

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE  
LA VOLATILIDAD DE LA ISOBUTILMETOXIPIRAZINA.**

**CONSTANZA BELÉN VEGA PÉREZ**

**SANTIAGO – CHILE**  
**2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS POLIFENOLES SOBRE  
LA VOLATILIDAD DE LA ISOBUTILMETOXIPIRAZINA.**

**STUDY OF THE EFFECT OF POLIPHENOLS ON THE  
VOLATILY OF ISOBUTILMETHOXYPIRAZINE.**

**CONSTANZA BELÉN VEGA PÉREZ**

**SANTIAGO – CHILE**  
**2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE POLIFENOLES SOBRE LA  
VOLATILIDAD DE LA ISOBUTILMETOXIPIRAZINA.**

**Memoria para optar al Título  
Profesional de: Ingeniero Agrónomo**

**CONSTANZA BELÉN VEGA PÉREZ**

<b>PROFESOR GUÍA</b>	<b>Calificaciones</b>
<b>Sr. Álvaro Peña Neira Ingeniero Agrónomo-Enólogo, Dr.</b>	<b>6,4</b>
<b>Sr. Felipe Laurie Gleisner Ingeniero Agrónomo-Enólogo, Ph.D</b>	<b>6,0</b>
<b>PROFESORES EVALUADORES</b>	
<b>Sr. Elías Obreque Slier Ingeniero Agrónomo-Enólogo, Dr.</b>	<b>6,5</b>
<b>Sra. Cielo Char Aubry Bioquímica, Mg. Sc. Dr.</b>	<b>6,9</b>

**SANTIAGO – CHILE  
2014**

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Todo proyecto logra ser concluido por una convergencia de situaciones y personas que nos ayudan a lo largo de nuestra vida. Para mí en particular, este proyecto no es solo merito mío, sino también de muchas personas que han cooperado y con quienes he tenido la fortuna de contar.

Quiero dar gracias a Dios y a mi familia, a mis padres, a mis tíos Astrid y José Miguel, a mi prima Josefina, a mi bisabuela y a mis abuelos que siempre creyeron en mí y nunca me han puesto límites cuando de conseguir mis sueños se trata, en especial a mi tata, con quien comparto aquellos almuerzos que despertaron toda mi motivación por ser enóloga. Tía Marta esto también es para ti.

Quiero agradecer también a mi querido departamento de Agroindustria y Enología, porque siempre me he sentido como en casa, en especial a Lily, Laly, Héctor, Anita y Rosy. Muchísimas gracias por toda su disposición y por hacer este camino más fácil para mí. También a mis profesores, Carla Jara, Carmen Prieto, Claudio Pastenes, Eduardo Loyola, Elías Obreque, y Marcela Medel por toda su ayuda y consejos. A mis profesores guías Alvaro Peña y Felipe Laurie por toda su disposición y dedicación a este trabajo, además de escuchar todas mis locuras a lo largo de esta investigación.

Agradezco al Proyecto Fondecyt N° 1110655, OXYGEN AND TANNIN MANAGEMENT FOR COLOR STABILIZATION, VEGETAL CHARACTER REDUCTION AND PALATE DEVELOPMENT OF RED WINES, por el financiamiento de esta investigación.

Quiero agradecer a mis amigos por darme todo el apoyo que siempre he necesitado, a Verónica, Karina, Gaby y Paulina por ser mis confidentes, a mis amigos Guillermo, Sergio, y a mis queridos instructores Carlos y Marcelo, por cuidarme y enseñarme desde niña a ser perseverante en conseguir mis metas, es algo que les agradeceré siempre.

También quiero compartir esto con quienes me han acompañado y ayudado a conocer la realidad profesional de la enología, al área de elaboración de la CCU, quienes tuvieron la generosidad de compartir conmigo sus conocimientos y a la viña Casas de Bosque, por todo lo que me enseñaron y por la oportunidad de descubrir con ustedes lo maravilloso de ser enóloga y lo mucho que me apasiona.

Y por último, el más importante, a ti Rodolfo, por estar siempre conmigo, por tu apoyo, tu compañía y por todo el amor que me das. Juntos todos nuestros sueños son posibles, este es uno de ellos y aún nos quedan más. A tu familia también, porque siempre me han apoyado y hecho sentir como en casa...

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
Lugar de estudio.....	15
Materiales .....	15
Metodología.....	16
Análisis estadístico.....	23
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
Ensayo 1. Evaluación del efecto de compuestos fenólicos de diferente polaridad, ácido gálico, (+)-catequina sobre la volatilidad de la IBMP. ....	24
Efecto de la dosis de compuestos fenólicos de distinta polaridad sobre la disminución de la volatilidad de la IBMP. ....	24
Efecto de compuestos fenólicos de distinta polaridad según la dosis utilizada sobre la disminución de la volatilidad de la IBMP.....	25
Ensayo 2. Determinación del efecto de la fracción monomérica, oligomérica y polimérica de taninos de un vino del cv. Syrah sobre la volatilidad de la IBMP. ....	27
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>32</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>33</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>39</b>

## **ABREVIATURAS**

<b>ANDEVA</b>	Análisis de Varianza
<b>CG-MS</b>	Cromatógrafo de Gases – Espectrómetro de Masas
<b>cv.</b>	Cultivar
<b>IBMP</b>	Isobutilmetoxipirazina
<b>PD</b>	Pirazina Deuterada (estándar interno)
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SPME</b>	Microextracción en Fase Sólida

## RESUMEN

La calidad de los vinos está determinada por numerosos factores, dentro de los cuales destaca la fracción aromática. Ésta juega un rol fundamental pues en algunos casos puede llegar a determinar la elección del consumidor. Un compuesto aromático de importancia en enología es la Isobutilmetoxipirazina (IBMP), ya que su presencia puede ser considerada positiva o negativa según el tipo de vino donde se encuentre. En el caso de la mayoría de los vinos tintos, es considerada un defecto por su bajo umbral de percepción olfativo y por los descriptores sensoriales que imprime al vino. Debido a lo anterior, se ha planteado el siguiente trabajo, donde se evaluó el efecto de los compuestos fenólicos sobre la volatilidad de compuestos de la familia de las pirazinas, en este caso, de la isobutilmetoxipirazina.

El estudio constó de dos ensayos independientes entre sí. El primero consideró la evaluación del efecto de dos compuestos fenólicos monoméricos (ácido gálico y (+)-catequina) de diferente polaridad y a diferentes concentraciones. El segundo ensayo utilizó fracciones de proantocianidinas de distinta masa molecular (FI: Monómeros, FII: Oligómeros, FIII: Polímeros). En ambos ensayos, se determinó el efecto de los compuestos fenólicos sobre la volatilidad de la IBMP.

La investigación se basó en la interacción existente entre los compuestos fenólicos del vino y la IBMP. Los análisis químicos se realizaron a partir de una solución vínica modelo simplificada sobre la cual se adicionaron diferentes dosis de compuestos fenólicos (según lo dispuesto para cada ensayo) junto a una concentración de IBMP conocida, los cuales reaccionaron durante 30 minutos, para luego medir la variación de concentración entre el control (solución vínica sin el compuesto fenólico) y la muestra antes mencionada mediante cromatografía gaseosa acoplada a un detector de masas GC-MS.

Los resultados obtenidos demuestran que existe no sólo una interacción entre los polifenoles y el compuesto aromáticos, sino que también en algunos casos, existe disminución de la concentración de la IBMP y por ende de su volatilidad. Como resultado del primer ensayo, fue posible observar que ambos compuestos tuvieron un efecto en la reducción de la concentración del compuesto aromático, siendo más efectiva en bajas dosis la acción de la (+)-catequina, mientras que en las dosis más altas, tuvo un mayor impacto la utilización de ácido gálico. Para el segundo ensayo, donde se midió el efecto de las diferentes fracciones de taninos, los resultados indican que las fracciones FII y FIII son las que tuvieron efecto sobre la disminución de la concentración de la IBMP.

Si bien aún no existe una respuesta concreta a cuál es la reacción responsable de dicho efecto, la evidencia apunta a que se trataría de un efecto de retención debido a la interacción entre fenoles y el compuesto aromático; o bien, como resultado de un proceso oxidativo, derivado de la interacción de estos compuestos, la cual terminaría en la ruptura del anillo aromático y por ende la eliminación de una parte de la pirazina del medio vínico.

**Palabras clave:** Pirazinas, GC-MS, flavonoide, no flavonoide, aroma a pimentón verde.

## ABSTRACT

The quality of wine is determined by many factors, among which the aromatic fraction stands out. This fraction plays a fundamental role, because in some cases can determine consumer choice. An aromatic compound that generates controversy is the Isobutylmethoxypyrazine (IBMP), as its presence can be considered positive or negative depending on its concentration and the type of wine. In the case of red wines, it is considered a defect because of their low threshold of olfactory perception and its contribution to vegetal aromas in wine. Due to the prior, and considering, that the chemical matrix of wine, especially their phenolic compounds, may affect the volatility of compounds of the family of pyrazines, is that the following work has been developed.

The study comprised two independent trials. The first assay considered the use of two phenolic compounds (gallic acid and (+)-catechin) with different polarity and different concentrations. The second trial used tannin fractions with different molecular weight (FI: Monomers, FII: Oligomers, FIII: Polymers). In both trials, the effect of phenolic compounds on the volatility of the IBMP was determined.

The research was based on the interaction between the phenolic compounds of wine and IBMP. The Chemical analyzes were performed on a simplified model of wine solution with different doses of phenolic compounds as provided for each test and a known concentration of IBMP, which reacted for 30 minutes. Later, the concentration change between the control (wine solution without the phenolic compound) and the sample was analyzed by gas chromatography coupled to a mass detector GC-MS.

The results demonstrate that not only there is an interaction between polyphenols and aromatic compounds, but also, that in some cases, the IBMP concentration decreased. As a result of the first assay, it was observed that both compounds had an effect in reducing the concentration of the aromatic compound. The action of (+)-catechin was more effective at low doses and the gallic acid had a greater impact at higher doses. For the second assay, the results indicate the FII and FIII tannin fractions had an effect on the decrease of the concentration of the IBMP.

While there is still no concrete answer to what kind of reaction is responsible for this effect, the evidence suggests that it would be a retention effect due to an interaction between phenols and aromatic compound or due to an oxidative process (derivative interaction of these compounds) which end in the breaking of the aromatic ring and then removing a part of the pyrazine of the wine medium.

**Key Words:** Pyrazines, GC-MS, flavonoid, no flavonoid, green pepper aroma.



## INTRODUCCIÓN

La calidad final de los vinos está determinada por un conjunto de componentes, entre los cuales se encuentran los alcoholes, azúcares, ácidos orgánicos, proteínas, sales minerales y compuestos fenólicos. Las zonas geográficas (principalmente suelo y clima) pueden influir en la composición química de la fruta, pero cada variedad posee características únicas asociadas a su tipicidad (Agosin y Belancic, 2006; Narváez, 2010). De este modo, para producir un vino de calidad resulta necesario comprender las características, cualidades y defectos, que poseen las diferentes variedades de uvas y como pueden expresarse armónicamente, o no, en los vinos al momento de su vinificación.

La fracción aromática de las uvas comprende un gran número de compuestos volátiles incluyendo alcoholes, ésteres, ácidos, terpenos, norisoprenoides, tioles, pirazinas y compuestos carbonilos. Las pieles de las bayas contienen más de la mitad del total de compuestos volátiles presentes en la uva. Estos compuestos aromáticos muestran diferentes características como diferente polaridad, solubilidad, volatilidad, estabilidad, oxidación y degradación, entre otras. Dependiendo de su concentración en la matriz vínica y su estructura química, pueden tener diferente impacto sobre el perfil sensorial de los vinos. Así, la composición aromática de las uvas es uno de los factores más importantes que determinan el carácter del vino y su calidad (Canuti *et al.*, 2009; Domínguez y Agosín, 2010; Muñoz-González *et al.*, 2013).

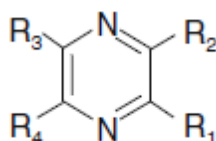
Desde esta perspectiva, la fracción aromática del vino toma un rol fundamental pues en algunos casos puede llegar a determinar la elección del consumidor por un determinado producto. Esto es relevante de considerar debido a que su composición no solo viene determinada desde la materia prima, sino que interviene en su desarrollo además la bioquímica y la tecnología asociadas al proceso productivo. Es así que se pueden distinguir cuatro orígenes: aromas varietales, asociados al cultivar, aromas pre-fermentativos, formados desde la cosecha hasta el principio de la fermentación, aromas fermentativos, dependientes del tipo de levadura utilizados, y finalmente aromas post-fermentativos, formados durante la conservación del vino. Es importante destacar además que es posible modificar la concentración y por ende la calidad de los vinos, mediante prácticas enológicas como la maceración pre-fermentativa o la utilización de cosechas mecanizadas o sistemas de prensado directo, las que favorecen la presencia de remanentes de tallo que pueden modificar la matriz aromática (Agosin y Belancic, 2006; Flanzy, 2000; Medel, 2012; Villarino *et al.*, 2011).

En años recientes la influencia de la matriz no-volátil del vino sobre su aroma ha cobrado cada vez más interés. En tal sentido, se ha observado que compuestos fenólicos monoméricos, abundantes en vinos tintos jóvenes, pueden interactuar con terpenos en soluciones etanólicas, provocando menor expresión del aroma en condiciones *in vitro*. Compuestos como la (+)-catequina y fracciones de taninos pueden propiciar la retención o disminución de la volatilidad de diferentes compuestos aromáticos en la matriz vínica (Dufour y Bayonove, 1999b). Otras interacciones que han sido descritas se asocian al anillo

galoil de algunos compuestos fenólicos y los anillos aromáticos de compuestos responsables del aroma, mediante enlaces  $\pi$ - $\pi$ , es decir enlaces químicos covalentes más bien débiles (Aronson y Ebeler 2004; Jung *et al.*, 2000). Adicionalmente, el tipo y estado de polimerización, que están relacionados con el origen del compuesto fenólico (desde semilla u hollejo), podría estar relacionado con diferentes interacciones con moléculas responsables del aroma (Mitropoulou *et al.*, 2011; Lorrain *et al.*, 2013). La interacción de la matriz no aromática con compuestos responsables del aroma puede incluir además oxidaciones e interacciones hidrofóbicas, entre otras (Pozo Bayón y Reineccius, 2009; Robinson *et al.*, 2009; Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2011; Saenz-Navajas *et al.*, 2010; Dufour y Bayonove 1999a-1999b; Dufour y Sauvaitre, 2000).

Uno de los grupos de compuestos de la matriz no volátil lo constituyen los compuestos fenólicos y un grupo de compuestos de gran relevancia en la calidad aromática de algunos vinos de variedades tintas y blancas lo constituyen las pirazinas, siendo poco conocido el efecto de los primeros, sobre la volatilidad de las segundas.

Las pirazinas son anillos aromáticos monociclos con dos átomos de nitrógeno en posición *para* (Figura 1). Existen diversos sustituyentes en esta estructura general, que dan lugar a diversas pirazinas, existiendo más de 70 en la naturaleza. Entre los sustituyentes se incluyen grupos funcionales oxigenados tales como grupos alcoxi y acil, o grupos sulfurados del tipo tiol o sulfidos. Debido a su baja presión de vapor, las pirazinas se volatilizan fácilmente, siendo responsables de diversos descriptores aromáticos, con muy bajos umbrales de percepción sensorial (Müller y Rappert, 2010).



**Figura 1. Estructura general de las pirazinas, extraída de Müller y Rappert (2010).**

Los aromas vegetales, asociados olfativamente a pimienta verde, espárrago, arveja, betarraga, son responsabilidad directa de las metoxipirazinas, compuestos que se encuentran frecuentemente en vinos del cv. Cabernet Sauvignon, Carménère y Sauvignon blanc. Se ha sugerido que las metoxipirazinas cumplen un rol biológico tanto en vegetales como en el reino animal, el cual estaría asociado a una función de defensa química frente a los potenciales predadores, o bien en el caso particular de las plantas, un indicador de inmadurez para evitar el consumo del fruto y así asegurar la propagación de la especie. Dentro de esta familia de compuestos, la molécula más importante, en función de su distribución y concentración, es la 3-isobutil-2-metoxypirazina (IBMP), cuyo umbral de detección sensorial es extremadamente baja, 2 ng/L en agua destilada y cercano a 10 ng/L promedio en vino (Agosin y Belancic, 2006; Dunlevy *et al.*, 2013; Ebeler y Thorngate, 2009; Flanzly, 2000).

Su distintivo aroma a pimentón verde es considerado importante para el estilo marcado de los vinos del cv. Sauvignon blanc, sin embargo, en otras variedades, las altas concentraciones obtenidas pueden ser abrumadoras y desagradables para el consumidor. Particularmente en Carménère, cuando es cosechada de manera precoz, se exacerban las notas herbáceas propias de la variedad consideradas defecto, y que no solo recuerdan aromas herbáceos, sino también olores a “bodega”, y a papa (Allen y Lacey, 1995; Agosin y Belancic, 2006; Flanzy, 2000; Pszczolkowski, 2004; Rajchl *et al.*, 2009).

Poco se conoce sobre las reacciones asociadas a la degradación de pirazinas. Según Müller y Rappert (2010), estudiando la degradación de pirazinas por bacterias, se observa una hidroxilación de la molécula de pirazina, con una posterior oxidación y ruptura del anillo (lo que se confirma al no haber respuesta en el rango UV/Vis y a la presencia de amonio residual en el medio), lo que deja en evidencia la necesidad de la presencia de oxígeno para que la reacción de degradación oxidativa ocurra.

Ampliando el campo investigativo existen algunos autores que afirman que la disminución de la IBMP en la matriz vínica estaría asociada a procesos oxidativos como los descritos por Fedrizzi *et al.* (2011), donde los compuestos fenólicos juegan un rol fundamental en la modificación de la gama aromática de los vinos no solo en el proceso de crianza sino también a lo largo del tiempo. Ugliano (2013) sostiene al respecto que el oxígeno modula reacciones entre compuestos aromáticos y componentes no volátiles, las cuales pueden resultar en la formación o degradación de un amplio número de compuestos aromáticos, aunque dicho efecto no se encuentra descrito para todos los compuestos aromáticos existentes en el medio vínico.

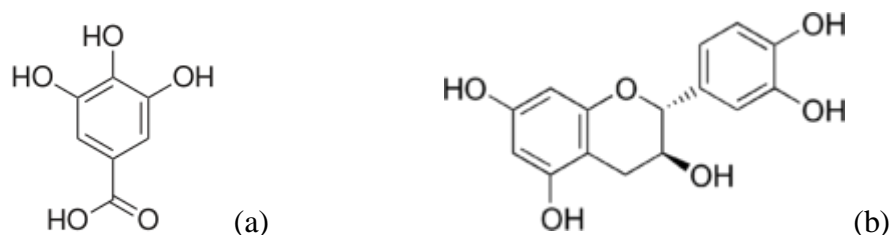
Actualmente el conocimiento en relación a la concentración de las pirazinas, no es suficiente para predecir el efecto sensorial que se observará en el vino. Esto se debe en alguna medida a la posible existencia de ciertas interacciones físicas o químicas entre los aromas y la matriz de componentes no volátiles de los vinos, que influyen en su volatilidad y percepción (Aronson y Ebeler, 2004).

El oxígeno juega un rol relevante en el desarrollo del color, aroma y otras propiedades sensoriales en vinos tintos y blancos. Desde esta perspectiva, los procesos oxidativos son considerados un fenómeno crucial en la elaboración desde la cosecha hasta su guarda (Fedrizzi *et al.*, 2011).

De acuerdo con Waterhouse y Laurie (2006), la oxidación es el proceso químico en el cual un electrón es removido desde un átomo, o grupo de átomos a través de reacciones que pueden o no involucrar la adición de oxígeno o pérdida de hidrógeno. En el vino, los compuestos fenólicos son los primeros reactantes que son oxidados en presencia de oxígeno, proceso que inicia una cascada de transformaciones químicas. Las reacciones de oxidación son catalizadas por metales de transición tales como cobre y hierro. El proceso implica inicialmente la formación de un radical semiquinona, el cual es posteriormente oxidado a su correspondiente quinona (Mathokina y Kilmartin, 2013).

No todos los compuestos fenólicos presentan el mismo comportamiento oxidativo, dadas las diferencias en sus estructuras químicas. En un estudio sobre el impacto de entre otros factores los compuestos fenólicos (antocianos y (+)-catequina) sobre el 3-mercaptohexanol en vinos tintos, compuesto responsable de aromas a fruta en vinos de los cvs. Cabernet Sauvignon, Cabernet franc y Merlot, Blanchard *et al.* (2004) señalan que mientras la (+)-catequina (500 mg/L) generó una rápida disminución del 3-mercaptohexanol, las antocianinas (200 mg/L) limitaban la disminución de este tiol de origen varietal. De acuerdo a estos autores, la (+)-catequina se oxida fácilmente a quinona cuando es expuesta al aire. Las *o*-quinonas son potentes agentes oxidantes y fuertemente electrofílicos, pudiendo reaccionar fácilmente con tioles mediante la reacción de adición de Michael. Por una serie de reacciones acopladas, las *o*-quinonas, pueden generar peróxidos, conocidos por sus propiedades oxidativas sobre tioles. La disminución del 3-mercaptohexanol en presencia de (+)-catequina, podría deberse a una o ambas reacciones. En el caso de los antocianos (salvo la cianidina-3-glucósido y delphinidina-3-glucósido, que presentan formas de quinona y semiquinona en ambientes oxidativos), el efecto protector en la disminución de la concentración de 3-mercaptohexanol se debería al reconocido efecto antioxidante que presenta este grupo de compuestos. En relación al ácido gálico y la (+)-catequina (Figura 2), compuestos fenólicos empleados en el presente estudio, corresponden en ambos casos a compuestos con grupos *orto*-difenoles, fácilmente oxidables (Kilmartin *et al.*, 2001).

En relación a la polaridad de ambos compuestos, asociada a su orden de elución en análisis por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP), es posible señalar que el ácido gálico es más polar que la (+)-catequina, lo que puede implicar diferencias en su solubilidad, así como una reactividad con otros compuestos diferente para ambos compuestos.



**Figura 2. (a) Ácido gálico y (b) (+)-catequina**

Existe poca investigación sobre la interacción entre compuestos aromáticos y la matriz constituyente del vino. Dufour y Bayonove (1999b) confirmaron la existencia de interacciones hidrofóbicas entre catequinas y algunos tipos de compuestos aromáticos. Mientras en un estudio más reciente se observó que el ácido gálico (10 mM) causaba la disminución en la volatilidad de la 2-metoxipirazina, en tanto el flavonol naringenina a la misma concentración tenía un mínimo efecto (Aronson y Ebeler, 2004).

Según Dufour y Bayonove (1999b), al aumentar la concentración de (+)-catequina en soluciones modelo, desde 1 a 12 g/L, la volatilidad de cuatro compuestos aromáticos

presentes en los vinos (limoneno, benzaldehído, isoamil acetato y etil-hexanoato) disminuyeron.

Otra parte de la compleja matriz del vino, la componen también las proantocianidinas o taninos condensados que se encuentran localizados en las partes sólidas de la baya. Estos compuestos pertenecen al grupo de los flavanoles, cuya familia está compuesta por diferentes formas isoméricas de la (+)-catequina y sus polímeros. La cantidad, composición y grado de polimerización de los taninos condensados difiere entre la piel de la baya y las semillas. Así, aquellos taninos originados en la piel tienen mayor grado de polimerización que los de semillas. Algunos autores han señalado que el grado de polimerización y galoilación de los taninos condensados son importantes variables estructurales que afectarían la percepción de la astringencia y podrían afectar por ende, su interacción con otro tipo de compuestos. Respecto a las fracciones de taninos del vino, diversos autores indican la existencia de un orden de concentración en vinos tintos; FIII (Polimérica) > FII (Oligomérica) > FI (Monomérica). Este orden se repite en diversos cultivares como Cabernet Sauvignon, Carménère, Malbec, Syrah, Tempranillo y Graciano (Agosin *et al.*, 2007; Cáceres, 2013; Fanzone, 2012; Monagas *et al.*, 2003; Obreque-Slier, 2010). Este orden puede extrapolarse también a vinos blancos del cultivar Sauvignon Blanc, según lo documentado por Cáceres (2013).

En relación a lo anterior es que han sido estudiadas también las interacciones entre los taninos condensados del vino y sus aromas, observando resultados que varían según el aroma en que ha sido estudiado. Para el caso del limoneno, la presencia de taninos contribuyó a incrementar su volatilidad, mientras que en el benzaldehído se vio disminuida (Dufour y Bayonove, 1999). Desde esta perspectiva se hace interesante evaluar el efecto de estas distintas fracciones de taninos, puesto que la concentración de cada fracción y su diferente grado de polimerización pueden mostrar eventualmente diferentes efectos para un mismo compuesto aromático, como la IBMP.

Debido a la escasa información existente sobre el efecto de los compuestos fenólicos y más específicamente de compuestos flavonoides, no flavonoides y las fracciones de taninos presentes en un vino sobre la volatilidad de la IBMP es que se planteó el presente estudio.

### **Objetivo general**

Determinar el efecto de compuestos fenólicos sobre la volatilidad de IBPM en una solución modelo de vino, determinado a partir de la concentración de pirazinas en medio gaseoso.

### **Objetivos específicos**

- Comparar el efecto de dos compuestos fenólicos de distinta polaridad (ácido gálico y (+)-catequina) y en distintas concentraciones sobre la volatilidad de la IBMP en una solución modelo de vino.
- Determinar el efecto de la fracción monomérica, oligomérica y polimérica de taninos, de un vino tinto Syrah sobre la volatilidad de la IBMP en una solución modelo de vino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de estudio

Los análisis se realizaron en los Laboratorios de Química Enológica y de Cromatografía del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

### Materiales

#### Equipamiento

Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases modelo Agilent Technologies 6890 N, acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5975 B Agilent Technologies. La columna corresponde al modelo Agilent Technologies HP – 5NS 30 m x 0,250 mm (30m, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de película).

La fibra utilizada para llevar a cabo la microextracción en fase sólida (SPME), fue del tipo Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano DVB/CAR/PDMS, (50/30 µm, SIGMA, USA).

#### Estándares y reactivos

Las metoxipirazinas sintéticas de las que se dispuso para llevar a cabo los ensayos fueron, 2-isobutil-3 metoxipirazinas, de pureza 99%, (SIGMA, USA) y 2-isobutil 3- metoxi – d3- pirazina estándar interno (deuterada), de pureza 99%, adquirida en CLUSEAU INFO LABO, (FRANCIA).

Los estándares de compuestos fenólicos que fueron adquiridos para este estudio son, ácido gálico de pureza 98,5% (SIGMA, USA) y (+)-catequina de pureza 99,8% (SIGMA, USA).

El vino del cv. Syrah de la vendimia 2012, varietal y sin uso de madera en su elaboración, utilizado para la obtención de las diferentes fracciones de taninos, fue donado por Viña Carmen. Este vino fue caracterizado químicamente en forma previa y sus resultados se encuentran disponibles en el Apéndice I.

## **Materiales de laboratorio**

### Análisis pirazinas

- Viales ámbar, 15 mL, Supelco, SIGMA-ALDRICH, USA.
- Bitartrato de potasio, adquirido en Winckler Ltda, Santiago, Chile.
- Matraces ámbar 10 mL, Duran, adquiridos a Merck, Darmstadt, Alemania.
- Matraces ámbar 100 mL, Duran, adquiridos a Merck, Darmstadt, Alemania.
- Cloruro de sódio para análisis, EMSURE® ACS,ISO,Reag. pH Eur, Merck, Darmstadt, Alemania.

### Fraccionamiento

- Metanol grado gradiente para cromatografía en fase líquida LiChrosolv® Reag. pH Eur, Merck, Darmstadt, Alemania.
- Etanol absoluto para análisis EMSURE® ACS,ISO,Reag. pH Eur, Merck, Darmstadt, Alemania.
- Acetato de etilo para cromatografía en fase líquida LiChrosolv® Reag. Ph Eur, Merck, Darmstadt, Alemania.
- Solución reguladora (fosfato), pH 7, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey, U.S.A
- Sep-Pak Plus tC<sub>18</sub> environmental cartridges (900 mg) and Sep-Pak Plus Short tC<sub>18</sub> cartridges (400 mg) adquiridos a Waters, Milford, California, U.S.A
- Espectrofotómetro UV-VIS Pharmaspec, modelo UV-1700 (Shimadzu, Kyoto, Japón).

## **Metodología**

### **Diseño experimental y tratamientos**

El diseño del experimento constó de dos ensayos independientes entre sí, cada uno con tres repeticiones por tratamiento. A continuación se presentarán en detalle los tratamientos de cada uno de los ensayos a realizar.

Ensayo 1: Se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA), con arreglo factorial de tratamientos, que constó de dos factores: Utilización de compuestos fenólicos de distinta polaridad, y diferentes concentraciones de los mismos, disponiendo de tres niveles para



cada uno respectivamente. Constó de un total de seis tratamientos, a partir de la evaluación de dos factores, los cuales serán expuestos a continuación en la Cuadro 1.

La unidad experimental para el primer ensayo del estudio, consistió en un matraz con 100 mL de la solución mezcla, del cual se obtuvo una unidad muestral de 3,75 mL para la realización del análisis según la metodología utilizada por Gómez (2010).

**Cuadro 1. Ensayo 1.** Evaluación del efecto de compuestos fenólicos de diferente polaridad, ácido gálico y (+)-catequina sobre la volatilidad de la IBMP.

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis de IBMP</b>	<b>Tipo de fenol</b>	<b>Concentración</b>
<b>1</b>			<b>500 mg/L</b>
<b>2</b>	<b>10 ng/L</b>	<b>Ac. gálico</b>	<b>1000 mg/L</b>
<b>3</b>			<b>2000 mg/L</b>
<b>4</b>			<b>500 mg/L</b>
<b>5</b>	<b>10 ng/L</b>	<b>(+)-catequina</b>	<b>1000 mg/L</b>
<b>6</b>			<b>2000 mg/L</b>

Las concentraciones de compuestos fenólicos fueron establecidas por <sup>1</sup>Laurie (2012) en base al aporte de fenoles totales que poseen tres distintos tipos de vino (tintos, rosados y blancos) descritos y caracterizados previamente por Donoso (2001), Narváez (2010) y Zúñiga (2010).

Ensayo 2: Se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA), compuesto por tres tratamientos (diferentes fracciones tánicas: monómeros, oligómeros y polímeros a una sola dosis por compuesto), con tres repeticiones.

Respecto de las concentraciones de las fracciones tánicas (monómeros, oligómeros y polímeros) utilizadas, éstas fueron establecidas en base a mediciones de cuantificación de flavanoles de las distintas fracciones de taninos mediante espectrofotometría (Sun *et al.*, 2006), teniendo como referencia ensayos previos de cuantificación realizados por Narváez (2010) y se presentan en el Cuadro 2.

La unidad experimental para el ensayo 2 del estudio, consistió en un matraz con de 10 mL de la solución mezcla, del cual se obtuvo una unidad muestral de 3,75 mL para la realización del análisis según la metodología utilizada por Gómez (2010).

<sup>1</sup> Laurie. F. (2012). Ph.D. Ingeniero Agrónomo – Enólogo. Profesor de enología, Universidad de Talca. Comunicación personal.

**Cuadro 2: Ensayo 2.** Determinación del efecto de la fracción monomérica, oligomérica y polimérica de taninos del cv. Syrah sobre la volatilidad de la IBMP.

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración de IBMP</b>	<b>Fracción de taninos vino Syrah</b>
<b>1</b>	<b>10 ng/L</b>	<b>Monómeros</b>
<b>2</b>	<b>10 ng/L</b>	<b>Oligómeros</b>
<b>3</b>	<b>10 ng/L</b>	<b>Polímeros</b>

## **Procedimiento**

### Preparación de la solución modelo

Se preparó 1 L de solución hidroalcohólica (12% v/v de etanol), sobre la cual se adicionaron 2 g bitartrato de potasio, a la que se le realizó una corrección de acidez para llegar a un pH de 3,5 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio según el caso. Esto con el fin de representar el 98% aproximadamente de la matriz de un vino, según lo descrito por <sup>2</sup>Laurie (2012). Se preparó solución modelo fresca una vez por semana con el fin de evitar problemas de contaminación, o degradación de compuestos.

### Fraccionamiento

Los fracciones tánicas utilizadas, fueron obtenidas a partir de procesos de fraccionamiento realizados en el laboratorio de Química Enológica y posteriormente cuantificadas, procesos realizados de acuerdo a la metodología propuesta por Sun *et al.* (2006).

El procedimiento resumido por Cáceres (2013), se realizó de la siguiente manera: se tomaron 10 mL de vino del cv. Syrah y se concentraron a sequedad en un evaporador al vacío a menos de 30°C. El extracto obtenido se disolvió en 20 mL de buffer fosfato (67 mM, pH 7,0). El pH de esta solución se ajustó a un pH 7,0 con adición de NaOH o HCl. bajo una atmósfera protegida con nitrógeno. En forma paralela, se preparó el sistema de

<sup>2</sup> Laurie. F. (2012). Ph.D. Ingeniero Agrónomo – Enólogo. Profesor de Enología, Universidad de Talca. Comunicación personal.

SPE constituido por dos cartuchos Sep-Pak tC18 ensamblados en serie (Environmental tC18 (900 mg) en la parte superior y Short tC18 (400 mg) en la parte inferior), los cuales se acondicionaron en forma secuencial con metanol (10 mL), agua desionizada (2x10 mL), y buffer fosfato (10 mL). Las muestras se pasaron a través de los cartuchos a un flujo no mayor a 2 mL/min, y los ácidos fenólicos se eliminaron mediante el paso de 10 mL de buffer fosfato. Una vez efectuado este paso los cartuchos se secaron con nitrógeno gaseoso durante 2 h. Se efectuó la elución de las fracciones monoméricas y oligoméricas de flavanoles (FI y FII) mediante la adición de 25 mL de acetato de etilo, seguido por la elución de la fracción polimérica (FIII) con 15 mL de metanol. La fracción de acetato de etilo eluido se evaporó a sequedad bajo vacío, se redisolvió con 5 mL de buffer fosfato y se recargó en la misma serie de cartuchos que se acondicionaron previamente tal como se describió anteriormente. Los cartuchos nuevamente se secaron con nitrógeno y se realizó la elución secuencial de la FI y la FII con 25 mL de éter dietílico y 15 mL de metanol, respectivamente. Las tres fracciones (FI, FII y FIII) se evaporaron hasta la sequedad bajo vacío y se redisolvieron finalmente en 3 mL de metanol (DI, DII y DIII) para su análisis.

La cuantificación del contenido total de flavanoles en cada fracción se llevó a cabo mediante el ensayo con vainillina (Sun *et al.*, 1998b). El procedimiento resumido fue el siguiente: se tomaron dos tubos de vidrio y se adicionaron, a cada uno, 1 mL de muestra (DI, DII o DIII) y 2,5 mL de solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/metanol (25/75, v/v). A uno de ellos se le agregó 2,5 mL de una solución al 1% de vainillina en metanol (p/v) y al restante 2,5 mL de metanol (control). Los tubos se mantuvieron a una temperatura de 30°C durante 15 min (FI) y por un período de tiempo suficiente para alcanzar la máxima reacción (FII y FIII), y se efectuó la medición de la absorbancia a 500 nm. Los análisis se hicieron por triplicado.

Los resultados de cada fracción fueron expresados en mg/L, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{Monómeros (mg/L)} = (A_{500\text{nm}} \times \text{DI}) / (0,0081 \times M)$$

$$\text{Oligómeros (mg/L)} = (A_{500\text{nm}} \times \text{DII}) / (0,0046 \times M)$$

$$\text{Polímeros (mg/L)} = (A_{500\text{nm}} \times \text{DIII}) / (0,0037 \times M)$$

Donde A<sub>500nm</sub>, es la diferencia entre la absorbancia de la muestra y el control.

Una vez determinada la concentración de las fracciones (mg/L), dichas fracciones fueron disueltas en solución modelo, para su posterior utilización en el ensayo 2.

## Preparación de muestras

### Ensayo 1

Para la realización del primer ensayo, se prepararon 100 mL de muestra en un matraz ámbar, mezcla compuesta por la dosis del reactivo determinado (estándares de compuestos fenólicos) diluido sobre una porción de solución modelo, 700  $\mu$ L de estándar de IBMP (correspondientes a los 10 ng/L, según el cálculo de dilución realizado previamente) el cual fue añadido en último lugar, y posteriormente aforado a 100 mL con la misma solución modelo previamente descrita. La muestra fue agitada durante 30 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente para favorecer la reacción entre los compuestos.

### Ensayo 2

Para la realización del segundo ensayo, se prepararon 10 mL de muestra en un matraz ámbar, dicha mezcla estuvo compuesta por la dosis de un reactivo determinado (diferentes fracciones de tanino) diluidos en una porción de solución modelo, sobre la cual se adicionaron 70  $\mu$ L de estándar de IBMP (correspondientes a los 10 ng/L, según el cálculo de dilución realizado previamente). Finalmente el contenido del matraz fue aforado a 10 mL con la solución modelo previamente descrita. La muestra fue agitada durante 30 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente para favorecer la reacción entre los compuestos.

## Extracción y condiciones para análisis

El proceso de extracción se llevó a cabo mediante el método de SPME descrito por Gómez (2010), con las siguientes especificaciones: sobre un vial de vidrio ámbar de 15 mL, se depositaron 3,75 mL de muestra, 3,75 mL de agua desionizada y 2,25 g de cloruro de sodio. Luego, esta solución se sometió a una temperatura de 65°C, siendo agitada a 1000 rpm para generar el espacio de cabeza donde posteriormente se expuso la fibra DVB/CAR/PDMS a 2 cm de distancia, durante un periodo de 30 minutos (Figura 3).

Una vez terminado éste proceso, la siguiente etapa fue la desorción térmica (Figura 4) de los compuestos adsorbidos en la fibra, sobre el cromatógrafo de gases acoplado al detector espectrómetro de masas (GC-MS) para ser analizados bajo los parámetros y condiciones mencionados por Gómez (2010).



**Figura 3. Disposición de la muestra para el proceso de extracción mediante SMPE.**



**Figura 4. Disposición de la fibra en GC-MS para la desorción térmica de la muestra.**

## Variable medida

- Diferencia en la concentración de IBMP sobre el espacio de cabeza (diferencia de concentración entre control y muestra) mediante cromatografía de gases (GC-MS), (Gómez, 2010).

## Determinación analítica

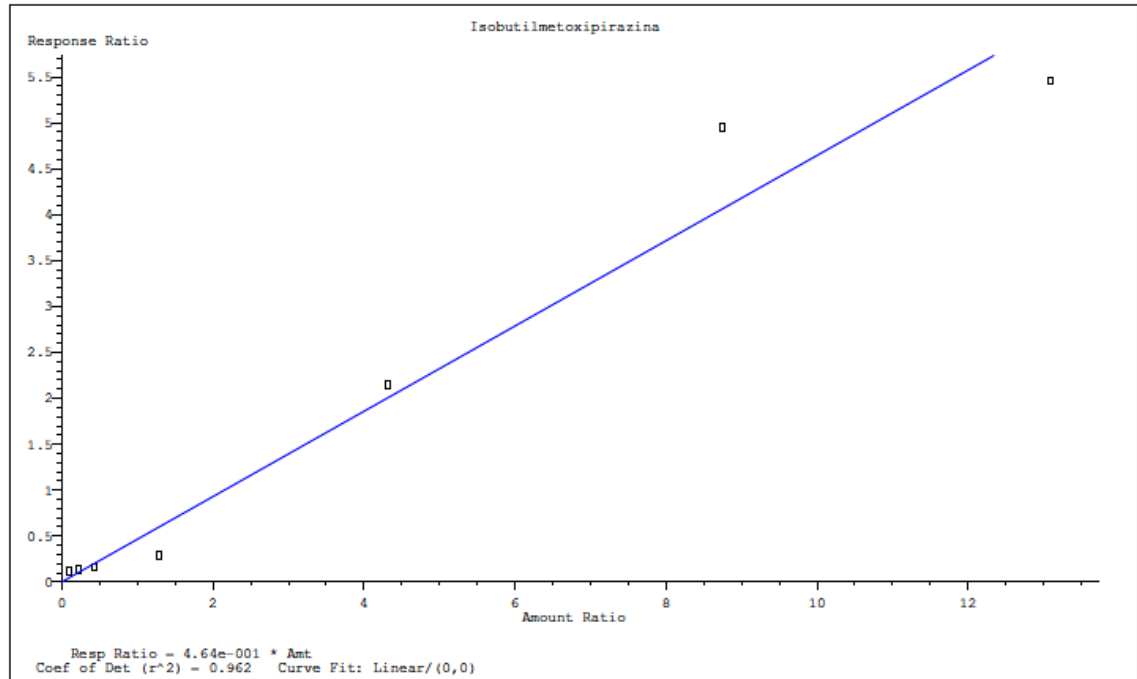
En este estudio se determinó y cuantificó la isobutilmetoxipirazina (IBMP) o 2 – metoxi – 3 – (2 – metilpropil) pirazina para los ensayos 1 y 2 de la presente investigación.

### Curva de calibración

Para cuantificar el efecto de los diferentes polifenoles sobre la volatilidad de la IBMP se elaboró recta de calibrado a partir de la inyección de seis concentraciones distintas de IBMP, las que fluctuaron entre 2 y 100 ppt.

Las soluciones patrón de estándar de isobutilmetoxipirazina y de 2 – isobutil 3 – metoxi – d3- pirazinas (Pirazina Deuterada) fueron preparadas mediante dilución directa en metanol y almacenadas a -20°C. Luego, las soluciones utilizadas para la realización de la curva de calibración fueron preparadas, cada una, mediante dilución de las soluciones estándar en una solución hidroalcohólica (6% v/v de etanol, pH 3,5), las cuales fueron almacenadas a 5°C.

El método utilizado está basado en la adición de un estándar interno (2 – isobutil 3 – metoxi – d3- pirazinas), en volúmenes conocidos e iguales, a las muestras de cada una de las soluciones utilizadas en las curvas de calibración, preparadas bajo los mismos parámetros descritos para las muestras del presente estudio. Posteriormente se procedió con el proceso de extracción, mediante la utilización de SPME, para luego inyectar la muestra en el GC-MS. A partir de las áreas obtenidas de la inyección de cada una de soluciones, se calculó la relación la IBMP y el estándar interno y se graficó (Figura 5) contra la concentración del compuesto en cada solución, tomando como base el método de calibración empleado por Gómez (2010).



**Figura 5. Curva de calibración para IBMP, extraída del software de GC-MS.**

### **Análisis estadístico**

Los resultados fueron sometidos a Análisis de Varianza (ANDEVA), y de existir diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey al nivel de significancia de un 5%. Los datos fueron procesados mediante la utilización del software Minitab® 13.

## RESULTADOS

En la sección apéndices, se deja a disposición un cromatograma tipo obtenido a partir de la realización del presente estudio, con el fin de identificar y diferenciar el compuesto aromático estudiado y su tiempo de retención respecto de otras moléculas de la misma familia (Apéndice III, Figura 1), junto a los espectros de masa de iones correspondientes para cada compuesto utilizado (Apéndice III, Figura 2).

### **Ensayo 1. Evaluación del efecto de compuestos fenólicos de diferente polaridad, ácido gálico, (+)-catequina sobre la volatilidad de la IBMP.**

Los resultados obtenidos se expresan como la diferencia de concentración entre control y muestra en la concentración de IBMP sobre el espacio de cabeza mediante cromatografía de gases (GC-MS). De este modo, se hace necesario precisar que un mayor valor reflejado en los gráficos y tablas adjuntadas en el apéndice, implica una menor concentración de IBMP en el espacio de cabeza de los tratamientos (Figura 6).

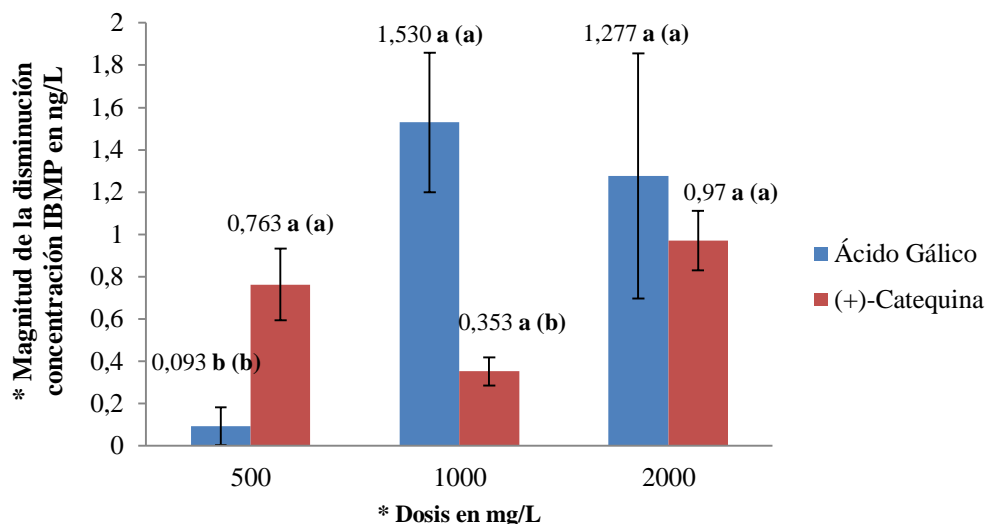
Al realizar el análisis estadístico DCA con arreglo factorial, fue posible comprobar que existe una interacción entre el compuesto fenólico utilizado (ácido gálico y (+)-catequina) y la dosis utilizada del mismo. De este modo en primer lugar se presentan los resultados del efecto de la dosis sobre la acción del compuesto utilizado en la búsqueda de disminuir la volatilidad de la IBMP, mientras que en segundo lugar se presenta el efecto de diferentes compuestos fenólicos según la dosis utilizada para cada uno.

#### Efecto de la dosis de compuestos fenólicos de distinta polaridad sobre la disminución de la volatilidad de la IBMP.

Como es posible apreciar, para el caso del ácido gálico, existen diferencias significativas entre las diferentes dosis utilizadas (Figura 6, apéndice II).

De este modo, la disminución de la volatilidad de la IBMP es mayor en el espacio de cabeza de viales con dosis de 1000 y 2000 mg de ácido gálico/L, no existiendo entre estos últimos tratamientos diferencias significativas entre sí. Sería posible inferir entonces que vinos con un mismo nivel de IBMP, presentarían menor volatilidad de la misma, en la medida en que el contenido de ácido gálico es más alto a partir de los 500 mg/L, según lo reflejado en el presente ensayo.





\*Promedios unidos con letras iguales [dirección horizontal (1) y vertical entre paréntesis (2), indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos, según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

(1): PCM para efecto de la dosis de compuestos fenólicos de distinta polaridad sobre la disminución de la volatilidad de la IBMP.

(2): PCM para efecto de compuestos fenólicos de distinta polaridad según la dosis utilizada sobre la disminución de la volatilidad de la IBMP.

**Figura 6. Efecto de compuestos fenólicos de distinta polaridad sobre la disminución de la volatilidad de la IBMP. (A) Ácido gálico, (B) (+)-catequina.**

Respecto al uso de (+)-catequina, no existen diferencias significativas entre las dosis utilizadas, por lo que podría inferirse que las diferentes dosis de dicho compuesto no generan un mayor impacto en la disminución de la volatilidad de la IBMP.

Efecto de compuestos fenólicos de distinta polaridad según la dosis utilizada sobre la disminución de la volatilidad de la IBMP.

A continuación se presentan los resultados del efecto del compuesto según la dosis utilizada. Los resultados serán presentados en relación a cada una de las dosis utilizadas.

A partir de la Figura 6, es posible evidenciar, que a una misma dosis de ambos compuestos (500 mg/L), se obtiene un mayor promedio de disminución de la volatilidad de la IBMP en presencia de (+)-catequina en el medio respecto al ácido gálico (apéndice II).

Se evidencia también que existen diferencias significativas entre los dos compuestos utilizados a la dosis de 1000 mg/L. Si bien existe una disminución en presencia de cada uno de los compuestos utilizados, ésta es mayor en presencia de ácido gálico (Figura 6,apéndice II).

En relación al efecto de compuestos fenólicos de distinta polaridad a la dosis de 2000 mg/L, es posible inferir que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, aunque se aprecia que existe una disminución efectiva de la volatilidad de la IBMP en presencia de cada uno de ellos (Figura 6, apéndice II).

## Ensayo 2. Determinación del efecto de la fracción monomérica, oligomérica y polimérica de taninos de un vino del cv. Syrah sobre la volatilidad de la IBMP.

A continuación se presentan los resultados que comprenden el segundo ensayo de la presente investigación. Es importante mencionar que se utilizó vino del cv. Syrah varietal, cosecha 2012, procurando la ausencia total de contacto con cualquier tipo de madera utilizada en la producción de vinos (chips, cubitos, duelas o barricas), a fin de lograr evaluar el efecto de las fracciones tánicas propias de la uva y por ende del vino sobre la volatilidad de la IBMP. Del mismo modo los vinos de cv. Syrah no son descritos por la presencia de IBMP, por lo que no se espera que dicho compuesto aromático esté presente en la matriz de dicha variedad. Las concentraciones de las diferentes fracciones de taninos coinciden con lo que habitualmente se encuentra en vinos tintos de diferentes cultivares (Cáceres, 2013; Fanzone, 2012; Monagas *et al.*, 2003; Narvaez, 2010). Para este estudio los valores obtenidos fueron de  $61,1 \pm 3,8$  mg/L; oligómeros  $132,0 \pm 4,2$  mg/L y polímeros  $1003,3 \pm 96$  mg/L.

Debido a la similitud en la metodología entre ambos ensayos, al igual que en el caso anterior, los resultados obtenidos se expresan como la diferencia de concentración entre control y muestra en la concentración de IBMP sobre el espacio de cabeza mediante cromatografía de gases (GC-MS). De este modo, un mayor valor reflejado en la tabla, implica una menor concentración de IBMP en el espacio de cabeza de los tratamientos (Cuadro 3).

A partir del siguiente Cuadro es posible establecer la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos propuestos. Los mayores promedios de disminución se obtuvieron en presencia de oligómeros y polímeros, existiendo diferencias significativas entre ellos también. De este modo es posible inferir que cadenas de tamaño medio de tanino polimerizado tienen un mayor impacto sobre la disminución *versus* cadenas de gran tamaño o de monómeros de tanino (Cuadro 3).

### Cuadro 3. Efecto de las diferentes fracciones tánicas de un vino del cv. Syrah sobre la disminución de la volatilidad de la IBMP <sup>(1)</sup>.

Compuesto	Promedio de disminución de volatilidad de la IBMP (ng/L)
(FI) Monómeros $61,1 \pm 3,8$ mg/L	$0,023 \pm 0,062$ c
(FII) Oligómeros $132,0 \pm 4,2$ mg/L	$1,80 \pm 0,020$ a
(FIII) Polímeros $1003,3 \pm 96$ mg/L	$1,71 \pm 0,015$ b

\*Promedios unidos con letras iguales (dirección Vertical), indican diferencias estadísticamente no significativas, según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

(1): Promedio de la diferencia medida entre el control sin compuesto fenólico y el tratamiento en ng/L  $\pm$  desviación estándar.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio para el caso del efecto de ácido gálico y catequina sobre la volatilidad de la pirazina IBPM (Figura 6), se observa que con la menor concentración de (+)-catequina disminuye la volatilidad de la IBPM, para luego aumentar en la dosis de 1000 mg/L, disminuyendo nuevamente en la dosis de 2000 mg/L. En este sentido se observa para la IBPM un comportamiento similar al del limoneno con la (+)-catequina observado por Dufour y Bayonove (1999b). Cabe mencionar que en un vino tinto, el promedio de (+)-catequina es cercano a 200 mg/L (Frankel *et al.*, 1995), por lo que en el rango menor de la dosis de (+)-catequina del presente estudio (500 mg/L), es posible suponer que existiría un efecto de disminución del nivel volatilidad de la IBPM producto de la acción de la (+)-catequina.

En el caso del ácido gálico, a bajas concentraciones (500 mg/L), presenta un bajo efecto sobre la disminución de la volatilidad de la IBPM, comportamiento que cambia a concentraciones mayores (1000 y 2000 mg/L), siendo entre aproximadamente 13 y 16 veces mayor la disminución de la volatilidad observada. De acuerdo a Frankel *et al.* (1995), el promedio de ácido gálico en vinos tintos es cercano a 100 mg/L, por lo que podría suponerse un bajo efecto de este compuesto sobre la volatilidad de la IBPM en la concentración presente en los vinos.

De la Figura 6 es posible inferir que el efecto en la disminución de la IBPM es dependiente del tipo de compuesto fenólico con el que interactúe. Considerando las concentraciones en vinos tintos ya señaladas y que están en el rango asociado a la menor dosis de ambos compuestos estudiados (500 mg/L), es notoria la capacidad en reducir la volatilidad de la IBPM de la (+)-catequina en comparación al ácido gálico, siendo de aproximadamente 8 veces mayor. La (+)-catequina presenta varios grupos hidroxilo (OH), presentando un potencial para un puente de hidrógeno con la IBPM. En cuanto al ácido gálico Jung *et al.* (2000) señalan que su interacción con la pirazina 2-metilpirazina, es una combinación intrincada de interacciones covalentes débiles, donde los puentes de hidrógeno hacen la mayor contribución a la conformación geométrica específica.

Finalmente, dado que ambos compuestos en estudio son *orto*-difenoles, no se puede descartar un efecto como el descrito para los tioles por Blanchard *et al.* (2004), en que reacciones de oxidación puedan generar una ruptura del anillo aromático de la IBPM, con una consecuente disminución en sus niveles de volatilidad. Este efecto podría ser el responsable de la disminución de la IBPM en las dosis de fenoles más altas (Figura 6). Lo anterior estaría relacionado a lo investigado por Mathokina y Kilmartin, (2013), donde se aprecia, que compuestos pertenecientes a la familia de los no flavonoides, son más susceptibles de oxidarse que los flavonoides, lo que explicaría que el ácido gálico a las dosis de 1000 y 2000 mg/L genera un mayor efecto sobre la volatilidad de la IBPM (Figura 6).

Respecto a los procesos oxidativos, como respuesta a la disminución de la IBMP en el medio, cabe señalar que independientemente del polifenol utilizado, el efecto propuesto estaría condicionado, en algunos casos, a la concentración de los fenoles en la matriz vínica. Esto se ve demostrado en los resultados obtenidos por Coetzee *et al.* (2013), donde la aplicación de oxígeno a vinos del cv. Sauvignon Blanc no tuvo un impacto significativo sobre la concentración de IBMP. Esto podría sugerir que la oxidación del compuesto aromático tiene un efecto significativo en aquellos vinos cuya concentración de compuestos fenólicos es más alta, como en vinos tintos o rosados. Lo anterior se condice con lo mencionado por Blake *et al.* (2009), donde la mayor disminución en la concentración de IBMP en botella se obtuvo en vinos tintos por sobre los vinos blancos en todos sus tratamientos. Esto también concuerda con los resultados obtenidos para el primer ensayo del presente estudio, ya que como se mencionó anteriormente, las dosis de compuestos fenólicos utilizados fueron establecidas en base a las concentraciones de fenoles de bajo peso molecular documentadas por diversos autores para vinos blancos, tintos y rosados

De acuerdo con Sun *et al.* (1998), las fracciones oligoméricas y poliméricas en vino tinto presentan un grado de polimerización medio aproximado a 4,8 y 22,1 unidades de flavan-3-oles, respectivamente. Diversos estudios indican que las fracciones de taninos en el vino siguen un orden de concentración en vinos tintos: FIII (polimérica) > FII (oligomérica) > FI (monomérica). Es así que la fracción oligomérica y polimérica tuvieron un 78% y 74% más de efecto respectivamente que los monómeros sobre la volatilidad de la IBMP. Considerando que las fracciones mayoritarias de taninos (FII y FIII) son las que generan la mayor disminución de la volatilidad de la IBMP, los resultados coinciden con Aronson y Ebeler (2004) en cuanto a que los taninos del vino interactúan con los compuestos aromáticos del mismo.

Un efecto similar fue documentado por Mitropoulou *et al.* (2011), quienes registraron una disminución notoria en la volatilidad de diferentes compuestos aromáticos (isoamil acetato y linalol entre otros). Esta disminución estaría condicionada al origen de la fracción tánica utilizada. Es así que para un mismo compuesto, por ejemplo el linalol, tiene un mayor impacto en la reducción de su volatilidad la utilización de taninos de la piel de las bayas en comparación con uso de taninos de la semilla, pues existe una diferencia en el grado de polimerización y composición de los mismos. De acuerdo a Pinelo *et al.* (2006) el grado medio de polimerización estimado para los taninos de la piel es de 28 y sus mayores constituyentes son moléculas de (+)-catequina, (-)-epicatequina y epicatequina galato polimerizadas, mientras los taninos de la semilla, presentan un menor grado medio de polimerización (11) y su composición es mayoritariamente en base a monómeros de tanino, de los cuales el que se encuentra mayoritariamente es la epicatequina. Lo anterior podría dar respuesta a los resultados obtenidos en el presente estudio, donde las fracciones FII y FIII fueron las que tuvieron un efecto en la reducción de la IBMP del medio vínico (Cuadro3).

Otra arista importante, en la acción de los taninos sobre la IBMP, la constituyen las prácticas enológicas y su impacto en el carácter vegetal de los vinos. En este sentido Aronson y Ebeler (2004) agregan que la adición exógena de taninos comerciales al vino

tinto, tendría un mínimo efecto sobre la volatilidad de los compuestos aromáticos, dado el efecto que ya ejercen en este sentido las fracciones de flavan-3-oles presentes en el vino. Sin embargo, otros autores han investigado el impacto de otras prácticas enológicas habituales, como la utilización de madera, sobre la concentración de la IBMP. De este modo, Bompas y Gautier (2009), comprobaron que mediante la utilización de chips de roble americano que es factible disminuir en una pequeña proporción la concentración de pirazinas en vinos del cv. Cabernet Sauvignon. Dicho efecto estaría asociado al aporte de compuestos fenólicos provenientes de la madera, tales como taninos elágicos y gálicos, los cuales podrían combinarse con la IBMP según lo propuesto por Aronson y Ebeler (2004) y Jung *et al.* (2000) y de esta forma disminuir la volatilidad de la IBMP. En relación a lo anterior, Jackson (2008) señala que los elagitaninos derivados de la madera de roble pueden también participar en reacciones oxidativas que tienen como producto peróxido de oxígeno, el cual, podría ser el responsable de la oxidación del compuesto aromático y por ende una disminución de su concentración. Es relevante mencionar que este efecto estaría condicionado al origen de la madera, pues existe una relación directa entre el origen geográfico de la madera de roble utilizada y su concentración de compuestos fenólicos (Zamora, 2003).

Al igual que en el ensayo anteriormente discutido, el efecto de retención de la IBMP por interacción polifenol-aroma también se encuentra considerado dentro de las posibles opciones para la disminución de la concentración en el espacio de cabeza por Aronson y Ebeler (2004), para lo cual, al igual que en la discusión del primer ensayo, la teoría del desarrollo de enlaces débiles entre compuestos fenólicos y la pirazina de Jung *et al.* (2000) explicaría la diferencia de concentración mencionada.

Ya sea por acción oxidativa, por efecto de retención o ambos inclusive, el efecto de los polifenoles sobre la disminución de la concentración de la IBMP se traspaasa al campo sensorial. La percepción olfativa de la IBMP se ve alterada o modificada en presencia de fenoles en la matriz vínica. Es así que tanto Aronson y Ebeler (2004) como Lund *et al.* (2009), registraron una disminución en la percepción sensorial por parte de panel entrenado de la 2-metoxi-3-isobutilpirazina, lo cual demuestra que la interacción químicamente probada, tiene un impacto real en la percepción de los atributos aromáticos del vino.

Sin perjuicio de lo anteriormente señalado, las actuales investigaciones aun no llegan a un acuerdo respecto a la naturaleza de la reacción que tiene como consecuencia la disminución en la concentración de IBMP, quedando en una incógnita aun si se trata de un efecto de retención a partir de la adición del compuesto analizado o bien de una oxidación, ambos planteados en la discusión del presente estudio.

Atendiendo a lo anterior, se hace difícil además modular la evolución de la IBMP en el tiempo en la matriz vínica, puesto que a diferencia de este estudio, el vino posee una matriz muchísimo más compleja, donde no sólo actúan compuestos fenólicos como agentes oxidantes de aromas, sino que también existen otros compuestos (de la misma familia u otras) que actúan como agentes protectores frente a las reacciones oxidativas propias del medio.

Desde esta perspectiva se hace necesario ir complejizando de a poco la matriz vínica que se utiliza como base para el análisis de la dinámica de la IBMP con el fin de poder evaluar si existen además otras interacciones asociadas la modificación de la concentración de la IBMP en mostos y vinos.

## CONCLUSIONES

- Los compuestos fenólicos influyen sobre la volatilidad de la IBMP, sin embargo este efecto está condicionado por la interacción entre la cantidad del compuesto presente en el medio y el tipo de compuesto.
- Del total de las fracciones tánicas presentes en el vino, aquellas que presentan grado de polimerización intermedio o alto, tienen un mayor efecto supresor sobre la volatilidad de la IBMP.



**BIBLIOGRAFÍA**

- Allen, M. and M., Lacey. 1999. Methoxypyrazines of grapes and wines. pp 31 – 38. In: Waterhouse, A., S. Ebeler. Chemistry of Wine Flavor. American Chemical Society, Washington, DC, EEUU. 245p.
- Alvarado, C; E., Cambillo; A., Fernandez; A., Muñoz; y F., Ramos. 2007. Efecto del consumo moderado de vino tinto sobre algunos factores de riesgo cardiovascular. *Acta Médica Peruana*, 24 (3): 145 – 152.
- Agosin, E. y A., Belancic, 2002. Aromas varietales: influencia de ciertas prácticas vitícolas y enológicas. Centro Tecnológico de Aromas y Sabores, Ingeniería Dictuc, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- Agosin, E; K., Fernandez, and J. Kennedy. 2007. Characterization of *Vitis vinifera* L. cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (9): 3675 – 3680.
- Aronson, J. and S. Ebeler, 2004. Effect of polyphenol compounds on the headspace volatility of flavors. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55 (1): 13 – 21.
- Bate-Smith, E. 1981. Astringent tannins of the leaves of *Geranium* species. *Phytochemistry*, 20:211-216.
- Blake, A; Y. Kotseridis; I. Brondle; D. Inglis; M. Sears and G. Pigkering. 2009. Effect of closure and packaging type on 3-alkyl-2-methoxypyrazines and other impact odorants of Riesling and Cabernet Franc wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4680-4690.
- Blanchard, L; P. Darriet and D. Dubourdieu. 2004. Reactivity of 3-Mercaptohexanol in red wine: impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55 (2): 115 – 120.
- Bompas, C. y P., Gauthier. 2009, Jul-Ago. Uso racional de los productos de roble – Efecto de chips de roble americano sobre los aromas vegetales en vinos tintos. *Revista Enología*, (4): 11 – 13.
- Bordeau, E., J. Scarpa. 1998. Análisis Químico del Vino. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 253p.
- Burns, J; A., Crozier; M. Hughes; D. Matthews; M. McDonald; and M., Lean. 1998. Survey of de free and conjugated myrecetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 46 (2): 368 – 375.

Cáceres, A. 2013, Jul. Flavanoles de bayas y vinos y la influencia de factores enológicos sobre sus características químicas y sensoriales. Tesis Doctoral. Tarragona, España. Departament de Bioquímica I Biotecnologia, Facultat d' Enologia. Universitat Rovira I Virgili. 233p.

Canuti, V; M. Conversano; M. Li Calzi; H. Heymann; M. Matthews; and S. Ebeler. 2009. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for profiling free volatile compounds in Cabernet Sauvignon grapes and wines. *Journal of Chromatography A*, 1216: 3012 – 3022.

Coetzee, C; K., Lisjak; L. Nicolau; P. Kilmartin and W. Johannes du Toit. 2013. Oxygen and sulfur dioxide additions to Sauvignon Blanc must: effect on must and wine composition. *Flavour and Fragrance Journal*, 28 (3): 155-167.

Dominguez, A. and E. Agosin. 2010. Gas Chromatography coupled with mass spectrometry detection for the volatile profiling of *Vitis Vinifera* cv. Carménère wines. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 55 (3): 385 – 391.

Donoso, C. 2001. Caracterización de la composición fenólica de vinos de cv. Sauvignon blanc provenientes de cinco valles de Chile. Memoria de título para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 87p.

Dufour, C. and C. Bayonove. 1999a. Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 671-677.

Dufour, C. and C. Bayonove 1999b. Interactions between wine polyphenols and aroma substances. An insight at the molecular level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 678–684.

Dufour, C and I. Sauvaitre. 2000. Interactions between anthocyanins and aroma substances in a model system. Effect on the flavor of grape derived beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1784–1788.

Dunlevy, J; E. Dennis; K. Soole; M. Perkin; C. Davies; and P. Boss. 2013. A methyltransferase essential for the methoxypyrazine derived flavour wine. *The Plant Journal*, 75: 606-617.

Ebeler, S. and J. Thorngate. 2009. Wine chemistry and flavor: looking into the crystal glass. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 57: 8098-8108.

Fanzone, M. 2012, May. Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (*Vitis Vinifera* L.): Su relación con el origen geográfico, factores

vitivinólicas y valor comercial. Tesis Doctoral. Tarragona, España. Departament de Bioquímica I Biotecnologia, Facultat d' Enologia. Universitat Rovira I Virgili. 369p.

Fedrizzi, B; G. Zapparoli; F. Finato; E. Tosi; A. Turri; M. Azzolini; and G. Versini. 2011. Model aging and oxidation effects on varietal, fermentative, and sulfur compounds in a dry botrytized red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 1804-1813.

Flanzy, C. 2000. Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos. Ed. Mundi-Prensa. España. 783p.

Frankel, E; A. Waterhouse; and P. L. Teissedre. 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected california wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 890-894.

García-Barceló. J. 1990. Técnicas Analíticas Para Vinos. Ediciones FAB. Barcelona, España. 1713 p.

Gómez, C. 2010. Efecto de la luz solar sobre la concentración de metoxipirazinas en bayas del cv. Carmenerè. Tesis Ingeniera Agrónoma y Magister en Enología y Vitivinicultura. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 59p.

Jackson, R. 2008. Wine Science, Principles and Applications. Academic Press. San Diego, California 790p.

Jung, D. M.; J.S. de Ropp, and S. Ebeler. 2000. Study of interactions between food phenolics and aromatic flavors using one- and two-dimensional H-1 NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 407– 412

King, B. and J. Solms. 1979. Interactions of flavor compounds in model food systems using benzyl alcohol as an example. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6): 1331-1334.

Kilmartin, P; H. Zou; and A. Waterhouse. 2001. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1957-1965.

Lorrain, B; S. Tempere; N. Iturmendi; V. Moine; G. de Revel.; and P.L. Teissedre. 2013. Influence of phenolic compounds on the sensorial perception and volatility of red wine esters in model solution: an insight at the molecular level. *Food Chemistry*, 140, 76– 82.

Lund, C; L. Nicolau; Gardner, R; and Kilmartin, P. 2009. Effect of polyphenols on the perception of key aroma copound from Sauvignon Blanc wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15: 18-26.

Makhotkina O and P. Kilmartin . 2013. Electrochemical oxidation of wine polyphenols in the presence of sulfur dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (23):5573–5581.

Medel, R. 2012. Estudio del efecto de distintos manejos de cosecha y maceración prefermentativa sobre la composición química del mosto del cv. Sauvignon Blanc. Memoria de título para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 52p.

Mitropoulou, A; E. Hatzidimitriou and A. Paraskevopoulou. 2011. Aroma release of a model wine solution as influenced by the presence of non-volatile components. Effect of commercial tannin extracts, polysaccharides, and artificial saliva. *Food Research International*, 44: 1561– 1570.

Monagas, M; C. Gómez-Cordovés; B. Bartolomé; O. Laureano; y JM. Ricardo da Silva. 2003, Oct. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22: 6475-6481.

Müller, R., and S. Rappert. 2010. Pyrazines: occurrence, formation and biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1315-1320.

Muñoz-Gonzalez, C; P. Martín-Álvarez; M. Moreno-Arribas; and M. Pozo-Bayón. 2013. Impact of the nonvolatile wine matrix composition on the *in vivo* aroma release from wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 66 – 73.

Narváez, J. 2010. Comparación de tres métodos de medición de taninos totales y su relación con la astringencia y el amargor percibidos por un panel de degustación. Tesis Ingeniero Agrónomo y Magister en Enología y Vitivinicultura. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 103p.

Obreque-Slier, E. 2010, Jun. Caracterización fenólica de uvas del cv. Carménère y su relación con la sensación de astringencia. Tesis Doctoral. Tarragona, España. Departament de Bioquímica I Biotecnología, Facultat d' Enología. Universitat Rovira I Virgili. 245p.

Pinelo, M; A. Arnous; and, A. Meyer. 2006. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 579-590.

Pozo Bayón, M. A; and G. Reineccius, 2009 Interactions between wine matrix macro-components and aroma compounds. In *Wine Chemistry and Biochemistry*; Moreno-Arribas, M. V.; Polo, M. C., Eds.; Springer, New York; Vol. II, pp 417–435.

Pszczolkowski, P. 2004. La intervención de cv. Carménère (*Vitis vinifera*), en Chile, desde la mirada de uno de sus actores. *Universum*, 2: 150 – 165.

Rajchl, A; H. Čížková; M. Voldřich; D. Lukešová; and Z. Panovská. 2009. Methoxypyrazines in Sauvignon Blanc wines, detection of addition of artificial aroma. *Czech Journal Food and Science*, 27(4): 259-266.

Robinson, A. L; S. E. Ebeler; H. Heymann; P. K. Boss; P. S. Solomon; and R. D. Trengove. 2009. Interactions between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma compound headspace partitioning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10313–10322.

Rodriguez-Bencomo, J. J; C. Munoz-Gonzalez; I. Andujar-Ortiz; P. Jose Martin-Alvarez; M. Victoria Moreno-Arribas; and M. Angeles Pozo-Bayon. 2011. Assessment of the effect of the nonvolatile 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, 2484–2494.

Saenz-Navajas, M; E. Campo; L. Cullere; P. Fernandez-Zurbano; D. Valentin; and V. Ferreira. 2010. Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5574– 5585.

Salgado, R. 2003. Caracterización de la composición fenólica de vinos del cv. Carménère provenientes de cinco valles de Chile. Memoria de título para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 72p.

Sun, B; M. Conceição Leandro; V. de Freitas and M., Spranger. 2006. Fractionation of red wine polyphenols de solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1128: 27-38.

Ugliano, M. 2013. Oxygen contribution to wine aroma evolution during bottle aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 6125-6136.

Vallarino, J; X. López-Cortés; J. Dunlevy; P. Boss; F. Gonzalez-Nilo; and Y. Moreno. 2011. Biosynthesis of Methoxypyrazines: elucidating the structural/functional relationship of two *Vitis Vinifera* O-metiltransferases capable of catalyzing the putative final step of the biosynthesis of 3-alkyl-2-methoxypyrazine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7310-7316.

Waterhouse, A and V. F. Laurie. 2006. Oxidation of wine phenolics: a critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3): 306-313.

Zamora, F. 2003. Elaboración y Crianza del Vino Tinto: Aspectos científicos y prácticos. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 225p.

Zúñiga, M. 2010. Caracterización química y sensorial de vinos comerciales del cv. Pinot noir producidos en Chile. Tesis Ingeniera Agrónoma y Magister en Enología y

Vitivinicultura. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.  
54p.

## ANEXOS

## Apéndice I

Análisis químicos básicos para vino Syrah utilizado para fraccionamiento

<b>Análisis</b>	<b>Resultado</b>	<b>Metodología</b>
pH	3,6 ± 0,001	
Acidez Titulable	3,43 ± 0,112 g/L de ácido sulfúrico	Recopilado por Bordeu y Scarpa, 1998.
Acidez Volátil	0,564 ± 0,02 g/L de ácido acético	
Grado alcohólico	14,2° ± 0,12	
Taninos totales	1,3 ± 0,122 g/L de catequina	Mediante reacción de Bate-Smith (Bate-Smith, 1981).
Fenoles totales	1786,45 ± 0,225 mg/L ácido gálico	Mediante análisis espectrofotométrico a DO 280 nm Recopilado por Bordeu y Scarpa, 1998.
Antocianos totales	663,6 ± 1,711 mg/L de malvidina	Recopilado por Bordeu y Scarpa, 1998.
Intensidad Colorante	20,084 ± 0,155 ua	Mediante análisis espectrofotométrico a DO 420nm;520nm y 620nm, Recopilado por Bordeu y Scarpa, 1998.

## Apéndice II

Resultados obtenidos para el Ensayo 1: Evaluación del efecto de compuestos fenólicos de diferente polaridad, ácido gálico, (+)-catequina sobre la volatilidad de la IBMP.

**Cuadro 1. Efecto de la dosis de compuestos fenólicos de distinta polaridad sobre la disminución de la volatilidad de la IBMP <sup>(1)</sup>**

Compuesto	Dosis (mg/L)	Concentración de IBMP muestra control (ng/L)	Concentración promedio de IBMP tratamiento (ng/L)	Diferencia de concentración IBMP (ng/L)
Ác. Gálico	500 mg/L	10	9,907	0,093 ± 0,090 <b>b</b>
	1000 mg/L	10	8,470	1,530 ± 0,331 <b>a</b>
	2000 mg/L	10	8,723	1,277 ± 0,576 <b>a</b>
(+) -catequina	500 mg/L	10	9,237	0,763 ± 0,174 <b>a</b>
	1000 mg/L	10	9,647	0,353 ± 0,066 <b>a</b>
	2000 mg/L	10	9,030	0,970 ± 0,140 <b>a</b>

Promedios unidos con letras iguales (dirección Vertical), indican diferencias estadísticamente no significativas, según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ )

(1): Promedio de la diferencia medida entre el control sin compuesto fenólico y el tratamiento en ng/L ± desviación estándar

**Cuadro 2. Efecto del compuestos fenólicos de distinta polaridad, en dosis de 500 mg/L, sobre la disminución de la volatilidad de la IBMP <sup>(2)</sup>.**

Compuesto	Concentración de IBMP muestra control (ng/L)	Concentración promedio de IBMP tratamiento (ng/L)	Diferencia de concentración ( Control - tratamiento) IBMP (ng/L)
500 mg/L Ac. Gálico	10	9,907	0,093 ± 0,090 <b>b</b>
Catequina	10	9,237	0,763 ± 0,174 <b>a</b>

Promedios unidos con letras iguales (dirección Vertical), indican diferencias estadísticamente no significativas, según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ )

(2): Promedio de la diferencia medida entre el control sin compuesto fenólico y el tratamiento en ng/L ± desviación estándar



**Cuadro 3. Efecto del compuestos fenólicos de distinta polaridad, en dosis de 1000 mg/L, sobre la disminución de la volatilidad de la IBMP <sup>(3)</sup>.**

<b>Compuesto 1000 mg/L</b>	<b>Concentración de IBMP muestra control (ng/L)</b>	<b>Concentración promedio de IBMP tratamiento (ng/L)</b>	<b>Diferencia de concentración ( Control - tratamiento) IBMP (ng/L)</b>
<b>Ac. Gálico</b>	10	8,47	1,530 ± 0,331 <b>a</b>
<b>Catequina</b>	10	9,647	0,353 ± 0,066 <b>b</b>

Promedios unidos con letras iguales (dirección Vertical), indican diferencias estadísticamente no significativas, según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ )

(3): Promedio de la diferencia medida entre el control sin compuesto fenólico y el tratamiento en ng/L ± desviación estándar

**Cuadro 4. Efecto del compuestos fenólicos de distinta polaridad, en dosis de 2000 mg/L, sobre la disminución de la volatilidad de la IBMP <sup>(4)</sup>.**

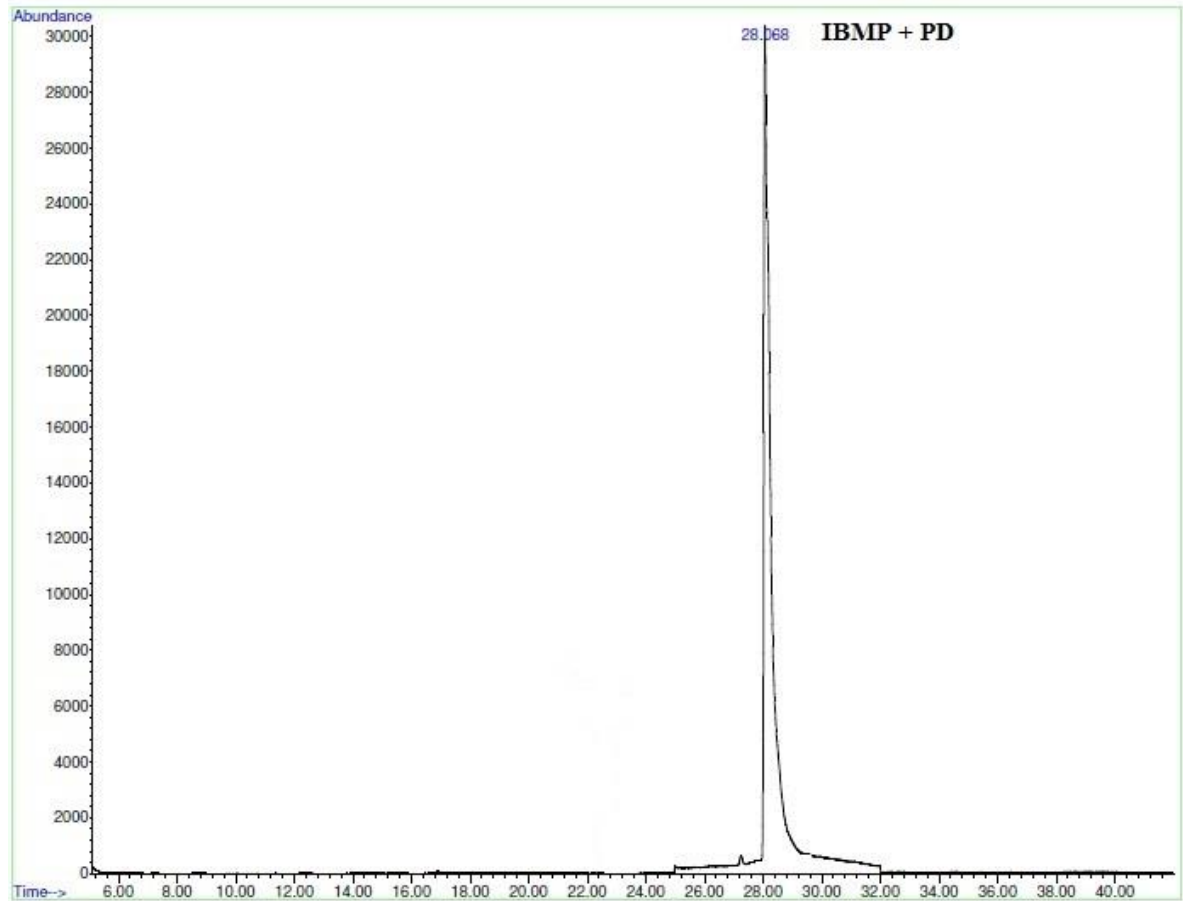
<b>Compuesto 2000 mg/L</b>	<b>Concentración de IBMP muestra control (ng/L)</b>	<b>Concentración promedio de IBMP tratamiento (ng/L)</b>	<b>Diferencia de concentración ( Control - tratamiento) IBMP (ng/L)</b>
<b>Ac. Gálico</b>	10	8,723	1,277 ± 0,576 <b>a</b>
<b>Catequina</b>	10	9,03	0,970 ± 0,140 <b>a</b>

Promedios unidos con letras iguales (dirección Vertical), indican diferencias estadísticamente no significativas, según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ )

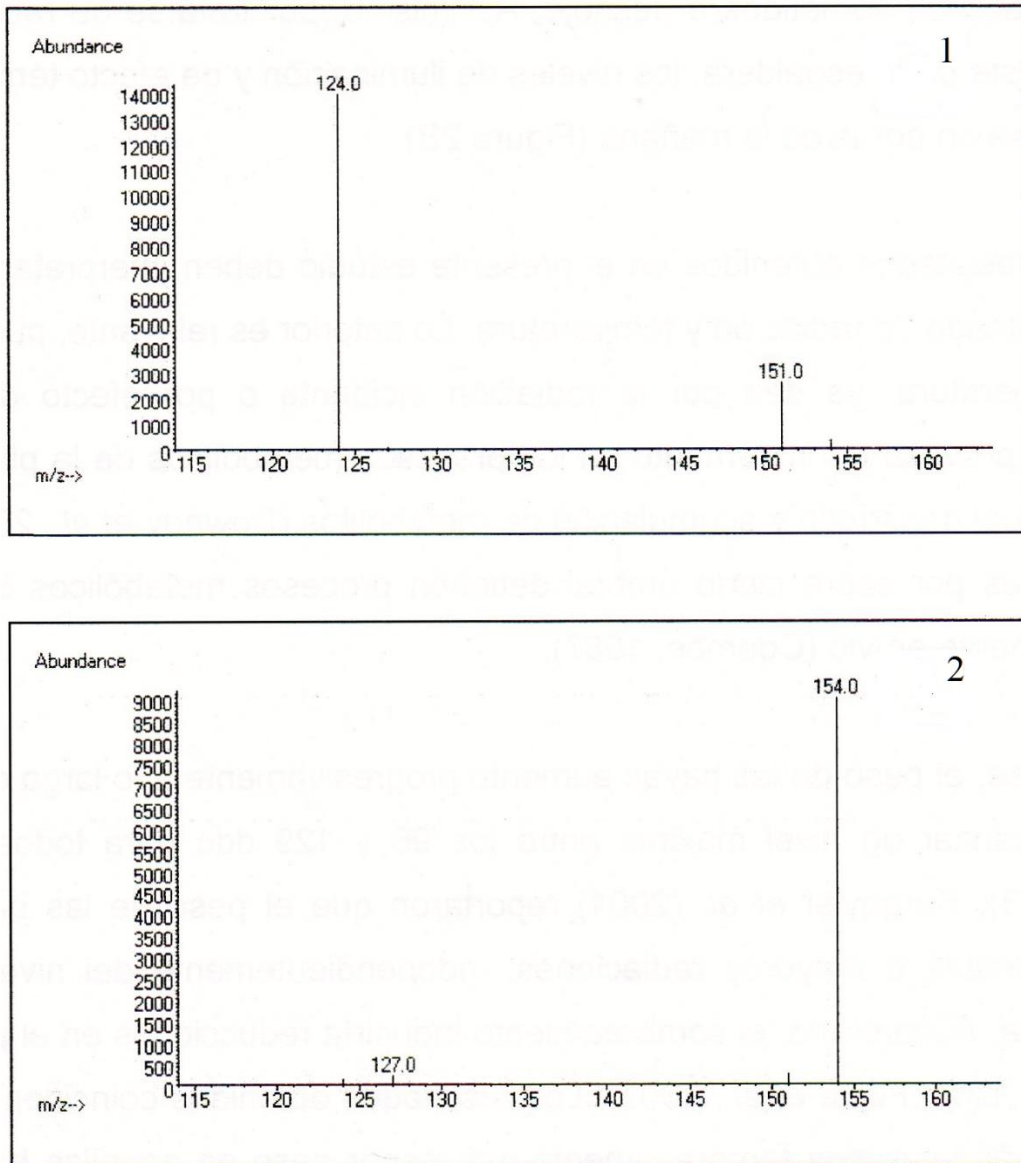
(4): Promedio de la diferencia medida entre el control sin compuesto fenólico y el tratamiento en ng/L ± desviación estándar

### Apéndice III

Cromatograma tipo y espectro de masa de iones para IBMP y PD.



**Figura 1. Cromatograma tipo para compuestos de la familia de las pirazinas obtenido a partir de la realización del estudio. Isobutilmetoxipirazina (IBMP) y Pirazina deuterada (PD).**



**Figura 2. Espectro de masa de iones correspondiente a dos metoxipirazinas. (1) Isobutilmetoxipirazina (IBMP) y (2) Pirazina deuterada (2-isobutil 3- metoxi – d3-pirazina, PD). Extraída de Gómez (2010).**