538 \pm 0,011	0,41 \pm 0,02	0,48 \pm 0,02	0,5506 \pm 0,0041	0,312 \pm 0,042	0,401 \pm 0,029	0,3044 \pm 0,0081	0,26 \pm 0,01	0,298 \pm 0,019	0,2918 \pm 0,0077
β -damascenona	1,686 \pm 0,024	1,5649 \pm 0,0071	2,066 \pm 0,058	2,65472 \pm 0,00026	1,763 \pm 0,022	1,3 \pm 0,02	2,114 \pm 0,083	2,3116 \pm 0,0063	2,74 \pm 0,02	0,952 \pm 0,036	2,28 \pm 0,05	2,481 \pm 0,082
aceto de β -feniletilo	2,31 \pm 0,04	2,57 \pm 0,19	2,87 \pm 0,11	3,46 \pm 0,18	2,283 \pm 0,084	1,795 \pm 0,061	3,02 \pm 0,17	3,27 \pm 0,28	3,687 \pm 0,026	1,405 \pm 0,046	2,83 \pm 0,11	3,124 \pm 0,043
geraniol	0,685 \pm 0,028	1,016 \pm 0,062	0,561 \pm 0,024	0,697 \pm 0,012	0,545 \pm 0,011	0,759 \pm 0,011	0,4913 \pm 0,0073	0,612 \pm 0,025	0,8476 \pm 0,0069	0,38 \pm 0,012	1,461 \pm 0,026	1,084 \pm 0,016
guaiacol	3,376 \pm 0,045	4,09 \pm 0,16	2,2212 \pm 0,0021	4,226 \pm 0,051	3,902 \pm 0,035	4,273 \pm 0,081	2,025 \pm 0,011	4,4183 \pm 0,0068	2,016 \pm 0,032	3,564 \pm 0,095	1,8657 \pm 0,0088	3,853 \pm 0,027
β -ionona	0,226 \pm 0,012	0,251 \pm 0,031	0,24 \pm 0,01	0,196 \pm 0,015	0,217 \pm 0,005	0,2867 \pm 0,0034	0,201 \pm 0,023	0,198 \pm 0,017	0,146 \pm 0,005	0,122 \pm 0,0024	0,122 \pm 0,012	0,1464 \pm 0,0081
o-cresol	0,3531 \pm 0,0035	0,2575 \pm 0,0057	0,211 \pm 0,0026	0,186 \pm 0,0061	0,3121 \pm 0,0067	0,4131 \pm 0,0055	0,0947 \pm 0,0094	0,2761 \pm 0,0098	0,2084 \pm 0,0013	0,4189 \pm 0,0034	0,1285 \pm 0,0066	0,2306 \pm 0,0037
γ -nonalactona	0,556 \pm 0,041	0,747 \pm 0,064	1,23 \pm 0,021	1,385 \pm 0,0084	0,945 \pm 0,034	0,771 \pm 0,014	0,5673 \pm 0,0011	1,085 \pm 0,041	0,43 \pm 0,017	0,569 \pm 0,041	0,3749 \pm 0,0054	0,53 \pm 0,011
m-cresol	8,053 \pm 0,016	8,42 \pm 0,46	6,6301 \pm 0,0063	5,7 \pm 0,2	4,789 \pm 0,077	7,27 \pm 0,02	5,54 \pm 0,41	9,84 \pm 0,23	6,34 \pm 0,16	14,46 \pm 0,33	4,368 \pm 0,027	4,001 \pm 0,091
4-vinilguaicol	46,13 \pm 0,47	42,7 \pm 2,2	33,73 \pm 0,67	45,5 \pm 0,47	39,61 \pm 0,52	41,28 \pm 0,18	44,4 \pm 0,4	71,4 \pm 2,4	38,95 \pm 0,53	55 \pm 2,3	47,1 \pm 1,6	41,2 \pm 1,4
masoia lactona	n.d.	n.d.	0,932 \pm 0,023	1,415 \pm 0,023	1,106 \pm 0,021	0,69 \pm 0,017	1,05 \pm 0,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 1. Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) * y desviaciones estándares (n=2) de los aromas analizados en cada par de muestra por zonas

Compuestos	Ainzón		Magallón		Fuendejalón		Pozuelo		Borja		Tabuena	
	No histórica	Histórica	No histórica	Histórica	No histórica	Histórica	No histórica	Histórica	No histórica	Histórica	No histórica	Histórica
siringol	58,14 \pm 0,16	56,5 \pm 2,7	57,6 \pm 1,1	75,2 \pm 0,5	71,12 \pm 0,39	47,63 \pm 0,58	80,6 \pm 2,5	94,28 \pm 0,71	63,8 \pm 1,1	56,8 \pm 2,7	69,27 \pm 0,83	80,13 \pm 0,28
isoeugenol	0,1101 \pm 0,0061	0,1817 \pm 0,0048	0,127 \pm 0,0094	0,141 \pm 0,011	0,13 \pm 0,01	0,0943 \pm 0,0084	0,104 \pm 0,011	0,1307 \pm 0,0087	0,1226 \pm 0,0052	0,13062 \pm 0,00087	0,1206 \pm 0,0047	0,1045 \pm 0,0086
4-vinilfenol	46,5 \pm 1,4	64,94 \pm 0,94	51,94 \pm 0,11	64,8 \pm 0,12	47,21 \pm 0,85	39 \pm 0,78	83,8 \pm 2,4	157 \pm 1,1	44,45 \pm 0,34	80 \pm 2	69,86 \pm 0,73	43,06 \pm 0,31
metoxieugenol	0,502 \pm 0,015	0,553 \pm 0,083	0,34638 \pm 0,00052	0,7927 \pm 0,0015	0,3597 \pm 0,0079	0,4306 \pm 0,0051	0,429 \pm 0,014	0,8897 \pm 0,0082	0,499 \pm 0,044	0,445 \pm 0,037	0,4309 \pm 0,0076	0,65 \pm 0,01
vainillina	71,7 \pm 1,5	55,4 \pm 2,2	63,4 \pm 1,9	111,6 \pm 1,1	71,2 \pm 1,7	57,747 \pm 0,012	57,49 \pm 0,34	91,3 \pm 2,4	61,9 \pm 2,3	56,7 \pm 2,7	44,24 \pm 0,14	87,8 \pm 2,2
acetovainillona	19,83 \pm 0,15	13,45 \pm 0,34	10,6 \pm 0,3	16,097 \pm 0,032	14,13 \pm 0,16	17,72 \pm 0,57	9,39 \pm 0,22	22,51 \pm 0,37	14,18 \pm 0,15	10,57 \pm 0,61	14,56 \pm 0,13	19,63 \pm 0,28
siringaldehído	1830 \pm 81	760 \pm 47	1420 \pm 58	2630 \pm 4	1780 \pm 18	1160 \pm 35	1310 \pm 12	2030 \pm 60	2320 \pm 129	540 \pm 41	1088,5 \pm 6,8	2670 \pm 114
MHA*	0,156 \pm 0,016	0,0835 \pm 0,0069	0,179 \pm 0,011	0,316 \pm 0,016	0,302 \pm 0,024	0,1392 \pm 0,0035	0,242 \pm 0,013	0,1887 \pm 0,0059	0,179 \pm 0,013	0,156 \pm 0,0056	0,1542 \pm 0,0069	0,1601 \pm 0,0052
BM*	0,292 \pm 0,035	0,24 \pm 0,02	0,276 \pm 0,0015	0,345 \pm 0,017	0,28 \pm 0,062	0,169 \pm 0,023	0,432 \pm 0,011	0,3792 \pm 0,0042	0,36 \pm 0,02	0,15 \pm 0,002	0,2754 \pm 0,0042	0,221 \pm 0,033
FFT*	0,853 \pm 0,023	0,467 \pm 0,052	1,03 \pm 0,16	1,6 \pm 0,008	1,042 \pm 0,011	0,872 \pm 0,059	1,29 \pm 0,12	1,62 \pm 0,14	0,844 \pm 0,045	0,5441 \pm 0,0072	0,85 \pm 0,28	1,12356 \pm 0,00074
MH*	1520 \pm 162	566,4 \pm 3,7	860 \pm 31	1460 \pm 37	1920 \pm 54	1240 \pm 13	1480,7 \pm 6,7	1220 \pm 29	1210 \pm 37	1330 \pm 60	1310 \pm 16	1840 \pm 227
MP*	0,479 \pm 0,068	0,5719 \pm 0,0068	0,521 \pm 0,048	0,7622 \pm 0,0084	0,656 \pm 0,022	0,4904 \pm 0,0061	0,693 \pm 0,039	0,654 \pm 0,0048	0,525 \pm 0,044	0,634 \pm 0,042	0,679 \pm 0,012	0,755 \pm 0,019

*Las concentraciones están expresadas en ng/L

Tabla 2. Resultados de la prueba t de comparación de medias entre muestras Históricas y No históricas y del cálculo de la diferencia relativa porcentual.

Compuestos	Diferencia relativa	P
limoneno	-2,9%	0,8863
1,8-cineol	4,3%	0,7983
óxido de linalool	4,0%	0,7135
dihidromircenol	-2,6%	0,8944
vitispiranos	-2,3%	0,8960
linalool	-2,9%	0,8948
Riesling acetal	-3,7%	0,8185
α -terpineol	4,2%	0,8570
TDN	-9,0%	0,6037
β -citronelol	2,8%	0,8671
β -damascenona	-11,6%	0,4937
aceto de β -feniletilo	-8,5%	0,5783
geraniol	-0,9%	0,9695
guaiacol	45,3%	0,0023
β -ionona	3,8%	0,8209
o-cresol	30,7%	0,1957
γ -nonalactona	21,4%	0,4108
m-cresol	32,6%	0,1755
4-vinilguaicol	17,2%	0,1685
masoia lactona	2,1%	0,9527
siringol	2,5%	0,8400
isoeugenol	8,5%	0,4433
4-vinilfenol	27,4%	0,3558
metoxieugenol	37,7%	0,0337
vainillina	21,8%	0,1801
acetovainillona	18,9%	0,2389
siringaldehído	0,3%	0,9908
MHA	-15,0%	0,4939
BM	-24,1%	0,1673
FFT	5,2%	0,8124
MH	-7,8%	0,6539
MP	8,5%	0,3848
suma fenoles	24,3%	0,0144
suma terpenos	0,8%	0,9521
norisoprenoides	-4,6%	0,6985
mercaptanos varietales	0,3%	0,9768

Como puede observarse, promediando todas las zonas de viñedo estudiadas, las diferencias significativas afectan a los componentes del grupo de los fenoles volátiles: guaiacol, metoxieugenol y a la suma de la familia de los fenoles.

Además, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para estudiar la relación existente entre las muestras en función de sus diferencias en contenidos aromáticos. En la figura 1 se muestra la distribución de las muestras Históricas (H_) y las No Históricas (T_). Como se puede observar, las muestras Históricas tienen una distribución más amplia a lo largo del eje PC1, con respecto a las No históricas que se encuentran más agrupadas entre sí.

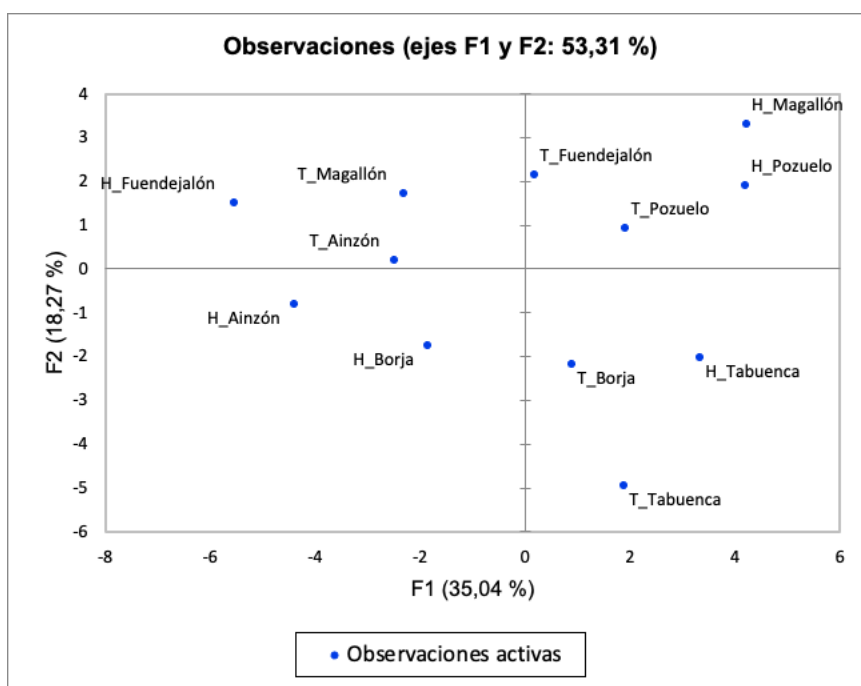


Fig. 1. Análisis de Componentes Principales. Distribución de muestras por edad y zona: T_ son las muestras procedentes de viñedos no históricos y H_ las procedentes de viñedos históricos

En la figura 2 se observa la importancia de los aromas en las componentes principales que justifica la distribución observada para las diferentes muestras. Las Garnachas Históricas de Pozuelo y Magallón se caracterizan por tener mayores contenidos de vainillina, siringol y siringaldehído, de vitispiranos, Riesling acetal, TDN y β -

damascenona. Mientras que, las Garnachas históricas de Ainzón, Fuendejalón y Borja se caracterizan por tener más limoneno, cineol y β -ionona.

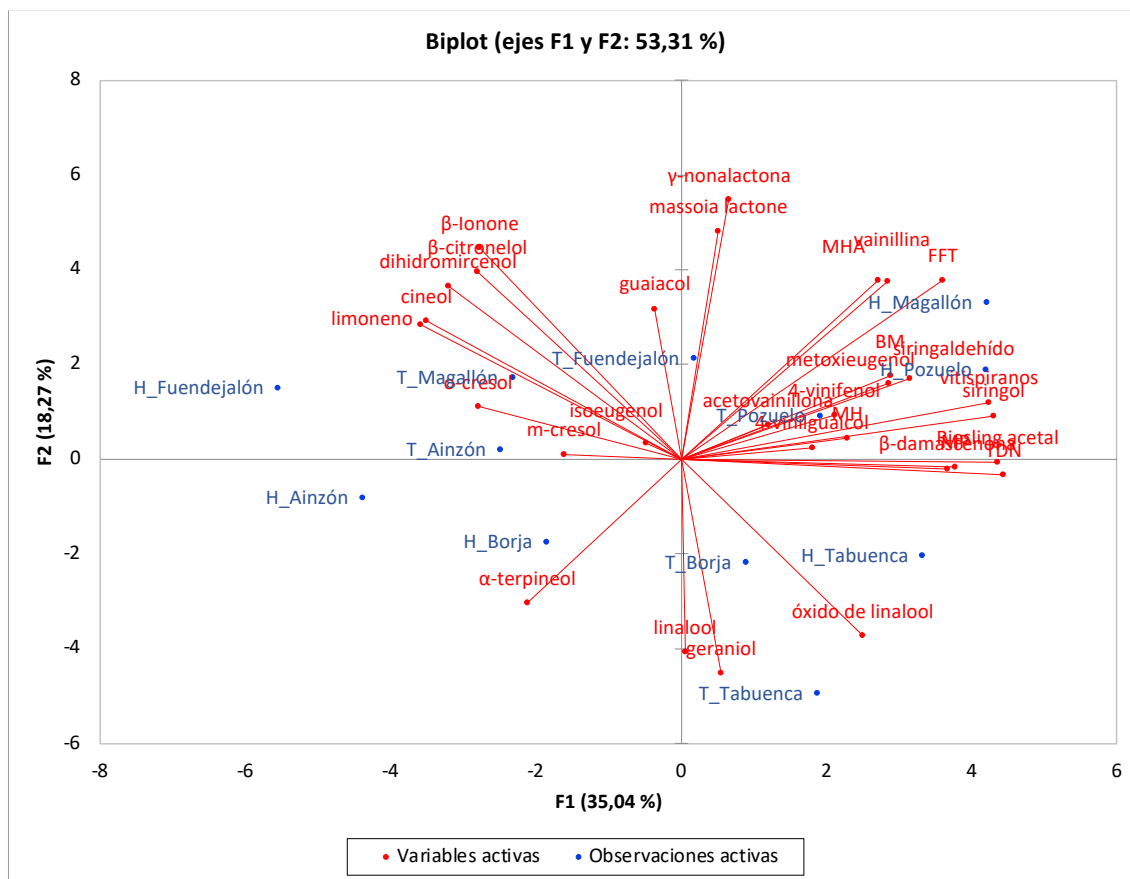


Fig. 2. Análisis de Componentes principales. Distribución de los aromas

Al parecer la influencia de la zona de procedencia tiene más peso que la edad del viñedo en sí. Puesto que, no hay vínculos evidentes geográficos o edafoclimáticos entre las muestras de un lado u otro, podemos pensar que las diferencias se deben a factores clonales no conocidos.

De manera general, las uvas procedentes de viñedos más antiguos pueden producir niveles entre un 38 y un 45% significativamente más altos de guaiacol y metoxieugenol, y de un 24% superior de la familia de los fenoles volátiles, en general.

Desde el punto de vista sensorial, estas diferencias indican que en algunos casos, las parcelas históricas dan lugar a vinos de Garnacha con estructuras aromáticas frutales y florales diferenciadas de los correspondientes pares procedentes de uvas de viñas más

jóvenes. Como notas comunes, los mayores niveles de componentes con aromas a tostado y clavo, harán que la fruta se perciba como más fruta negra que roja; pero según la procedencia se ha detectado que las uvas procedentes de parcelas más antiguas pueden además desarrollar aromas más florales, enriquecidos en terpenos y β -ionona, o más frutales y especiados, enriquecidos en β -damascenona y derivados de la vainillina.

La conclusión más clara del estudio es que se ha demostrado que la edad del viñedo afecta de manera significativa a los niveles generales de uno de los 4 grupos más relevantes de metabolitos secundarios de aromas varietales. Dado que estos metabolitos aromáticos están desde el punto de vista bioquímico, emparentados con los polifenoles, cabe inferir que es muy probable que algunas de las familias de polifenoles también vengán afectadas por la edad del viñedo.

Ensayo de Deshojado

Paralelamente, se realizaron otros estudios en el marco de un ensayo para evaluar el efecto del deshojado (temprano o tardío) en la producción de aromas, también en uvas de Garnacha. Con este fin, se siguió una metodología similar a la explicada anteriormente con uvas Testigo, de Deshojado Temprano (en el cuajado) y de Deshojado Tardío (en el envero) de parcelas situadas en la Bodega Álvaro Palacios perteneciente a la D.O.Ca. Rioja. Cada tratamiento se realizó sobre 5 réplicas (R1-R5). Las muestras se trataron de la misma manera que se hizo en el ensayo anterior. Las concentraciones para cada compuesto analizado en cada tipo de deshojado y la muestra testigo de cada una de las 5 réplicas aparecen reflejadas en la tabla 3a (R1-R3) y la 3b (R4 y R5).

Una vez realizada la determinación de los compuestos se realizó una prueba de diferencias por pares para cada uno de los deshojados, con el objetivo de estudiar si existían diferencias significativas entre la muestra Testigo y sus correspondientes pares de deshojado tanto temprano como tardío. Los resultados de esta prueba aparecen reflejados en la tabla 4.

El deshojado como tal induce niveles superiores de 4-mercapto-4-metilpentanona (MP) y de 4-vinilfenol (si fijamos la significatividad en $p < 0,1$). Además, provoca niveles inferiores de o-cresol y β -citronelol (si fijamos la significatividad en $p < 0,1$).

Si analizamos cada tipo de deshojado por separado, podemos observar que el deshojado temprano induce cambios muy relevantes en los derivados de los carotenoides que a su vez como se ha mencionado antes son precursores de los norisoprenoides. De esta forma, se observa un aumento de los contenidos de vitispiranos, TDN ($p < 0,1$) y Riesling Acetal. Esto pudiera deberse a que la exposición a la luz solar promueve el aumento de los carotenoides en uvas no maduras en comparación con las uvas que se encuentran a la sombra y estos se sintetizan principalmente en la primera etapa de la formación de la fruta hasta el envero (Etapa del ciclo vegetativo anual de la vid después del cuajado y es el comienzo de la maduración de las bayas)². Sin embargo, disminuyen los niveles de β -damascenona, lo cual podría tener un efecto positivo sobre el carácter sobremaduro. También disminuyen algunos derivados de la vainilla y el bencilmercaptano. Con la disminución en los niveles de este mercaptano polifuncional podría verse reducido el aroma empireumático.

Por su parte el deshojado tardío induce cantidades mayores de limoneno, dihidromircenol y β -ionona, que puede aportar aroma a violetas.

Estos estudios son muy preliminares y es necesario estudiar diferentes añadas para arribar a conclusiones más sólidas y confiables.

²Mendes-Pinto, M. M. (2009). Carotenoid breakdown products the—Norisoprenoids—In wine aroma. Archives of Biochemistry and Biophysics, 483(2), 236-245. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.01.008>

Tabla 3a. Concentraciones (ug/L) y desviaciones estándares (n=2) de los aromas analizados en las Réplicas R1, R2 y R3. *- la concentración en ng/L

Compuestos	R1			R2			R3		
	Testigo	D. Temprano	D. Tardío	Testigo	D. Temprano	D. Tardío	Testigo	D. Temprano	D. Tardío
limoneno	20 ± 2	16,82 ± 0,05	32,1 ± 2,4	15,6 ± 1,7	14,32 ± 0,62	28,8 ± 4,5	28,8 ± 1,2	17,1 ± 1,8	33,7 ± 0,1
1,8-cineol	0,4118 ± 0,0021	0,336 ± 0,031	0,6 ± 0,063	0,4 ± 0,038	0,402 ± 0,025	0,5 ± 0,1	0,5442 ± 0,0033	0,5374 ± 0,0084	0,676 ± 0,017
óxido de linalool	2,164 ± 0,077	1,4712 ± 0,0019	1,25736 ± 0,00095	1,6149 ± 0,0032	2,059 ± 0,041	1,659 ± 0,031	1,659 ± 0,026	1,396 ± 0,035	1,95 ± 0,02
dihidromircenol	0,883 ± 0,082	0,88 ± 0,11	1,331 ± 0,083	1,22 ± 0,051	0,854 ± 0,011	1,37 ± 0,32	1,37 ± 0,032	1,073 ± 0,066	1,71 ± 0,02
vitispiranos	38,4 ± 1,2	40 ± 1	23,16 ± 0,86	27,01 ± 0,074	51,1 ± 1,4	33,4 ± 0,81	33,4 ± 0,18	25,386 ± 0,025	40,43 ± 0,18
linalool	5,85 ± 0,19	3,59 ± 0,13	3,409 ± 0,073	3,825 ± 0,035	4,359 ± 0,021	4,65 ± 0,27	4,653 ± 0,032	3,698 ± 0,072	5,51 ± 0,025
Riesling acetal	10,028 ± 0,049	10,602 ± 0,027	5,98 ± 0,33	7,691 ± 0,048	11,48 ± 0,12	7,569 ± 0,054	7,6 ± 0,2	6,99 ± 0,12	9,81 ± 0,16
α-terpineol	7,91 ± 0,03	5,374 ± 0,023	4,147 ± 0,055	5,775 ± 0,068	6,004 ± 0,031	5,334 ± 0,023	5,334 ± 0,014	4,65 ± 0,098	7,3 ± 0,13
TDN	16 ± 0,51	13,82 ± 0,76	8,6 ± 0,31	11,109 ± 0,021	17,04 ± 0,98	12,91 ± 0,64	12,91 ± 0,44	10,32 ± 0,19	14,36 ± 0,78
β-citronelol	0,397 ± 0,023	0,2981 ± 0,0075	0,348 ± 0,039	0,466 ± 0,022	0,391 ± 0,012	0,392 ± 0,048	0,39 ± 0,03	0,393 ± 0,011	0,432 ± 0,021
β-damascenona	3,53 ± 0,13	2,74 ± 0,02	2,21 ± 0,15	3,13 ± 0,01	2,834 ± 0,046	2,6085 ± 0,0078	2,6085 ± 0,0029	2,744 ± 0,035	2,733 ± 0,056
aceto de β-feniletilo	4,743 ± 0,044	3,726 ± 0,053	3,35 ± 0,074	4,09 ± 0,35	4,02 ± 0,15	3,723 ± 0,029	3,723 ± 0,014	3,737 ± 0,011	4 ± 0,3
geraniol	1,243 ± 0,043	0,6761 ± 0,0055	0,55 ± 0,027	0,7837 ± 0,0011	0,91769 ± 0,00073	0,867 ± 0,018	0,8667 ± 0,0083	0,71 ± 0,04	0,99 ± 0,02
guaiaicol	2,113 ± 0,095	2,5567 ± 0,0097	1,5 ± 0,1	2,685 ± 0,055	2,989 ± 0,052	3,332 ± 0,029	3,332 ± 0,036	1,97 ± 0,016	2,02 ± 0,047
β-ionona	0,156 ± 0,021	0,14 ± 0,02	0,1978 ± 0,0063	0,168 ± 0,016	0,151 ± 0,0072	0,214 ± 0,051	0,214 ± 0,017	0,189 ± 0,011	0,25713 ± 0,00066
o-cresol	0,1782 ± 0,0017	0,1943 ± 0,0017	0,128 ± 0,016	0,2419 ± 0,0066	0,1365 ± 0,0045	0,1755 ± 0,0034	0,17553 ± 0,00052	0,1784 ± 0,0054	0,1546 ± 0,0089
γ-nonalactona	0,533 ± 0,024	0,589 ± 0,014	0,5587 ± 0,0066	0,64 ± 0,03	0,89036 ± 0,00053	0,609 ± 0,052	0,6093 ± 0,0056	0,7 ± 0,027	0,574 ± 0,032
m-cresol	4,671 ± 0,035	4,08 ± 0,05	4,76 ± 0,32	5,33 ± 0,18	4,25 ± 0,14	5,02 ± 0,17	5,025 ± 0,075	5,04 ± 0,16	4,49 ± 0,11
4-vinilguaicol	43,7 ± 2,7	36,1559 ± 0,0095	49,9 ± 4,9	35,9 ± 1,8	45,44 ± 0,42	33,8 ± 0,4	33,79 ± 0,96	36,28 ± 0,39	34,4 ± 1,5
siringol	49,9 ± 2,5	38,179 ± 0,054	36,7 ± 2,7	45,73 ± 0,52	62,1 ± 1,8	47 ± 2,3	50 ± 2	48,98 ± 0,93	52,8 ± 2,3
isoeugenol	0,188 ± 0,022	0,1996 ± 0,0035	0,21 ± 0,03	0,245 ± 0,019	0,179 ± 0,013	0,1336 ± 0,0034	0,13356 ± 0,00012	0,169 ± 0,019	0,163 ± 0,034
4-vinilfenol	43 ± 0,9	45,91 ± 0,11	78,65 ± 0,54	38,52 ± 0,25	68,56 ± 0,11	42,77 ± 0,15	40 ± 3	53,35 ± 0,16	57,555 ± 0,061
metoxieugenol	0,76 ± 0,091	0,5734 ± 0,0061	0,869 ± 0,089	0,5967 ± 0,0041	0,43639 ± 0,00079	0,565 ± 0,021	0,5646 ± 0,0028	0,5 ± 0,1	0,56 ± 0,13
vainillina	63,61 ± 0,81	61,93 ± 0,29	49,8 ± 1,8	55,5 ± 1,2	72,4 ± 1,7	61,7 ± 2,4	61,7 ± 0,71	53 ± 1,5	53,3 ± 1,7
acetovainillona	22,1 ± 1,2	19,92 ± 0,13	17,7 ± 3,9	19,63 ± 0,12	14,06 ± 0,39	16,47 ± 0,19	16,5 ± 0,4	16,4 ± 1,3	17,3 ± 1,1
siringaldehído	1780 ± 18	1010 ± 13	750 ± 115	1250 ± 21	770 ± 24	1330 ± 60	1331,7 ± 2,4	940 ± 12	1250 ± 13

Tabla 3a (Continuación). Concentraciones (ug/L) y desviaciones estándares (n=2) de los aromas analizados en las Réplicas R1, R2 y R3.
*- la concentración en ng/L

Compuestos	R1			R2			R3		
	Testigo	D. Temprano	D. Tardío	Testigo	D. Temprano	D. Tardío	D. Tardío	Compuestos	Testigo
MHA*	0,1375 ± 0,0033	0,1936 ± 0,0074	0,404 ± 0,082	0,1707 ± 0,0036	0,304 ± 0,038	0,2623 ± 0,0076	0,34 ± 0,01	0,305 ± 0,014	0,285 ± 0,015
BM*	0,3826 ± 0,0071	0,319 ± 0,013	0,472 ± 0,035	0,317 ± 0,012	0,306 ± 0,012	0,518 ± 0,0047	0,506 ± 0,077	0,4604 ± 0,0055	0,55 ± 0,12
FFT*	0,471 ± 0,027	0,664 ± 0,084	0,797 ± 0,039	0,697 ± 0,076	0,55 ± 0,065	0,629 ± 0,028	0,871 ± 0,021	0,5508 ± 0,00061	0,65 ± 0,14
MH*	1240 ± 35	1570 ± 29	1950 ± 44	1600 ± 126	2090 ± 49	2120 ± 16	2660 ± 55	2060 ± 16	1800 ± 372
MP	0,76 ± 0,069	0,7624 ± 0,0078	1,077 ± 0,061	0,529 ± 0,051	0,704 ± 0,023	0,692 ± 0,0031	0,752 ± 0,082	0,868 ± 0,029	0,845 ± 0,062

Tabla 3b. Concentraciones (ug/L) y desviaciones estándares (n=2) de los aromas analizados en las réplicas R4 y R5. *- la concentración en ng/L

Compuestos	R4			R5		
	Testigo	D. Temprano	D. Tardío	Testigo	D. Temprano	D. Tardío
limoneno	15,2 ± 3,1	31,06 ± 0,64	31,7 ± 2,4	15,3 ± 0,6	15,25 ± 0,37	14,9 ± 1,7
1,8-cineol	0,6 ± 0,06	0,605 ± 0,024	0,54 ± 0,016	0,5513 ± 0,0088	0,3309 ± 0,0076	0,402 ± 0,077
óxido de linalool	1,609 ± 0,036	1,303 ± 0,018	1,202 ± 0,023	1,2187 ± 0,0008	1,781 ± 0,021	1,836 ± 0,016
dihidromircenol	1,04 ± 0,12	1,407 ± 0,054	1,411 ± 0,041	1,44 ± 0,021	0,829 ± 0,015	0,85 ± 0,12
vitispiranos	25,62 ± 0,42	38,41 ± 0,65	30 ± 1	32,56 ± 0,84	29,9 ± 1,9	55,53 ± 0,15
linalool	4,25 ± 0,15	3,32 ± 0,02	3,163 ± 0,041	3,192 ± 0,036	4,088 ± 0,011	3,2 ± 0,13
Riesling acetal	7,714 ± 0,058	9,34 ± 0,11	7,698 ± 0,024	7,699 ± 0,052	7,428 ± 0,051	12 ± 0,12
α-terpineol	4,93 ± 0,07	4,396 ± 0,011	4,613 ± 0,026	4,631 ± 0,044	6,443 ± 0,022	4,20 ± 0,10
TDN	9,8 ± 0,18	13,71 ± 0,56	10,72 ± 0,72	11,22 ± 0,48	11 ± 0,60	16,87 ± 0,075
β-citronelol	0,4 ± 0,027	0,3434 ± 0,0034	0,3508 ± 0,0058	0,355 ± 0,016	0,4111 ± 0,0014	0,314 ± 0,025
β-damascenona	2,973 ± 0,057	2,163 ± 0,013	2,298 ± 0,002	2,299 ± 0,025	2,65 ± 0,04	2,1257 ± 0,0045
aceto de β-feniletilo	3,958 ± 0,084	2,91 ± 0,17	3,369 ± 0,068	3,32 ± 0,17	3,69 ± 0,11	3,0 ± 0,10
geraniol	0,849 ± 0,023	0,535 ± 0,0032	0,4999 ± 0,0098	0,5 ± 0,015	0,841 ± 0,011	0,603 ± 0,012
guaiacol	3 ± 0,1	1,3534 ± 0,0047	1,71137 ± 0,00087	1,71 ± 0,05	3,83 ± 0,01	3,366 ± 0,076
β-ionona	0,188 ± 0,025	0,2162 ± 0,00073	0,2192 ± 0,0093	0,22581 ± 0,00034	0,15494 ± 0,00093	0,16 ± 0,02
o-cresol	0,2097 ± 0,0084	0,1014 ± 0,0013	0,09563 ± 0,00038	0,0959 ± 0,0013	0,2191 ± 0,0026	0,1089 ± 0,0077
γ-nonolactona	0,699 ± 0,042	0,5077 ± 0,0024	0,661 ± 0,026	0,6797 ± 0,0081	0,8104 ± 0,0014	1,025 ± 0,077
m-cresol	5,26 ± 0,32	3,976 ± 0,074	4,137 ± 0,012	4,14 ± 0,14	4,567 ± 0,024	4,17 ± 0,48
4-vinilguaicol	29,7 ± 1,7	43,9 ± 1,1	44 ± 0,7	43,54 ± 0,23	39,2 ± 0,3	46,7 ± 2,3
siringol	51,5 ± 1,7	34,6 ± 1,3	39,63 ± 0,48	40 ± 1,5	58,9 ± 0,1	56,76 ± 0,97
isoeugenol	0,135 ± 0,017	0,1479 ± 0,0057	0,1449 ± 0,0047	0,1482 ± 0,0016	0,1658 ± 0,0039	0,169 ± 0,024
4-vinilfenol	33,7 ± 1,1	81,437 ± 0,011	67,33 ± 0,32	67,1 ± 0,15	51,035 ± 0,084	81,6 ± 3,8
metoxieugenol	0,509 ± 0,066	0,3573 ± 0,0058	0,34 ± 0,016	0,3287 ± 0,0051	0,5391 ± 0,0055	0,429 ± 0,059
vainillina	64,05 ± 0,97	54,75 ± 0,63	58,93 ± 0,81	59,5 ± 1,5	62,95 ± 0,16	73,1 ± 1,3
acetovainillona	22,3 ± 1,5	10 ± 1	14,4 ± 0,6	14,85 ± 0,22	16,28 ± 0,36	13,4 ± 1,1
siringaldehído	1520 ± 74	760 ± 26	800 ± 11	800 ± 25	1260 ± 21	520 ± 45
MHA*	0,2412 ± 0,0031	0,298 ± 0,005	0,3993 ± 0,0098	0,416 ± 0,038	0,202 ± 0,018	0,18 ± 0,016
BM*	0,439 ± 0,056	0,409 ± 0,039	0,383 ± 0,045	0,48 ± 0,06	0,398 ± 0,083	0,458 ± 0,023
FFT*	0,824 ± 0,024	0,668 ± 0,033	0,574 ± 0,089	0,765 ± 0,061	0,497 ± 0,032	0,8 ± 0,24
MH*	2070 ± 19	1280 ± 46	2190 ± 107	3840 ± 92	1570 ± 43	1600 ± 28
MP	0,804 ± 0,051	1,041 ± 0,073	1,003 ± 0,054	0,791 ± 0,048	1,18 ± 0,17	0,99 ± 0,07

Tabla 4. Resultados de la prueba t de diferencia de medias por pares entre cada tipo de deshojado y la muestra testigo. Valores de $p < 0,05$ se señalan en rojo e indican que existen diferencias significativas.

Compuestos	Deshojado Temprano	Deshojado Tardío
limoneno	0,212	0,0001
1,8-cineol	0,488	0,138
óxido de linalool	0,969	0,313
dihidromircenol	0,489	0,004
vitispiranos	0,017	0,904
linalool	0,645	0,857
Riesling acetal	0,021	0,455
α -terpineol	0,626	0,600
TDN	0,078	0,594
β -citronelol	0,086	0,002
β -damascenona	0,033	0,118
aceto de β -feniletilo	0,125	0,300
geraniol	0,413	0,464
guaiacol	0,527	0,405
β -ionona	0,451	0,002
o-cresol	0,065	0,018
γ -nonalactona	0,663	0,366
m-cresol	0,010	0,800
4-vinilguaicol	0,336	0,520
siringol	0,738	0,214
isoeugenol	0,579	0,679
4-vinilfenol	0,055	0,022
metoxieugenol	0,078	0,266
vainillina	0,515	0,365
acetovainillona	0,076	0,467
siringaldehído	0,076	0,244
MHA*	0,998	0,654
BM*	0,019	0,248
FFT*	0,193	0,825
MH*	0,314	0,515
MP*	0,046	0,007

Conclusiones generales

A pesar de ser en ambos casos unos ensayos muy reducidos y por tanto tratamientos estadísticos muy limitados, principalmente por el número de muestras analizadas, se han encontrado algunos resultados muy relevantes por lo que creemos que el estudio del potencial aromático de las uvas mediante la hidrólisis acelerada en anoxia abre puertas a nuevas investigaciones en el estudio de la influencia de diferentes factores que inciden sobre las uvas.

Anexo III. Preevaluación de la fermentación rápida de mostos de uva para el estudio de los aromas varietales derivados de hidrólisis ácida de precursores

Dada la dificultad y coste asociados al uso de FFAs para la evaluación de los aromas varietales derivados de precursores, se planteó el interés de contar con un método de preparación de muestra alternativo. Dado que, durante la extracción de la FFA, lo que se elimina esencialmente son el azúcar y los aminoácidos contenidos en el mosto, y que una manera alternativa de eliminar estos componentes es mediante fermentación, se planteó la posibilidad de emplear una fermentación rápida como sistema rápido de preparación de muestra para la evaluación de la potencialidad aromática de una uva por hidrólisis. Esto permitiría evitar la preparación de las mistelas, su desalcoholización, la extracción SPE y la propia reconstitución, por lo que haría posible desarrollar procedimientos de trabajo mucho más rápidos, baratos y versátiles que los hasta ahora propuestos.

En esta primera aproximación a esta propuesta, se busca, simplemente, determinar la cantidad de levadura necesaria para llevar a cabo una fermentación completa de mostos de uva en un tiempo razonable (2-3 días) y realizar una evaluación preliminar del efecto de la fermentación rápida sobre los precursores aromáticos. Las condiciones prefijadas para la fermentación fueron: temperatura de 28°C, suplementación del mosto de partida con NH_4^+ y un $\text{pH}=3,5$.

1. Cantidad de levadura a emplear

1.1 Experimental

Para la evaluación de la cantidad de levadura se partió de un mosto comercial ecológico (Lambda, Grupo Vichy Catalan, España) que se compró en el supermercado. Este mosto se suplementó con 0,75 g/L de NH_4^+ en formato de sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se ajustó su pH a 3,5 y se midieron los grados Brix en un refractómetro, que fueron de 15,6 para un grado de alcohol probable de 8,65%. Posteriormente, se hicieron pruebas inoculando en cada caso 150 mL del mosto con 50, 250 y 500 g/hL de levadura Lalvin QA23TM (*Saccharomyces cerevisiae*, Lallemand Bio, Barcelona) previamente activada según lo indicado por el

fabricante. Las fermentaciones se hicieron en agitación constante de 200 rpm y en frascos Pyrex de 250 mL con válvulas de Müller en un incubador a 28°C.

1.2 Resultados

En la figura 1 se observa la evolución de las fermentaciones en términos de azúcar consumido. Una vez que el peso fue constante durante dos días consecutivos se consideró terminada la fermentación.

Como se puede apreciar, la velocidad de fermentación fue muy rápida en los tres casos. A 500 g/hl, más del 95% del azúcar había sido metabolizado en el primer día, a 250, casi el 90%, y en el segundo día la fermentación estaba virtualmente completa en los tres casos. Dadas las escasas diferencias entre 250 y 500, se decidió emplear 250 g/hL de levadura en estudios subsiguientes.

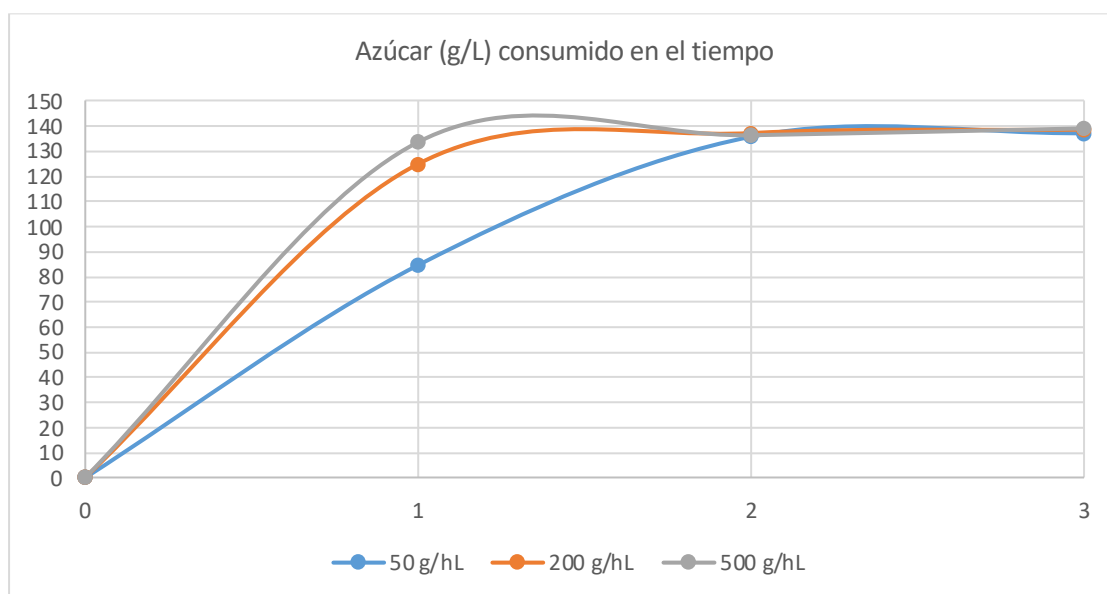


Fig.1 Azúcar consumido durante las fermentaciones con tres cantidades diferentes de levadura inoculada en el mosto

2. Evaluación preliminar de la fermentación rápida como preparación de muestra alternativa en el análisis de aromas varietales derivados de precursores

2.1 Experimental

En este caso, y para poder comparar los resultados con el método actual de preparación de FFAs, se escogió una mistela de la variedad Tempranillo. Primeramente, 750 mL de la mistela se desalcoholizaron, midiéndose en una probeta el volumen recuperado de agua-etanol condensado en el balón recolector del rotavapor. Este mismo volumen, pero de agua conteniendo 0,75 g/L de NH_4^+ se le añadió a la mistela ya desalcoholizada, de forma que el volumen final fue de 750 mL, igual al de partida.

Este volumen de mistela desalcoholizada y reconstituida en agua se dividió en dos fracciones:

- 1- Fracción para fermentación rápida (nuevo procedimiento)
- 2- Fracción re-extraída a FFA, que, a su vez, se dividió en otras dos fracciones:
 - a. Reconstituida con azúcares y fermentada con el procedimiento anterior (control de fermentación).
 - b. Reconstituida con vino sintético (control global).

La forma específica de operar fue la siguiente:

Para la fracción de fermentación rápida, se partió de 300 mL de la mistela desalcoholizada. Esta tuvo 19° Brix (por medición en un refractómetro), lo que equivale a una concentración de aproximadamente 183,5 g/L de azúcar y un Grado Alcohólico Potencial según el rendimiento en alcohol (azúcares por 1% vol. alcohol) de 10,8% de etanol al final de la fermentación³. Estos 300 mL se dividieron en dos alícuotas de 150 mL, que se colocaron en dos fermentadores, para hacer la fermentación por duplicado.

Para la obtención de la FFA se reescaló el método original de preparación de FFAs (descrito en el capítulo 2.1.2 del capítulo 1). Se partió igualmente de 300 mL de la mistela

³ Tablas consultadas en la web de Laffort en www.laffort.com. Fuentes: Grado Brix *Traité d'œnologie* Tome 1, Ed 7, p374. Densidad OIV *Recueil des meth. Internationales d'analyse des vins et des moûts* Ed. 2018. Grado Oechsle *Traité d'œnologie* Tome 1, Ed 7, p374. Grado Baumé *Traité d'œnologie* Tome 1, Ed 7, p374. Azúcares (g/L) OIV *Recueil des meth. Internationales d'analyse des vins et des moûts* Ed. 2018.

desalcoholizada, por cada uno de los controles, que se dividieron desde el comienzo en dos alícuotas de 150 mL para tener dos réplicas por control. Cada alícuota fue extraída en un cartucho de C18 conteniendo 2 g de relleno. La elución se produjo con 20 mL de etanol por cada réplica.

Para el control de fermentación, las dos réplicas del mismo fueron llevadas a sequedad en el rotavapor y se redisolviéron cada una en 150 mL de un mosto sintético conteniendo 0,75 g/L de NH_4^+ , 183,5 g de azúcar por la adición de 91,75 g de fructosa y 91,75 g de glucosa y un pH= 3,5. Una vez reconstituidos “los mostos de FFA” se comprobó que la medida de grados Brix fuera correcta lo que resultó en una medida de 18,9°. Cada réplica se colocó en un fermentador.

Todas las muestras fermentadas (las del nuevo procedimiento y los controles de fermentación) se fermentaron en las mismas condiciones: a 28°C en un incubador, en agitación constante de 200 rpm y con 250 g/hL, en cada fermentador, de levadura QA23, previamente activada según las recomendaciones del fabricante. Una vez terminadas las fermentaciones se centrifugaron los fermentados a 1450 rpm durante 15 min y se reajustó el pH a 3,5.

En el caso de los controles globales, las dos alícuotas de 20 mL de FFA, fueron reconstituídas en vino sintético conteniendo 5 g/L y un pH = 3,5, hasta obtener 150 mL de FFA reconstituida.

Las muestras del nuevo procedimiento y los contrales de fermentación y global, preparados como se indicó anteriormente, fueron sometidos a hidrólisis ácida y analizados. Para ello las muestras se introdujeron en la cámara de anoxia, donde se envasaron por tipo de muestra y réplica 2 viales de 20 mL (para el método de minoritarios y trazas) y 2 viales de 10 mL (mercaptanos polifuncionales) dejando el mínimo espacio de cabeza. Los viales cerrados y separados por tipo de muestra y método de análisis de aromas, se colocaron dentro de una bolsa de plástico termosellada (Coimbra Pack, S.L, Zaragoza, España), certificadas con permeabilidad al oxígeno (valor medio de $9 \text{ cm}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{día})$). Luego, esta primera bolsa se colocó dentro de otra del mismo tipo y entre ellas se añadió carbón activado con un eliminador de oxígeno (AnaeroGen™ de ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Luego en una estufa a 75°C se colocaron las bolsas durante el tiempo correspondiente: 24h para los compuestos

minoritarios y trazas y 96h para los mercaptanos polifuncionales. Una vez hidrolizadas se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

Se realizaron análisis de aromas mayoritarios en las muestras a tiempo 0 de hidrólisis, de aromas minoritarios y trazas en las de 24 h de hidrólisis y de mercaptanos polifuncionales tras 96 horas de análisis. El procedimiento de análisis de los compuestos mayoritarios es el descrito en el apartado 2.4.1 del capítulo 3, mientras que el de compuestos minoritarios y trazas aparece descrito en el apartado 2.3.1 del capítulo 1 y el de mercaptanos polifuncionales en el apartado 2.3.2 del mismo capítulo.

2.2. Resultados

Tiempo de fermentación

Como era de esperar la fermentación de las dos réplicas biológicas de mistela desalcoholizada tardó menos de 3 días en terminar. Sin embargo, la fermentación de las réplicas del control de fermentación se llevó 11 días, lo que debe atribuirse a la pérdida en el proceso de extracción de la FFA de cationes metálicos y vitaminas hidrosolubles, que no fueron reemplazadas durante la reconstitución.

Evaluación del aroma generado

Compuestos fermentativos

En el análisis de los compuestos fermentativos en ambos fermentados todos los compuestos resultaron ser significativamente diferentes a excepción de: acetato de etilo, isobutanol, butanol, ácido acético, ácido butírico, decanoato de etilo, ácido isovalérico, metionol, alcohol bencílico y ácido decanoico. Quizás lo más remarcable son los niveles muy superiores de acetaldehído y acetoína en la FFA, lo que se puede atribuir al mayor tiempo que tardó la FFA en terminar de fermentar. En cualquier caso, las diferencias observadas en estos componentes son esperables e irrelevantes desde el punto de vista de este ensayo, ya que se trata fundamentalmente de compuestos de origen fermentativo.

Tabla 2. Concentraciones promedio (mg/L) y desviaciones estándares (n=4) de los aromas mayoritarios analizados. Resultados ANOVA de un factor.

Compuestos	FFA fermentada	Mistela fermentada	p-valor
acetaldehído	76 ± 9.3	2.8 ± 0.55	7.9E-03
acetato de etilo	10.6 ± 0.29	13 ± 2	1.9E-01
propanoato de etilo	0.13 ± 0.015	0.04 ± 0.0019	1.4E-02
diacetilo	0.056 ± 0.0055	0.0206 ± 0.00011	1.2E-02
butirato de etilo	0.0069 ± 0.00087	0.024 ± 0.0038	2.4E-02
isobutanol	24 ± 0.22	22 ± 1.3	2,40E-01
acetato de isoamilo	0.05 ± 0.015	0.262 ± 0.0097	3.7E-03
butanol	0.3 ± 0.051	0.27 ± 0.011	6.1E-01
acetato de β-feniletilo*	7.4 ± 0.51	62 ± 2.5	1.0E-08
alcohol isoamílico	44 ± 1.1	88 ± 4.5	5.5E-03
hexanoato de etilo	0.027 ± 0.0041	0.069 ± 0.0086	2.5E-02
2-metilbutirato de etilo*	4.8 ± 0.36	6.7 ± 0.65	2.7E-03
isobutirato de etilo*	23 ± 3.1	16 ± 1.5	7.4E-03
acetoína	20.4 ± 0.68	0.28 ± 0.013	5.8E-04
lactato de etilo	0.33 ± 0.028	0.834 ± 0.0039	1,5E-03
octanoato de etilo	n.d.	0.058 ± 0.0073	7,8E-03
ácido acético	127 ± 11	142 ± 26	5.2E-01
ácido isobutírico	2.24 ± 0.025	1.69 ± 0.055	6.0E-03
butirolactona	0.14 ± 0.021	1.44 ± 0.03	4.0E-04
ácido butírico	0.61 ± 0.062	0.53 ± 0.057	3.6E-01
decanoato de etilo	0.042 ± 0.0089	0.02 ± 0.0025	7.4E-02
succinato de dietilo	0.81 ± 0.054	0.07 ± 0.015	2.8E-03
ácido isovalérico	1.1 ± 0.13	1.2 ± 0.12	9.0E-01
metionol	0.017 ± 0.0034	0.22 ± 0.092	8.7E-02
ácido hexanoico	0.73 ± 0.06	1.2 ± 0.068	1.8E-02
alcohol bencílico	0.083 ± 0.0019	0.0822 ± 0.00073	5.1E-01
β-feniletanol	8.2 ± 0.47	11.89 ± 0.07	8.4E-03
ácido octanoico	0.051 ± 0.0016	1.693 ± 0.0012	7.4E-07
ácido decanoico	0.0167 ± 0.00026	0.3 ± 0.22	2.0E-01

* Compuestos analizados por el método de minoritarios y trazas

Compuestos del aroma varietal (minoritarios, trazas y mercaptanos polifuncionales):

Los contenidos de estos aromas en la muestra obtenida con el nuevo procedimiento y en los dos controles fueron analizados mediante un ANOVA y una prueba de Tukey, para evaluar si existían diferencias significativas entre ellas. Para los compuestos en los que

existían diferencias significativas entre los hidrolizados de cada fermentado y el control global se calculó el incremento porcentual del aroma generado en el fermentado respecto al generado en el control global. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones promedio ($\mu\text{g/L}$) y desviaciones estándares ($n=4$ para los fermentados y $n=2$ para la FFA) de los aromas varietales analizados. Resultados ANOVA de un factor y prueba de Tukey. Diferentes letras significa que pertenecen a grupos diferentes de la prueba de Tukey

Compuestos	control global (extraído no fermentado)	control de fermentación (extraído y fermentado)	Nuevo procedimiento (no extraído y fermentado)	p-valor	% Incremento respecto al control global*	
					Control ferment.	Nuevo proced.
cinamato de etilo	0.05 ± 0.0077 b	2 ± 0.34 a	0.39 ± 0.022 b	2.4E-05	3843	
dihidrocinamato de etilo	n.d. b	n.d. b	0.278 ± 0.0099 a	1.6E-10		
leucato de etilo	n.d. b	n.d. b	8.6 ± 0.32 a	2.2E-10		
γ -nonalactona	0.177 ± 0.0021 c	3.33 ± 0.082 a	2.89 ± 0.037 b	2.1E-10	1782	1533
masoia lactona	2.89 ± 0.071 a	0.97 ± 0.028 b	0.85 ± 0.032 c	1.8E-10	-66,6	-70,5
β -damascenona	0.44 ± 0.02 a	0.33 ± 0.03 b	0.26 ± 0.018 c	2.2E-04	-24,0	-40,1
β -ionona	4.5 ± 0.23	3 ± 1.6	3 ± 1.3	4.6E-01		
Riesling acetal	5.3 ± 0.32 b	6.9 ± 0.73 a	6.2 ± 0.18 ab	0.01953	31	
óxido de rosa	0.121 ± 0.0074	0.125 ± 0.0037	0.124 ± 0.0057	6.7E-01		
TDN	6.2 ± 0.21 b	12 ± 2.8 a	14 ± 2.3 a	2.0E-02	99	121
vitispiranos	0.236 ± 0.0099	0.32 ± 0.057	0.31 ± 0.035	1.4E-01		
α -terpineol	n.d. b	1.14 ± 0.048 a	1.07 ± 0.029 a	9.3E-08	236	217
β -citronelol	9.6 ± 0.44 c	26 ± 1.1 a	22 ± 2.7 b	7.2E-05	172	129
dihidromircenol	0.22 ± 0.025 a	0.21 ± 0.039 a	0.15 ± 0.01 b	1.8E-02		-34
geraniol	2.49 ± 0.084 ab	2.8 ± 0.2 a	2.3 ± 0.11 b	5.4E-03		
linalol	0.422 ± 0.0072 c	1.4 ± 0.18 a	0.9 ± 0.12 b	2.4E-04	233	113
óxido de linalol	1.19 ± 0.057	1.5 ± 0.19	1.42 ± 0.091	5.6E-02		
nerol	0.25 ± 0.065 b	0.39 ± 0.033 a	0.24 ± 0.027 b	1.6E-03	54	
limoneno	14.9 ± 0.66	14.9 ± 0.32	14 ± 0.85	1.7E-01		
acetovainillona	6.8 ± 0.42 c	22.7 ± 0.65 a	15.3 ± 0.15 b	5.2E-09	236	127
siringaldehído	119 ± 2.2 a	45 ± 6 b	32 ± 4.6 c	5.6E-07	-62	-73
vainillina	13 ± 0.18 a	9 ± 0.34 c	10.7 ± 0.81 b	2.7E-04	-31	-18
4-vinilguaiacol	5.21 ± 0.011 c	8.5 ± 0.45 b	12.8 ± 0.54 a	6.7E-07	63	146
4-vinilfenol	31.3 ± 0.23 b	23.1 ± 0.86 c	84 ± 1.7 a	9.6E-11	-26	169
4-etilfenol	0.0407 ± 0.00075 c	0.231 ± 0.0052 a	0.072 ± 0.0035 b	2.0E-10	466	76
eugenol	0.245 ± 0.0099 c	0.54 ± 0.033 a	0.33 ± 0.011 b	2.1E-06	122	36
guaiacol	6.96 ± 0.037 a	5.2 ± 0.41 b	4.5 ± 0.13 c	7.3E-05	-25	-35
m-cresol	0.085 ± 0.0039 b	0.108 ± 0.0028 a	0.067 ± 0.0031 c	1.2E-06	27	-20
metoxieugenol	7.53 ± 0.074 a	7.4 ± 0.44 a	6 ± 0.28 b	9.4E-04		-21

Tabla 1. Concentraciones promedio ($\mu\text{g/L}$) y desviaciones estándares ($n=4$ para los fermentados y $n=2$ para la FFA) de los aromas varietales analizados. Resultados ANOVA de un factor y prueba de Tukey. Diferentes letras significa que pertenecen a grupos diferentes de la prueba de Tukey

Compuestos	control global (extraído no fermentado)	control de fermentación (extraído y fermentado)	Nuevo procedimiento (no extraído y fermentado)	p-valor	% Incremento respecto al control global*	
					Control ferment.	Nuevo proced.
o-cresol	0.424 \pm 0.0022 b	0.514 \pm 0.009 a	0.188 \pm 0.008 c	3.6E-10	21	-56
syringol	116.6 \pm 0.24 a	88 \pm 3.1 b	77 \pm 1.5 c	6.1E-07	-25	-34
isoeugenol	4.76 \pm 0.085	4.6 \pm 0.12	4.8 \pm 0.27	3.1E-01		
furfuritiol	5.6 \pm 0.32 b	5.4 \pm 0.5 b	7.8 \pm 0.28 a	1.4E-04		38
4-mercapto-4-metil-2-pentanona	206 \pm 24	208 \pm 44	274 \pm 42	1.0E-01		
acetato de 3-mercaptohexilo	6 \pm 1.2	8 \pm 1.1	8 \pm 2.6	4.4E-01		
3-mercaptohexanol	1250 \pm 24 b	2262 \pm 74 a	965 \pm 17 c	8.8E-09	83	-23

*Porcentaje de incremento respecto a la FFA control de los aromas con diferencias significativas entre la FFA control y el fermentado.

Como puede verse, la muestra obtenida con el nuevo procedimiento contiene todos los aromas varietales, lo que indica que el procedimiento de fermentación rápida no metaboliza o absorbe los precursores aromáticos, lo que a priori, posibilita su uso como procedimiento para preparación de muestras para el análisis de precursores de aromas varietales.

De hecho, tan solo se registran contenidos significativamente inferiores en algunos aromas varietales, como son la massoia lactona, la β -damascenona, el dihidromircenol, siringaldehído, vainillina, guaiacol, cresoles, metoxieugenol, syringol y 3-mercaptohexanol. Varios de estos resultados ya eran esperados, ya que en estudios previos se ha demostrado que la levadura degrada o metaboliza parte de los precursores de algunos de estos componentes ⁴. Este es el caso de la massoia lactona, que ya se conoce desde hace tiempo que es reducida durante la fermentación (otra ref PONS), pero también el del siringaldehído, vainillina, guaiacol, cresoles e incluso 3-mercaptohexanol.

⁴ Denat, M., Pérez, D., Heras, J. M., Sáenz-Navajas, M. P., & Ferreira, V. (2021). Impact of two yeast strains on Tempranillo red wine aroma profiles throughout accelerated ageing. *OENO One*, 55(4), Article 4. <https://doi.org/10.20870/oenone.2021.55.4.4732>

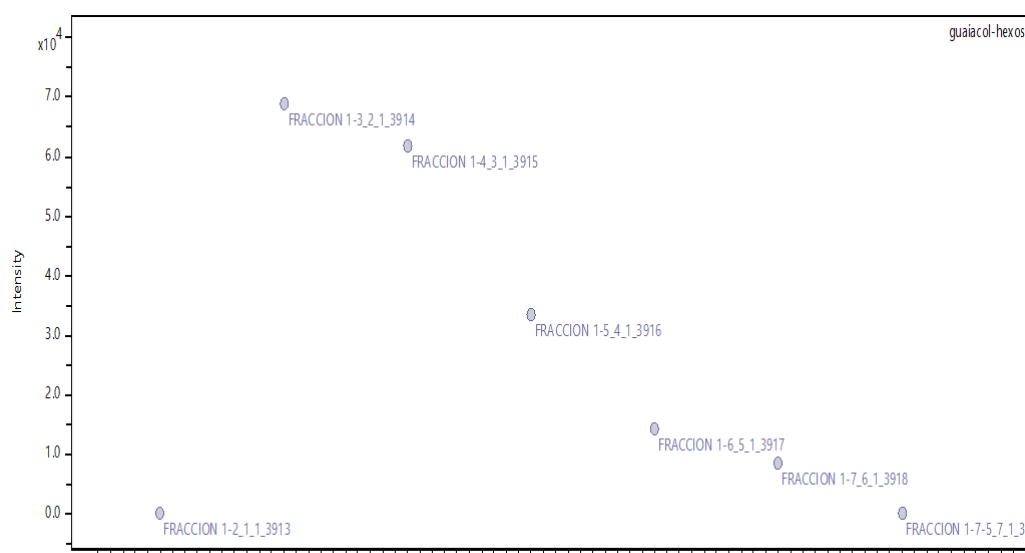
El comportamiento del 3-mercaptohexanol es complejo. En la FFA fermentada se genera un 82,5 % más que en la FFA control, lo que sugiere que la fermentación tiene un efecto sobre sus precursores, lo cual ya es conocido. Sin embargo, en la mistela fermentada se genera un 22,8 % menos que en la FFA control. Esto podría sugerir que, dado que en la preparación de la FFA se eliminan principalmente metales y aminoácidos, estos podrían tener un efecto sobre la hidrólisis de estos precursores, quizás por ello tanto en la FFA fermentada como en la FFA control, los niveles son superiores frente a la mistela fermentada.

No obstante, teniendo en cuenta que, además, los componentes que se encuentran en concentraciones significativamente menores a los de la muestra obtenida por fermentación rápida, están presentes en cantidades bastante cercanas al control global (FFA control), al menos en términos relativos, puede considerarse que, de manera preliminar, la fermentación rápida empleando cantidades altas de levadura y de amonio, puede resultar una estrategia competitiva para el estudio de la potencialidad aromática de la uva de vinificación.

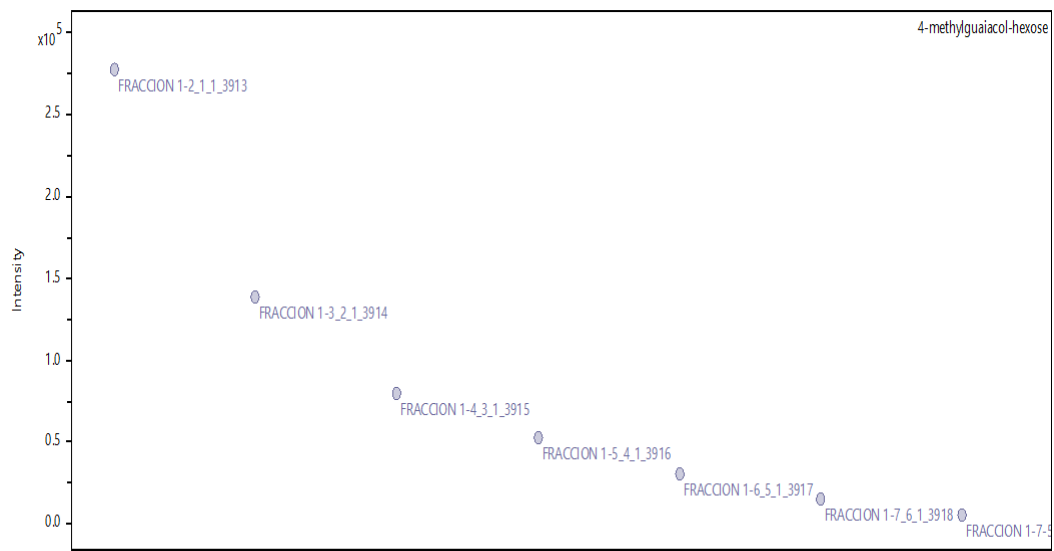
Anexo IV. Perfiles de intensidad en las fracciones sin hidrolizar del análisis UHPLC-MS de los potenciales precursores identificados en el capítulo 4.

En este anexo aparecen reflejados los perfiles de intensidad de cada uno de los potenciales precursores identificados en las fracciones sin hidrolizar del análisis UHPLC-MS, por zonas de aromas.

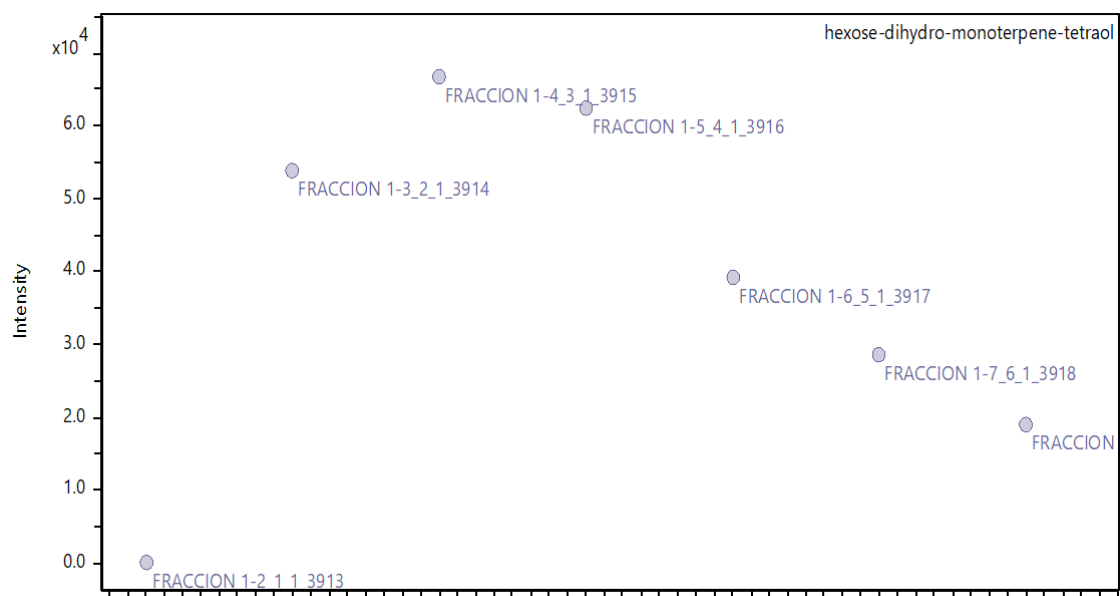
Zona 1



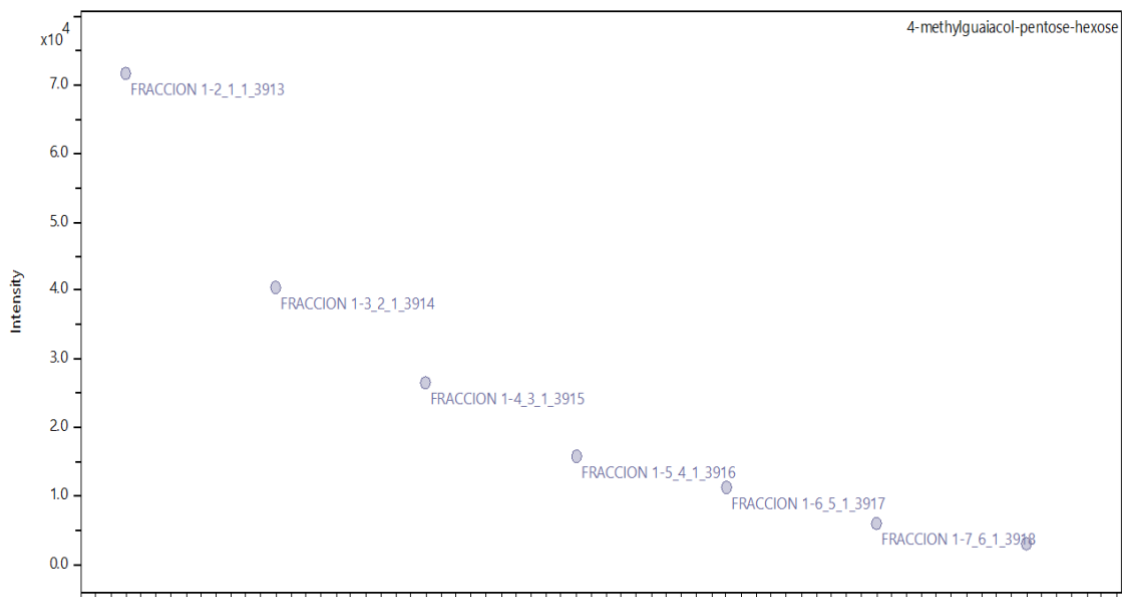
Perfil de intensidad del precursor guaiacol-hexosa (no.1)



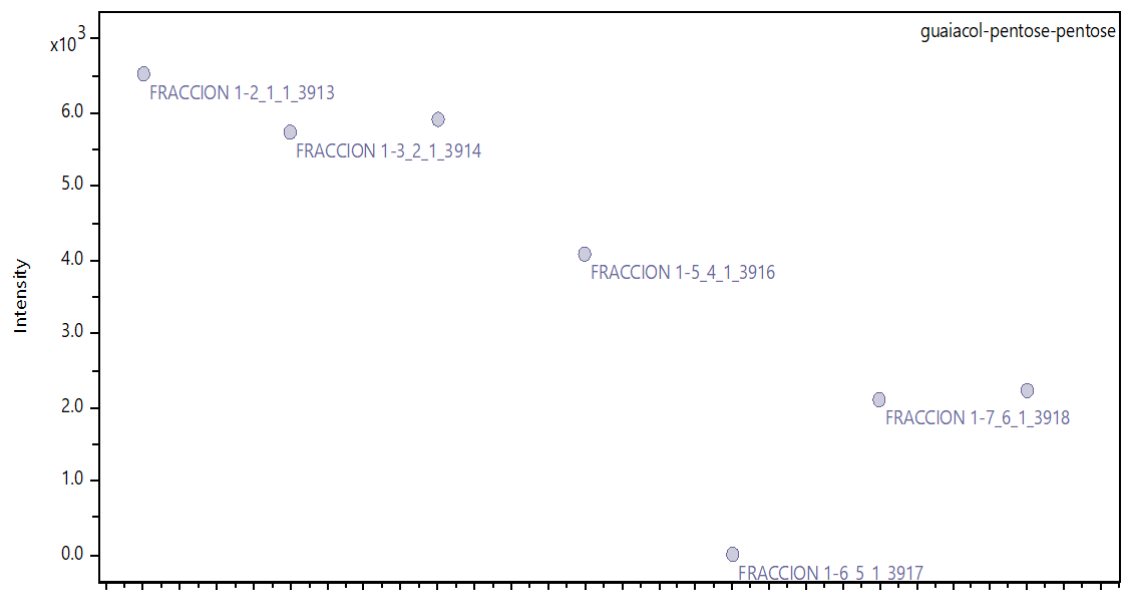
Perfil de intensidad del precursor 4-etilguaiacol-hexosa (no.2)



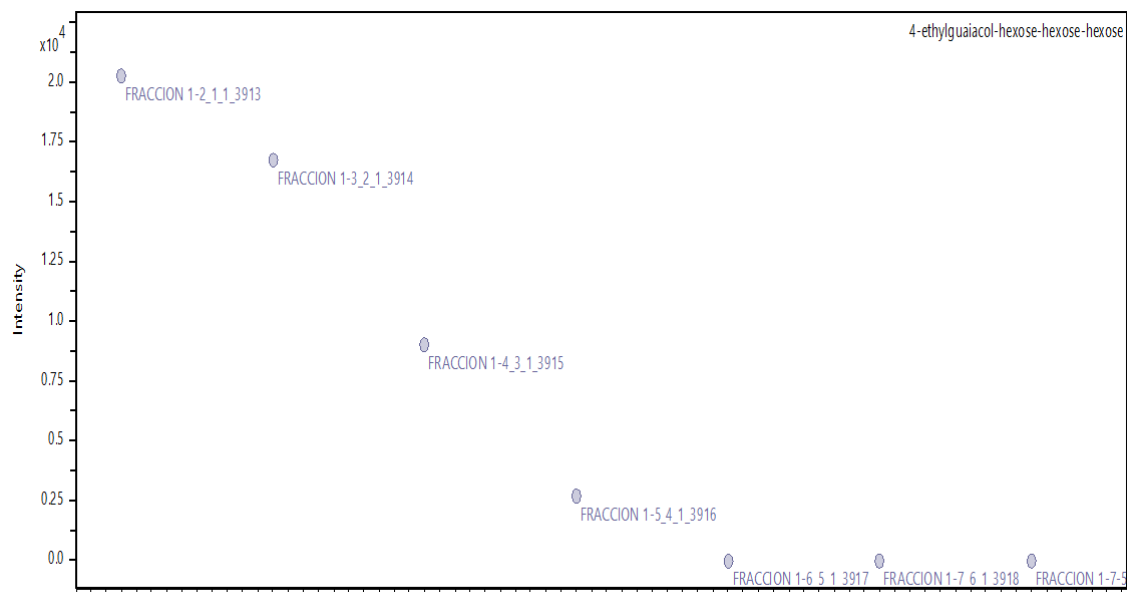
Perfil de intensidad del precursor dihidro-monoterpen-tetraol-hexosa (no.3)



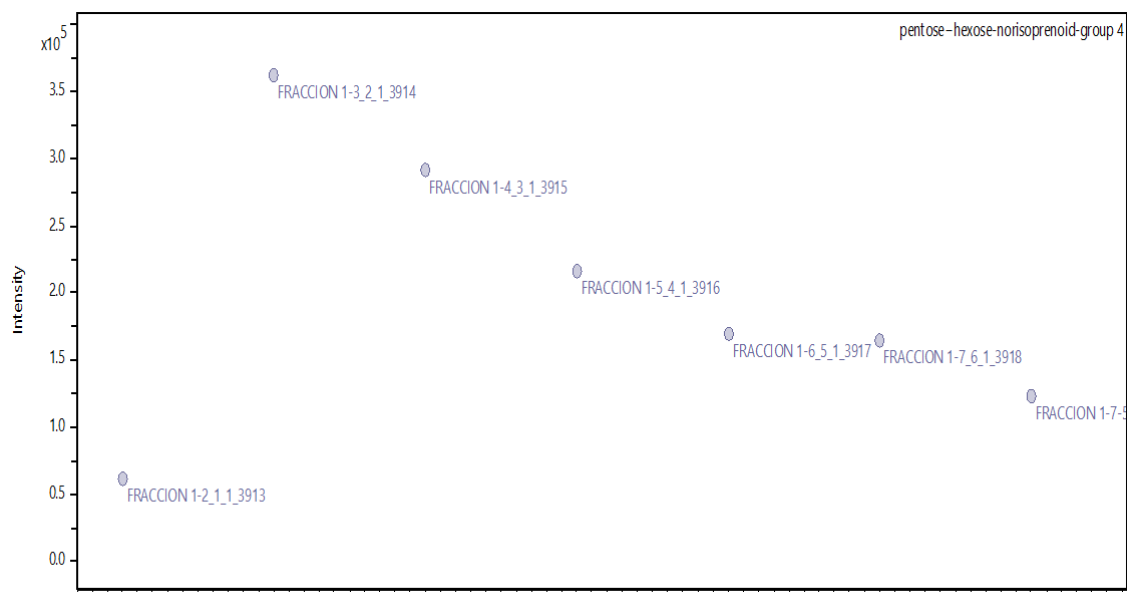
Perfil de intensidad del precursor 4-metilguaiacol-pentosa-hexosa (no.4)



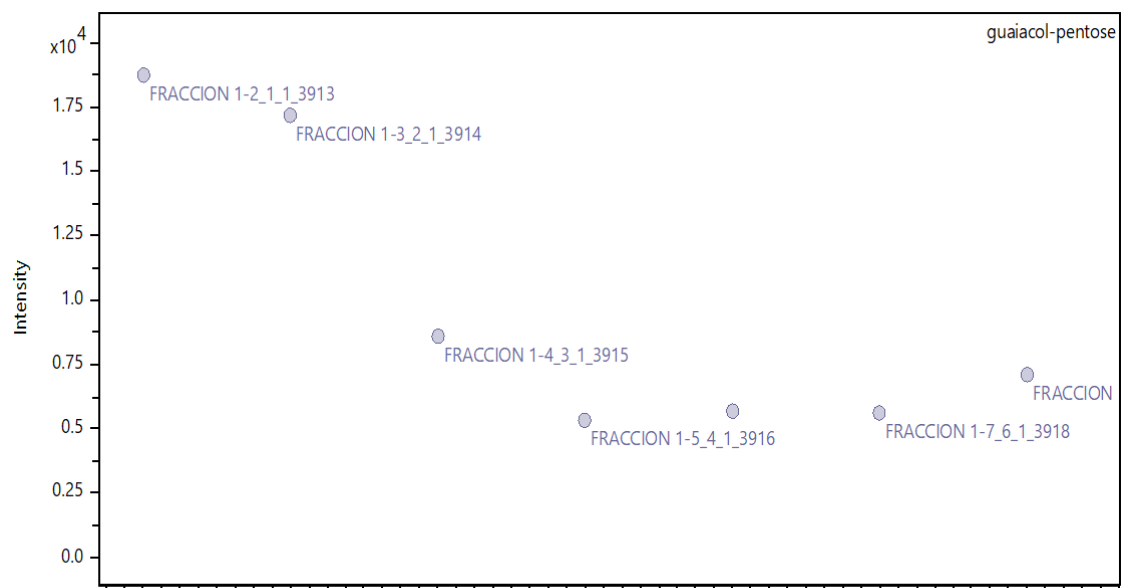
Perfil de intensidad del precursor guaiacol-pentosa-pentosa (no.5)



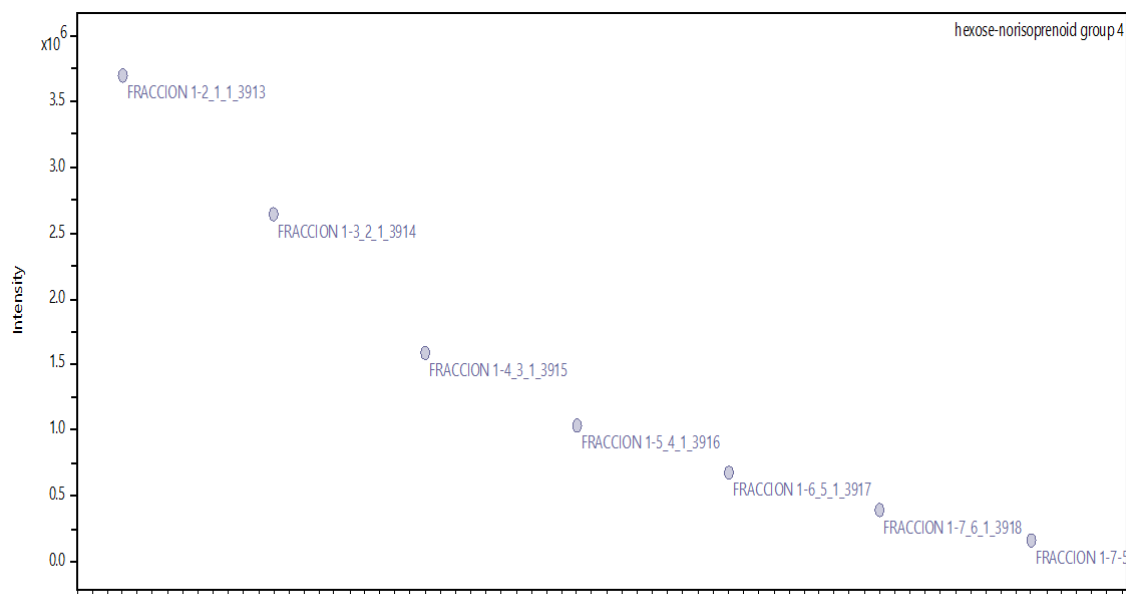
Perfil de intensidad del precursor 4-etilguaiacol-hexosa-hexosa-hexosa (no.6)



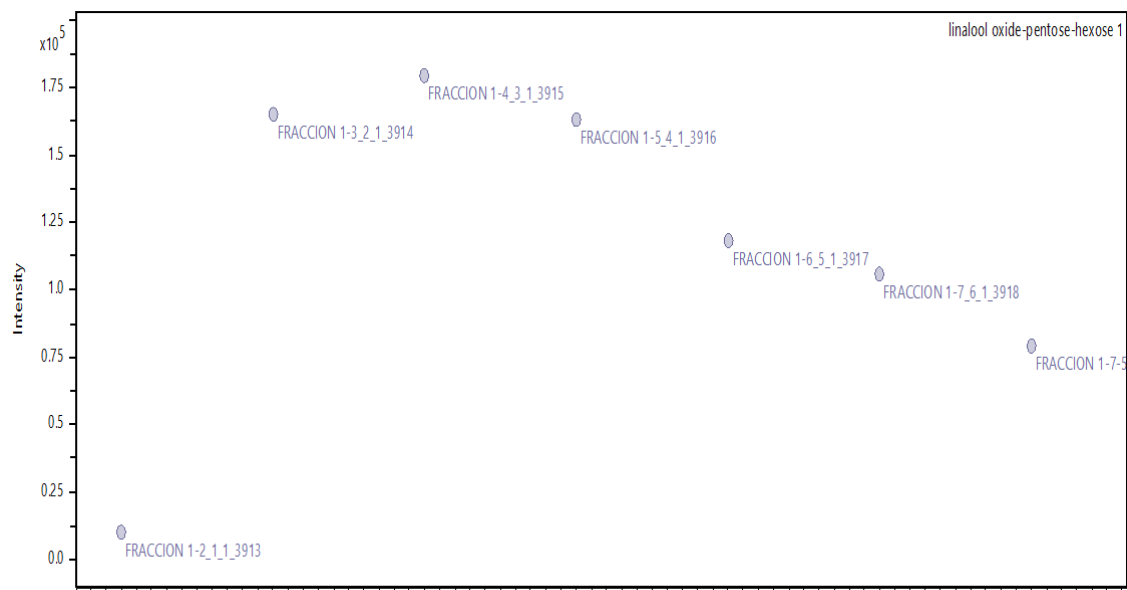
Perfil de intensidad del precursor norisoprenoide grupo 4-pentosa-hexosa (no.7)



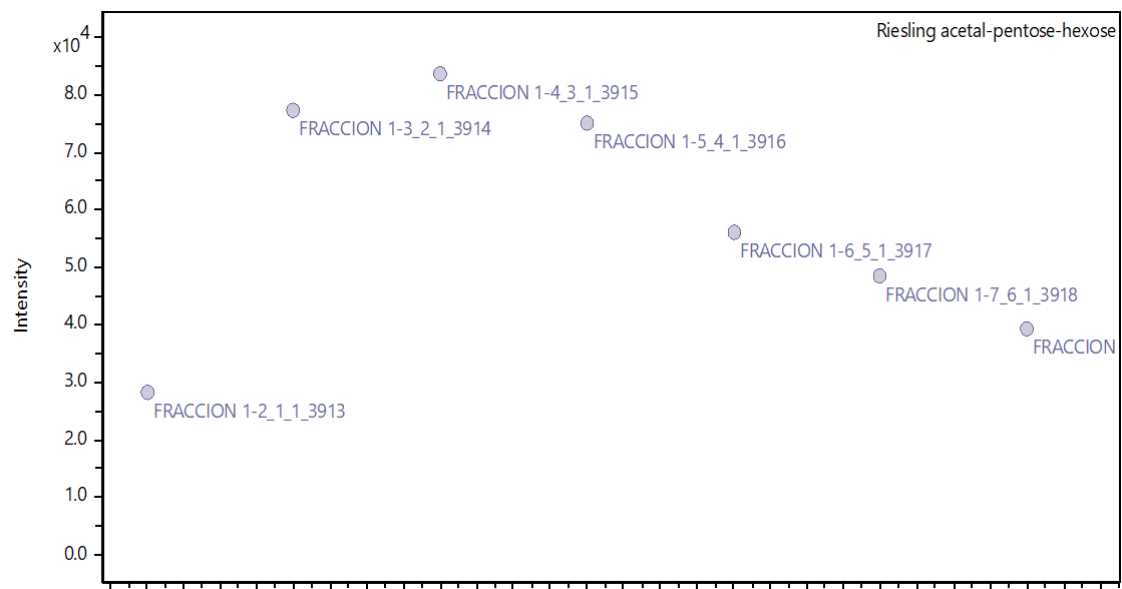
Perfil de intensidad del precursor guaiacol-pentosa (no.8)



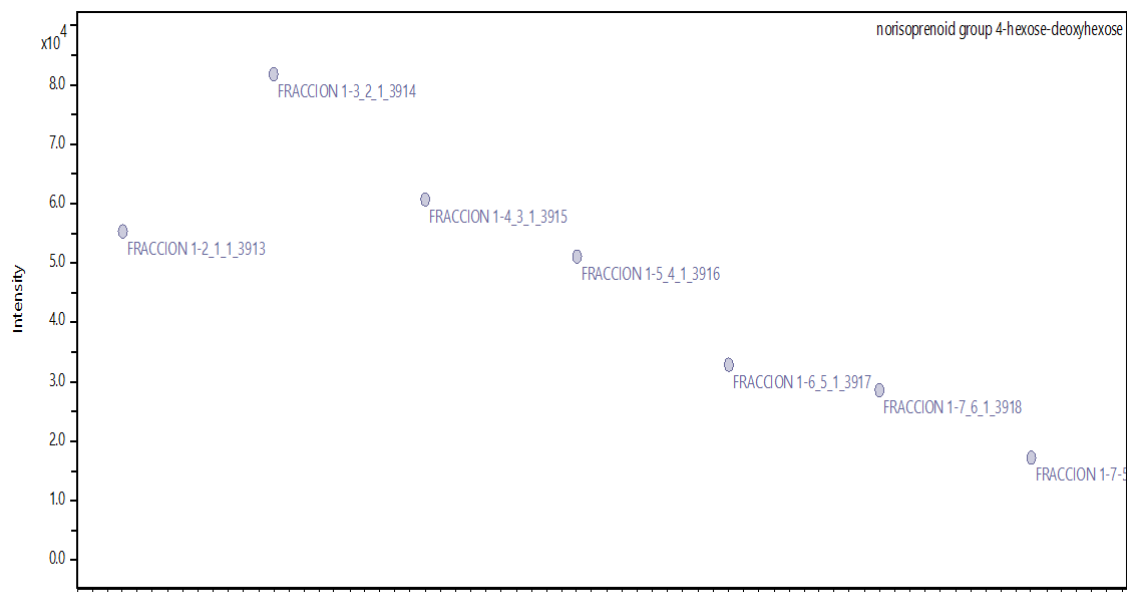
Perfil de intensidad del precursor norisoprenoide grupo 4-hexosa (no.9)



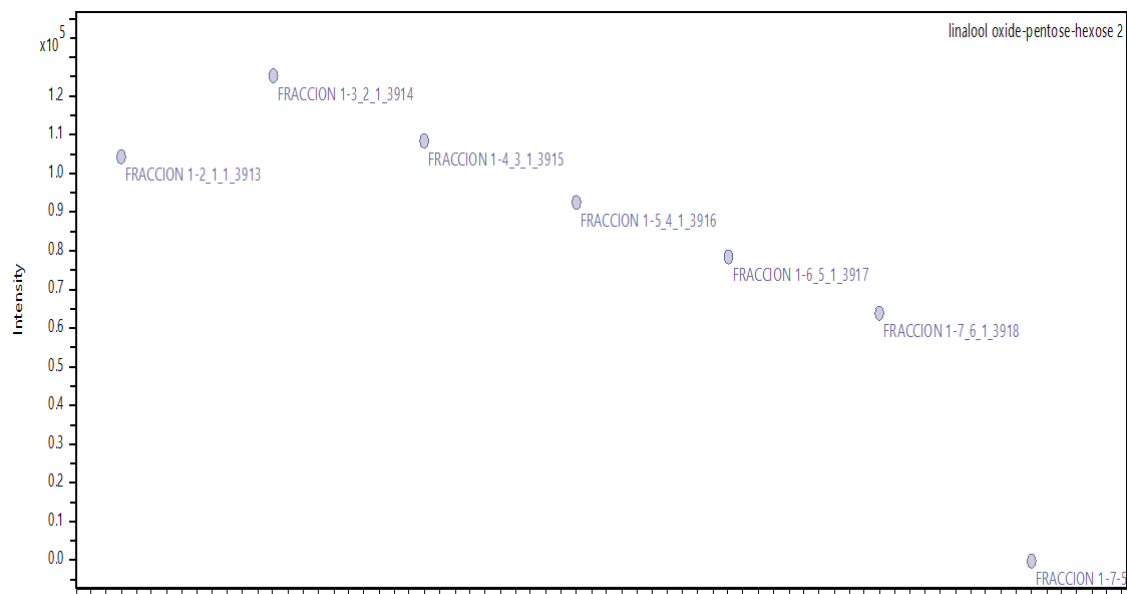
Perfil de intensidad del precursor óxido de linalool-pentosa-hexosa 1 (no.10)



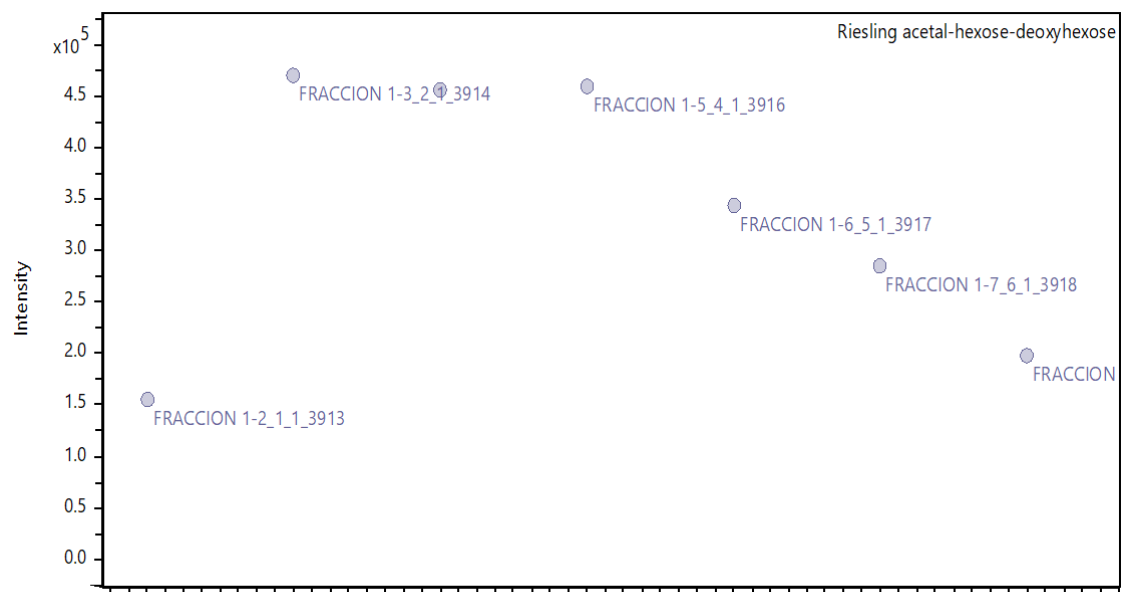
Perfil de intensidad del precursor Riesling acetal-pentosa-hexosa (no.11)



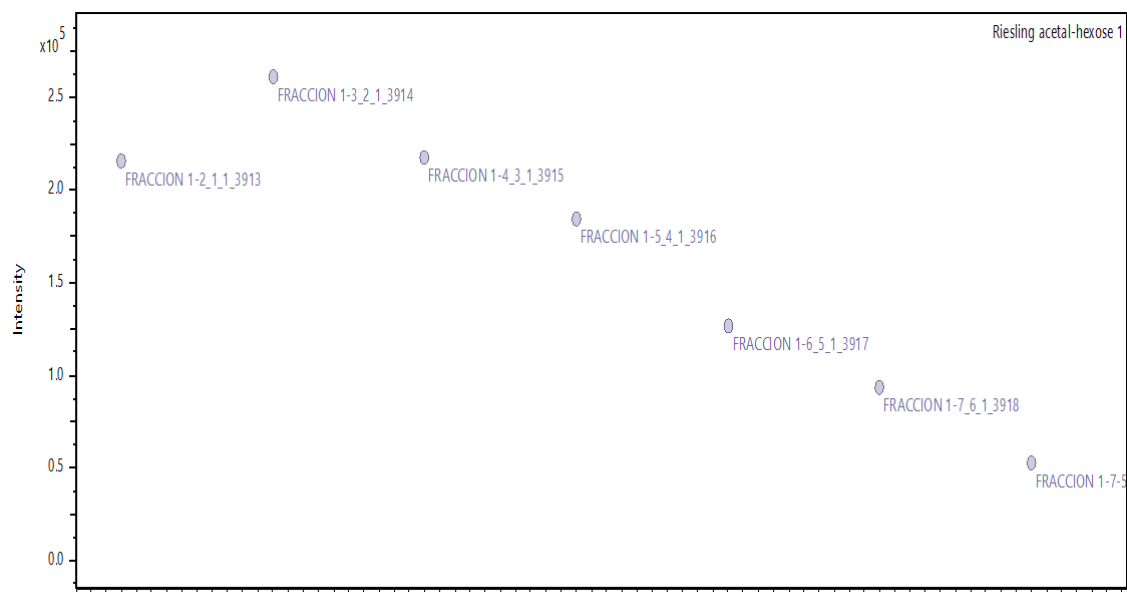
Perfil de intensidad del precursor norisoprenoide grupo 4-hexosa-deoxihexosa(no.12)



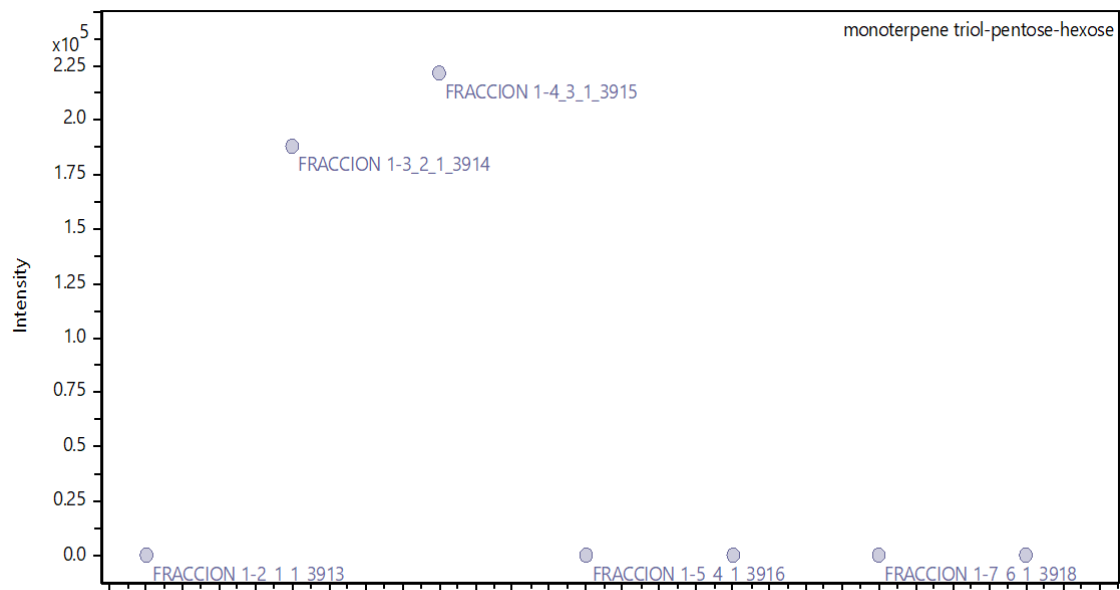
Perfil de intensidad del precursor óxido de linalool-pentosa-hexosa 2 (no.13)



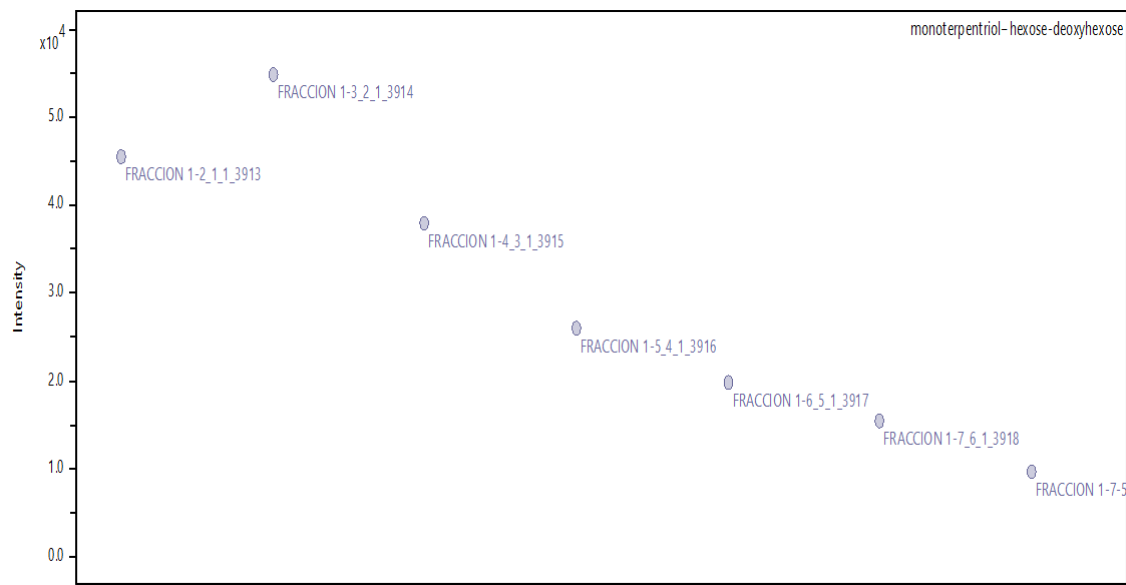
Perfil de intensidad del precursor Riesling acetal-hexosa-deoxihexosa (no.14)



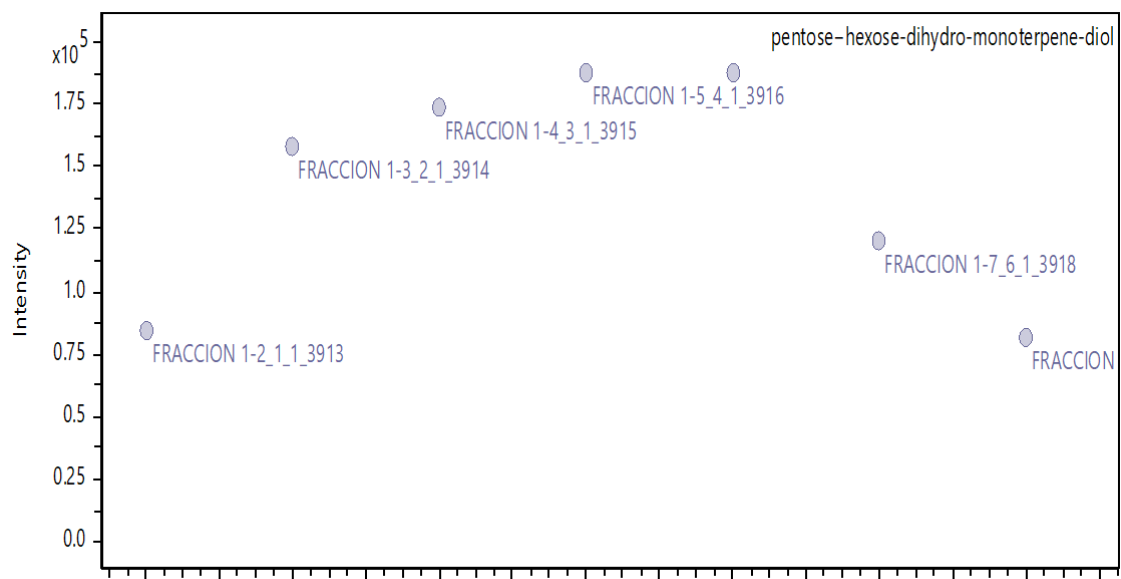
Perfil de intensidad del precursor Riesling acetal-hexosa 1 (no.15)



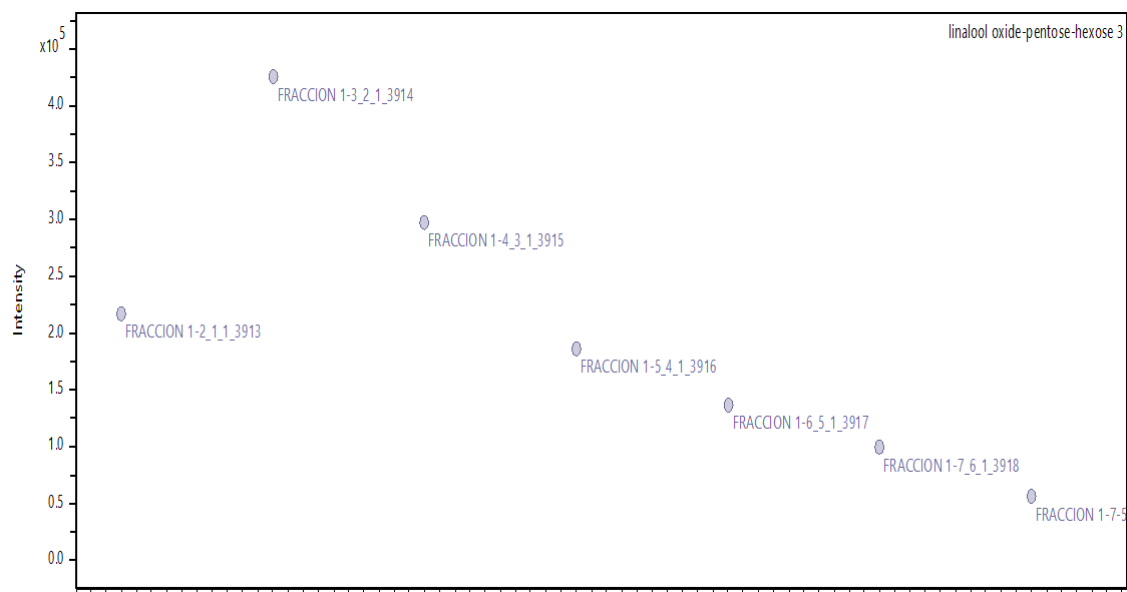
Perfil de intensidad del precursor monoterpenetriol-pentosa-hexosa (no.16)



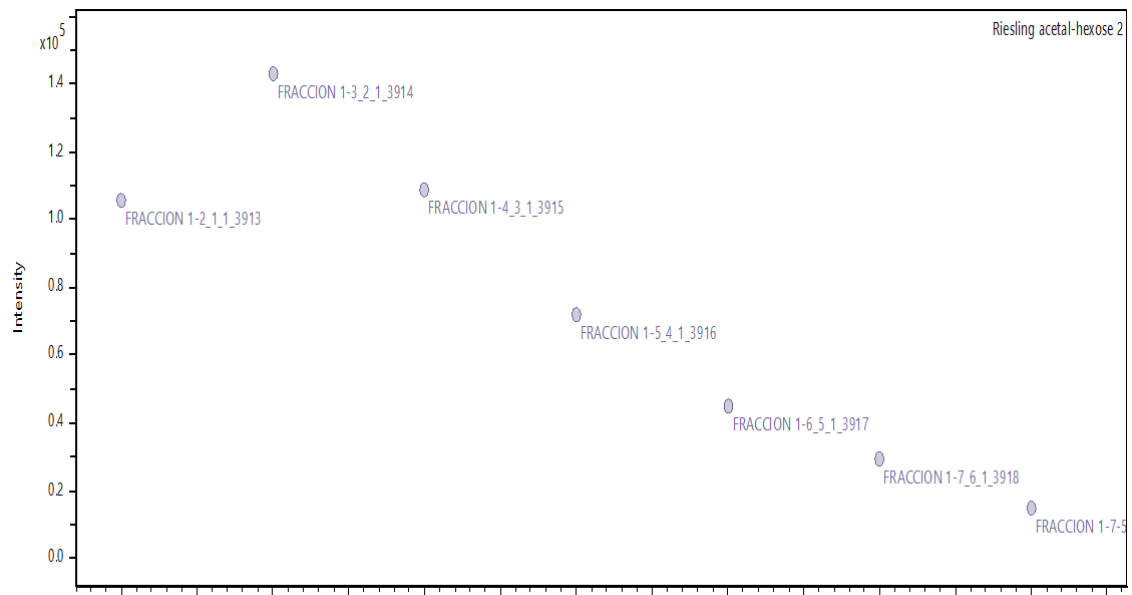
Perfil de intensidad del precursor monoterpenetriol-hexosa-deoxyhexosa (no.17)



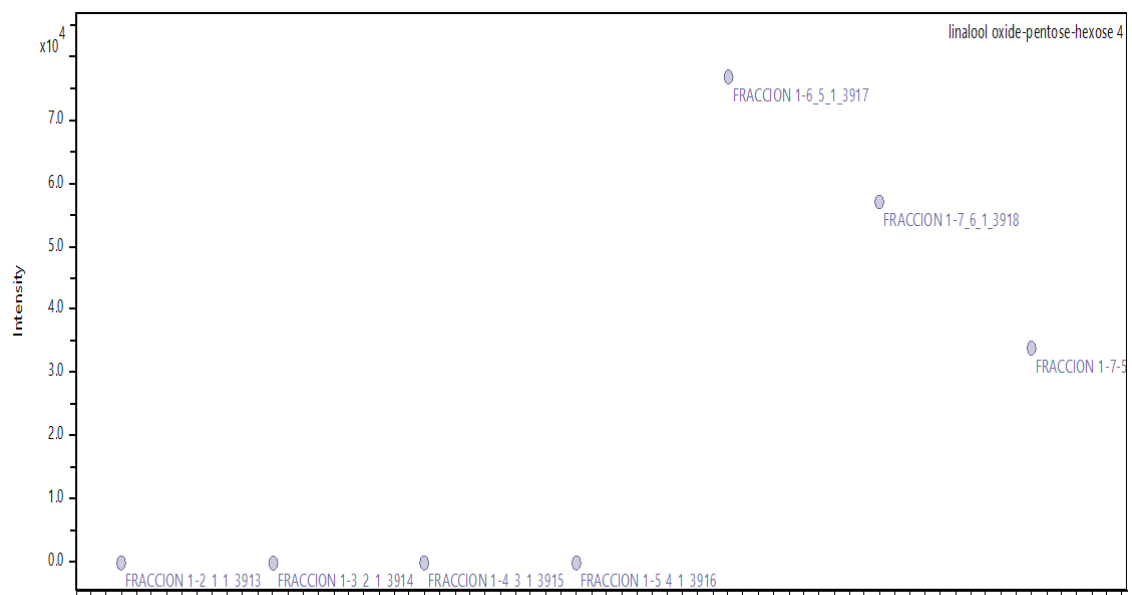
Perfil de intensidad del precursor dihidro-monoterpéndiol-pentosa-hexosa (no.18)



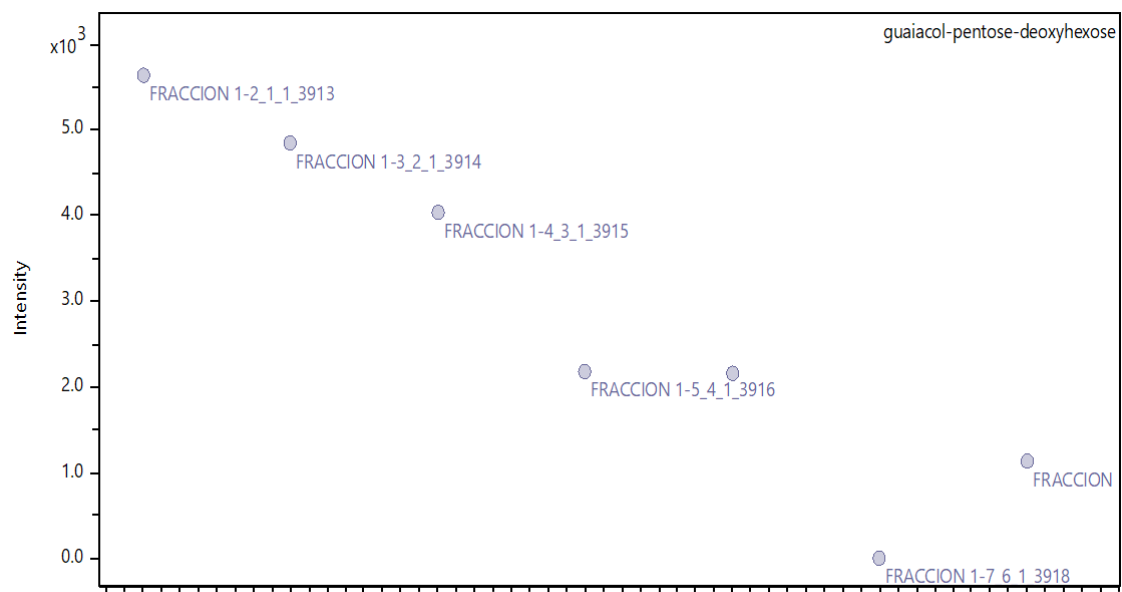
Perfil de intensidad del precursor óxido de linalool-pentosa-hexosa 3 (no.19)



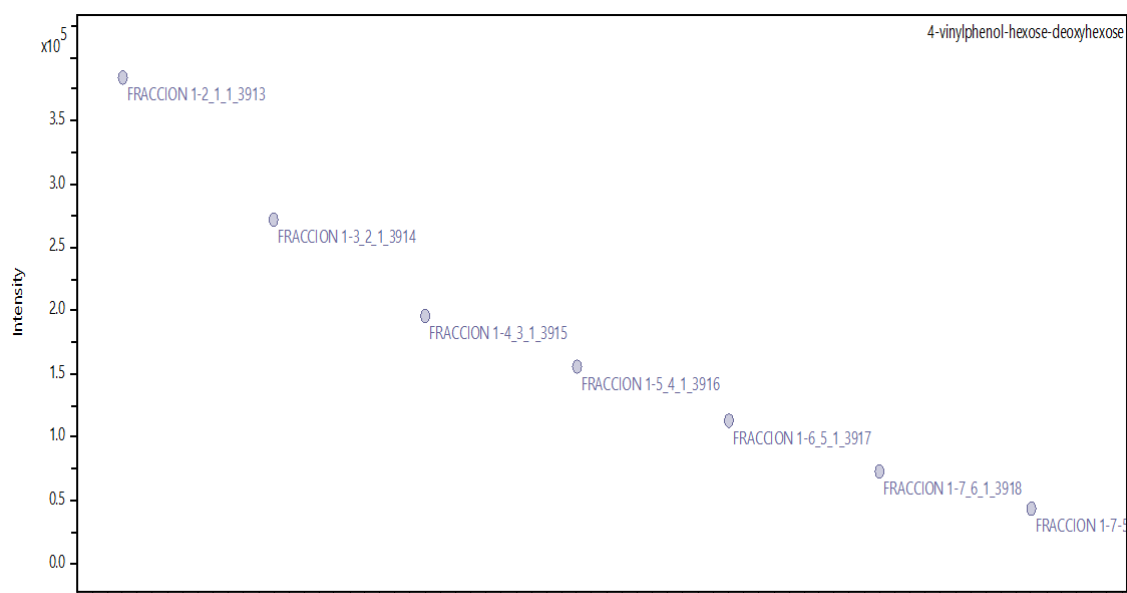
Perfil de intensidad del precursor Riesling acetal-hexosa 2 (no.20)



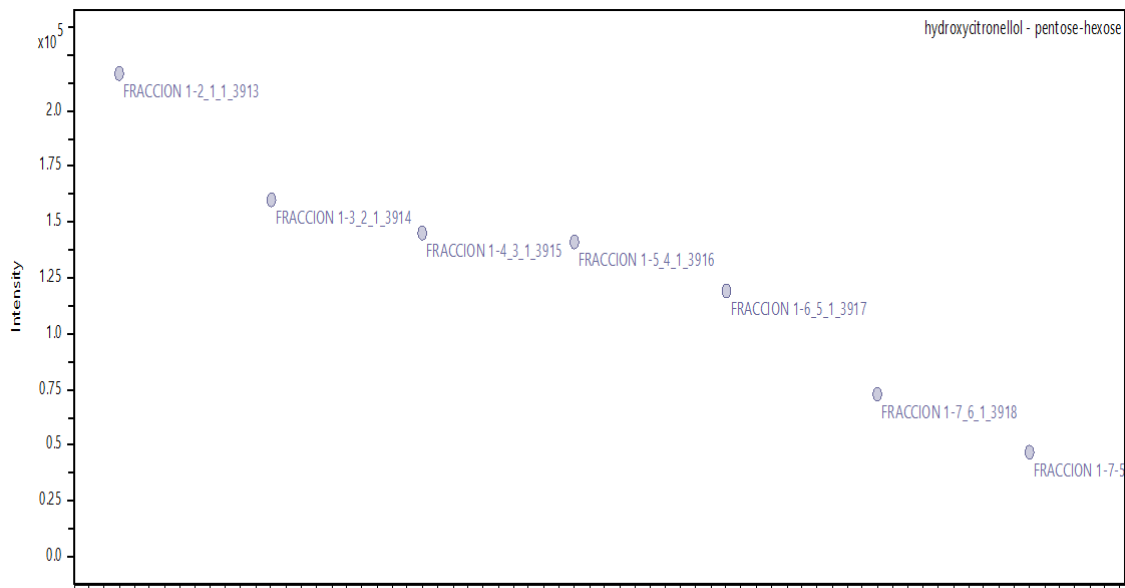
Perfil de intensidad del precursor óxido de linalool-pentosa-hexosa 4 (no.21)



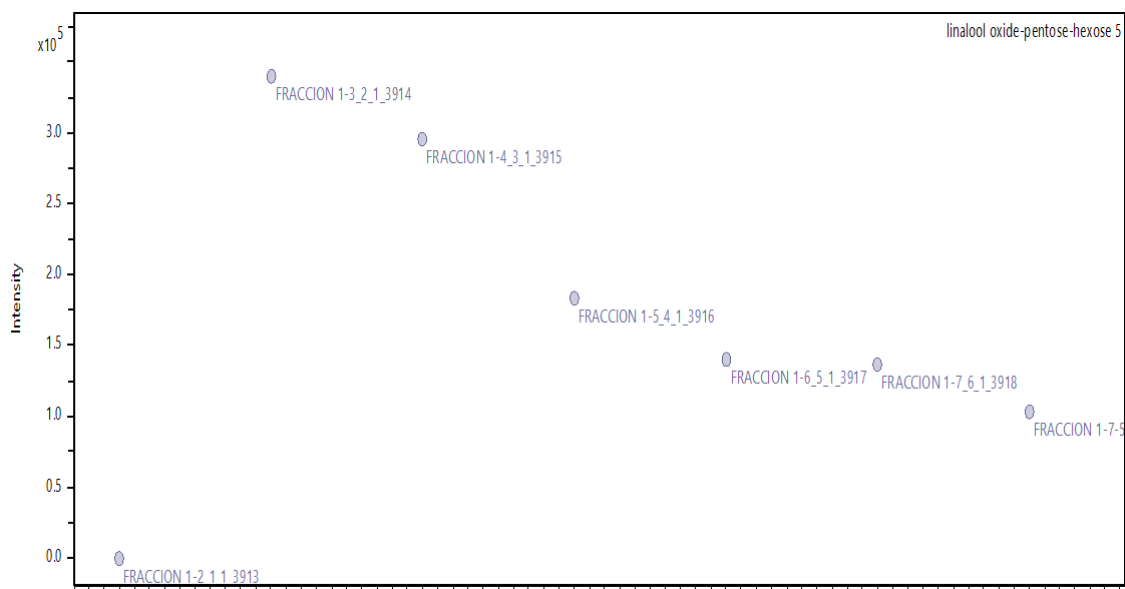
Perfil de intensidad del precursor guaiacol-pentosa-deoxihexosa (no.22)



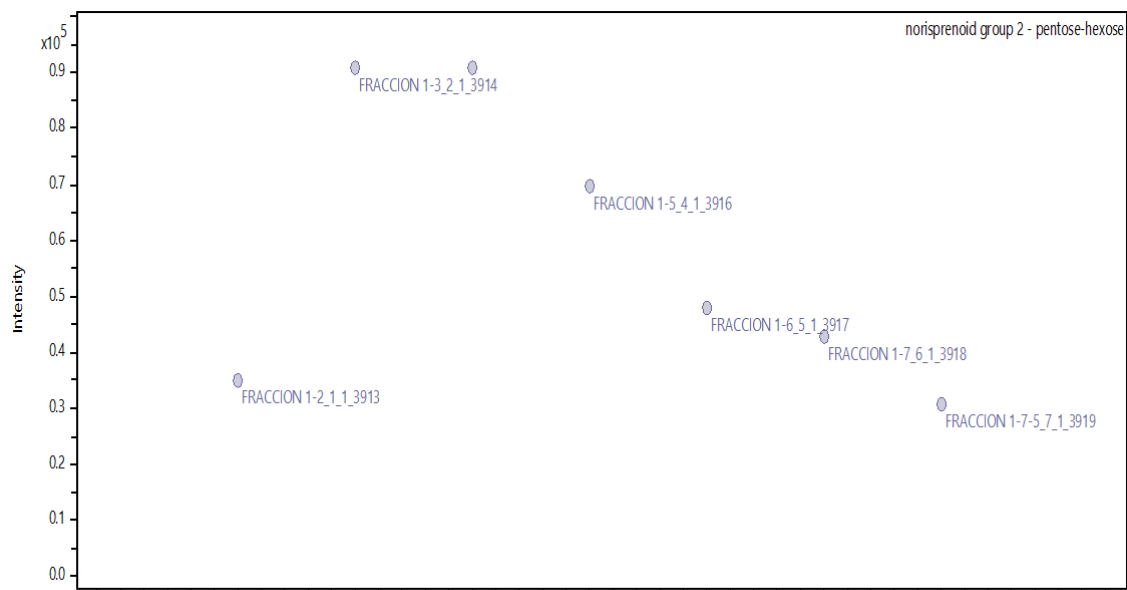
Perfil de intensidad del precursor 4-vinilfenol-hexosa-deoxihexosa (no.23)



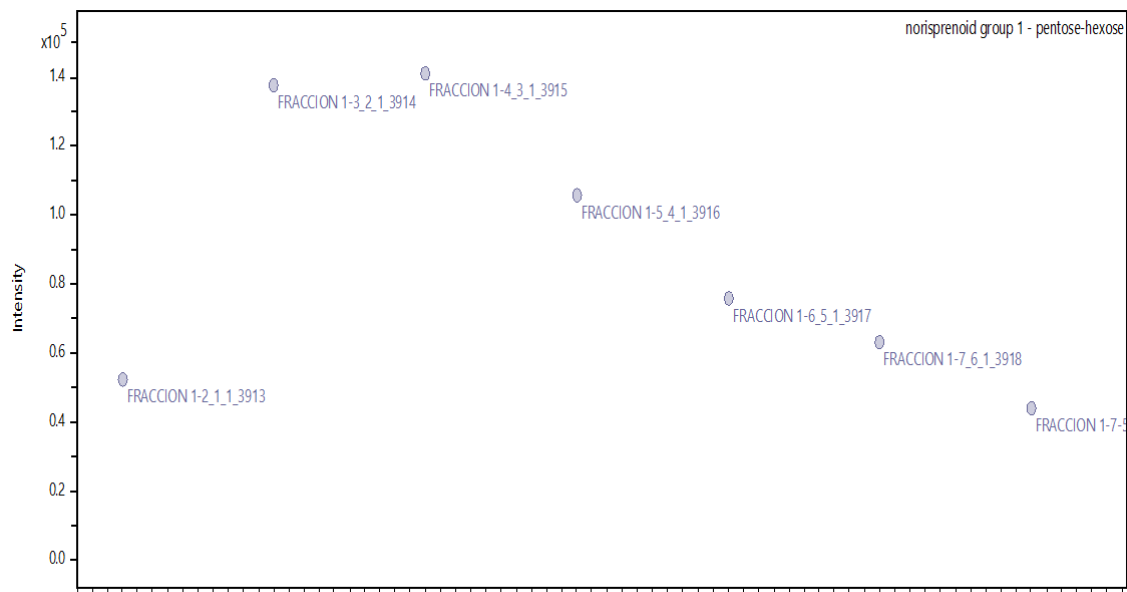
Perfil de intensidad del precursor hidroxycitronelol-pentosa-hexosa (no.24)



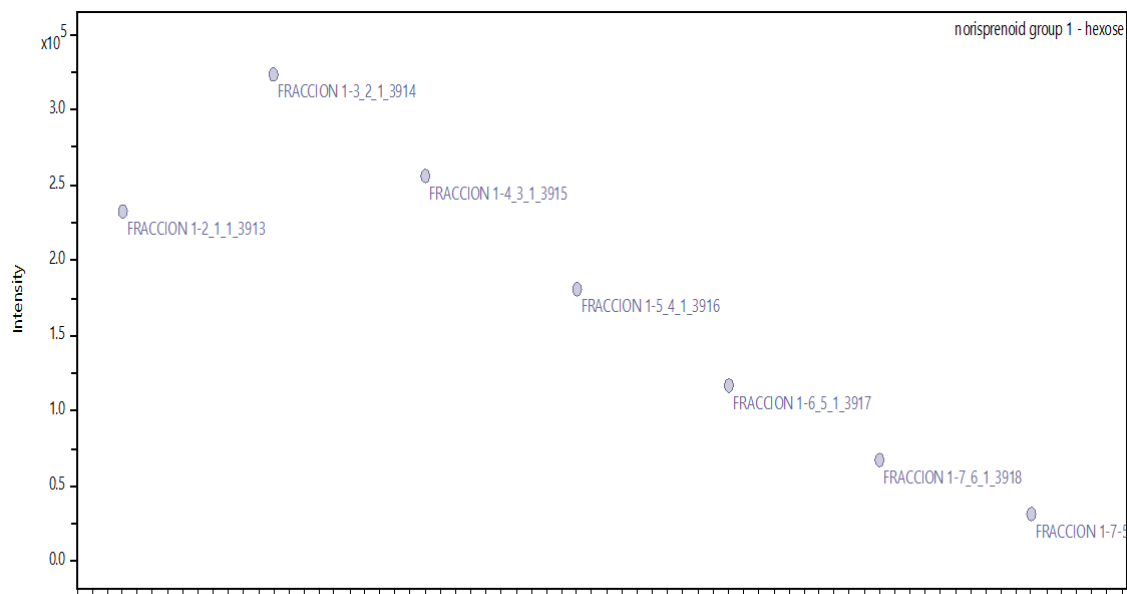
Perfil de intensidad del precursor óxido de linalool-pentosa-hexosa 5 (no.25)



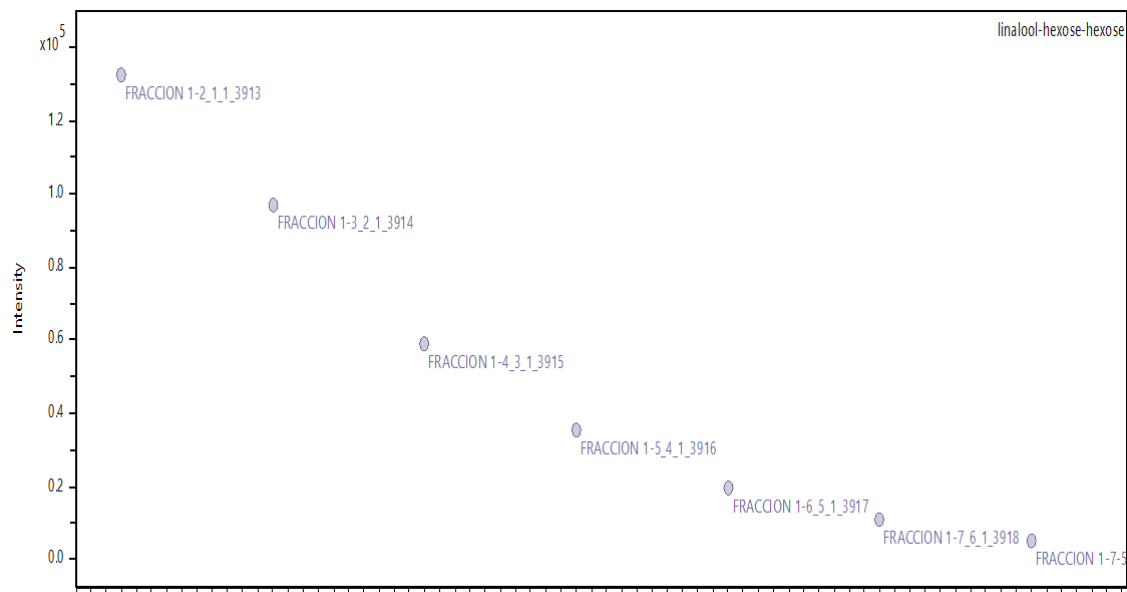
Perfil de intensidad del precursor norisoprenoide grupo 2-pentosa-hexosa (no.26)



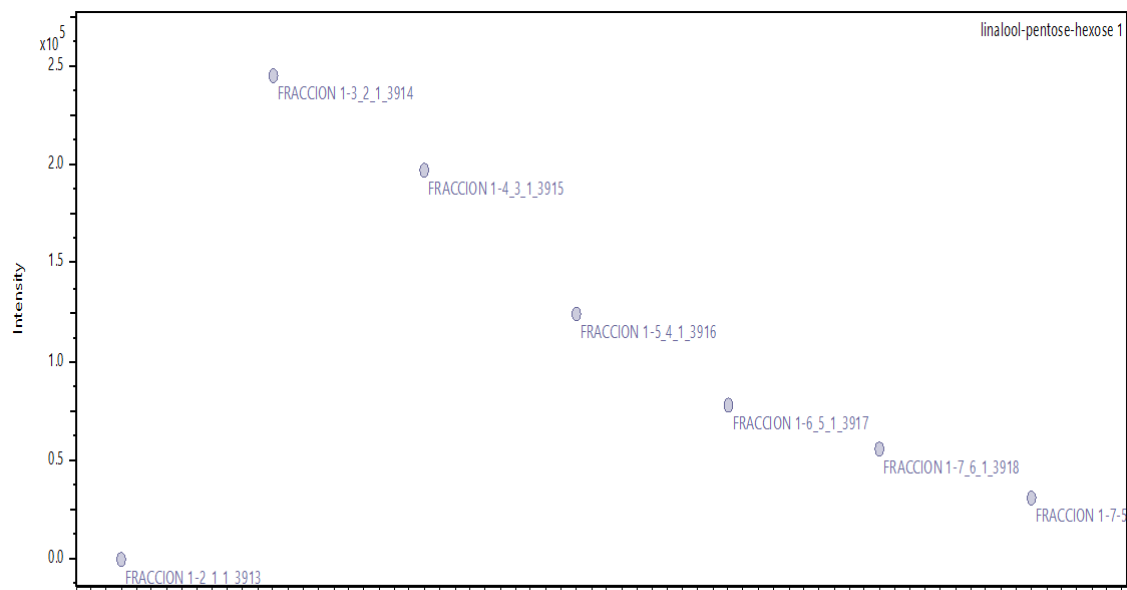
Perfil de intensidad del precursor norisoprenoide grupo 1-pentosa-hexosa (no.27)



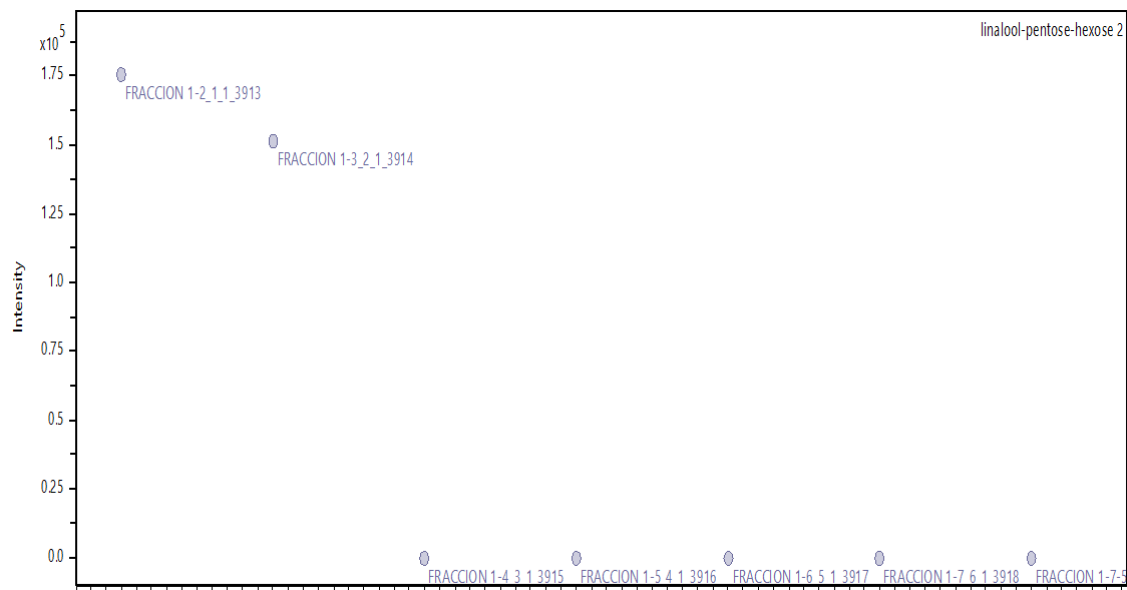
Perfil de intensidad del precursor norisoprenoide grupo 1-hexosa (no.28)



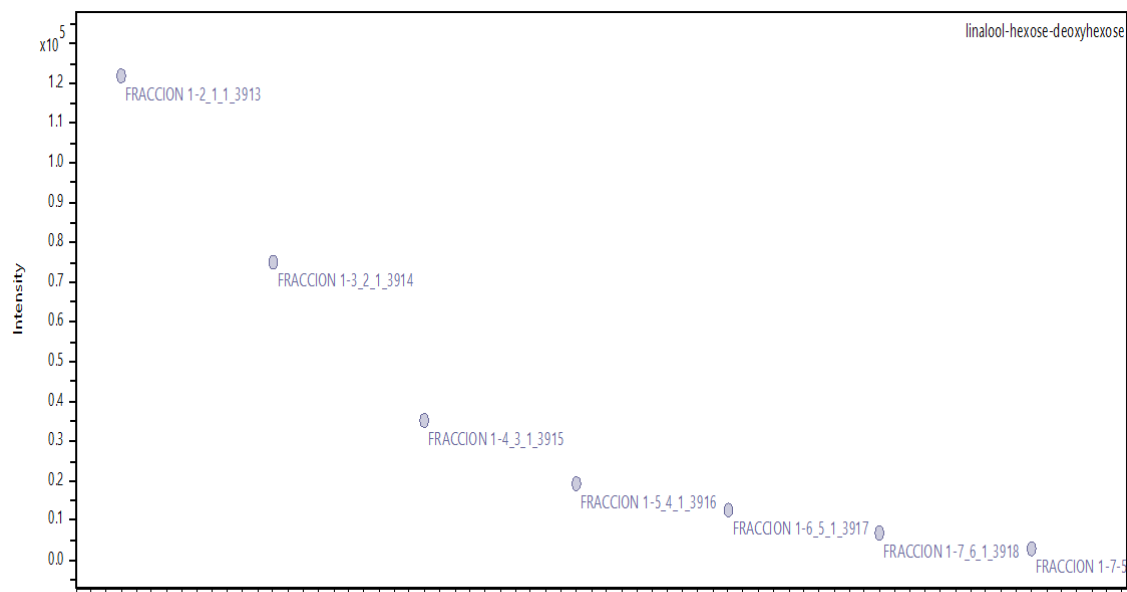
Perfil de intensidad del precursor linalool-hexosa-hexosa (no.29)



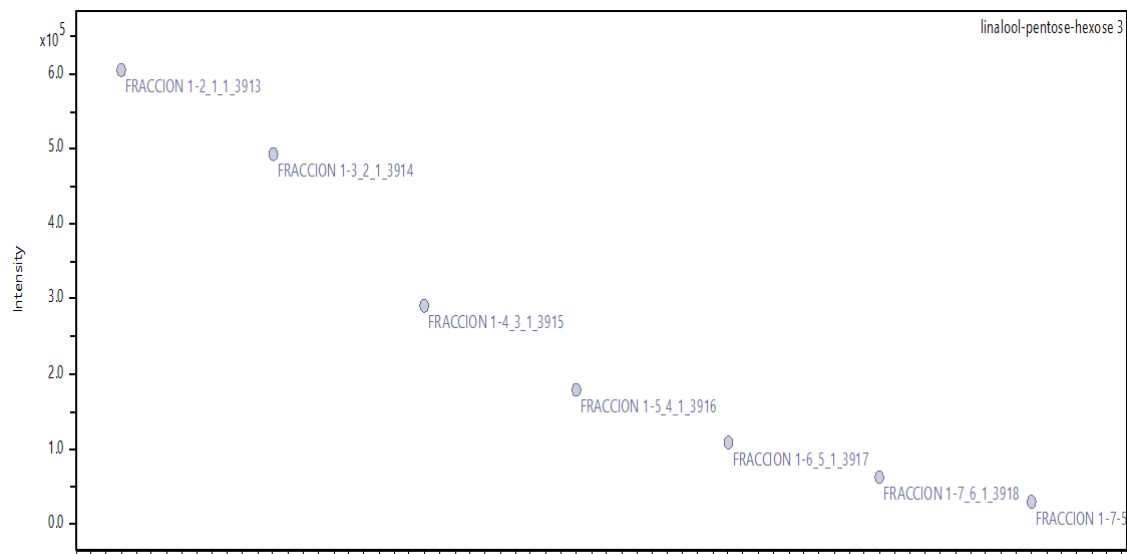
Perfil de intensidad del precursor linalool-pentosa-hexosa 1(no.30)



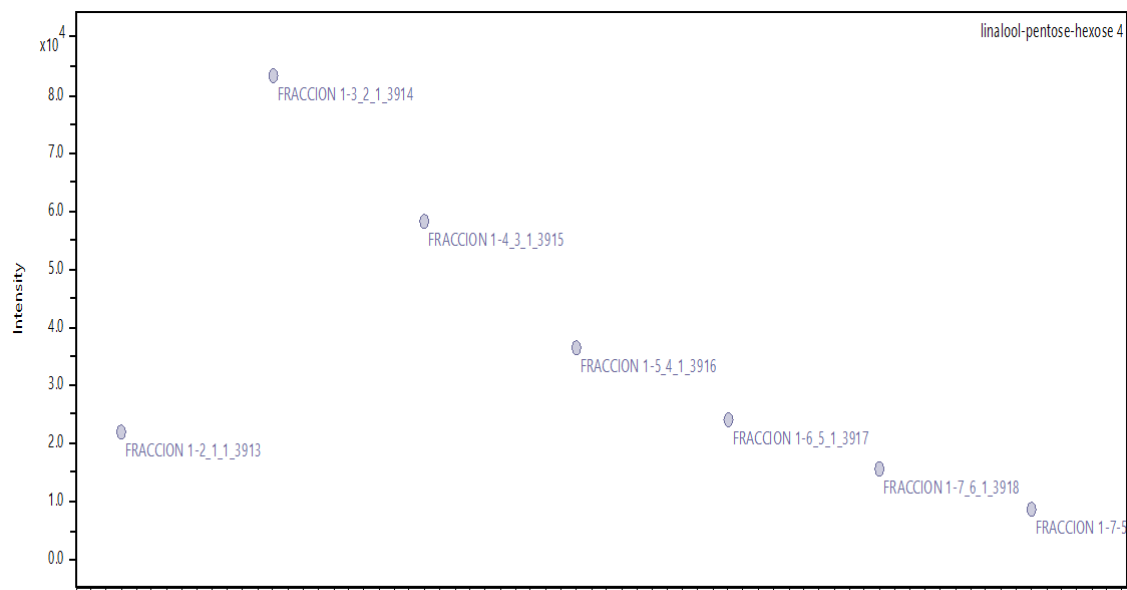
Perfil de intensidad del precursor linalool-pentosa-hexosa 2 (no.31)



Perfil de intensidad del precursor linalool-hexosa-deoxihexosa (no.32)



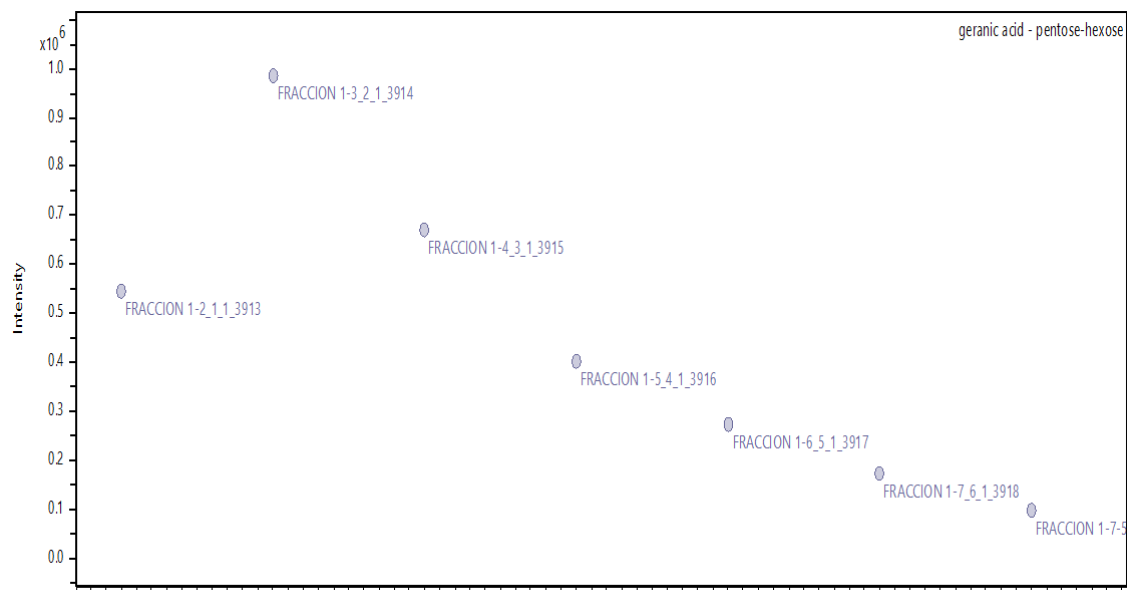
Perfil de intensidad del precursor linalool-pentosa-hexosa 3 (no.33)



Perfil de intensidad del precursor linalool-pentosa-hexosa 4 (no.34)

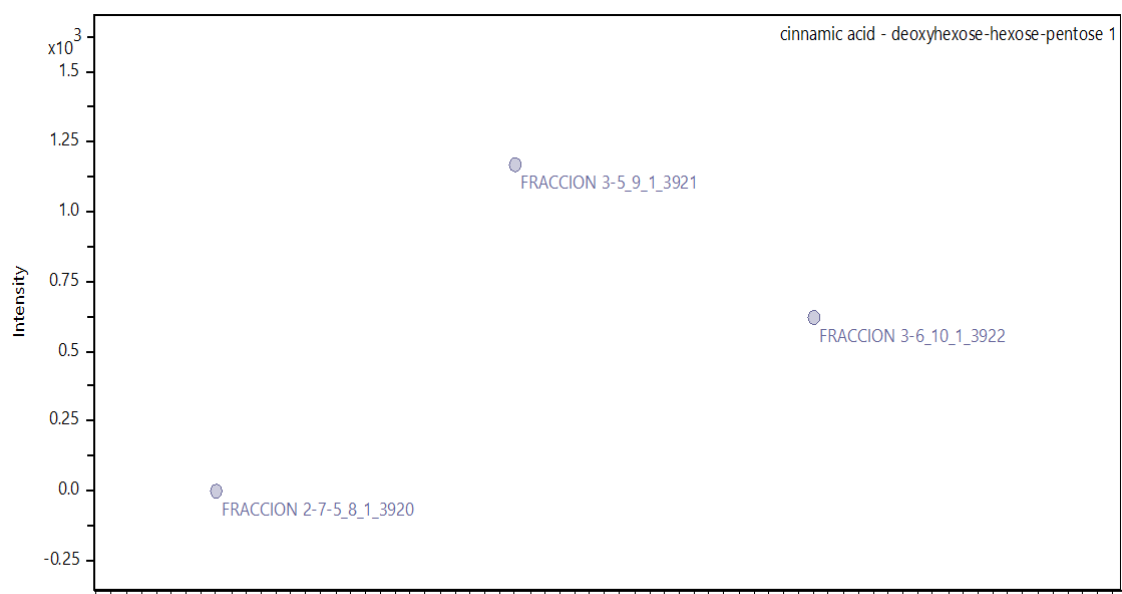


Perfil de intensidad del precursor ácido geránico-hexosa-deoxihexosa (no.35)

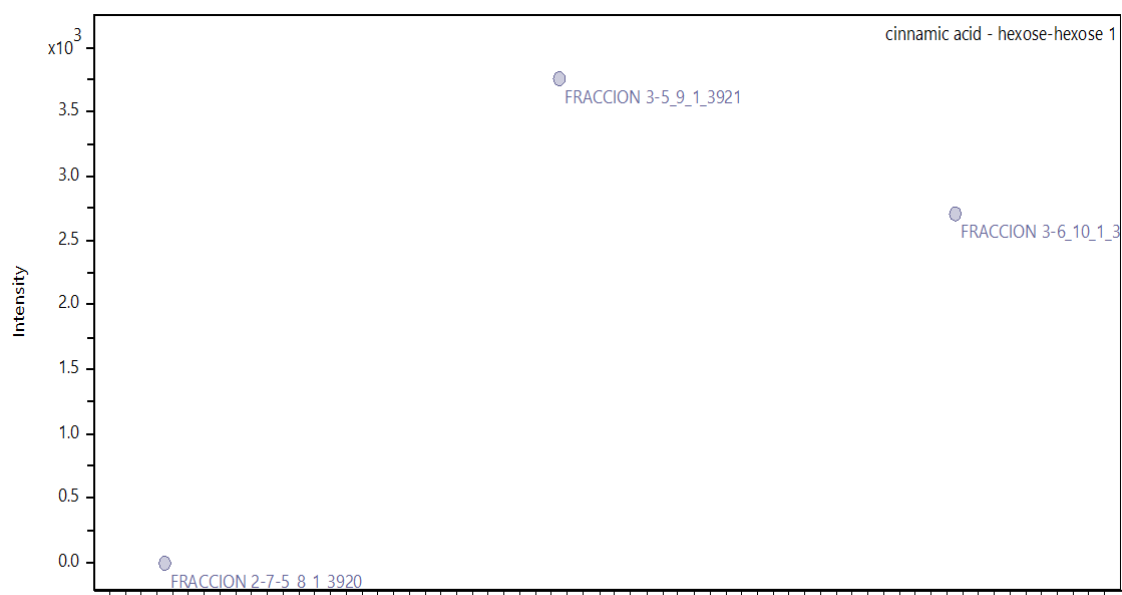


Perfil de intensidad del precursor ácido geránico-pentosa-hexosa (no.36)

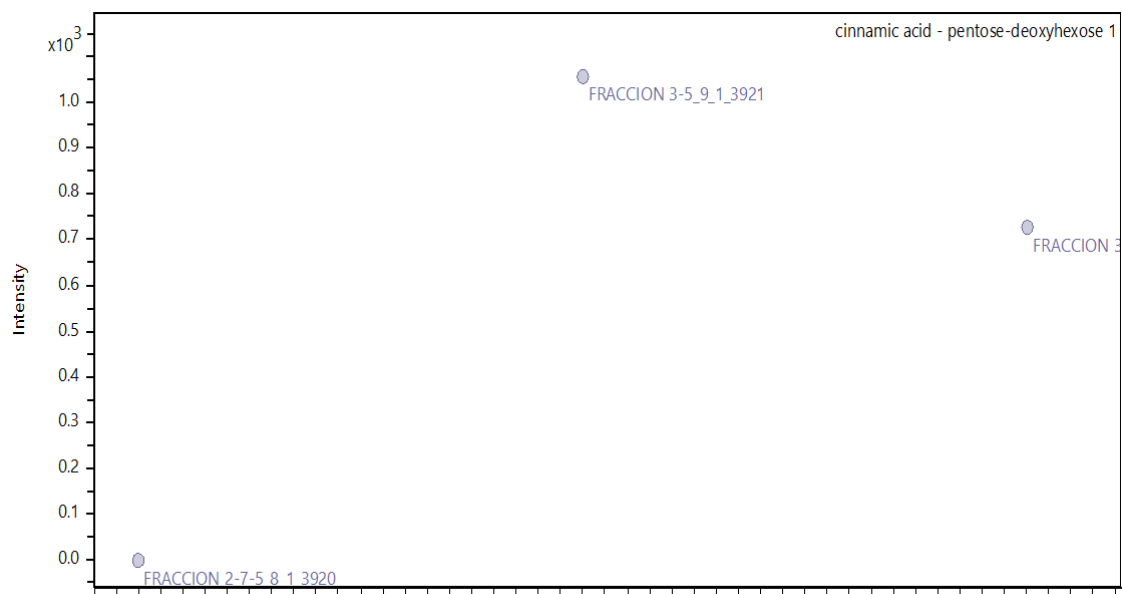
Zona 2



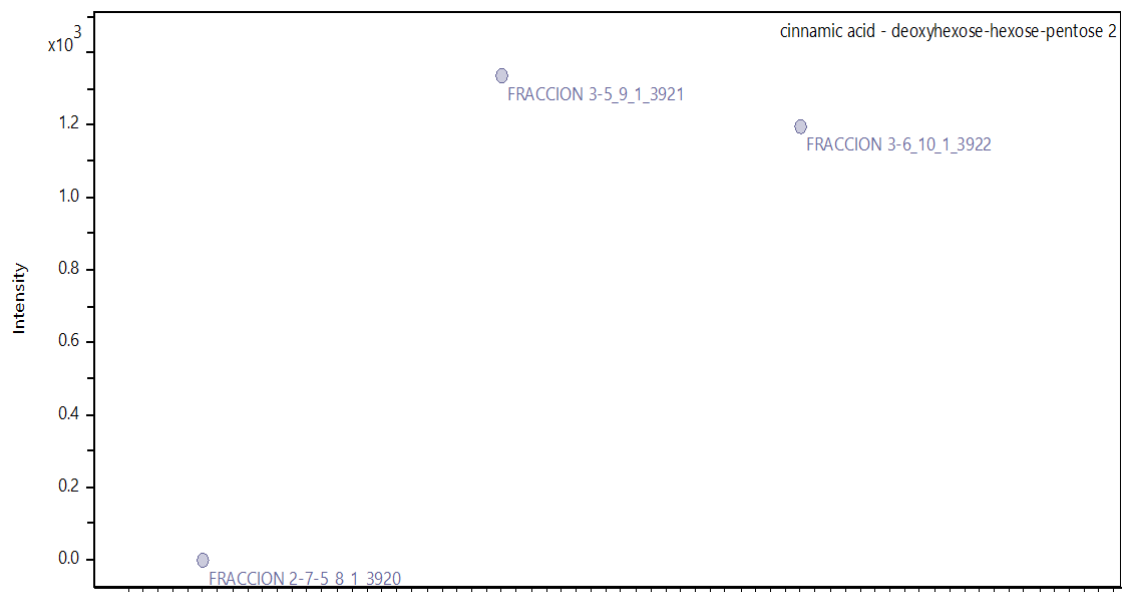
Perfil de intensidad del precursor ácido cinámico-deoxihexosa-hexosa-pentosa 1 (no.37)



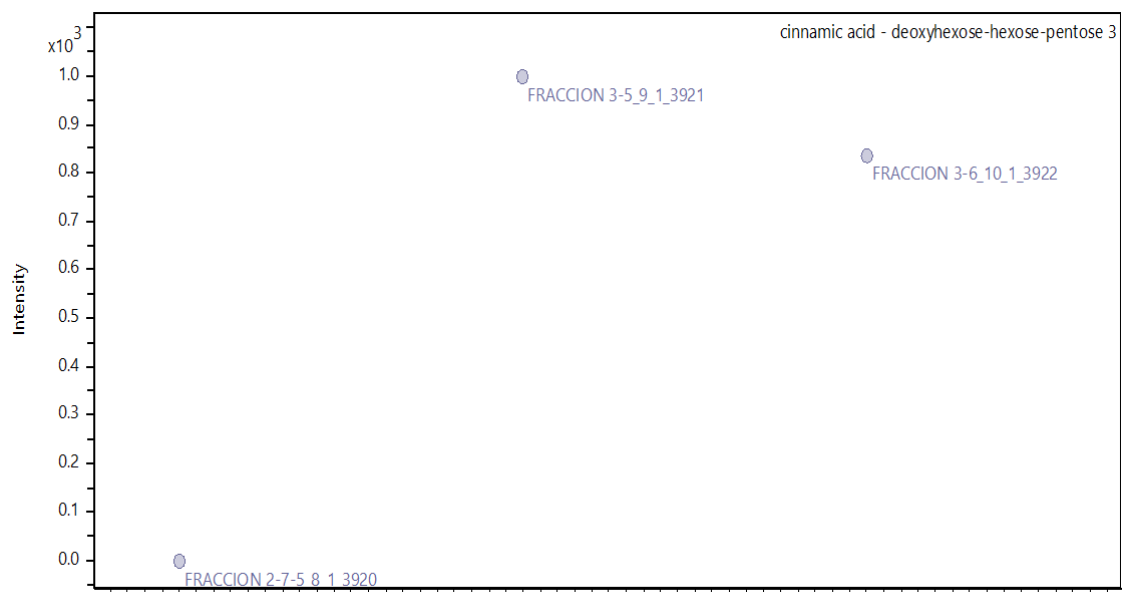
Perfil de intensidad del precursor ácido cinámico-hexosa-hexosa 1 (no.38)



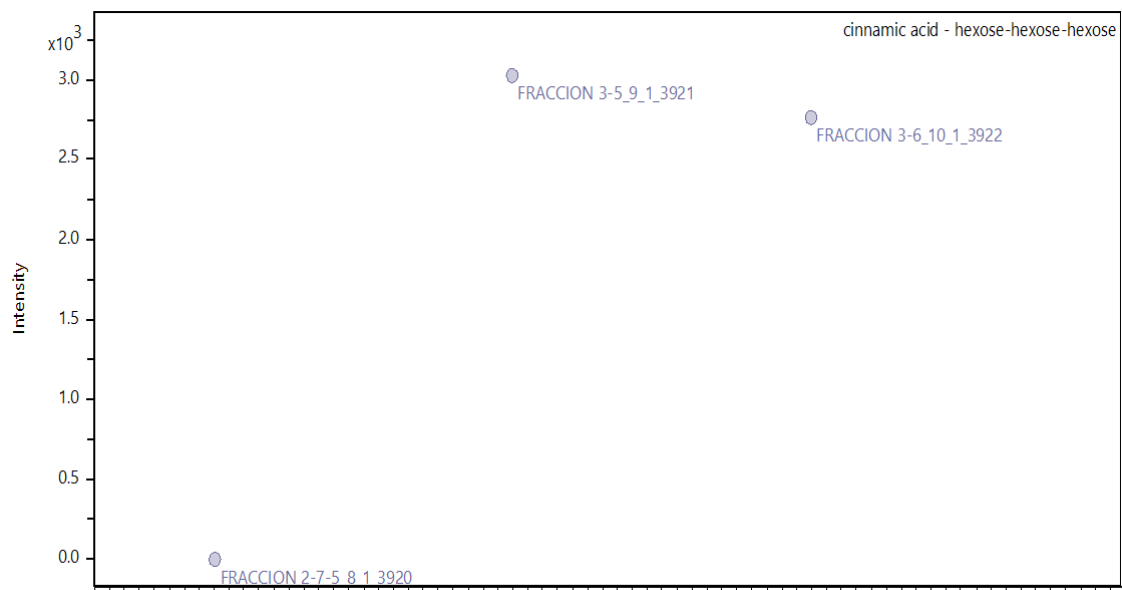
Perfil de intensidad del precursor ácido cinámico-pentosa-deoxihexosa 1 (no.39)



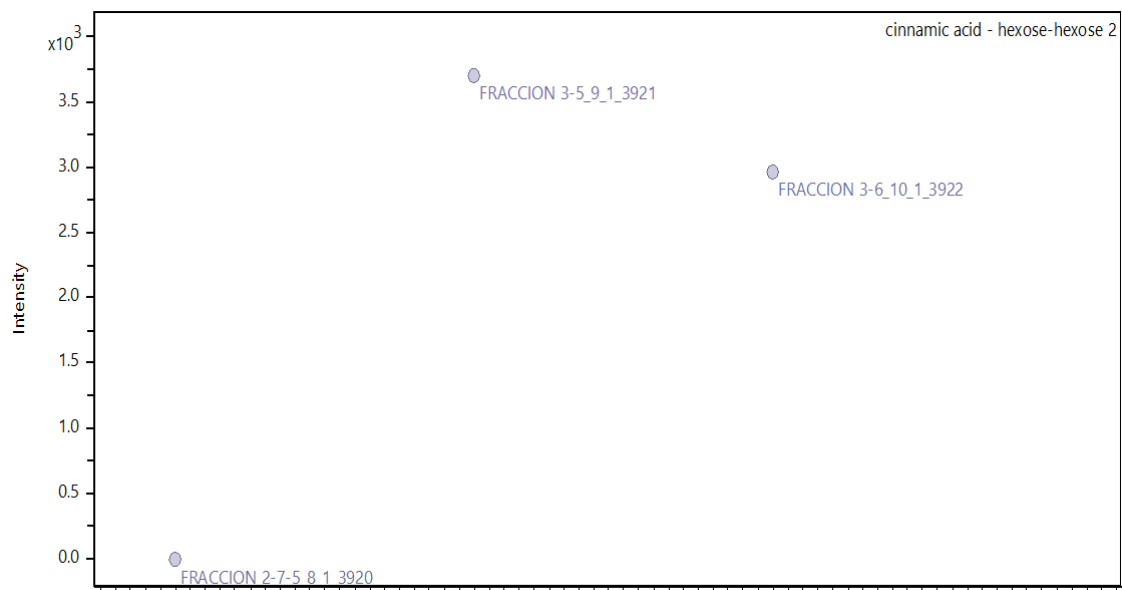
Perfil de intensidad del precursor ácido cinámico-deoxihexosa-hexosa-pentosa 2 (no.40)



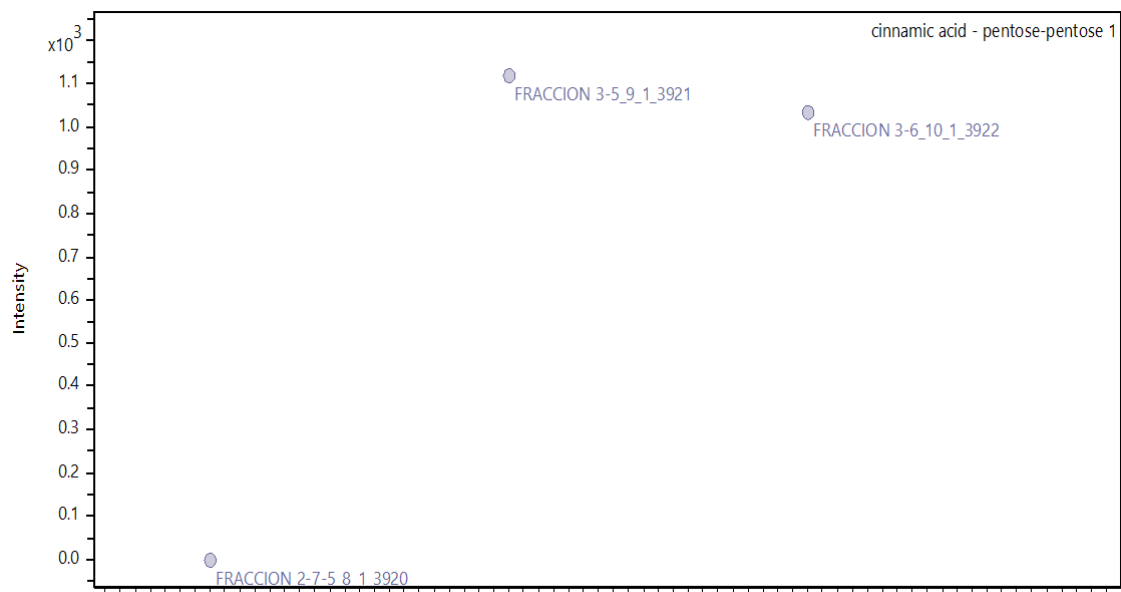
Perfil de intensidad del precursor ácido cinámico-deoxihexosa-hexosa-pentosa 3 (no.41)



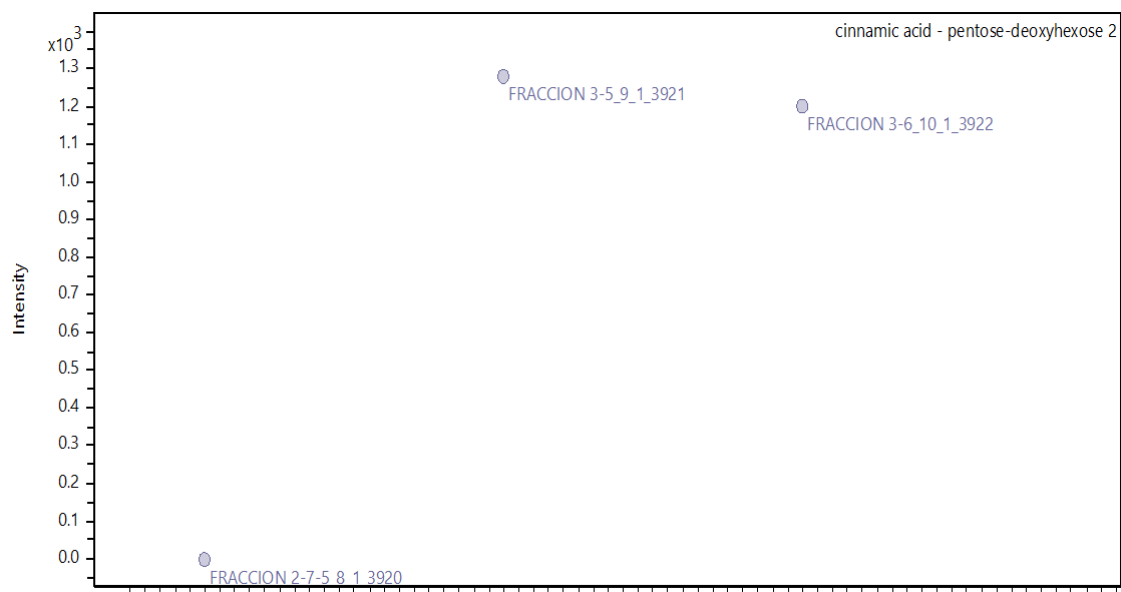
Perfil de intensidad del precursor ácido cinámico-hexosa-hexosa-hexosa (no.42)



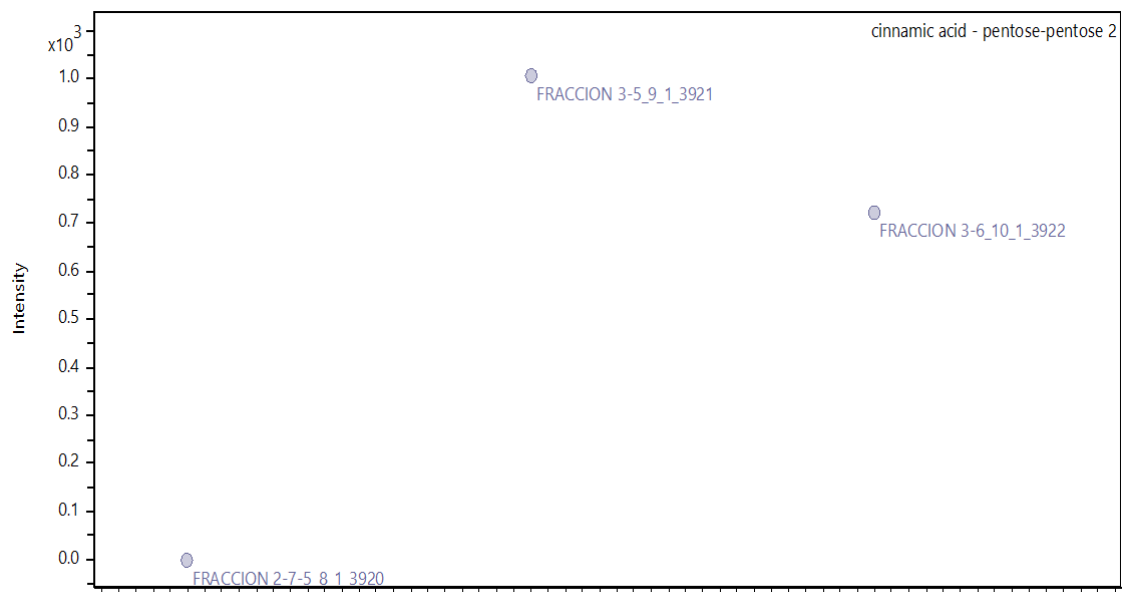
Perfil de intensidad del precursor ácido cinámico-hexosa-hexosa 2 (no.43)



Perfil de intensidad del precursor ácido cinámico-pentosa-pentosa 1 (no.44)

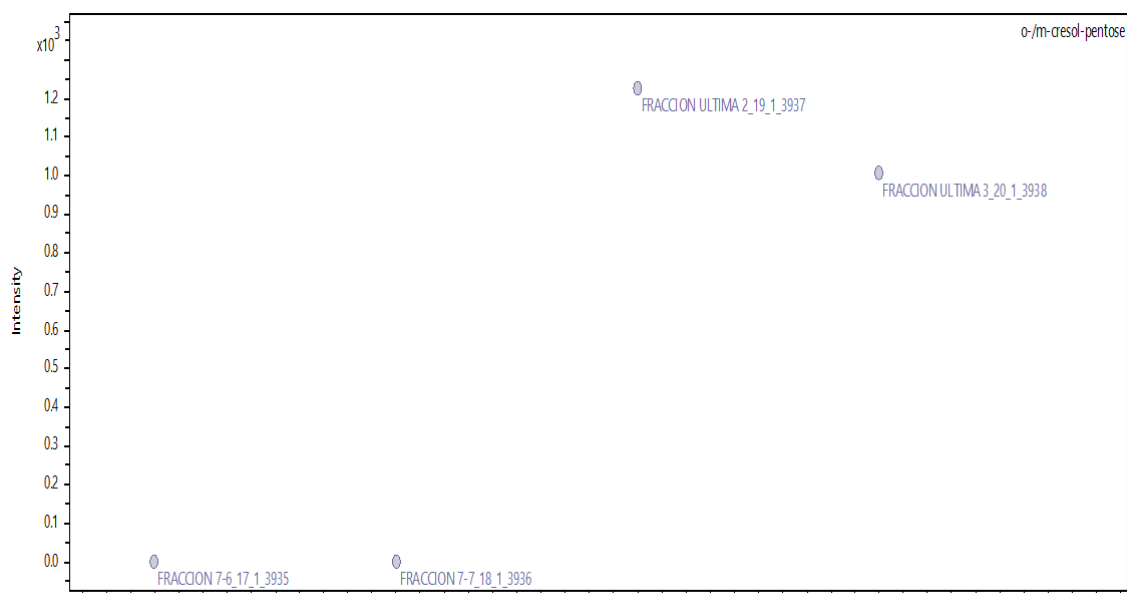


Perfil de intensidad del precursor ácido cinámico-pentosa-deoxihexosa 2 (no.45)

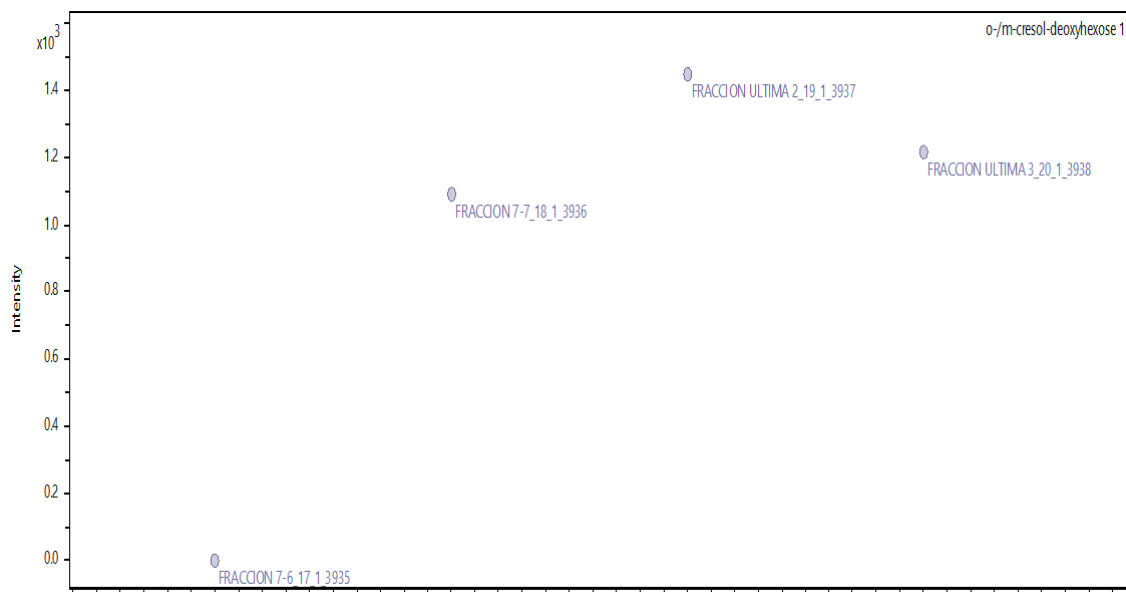


Perfil de intensidad del precursor ácido cinámico-pentosa-pentosa 2 (no.46)

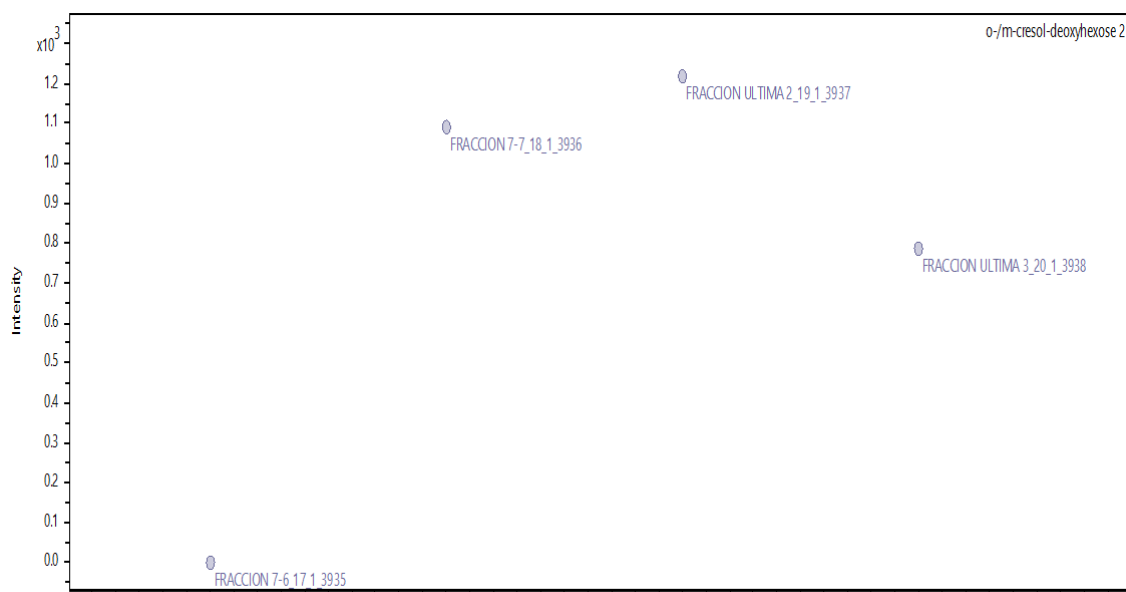
Zona 3



Perfil de intensidad del precursor o-/m-cresol-pentosa (no.47)



Perfil de intensidad del precursor o-/m-cresol-deoxyhexosa 1 (no.48)



Perfil de intensidad del precursor o-/m-cresol-deoxyhexosa 2 (no.49)