



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

**INDICADORS DE LA QUALITAT ORGANOLÈPTICA DEL CAVA DURANT
LA CRIANÇA I L'EMMAGATZEMATGE**

JOAN BOSCH FUSTÉ
2007

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA
PROGRAMA DE DOCTORAT
MEDICAMENTS, ALIMENTACIÓ I SALUT
BIENNI 2002 - 2004

**INDICADORS DE LA QUALITAT ORGANOLÈPTICA DEL CAVA DURANT
LA CRIANÇA I L'EMMAGATZEMATGE**

Memòria presentada per Joan Bosch Fusté per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona, dirigida per:

Dra. Elvira López Tamames

Dra. Susana Buxaderas Sánchez

Joan Bosch Fusté

JOAN BOSCH FUSTÉ
2007

Aquest treball ha estat finançat per:

- La *Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) del Ministerio de Educación y Ciencia* a través dels projectes:

VIN01-051
AGL2005-03451

- La Generalitat de Catalunya mitjançant l'Ajut per Grups de Recerca Consolidats:

2001 SGR 00131
2005 SGR 00156

- Beca Pre-doctoral de Formació de Personal Investigador (FI) (Generalitat de Catalunya) pel període Gener 2003 – Desembre 2006.

Per la realització d'aquest treball s'ha disposat de la col·laboració de les bodegues del Grup Freixenet S.A.

Agraïments

Finalment, quan un arriba al final d'aquesta etapa pensa en totes les persones que en major o menor mesura han estat presents durant tots aquests anys de treball al laboratori. Sense tots, això no hauria estat possible, per aquest motiu:

A tothom, Gràcies.

Primerament, he de reconèixer que aquesta tesi no seria la mateixa sense "Las Jefas". Gràcies per acceptar que passés a formar part del vostre laboratori i tenir la porta del despatx oberta davant de qualsevol dubte. Susana, gràcies per posar una mica de pau quan les discussions amb l'Elvira pujaven de to. Per mantenir la distància prudencial, per controlar la feina que estava fent al laboratori i per proposar possibles sortides a la feina feta. Elvira, que haig de dir-te, crec que la paraula que millor ho resumeix tot és simplement, Gràcies. Han estat moltes hores (cafès, seminaris, dinars, vermutos, etc), i al llarg d'aquest temps fins hi tot hem fet feina, una tesi. Mai oblidaré la terrible frase "he estado pensando...", però la majoria d'aportacions tenien el seu sentit i m'han ajudat a millorar el treball final.

No puc oblidar-me de les companyes de grup, Montse, Stefania i Paqui. Junts hem tirat endavant aquest particular grup d'investigació (la nostra feina ens ha costat, oi?). Gràcies per haver-me ajudat en els meus inicis al laboratori i sempre que ho he necessitat, que no han estat poques vegades. M'heu ensenyat moltes coses i no únicament de feina. Joan, benvingut a la nau, tot i que a vegades et semblarà que tothom ha abandonat el vaixell i la cosa s'enfonsa, en el fons és un magnífic grup humà i de treball.

Menció especial tenen, i han de tenir, tots els companys de laboratori (Raül, Mireia, Alex, Anna, Marta, Maria i Rafa). Ells són els que m'han aguantat durant aquest temps, i creieu-me si us dic que no ha d'haver estat fàcil. Heu estat un bon motiu per anar a treballar cada matí. Mai podré oblidar a les meves nenes: Elena, Lulu i Mariluz. Com hauria estat possible tot això sense vosaltres?, gràcies per estar al meu costat i aguantar el meu dia a dia. Vull agrair-vos la vostra simpatia, alegria i paciència. Han estat moltes hores junts i sempre heu creat un bon ambient de treball.

També vull agrair a la resta de companys (no poso noms per no deixar-me a ningú) dels diferents grups d'investigació del departament (Greixos I, Greixos II i Amines). Tots heu estat presents en algun moment del meu treball i per tant tots heu participat. Així com tots els professors (PDI) i personal d'administració i serveis (PAS) del Departament de Nutrició i Bromatologia. En especial a la Rosa i la Cristina, per tot el suport i consells rebuts al llarg de tot aquest temps i les

bones estones passades en les diferents celebracions que hem compartit al laboratori de Vins.

Un record especial per la Dra. Elisa Sartini. Has estat tu qui m'ha ensenyat molt del que ara sé sobre cromatografia líquida i compostos fenòlics. Vas venir per fer una petita col·laboració i vas acabar fent un gran treball, que m'ha facilitat molt la feina. Moltes gràcies.

També vull agrair la col·laboració i suport continuat del Dr. Josep Caixach i de la Cintia. M'heu introduït en el sempre difícil món de l'espectrometria de masses, sense vosaltres una part molt important de la tesi no s'hauria pogut fer, espero seguir col·laborant d'ara endavant. Igualment, vull donar les gràcies al Dr. Josep Guadayol pel treball realitzat en l'extracció de volàtils i, a la Dra. Roser Vila i el Dr. Salvador Cañigueral per les diferents col·laboracions que encara tenim en funcionament.

No vull, ni puc, oblidar-me del Grup dels Drs. Diego Haro i Pedro Marrero: Mayo, Xisca, Mar, Mariona i Anna, us ha tocat compartir molts moments (dinars, bodes, visites al laboratori, etc) i no tots han estat dolents, oi? Gràcies per tots ells. M'heu permès desconnectar del meu grup i comprovar que "en todas las casas cuecen habas".

Nuria (i Antonio), hem compartit més que hores de feina, jornades gastronòmiques, boletaires, celebracions, etc. cosa que us agraeixo. A més a més, espero haver establert una bona amistat.

Tot i que una tesi requereix de molt temps al laboratori també hi ha vida fora i per això vull agrair l'amistat i suport especialment a l'Eloi, el Toni, l'Adam, el Xavi i a la resta d'amics.

M'agradaria donar les gràcies d'una manera molt especial a la família. Papa i Mama, probablement vosaltres sou els responsables del camí que he seguit, i vist amb certa perspectiva, haig de reconèixer que no ha anat tant malament. Elena, tu vas ser la primera que vas seguir la seva estela i em vas fer entrar amb més ganes el cuquet de la ciència, gràcies. Francesc, tu també has col·laborat a crear el caldo de cultiu científic de la família. Josep, Carme, Júlia i avi Paco també formeu part de la meva família i us vull agrair el vostre suport incondicional i necessari per la realització d'aquesta tesi.

Joana, que t'haig de dir que no sàpigues. Ets la persona que millor em coneix i la que m'ha donat més suport durant tots aquests anys de tesi. Tot i que poques vegades he expressat les meves preocupacions has estat al meu costat quan ho necessitava. Gràcies per ajudar-me a arribar al final del camí.

**La paciència és un arbre d'arrel amarga,
però de fruits molt dolços.**

Proverbi persa

Índex

I. Interès i objectius	1
II. Antecedents bibliogràfics	7
2.1 Elaboració del Cava	9
2.1.1 Obtenció del vi base: Vinificació en Blanc	11
2.1.1.1 Matèria primera: Raïm	11
2.1.1.2 Obtenció del most	13
2.1.1.3 Sulfitat i correccions	14
2.1.1.4 Primera fermentació	16
2.1.1.5 Estabilització post-fermentativa	17
2.1.2 Segona fermentació i presa d'espuma	18
2.1.2.1 Cupatge	18
2.1.2.2 Tiratge	19
2.1.2.3 Rima	20
2.1.2.4 Remogut	21
2.1.2.5 Degollament	22
2.2 Qualitat organolèptica: Aroma i color	24
2.2.1 Aroma del cava	24
2.2.1.1 Aroma primari	25
2.2.1.1.1 Aroma varietal	26
2.2.1.1.2 Aroma pre-fermentatiu	27
2.2.1.2 Aroma fermentatiu	29
2.2.1.3 Aroma post-fermentatiu o de cria	31
2.2.2 Color del cava	33
2.2.2.1 Compostos fenòlics	33
2.2.2.1.1 Compostos no flavonoides	34
2.2.2.1.2 Compostos flavonoides	35
2.2.2.2 Oxidació dels compostos fenòlics	36
2.2.2.2.1 Oxidació enzimàtica	37
2.2.2.2.2 Oxidació química	38
2.2.2.3 Altres fenòmens d'enfosquiment	39

2.2.2.4	Estudis d'estabilitat accelerada	40
2.3	Tècniques instrumentals per la determinació de compostos implicats	41
2.3.1	Mètodes d'extracció de compostos volàtils	41
2.3.1.1	Extracció i destil·lació simultània	42
2.3.1.1.1	Aparell Likens-Nickerson (LN)	43
2.3.1.2	Sistemes d'extracció de volàtils en espai de cap (Headspace)	44
2.3.1.2.1	Headspace dinàmic:	
Closed-Loop Stripping analysis (CLSA)		45
2.3.1.2.2	Headspace estàtic:	
Microextracció en fase sòlida (SPME)		47
2.3.2	Separació dels compostos implicats en les característiques organolèptiques	50
2.3.2.1	Separació cromatogràfica	50
2.3.2.1.1	Cromatografia de gasos (GC)	51
2.3.2.1.2	Cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC)	53
2.3.3	Detecció i identificació dels compostos implicats en les característiques organolèptiques	54
2.3.3.1	Detector de masses (MS)	55
2.3.3.2	Diode array detector (DAD)	56
2.3.4	Mètodes d'elucidació estructural	57
III.	Metodologia i pla de treball	61
3.1	Marcadors volàtils i semi-volàtils de la qualitat durant la cria i l'emmagatzematge	65
3.1.1	Evolució dels volàtils durant la rima real i possibles marcadors de cria	65
3.1.2	Perfil aromàtic de caves comercials i possibles nous marcadors de qualitat	66
3.1.3	Evolució dels volàtils durant una cria i emmagatzematge accelerats	67
3.2	Determinació d'indicadors no volàtils de la qualitat al llarg de la cria i emmagatzematge	68
3.3	Mètodes utilitzats	69
3.3.1	Disseny del test accelerat	69
3.3.2	Tècniques instrumentals	71

IV. Resultats i discussió	73
4.1 Marcador volàtils i semi-volàtils de la qualitat durant la criança i l'emmagatzematge	75
4.1.1 Evolució dels compostos volàtils del cava (vi espumós) durant períodes llargs de criança en contacte amb els llevats de la segona fermentació	76
4.1.2 Perfil volàtil de vins espumosos obtingut mitjançant tres mètodes d'extracció i anàlisi per cromatografia de gasos-espectrometria de masses (GC-MS)	85
4.1.3 Evolució dels volàtils durant una criança i emmagatzematge accelerats	97
4.1.3.1 Caves amb criança accelerada	98
4.1.3.2 Caves comercials amb emmagatzematge accelerat	105
4.1.4 Evolució de nous marcadors de qualitat de caves comercials amb emmagatzematge accelerat	109
4.2 Marcadors no volàtils de la qualitat durant la criança i l'emmagatzematge	115
4.2.1 Test accelerat durant la criança i l'emmagatzematge de vi espumós "Cava"	116
4.2.2 Aplicació de l'espectrometria de masses per l'elucidació estructural d'un marcador de criança de vi espumós "Cava"	139
V. Comentari dels resultats	157
VI. Conclusions	163
VII. Referències bibliogràfiques	167

Annex I: Abreviatures

Annex II: Compostos identificats

Interès i objectius

I. Interès i objectius

Les dades de producció i consum de Cava, vi escumós de qualitat produït en una regió determinada (v.e.q.p.r.d.), elaborades pel Consell Regulador, mostren un increment sostingut de la producció total al llarg dels últims anys, assolint l'any 2006 els 224890 milions d'ampolles de les quals el 55% es van destinar a l'exportació. Aquestes mateixes dades, de l'any 2006, mostren que el principal destinatari d'aquest tipus de vi en el mercat interior és l'àmbit privat (69%), sent el principal sistema de distribució d'aquest tipus de productes les ventes a supermercats i a hipermercats (71%).

Les dades de producció demostren la importància econòmica i social del cava, tanmateix per mantenir i incrementar aquest índex de producció i consum és necessari mantenir una qualitat del producte i, en la mesura del possible, incrementar-la.

La qualitat d'un aliment es defineix per la capacitat de satisfer les necessitats explícites o implícites del consumidor (ISO 8402:1994). Dins aquest conjunt de necessitats podem englobar les característiques sensorials, les propietats nutricionals, la composició química així com els possibles defectes. Tanmateix, el consumidor, en el moment d'efectuar l'elecció del producte, està condicionat principalment per les qualitats sensorials o organolèptiques d'aquest, entre les quals s'inclouen l'aparença, la textura, l'aroma i el gust.

Els caves són begudes que es consumeixen sobretot per raons fruitives i els factors que més n'afecten l'elecció per part dels consumidors són l'aparença i l'aroma. Aquest últim aspecte és, probablement, el més complex, ja que hi participen centenars de substàncies volàtils i semi-volàtils de diferents famílies químiques que es poden trobar en intervals de concentració molt variables.

Interès i Objectius

L'umbral de percepció d'aquells compostos que condicionen l'aroma pot ser molt diferent, de manera que determinats compostos presents a molt baixes concentracions ($\mu\text{g/L}$) són ràpidament detectats per l'olfacte i en canvi, altres compostos requereixen altes concentracions (mg/L) per poder ser percebuts. En aquest sentit, l'impacte sensorial és el que ens informa de la intensitat aromàtica de cada compost. Així, trobem que substàncies presents a molt baixa concentració poden ser determinants per l'acceptació o rebuig d'un producte, mentre que substàncies presents a elevades concentracions poden no afectar a l'acceptabilitat del producte.

Aquest comportament dels compostos aromàtics fa difícil seleccionar un mètode analític que sigui útil per la valoració qualitativa i quantitativa de la fracció volàtil simultàniament. A més a més, les metodologies que permeten l'estudi dels compostos que incideixen en l'aroma requereixen, normalment, d'una etapa prèvia d'aïllament. Això suposa, en molts casos, procediments llargs, laboriosos i sovint costosos, que moltes vegades provoquen la pèrdua d'analits i/o la formació d'artefactes.

El color del cava prové dels compostos fenòlics del raïm que acaben formant part dels caves. No obstant, aquests compostos s'oxiden amb facilitat alterant el color del producte. L'estabilitat del color del cava a llarg del procés d'elaboració, així com durant la distribució i l'emmagatzematge, és un aspecte de gran interès per les bodegues elaboradores. L'origen de l'alteració del color varia en funció de l'etapa del procés d'elaboració. De manera que, en els raïms i el most la principal via d'enfosquiment és d'origen enzimàtic. Per aquest motiu, s'addiciona SO_2 al most per bloquejar aquests processos gràcies a la seva capacitat antioxidant. Un cop s'ha obtingut el vi, els fenòmens d'enfosquiment solen produir-se per altres reaccions químiques poc estudiades fins al moment.

Un dels problemes més importants que se li planteja a la indústria elaboradora de cava entorn al tema de la qualitat dels seus productes és tenir variables objectives que permetin estandaritzar-la. En el cas del cava, tot i disposar d'una

Interès i Objectius

legislació pròpia (B.O.E. 189278:37587-93, 1991) i d'un consell regulador que és qui determina els paràmetres de qualitat que s'han de superar per poder assolir la D.O. Cava, cadascuna de les bodegues ha de disposar d'uns paràmetres de control propis que aporten informació de les propietats organolèptiques concretes dels seus productes.

En els caves, la criança en contacte amb els llevats de la segona fermentació suposa una sèrie de canvis de tipus fisicoquímics i/o biològics conduïts per enzims produïts pels llevats. Aquestes modificacions proporcionen unes sensacions aromàtiques als caves que tenen gran acceptació en el mercat. El desenvolupament d'aquestes notes aromàtiques justifica els llargs períodes de rima (més de 24 mesos) al que es sotmeten els caves d'alta gama i, en conseqüència, d'elevat preu de venda. No obstant, no es coneix quin és el límit de temps de criança a partir del qual pot començar una disminució de la qualitat. Actualment, les bodegues realitzen el control de la qualitat organolèptica mitjançant l'anàlisi sensorial que té un alt component subjectiu. Així, els elaboradors de caves voldrien disposar de paràmetres objectius per poder controlar la qualitat organolèptica al llarg del procés de rima. Entenent que els marcadors de rima o criança podrien significar un increment de la qualitat organolèptica del producte.

Un cop s'han separat els llevats i s'ha addicionat el licor d'expedició comença la vida comercial del cava. Les condicions a què és sotmès el cava durant l'emmagatzematge i/o la distribució afecten les seves característiques organolèptiques. Empíricament, els enòlegs saben que el temps de vida comercial és un factor que juga en contra de la qualitat organolèptica del producte. Com que el temps que transcorre des de l'expedició fins que el cava es consumeix és imprevisible i que les condicions d'emmagatzematge no poden ser controlades per la bodega, els productors voldrien disposar de marcadors objectius dels canvis que es produeixen. De manera que els indicadors de temps d'emmagatzematge podrien interpretar-se com un demèrit de la qualitat.

Interès i Objectius

Per aquestes raons, l'objectiu que es formula en aquesta tesi doctoral és:

- Proposar marcadors químics de criaça i de vida comercial.

Així doncs, els objectius concrets pretenen respondre a un interès empresarial:

1. Caracteritzar la fracció volàtil del cava amb la finalitat de trobar aquells compostos volàtils que puguin ser utilitzats com indicadors de la qualitat aromàtica durant la criaça i l'emmagatzematge.
2. Determinar possibles indicadors químics no volàtils relacionats amb l'envelliment del cava que es poden desenvolupar al llarg de la criaça i durant l'emmagatzematge.

Antecedents Bibliogràfics

II. Antecedents Bibliogràfics

El procés d'elaboració del cava és tecnològicament complex i està afectat per una normativa reguladora específica (BOE 189278:37587-93, 1991). A continuació s'exposaran les principals etapes d'elaboració del cava i els factors que en determinen les qualitats organolèptiques de l'aroma i del color. A més, s'efectuarà una descripció de la metodologia analítica disponible per la determinació dels compostos implicats en les característiques sensorials d'aquests vins escumosos.

2.1 *Elaboració del Cava*

El Cava és un vi escumós de qualitat produït en una regió determinada (v.e.c.p.r.d, Council Regulation EC 1493/1999), segons el mètode tradicional o mètode *champenoise*. Amb la finalitat de reglamentar la qualitat i protegir-ne la producció es va crear la Denominació d'Origen Cava (D.O. Cava). Aquesta denominació d'origen inclou diferents regions del territori nacional, tot i que la major part (98%) del cava és produït a Catalunya. El Reglament de la Denominació Cava i del seu Consell Regulador (BOE 189278:37587-93, 1991) marca els diferents punts crítics en els quals la qualitat del producte final es pot veure afectada.

El procés d'elaboració del cava consta de dos etapes clarament diferenciades, la vinificació en blanc del raïm i la segona fermentació, en botella tancada, del vi base. Mentre que amb la primera etapa s'obtenen els vins blancs, amb els quals

s'efectua el cupatge, durant la segona és quan s'obté el vi escumós amb el diòxid de carboni a pressió (6 atm).

Al llarg dels següents apartats es descriuran les etapes més importants de l'elaboració del cava i els factors que més incideixen en la qualitat del producte final. A la figura II – 1 s'esquematitza el procés des de la matèria primera, el raïm, fins el producte final, el Cava.

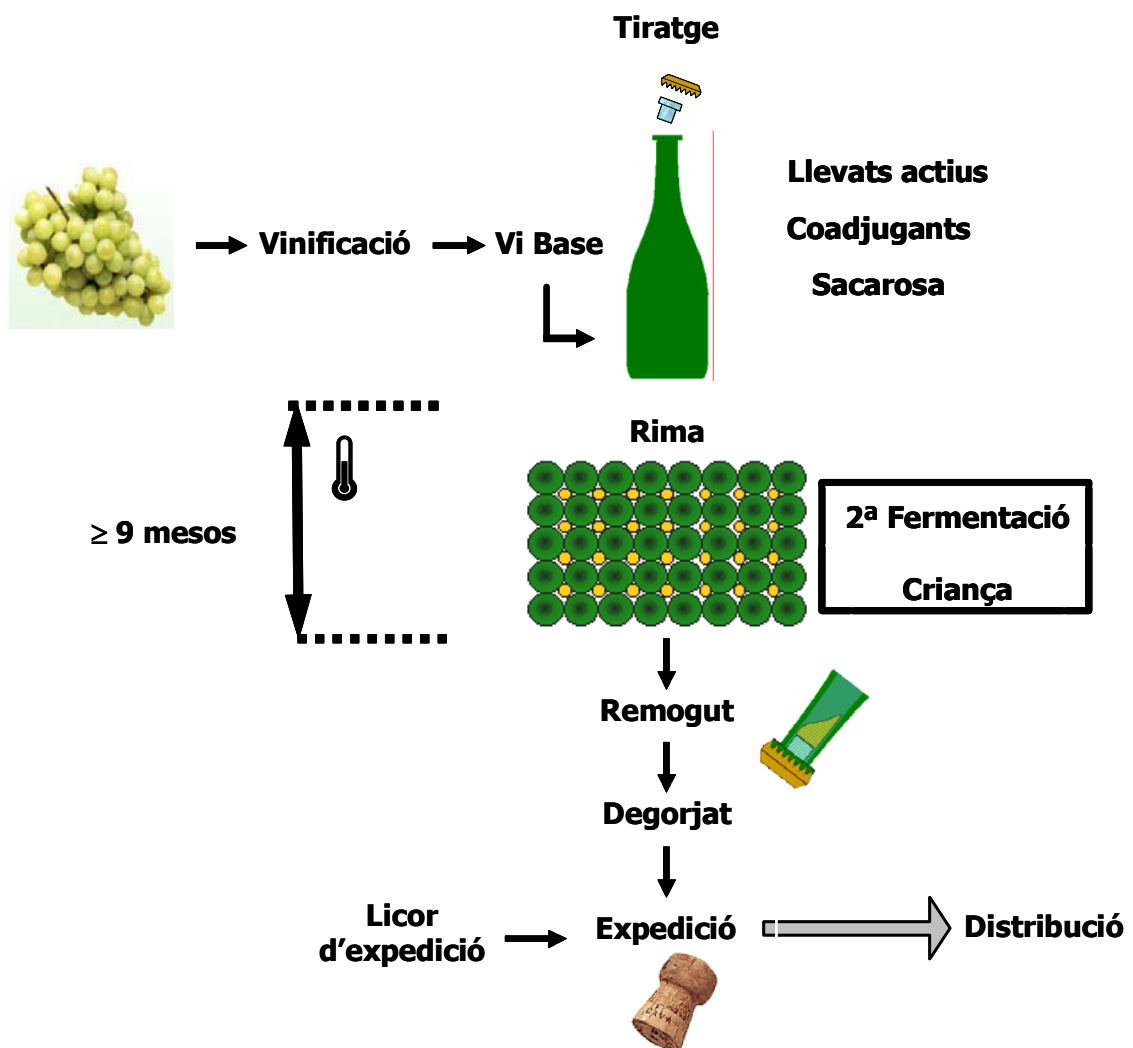


Figura II - 1: Esquema del procés d'elaboració del cava mitjançant el mètode tradicional.

2.1.1 Obtenció del vi base: Vinificació en blanc

2.1.1.1 Matèria primera: Raïm

A l'hora d'obtenir un vi base de qualitat hi ha una sèrie de factors que cal tenir en compte, ja que condicionen la matèria primera a partir de la qual es produirà el cava. En aquest sentit, el sòl es considera el factor més determinant pel creixement del raïm. Les característiques edafològiques (acidesa o alcalinitat del terreny) i el clima són variables pròpies de la zona geogràfica que condicionen l'obtenció d'uns raïms d'òptima qualitat (Figura II-2).



Figura II - 2: Factors que condicionen la qualitat de la matèria primera

La integritat física del gra de raïm, l'estat fitosanitari, així com les varietats emprades condicionen la qualitat del vi base que s'elabori (Andrés-Lacueva et al. 1996a, 1996b i 1997; López-Barajas et al. 1997 i 1998; Moreno-Arribas et al. 2000; Marchal et al 2001; Seneé et al. 1999). Els raïms han d'estar lliures d'infeccions fúngiques, aspecte que és necessari controlar mitjançant inspeccions visuals durant la maduració del fruit. Sovint la infecció es produeix

poc abans de la verema, quan la pell del raïm ja és molt fina i els tractaments fitosanitaris no representen una opció. Un dels fongs amb més incidència a la vinya és el *Botrytis cinerea* el qual pot aparèixer quan es produeixen pluges abundants durant l'estiu. Els efectes d'aquesta infecció en la qualitat del vi base són molt notables, ja que disminueix el contingut de nitrogen i sucres, atenua l'aroma, provoca un ràpid enfosquiment del most i augmenta els nivells d'àcids com l'àcid acètic.

Les varietats de raïm autoritzades per obtenir el vi destinat a l'elaboració de cava són: garnatxa negra, monestrell i *pinot noir* com a varietats negres i macabeu o viura, xarel·lo, parellada, malvasia i *chardonay* com a varietats blanques. Sent el macabeu, xarel·lo i parellada les més emprades.

Per tal d'obtenir un vi base òptim el moment de recol·lecció és determinant. Aquest es determina en funció del contingut de sucres acumulats al raïm. En zones càlides el raïm pot acumular fins a 26 g de sucre / 100 mL de most (28°Brix). Tanmateix, per l'elaboració de vins blancs se sol realitzar la verema quan el grau de maduració del raïm se situa entre 20,5 i 22,5 °Brix, cosa que permetrà obtenir un vi base amb un grau alcohòlic potencial entre 11,3 i 12,6 % (v/v).

Segons els treballs de Noble et al. (1975) i Wagener (1980) no hi ha diferències en la qualitat del vi base segons el tipus de recol·lecció, manual o mecanitzada. Tanmateix, el raïm recol·lectat es recomana que sigui dipositat en caixes perforades de capacitat limitada de pes per tal de preservar la integritat del gra fins que aquest arriba a la premsa de la bodega. D'aquesta manera, es minimitzen els processos d'enfosquiment i fermentació incontrolada del most. En aquest sentit, també es recomana reduir al màxim el temps entre la recollida i el premsat.

2.1.1.2 Obtenció del most

Un dels aspectes que caracteritza el mètode tradicional és el tipus de premsat que s'efectua del raïm per tal d'obtenir un most de màxima qualitat. Convé que el premsat sigui molt suau i ràpid per evitar extreure productes de la pell o de la raspa, que es consideren com a contaminants naturals, ja que augmenten els fangs, els compostos que aporten color, així com els aromes herbacis.

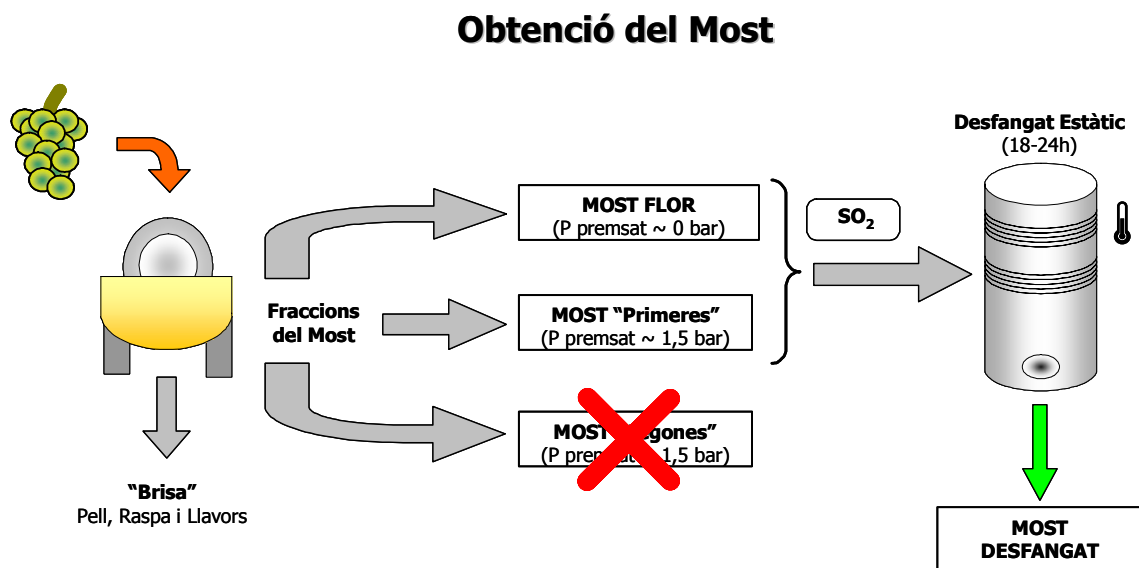


Figura II – 3: Obtenció del most per premsat champenoise, sulfitat i clarificació pre-fermentativa.

Per l'obtenció del most destinat a l'elaboració de cava s'efectua un premsat fraccionat (premsat *champenoise*), de manera que primer s'apliquen pressions suaus ($P \sim 0$ Bar) que permeten obtenir el most flor o *cuvée*, i, a mesura que s'augmenta la pressió, es produeixen les fraccions primeres i segones. Aquestes últimes es destinen a produir vins més afruitats i de ràpida evolució (figura II – 3).

Els equipaments recomanats pel premsat *champenoise* són premses hidràuliques de base ampla i tremuja de poca alçada, que han estat

automatitzades al llarg dels últims anys. Paral·lelament s'han desenvolupat premses pneumàtiques de membranes laterals que permeten respectar al màxim la qualitat del raïm.

2.1.1.3 Sulfitat i Correccions

El sulfitat és una etapa prèvia a la fermentació molt necessària per tal de conservar la qualitat del most fins la primera fermentació, durant la primera fermentació, així com la qualitat del vi base. El SO_2 actua com a antioxidant, impedit l'oxidació dels compostos fenòlics per acció dels enzims polifenoloxidasas. A més, també té funcions com a conservant gràcies a la seva activitat antimicrobiana, impedit fermentacions no desitjades.

El sulfitat es realitza al most a la sortida de la premsa (figura II – 3) i no sobre el raïm, ja que la dosis de SO_2 depèn de la qualitat del most obtingut (cuvè o fraccions). Quan més àcid sigui un most, ja sigui de forma natural o per correcció de l'acidesa, menor serà la quantitat necessària de SO_2 per controlar la fermentació. Això es degut al fet que el pH del most determina la forma en que es troba el SO_2 (figura II - 4). Quan més àcid és el most més desplaçat es troba l'equilibri de la figura II – 4 cap a la forma SO_2 molecular (lliure), que és el que realment té activitat antimicrobiana. A mesura que augmenta el pH es formen el bisulfit (HSO_3^-) i el sulfit (SO_3^{2-}), que poden reaccionar amb els grups carbonil, com el de l'acetaldehid formant SO_2 lligat que no té activitat antimicrobiana, però que exerceix altres accions també interessants com és el bloqueig de compostos i l'acció antioxidant (figura II – 3).

Formes del SO₂ presents al cava

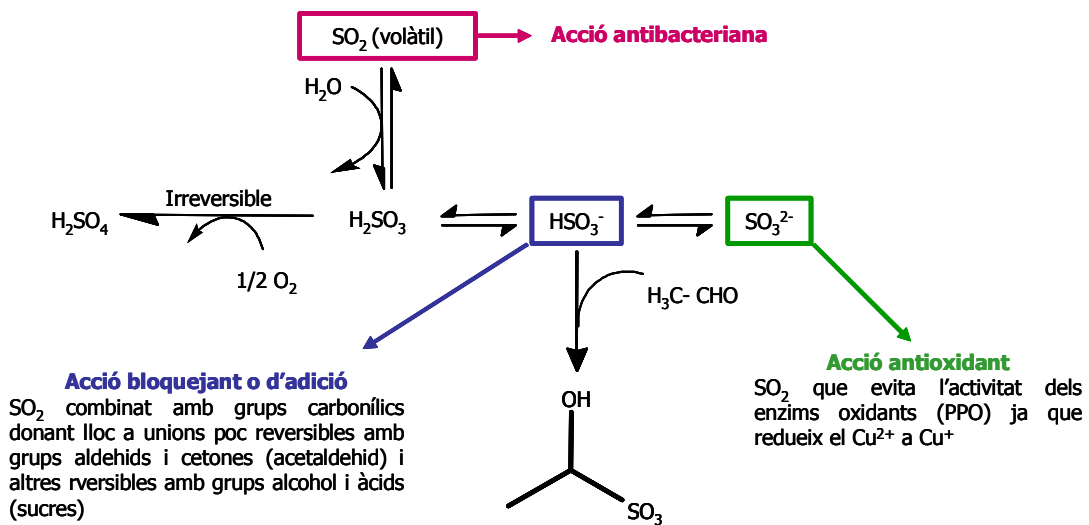


Figura II – 4: Equilibris del SO₂ que es presenta en el cava.

Un cop el most ha estat ensulfatat s'ha de desfangar (figura II – 3) per tal de reduir els sòlids en suspensió des de valors de 1 – 2 % en el most cuveà a valors inferiors al 0,5 %. Aquest desfangat pot efectuar-se de forma dinàmica (filtració) o estàtica (decantació refrigerada). Un cop s'ha realitzat aquesta clarificació el most està llest per dipositar-se al tanc de fermentació.

Els mostos procedents de raïms poc madurats tenen uns continguts insuficients de sucres naturals cosa que produiria un vi de baix grau alcohòlic. Per tal d'augmentar el grau alcohòlic d'aquests productes s'addicionen en aquest moment mostos concentrats. Aquesta correcció és característica de climes freds on es difícil assolir graus de maduració òptims.

També, com a conseqüència del desfangat i de la posterior fermentació i clarificació post-fermentativa, es produeix una disminució dels continguts d'àcid tartàric, de manera que disminueix l'acidesa del vi i és fa més inestable. Per

aquest motiu en els mostos, especialment els de raïms de climes càlids, s'efectua la correcció de l'acidesa mitjançant l'addició d'àcid tartàric.

2.1.1.4 Primera fermentació

La fermentació és conduïda a través de l'addició al most dels llevats (*Saccharomyces cerevisiae*) seleccionats per la bodega, de manera que s'obtingui una fermentació completa del most sense produir productes organolèptics negatius (com poden ser els aromes de reducció tipus mercaptans, acetat d'etil, àcid acètic, etc) (figura II – 5).

L'addició dels llevats que conduiran la segona fermentació, les correccions anteriorment comentades i l'addició de clarificants per facilitar la clarificació post-fermentativa s'efectua mitjançant el que es coneix com a addició del peu de cuba.

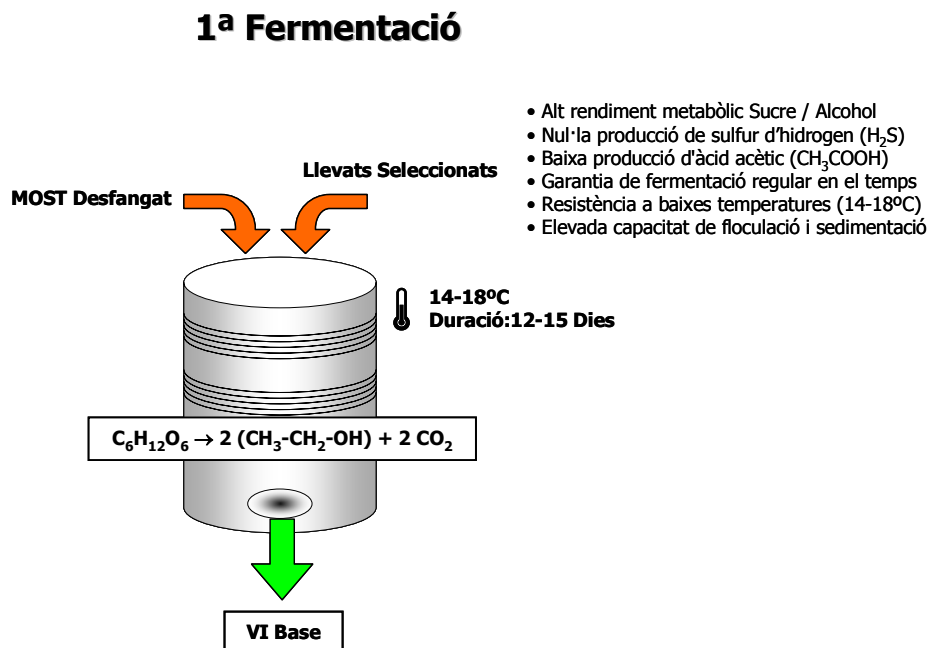


Figura II – 5: Esquema de la primera fermentació del most amb la qual s'obté el vi base.

El control de la fermentació s'efectua a través de la temperatura que es manté entre 10 – 15°C. Amb valors de temperatura per sota dels 18°C s'afavoreix la formació esters afruitats, mentre que per valors superiors s'afavoreix la formació d'alcohols de cadena llarga (isoamil alcohol i hexanol) (Usseglio-Tomasset et al. 1983 i Margheri et al. 1984). A més de controlar la temperatura del most durant la fermentació, es registra la densitat per seguir la correcta conversió dels sucres en alcohol i per assegurar la correcta evolució de la fermentació.

2.1.1.5 Estabilització post-fermentativa

La clarificació del vi base és, en general, poc intensa, ja que no convé eliminar totes les macromolècules per evitar posteriors problemes d'espuma en el cava, al actuar aquestes de suport en l'emulsió aire – líquid de l'escuma. A més, una clarificació molt intensa tampoc és necessària, ja que durant el tiratge el cupatge adquireix novament turbidesa degut als llevats de la segona fermentació i als additius de tiratge.

Normalment, les clarificacions físiques per sedimentació i transvàs són suficients per netejar el vi, gràcies a la prèvia addició de clarificants. Tanmateix, si el vi presenta defectes aquests es poden corregir emprant bentonites, gelatines o filtracions.

Després de la clarificació els vins base es sotmeten a l'estabilització tartàrica. Aquesta té per objectiu evitar la formació i posterior precipitació de cristalls de tartrat durant l'envelliment, els quals poden actuar com a nuclis de formació de bombolles de CO₂ i produir una sortida incontrolada de cava durant la rima o el degorjat. A més, l'eliminació del tartrat insoluble és necessari per evitar la seva

precipitació a l'ampolla de cava que rep el consumidor ja que el cava es consumeix fred.

L'estabilització tartàrica pot efectuar-se per mètodes químics (addició d'inhibidors de la cristallització) o per mètodes físics com el fred, que insolubilitza i precipita l'excés de tartàric.

Un cop s'ha efectuat l'estabilització tartàrica el vi ja està llest per tal que l'enòleg efectui el cupatge o mescla de vins base adequada. El vi base destinat a la producció de cava ha de complir les característiques analítiques que es descriuen a la norma (BOE 189278:37587-93, 1991):

- Graduació alcohòlica adquirida: Mínima: 9,5 % (v/v) - Màxima: 11,5 % (v/v)
- Acidesa total mínima (en àcid tartàric): 5,5 g/L
- Extracte sec no reductor: Mínim: 13g/L - Màxim: 22 g/L
- Acidesa volàtil total (en àcid acètic): Inferior a 0,60 g/L
- Anhídrid sulfurós total: Inferior a 140 mg/L
- Cendres: Mínim 0,70 g/L – Màxim: 2 g/L
- pH: Mínim 2,8 – Màxim 3,3

2.1.2 Segona fermentació i presa d'escuma

2.1.2.1 Cupatge

És provablement l'operació més crítica i empírica de tot el procés d'elaboració del cava. Aquí és on l'enòleg ajusta les proporcions de cada vi blanc monovarietal per obtenir un producte final el més equilibrat possible al llarg de la criança i que evolucioni correctament durant la segona fermentació i rima.

2.1.2.2 Tiratge

Consisteix en l'addició del peu de cuba a la mescla de vins base (cupatge). El peu de cuba està format per una biomassa de llevats seleccionats, sucres i coadjuvants de tiratge (clarificants, nutrients pels llevats, etc). Els vins s'hauran de mesclar amb els llevats i els sucres per tal de formar una suspensió homogènia que permeti una segona fermentació completa, on a mesura que es consumeixin els sucres s'alliberarà el diòxid de carboni responsable de la pressió de la botella (figura II – 6).

La preparació dels llevats o peu de cuba pot ser en discontinu (es prepara un nou peu de cuba cada setmana) o en continu (cada dia s'omple la part gastada del tanc dels llevats amb vi, aigua i sucres). Els peus de cuba, a més a més, necessiten de l'aport d'oxigen (per aireació o injecció) i de nitrogen (fosfat diamònic). Aquest dos factors són limitants per la correcta evolució dels llevats ja que a la temperatura i concentració d'alcohol els llevats tenen un creixement limitat.

Després de l'addició del licor de tiratge les ampolles són tapades amb un obturador de polietilè i, finalment, amb un tap corona que és el que assegura que l'ampolla quedi hermèticament tancada. Aquest tancament ha de ser capaç d'aguantar les 6 -8 atm de pressió durant el temps de cria del cava (rima).

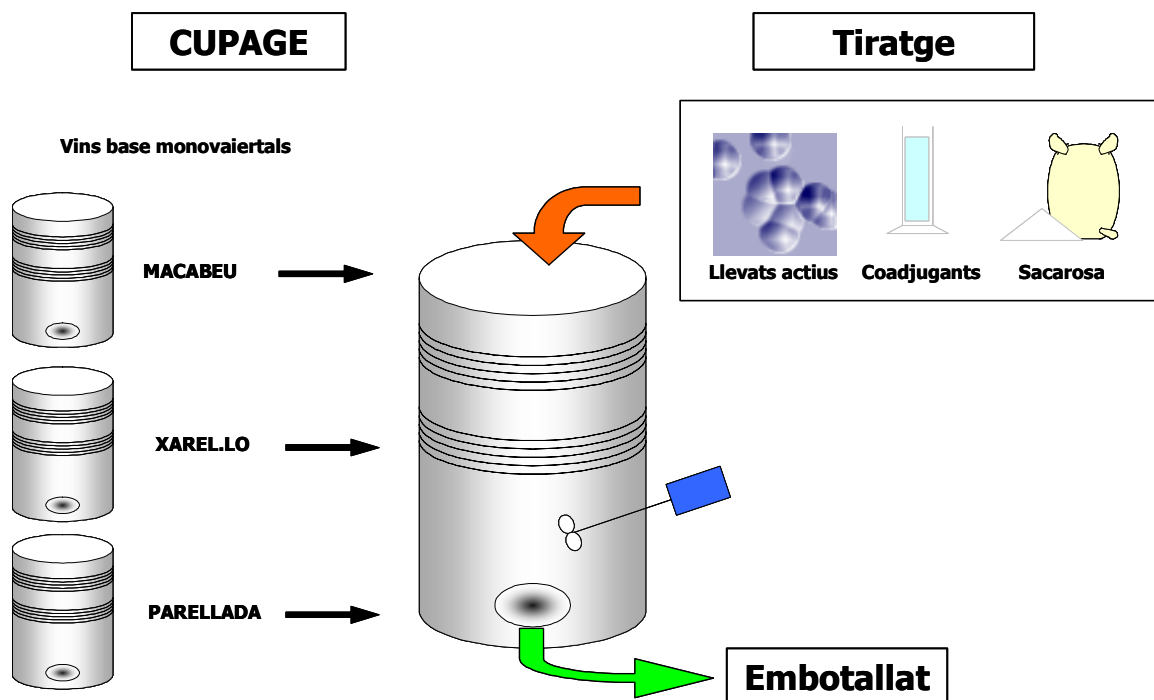


Figura II – 6: Preparació del cupatge i addició del licor de tiratge previ a l'embotellat.

2.1.2.3 Rima

Un cop les ampolles han estat dosificades amb el licor de tiratge i tapades hermèticament es dipositen a la cava en rima (horitzontalment), en caixes de fusta o metàl·liques, per tal que es produeixi la segona fermentació. Aquesta es produeix a l'interior de l'ampolla hermèticament tancada i té una duració aproximada d'entre 1 i 3 mesos. Les condicions adequades per que es produeixi una segona fermentació correcta són: temperatura controlada (5 – 15 °C), absència de corrents d'aire i d'olors estranys, protecció de la llum (especialment pels raigs ultraviolats) i humitat relativa baixa.

Durant la segona fermentació, i després de la pèrdua de viabilitat dels llevats, es produeixen una sèrie d'intercanvis entre les cèl·lules i el vi que aporten personalitat a aquests tipus de begudes. Segons la normativa de la

Denominació d'Origen Cava (BOE 189278:37587-93, 1991) la fase de rima, durant la qual es produeix la segona fermentació, ha de tenir una duració mínima de 9 mesos, tot i que pels caves d'alta categoria aquest període es pot allargar fins a 5 anys.

2.1.2.4 Remogut

Juntament amb la presa d'espuma el remogut és una de les etapes més característiques del mètode *champenoise*. Aquesta etapa consisteix en acumular al coll de l'ampolla els llevats morts de la segona fermentació per ser eliminats posteriorment. Per aconseguir-ho és necessari realitzar una sèrie de moviments rotatius successius i un aixecament de les ampolles per tal d'anar desplaçant els sòlids. D'aquesta manera els llevats morts queden acumulats al coll de l'ampolla quan aquestes queden disposades en punta (cap per avall).

Diferents treballs (Athanasios et al. 2003; Efremenko et al. 2006; Fumi et al. 1988; Yokotsuka et al. 2007) estudien l'efecte d'utilitzar llevats immobilitzats per efectuar la segona fermentació, per tal de facilitar l'etapa del remogut. Aquest estudi conclouen que es poden obtenir vins espumosos similars sense alteració de la turbidesa ni del temps de fermentació. Aquestes noves tecnologies requereixen, però, de gran especialització tècnica i d'un tiratge en condicions quasi estèrils per evitar el desenvolupament de llevats contaminants que serien difícils d'eliminar. Tots aquests requeriments fan que siguin sistemes cars, no aplicables als processos d'elaboració estàndards per part de les bodegues.

El remogut pot efectuar-se de forma manual o automatitzada. El principal problema que ofereix el remogut manual no és la mà d'obra, ja que un expert pot arribar a girar de l'ordre de 40.000 a 45.000 ampolles per dia, sinó l'espai necessari. Un pupitre tradicional que permet remoure 120 ampolles ocupa 1 m²

i pot tenir entre 7 i 8 cicles per any. Els sistemes automatitzats permeten una càrrega superior d'ampolles i uns 50 cicles per any. A més, el remogut automatitzat permet assegurar una igual qualitat de tota la producció, ja que el remogut al ser un fenomen únicament físic és més ben reproduït a totes les ampolles per una màquina.

2.1.2.5 Degollament

Consisteix en eliminar el sediment desplaçat al coll de l'ampolla, dosificar el licor d'expedició i tapar l'ampolla amb el tap de suro definitiu. Són una sèrie d'operacions mecanitzades que permeten tractar de 1.200 a 12.000 ampolles per hora. Per tal d'eliminar els sediments que s'han desplaçat al coll de les ampolles es procedeix a congelar el coll, posteriorment s'elimina el tap corona i l'obturador de plàstic, de manera que la pressió interna del cava expulsa el coll amb els sediments congelats juntament amb una part de cava. El volum de cava perdut és reomplert amb el licor d'expedició, la composició del qual sol ser un gran secret de cada bodega. Tot i que, de manera general, està formada per vi, SO₂ i sucres (excepte per la qualitat brut nature).

Amb aquesta addició de licor d'expedició es pot ajustar el contingut de sucres dels caves d'acord amb la legislació vigent (BOE 189278:37587-93, 1991). Segons aquesta, les diferents categories de caves s'anomenen:

Brut Nature: Menys de 3g/L (sense addició de sucres
després de la segona fermentació)

Extra Brut: Fins 6 g/L

Brut: Fins 15 g/L

Extra-sec: Entre 12 – 20 g/L

Sec: Entre 17 – 35 g/L

Semi-sec: Entre 33 – 50 g/L

Antecedents Bibliogràfics

Dolç: Més de 50 g/L

Un cop s'ha addicionat el licor d'expedició es procedeix a tancar l'ampolla amb el tap de suro definitiu. Tot i que el tap de suro pot aportar al cava aspectes positius, el gust a suro és encara la problemàtica més gran dels caves. Un cop s'ha introduït el tap definitiu es procedeix a l'etiquetat i a l'emmagatzematge de les ampolles fins a la seva comercialització. Tot i que tradicionalment s'havia considerat que l'emmagatzematge s'havia de produir en posició horitzontal per tal de no perdre pressió, la posició vertical és igualment correcta per la conservació del cava fins a la seva venda.

Finalitzat el procés d'elaboració del cava, aquest, igual que els vins base, ha de complir amb unes característiques analítiques que es descriuen a la norma (BOE 189278:37587-93, 1991):

- Graduació alcohòlica adquirida: Míxima: 10,8 % (v/v) - Míxima: 11,8 % (v/v)
- Acidesa total mínima (en àcid tartàric): 5,5 g/L
- Extracte sec no reductor: Mínim: 13g/L - Míxim: 22 g/L
- Acidesa volàtil real (en àcid acètic): Inferior a 0,65 g/L
- Anhídrid sulfurós total: Inferior a 160 mg/L
- Cendres: Mínim 0,70 g/L - Míxim: 2 g/L
- pH: Mínim 2,8 – Míxim 3,3
- Sobrepressió mínima: 3,5 bar a 20°C

Durant l'emmagatzematge i posterior distribució del producte acabat els factors que més afecten a la qualitat del cava són la temperatura i la llum. Per aquest motiu se solen utilitzar ampolles de vidre verd que protegeixen el cava de la llum.

2.2 Qualitat organolèptica del cava: Aroma i Color

La qualitat organolèptica és la responsable última que condicionarà l'elecció del producte per part dels consumidors. En aquest sentit, l'aroma (olfacte) juntament amb el color (vista) són probablement els dos factors discriminats que més afecten a la percepció de la qualitat del cava.

En aquesta secció de la memòria es pretén efectuar una revisió bibliogràfica dels aspectes que han estat objecte d'estudi durant la realització de la tesi doctoral, l'estudi de la fracció volàtil i dels compostos fenòlics del cava al llarg de la criança i l'emmagatzematge.

2.2.1 Aroma del Cava

Hi ha nombrosos compostos i amb nivells de concentració molt diferents, des de ng/L fins a g/L, implicats en la percepció de l'aroma del cava (Ferreira et al. 2002). A més, cada substància té un llindar olfactiu diferent. Es coneix per llindar olfactiu (gust) aquella concentració mínima d'una substància que és captada per com a mínim el 50% de la població de catadors. El llindar de cada compost químic està determinat per l'estructura química, la polaritat, el pes molecular, etc. Tanmateix, un compost que es troba present a molt baixa concentració pot tenir un paper molt important en l'acceptació o rebuig d'un producte. Així, es defineix com impacte olorós d'un compost la intensitat d'estímul que és capaç de produir, la qual és independent de la concentració.

En els caves, igual que en els vins, hi ha molts processos i transformacions químiques, bioquímiques i tecnològiques implicades en l'aroma, de manera que l'origen d'aquest en el cava és molt complex. Alguns autors afirmen que en

l'aroma dels vins estan implicats més de 800 substàncies volàtils, de les quals únicament prop de 50 afecten decisivament, amb un impacte olorós determinant (Ferreira et al. 2002).

La classificació dels aromes pot respondre a diferents criteris com poden ser origen, grups funcionals, característiques sensorials, etc. Tanmateix, la més habitual sol ser la classificació dels aromes en funció de l'etapa del procés d'elaboració en què es formen. D'aquesta manera parlem d'aroma primari (varietal i pre-fermentatiu), secundari (fermentatiu) i terciari (post-fermentatiu i de cria).

2.2.1.1 Aroma primari

El potencial aromàtic del raïm inclou els diferents components que es troben presents en el gra i que caracteritzen les diferents varietats (Gunata et al. 1990; Francis et al. 1992; Marais et al. 1992; Razungles et al. 1993; Carro-Mariño et al. 1995; Williams et al. 1995; López-Tamames et al. 1997; Bonnländer et al. 1998). Dins el potencial aromàtic del raïm podem distingir:

- Substàncies oloroses lliures que ja estan presents en el gra de raïm (aroma varietal lliure)
- Precursors aromàtics (aroma pre-fermentatiu):
 - a) Precursors d'origen varietal que per acció de les transformacions químiques, bioquímiques i tecnològiques alliberen les substàncies volàtils (glicòsids, compostos fenòlics, etc)

b) Precursors que poden ser o no volàtils però que per la seva reactivitat es transformen en altres compostos volàtils (terpenols, norisoprenoids, etc)

2.2.1.1.1 Aroma varietal

Els terpenols són el grup més ampli (es poden citar més de 70 compostos terpènics identificats en el vi) (Zalacain et al. 2007) de substàncies volàtils lliures presents al raïm. Aquests compostos es troben de forma quasi intacte o relativament poc transformats en el vi.

Biogènesi de Monoterpens i Sesquiterpens

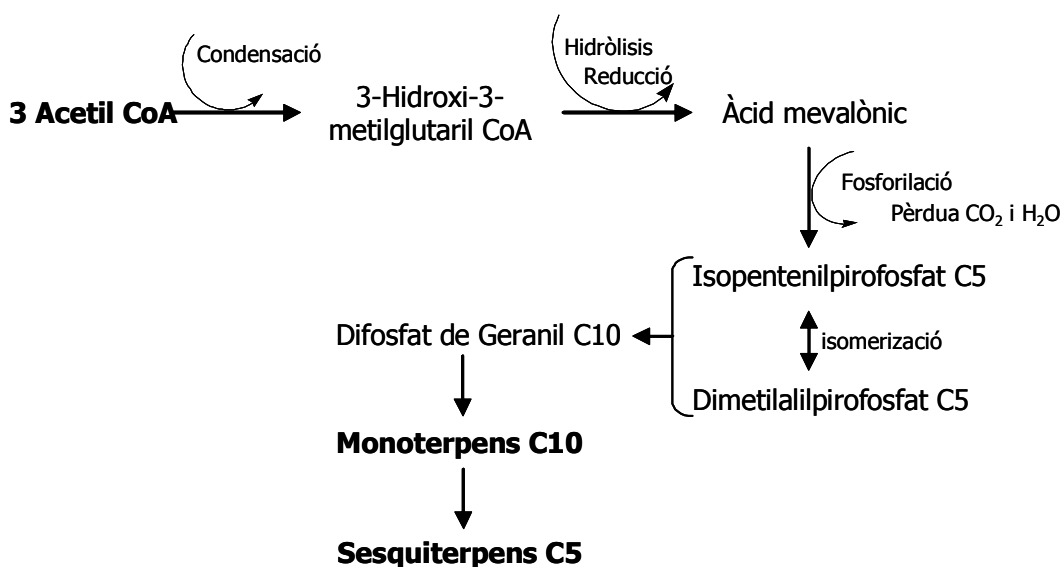


Figura II – 7: Biogènesi de mono i sesquiterpens a partir de l'acetil-CoA.

La biosíntesi d'aquests compostos, àmpliament estudiada en plantes aromàtiques i llevats, s'inicia amb la glucosa, que en diferents etapes es transforma en àcid mevalònic, via acetil-CoA. Finalment, aquest àcid forma

l'isopentenil pirofosfat que és la base de 5 carbonis per la síntesi de terpenoids (figura II – 7).

L'estat fitosanitari del raïm afecta notablement als nivells de terpens presents en el fruit. Així, compostos com el linalol, nerol, geraniol i altres es transformen i disminueixen substancialment en aquells raïms afectats pel fong *B. cinerea*, sent aquesta disminució més marcada quan més gran és l'afectació del raïm.

2.2.1.1.2 Aroma pre-fermentatiu

La presència de precursors d'aromes al raïm fa que durant l'elaboració del cava es puguin alliberar compostos característics de l'aroma varietal. Dins les famílies de compostos que poden actuar com a precursors d'altres aromes trobem:

Monoterpenols: Més o menys sensibles a reaccions d'hidratació i d'oxidació

Diols i poliols terpènics: Es transformen, a pH relativament baixos com els que es donen en els vins i mostos, en monoterpenols més oxidats

Àcids grassos: Durant el premsat, els grans de raïm entren en contacte amb l'aire; això fa que a partir d'àcids grassos insaturats es formin principalment aldehids i alcohols de 6 carbonis. Aquests compostos són els responsables de l'olor a fulles tallades.

Derivats dels carotenoids: Els carotenoids tenen el mateix origen que els terpenols però amb un grau de polimerització superior. Són poc solubles en medi aquós a causa de la seva liposolubilitat. Com a conseqüència de la llum i de les oxidases es fragmenten i s'alliberen fragments volàtils i olorosos. Entre els compostos alliberats a partir dels carotenoids trobem la β -ionona, la β -damascona, el 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalè (TDN) o el vitispirà (figura II –

8). Aquests compostos es troben presents a molt baixa concentració en el vi però al tenir llindars olorosos baixos influeixen en l'aroma.

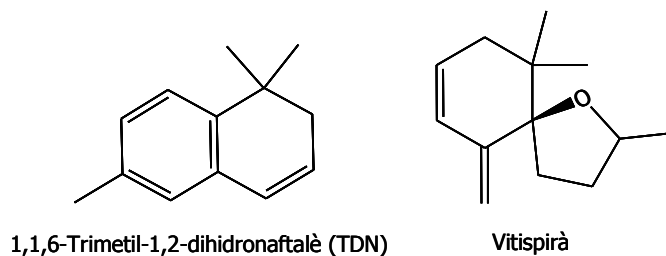


Figura II – 8: Estructura química del vitispirà i TDN.

Glicòsids: Compostos glicosilats susceptibles d'alliberar els aglicons olorosos per hidròlisi química o enzimàtica. Els derivats dels carotenoids es troben majoritàriament en formes glicosilades. Això fa que aquests compostos augmentin el seu contingut amb l'envelliment, com a conseqüència de la seva hidròlisi.

Tenint en compte les notes aromàtiques dels compostos, els aromes primaris es poden agrupar en tres subgrups, en funció de les seves característiques sensorials. Així, tenim els compostos amb notes:

- Florals: Terpens i norisoprenoids.
- Afruitades: Ésters i lactones.
- Herbàcies: Aldehids i alcohols de 6 àtoms de carboni i heterocicles nitrogenats (pirazines).

L'aroma primari del cava està condicionat, per tant, per les varietats de raïm emprades en la seva elaboració. Així, les varietats Macabeu, Xarel·lo i Parellada, que són les més utilitzades per l'elaboració del cava, aporten unes qualitats particulars a l'aroma d'aquests escumosos.

- el macabeu permet obtenir vins afruitats, frescos, equilibrats i de gran finesa, aportant dolçor i perfum.
- la parellada produeix vins de baixa graduació i moderada acidesa, afruitats amb aromes delicats i caracteritzats per la seva gran finesa.
- el xarel·lo permet obtenir vins d'alta graduació, consistents i equilibrats, que aporten cos i estructura.

2.2.1.2 Aroma fermentatiu

L'aroma fermentatiu inclou els aromes formats durant l'etapa essencial de transformació del most en vi, la fermentació alcohòlica (Daudt et al 1978; Houtman et al. 1986; Shinohara et al. 1986; Mestres et al. 1998 i 1999; Tominaga et al. 1998). Durant aquesta fermentació, els sucres són transformats a alcohol, alliberant CO₂ i generant productes secundaris olorosos. Els compostos volàtils formats durant la fermentació representen, quantitativament, la fracció més important de les substàncies integrants de l'aroma del vi. L'alcohol, generat pel metabolisme dels llevats, intervé directament en la percepció dels aromes, ja que està present a concentracions molt superiors a la del seu llindar de percepció, i indirectament, afectant els coeficients de partició aire/líquid de la majoria de substàncies volàtils.

Durant la fermentació (primera o segona), els llevats, a través del seu metabolisme, transformen els glúcids, lípids i proteïnes en compostos aromàtics que s'alliberen al medi (figura II – 9).

Formació d'aromes fermentatius

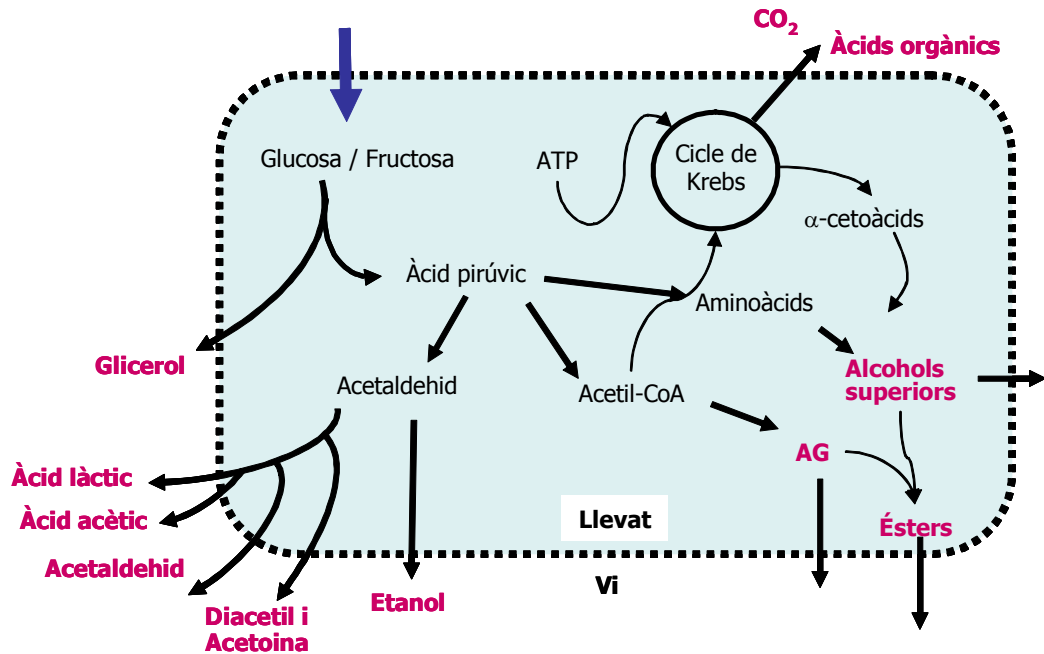


Figura II – 9: Principals rutes metabòliques dels llevats que porten a la formació dels aromes de fermentació en el cava.

Llevat de l'alcohol, els alcohols, els àcids grassos i els ésters són les substàncies volàtils més representatives dels aromes de fermentació:

Alcohols: Principalment es troben alcohols superiors que provenen del metabolisme dels aminoàcids. En conseqüència la seva formació està molt relacionada amb la font de nitrogen dels llevats. Hi ha dues vies majoritàries de biosíntesi d'alcohols, per catabolisme d'aminoàcids i per anabolisme d'aminoàcids via α-cetoàcids (figura II – 9).

Els principals alcohols que podem trobar en els vins són 2 i 3-metilbutanol, propanol, 2-metilpropanol, butanol, pentanol i 2-feniletanol, malgrat que aquest últim també es troba present en el raïm com a aroma primari.

Àcids grassos i els seus ésters etílics: En general, són responsables d'aromes valorats favorablement, principalment afruitats (a excepció de l'acetat d'etil que quan supera el nivell de 100 mg/L aporta notes a dissolvent que són desagradables) (Boutou et al., 2007). Els àcids, al no superar els seus llindars de percepció, no solen afectar negativament a la percepció aromàtica del cava, sinó que li confereixen equilibri. Tant els àcids com els ésters deriven de l'acil-CoA (Liu et al., 2004) (figura II – 9).

Un altre grup important de compostos implicats en l'aroma fermentatiu són els compostos carbonílics, que es formen durant la fermentació dels llevats per l'elevada activitat reductora. Els principals compostos carbonílics que influencien l'aroma fermentatiu del cava són l'acetaldehid, el diacetil, el 3-hidroxi-pentan-3-ona i el piruvaldehid. Altres compostos responsables de l'aroma fermentatiu són: compostos sofrats, nitrogenats, lactones i fenols volàtils.

A part de la fermentació alcohòlica, en els vins espumosos (xampanyes principalment) es pot produir la fermentació malolàctica. Durant aquesta fermentació, l'àcid màlic del raïm és transformat a àcid làctic i diòxid de carboni. La utilització de bacteris seleccionats evita l'aparició de defectes en l'aroma com pot ser un excés d'àcids grassos de cadena curta o de fenols volàtils.

2.2.1.3 Aroma post-fermentatiu o de cria

Aquest aroma està integrat per substàncies volàtils formades per processos químics (hidròlisi, esterificacions, oxidacions) i/o bioquímics a partir dels aromes formats en etapes anteriors (Franquet 1990; Waterhouse et al., 1994; Dugelay et al., 1995; Singleton 1995). Aquests aromes estan relacionats amb la conservació i l'envelliment del cava.

L'aroma característic del cava s'adquireix durant la fase de rima, conseqüència del temps i de l'autolisi dels llevats. Al llarg d'aquesta etapa el cava està en contacte directe amb els llevats de la segona fermentació i es produeixen intercanvis a través de les membranes dels llevats. Posteriorment, els llevats experimenten l'autolisi, de manera que el contingut del llevat passa al cava.

Els caves experimenten una criaça que es pot considerar no oxidativa o reductora, per l'elevada pressió de CO₂ (> 6 atm), durant la qual es produeixen una sèrie de modificacions que afecten principalment a ésters, monoterpens, norisoprenoids, fenols volàtils i derivats furfurals.

Ésters: Al llarg de la criaça es produeix una disminució dels ésters per reaccions d'hidròlisi. La velocitat d'aquestes reaccions està directament afectada pel pH del vi i per la temperatura. Així com un augment dels ésters procedents de diàcids (Succinat de dietil). Aquesta disminució en el contingut d'ésters produeix una disminució del caràcter afruitat i fresc del vi. Un comportament similar presenten els acetats, tot i que les seves velocitats de degradació són superiors i per aquest motiu es troben a concentracions molt baixes en els productes acabats.

Norisoprenoids: Durant la criaça del cava apareixen certs compostos de tipus norisoprenoid que tenen impacte en l'aroma del cava. Entre aquests compostos destaquen els isòmers del vitispirà, el 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalè (TDN) i la β -damascona (Francioli et al., 1999; Winterhalter P., 1993; Silva-Ferreira et al. 2004).

Furfurals: Els furfurals tenen poca participació en l'aroma, però tenen especial importància en el color. Els derivats furfurals, com el 2-furfural i l'etil-2-furoat, augmenten durant l'envelliment del vi com a conseqüència de la degradació dels sucres. Tot i que el 2-furfural també es pot formar a partir de l'àcid ascòrbic.

2.2.2 Color del Cava

Unes de les característiques sensorials més apreciades per part del consumidor en els caves és el color, el qual pot condicionar l'elecció del producte. Per aquest motiu, les bodegues tenen una especial preocupació per l'estabilitat del cava davant dels fenòmens d'enfosquiment. Durant el procés d'elaboració del cava hi ha diferents punts on es poden produir alteracions del color: durant l'obtenció del most, al llarg de la primera fermentació, a la rima o durant l'emmagatzematge. Mentre que una alteració del color en el most o en el vi base, fruit de la primera fermentació, pot ser detectada i corregida, de manera que no arriba al producte final, una alteració durant la fase de rima és difícil de detectar i, per tant, de solucionar.

En els processos d'enfosquiment de fruites i begudes hi ha una família de compostos que desenvolupen un paper fonamental, els compostos fenòlics. Aquests, ja sigui per fenòmens d'enfosquiment enzimàtics o químics, produeixen pigments que alteren el color (Singleton, 1987; Singleton & Kramling 1976; Cilliers et al., 1990; Cilliers et al., 1991; Pickering et al.; 1999; Fernández-Zurbano et al., 1998; Es-Safi et al., 2000 a i 2000 b). A més, en els caves i mostos, al tenir cert nivell de sucres, es poden produir alteracions tipus reaccions de Maillard o degradacions de Strecker que també són susceptibles de produir un enfosquiment.

2.2.2.1 Compostos fenòlics

Els compostos fenòlics, amb més de 8.000 estructures conegudes, formen una de les famílies més importants de metabòlits secundaris de les plantes, dels quals uns no són essencials per la supervivència mentre que altres tenen funcions de defensa com a fitotoxines.

Generalment, presenten un anell aromàtic amb un o més substituents hidroxil; tanmateix, aquesta definició no inclou tots els compostos fenòlics i per aquest motiu, és preferible la definició basada en el seu origen metabòlic. Així, els compostos fenòlics inclouen aquelles substàncies derivades de la ruta del shikímic i del metabolisme del fenilpropanoat.

En el gra de raïm els compostos fenòlics es troben a l'interior dels vacúols de les cèl·lules de la polpa i la pellofa. Al formar part del constituents del gra de raïm els compostos fenòlics acaben estant presents en el most a partir del qual s'obté el vi base i el cava. El contingut i la tipologia dels compostos fenòlics en els cava tenen una gran importància ja que afecten directa o indirectament a la seva qualitat. Són, doncs, els principals responsables del color dels vins i, a més a més, alguns d'ells tenen un especial interès nutricional i farmacològic (Clifford et al. 1996; Jang et al. 1997; Hour et al. 1999), fruit de les seves propietats antioxidants.

La classificació més usual dels compostos fenòlics es basa en la distinció entre compostos no flavonoides i compostos flavonoides, sent aquests últims els que presenten un esquelet C6-C3-C6.

2.2.2.1.1 Compostos no flavonoides

Aquesta denominació inclou els àcids fenòlics amb esquelet C6-C1, els àcids hidroxicinnàmics amb esquelet C6-C3 i altres derivats fenòlics com els estilbens (figura II – 10). La presència d'èsters tartàrics dels àcids hidroxicinnàmics i l'absència d'èsters de l'àcid quínic és una característica del gènere *vitis*. Les formes lliures dels àcids fenòlics i hidroxicinnàmics són estranyes en el gra de raïm, però al ser alliberades per hidròlisi, com a conseqüència dels processos tecnològics, poden estar presents en el cava. Químicament es caracteritzen per tenir un anell benzènic amb un o més grups hidroxils a la seva estructura. Això

fa que aquesta estructura tingui un cert caràcter àcid, tot i que la seva força com a àcid està directament condicionada pels possibles substituents de l'anell benzènic i pel pH del medi.

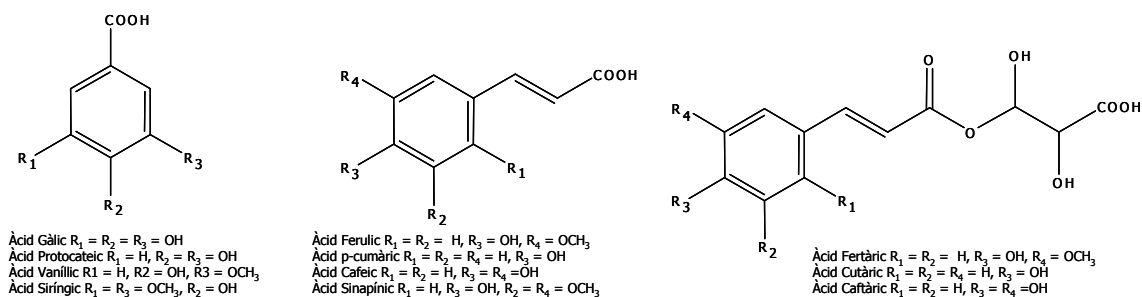


Figura II – 10: Estructura dels compostos no flavonoides del cava. A: Àcids benzoics. B: Àcids hidroxicinnàmics. C: Ésters tartàrics d'àcids hidroxicinnàmics.

A més, en el raïm es troba el resveratrol, un estilbè amb activitat fitotòxica que protegeix el raïm d'infeccions fúngiques. Alhora, el resveratrol sembla presentar un ampli nombre d'efectes beneficiosos per la salut humana, com propietats, antivirals, neuroprotectives, antiinflamatòries i anticancerígenes. (Athar et al. 2007). El resveratrol es localitza principalment a la pell del raïm de manera que en el cava n'hi ha uns nivells molt baixos ja que en el cava no hi ha maceració en contacte amb les pells del raïm durant l'elaboració dels vins base.

2.2.2.1.2 Compostos flavonoides

Els flavonoides es caracteritzen per un esquelet base de 15 àtoms de carboni (C6-C3-C6) de tipus 2-fenilbenzopirona amb dos anells benzènics (anell A i B) i un anell pirànic (anell C). Aquesta família de compostos es divideix en diferents subclasses, en funció del grau d'oxidació del nucli pirànic (figura II – 11).

En sentit estricte, els flavanols són els únics que es basen en l'estructura base C6-C3-C6 dels flavonoides. Però, en sentit ampli també s'inclouen els antocians

i els flavan-3-ols. Els flavonoides es troben localitzats, principalment, a la pell del gra de raïm i en molt petita concentració a la polpa. Tanmateix, com a conseqüència del premsat, una part d'aquests compostos poden passar al most i trobar-se en el cava.

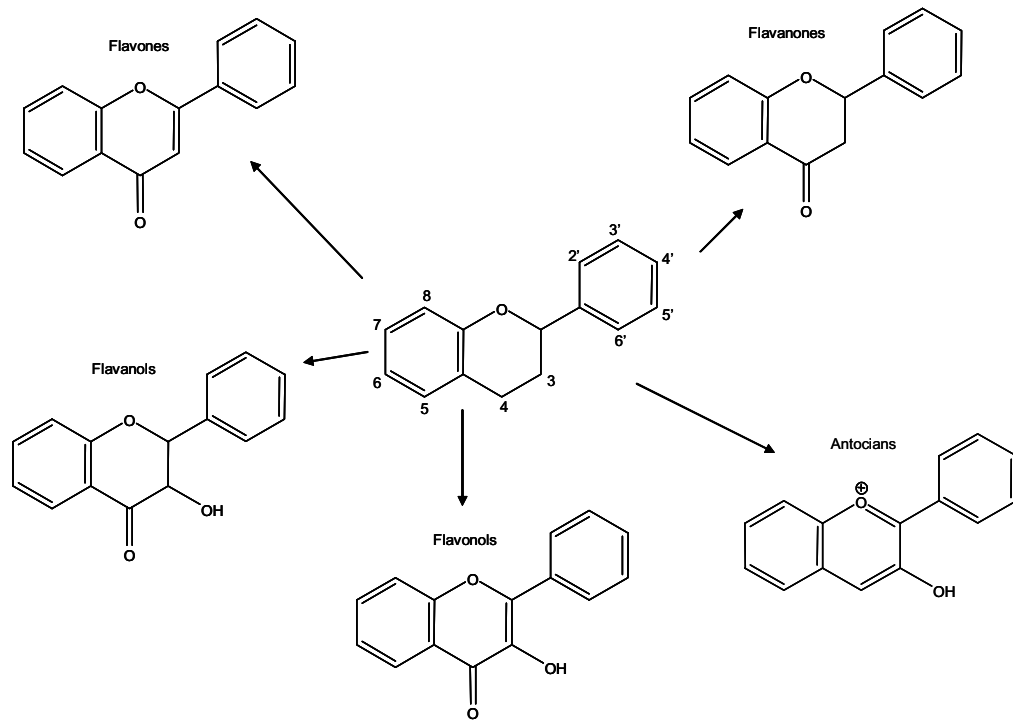


Figura II – 11: Esquelet base de 15 àtoms de carboni (C6-C3-C6) a partir del qual es deriven els compostos flavonoides.

2.2.2.2 Oxidació dels compostos fenòlics

Un dels possibles efectes de la criança dels caves sobre els compostos fenòlics és la seva oxidació, la qual acaba produint un enfosquiment i en conseqüència, una pèrdua de qualitat. L'oxidació dels compostos fenòlics es pot produir per processos biològics / bioquímics, mitjançant enzims, o per processos químics.

2.2.2.2.1 Oxidació enzimàtica

Antecedents Bibliogràfics

Aquest fenomen d'oxidació dels compostos fenòlics és conseqüència de la polifenoloxidasa (PPO), un enzim present a les fruites que requereix de la presència d'oxigen per realitzar la seva acció (Robards et al. 1999). La PPO presenta una activitat creolasa que actua sobre els compostos fenòlics generant *orto*-difenois i una activitat catecolasa que oxida aquests compostos a *orto*-quinones (figura II – 12). Aquestes quinones són altament reactives (oxidants i electròfil·les) de manera que reaccionen ràpidament originant un gran nombre de compostos que poden tenir coloracions intenses quasi negres.

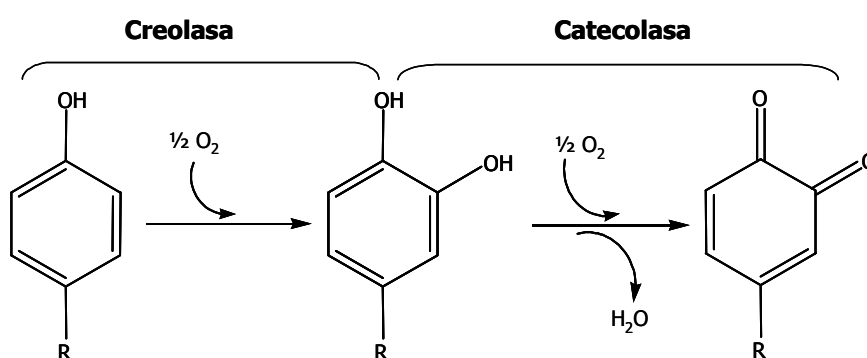


Figura II - 12: Esquema del procés d'oxidació enzimàtica:

El substrat que més ràpidament és atacat per la PPO és l'àcid caftàric, formant-se la quinona corresponent. Aquesta quinona pot reaccionar posteriorment amb el glutatió formant el 2-S-glutationilcaftàric àcid (SGR) (Cheynier et al. 1993, Singleton et al. 1984, Singleton et al. 1985). Això succeeix fins que s'esgota el glutatió, moment en què la quinona de l'àcid caftàric passa a oxidar altres fenols.

En el raïm i en el most l'activitat de la PPO és la principal responsable dels fenòmens d'enfosquiment. Tanmateix, en els vins i caves la seva activitat està inhibida per la presència de l'alcohol produït durant la fermentació dels sucres per part dels llevats. A més, aquest enzim també veu afectada la seva activitat pel SO_2 , tot i que no es coneix exactament el mecanisme pel qual es produeix la inhibició. Degut a aquestes inhibicions de la PPO, els fenòmens

d'enfosquiment que es produeixen en els caves són preferentment provocats per reaccions químiques (Robards et al. 1999; Mayen et al. 1997; Bradshaw et al. 2004).

2.2.2.2.2. Oxidació química

Quan els caves entren en contacte directe amb l'oxigen, els compostos que es veuen més afectats són els fenols. Hi ha estudis (Goldberg et al. 1996; Fernández-Zurbano et al. 1998; Ibern-Gómez et al. 2000) que mostren que els processos d'oxigenació dels vins porten a una disminució de la seva quantitat de fenols. Paral·lelament, la capacitat dels vins de consumir oxigen està relacionada amb el contingut de fenols. Igual que en l'enfosquiment enzimàtic els *orto*-difenols són els compostos fenòlics que amb més facilitat s'oxiden.

El procés pel qual l'oxigen reacciona amb els fenols no està encara exactament definit. És conegut que l'oxigen com a tal (O_2) no pot reaccionar amb aquests compostos, de manera que necessita d'una activació que es pot produir per la llum o per la presència de metalls. Degut a què les ampolles de cava solen ser de color verd, per evitar la llum, i estan guardades a la cava, normalment en absència de llum, la principal via d'activació de l'oxigen a les ampolles de cava són els metalls, que tot i trobar-se en molt baixes concentracions sempre hi són presents.

D'altra banda, cal destacar que en els vins i caves els processos d'autoxidació dels fenols estan molt limitats ja que degut al pH del medi (entorn a 3) hi ha una concentració molt baixa d'ions fenolat. A més, les velocitats de reacció dels processos d'autoxidació són menors que velocitats de les reaccions que es produeixen com a conseqüència de l'activació de l'oxigen induïda per metalls.

2.2.2.3 Altres fenòmens d'enfosquiment: Reacció de Maillard i Degradació de Strecker

Es coneix per reacció de Maillard el conjunt de reaccions que s'inicien amb l'addició de compostos amínics (aminoàcids) al grup carbonil dels monosacàrids (sucres) i acaben amb la formació dels furfurals. Aquests últims són els responsables d'aportar una coloració marronosa o bruna als aliments així com aromes de torrat i carmel (Câmara et al. 2004 i 2006, Cutzach et al. 1999, Pérez-Coello et al. 2003 i Moreno et al. 2005).

Els caves són una solució hidro-alcohòlica que presenta en quantitat suficient sucres, ja siguin residuals o addicionats amb el licor d'expedició, i aminoàcids, propis de les proteïnes del most o dels llevats de la segona fermentació. La presència de sucres i aminoàcids fa que en els caves durant la fase de rima (9 mesos com a mínim) es puguin produir reaccions de Maillard. Aquestes reaccions estan afavorides per la disminució d'activitat d'aigua produïda per l'elevada concentració d'etanol (11,5% v/v), així com pel temps que es mantenen en contacte els substrats. Tot i que gràcies a la baixa temperatura de la cava la seva velocitat es molt lenta.

A les etapes finals de la reacció de Maillard es produeix el que es coneix com a degradació de Strecker. Aquesta degradació no requereix de la presència de compostos carbonílics, ni pH del medi específics. Conseqüència de la degradació de Strecker s'originen aldehids implicats en l'aroma com el 3-metilbutanal (aroma de malta), el fenilacetaldehid (notes de mel) i el metional (aroma de patata). Aquest últim és un compost sulfurós format a partir de l'aminoàcid metionina, amb un llindar olfactiv molt baix (0,1 – 0,2 ng/L a l'aire) i un impacte olfactiv negatiu.

2.2.2.4 Estudis d'estabilitat accelerada

Per tal d'estudiar l'evolució dels aliments al llarg del temps molts estudis de durabilitat simulen en el laboratori períodes llargs de conservació augmentant la temperatura de conservació. De manera que es sotmet un aliment a temperatures superiors a les habituals d'emmagatzematge per tal d'accelerar les reaccions que poden alterar el producte. Tot i que els estudis de durabilitat d'un producte s'han d'efectuar a tres temperatures diferents, si es volen establir cinètiques, quan el que interessa és simplement accelerar l'envelliment d'un producte es pot realitzar a una única temperatura no massa elevada.

Fins al moment, existeixen molts pocs estudis d'enfosquiment en vins espumosos a través dels quals s'hagi pogut seguir l'evolució del color. En el treball d'Ibern et al. (2000) s'observa un increment de l'enfosquiment (mesurat com a absorbància a 420 nm) del cava durant la seva criança. Aquest enfosquiment s'atribueix a l'oxidació dels compostos fenòlics, tot i que durant la fase de rima a les ampolles de cava hi ha una alta pressió de CO₂ que aporta un ambient anaeròbic. Estudis de Pozo-Bayon et al. 2003 mostren que les diferències trobades entre els compostos fenòlics dels caves estan més relacionades amb les diferents varietats de raïm que no pas amb el període de criança. A més, conclouen que l'envelliment en contacte amb els llevats de la segona fermentació ofereix una resistència front l'enfosquiment per un efecte protector dels llevats. Aquest aspecte també s'ha observat en vi blanc de jerez per López-Toledano et al. (2002 i 2006) i per Barón et al. (1997), que detecten un efecte protector del vel de llevats que es forma sobre el vi de jerez durant la criança. No obstant, tot i que la criança biològica dels vins de jerez és la més similar a la dels vins escumosos tipus cava, existeix una diferència fonamental. En els vins de jerez, la criança és conduïda per llevats de l'espècie *Saccharomyces cerevisiae*, que es desenvolupen formant un vel característic que aïlla el vi de l'oxigen de l'aire. En els caves, la criança biològica es deu a què el cava es manté en contacte directe amb els llevats de la segona fermentació que s'acabaran lisant. A més, el CO₂ queda retingut a la botella

donant lloc a una solució sobresaturada de que assoleix una pressió pròxima a les 6 atmosferes.

2.3 Tècniques instrumentals per la determinació de compostos implicats en les característiques organolèptiques

Per la determinació dels compostos volàtils i semi-volàtils implicats en l'aroma del cava, així com dels compostos fenòlics relacionats amb el color es fa necessària l'aplicació de diferents tècniques instrumentals. A continuació es descriuen les tècniques més comunment emprades per la determinació dels aromes i dels fenols.

2.3.1 Mètodes d'extracció de compostos volàtils

La caracterització dels compostos que determinen l'aroma és, possiblement, un dels reptes més difícils en l'anàlisi dels caves. La principal dificultat recau en el fet que la fracció volàtil està integrada per substàncies de diferents característiques químiques i físico-químiques. Tanmateix, el fet que totes les molècules siguin més o menys volàtils fa que la tècnica instrumental d'elecció sigui la cromatografia de gasos (GC) precedida d'una extracció i concentració dels compostos.

És àmpliament conegut que un únic mètode d'extracció no és mai suficient per la completa caracterització de les substàncies volàtils dels caves, per això s'han desenvolupat diferents sistemes d'extracció, basats en aprofitar algunes de les

propietats físico-químiques de les molècules, per tal d'obtenir aquelles fraccions de compostos que eren objecte d'estudi.

Les diferents tècniques es diferencien principalment en la metodologia emprada per preparar la mostra (extracció, aïllament, concentració, derivatització, etc.) abans de la seva anàlisi per cromatografia de gasos. Tot i que totes aquestes etapes prèvies a l'anàlisi poden afectar directament a la reproductibilitat i a la precisió dels resultats.

De les nombroses tècniques d'extracció de compostos volàtils es destaquen les que es basen en l'extracció i destil·lació simultània (SDE) i en l'anàlisi de l'espai de cap (headspace), que són les que s'han utilitzat en aquest treball.

2.3.1.1 Extracció i destil·lació simultània (SDE)

La SDE consta de dues etapes, l'extracció amb dissolvent dels compostos volàtils de la mostra i la purificació d'aquests per destil·lació. Aquestes dues etapes es produeixen simultàniament, cosa que permet optimitzar el temps. Al combinar l'extracció i la destil·lació podem obtenir extractes molt rics en compostos volàtils (Díaz-Maroto et al. 2002; Blanch et al. 1996).

La destil·lació és una tècnica molt antiga que permet separar, utilitzant la temperatura, diferents components líquids d'una mescla, aprofitant les diferències de volatilitat dels seus compostos. Un sistema clàssic de destil·lació és l'obtenció d'alcohol aplicant calor a una mescla fermentada. L'instrumental utilitzat per la destil·lació és l'alambí, el qual consta d'un recipient on es diposita la mescla a destil·lar i on s'aplica calor, un condensador on es refreden els vapors i un recipient on es recullen els vapors condensats. La destil·lació pot ser contínua o discontinua. La primera sol ser utilitzada per la indústria i es basa en l'alimentació continuada de la mescla a separar, obtenint-se de forma

contínua les diferents fraccions separades. Per altra banda, la destil·lació discontinua, es basa en omplir la caldera amb la mescla per lots, aplicar calor per produir l'evaporació dels compostos a separar i recollir els vapors condensats en un segon recipient.

L'extracció amb dissolvents és un procés de transferència de matèria entre dues fases immiscibles basat en les diferències de solubilitat de les substàncies. Això permet la separació de mescles líquides o dissoltes, mitjançant el seu tractament amb un solvent orgànic. El fet d'haver d'introduir un dissolvent a la mostra fa augmentar el risc de contaminació d'aquesta i que es puguin generar artefactes (compostos no presents originalment a la mostra). A més a més, per poder realitzar l'anàlisi cromatogràfica es fa necessària una etapa prèvia de concentració per eliminar l'excés de dissolvent d'aquestes mostres.

2.3.1.1.1 Aparell de Likens-Nickerson (LN)

És una modificació efectuada per *Likens - Nickerson* de l'hidrodestil·lació (Nickerson et al. 1966), que combina la destil·lació i l'extracció (figura II – 13). Utilitza un dissolvent de baix punt d'evaporació (pentà, hexà, diclorometà) per extreure els compostos en continu i la temperatura de la destil·lació per arrossegar les substàncies més volàtils.

Les principals avantatges del SDE són que, gràcies al fet d'utilitzar un dissolvent bastant volàtil, es pot treballar a temperatures inferiors als 100°C i evitar així en gran mesura la formació d'artefactes. A més a més, la recirculació del dissolvent permet anar concentrant en volàtils la fracció orgànica, sense necessitat d'utilitzar grans quantitats de dissolvents.

Els problemes que ofereix aquesta tècnica respecte la resta de mètodes que no utilitzen temperatura són les possibles alteracions que pateixen els compostos volàtils amb la calor. Hi ha diferents treballs que determinen la diferència entre

l'olor de les mostres en fresc i l'olor dels extrets obtinguts mitjançant SDE (Díaz-Maroto et al. 2002; Blanch et al. 1996).

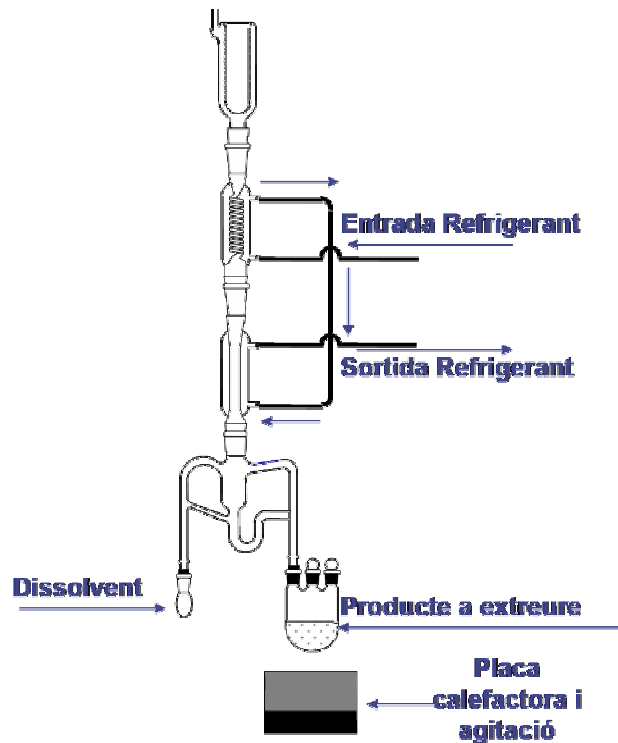


Figura II – 13: Esquema d'un sistema d'obtenció de la fracció volàtil de Likens-Nickerson.

2.3.1.2 Sistemes d'extracció de volàtils en espai de cap (headspace)

Com s'ha comentat anteriorment, la utilització de dissolvents per tal d'obtenir la fracció volàtil pot implicar l'aparició d'artefactes en el perfil aromàtic. És per tant comprensible que moltes tècniques d'extracció d'aromes es basin en la volatilitat dels compostos, la qual depèn de la matriu (aliment). Això ha portat al desenvolupament de tècniques d'extracció d'aromes basades en l'equilibri de

partició líquid – aire - sòlid dels compostos volàtils. Aquest fet requereix que els compostos que formen part de l'aroma tinguin una pressió de vapor adequada, per poder passar de l'aliment a l'aire en una quantitat suficient per ser detectats pel sistema olfactori.

Existeixen dos tipus de tècniques de *headspace*, la dinàmica i l'estàtica.

Headspace dinàmic: Igual que en el headspace estàtic, es posa una mostra en un vial tancat, de manera que els volàtils de l'aliment i els de la fase gasosa estiguin en equilibri. Tanmateix, en el headspace dinàmic es produeix una renovació de l'aire forçant als volàtils a passar a la fase gas. Finalment, l'aire que es fa sortir del vial passa per una trampa de material sòlid (Tenax[®], carbó actiu, etc) on queden atrapats els compostos volàtils. Posteriorment, s'utilitza un dissolvent o la desorció per temperatura per alliberar els compostos volàtils abans de l'anàlisi cromatogràfica.

Headspace estàtic: Es basa en deixar un aliment en un vial tancat el temps suficient per tal que es produeixi l'equilibri entre els compostos volàtils de l'aliment i la fase gasosa. Un cop s'ha assolit aquest equilibri es procedeix a captar una part de l'aire del vial (entre 0,1 – 2 mL) i s'injecta al cromatògraf de gasos.

2.3.1.2.1 Headspace dinàmic: Closed Loop Stripping Analysis (CLSA)

El sistema CLSA és una variació del denominat *Purge and Trap*, en el qual es recircula el gas utilitzat per arrossegar els compostos volàtils de la fase líquida. Aquesta tècnica permet utilitzar grans volums de mostra i, per tant, millorar els límits de detecció. El sistema consisteix, com en tot sistema d'espai de cap dinàmic, en fer passar un corrent de gas inert (normalment nitrogen), prèviament purificat, a través d'una mostra líquida (aigua, vi, cava), de forma

que es desplacen els compostos volàtils orgànics de la mostra a la fase gasosa. Posteriorment, els compostos volàtils extrets es fan passar a través d'una trampa on queden retinguts en un adsorbent (Tenax[®], carbó actiu, etc).

En l'extracció de compostos volàtils presents a les mostres intervenen dos equilibris de partició. El primer equilibri és produït entre els compostos volàtils de la fase líquida (mostra) i la fase gasosa (aire). Aquest equilibri, que està regit pel coeficient de partició líquid - aire (K_{vw}), es veu afectat per la concentració en el salts del medi líquid i per la temperatura. Un cop els compostos han estat extrets són arrossegats per l'aire i conduïts fins a la trampa d'adsorbent. Aquí es produeix el segon equilibri, entre la fase gasosa i la fase sòlida. Aquest equilibri es troba regulat pel coeficient de partició gas - sòlid (K_{vs}). Els compostos volàtils poden quedar retinguts en el material de la trampa per absorció o per adsorció. Aquest fenomen es veu molt afectat per la temperatura, de manera que es pot afavorir la retenció utilitzant un sistema refrigerant.

Finalment, per tal de recuperar els compostos volàtils es procedeix a extreure, amb una petita quantitat de dissolvent orgànic, el material sòlid emprat per retenir aquests volàtils.

El sistema *Closed-Loop Stripping Analysis* ha estat tradicionalment utilitzat en l'anàlisi de mostres d'aigua (Espadaler et al. 1997, Malleret et al. 2001, Martí et al. 2005) per detectar la presència de contaminants a nivell de pico-grams per litre. Fins al moment només s'ha trobat un treball en el qual s'aprofités la capacitat d'extracció de la tècnica per obtenir els compostos volàtils d'una solució model de vi addicionada amb patrons (Eggers et al. 2003).

2.3.1.2.2 *Headspace estàtic: Microextracció en fase sòlida (SPME)*

A la dècada dels 90, Arthur i Pawliszyn (Arthur et al. 1990; Zhang et al. 1993; Yang et al. 1994; Zhang et al., 1994), van desenvolupar una nova tècnica d'extracció de compostos volàtils, generalment de l'espai de cap (*headspace*), anomenada microextracció en fase sòlida o *solid phase micro-extraction* (SPME). Inicialment desenvolupada per la detecció de compostos clorats en aigües contaminades, amb posterioritat s'ha aplicat a multitud de matrius biològiques (Scibetta et al. 2006, Gallardo et al. 2006, Yonamine et al. 2006), ambientals (Isetun et al. 2004, Halasz et al. 2006, Prosen et al. 2007) o alimentàries (Bianchi et al. 2006, Berlioz et al. 2006, Santos et al. 1996).

La SPME permet extreure i concentrar les substàncies volàtils directament sobre una fibra (fase estacionària), la qual pot disposar d'un o varis polímers d'extracció (Arthur et al. 1990, Zhang et al. 1993, Yang et al. 1994, Kataoka et al. 2000, Lord et al. 2000). Posteriorment, els compostos volàtils són alliberats al port d'injecció del cromatògraf de gasos per desorció tèrmica.

El procediment de la SPME consta de dos etapes principals: l'extracció i la desorció (figura II – 14).

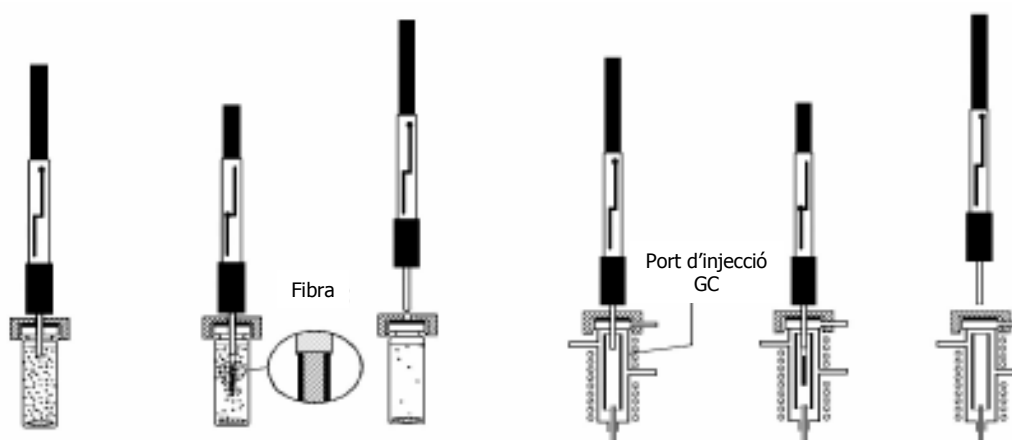


Figura II - 14: Esquema d'extracció i desorció de la SPME

Fase d'extracció: Moment en què es produeix la migració dels volàtils de la matriu problema a l'espai de cap i d'aquí a la fibra de SPME. Els compostos poden quedar retinguts per adsorció (els volàtils s'integren a l'interior de la fibra) o per absorció (els volàtils queden a la superfície de la fibra), en funció del tipus de material de fibra emprat (taula II – 1).

Hi ha tres tipus d'extracció:

Immersió directe: La fibra es diposita dins la matriu a analitzar. Això fa disminuir molt la vida útil d'aquesta fibra i dificulta la reproductibilitat de l'extracció. A més, requereix de mostres líquides.

Headspace: La fibra s'exposa a la fase gas que queda sobre la matriu problema, en la qual els volàtils estan en equilibri amb els de l'aliment en funció de la seva pressió de vapor. Aquest és el sistema més utilitzat per la determinació de volàtils i semi-volàtils. A més, permet modificar propietats de la matriu (pH, força iònica, temperatura, volum de mostra, etc), per augmentar el rendiment de l'extracció.

Protecció de membrana: Es basa en col·locar una membrana semi-permeable entorn de la fibra per protegir-la de compostos d'elevat pes molecular. La cinètica d'extracció és més lenta ja que els volàtils han de difondre a través de la membrana abans d'assolir la fibra.

Fase de desorció: Moment en què els volàtils i semi-volàtils que han quedat atrapats en el polímer de la fibra són alliberats.

Aquests procés es pot produir per:

Desorció tèrmica: La fibra es col·loca al port d'injecció del cromatògraf de gasos que es troba a temperatura suficient per permetre l'alliberació de tots els compostos retinguts a la fibra.

Dissolvent: Sistema viable per aquells compostos que són tèrmicament inestables o poc volàtils, on les elevades temperatures del port d'injecció no són aplicables. Aquesta tècnica se sol aplicar quan es pretén acoblar la SPME a la cromatografia líquida.

Fase estacionaria	Espesor	T ^a máxima de uso	Proceso de extracción	Polaridad	Uso recomendado
PDMS (polidimetilsiloxano)	100µm fase no enlazada	280 °C	Absorción	No polar	GC/HPLC
	30µm fase no enlazada	280 °C	Absorción	No polar	GC/HPLC
	7µm fase enlazada	340 °C	Absorción	No polar	GC/HPLC
PDMS/DVB (PDMS/divinilbenceno)	65µm fase parcialmente entrecruzada	270 °C	Adsorción	Bipolar	GC
	60µm fase parcialmente entrecruzada	-	Adsorción	Bipolar	HPLC
	65µm fase muy entrecruzada ¹	270 °C	Adsorción	Bipolar	GC
PA (poliacrilato)	85µm fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Absorción	Polar	GC/HPLC
CAR/PDMS (carboxen/PDMS)	75µm fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Adsorción	Bipolar	GC
	85µm fase muy entrecruzada ¹	320 °C	Adsorción	Bipolar	GC
CW/DVB (carbowax/DVB)	65µm fase parcialmente entrecruzada	265 °C	Adsorción	Polar	GC
	70µm fase muy entrecruzada ¹	265 °C	Adsorción	Polar	GC
CW/TPR (CW/templated resin)	50µm fase parcialmente entrecruzada	-	Adsorción	Polar	HPLC
DVB/CAR/PDMS	50/30µm fase muy entrecruzada ¹	270 °C	Adsorción	Bipolar	GC
	50/30µm fase muy entrecruzada ^{1,2}	270 °C	Adsorción	Bipolar	GC

Taula II - 1: Fibres comercials per SPME.¹ Fibres Stableflex: recobriments dipositats sobre una fibra de sílice fosa flexible; ² longitud especial de 2cm

Actualment en el mercat hi ha disponible una àmplia selecció de fibres en funció de les característiques de polaritat dels analits que es pretenen estudiar. A la taula II - 1 es resumeixen les fibres que fins al moment es poden trobar al mercat.

2.3.2 Separació dels compostos implicats en les característiques organolèptiques

Com s'ha mencionat anteriorment, després d'una extracció s'obté una mescla complexa de compostos volàtils, els quals s'han de separar i identificar. Per la seva versatilitat la tècnica d'elecció és la cromatografia.

2.3.2.1 Separació cromatogràfica

La cromatografia engloba un conjunt de tècniques basades en la separació dels components d'una mescla. Les tècniques cromatogràfiques són molt variades, però en totes elles hi ha una fase mòbil, que consisteix en un fluid (gas, líquid o fluid supercrític), que arrossega la mostra a través d'una fase estacionària formada per un sòlid o un líquid fixat en un sòlid.

Els components de la mescla a separar interaccionen de manera diferent amb la fase estacionària i la fase mòbil. De manera que els compostos passen per la fase estacionària a diferent velocitat i això permet la seva separació. Cada substància té un temps de pas característic a través del sistema, anomenat temps de retenció. Un cop s'ha produït la separació, els compostos passen per un detector que genera una senyal, la qual depèn de la concentració i del tipus de compost.

Per la realització del treball s'han emprat dues tècniques cromatogràfiques en funció del tipus d'analits que es pretenien estudiar. Així, s'ha emprat la cromatografia de gasos per l'estudi de la fracció volàtil i la cromatografia líquida per l'anàlisi de la fracció fenòlica dels caves.

2.3.2.1.1 Cromatografia de gasos (GC)

La GC és una tècnica cromatogràfica en la que la mostra es volatilitza a l'injector i entra a la columna cromatogràfica. L'elució dels components de la mostra es produeix per la rampa de temperatura del forn on es troba la columna i pel flux de gas inert de la fase mòbil. Aquí, a diferència d'altres tipus de cromatografies, la fase mòbil no interacciona amb les molècules, la seva única i exclusiva funció és la de transportar els analits a través de la columna.

La GC es realitza en un cromatògraf de gasos que consta de diversos components: el gas portador, el sistema d'injecció de mostra, la columna (generalment a l'interior d'un forn) i el detector (figura II – 15).

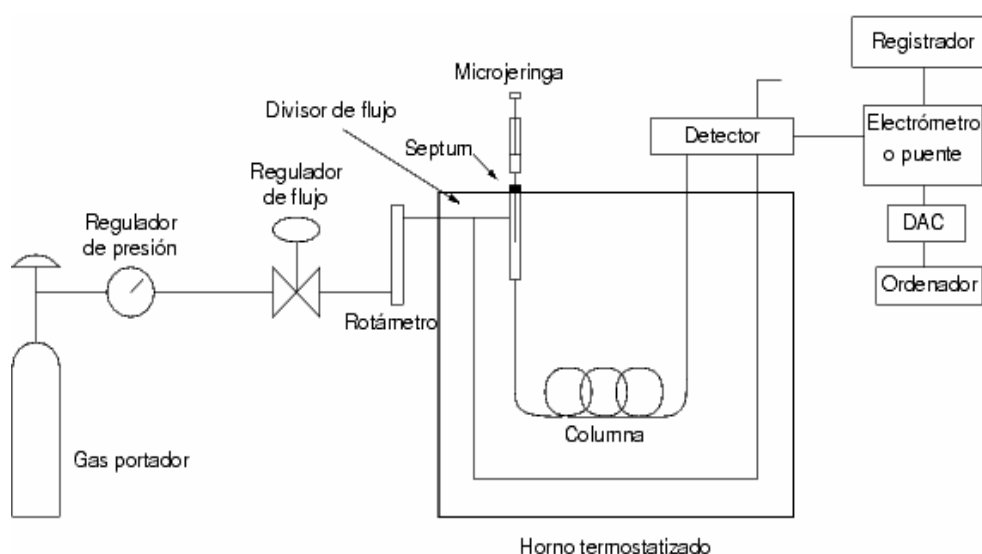


Figura II – 15: Esquema d'un cromatògraf de gasos.

Gas portador: Ha de ser un gas inert per evitar que reaccioni amb els analits o amb la columna. L'elecció del gas sol estar condicionada pel detector que s'utilitzi. Generalment s'escull heli, argó, nitrogen o hidrogen.

Sistema d'injecció de mostra: És l'etapa clau ja que s'ha d'injectar la quantitat de mostra suficient i de la forma correcta. Aquest procés es realitza a la cambra de vaporització, la qual ha d'estar com a mínim 50°C per sobre del punt d'ebullició del compost menys volàtil de la mescla, i ha d'estar segellada per un sèptum.

Columna cromatogràfica: S'utilitzen dos tipus de columnes: les empaquetades i les capil·lars, tot i que aquestes últimes són les més usuals gràcies a la seva major eficiència i rapidesa. Al mercat estan disponibles en longituds variables (2 – 60 metres) i amb diferents materials com a fase estacionària (C8, C18, polietilenglicol, etc)

Detector: És el responsable de detectar els analits quan surten de la columna cromatogràfica. Hi ha una gran diversitat de detectors (Ionització de Flama, Masses, Nitrogen-Fòsfor, etc), però tots han de complir unes característiques generals:

- Sensibilitat
- Resposta lineal de l'analit
- Temps de resposta curt
- Ampli interval de temperatures de treball
- Estabilitat i reproductibilitat
- Fiabilitat

2.3.2.1.2 Cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC)

La HPLC és un tipus de cromatografia en columna utilitzada per separar els components d'una mescla líquida, basant-se en les diferents interaccions químiques que aquests estableixen amb la columna cromatogràfica. La mostra a analitzar és introduïda en petites quantitats i els diferents components se separen en funció de les interaccions físiques i/o químiques amb la fase estacionària, a mesura que van avançant per la columna impulsats per la fase mòbil. El grau de retenció dels components de la mostra dependrà de la naturalesa de les fases mòbil i estacionària, així com dels compostos.

Una de les millores introduïdes amb la HPLC respecte la cromatografia líquida convencional és el fet de treballar amb pressions elevades de fase mòbil, cosa que permet augmentar la velocitat lineal dels compostos dins de la columna. A més a més, la HPLC permet variar la composició de la fase mòbil durant l'anàlisi cromatogràfica (gradient d'elució), de manera que es va canviant l'afinitat dels compostos retinguts a la fase estacionària per la fase mòbil.

Existeixen dos tipus de HPLC en funció del tipus de fase estacionària que s'utilitzi:

Fase normal: Es basa en una fase estacionària polar i una fase mòbil apolar. És emprada quan els compostos a estudiar són polars, de manera que quedaran retinguts a la columna i, a mesura que s'augmenta la polaritat de la fase mòbil, s'aniran alliberant.

Fase reversa: Es basa en una fase estacionària apolar i una fase mòbil polar. S'utilitzen fases estacionàries de sílice modificada amb cadenes de 8 o 18 àtoms de carboni. Això fa que quan més apolars siguin els compostos a estudiar més retinguts queden a la columna.

En ambdós casos les característiques fisicoquímiques dels compostos a estudiar juguen un paper fonamental en la seva retenció a la columna i, per tant, en el tipus de cromatografia a seleccionar. Altres paràmetres a tenir en compte són: la força iònica i el pH de la fase mòbil, ja que poden condicionar la naturalesa química (si es troben en forma neutra i ionitzada) dels compostos a estudiar i per tant la seva afinitat per la fase estacionària.

La HPLC consta d'un sistema de bombeig, que és el responsable de fer circular la fase mòbil pel sistema (injector – columna – detector), d'un sistema d'injecció, que ens permet introduir la mostra a la columna cromatogràfica, d'una columna on es troba la fase estacionària i on es produeix la separació dels diferents components de la mescla, i d'un detector que és l'encarregat de detectar permanentment una senyal (línia de base) que s'altera a mesura que els diferents compostos surten de la columna (pics).

2.3.3 Detecció i identificació de compostos d'interès organolèptic

Actualment, hi ha diferents tipus de detectors (Ultraviolat-Visible, Infraroig, Fluorescència, *Diode-Array*, *Light-Scattering*, Masses, etc), en funció de la senyal química o física que s'utilitza per la detecció dels components de la mescla. De la varietat de detectors disponibles s'han emprat el detector de masses (MS) acoblat a la GC, per la identificació dels compostos volàtils, i el detector *diode array* (DAD) acoblat a la HPLC, pels compostos fenòlics.

2.3.3.1 Detector de masses

El detector de masses acoblat a la GC utilitza la propietat que tenen els compostos de presentar un patró de fragmentació diferent. De manera que, en el detector es produeix la ruptura dels compostos a mesura que elueixen de la columna cromatogràfica.

Un detector de masses convencional està format per tres parts: font d'ionització, cambra d'anàlisi i sistema de detecció (figura II – 16).

Font ionització: Tot i existir diferents sistemes d'ionització el més habitual és l'impacte electrònic (EI). En aquest sistema, quan les molècules individualment elueixen del GC entren a la font d'ionització, on són bombardejades per un corrent d'electrons generat per un filament al qual se li aplica una diferència de potencial. Amb la pluja d'electrons, les molècules es fragmenten (de forma característica per cada molècula) i els fragments queden carregats. A la pràctica, com que tots els fragments tenen una càrrega unitària, el valor de la relació de massa / càrrega (m/z) és el valor de massa del fragment.

Cambra d'anàlisi: Els fragments carregats es fan passar per un grup de quatre electroimans (quadrupol) que els transporta fins al detector. El quadrupol es programa perquè efectui la separació dels fragments en funció de la seva m/z , així només entren al detector aquells fragments que es volen estudiar.

Detector: És l'encarregat de registrar els fragments de massa que arriben. Per cada molècula es genera un espectre amb la m/z (eix d'ordenades) i la seva intensitat (eix d'abscisses).

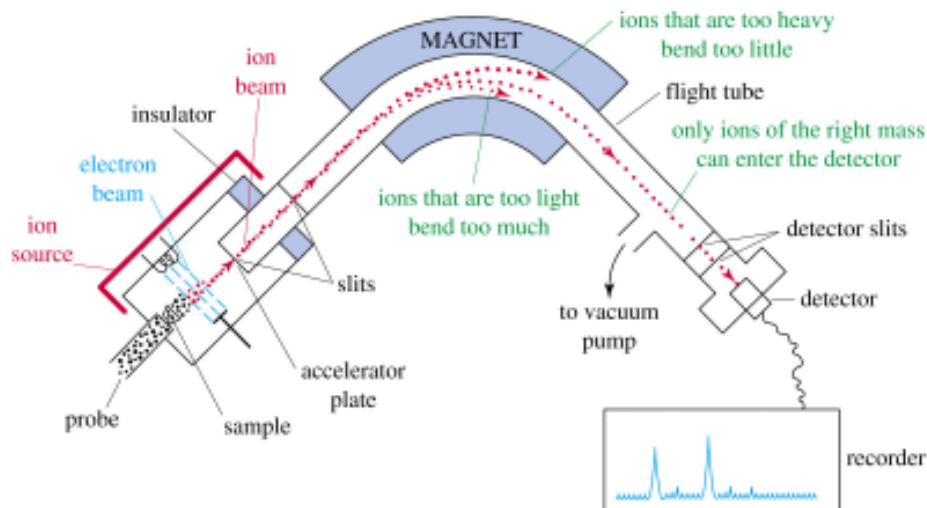


Figura II – 16: Esquema d'un detector de masses.

2.3.3.2 Detector de fotodiodes (DAD)

La cromatografia líquida acoblada a un detector d'ultraviolat (LC/UV) o a un detector d'ultraviolat amb sèrie de fotodiodes (LC/DAD) ha estat àmpliament utilitzada durant les últimes dècades i forma part, quasi indispensable, de qualsevol laboratori analític d'investigació.

Els detectors tipus DAD consten bàsicament d'un font emissora de llum (làmpada de deuteri per la regió d'ultraviolat), d'una cel·la per on passa la mostra, d'un difractor de la llum (per separar les diferents longituds d'ona) i d'un detector (fotodiode).

La cel·la està connectada a la columna cromatogràfica del HPLC de manera que els compostos a estudiar de la mostra problema, un cop han estat separats, passen de forma individual per l'interior de la cel·la d'anàlisi. A la cambra d'anàlisi es fa passar un feix de llum emès per la làmpada, que es recull en una bateria de diodes situats a la part posterior, mesurant-se les diferents longituds d'ona que arriben el detector. Així, per diferència entre les longituds d'ona registrades quan només passa la fase mòbil i quan passen els components de la

mostra es genera una resposta, que es registra com un cromatograma. I, per cada compost que s'ha separat es determina el seu espectre d'absorció.

2.3.4. Mètodes d'elucidació estructural

Quan el que es pretén és identificar noves estructures de compostos, que permetin controlar l'evolució de la qualitat d'un producte al llarg del seu procés d'elaboració i durant la seva vida útil (distribució – emmagatzematge – venda), es requereix de l'aplicació de mètodes d'elucidació estructural.

L'elucidació estructural de nous compostos presenta moltes dificultats. La majoria de les quals deriven, precisament, del fet de no conèixer l'estructura del compost que s'està estudiant, ja que això dificulta l'elecció de la tècnica o tècniques a emprar i la interpretació dels resultats obtinguts. De les tècniques més habituals que s'apliquen per obtenir informació sobre l'estructura de productes destaquem: la cromatografia líquida d'alta eficàcia acoblada a l'espectrometria de masses (HPLC/MS), l'espectrometria de masses en tàndem (MS/MS) i el *time of flight- mass spectrometry* (TOF-MS).

HPLC/MS: La tècnica cromatogràfica (HPLC) combinada amb l'espectrometria de masses (MS) combina l'eficàcia de la separació cromatogràfica amb l'elevada sensibilitat i selectivitat de l'espectrometria de masses. Al permetre obtenir informació del pes molecular dels analits que formen part d'una mescla ens aporta informació sobre l'estructura. Tanmateix, és una eina d'aplicació molt limitada en l'elucidació estructural i les seves aplicacions se centren principalment en anàlisis rutinàries en els processos de control de qualitat.

MS-MS: Els nous instruments d'espectrometria de masses disposen d'un triple quadrupol (MS-MS) que permet l'estudi de les rutes de fragmentació dels compostos, amb una assignació inequívoca dels fragments de massa obtinguts. Aquesta espectrometria de masses, denominada en tàndem, implica diferents etapes de selecció o anàlisi de les diferents vies de fragmentació. Aquests equipaments són de gran utilitat en el moment d'identificar compostos en mescles complexes, així com per determinar estructures de substàncies desconegudes.

En els sistemes MS/MS la generació dels ions es realitza com en qualsevol sistema d'espectrometria de masses. Però, de la mescla d'ions generats a la font d'ionització se seleccionen només els que tenen uns determinats valors de m/z a la primera etapa de l'anàlisi (primer quadrupol). Aquest fragments de m/z són els fragments anomenats precursors o parents. Posteriorment, els ions precursors són separats utilitzant el segon quadrupol on no es produeix cap fragmentació. Finalment, els ions precursors seleccionats en el segon quadrupol són fragmentats en els anomenats fills i analitzats en la segona etapa de l'anàlisi (tercer quadrupol). Quan el que s'està analitzant és un compost pur, l'espectre de masses obtingut permet establir amb molta claredat quina és la via de fragmentació del compost, mitjançant els pares i els fills. És a dir, es pot saber quin és l'ordre de fragmentació i a partir de quin fragment pare s'ha originat un fragment fill.

TOF-MS: En els últims anys s'ha desenvolupat una nova eina, l'anomenada time of flight – mass spectrometry (TOF-MS), que presenta una elevada selectivitat, resolució i exactitud. Els equipaments TOF-MS disposen, igual que la resta d'espectròmetres de masses, d'una font d'ionització, d'un analitzador de masses i d'un detector.

Els sistema d'ionització de les molècules més utilitzat en els aparells TOF-MS s'anomena matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI). Es tracte d'un

Antecedents Bibliogràfics

sistema d'ionització que utilitza unes molècules cristal·litzades per formar una matriu on s'incorporen les substàncies a analitzar. Aquest sistema incorpora acetonitril, per permetre la dissolució de les parts apolars de l'analit, i aigua, per la dissolució de les parts polars. A més a més, aquest sistema utilitza un làser per aportar l'energia necessària per ionitzar les molècules a estudiar. El sistema de mesura de la relació m/z dels aparells TOF-MS es basa en generar ions amb la mateixa càrrega elèctrica i aplicar un camp elèctric constant, de manera que l'acceleració dels ions és proporcional a la massa del fragment. Així, el detector el que fa és mesurar la relació m/z en funció de la velocitat dels fragments.

Aquests d'aparells permeten obtenir mesures de massa exacta (quatre decimals), de manera que aporten molta informació. En funció de la massa exacta es pot obtenir la fórmula molecular del compost problema. A més a més, hi ha aparells que permeten determinar la massa exacta dels fragments, permetent estudiar la via de fragmentació d'un compost al assignar una fórmula a cada fragment generat.

Al llarg dels darrers anys, aquestes tècniques d'elucidació estructural han esdevingut una eina molt valuosa per determinar estructures i vies de fragmentació. Tanmateix, quan s'està estudiant l'estructura d'un compost del qual no es disposa de patró comercial, es fa necessari confirmar tota la informació recollida amb una eina anomenada ressonància magnètica nuclear (RMN).

Metodologia I Pla de Treball

III. Metodologia i Pla de Treball

Per tal de controlar la qualitat organolèptica del cava durant la fase de rima i potenciar les seves expectatives comercials, el grup de recerca de vins i caves ha iniciat, en col·laboració amb l'empresa elaboradora Freixenet S.A., els projectes de recerca VIN01-051 i AGL2005-03451 per caracteritzar els aromes florals, els torrats i els típics de caves de llarga criança i alta gama. Fruit d'aquesta col·laboració s'ha disposat d'unes mostres en fase de rima reals que han estat emprades per dur a terme la primera part de la tesi.

Per buscar marcadors químics d'envelliment en mostres de cava a temps real es requereixen anys, un elevat cost per l'estoc d'ampolles i dificultat de monitoritzar les mostres comercials durant la seva distribució. Per aquests motius s'ha hagut de plantejar una metodologia experimental basada en accelerar els processos d'envelliment del cava. Així gran part d'aquesta tesi es basa en el disseny d'un test accelerat d'envelliment al laboratori.

En el test d'envelliment s'ha optat per accelerar els processos que normalment es produeixen en el cava, durant la seva criança a la cava (fase de rima) o durant la seva distribució (emmagatzematge), mitjançant la temperatura. S'ha seleccionat una temperatura moderada de 37°C, de manera que es forçés una aparició gradual d'aquells possibles indicadors (volàtils i no volàtils) de la qualitat organolèptica del cava i s'evités produir l'aparició de compostos no naturals en els caves (artefactes).

Per avaluar l'aparició de marcadors s'ha dissenyat un estudi factorial amb dues qualitats de cava, una de baixa gama (Cava A) i una d'alta gama (Cava B). La raó d'emprar les dues categories respon a què la bodega, en funció de la qualitat i del cost del coupatge deixarà que el cava resultant evolucioni més o

menys a la fase de rima. Els vins base més senzills són els que es destinen a caves de curta evolució durant la cria (9 – 12 mesos), perquè l'enòleg sap que no evolucionarien satisfactòriament amb una llarga fase de rima. A més a més, solen ser aquests caves els que reben una certa quantitat de sucre (qualitats semi-sec, sec i extra-sec) per tal d'emascarar algun possible defecte aromàtic que pugui aparèixer. Per contra, els vins base de major qualitat es mantindran en contacte amb els llevats durant un període ampli de cria (18 – 36 mesos). Aquests caves són els que constitueixen la més alta qualitat, amb propietats organolèptiques més òptimes i als quals se'ls addiciona molt poca quantitat de sucre en el licor d'expedició (brut, extra-brut) o fins i tot no se'ls addicionen sucres (brut nature) (apartat 1.2.5). De cadascuna de les categories (A i B) s'han seleccionat dos tipus de mostres obtingudes al llarg de dues etapes del procés d'elaboració: fase de rima (caves amb els llevats de la segona fermentació) i comercials (caves addicionats amb el licor d'expedició).

Aquestes mostres han estat sotmeses a condicions oxidants (presència d'oxigen) i no oxidants (presència de diòxid de carboni o nitrogen). Les mostres envellides en presència d'oxigen s'han utilitzat com a control dels possibles processos d'oxidació que poden produir-se en el cava, principalment durant l'emmagatzematge on es pot produir un petit intercanvi d'oxigen a través del tap de suro definitiu. En canvi, per les condicions no oxidants s'ha emprat el gas nitrogen per envellir el cava en unes condicions inerts al ser un gas del qual no s'ha descrit cap reacció amb els components del cava. I s'ha seleccionat per primera vegada en un estudi d'envelliment accelerat de cava el diòxid de carboni, per simular unes condicions el més similar possible a aquelles que es produeixen en el cava en condicions reals, durant la cria i durant la seva distribució i emmagatzematge.

Per valorar la qualitat organolèptica del cava, així com per detectar aquells possibles marcadors de la correcta evolució d'aquesta qualitat, cal disposar de metodologies analítiques que permetin obtenir resultats fiables. Aquestes tècniques han de reunir una sèrie de característiques, ja que han de ser

ràpides, econòmiques, senzilles d'aplicar i respectuoses amb el medi ambient per tal que puguin ser adoptades per efectuar les anàlisis rutinàries de control de qualitat a la bodega elaboradora i per poder analitzar un elevat nombre de mostres.

Per efectuar una descripció de la metodologia emprada per dur a terme la tesis aquesta metodologia s'ha dividit en funció dels objectius que ens havíem plantejat: Trobar marcadors de qualitat volàtils i no volàtils durant la fase de rima i al llarg de l'emmagatzematge. A més a més, s'ha inclòs un tercer apartat en el qual s'especifiquen els mètodes utilitzats: Test d'envelliment accelerat i tècniques analítiques.

3.1 Marcador volàtils i semi-volàtils de la qualitat durant la criaça i l'emmagatzematge

Per tal de seleccionar quins compostos volàtils i semi-volàtils evolucionen al llarg de la rima i de l'emmagatzematge, i amb la finalitat de monitoritzar la qualitat aromàtica del cava, aquesta part s'ha dividit en tres sub-apartats:

3.1.1 Evolució dels volàtils durant la rima real i possibles marcadors de criaça

S'han utilitzat mostres en fase de rima real de dos tipus diferents de caves, un cupatge tradicional de macabeu, xarel·lo i parellada (1:1:1) i un segon cupatge que incloïa la varietat negra trepat, autoritzada per la D.O. Cava. S'ha caracteritzat el perfil aromàtic d'aquests caves des de 9 (mínim legal) fins a 27 mesos de contacte amb els llevats de la segona fermentació amb una periodicitat trimestral. Amb aquestes mostres es va posar a punt la tècnica de microextracció en fase sòlida (SPME) amb dues fibres d'extracció (PDMS i

DVB/CAR/PDMS), seguida de la cromatografia de gasos acoblada a un detector de masses (GC-MS). Aquesta tècnica reuneix els requisits per ser utilitzada com a mètode de control habitual a la bodega, sent senzilla, ràpida, econòmica i respectuosa amb el medi ambient. La comprovació de la validesa i fiabilitat del mètode analític escollit es va realitzar mitjançant el càlcul dels factors de resposta, linealitat, repetibilitat i límits de detecció i quantificació.

3.1.2. Perfil aromàtic de caves comercials i possibles nous marcadors de qualitat

El mètode d'extracció de la fracció volàtil seleccionat en l'apartat 3.1.1, tot i ser el més idoni per controlar la qualitat aromàtica dels caves durant la fase de rima, és necessari comprovar si la informació que dóna és adient, també per controlar els caves comercials o pel contrari, està limitada i és necessari adaptar les condicions de la tècnica de SPME per obtenir un perfil volàtil diferent. Per aquesta raó, en mostres comercials es va comparar el perfil volàtil obtingut amb tres mètodes d'extracció: el SDE on s'utilitza la destil·lació i extracció líquid-líquid a elevada temperatura; el CLSA, que utilitza aire a T^a moderada per arrossegar els compostos volàtils per ser retinguts en un medi sòlid i després extrets amb un dissolvent orgànic; i finalment la SPME, que a T^a moderada reté en una fibra els compostos volàtils que són directament alliberats a la columna cromatogràfica. Aprofitant la capacitat extractiva dels mètodes SDE i CLSA es pretén comprovar si hi ha compostos que poguessin ser indicadors de la qualitat, però que no són detectats per la tècnica SPME. Per realitzar aquest sub-apartat es van utilitzar mostres de tres caves comercials (addicionats amb el licor d'expedició), procedents d'un cupatge tradicional de les varietats blanques, i aquests mateixos caves després d'estar durant un mes a 37°C.

3.1.3 Evolució dels volàtils durant la criaça i l'emmagatzematge accelerats

Com que tenir mostres de cava durant la rima i al llarg de l'emmagatzematge i distribució és molt costós, en temps i diners, ens vam plantejar efectuar un test accelerat d'envelliment. Una vegada realitzat el test es disposava de mostres amb rima accelerada i de mostres comercials emmagatzemades en condicions inadequades de T^a.

A les mostres de rima accelerada s'han determinat els compostos volàtils i semi-volàtils mitjançant la tècnica SPME seguida de la cromatografia de gasos acoblada a un detector d'ionització de flama (GC-FID). Amb aquesta tècnica es volia comprovar, mitjançant els marcadors de qualitat identificats en les mostres de rima real, si l'envelliment accelerat que s'havia provocat podia assimilar-se a una criaça en rima real.

Les mostres comercials del test s'han utilitzat per desenvolupar una nova metodologia analítica de SPME seguida de GC-MS que fos útil per determinar els compostos detectats com a possibles marcadors de la qualitat amb mètodes amb major capacitat d'extracció (SDE i CLSA) (apartat 3.1.2). D'aquests compostos destaquen els furfurals i certs compostos sofrats, que es pensava que eren formats per reaccions de Maillard/Strecker.

L'esquema següent resumeix el treball realitzat en aquest apartat:

- S'ha posat a punt la tècnica de microextracció en fase sòlida comparant dues fibres d'extracció per analitzar els compostos volàtils indicadors del temps d'envelliment en caves en fase de rima real.
- S'ha caracteritzat el perfil aromàtic del cava comercial utilitzant diferents tècniques d'extracció (SDE, CLSA i SPME), per tal de comparar els perfils i adaptar la tècnica SPME a la determinació de compostos volàtils que

poden aparèixer en els caves comercials envellits o mantinguts a temperatures inadequades.

- S'ha comprovat la validesa i fiabilitat del mètode analític escollit, mitjançant el càlcul dels factors de resposta, linealitat, repetibilitat i límits de detecció i quantificació.
- S'han identificat els compostos que poden ser utilitzats com a marcadors de la qualitat organolèptica dels caves durant la cria i la distribució.

3.2 Determinació d'indicadors no volàtils de la qualitat al llarg de la cria i emmagatzematge

Com a resultat dels treballs d'investigació realitzats en el nostre grup d'investigació es disposa de dades que ens permeten conèixer l'evolució dels compostos fenòlics al llarg de la cria dels caves. A més, fruit d'un estudi d'enfosquiment accelerat realitzat a 55°C amb les mateixes mostres de rima real emprades en l'apartat 3.1.1 es va detectar la presència de compostos no identificats, que augmentaven significativament al llarg del temps.

Aquests antecedents van donar lloc a què, amb les mostres comercials i de rima obtingudes en el test d'envelliment accelerat es determinés l'evolució dels compostos fenòlics, mitjançant la cromatografia líquida d'alta eficàcia acoblada a un detector de fotodiodes (HPLC-DAD). Mitjançant aquestes dades s'ha pogut comprovar en les mostres de rima i comercials, l'evolució dels compostos fenòlics i detectar possibles alteracions d'aquests compostos.

També es s'ha treballat en l'elucidació estructural d'un compost que augmentava al llarg del test d'enfosquiment accelerat realitzat a 55°C (Girbau-

Solà, 2003) i que també es va formar en les mostres de rima i comercials obtingudes durant el test d'envelliment accelerat a 37°C. Per dur a terme aquesta secció es s'han emprat diferents metodologies analítiques com són la HPLC-MS, la MS-MS, Q-TOF.

A continuació es resumeix el treball realitzat en aquesta part de la tesi:

- S'ha caracteritzat el perfil fenòlic dels caves en fase de rima i comercials obtinguts en el test d'envelliment accelerat mitjançant la HPLC-DAD.
- S'han determinat nous possibles marcadors no volàtils de la qualitat organolèptica del cava i s'ha intentat elucidar l'estructura del marcador més adient pel propòsit de la tesi.

3.3 Mètodes utilitzats

En aquest apartat es descriu el disseny experimental del test accelerat d'envelliment, així com les tècniques instrumentals emprades.

3.3.1 Disseny del test accelerat

Per confeccionar el test d'envelliment es va dissenyar un estudi factorial amb dues categories comercials de cava (Cava A i Cava B) que provenien de la mateixa bodega col·laboradora. Les categories comercials seleccionades van ser semi-sec (Cava A) i brut (Cava B). Per cada tipus de cava es van considerar dues etapes del procés d'elaboració: Cava en contacte amb els llevats de la segona fermentació (lies) i Cava addicionat amb el licor d'expedició (comercial).

Metodología i Pla de Treball

Per cada tipus de cava (A i B), les mostres de les diferents etapes del procés d'elaboració (Lies i Comercial) provenien del mateix vi base. A la figura III – 1 es representa un esquema del mostreig del test d'envelliment.

Lies: Per cada qualitat comercial (semi-sec i brut) es van agafar 12 ampolles de 750 mL de capacitat amb cava en contacte amb els llevats de la segona fermentació durant 12 mesos. Després d'homogeneïtzar i desgasar el cava en un recipient de 10 litres es van dosificar 150 mL en 60 botellins de vidre topaci de 250 mL de capacitat.

Comercial: Per cada qualitat comercial (semi-sec i brut) es van agafar 12 ampolles de 750 mL de capacitat amb cava en contacte amb els llevats de la segona fermentació durant 12 mesos. Aquests caves van ser degorjats a la bodega elaboradora i addicionats amb el licor d'expedició adequat en funció de la categoria comercial. Les ampolles de cava comercial es van homogeneïtzar i desgasar en un recipient de 10 litres i es van dosificar 150 mL en 60 botellins de vidre topaci de 250 mL de capacitat.

En tots els botellins es va deixar un espai de cap de 100 mL que va ser saturat amb tres condicions diferents (oxigen, nitrogen, diòxid de carboni). Per cada tipus de gas es van emprar 20 botellins (3 gasos x 20 botellins = 60 botellins). Les condicions de saturació de l'espai de cap dels botellins es van aconseguir després d'aplicar un flux de 150 mL/min durant 5 minuts per cada gas.

El test d'envelliment es va desenvolupar a la foscor, dins d'una estufa a una temperatura moderada de 37°C. Les mostres es van analitzar abans d'entrar a l'estufa, mostres control, i amb una periodicitat setmanal durant 7 setmanes. A més a més, es van deixar dos botellins més de cada tipus, per assegurar l'aparició dels marcadors d'envelliment, durant 9 i 13 setmanes respectivament. El test es va realitzar per duplicat per cada punt de mostreig.

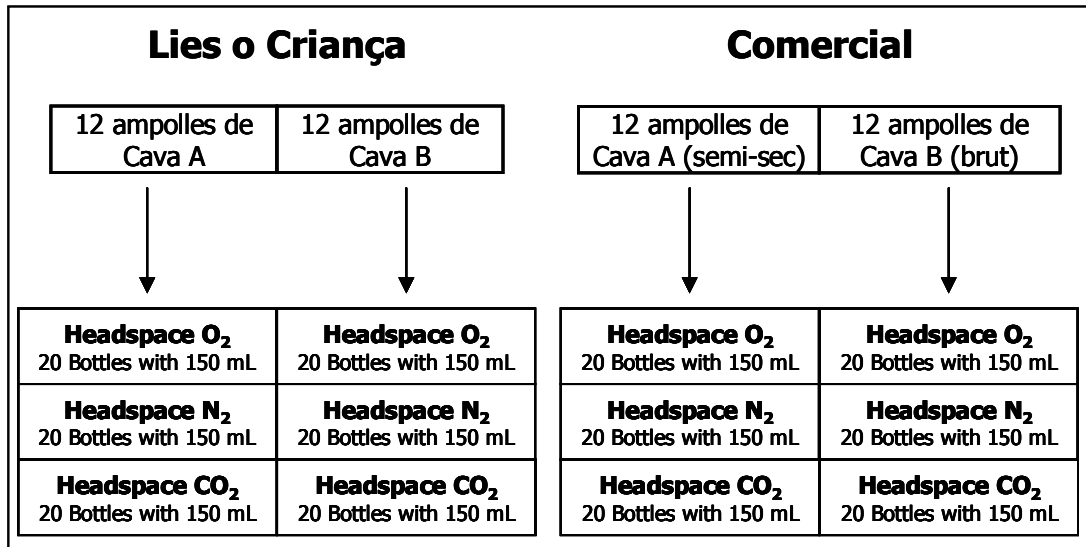


Figura III – 1: Esquema de la preparació de les mostres del test d'envelliment.

3.3.2. Tècniques instrumentals

A la taula III – 1 es resumeixen les metodologies analítiques emprades en els diferents apartats (3.1 i 3.2), així com les mostres utilitzades en cada cas.

Els mètodes emprats a cada apartat es troben detallats en el capítol IV dels resultats inclosos en les publicacions (apartats 4.1.1, 4.1.2, 4.2.1 i 4.2.2), excepte els mètodes SPME / GC-FID i SPME / GC-MS (SIM) que s'expliquen en els apartats 4.1.3. i 4.1.4, respectivament.

Metodologia i Pla de Treball

Metodologia	Mostres	Resultats
SPME (PDMS i DVB/CAR/PDMS) - GC/MS (Scan)	Dos coupatges (varietats blanques tradicionals i Trepat) amb criança real fins a 27 mesos.	Apartat 4.1.1
SDE CLSA SPME (DVB/CAR/PDMS) - GC/MS (Scan)	Caves comercials amb un envelliment accelerat a 37°C durant un mes.	Apartat 4.1.2
SPME (PDMS i DVB/CAR/PDMS) - GC/FID	Caves amb criança i emmagatzematge accelerats, obtinguts en el test d'envelliment accelerat.	Apartats 4.1.3.1 i 4.1.3.2
SPME (PDMS i DVB/CAR/PDMS) - GC/MS (Sim)	Caves amb emmagatzematge accelerat obtinguts en el test accelerat d'envelliment.	Apartat 4.1.4
HPLC - DAD	Caves amb criança i emmagatzematge accelerats, obtinguts en el test accelerat d'envelliment.	Apartat 4.2.1
HPLC - MS MS/MS TOF-MS	Fracions aïllades i liofilitzades de les mostres comercials del cava semi-sec amb espai de cap de CO ₂	Apartat 4.2.2

SPME: Microextracció en fase sòlida

DVB: Divinilbenzè

PDMS: Polidimetilsiloxà

CAR: Carboxen

GC: cromatografia de gasos

MS (Scan): Espectrometria de masses en mode *scan*

SDE: Extracció i destil·lació simultània

CLSA: *Closed loop stripping analysis*

FID: Detector d'ionització de flama

MS (Sim): Espectrometria de masses mitjançant la monitoratge d'ió

HPLC: Cromatografia líquida d'alta eficàcia

DAD: Detector de fotodiodes

TOF-MS: Espectrometria de masses de temps de vol

Resultats i Discussió

IV. Resultats i Discussió

En aquesta secció s'exposen els resultats obtinguts al llarg del treball experimental realitzat a la tesi. Aquests resultats han estat agrupats en publicacions (dos acceptades i dos en procés de revisió en revistes d'impacte). Cadascuna de les publicacions esta precedida d'un resum. A més, s'exposen resultats no publicats, però que formen part del treball realitzat i que han permès assolir els objectius plantejats.

4.1 Marcadors volàtils i semi-volàtils de la qualitat durant la cria i l'emmagatzematge

El primer objectiu de la tesi exigia caracteritzar la fracció volàtil i semi-volàtil dels caves a fi d'identificar aquells compostos que podien ser emprats per les bodegues per seguir la correcta evolució de la qualitat aromàtica dels caves.

Aquest objectiu es va dividir en diferents apartats, primer es van buscar aquells marcadors relacionats amb la correcta evolució de la cria real del cava en contacte amb els llevats de la segona fermentació (apartat 4.1.1); posteriorment, es van identificar els possibles marcadors d'un correcte emmagatzematge i distribució (apartat 4.1.2) i finalment es va estudiar l'evolució dels possibles marcadors de la qualitat mitjançant un test d'envelliment accelerat (apartat 4.1.3).

4.1.1 Evolució dels compostos volàtils del cava (vi escumós) durant períodes llargs de criança en contacte amb els llevats de la segona fermentació.

Publicació: M. Riu-Aumatell, J. Bosch-Fusté; E. López-Tamames, and S. Buxaderas. Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing in contact with lees. *Food Chem.*, 2005, 95, 237-242.

Resum:

L'objectiu del treball ha estat determinar, de forma ràpida i precisa, compostos que poguessin ser marcadors de la correcta evolució dels aromes post-fermentatius del cava amb llargs períodes de criança (superiors a 2 anys).

Les mostres de caves utilitzades han estat elaborades a escala industrial per una bodega de la regió del cava i s'han mantingut en contacte amb els llevats de la segona fermentació fins a 27 mesos. Els caves seleccionats eren un cupatge de les varietats blanques tradicionals (macabeu, xarel·lo i parellada) i un cava rosat elaborat amb la varietat trepat.

L'extracció dels compostos volàtils i semi-volàtils s'ha realitzat mitjançant la microextracció en fase sòlida a l'espai de cap (HS-SPME) utilitzant dues fibres comercials diferents. Una fibra apolar (PDMS) que obté els compostos únicament per absorció i una segona fibra (DVB/CAR/PDMS) que combina fases polars i apolars de manera que reté els compostos per absorció i adsorció.

S'han identificat 27 compostos implicats en el perfil aromàtic característic del cava. Les diferències entre les dos fibres seleccionades han estat únicament quantitatives, sent la fibra triple (DVB/CAR/PDMS) la que presenta una major capacitat d'extracció. Amb els resultats obtinguts s'ha realitzat una anàlisi estadístic de components principals obtenint que les mostres s'agrupen segons el tipus de fibra. Si es repeteix l'anàlisi de components principals tractant els resultats de cada fibra per separat s'observa que mentre la fibra PDMS no presenta una suficient capacitat discriminatòria, la fibra triple permet agrupar les mostres en funció de la varietat (component 1) i del temps de cria (component 2).

Posteriorment es va efectuar l'anàlisi de regressió entre els volàtils i el temps per confirmar les diferències en funció del període de cria. Com a resultat d'aquest tractament obtenim que la fibra triple és la que millor permet seguir l'evolució dels compostos al llarg del temps de cria.

S'identifiquen com a possibles marcadors de cria el vitispirà, el 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalè (TDN), el succinat de dietil, el 1-hexanol i el lactat d'etil. A més, podem concloure que la metodologia analítica seleccionada (SPME-GC/MS) permet seguir la correcta evolució dels volàtils al llarg d'una cria de 27 mesos.

Resultats concrets:

- Posada a punt d'un mètode analític de SPME GC/MS i selecció de la fibra extractiva més adient.
- Caracterització del perfil aromàtic de dos caves (tipus i *Rosé*) durant la rima real.
- Identificació de possibles marcadors d'una cria de qualitat



Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees

M. Riu-Aumatell, J. Bosch-Fusté, E. López-Tamames, S. Buxaderas *

Departament de Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

Received 23 August 2004; received in revised form 16 November 2004; accepted 16 November 2004

Abstract

In order to study the evolution of volatile compounds during long ageing times in contact with lees (more than 2 years), Headspace–solid phase microextraction (HS/SPME) method was applied to different cavas (Spanish Sparkling wine). Two different fiber coatings were used: PDMS which extracts the analytes by partitioning and DVB–CAR–PDMS which extracts either by partitioning or physically trapped the target compounds. Even though the volatile profile obtained by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) was similar, the triple phase seems to be more suitable to follow the development of the volatile profile during its ageing time. Hexyl, 2-phenylethyl and isoamyl acetates significantly decrease over time, while 1,2-dihydro-1,1,6-trimethylnaphthalene (TDN), vitispirane and diethyl succinate significantly increase during ageing in contact with lees.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ageing; Cava; Headspace/solid-phase microextraction; Volatile compounds

1. Introduction

Cava is the Spanish sparkling wine (Certified Brand of Origin) produced by the traditional method which consists of a second fermentation in closed bottles and ageing in contact with lees for at least 9 months, the minimum time legally established (Council Regulation (EC), 1493/1999). Empirically, cava makers believe that long ageing time provides high quality cavas with a complex bouquet. This aroma is difficult to standardize due to the influence of biological processes, such as yeast autolysis (de la Presa-Owens, Schlich, Davies, & Noble, 1998; Escudero, Charpentier, & Etievant, 2000; Leroy, Charpentier, Duteurtre, Feuillat, & Charpentier, 1990; Loyaux & Adda, 1981; Pozo-Bayón, Polo, Martín-Álvarez, & Pueyo, 2004; Tominaga, Guimbertau, &

Dubordieu, 2003). The characterization of the development with to the ageing time of the bouquet of the high quality cavas could provide a great economy of time and money for the wine makers.

Very few studies exist on the volatile composition of cava according to the ageing time in contact with lees (Francioli, Guerra, López-Tamames, Guadayol, & Caixach, 1999; Francioli, Torrens, Riu-Aumatell, López-Tamames, & Buxaderas, 2003). These authors suggested that some volatile compounds, determined by the solid phase microextraction technique (SPME) using the polydimethylsiloxane (PDMS) fiber, characterized cavas with different ageing times. The PDMS fibers used previously for cava (Francioli et al., 1999, 2003) is a nonpolar fiber which extracts the target analytes by partitioning. Actually, different commercial bipolar fiber coatings exists. In these bipolar phase coatings, the volatile compounds could be extracted either by partitioning or they could be physically trapped (Shirey & Mindrup, 1999). Recently, in the study of Torrens,

* Corresponding author. Tel.: +34 934024512; fax: +34 934035931.
E-mail address: susana@farmacia.far.ub.es (S. Buxaderas).

Riu-Aumatell, López-Tamames, and Buxaderas (2004), four fiber coatings were applied for white and red wine, and the divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS) was shown to be the most appropriate to obtain the wider wine volatile profile.

In the current research, we studied the development of post-fermentative aroma and its evolution in cava during a long ageing time in contact with lees (more than 2 years). The evolution of the volatile profile of two cava series produced from different grape varieties after 9–27 months of ageing was performed by HS/SPME and GC/MS every three months. The extraction was performed with two fibers PDMS, as proposed Francioli et al. (2003), and the triple phase DVB-CAR-PDMS as recommended for Torrens et al. (2004) in wines to consider if the volatile profile obtained differs according to the fiber used.

2. Material and methods

2.1. Samples

Two series of cava (Spanish sparkling wine), with ageing time of 9, 12, 15, 18, 21, 24, and 27 months, were made by the same winery at industrial scale, from the autochthonous *Vitis vinifera* of the cava region. One series was a blend of the traditional white varieties to produce cava: Macabeu, Xarel·lo and Parellada (1:1:1). The other series was a *rosé* cava of the red variety, Trepal.

2.2. Reagents

An internal standard solution (IS) of nonanoic acid ethyl ester, 95% purity (Sigma, St. Louis, MO, USA) in methanol (SDS, Peypin, France) was prepared at a concentration of 1 g/l.

2.3. SPME fiber coatings

The SPME fibers tested were 100 µm polydimethylsiloxane layer (PDMS) recommended for volatiles and 10 mm fiber coated with 50/30 µm divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane layer (DVB-CAR-PDMS) recommended for flavours (volatiles and semivolatiles) in the catalog recommendations of Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

2.4. SPME conditions

SPME was performed at 35 °C in the headspace mode (with a distance from the liquid surface of 20 mm) in closed 10 ml vials (Reference 27385, Supelco, Bellefonte, PA, USA) containing 5 ml of sample and 5 µl of IS for 30 min with magnetic stirring (700g). The fiber was activated prior to use each day by inserting it

into the GC injector at 250 °C for 30 min. The desorption time was 5 min. For each cava sample HS-SPME was applied in triplicate.

2.5. GC-MS analysis

The separation was carried out by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) using a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) 5971A mass spectrometer coupled to a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) 5890A Series II chromatograph. A Supelcowax 10 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) capillary column with polyethylenglycol 20 M stationary phase (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) and SPB-1™ capillary column with fused silica stationary phase (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) were used. The chromatographic conditions used were the same as that of Francioli et al. (2003). Electron impact mass spectra were recorded at a voltage of 70 eV ionization energy in the 15–250 u mass range, and 2 scans/s.

2.6. Qualitative analysis

Fig. 1 showed the chromatograms of 9 and 27 months of ageing time obtained with PDMS (a and c) and DVB-CAR-PDMS (b and d), respectively. The number of compounds corresponds to the compounds listed in Table 1. Volatile compounds were identified by comparing them with a private spectra library created with chemical standards and two spectral libraries (NIST/EPA/MSDC 49K Mass Spectral Database, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA and Registry of Mass Spectral Data with Structures, Wiley 6.1, NY, USA), as well as with relative retention times when chemical standards were available. We also used the retention index standards (Sigma, St Louis, MO, USA) of C8 and C32 aliphatic hydrocarbons dissolved in methanol to calculate the Kováts index (KI) in CW and SPB-1 columns, respectively (Table 1).

2.7. Quantitative analysis

Quantification was done by the internal standard method and the volatile compounds identified were quantified by considering the relative response factor to be 1 and were expressed as mg/l equivalents of IS. The RSD values, calculated from the triplicates of each cava sample, were similar for both fibers used (data not shown).

2.8. Statistical procedures

Principal components analysis (PCA) was applied in order to find either varietal, ageing time or fiber coating groupings. The relationship between ageing time (months) and the levels of aroma compounds was made by simple regression analysis and one-way ANOVA

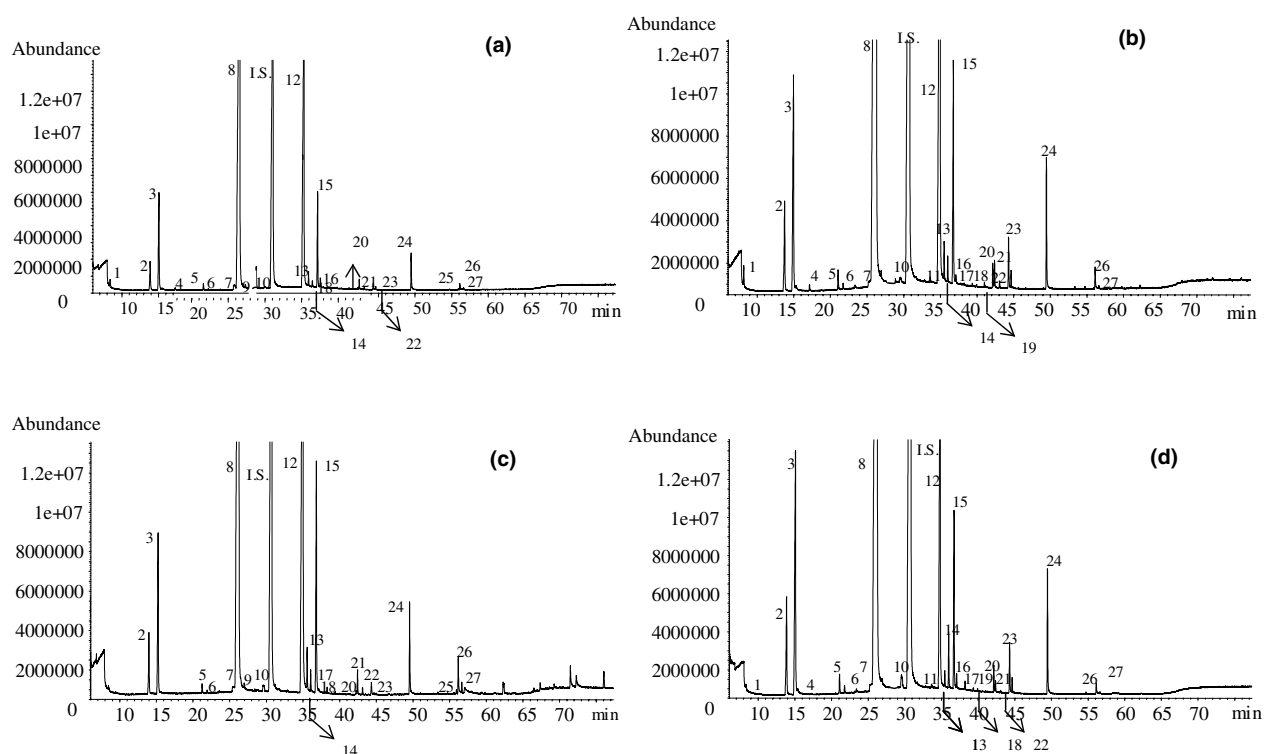


Fig. 1. Chromatograms of sparkling wines by HS/SPME method: (a) chromatogram of a sparkling wine obtained with PDMS fiber of 9 months of ageing time; (b) chromatogram of a sparkling wine obtained by DVB-CAR-PDMS fiber of 9 months of ageing time; (c) chromatogram of a sparkling wine obtained with PDMS fiber of 27 months of ageing time; (d) chromatogram of a sparkling wine obtained by DVB-CAR-PDMS fiber of 27 months of ageing time. Peak numbers correspond to the compounds listed in Table 1.

analysis. Significant result was considered when $p < 0.05$ (Statgraphics Plus 4.1).

3. Results and discussion

Twenty seven compounds were detected in the characteristic volatile profile of cavas (Fig. 1). The differences observed according to the fiber used (Fig. 1(a) and (c) with Fig. 1(b) and (d)) or the ageing time (Fig. 1(a) and (b) with Fig. 1(c) and (d)) were mainly quantitative. The numbered peak 11 (unknown peak 1, m/z 59, 72, 88, 101) was only detected with the triple phase fiber while the isoamyl hexanoate was only detected with the PDMS phase (Table 1). The tentatively identified volatile compounds vitispirane, 1,2-dihydro-1,1,6-trimethylnaphthalene (TDN) ethyl 2-methyl octanoate and ethyl decanoate (Table 1 and Fig. 1) were previously cited by Francioli et al. (1999) in sparkling wines. These compounds and ethyl hexadecenoate were detected with both fibers.

In order to obtain the groupings of the cavas according to the volatile compounds determined by HS/SPME, principal components analysis (PCA) was carried out (Fig. 2). Two groups were obtained according to the fiber used [Component 1 (34%)]. The analysis of variance

(one-way ANOVA) shows significant differences between these two groups (data not shown). Ethyl esters of high molecular weight (ethyl 2-methyloctanoate, dodecanoate, hexadecanoate and hexadecenoate) and isoamyl hexanoate were significantly higher in the samples determined by PDMS fiber while ethyl esters of low molecular weight (ethyl hexanoate, octanoate and lactate), alcohols (hexanol and 2-phenylethanol), fatty acids (hexanoic and octanoic acid) and post-fermentative aromas (vitispirane and diethyl succinate) were higher in cavas determined by DVB-CAR-PDMS. The two action mechanism of the triple phase fiber may have favoured the extraction of more polar compounds such as alcohols and acids.

When the principal components analysis (PCA) was performed with both fibers separately, any significant grouping according to the ageing time was obtained with the PDMS fiber (data not shown). Probably the combination of both mechanisms (absorbent and adsorbent) in the triple phase fiber enhanced its discriminant capacity. The PCA of the volatile compounds obtained with DVB-CAR-PDMS fiber is shown in Fig. 3. Although the volatile composition was different in white or rosé sparkling wine [Component 1 (32%)], the samples were distributed on the plane according to their ageing time [Component 2 (20%)]. Samples between 9 and

Table 1

Compounds determined by the HS/SPME method, Kováts index, identification and minimum and maximum values for the fibers PDMS and DVB-CAR-PDMS

	KI ^a Cw ^b phase	KI SPB- 1 ^c phase	Id. ^d	PDMS		DVB-CAR-PDMS		
				Minimum ^e	Maximum ^e	Minimum	Maximum	
1	Isoamyl acetate	1116	860	A, B	n.d. ^f	2.799	n.d.	5,877
2	Isoamyl alcohol	1211	719	A, B	0.048	1.612	0.023	0.855
3	Ethyl hexanoate	1230	984	A, B	0.594	2.242	0.047	2.655
4	Hexyl acetate	1267	1012	A, B	n.d.	0.684	0.003	0.033
5	Ethyl lactate	1334	1135	A, B	0.021	0.165	0.023	0.152
6	Hexanol	1347	858	A, B	n.d.	0.066	0.022	0.059
7	Ethyl 2-methyloctanoate	1415	1224	B ^g	n.d.	0.245	n.d.	0.120
8	Ethyl octanoate	1436	1184	A, B	1.427	26.652	8.600	22.972
9	Isoamyl hexanoate	1451	1233	A, B	n.d.	0.203	n.d.	n.d.
10	Vitispirane	1507	1260	B ^g	n.d.	0.126	0.020	0.223
11	Unknown peak 1 (<i>m/z</i> 59, 72, 88, 101)	1603	1147		n.d.	n.d.	0.015	0.099
12	Ethyl decanoate	1634	1381	A, B	3.314	9.990	3.043	8.630
13	Isoamyl octanoate	1649	1429	A, B	0.061	0.397	0.083	0.344
14	Diethyl succinate	1662	1153	A, B	0.004	0.205	0.089	0.460
15	Ethyl decenoate	1681	1437	B ^g	n.d.	2.241	0.729	10.449
16	Unknown peak 2 (<i>m/z</i> 57, 97, 151, 180)	1689	1247		n.d.	1.086	0.010	0.125
17	1,2-Dimethyl-1,1,6-trimethylnaphthalene	1719	1474	B ^g	n.d.	0.063	n.d.	0.068
18	Unknown peak 3 (<i>m/z</i> 55, 70, 83, 97)	1750	1263		n.d.	0.035	0.007	0.041
19	2-Phenylethyl acetate	1795	1222	A, B	n.d.	0.048	n.d.	0.080
20	Hexanoic acid	1826	1579	A, B	n.d.	0.162	0.047	0.204
21	Ethyl dodecanoate	1833	1577	A, B	0.021	0.606	0.042	0.135
22	Isoamyl decanoate	1853	1633	A, B	n.d.	0.076	0.002	0.081
23	2-Phenylethanol	1888	1080	A, B	n.d.	0.385	0.157	1.202
24	Octanoic acid	2038	1356	A, B	n.d.	0.691	0.250	1.639
25	Ethyl hexadecanoate	2229	1978	A, B	n.d.	0.199	n.d.	0.026
26	Decanoic acid	2254	1363	A, B	0.016	0.619	0.005	1.527
27	Ethyl hexadecenoate	2269	1438	B ^g	n.d.	0.207	n.d.	0.018

^a Kováts index.

^b Carbowax phase.

^c Silicone phase.

^d Identification (A, retention time; B, mass spectrometry).

^e mg/l equivalents of ethyl nonanoate (IS).

^f Not detected.

^g Tentatively identified.

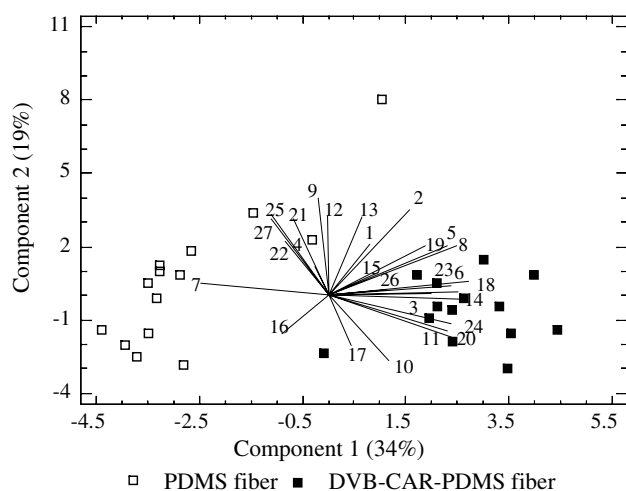


Fig. 2. Principal components analysis of the mean of the triplicates of the volatile compounds of cavas determined by PDMS and DVB-CAR-PDMS fibers. The vector numbers correspond to that of Table 1.

15 months were in the lower zone of the plane while the samples of 21 to 27 months were in the upper zone. Some acetate, ethyl and isoamyl esters of high molecular weight, seem to be typical aromas of cavas of low ageing time, while vitispirane, diethyl succinate, TDN, hexanol (related to autolysis process according to Francioli et al., 2003) and ethyl lactate seem to be compounds inherent in the bouquet of long aged cavas ($p < 0.05$) (Francioli et al., 1999; Francioli et al., 2003). Similar results were obtained by Loyaux and Adda (1981) during Champagne ageing, which showed a decrease in hexyl acetate and an increase in the concentration of vitispirane. Some authors suggest that it is the yeast autolysis, that occurs after approximately 18 months in contact with lees, which causes changes in aroma composition due to the enzymatic release from glycosidic precursors. Carotenoids are the origin molecules of C_{13} norisoprenoids. These compounds are substances that could originate from the direct degradation of carotenoid molecules

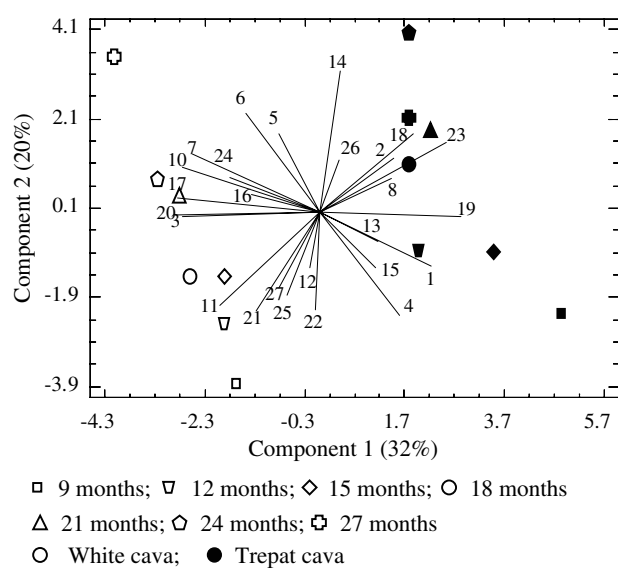


Fig. 3. Principal component analysis of the mean of the triplicates of the volatile compounds determined by DVB-CAR-PDMS fiber. The vector numbers correspond to that of Table 1.

and also from the hydrolysis of glycoside molecules. Vitispirane has a megastigme precursor and is linked to a sugar molecule. TDN is released during bottle storage and its origin is not clear. While some authors have shown that TDN is a direct degradation product of carotene (Rapp, 1998), others have shown two possible precursors in grape linked to a sugar molecule (Winterhalter, 1991; Silva Ferreira & Guedes de Pinho, 2004).

These changes of volatile composition according to ageing time, were confirmed by simple regression analysis. Table 2 shows the coefficients of regression (r) and the significant levels (p) obtained between the aroma

compounds and the ageing time (months) according to the fiber used and the cava type (white and rosé). Even though most of the regression models were linear ($y = a + bx$), some of them follow a reciprocal model ($y = a + b/x$). This last model was followed for some compounds determined with triple phase fibers notably ethyl hexadecanoate in white cava and isoamyl acetate and ethyl decanoate in Trepata cava. More significant results were obtained with triple phase than PDMS fiber. The evolution of acetate esters decreased with the ageing time (Fig. 3) while vitispirane, TDN, and diethyl succinate increased with time in contact with lees (Fig. 3). It was noticeable that TDN only was found in white cava. Probably the precursor of TDN had a varietal origin. Our results could confirm the presence of TDN precursor according to the varietal base wine. This precursor could be an early norisoprenoid as 3,6-dihydroxy-7,8-dihydro- α -ionone, 3,4-dihydroxy-7,8-dihydro- β -ionone and 3,9-dihydroxyteaspirane (Winterhalter, 1993), could be linked to a sugar molecule or TDN could be a compound resulting from carotene metabolism by yeast.

In conclusion, some volatiles showed a significant behaviour in relation to ageing in contact with lees (more than 2 years). Acetate esters were higher in young cavas while TDN, vitispirane and diethyl succinate increased in long aged samples. Despite the qualitative volatile profile obtained being similar with both fibers, DVB-CAR-PDMS fiber could be more suitable than PDMS to follow the volatile kinetics of cava bouquet. A lot of questions still exist according to the origin of post-fermentative aromas in bottle ageing in contact with lees. The origin of aromatic compounds in aged cavas (Spanish sparkling wine) is currently under investigation.

Table 2

Significant results of regression analysis between the ageing time (months) and aroma compounds for fiber type and cava type

	PDMS				DVB-CAR-PDMS			
	White cava ($n = 7$)		Trepata cava ($n = 7$)		White cava ($n = 7$)		Trepata ($n = 7$)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Isoamyl acetate	-0.858	<0.05	-0.754	<0.05	-0.773	<0.05	-0.864 ^c	<0.05
Hexyl acetate	-0.872	<0.01	-0.417	<0.05	-0.881	<0.01	-0.945	<0.005
Ethyl lactate	n.s. ^a		n.s.		n.s.		0.830	<0.05
Hexanol	n.s.		n.s.		0.880	<0.01	0.473	<0.05
Vitispirane	0.824	<0.05	0.900	<0.005	0.990	<0.001	0.730	<0.1
Unknown peak 1	n.d. ^b		n.d.		-0.831	<0.05	n.s.	
Diethyl succinate	0.848	<0.01	n.s.		0.940	<0.005	0.898	<0.01
Ethyl decanoate	n.s.		n.s.		n.s.		-0.776 ^c	<0.05
1,2-Dimethyl-1,1,6-trimethylnaphthalene	0.899	<0.005	n.d.		0.971	<0.001	n.d.	
2-Phenylethyl acetate	n.d.		-0.625	<0.01	-0.807	<0.05	n.s.	
Ethyl dodecanoate	n.s.		n.s.		-0.917	<0.005	-0.443	<0.05
Ethyl hexadecanoate	n.s.		n.s.		0.888 ^c	<0.01	n.d.	

^a Not significant.

^b Not detected.

^c Reciprocal-X model.

Acknowledgements

We are grateful to Segura Viudes SA, Castellblanch SA and Freixenet SA wineries for providing samples. This study was made possible thanks to financial assistance from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Spain) VIN01-051, from Generalitat de Catalunya (Spain), Project 2001SGR-00131 and through a Grant from the Generalitat de Catalunya to the PhD student J. Bosch-Fusté.

References

- Council Regulation (EC) No. 1493/1999 of 17 May 1999 on the common organisation of the market in wine 1179/1-84.
- de la Presa-Owens, C., Schlich, P., Davies, H. D., & Noble, A. C. (1998). Effect of Méthode Champenoise process on aroma of four *V. Vinifera* varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(3), 289–294.
- Escudero, A., Charpentier, M., & Etievant, P. (2000). Characterization of aged champagne wine aroma by GC–O and descriptive profile analyses. *Science des Aliments*, 20(3), 331–346.
- Francioli, S., Guerra, M., López-Tamames, E., Guadayol, J. M., & Caixach, J. (1999). Aroma of sparkling wines by headspace/solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(4), 404–408.
- Francioli, S., Torrens, J., Riu-Aumatell, M., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2003). Volatile compounds by SPME–GC as age markers of sparkling wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(3), 158–162.
- Leroy, M. J., Charpentier, M., Duteurtre, B., Feuillat, M., & Charpentier, C. (1990). Yeast autolysis during champagne aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(1), 21–28.
- Loyaux, D., & Adda, J. (1981). The evolution of champagne volatiles during aging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32, 1254–1258.
- Pozo-Bayón, M. A., Polo, M. C., Martín-Álvarez, P. J., & Pueyo, E. (2004). Effect of vineyard yield on the composition of sparkling wines produced from the grape cultivar Parellada. *Food Chemistry*, 86, 413–419.
- Rapp, A. (1998). Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung*, 42, 351–363.
- Shirey, R. E., & Mindrup, R. F. (1999). SPME-adsorption versus absorption: which fiber is best for your application? Supelco.
- Silva Ferreira, A. C., & Guedes de Pinho, P. (2004). Silva Guedes de Nor-isoprenoids profile during port wine ageing-influence of some technological parameters. *Analytica Chimica Acta*, 513, 169–176.
- Statgraphics Plus 4.1. (1994–1999). Statistical Graphics Corp., Rockville, Maryland.
- Tominaga, T., Guimbertau, G., & Dubordieu, D. (2003). Role of certain volatile thiols in the bouquet of aged champagne wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1016–1020.
- Torrens, J., Riu-Aumatell, M., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2004). Volatile compounds of red and white wines by headspace-solid phase microextraction using different fibers. *Journal of Chromatographic Science*, 42(6), 310–316.
- 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, 1825–1829.
- Winterhalter, P. (1993). The generation of C-13 norisoprenoid volatils. In C. Bayonove, T. Crouzet, C. Flanzly, J. C. Martin, & J. C. Sapis (Eds.), *Connaissance aromatique des cépages at qualité des vins*. Rev. Fr. Oenol., Lattes, France (pp. 65–73).

4.1.2 Perfil volàtil de vins espumosos obtingut mitjançant tres mètodes d'extracció i anàlisi per cromatografia de gasos - espectrometria de masses (GC-MS).

Publicació: J. Bosch-Fusté; M. Riu-Aumatell, J.M. Guadanyol, J. Caixach, E. López-Tamames, and S. Buxaderas. Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. 2007, in press.

Resum:

L'objectiu es centra en identificar marcadors d'un correcte emmagatzematge i distribució dels caves ja addicionats amb el licor d'expedició (comercials) i comprovar si els marcadors de criança també es poden utilitzar com a marcadors d'emmagatzematge. A més, es va plantejar determinar l'eficiència de la tècnica d'extracció de volàtils i semi-volàtils anteriorment utilitzada (SPME) amb dues tècniques de gran capacitat extractiva (SDE i CLSA) per intentar determinar nous compostos que puguin ser emprats com a marcadors de qualitat.

Les mostres emprades per desenvolupar aquesta part experimental són tres caves comercials, obtinguts a partir del cupatge blanc tradicional de macabeu, xarel·lo i parellada, a escala industrial per una bodega situada a la regió del cava. Aquests caves es van sotmetre a unes condicions d'emmagatzematge de 37°C amb un espai de cap de diòxid de carboni amb la finalitat d'accelerar l'aparició dels possibles indicadors d'un correcte emmagatzematge i distribució.

Aplicant la tècnica SDE, utilitzant un aparell Likens-Nickerson, i el CLSA es va efectuar una extracció exhaustiva dels compostos implicats en el perfil aromàtic del cava. A més a més, es va aplicar la SPME segons el mètode descrit a l'apartat 4.1.1. Els tres mètodes d'extracció van anar seguits del mateix anàlisi cromatogràfic mitjançant la GC-MS.

Es van detectar un total de 84 compostos volàtils implicats en el perfil aromàtic dels caves comercials a través de les tècniques d'extracció més exhaustives, la SDE i el CLSA. Prop del 40% d'aquests compostos també van ser detectats mitjançant la SPME, sent els compostos detectats per aquesta tècnica els més característics de l'aroma del cava. Entre els compostos identificats amb els tres mètodes extractius es troben els marcadors identificats en els caves de criança. Per tant, aquests compostos poden ser també indicadors de la qualitat del cava comercial.

Per primera vegada es descriuen en caves compostos com el lilial, l'octanal, la 2-octanona, el disulfur de diisopropil, la 2-metiltiofe-3-ona o l' α -amil-cinnamaldèhid. A més també s'identifiquen per primera vegada una sèrie de compostos de la família dels furfurals com són el furoat d'etil, el 2-acetilfuran i el 5-metilfurfural. La presència d'aquests últims compostos, que havien estat descrits en vins dolços envellits en presència d'oxigen, podria ser utilitzat com a marcadors de qualitat comercial de emmagatzematge del cava.

Tanmateix, es fa necessari posar a punt un mètode de SPME que permeti detectar de forma rutinària aquests compostos ja que l'actual mètode d'extracció no es prou eficaç.

Resultats concrets:

- Comparació del perfil volàtil dels caves obtingut aplicant tres mètodes d'extracció de volàtils i semi-volàtils.

- Caracterització del perfil aromàtic de caves comercials identificant fins a 84 compostos, alguns dels quals descrits per primera vegada en el cava
- Identificació dels mateixos marcadors de la cria en caves comercials
- Identificació de nous possibles marcadors de la qualitat aromàtica dels caves comercials (SDE i CLSA) que poden provenir de la degradació de sucres i/o aminoàcids.



Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis

Joan Bosch-Fusté^{a,*}, Montserrat Riu-Aumatell^a, Josep M. Guadayol^b, Josep Caixach^c,
Elvira López-Tamames^a, Susana Buxaderas^a

^a Dept. Nutrició i Bromatologia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain

^b Dept. Enginyeria Química, Universitat Politècnica de Catalunya, Colom, 1, 08222 Terrassa, Spain

^c Laboratori d'Espectrometria de Masses, IIQAB-CSIC, c/Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

Received 30 June 2006; received in revised form 29 November 2006; accepted 27 December 2006

Abstract

Simultaneous distillation extraction (SDE) and closed-loop stripping analysis (CLSA) show great capacity for organic compound extraction. Here we used these techniques to obtain and characterize a wide range of volatile compounds from aged cava sparkling wine. We also explored the potential application of head space-solid phase micro extraction (HS-SPME) to determine the distinctive volatile compounds of aged cava as this technique is a common extraction method in quality flavour control. For SDE, 50 mL of cava were extracted with pentane/dichloromethane during 4 h in a Likens–Nickerson (LN) extraction apparatus; while for CLSA, 25 mL of cava were stirred during 1 h into a CLSA apparatus with an adsorbent trap of granulated activated carbon. HS-SPME was performed at 35 °C using 2 ml of sample for 30 min. The 20-mm SPME fiber was coated with a 50/30- μ m layer of divinylbenzene–carboxen–polydimethylsiloxane (DVB–CAR–PDMS). All the extraction methods were followed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis. SDE and CLSA allowed the identification of 84 volatile compounds. Almost 40% of the volatiles from these two techniques were obtained by HS-SPME. Moreover, here we provide the first description of several tentatively identified compounds such as linal, octanal, 2-octanone, isopropyl disulfide, methylthiophen-3-one, α -amyl-cinnamaldehyde, ethyl 2-furancarboxylate, 2-acetyl-furan, and 5-methylfurfural in cava.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Volatile compounds; HS-SPME; CLSA; SDE; Sparkling wine; GC–MS

1. Introduction

The volatile composition of wines is complex because several organic structures contribute to flavour (Aznar, López, Cacho, & Ferreira, 2001; Câmpeanu, Burcea, Doneanu, Nămolosanu, & Visan, 1998; Castro, Natera, Benitez, & Barroso, 2004; Genovese, Dimaggio, Lisanti, Piombino, & Moio, 2005; Karásek et al., 2003; Ortega, López, Cacho, & Ferreira, 2001; Salinas, Alonso, & Esteban-Infantes,

1994; Sánchez-Palomo, Pérez-Coello, Díaz-Maroto, González-Viñas, & Cabezedo, 2006; Schneider, Baumes, Bayonove, & Razungles, 1998; Zea, Moyano, Moreno, Cortes, & Medina, 2001). The amounts of volatile compounds in wine range from nanograms to micrograms; moreover, these compounds have distinct physicochemical properties regarding, for example, polarity, volatility, and odour impact (Aznar et al., 2001; López, Ferreira, Hernández, & Cacho, 1999) as a result of the functional groups (alcohol, aldehyde, acid, etc.) present in the molecules. Cava is a quality sparkling wine (Certified Brand of Origin) elaborated by the traditional method that consists of a second fermentation followed by biological ageing in contact with lees in

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 45 08; fax: +34 93 403 59 31.
E-mail address: jbosch001@ub.edu (J. Bosch-Fusté).

anaerobic conditions for at least 9 months (Council Regulation (EC), 1493/1999). Volatile compounds in wine have three origins: from the grape (pre-fermentative aroma); from the yeast during the first or second fermentation (fermentative aroma); or from ageing during settling (post-fermentative aroma). This special ageing of cava gives this wine a more complex volatile profile since autolytic and enzymatic reactions may take place. It is thought that the base wine, the autolysis of lees of the second fermentation and the ageing time in contact with these lees are the most important factors that affect the sensory quality of sparkling wines. Aroma is also of paramount importance for producers of high quality sparkling wines such as *champagne* (Vannier, Brun, & Feinberg, 1999). In this regard, the flavour of cava is empirically described by cava makers with yeasty and toasty notes. Although several volatiles, like 1,2-dihydro-1,1,6-trimethylnaphthalene (TDN), vitispiranes isomers and diethyl succinate, have been used as markers of ageing (Riu-Aumatell, Bosch-Fusté, López-Tamames, & Buxaderas, 2006), distinctive compounds involved in the flavour of aged cava have not been characterized to date.

Here we applied a simultaneous distillation extraction method (SDE) and closed-loop stripping analysis (CLSA), both with high uptake techniques, to study a wide volatile profile of aged sparkling wine. SDE (Likens–Nickerson technique) combines the advantages of liquid–liquid and steam distillation extraction, and has been used to isolate volatile organic compounds from spices (Díaz-Maroto, Pérez-Coello, & Cabezudo, 2002) and wine (Blanch, Reglero, & Herraiz, 1996), with very high recovery rates. CLSA has been used to extract pollutants at very low concentrations from water samples (Malleret, Bruchet, & Hennion, 2001). Recently CLSA has been proposed as an effective method for isolating wine aroma compounds (Eggers, Kenefick, Richardson, Wigglesworth, & Girard, 2003). However, neither SDE nor CLSA have been applied to obtain a volatile profile from cava sparkling wines.

Head space-solid phase micro extraction (HS-SPME) is a simple, rapid, solvent-free and inexpensive method for extracting volatile and semi-volatile compounds. It is based on equilibrium between the analyte in vapour phase and silica fibre coated with an adsorbent polar or apolar polymer. A wide range of commercial fibres are available on the market, some extract the target analytes by partitioning while others extract the volatile compounds by physical trapping and also by partitioning. Finally, the analytes are directly desorbed in the injector port of GC apparatus. HS-SPME is the most common and easiest technique for food quality control (Liu, Zeng, & Tian, 2004; Tat, Comuzzo, Stolfo, & Battistutta, 2005; Torrens, Riu-Aumatell, López-Tamames, & Buxaderas, 2004) and in the last few years, this method has been applied to study the compounds involved in wine flavour (Bonino et al., 2003; De la Calle-García et al., 1997; Vas, Gál, Harangi, Dobó, & Vékey, 1998).

Here we analysed aroma extracts of aged cavas by means of SDE and CLSA techniques in order to identify new compounds. These extraction techniques were applied

to the same cavas in order to later compare the results with qualitative data obtained by HS-SPME.

2. Materials and methods

2.1. Samples

We used a total of three cavas (Spanish sparkling wine with an ageing time of 14 months), manufactured by the same winery on an industrial scale from the autochthonous *Vitis vinifera* of the cava region. Cavas were made with a blend of the traditional white varieties: *Macabeu*, *Xarel-lo* and *Parrellada* (1:1:1). Amber glass bottles of 250 mL were filled with 200 mL of cava and the headspace was saturated with carbon dioxide. The bottles were stored at 37 °C in a heater and samples were removed at 0 days (control cava) and after 30 days (aged cava) and stored at –20 °C until analysis. All glass bottles with samples were spiked with 2.5 mg L⁻¹ of 2-octanol (98% purity) as internal standard (IS).

2.2. Chemicals and reagents

Ethyl propionate, ethyl butyrate, propanol, isobutyl alcohol, hexanal, isoamyl acetate, methyl hexanoate, butanol, limonene, isoamyl alcohol, ethyl hexanoate, pentanol, hexyl acetate, octanal, ethyl lactate, hexanol, *trans*-3-hexenol, *cis*-3-hexenol, methyl octanoate, ethyl octanoate, heptanol, furfural, ethyl nonanoate, octanol, γ -butyrolactone, 5-methylfurfural, methyl decanoate, ethyl decanoate, isoamyl octanoate, diethyl succinate, α -terpineol, undecanal, decanol, 2-phenylethyl acetate, ethyl dodecanoate, benzyl alcohol, hexanoic acid 2-phenylethanol, methyl tetradecanoate, octanoic acid, methyl hexadecanoate, decanoic acid, methyl octadecanoate, tetradecanoic acid, hexadecanoic acid, and 2-octanol (IS) were purchased from Sigma–Aldrich and Fluka (St. Louis, MO, USA) and showed purity higher than 95%. Individual stock standard solutions of each aroma compound were prepared by weight in methanol (SDS, Peypin, France). A commercial solution of 24 aliphatic hydrocarbons (C8–C32) in hexane (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was added to the samples in order to calculate Kovat's indices.

2.3. Extraction methods

SDE: 50 mL of cava were placed in a 250-mL flask with 100 mL of distilled water. A second flask with 5 mL of a mixture of pentane and dichloromethane (3:1) (SDS, Peypin, France) was also attached to a Likens–Nickerson apparatus. Solvent and sample were heated to their boiling points. These temperature conditions were maintained for 4 h. A solution of polyethyleneglycol in water was used as cooler to condensate vapours and to avoid loss of volatile compounds. The extract was then collected at room temperature, dried over sodium sulphate anhydrous (Panreac S.A., Montcada i Reixac, Spain) and concentrated up to 0.5 mL under nitrogen gas.

CLSA: Extraction was performed in a commercial CLSA apparatus (Brechtbüler, Zurich, Switzerland). Twenty five mL of cava were diluted up to 1000 mL with double distilled water. The samples were air-stirred (flow rate of 1.5 L/min) for 70 min in a bath at 45 °C. Conditions were similar to those used by Eggers et al. (2003) in wine model solution, although in our case the adsorbent trap was a 5-mg filter of activated charcoal at 55 °C. The filter was then extracted with 40 µL of carbon disulphide (SDS, Peypin, France). The wine was diluted 1/40, so the ethanol concentration was not enough to alter the solubility of analytes. In these conditions non-saturation of activated charcoal was expected.

HS-SPME: Conditions were similar to those used by Riu-Aumatell et al. (2006). Two millilitres of sparkling wine were placed into a 10 mL glass vial (Reference 27385, Supelco, Bellefonte, PA, USA) for each HS-SPME analysis. A small magnetic stirring bar was also added. The vial was tightly capped with a PTFE septum and placed in a water bath with stirrer. The sample was maintained for 30 min at 35 °C. The fibre was activated by inserting it into the GC injector at 280 °C for 30 min. The SPME fiber was then inserted into the headspace. During the sampling time (30 min), the cava sample was stirred at constant speed (700g). After reaching the sampling time, the fibre was removed from the vial and inserted into the GC injection port for desorption during 5 min. A 20 mm-fibre coated with a 50/30 µm layer of divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS) was used.

2.4. GC-MS analysis

Volatiles were identified on a mass spectrometer Agilent Technologies 5973 Network coupled directly online to an Agilent Technologies 6890N Network GC System (both, Palo Alto, CA, USA). Spectra were obtained on electron impact at 70 eV, scanning from 15 to 250 m/z at 2 scans s^{-1} . The GC system was equipped with a supelcowax 10 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) capillary column with a 20 M polyethyleneglycol stationary phase (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) and SPB-1 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). The temperature programme ranged from 40 °C to 250 °C in the following way: 40 °C for 10 min, from 40 °C to 200 °C at 2 °C min^{-1} , one min at 200 °C, from 200 °C to 250 °C at 2 °C min^{-1} , and finally, 10 min at 250 °C. The carrier gas was helium at 1 ml min^{-1} . One microlitre of each extract from SDE and CLSA was injected in splitless mode. An 8-min solvent delay was programmed when the SDE extracts were injected.

2.5. Identification

Volatiles were identified by comparing the retention index and mass spectrum of commercial standards when they were available. The volatile compounds were also identified using the software library of mass spectra database Willey 6.1 (NY, USA); moreover, they were identified

using theoretical retention index calculation on polar column (Supelcowax-10 described above) and on non-polar column (SPB-1 described above). In addition, another GC-MS integrated quadrupole Trace MS Plus apparatus (ThermoElectron, USA) was used to confirm the identification of the volatile compounds. The following temperature programme was applied: 35 °C for 5 min, up to 250 °C at 5 °C min^{-1} , and finally, 20 min at 250 °C. A DB-5 column (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm) (J & W scientific, Folsom, CA, USA) was used with this GC-MS system. The MS parameters were: a mass range of 35–350 m/z , with 0.5 scan s^{-1} , and ionization energy of 70 eV. NIST/EPA/NIH mass spectral database 1998 (Gaithersburg, MD, USA) library was used with this GC-MS equipment.

3. Results and discussion

Three extraction methods (SDE, CLSA, and HS-SPME) were used to identify volatile compounds in cava (Table 1). The compounds are listed following elution order, and including their chemical name, CAS (SciFinder Scholar® 2006) number or mass fragments, Kovat's index for polar and non-polar columns, cited Kovat's and the identification method used. Chromatograms from SDE, CLSA, and HS-SPME are shown in Fig. 1. The peak numbers of the chromatograms match the numbers of Table 1. The semi-quantitative analysis was performed by internal normalization and is shown in Table 1 by means of an asterisk scale (<1%; 1–10%, and >10%).

SDE required 50 mL of sample for extraction while CLSA and SPME needed 25 and 2 mL, respectively. Therefore, SDE allowed us to obtain a cava chromatogram with a wider volatile profile than those from CLSA and SPME (Fig. 1). However, SDE is a lengthy process (4 h); moreover, this method requires solvents and temperature for volatile compounds extraction. In this study we used dichloromethane because of its polarity. Consequently, high extraction capacity for polar volatile compounds (alcohols, aldehydes, and acids) was obtained. This capacity was not observed in CLSA and SPME because these methods were based on the equilibrium partitioning of the volatiles between solution phase (sparkling wine) and vapour or gas phase. This equilibrium is regulated by the partition coefficient and thus it is difficult to apply HS-SPME and CLSA for the extraction of polar compounds from a hydro-alcoholic matrix like cava. CLSA (stripping technique) and HS-SPME identified only the most abundant alcohols such as propanol, isopropanol, isoamyl alcohol, hexanol, *cis*-3-hexenol and 2-phenylethanol. In contrast, in SDE extracts some ramified alcohols, like 2-methyl-1-pentanol, 3-methyl-1-pentanol, and isohexanol (4-methyl-1-pentanol) were detected (Table 1). These alcohols have been described in wine (Tat et al., 2005), sherry (Zea et al., 2001), and cognac (Ledauphin et al., 2005), and their occurrence could be related to oxidative ageing (Zea et al., 2001). Moreover, tentatively identified 3-ethoxy-1-propanol in the SDE extracts has been reported in

Table 1
Volatile compounds identified by SDE, CLSA, and HS-SPME

	Cas No./MS ^A	IK CW ^B	Cited IK ^C	IK SPBI ^D	ID ^E	Control cava			Aged cava		
						SDE	CLSA	SPME	SDE	CLSA	SPME
1	Ethyl propanoate	105-37-3	<1000		f, g	*	*	*	*	*	*
2	Ethyl isobutyrate	97-62-1	<1000		g, h	*	*	*	*	*	*
3	Butyraldehyde, diethyl acetal	3658-95-5	<1000	965 ^F							
4	Ethyl butyrate	105-54-4	1031	1031 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*
5	Propanol	71-23-8	1046	1052 ^H	f, g, h	**	**	**	**	**	**
6	Ethyl 2-methylbutanoate	7452-79-1	1055	1069 ^H	g, h	*	*	*	*	*	*
7	Ethyl isovalerate	108-64-5	1061	1052 ^F	g, h	*	*	*	*	*	*
8	Isobutyl alcohol	78-83-1	1108	1070 ^F	f, g, h	**	**	**	**	**	**
9	Valeraldehyde, diethyl acetal	3658-79-5	1120	1099 ^H	g, h	*	*	*	*	*	*
10	Isovaleraldehyde, diethyl acetal	03842-03-3	1079	1135 ^G	g, h	*	*	*	*	*	*
11	Hexanal	66-25-1	1094	1062 ^J	f, g, h	*	*	*	*	*	*
12	Isoamyl acetate	123-92-2	1123	1064 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*
13	Methyl hexanoate	106-70-7	1101	1142 ^H	f, g, h	*	*	*	*	*	*
14	Butanol	71-36-3	1159	1176 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*
15	1-Pentene-3-ol	918-85-4	1174	1147 ^G	g, h	*	*	*	*	*	*
16	Limonene	138-86-3	1193	1157 ^I	f, g, h	*	*	*	*	*	*
17	Isoamyl alcohol	123-51-3	1210	1175 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*
18	Ethyl hexanoate	123-66-0	1232	1211 ^J	f, g, h	*	*	*	*	*	*
19	Isopropyl disulfide	4253-89-8	1248	1239 ^H	f, g, h	*	*	*	*	*	*
20	Hexanal, diethyl acetal	3658-93-3	1250	1248	g	*	*	*	*	*	*
21	Pentanol	71-41-0	1258	1235 ^G	g, h	*	*	*	*	*	*
22	Hexyl acetate	142-92-7	1269	1249 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*
23	2-Octanone	111-13-7	1278	1267 ^J	f, g, h	*	*	*	*	*	*
24	Ethyl 3-hexenoate	2396-83-0	1286	1278 ^I	g, h	*	*	*	*	*	*
25	Octanal	124-13-0	1290	1291 ^G	g, h	*	*	*	*	*	*
26	Isohexanol	626-89-1	1317	1282 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*
27	2-Penten-1-ol	20273-24-9	1321	1312 ^G	g	*	*	*	*	*	*
28	1-Pentanol, 3-methyl-	589-35-5	1329	1323 ^G	g, h	*	*	*	*	*	*
29	Heptanal, diethyl acetal	688-82-4	1334	1332 ^G	g, h	*	*	*	*	*	*
30	Ethyl 2-hexenoate	1552-67-6	1336		g	*	*	*	*	*	*
31	2-Methyl-1-pentanol	105-30-6	1337		g	*	*	*	*	*	*
32	Ethyl lactate	97-64-3	1348	837	g	*	*	*	*	*	*
33	Hexanol	111-27-3	1351	821	f, g, h	*	*	*	*	*	*
34	<i>trans</i> 3-Hexenol	928-97-2	1367	845	f, g, h	*	*	*	*	*	*
35	3-Ethoxy-1-propanol	111-35-3	1375	854	f, g, h	*	*	*	*	*	*
36	<i>cis</i> -3-Hexenol	928-96-1	1379	840	g	*	*	*	*	*	*
37	Methyl octanoate	111-11-5	1383	853	f, g, h	*	*	*	*	*	*
38	Ethyl octanoate	106-32-1	1430	1103	f, g, h	*	*	*	*	*	*
39	Heptanol	111-70-6	1458	1178	f, g, h	*	*	*	*	*	*
40	Furfural	98-01-1	1459	957	f, g, h	*	*	*	*	*	*
41	2-Ethylhexen-1-ol	29594-61-4	1478	828	f, g, h	*	*	*	*	*	*
42	2-Acetylfuran	1192-62-7	1490	892	g, h	*	*	*	*	*	*
43	Vitispirane 1	65416-59-3	1508	1248	g, h	*	*	*	*	*	*
44	Vitispirane 2	65416-59-3	1511	1252	g, h	*	*	*	*	*	*
45	Methylthiophen-3-one	13679-85-1	1519	937	g, h	*	*	*	*	*	*
46	Nonanal, diethyl acetal	54815-13-3	1530		g	*	*	*	*	*	*

47	Ethyl propionate	123-29-5	1536	1530 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
48	1-Octanol	111-87-5	1561	1559 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
49	γ -Butyrolactone	96-48-0	1568	1634 ^I	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
50	5-Methylfurfural	620-02-0	1572	1566 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
51	Diethyl malonate	105-53-3	1582		g	*	*	*	*	*	*	*	*
52	Methyl decanoate	110-42-9	1593	1586 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
53	Ethyl 2-furancarboxylate	614-99-3	1621	1621 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
54	Ethyl decanoate	110-38-3	1639	1678 ^H	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
55	Isoamyl octanoate	2035-99-6	1652	1649 ^I	f, g, h	**	*	*	*	*	*	*	*
56	Diethyl succinate	123-25-1	1678	1662 ^J	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
57	Ethyl 9-decanoate	67233-91-4	1691	1681 ^J	g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
58	Terpene compound (ms)	93, 109, 204	1699		g	*	*	*	*	*	*	*	*
59	α -Terpineol	7785-53-7	1710	1694 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
60	Terpene compound (ms)	105, 161, 204	1717		g	*	*	*	*	*	*	*	*
61	Terpene compound (ms)	93, 161, 204	1723		g	*	*	*	*	*	*	*	*
62	TDN	30364-38-6	1731	1719 ^I	g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
63	Undecanal	112-44-7	1747		g	*	*	*	*	*	*	*	*
64	Terpene compound (ms)	119, 132, 202	1756		g	*	*	*	*	*	*	*	*
65	1-Decanol	112-30-1	1765	1764 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
66	2-Phenylethyl acetate	93-92-5	1811	1795 ^J	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
67	Ethyl dodecanoate	106-33-2	1827	1833 ^J	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
68	Benzyl alcohol	100-51-6	1870	1881 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
69	Hexanoic acid	142-62-1	1885	1826 ^J	f, g, h	**	*	*	*	*	*	*	*
70	2-Phenylethanol	60-12-8	1906	1888 ^J	f, g, h	**	*	*	*	*	*	*	*
71	Isopropyl myristate	110-27-0	1936	1964 ^H	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
72	Methyl tetradecanoate	124-10-7	2009		f, g	*	*	*	*	*	*	*	*
73	Lilial	80-54-6	2037		g	*	*	*	*	*	*	*	*
74	Ethyl tetradecanoate	124-06-1	2049	2046 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
75	Octanoic acid	124-07-2	2087	2038 ^J	f, g, h	**	*	*	*	*	*	*	*
76	<i>p</i> -Vinylguaiacol	7786-61-0	2192	2200 ^G		*	*	*	*	*	*	*	*
77	Methyl hexadecanoate	112-39-0	2216	2213 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
78	Terpene compound (ms)	119, 161, 204	2234		g	*	*	*	*	*	*	*	*
79	α -Amyl-cinnamaldehyde	122-40-7	2247		g	*	*	*	*	*	*	*	*
80	Ethyl hexadecanoate	628-97-7	2255	2229 ^J	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
81	Decanoic acid	334-48-5	2339	2254 ^J	f, g, h	**	*	*	*	*	*	*	*
82	Methyl octadecenoate	27234-05-5	2390	2417 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
83	Tetradecanoic acid	544-63-8	>2600	>2600 ^G	f, g, h	*	*	*	*	*	*	*	*
84	Hexadecanoic acid	57-10-3	>2600		g	*	*	*	*	*	*	*	*

The semi-quantitative analysis was performed by internal normalization and it was expressed by means of an asterisk scale (<1%, 1–10%, and >10%).

f: identification based on retention time and electron impact mass spectrum of standards; g: identification based on examination of electron impact mass spectrum; h: identification based on theoretical retention index calculation.

^A CAS number or mass fragments of identified compounds.

^B Kovat's indices on Supelcowax-10 column.

^C Kovat's indices of polar columns reported in literature.

^D Kovat's indices on SPB-1 column.

^E Identification method.

^F Aznar et al. (2001).

^G Ledauphin et al. (2005).

^H Cămpănu et al. (1998).

^I Comuzzo et al. (2006).

^J Riu-Aumatell et al. (2006).

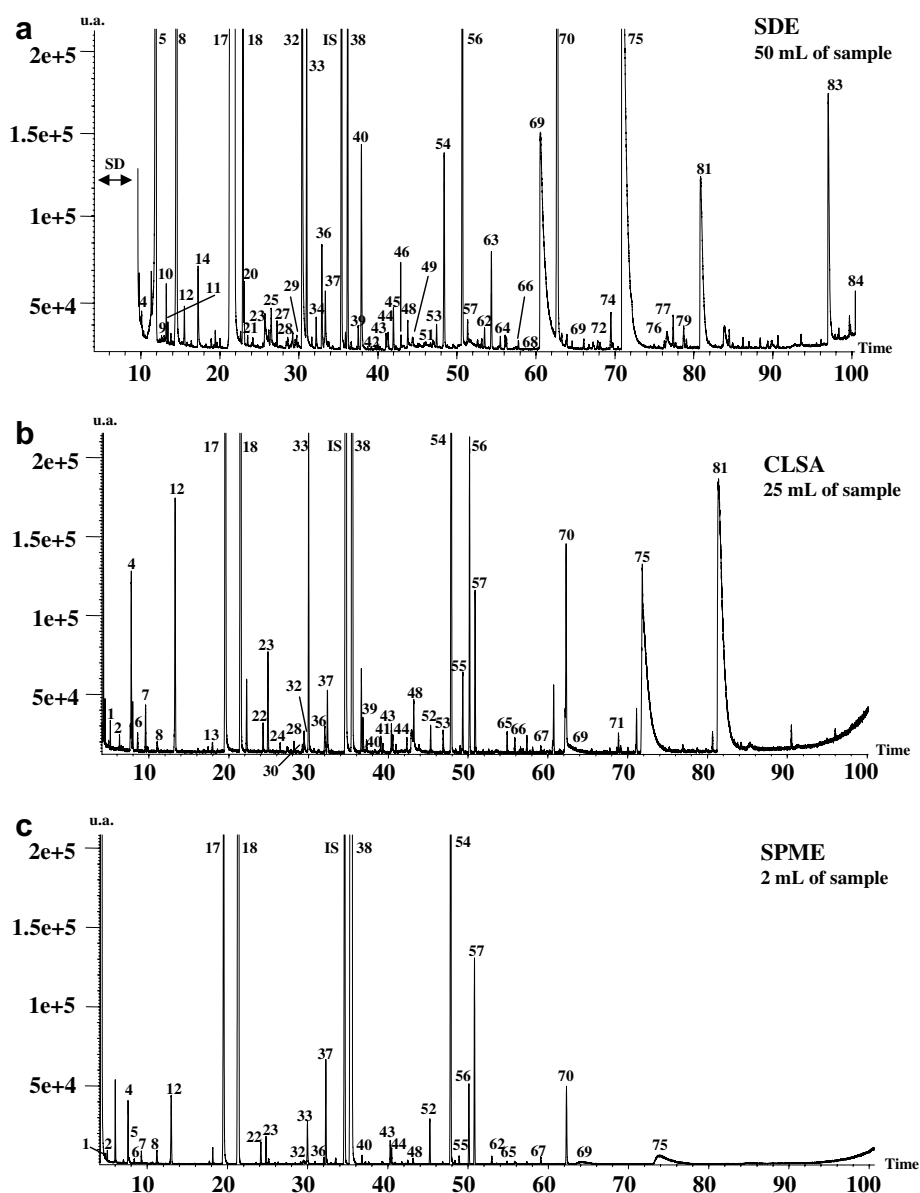


Fig. 1. Chromatograms of sparkling wines: (a) chromatogram of a sparkling wine extract obtained by SDE; (b) chromatogram of a sparkling wine extract obtained by CLSA; (c) chromatogram of a sparkling wine obtained by HS-SPME. Peaks numbers are identified according to Table 1.

wine that has undergone malolactic fermentation (Fernandes, Relva, Gomes da Silva, & Costa Freitas, 2003). Finally, two sulphur compounds (isopropyl disulfide and methylthiophen-3-one) were detected in the SDE extracts. The presence of methionine and yeast metabolism could explain the formation of these sulphur compounds (Bayonove, Baumes, Crouzet, & Günata, 2000; Blaise & Bertrand, 2000). The highest amounts of polar compounds were obtained by SDE; however, HS-SPME showed the most representative polar compounds of cava. Indeed, it may be a useful extraction method for alcohols and acids. However, the high extraction capacity of SDE and CLSA for acid compounds (hexanoic, octanoic and decanoic acids) may mask the detection of other minority compounds as a result of peak tailing (Fig. 1, peaks 69, 75, 81).

Ethyl esters of aliphatic acids are an important aromatic family in the volatile profile of sparkling wines. Although SDE, CLSA, and HS-SPME were suitable methods for determining ethyl esters (ethyl hexanoate, ethyl octanoate, and ethyl decanoate) in cava samples, SPME was the fastest and easiest technique to extract the main esters of volatiles. Other ethyl esters detected using these three extraction methods were ethyl 9-decanoate, ethyl lactate and diethyl succinate. The first ethyl ester has been reported in sparkling wine samples (Riu-Aumatell et al., 2006), and in white wines (Câmpeanu et al., 1998). Ethyl lactate and diethyl succinate are post-fermentative volatiles formed during the ageing of cava in contact with lees from the second fermentation. The concentration of diethyl succinate increases during ageing and this compound is a mar-

ker of the evolution of cava during cellar storage (Francioli, Guerra, Lopez-Tamames, Guadayol, & Caixach, 1999; Riu-Aumatell et al., 2006).

Other ester compounds present in the volatile profile of cava were methyl esters of hexanoic, octanoic, and decanoic acids. Ledauphin et al. (2005) detected methyl esters in spirit distilled beverages. In these beverages, the formation of methyl esters is due to the high temperature required during the distillation step of *cognac* elaboration. However, in the current study, the formation of these methyl esters was not related to artefacts formed as a result of the temperature used during extraction by SDE, because they were detected with SDE, CLSA, and HS-SPME techniques. Moreover, methyl esters in wines are related to yeast fermentation (Castro et al., 2004).

Sparkling wine acetates decrease along ageing time of cava in contact with lees (Riu-Aumatell et al., 2006). The samples used in our study were aged for 14 months. As a result, only isoamyl acetate, hexyl acetate, and 2-phenylethyl were detected. CLSA shows better extraction capacity for acetates than HS-SPME and SDE. However, the main acetate in wine (isoamyl acetate) was detected with all three techniques.

Acetal formation was attributed to the reaction between aldehydes and ethanol by temperature or oxidation mechanisms. We found that CLSA and HS-SPME did not detect acetals; therefore we propose that acetals were artefacts formed as a result of the high extraction temperature required when applying SDE.

Terpene compounds (lilial and compound numbers 58, 60, 61, 64, and 78) were better determined by SDE than by CLSA or HS-SPME (Fig. 1 and Table 1). Two characteristic norisoprenoids of aged cava, vitispirane isomers and TDN, were identified with all the methods tested. These compounds were markers of ageing because their concentrations increased with ageing (Francioli et al., 1999; Riu-Aumatell et al., 2006). Terpene and norisoprenoid compounds are varietal volatiles released during ageing, and will be better characterized by SDE.

Furfurals formed by sugar degradation in the presence of oxygen are usually found in sweet wines that have gone through biological ageing (Schneider et al., 1998). SDE and CLSA showed a greater capacity to determine ethyl 2-furancarboxylate, 2-acetylfuran, and 5-methylfurfural in cava samples than HS-SPME.

4. Conclusion

Our findings contribute to a better knowledge of the volatile constituents of cava sparkling wine. Eighty-four compounds were identified using SDE, CLSA, and HS-SPME extraction methods. SDE showed the best extraction rates for all families of volatiles. However, this laborious technique is costly in solvents and time. A good alternative is CLSA because it provides a wide profile of volatile compounds in cava samples. However, CLSA is also lengthy. HS-SPME is a straightforward and fast extraction method

which does not require sample treatments. This method allowed us to obtain the most important volatile compounds of each chemical family. Further studies will focus on HS-SPME to assess the occurrence of compounds formed from sugar degradation (furfurals and carbonyl compounds) during biological ageing of sparkling wine.

Acknowledgements

We are grateful to Segura Viudas SA, Castellblanch SA and Freixenet SA wineries for providing samples. This study was made possible thanks to financial assistance from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Spain) AGL2005-03451, from Generalitat de Catalunya (Spain), Project 2005SGR-00156 and through a Grant from the Generalitat de Catalunya to the PhD student J. Bosch-Fusté.

References

- Aznar, M., López, R., Cacho, J. F., & Ferreira, V. (2001). Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from rioja. GC-Olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 2924–2929.
- Bayonove, C., Baumes, R., Crouzet, J., & Günata, Z. (2000). In C Flanzly (Ed.), *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. AMV Ediciones (pp. 137–176, Chapter 5).
- Blaise, A., & Bertrand, A. (2000). In C Flanzly (Ed.), *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. AMV Ediciones (pp. 720–742, Chapter 24).
- Blanch, G. P., Reglero, G., & Herraiz, M. (1996). Rapid extraction of wine aroma compounds using a new simultaneous distillation-solvent extraction device. *Food Chemistry*, 56(4), 439–444.
- Bonino, M., Schellino, R., Rizzi, C., Aigotti, R., Delfini, C., & Baiocchi, C. (2003). Aroma compounds of an Italian wine (Ruché) by HS-SPME analysis coupled with GC-ITMS. *Food Chemistry*, 80, 125–133.
- Câmpeanu, G., Burcea, M., Doneanu, C., Nămolosanu, I., & Visan, L. (1998). GC/MS characterization of the volatiles isolated from the wines obtained from the indigenous cultivar Feteasca Regala. *Analysis*, 26, 93.
- Castro, R., Natera, R., Benítez, P., & Barroso, C. G. (2004). Comparative analysis of volatile compounds of 'fino' sherry wine by rotatory and continuous liquid-liquid extraction and solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 513, 141–150.
- Comuzzo, P., Tat, L., Tonizzo, A., & Battistutta, F. (2006). Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. *Food Chemistry*, 99(2), 217–230.
- De la Calle-García, D., Reichenbacher, M., Danzer, K., Hurlbeck, C., Bartsch, C., & Feller, K. H. (1997). Investigations on wine bouquet components by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography (SPME-CGC) using different fibers. *Journal of High Resolution Chromatography*, 20, 665–668.
- Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., & Cabezero, M. D. (2002). Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices comparison with simultaneous distillation-extraction. *Journal of Chromatography A*, 947, 23–29.
- Eggers, N., Kenefick, S., Richardson, S., Wigglesworth, T., & Girard, B. (2003). Evaluation of closed-loop stripping for the isolation of wine aroma compounds from aqueous solution. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 92–98.

- Fernandes, L., Relva, A. M., Gomes da Silva, M. D. R., & Costa Freitas, A. M. (2003). Different multidimensional chromatographic approaches applied to the study of wine malolactic fermentation. *Journal of Chromatography A*, 995, 161–169.
- Francioli, S., Guerra, M., Lopez-Tamames, E., Guadayol, J. M., & Caixach, J. (1999). Aroma of sparkling wines by headspace/solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 404–408.
- Genovese, A., Dimaggio, R., Lisanti, M. T., Piombino, P., & Moio, L. (2005). Aroma composition of red wines by different extraction methods and gas chromatography–SIM/MASS spectrometry analysis. *Annali di Chimica*, 95, 383–394.
- Karásek, P., Planeta, J., Varad'ová Ostrá, E., Mikešová, M., Goliáš, J., Roth, M., et al. (2003). Direct continuous supercritical fluid extraction as a novel method of wine analysis comparison with conventional indirect extraction and implications for wine variety identification. *Journal of Chromatography A*, 1002, 13–23.
- Ledauphin, J., Saint-Clair, J. F., Lablanquie, O., Guichard, H., Fournier, N., Guichard, E., et al. (2005). Identification of trace volatile compounds in freshly distilled calvados and cognac using preparative separations coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5124–5134.
- Liu, M., Zeng, Z., & Tian, Y. (2004). Elimination of matrix effects for headspace solid-phase microextraction of important volatile compounds in red wine using a novel coating. *Analytica Chimica Acta*, 540, 341–353.
- López, R., Ferreira, V., Hernández, P., & Cacho, J. (1999). Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: A comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1461–1467.
- Malleret, L., Bruchet, A., & Hennion, M. C. (2001). Picogram determination of “earthy-musty” odorous compounds in water using modified closed loop stripping analysis and large volume injection GC/MS. *Analytical Chemistry*, 73, 1485–1490.
- Ortega, C., López, R., Cacho, J., & Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *Journal of Chromatography A*, 923, 205–214.
- Riu-Aumatell, M., Bosch-Fusté, J., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2006). Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. *Food Chemistry*, 95, 237–242.
- Salinas, M. R., Alonso, G. L., & Esteban-Infantes, J. (1994). Adsorption-thermal desorption-gas chromatography applied to the determination of wine aromas. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 1328–1331.
- Sánchez-Palomo, E., Pérez-Coello, M. S., Díaz-Maroto, M. C., González-Viñas, M. A., & Cabezedo, M. D. (2006). Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of Muscat “a petit grains” wines and effect of skin contact. *Food Chemistry*, 95, 279–289.
- Schneider, R., Baumes, R., Bayonove, C., & Razungles, A. (1998). Volatile compounds involved in the aroma of sweet fortified wines (vinsoux naturels) from Grenache noir. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 46, 3230–3237.
- SciFinder Scholar® (version 2006). American Chemical Society.
- Tat, L., Comuzzo, P., Stolfo, I., & Battistutta, F. (2005). Optimization of wine headspace analysis by solid-phase microextraction capillary gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Food Chemistry*, 93, 361–369.
- Torrens, J., Riu-Aumatell, M., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2004). Volatile compounds of red and white wines by headspace-solid-phase microextraction using different fibers. *Journal of Chromatographic Science*, 42, 110–116.
- Vannier, A., Brun, O. X., & Feinberg, M. H. (1999). Application of sensory analysis to champagne wine characterisation and discrimination. *Food Quality and Preference*, 10, 101–107.
- Vas, G. Y., Gál, J., Harangi, J., Dobó, A., & Vékely, K. (1998). Determination of volatile aroma compounds of Bläufrankisch wines extracted by solid-phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, 36, 505–510.
- Zea, L., Moyano, L., Moreno, J., Cortes, B., & Medina, M. (2001). Discrimination of the aroma fraction of sherry wines obtained by oxidative and biological ageing. *Food Chemistry*, 75, 79–84.

4.1.3. Evolució dels volàtils durant una criança i emmagatzematge accelerats

Fruit dels resultats obtinguts en els apartats anteriors (4.1.1. i 4.1.2.) es disposava d'uns compostos que podien ser indicadors volàtils de la qualitat durant la criança i l'emmagatzematge.

En aquest punt es va plantejar la realització del test d'envelliment accelerat per estudiar l'evolució dels marcadors de la qualitat organolèptica en els caves des de la criança (sub-apartat 4.1.3.1) fins l'emmagatzematge del producte final (sub-apartat 4.1.3.2). Amb el test d'envelliment accelerat es pretén provocar una evolució progressiva del cava a T^a moderada, per evitar l'aparició d'artefactes, sense haver d'esperar el pas real del temps (el qual pot suposar uns 24 mesos en la criança o 12 mesos en la vida comercial).

A continuació es detallen els materials i mètodes utilitzats per la realització d'aquesta part experimental:

Mostres:

Les mostres emprades han estat els caves amb la criança accelerada en contacte amb les tres atmosferes (oxigen, nitrogen i diòxid de carboni) del test d'envelliment accelerat descrit a l'apartat 3.3 de la metodologia i pla de treball. S'han analitzat les mostres control que no han entrat a l'estufa i els caves que han estat 1, 4, 7 i 13 setmanes a 37°C.

Extracció de volàtils:

L'extracció dels compostos volàtils s'ha efectuat mitjançant la microextracció en fase sòlida utilitzant una fibra triple (DVB/CAR/PDMS) de 20 mm (referència Supelco 57348-U, Bellfonte, PA, USA). Per efectuar l'extracció s'han utilitzat 2 mL de cava addicionat amb 5 µL d'una solució (p/v) de 2-octanol (1 g/L) i 5-nonanol (1 g/L) com a patrons interns. Els 2 mL de cava s'han dipositat en un vial de 10 mL (Referència Supelco 27385) que contenia un agitador magnètic.

Finalment els vials es tapen amb un sèptum de PTFE. Els vials així preparats s'han dipositat en un bany d'aigua a 35°C on s'ha deixat 10 minuts per tal que s'assoleixi l'equilibri entre els compostos volàtils del cava i els de l'espai de cap. Passat el temps d'equilibri s'introdueix a l'espai de cap la fibra, prèviament activada durant 30 minuts al port d'injecció del cromatògraf de gasos que es troba a 270°C. El temps d'extracció ha estat de 30 minuts, passat aquest temps s'introdueix la fibra a l'injector del GC per la volatilització dels compostos retinguts a la fibra.

Anàlisi cromatogràfic:

La separació cromatogràfica s'ha realitzat en un cromatògraf de gasos (Hewlett-Packard 5890A Series II *chromatograph*, Palo Alto, CA, USA) acoblat a un detector d'ionització de flama. Les condicions cromatogràfiques seleccionades han estat: Temperatures de l'injector i detector de 270°C i 280°C, respectivament. El programa de temperatura del forn comença a 50°C durant 1 minut, seguit d'una rampa de 2°C fins a 100°C on es manté la temperatura durant 5 minuts. Seguidament s'augmenta en 2°C/min la temperatura fins assolir els 180°C on es manté durant 1 minut, Finalment s'augmenta fins els 240°C amb una rampa de 10°C per minut i es manté aquesta temperatura durant 5 minuts. La separació cromatogràfica emprada ha estat una columna capil·lar Supelcowax-10 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) amb 20M polietilenglicol de fase estacionària (30m x 0,25mm x 0,25µm).

4.1.3.1 Caves amb criaçà accelerada

Per tal de comprovar que els caves sotmesos al test d'envelliment accelerat han evolucionat com ho faria un cava en condicions de rima real s'ha comparat l'evolució dels compostos volàtils dels caves amb una rima accelerada amb els caves sotmesos a una rima real de fins a 27 mesos. En concret, s'ha estudiat l'evolució dels compostos que a l'apartat 4.1.1 havien estat seleccionats com a possibles marcadors (vitispirà, TDN, succinat de dietil) d'una correcta evolució

durant la criança. També s'han considerat el lactat d'etil i l'1-hexanol, ja que, en l'esmentat apartat, aquests compostos augmentaven, en alguns casos, amb el temps de criança.

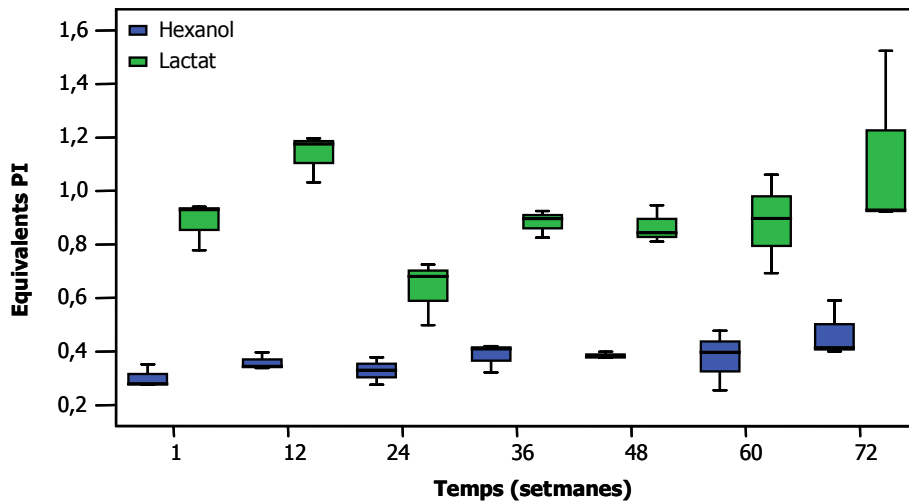


Figura IV – 1: Evolució de l'hexanol i el lactat d'etil durant la rima real

La relació entre l'1-hexanol i el lactat d'etil amb períodes de llarga criança no es mostra clara, alguns estudis (Puig-Deuet al 1998 i) els relacionen favorablement, mentra que altres treballs (Câmara et al 2006, Moreno et al 2005 i Pérez-Coello et al 2003) mostren un comportament desigual per aquests compostos (augment del lactat d'etil i no modificació del 1-hexanol). A les mostres de la rima real (figura VI – 1) i a les del test accelerat (figura VI – 2) no s'han observat diferències estadísticament significatives en els continguts de 1-hexanol i el lactat d'etil. Per aquest motiu, no es consideren marcadors de l'evolució de la qualitat organolèptica dels caves durant la rima. El seu origen està més lligat a les pràctiques pre-fermentatives (1-hexanol) i als processos de la fermentació (lactat d'etil) (apartat 2.1) que no amb la duració del període de criança.

Resultats i Discussió

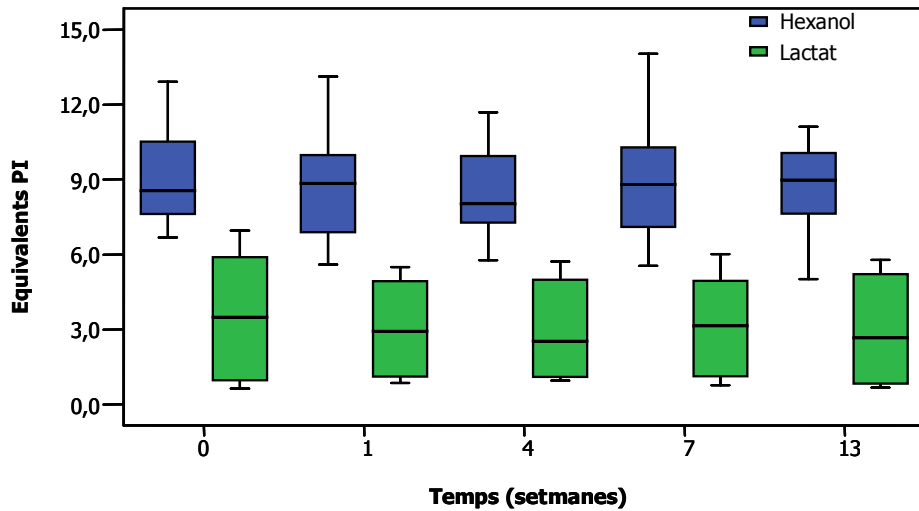


Figura IV – 2: Evolució de l'hexanol i el lactat d'etil durant la cria accelerada

Pels compostos que havien estat designats com a marcadors de la qualitat organolèptica durant la cria (vitispirà, succinat de dietil i TDN) s'ha detectat un augment significatiu en les mostres amb rima real (figura IV – 3) i en les mostres de cria del test d'envelliment (figures IV – 4, IV – 5 i IV -6). Un comportament similar per aquests compostos ha estat descrit en vins de jerez (Moreno et al. 2005), en vins blancs joves sotmesos a temperatura elevada d'emmagatzematge (Pérez-Coello et al. 2003 i Silva-Ferreira et al. 2002) i en vins de madeira envellits (Câmara et al. 2006).

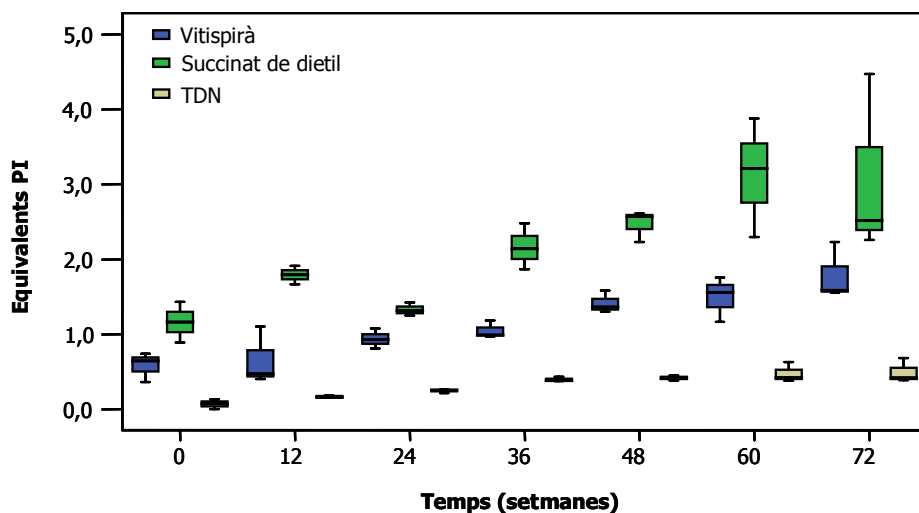


Figura IV – 3: Evolució del Vitispirà, TDN i succinat de dietil durant la rima real

Les evolucions dels tres marcadors en funció del temps es mostren en diagrames de capces i bigotis depenent de quin és el segon factor amb major grau d'influència (tipus de gas o categoria de cava). S'ha utilitzat com a segona variable de selecció l'atmosfera per el vitispirà (figura IV – 4) i el succinat de dietil (figura IV – 6) i la categoria de cava pel TDN (figura IV – 5).

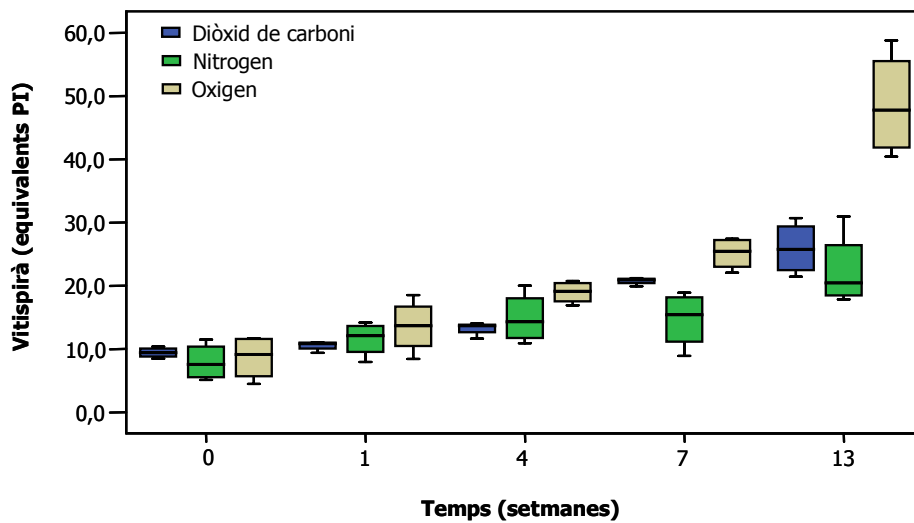


Figura IV – 4: Evolució del Vitispirà durant la criança accelerada

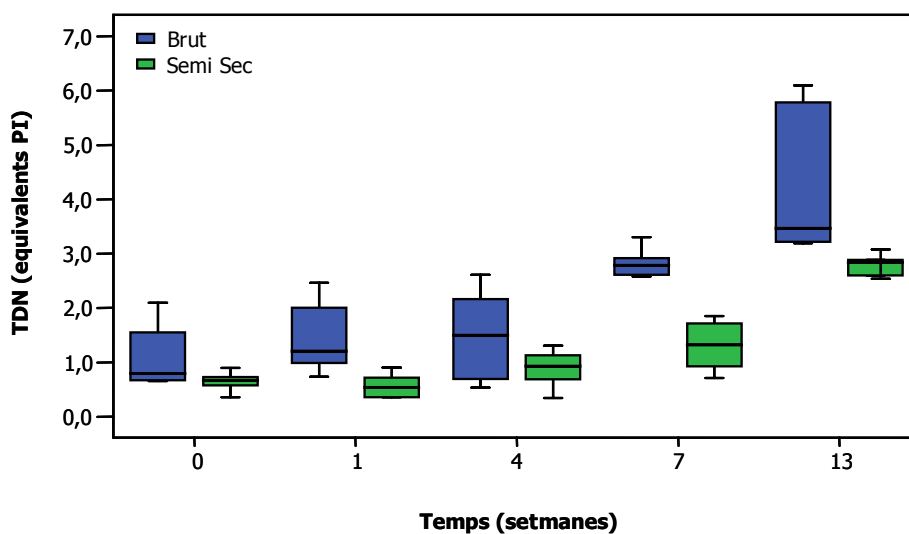


Figura IV – 5: Evolució del TDN durant la criança accelerada

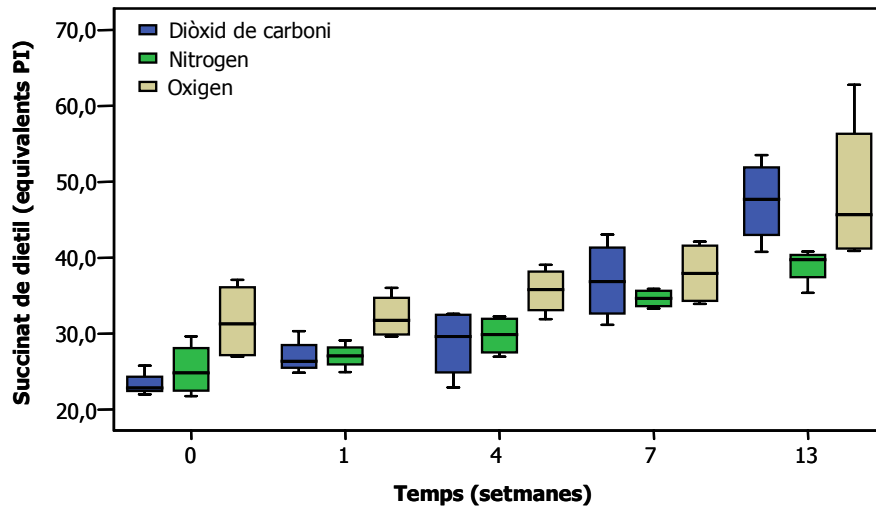


Figura IV – 6: Evolució del succinat de dietil durant la cria accelerada

Els augments que presenten el vitispirà, el succinat de dietil i el TDN s'han produït en les dues categories de caves utilitzades (brut i semi-sec) i en totes les condicions atmosfèriques (O_2 , CO_2 i N_2) ajustant-se a una funció lineal i significativa amb el temps. Això fa pensar que l'envelliment provocat en les mostres del test accelerat ha experimentat l'evolució esperada.

A la taula IV - 1 es mostren els valors dels coeficients de regressió (r), el nivell de significació (p) i els pendents (b) de les equacions de regressió lineal dels percentatges d'increment respecte el punt inicial (9 mesos per caves de rima real i mostres control, 0 dies a l'estufa, pel test accelerat) en funció del temps d'envelliments en setmanes. Els percentatges d'increment s'han calculat segons l'equació $[(\text{Valor} - \text{Valor Inicial})/\text{Valor Inicial}] * 100$.

			b	r	p
Vitispirà	Criança Accelerada	CO₂	15,72	0,964	< 0,01
		N₂	10,83	0,85	< 0,01
		O₂	33,73	0,966	< 0,01
	Rima Real	CO₂	2,93	0,982	< 0,01
TDN	Criança Accelerada	CO₂	19,55	0,943	< 0,01
		N₂	22,37	0,881	< 0,01
		O₂	28,76	0,935	< 0,01
	Rima Real	CO₂	9,57	0,966	< 0,01
Succinat de dietil	Criança Accelerada	CO₂	6,12	0,88	< 0,01
		N₂	3,55	0,959	< 0,01
		O₂	5,68	0,955	< 0,01
	Rima Real	CO₂	2,62	0,904	< 0,01

Taula IV – 1: Coeficients de regressió (r), nivell de significació (p) i pendents (b) de les equacions de regressió lineal dels increments quantitius en funció del temps de criaça real (n=7) i accelerada (n=10).

Tal i com es pot veure a la taula IV – 1 els valors de les pendents de les rectes de formació dels diferents marcadors de la rima de les mostres de criaça accelerada són, en tots els casos, superiors als pendents de les mostres de rima real. Per aquest motiu, els processos que en la rima succeeixen en 27 mesos, en el tests es produeixen més ràpidament. Tanmateix, les velocitats de formació de cada marcador varien en funció de si hi ha present una atmosfera oxidant o no oxidant.

El vitispirà en la forma lliure es troba en molt baixa concentració en el vi base i com a conseqüència de la criaça en contacte amb els llevats es produeix una aparició progressiva. Les principals vies de formació del vitispirà són l'alliberació de fragments volàtils i olorosos per degradació dels carotenoids (Câmara et al. 2006, Genovese et al. 2007 i Silva-Ferreira et al. 2002 i 2004), així com la ruptura de glicòsids. L'elevada velocitat d'aparició d'aquest compost en les condicions oxidants del test accelerat ($\Delta\%/t = 33,726$, taula IV – 1) pot ser deguda a un augment de la degradació dels carotenoids per contacte amb l'oxigen, afavorida per la temperatura. En aquest sentit, l'estudi realitzat per Silva-Ferreira et al. (2004) amb vins de Porto, altament saturats amb oxigen,

mostren taxes de formació de vitispirà també molt elevades. Així com el treball de Simpson (1978) en vins blancs sotmesos a emmagatzematge oxidatiu i el treball de Ferrari et al. (1999) en conyac. D'altra banda, les taxes de formació durant la cria accelerada en presència de diòxid de carboni són fins a cinc vegades superiors a la velocitat de formació durant la rima real ($\Delta\%/t = 2,934$) de manera que en aquestes condicions la formació del vitispirà es deguda principalment a la temperatura.

En el cas del TDN tot i ser un derivat norisoprenoid com el vitispirà, en condicions oxidants presenta una velocitat de formació de $\Delta\%/t = 28,762$ (taula IV – 1) la qual no està tant allunyada de les velocitats observades amb nitrogen ($\Delta\%/t = 22,368$) o amb diòxid de carboni ($\Delta\%/t = 19,549$). El TDN pot provenir, igual que l'anterior norisoprenoid, de la degradació dels carotenoids, així com de processos d'hidròlisi química o enzimàtica a partir dels glicòsids (Câmara et al. 2006, Genovese et al. 2007 i Silva-Ferreira et al. 2002 i 2004). En les mostres del test accelerat i atmosfera de CO_2 , s'ha produït una acceleració del procés de formació del TDN respecte a la rima real ($\Delta\%/t_{\text{rima}} = 9,56$) que suposa una velocitat dos cops superior. Els resultats suggereixen que, probablement, els mecanismes d'origen bioquímic (enzims dels llevats) poden tenir un paper més destacat que els processos de degradació per oxidació.

L'origen del succinat de dietil està lligat a processos post-fermentatius que estan relacionats amb fenòmens biològics del metabolisme dels llevats responsables de la fermentació. En aquest sentit, en els caves es produeixen dues fermentacions, la primera que transforma el most en vi base i la segona que transforma el cupatge de vins base en cava. Fruit de l'etapa post-fermentativa de la primera fermentació, els nivells d'aquest compost en el vi base augmenten i posteriorment es veuen incrementats durant la segona post-fermentació (criança,) sent un dels pics més destacats del cromatograma del cava. De manera que, al llarg de la rima es produeix un increment significatiu el qual s'atribueix als enzims alliberats al medi (cava) durant el procés d'autòlisi

dels llevats, que normalment té lloc abans dels 15 mesos de rima. Si comparem les velocitats de formació de les mostres amb criança accelerada (taula IV – 1) no s'observen diferències significatives en funció de les condicions oxidants i no oxidants. L'acceleració del procés de formació del succinat de dietil durant el test ha estat condicionat per la temperatura i, per aquest motiu, els ràtios de formació durant el test dupliquen el ràtio de la rima real.

4.1.3.2 Caves comercials amb emmagatzematge accelerat

Un cop s'ha comprovat que amb el test accelerat es recrea la tendència d'una rima real en un període de temps relativament curt (apartat 4.1.3.1), es van considerar els caves comercials (addicionats amb el licor d'expedició). En aquestes mostres es va avaluar si els indicadors de criança (vitispirà, succinat de dietil i TDN) també permetien efectuar un control de la qualitat durant l'emmagatzematge i distribució del producte final.

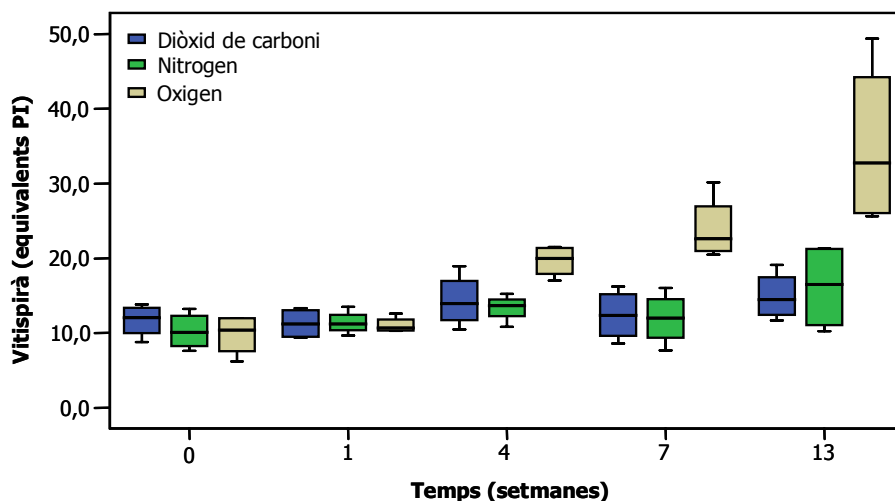


Figura IV – 7: Increments o evolució del Vitispirà en caves comercials

Resultats i Discussió

Pels tres marcadors (vitispirà, succinat de dietil i TDN) s'observa un augment dels nivells (figures IV – 7, IV – 8 i IV- 9) en funció del temps d'emmagatzematge. De manera que aquests mateixos compostos també es poden monitoritzar per tal d'efectuar un control de la qualitat durant l'emmagatzematge i distribució.

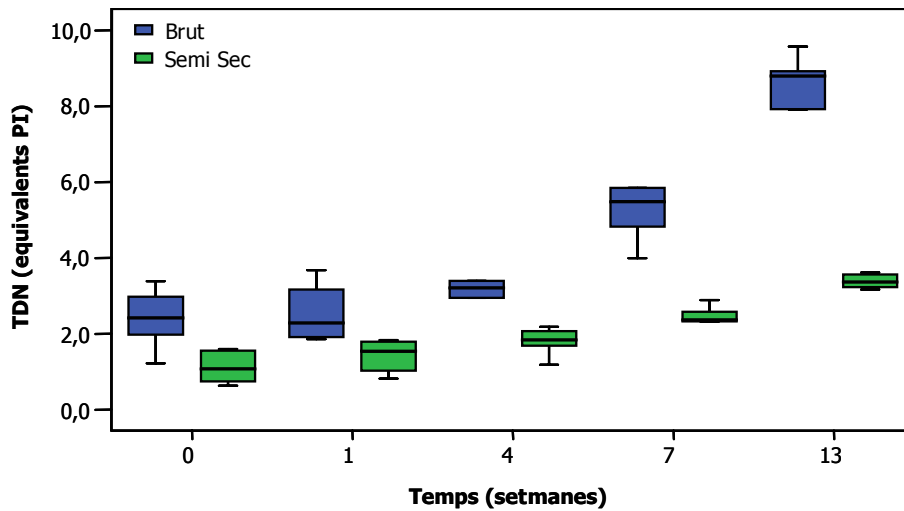


Figura IV – 8: Increments o evolució del TDN en caves comercials

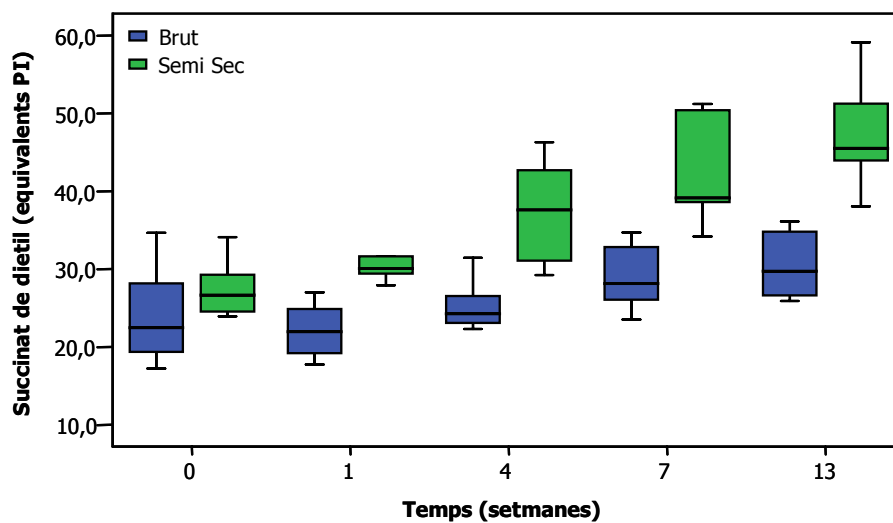


Figura IV – 9: Increments o evolució del Succinat de dietil en caves comercials

Resultats i Discussió

A la taula IV - 2 es mostren els valors dels coeficients de regressió (r), el nivell de significació (p) i els pendents (b) de les equacions de regressió lineal dels percentatges d'increment respecte el punt inicial (0 dies a l'estufa) en funció del temps d'envelliment en setmanes. Els percentatges d'increment s'han calculat segons l'equació $[(\text{Valor} - \text{Valor Inicial})/\text{Valor Inicial}] * 100$.

			b	r	p
Vitispirà	Criança Accelerada	CO₂	15,72	0,964	< 0,01
		N₂	10,83	0,85	< 0,01
		O₂	33,73	0,966	< 0,01
	Emmagatzematge accelerat	CO₂	2,75	0,079	< 0,01
		N₂	3,44	0,622	< 0,05
		O₂	18,67	0,878	< 0,01
TDN	Criança Accelerada	CO₂	19,55	0,943	< 0,01
		N₂	22,37	0,881	< 0,01
		O₂	28,76	0,935	< 0,01
	Emmagatzematge accelerat	CO₂	17,25	0,965	< 0,01
		N₂	16,48	0,942	< 0,01
		O₂	20,34	0,971	< 0,01
Succinat de dietil	Criança Accelerada	CO₂	6,12	0,88	< 0,01
		N₂	3,55	0,959	< 0,01
		O₂	5,68	0,955	< 0,01
	Emmagatzematge accelerat	CO₂	3,46	0,848	< 0,01
		N₂	3,26	0,699	< 0,02
		O₂	5,21	0,68	< 0,01

Taula IV – 2: Coeficients de regressió (r), nivell de significació (p) i pendents (b) de les equacions de regressió lineal dels increments quantitius en funció del temps de criaça accelerada ($n=10$) o emmagatzematge ($n=10$).

Pel norisoprenoid vitispirà la velocitat de formació durant l'emmagatzematge accelerat (taula IV – 2) es significativament inferior a la de la rima accelerada. De manera que, després de l'eliminació dels llevats de la segona fermentació i l'addició del licor d'expedició, el vitispirà evoluciona poc amb CO₂. La menor velocitat de formació del vitispirà en els caves comercials podria ser atribuïda a l'adsorció de precursors als llevats que han estat eliminats amb el degorjat. En

conseqüència, tot i ser útil per la criança, reflecteix poc els canvis que experimenta el cava comercial. A més a més, es confirma, tal i com s'havia assenyalat en l'apartat anterior (4.1.3.1), que la formació del vitispirà podria estar molt relacionada amb processos d'oxidació, ja que és en presència d'oxigen on es s'observa una major taxa de formació (figura IV – 7). No obstant, una atmosfera d'oxigen no es la pròpia dels caves.

La taxa de formació de TDN al llarg del temps la criança i durant l'emmagatzematge accelerats presenta valors elevats ($\Delta\%/t > 15$ en totes les condicions atmosfèriques) en ambdós cassos (taula IV – 2). Tanmateix, l'evolució d'aquest marcador està molt relacionat amb la qualitat del cava (figura IV – 8), sent els caves d'alta gama (brut) on es mostra un major ràtio de formació. Això pot ser degut a què el TDN és un aroma molt condicionat a la qualitat de la matèria primera, de manera que el TDN seria millor marcador d'emmagatzematge pels caves d'alta gama.

La velocitat de formació del succinat de dietil en presència de diòxid de carboni durant la criança accelerada ha estat el doble que durant l'emmagatzematge accelerat (taula IV – 2). Això pot ser degut a què l'origen d'aquest marcador està relacionat amb els fenòmens post-fermentatius que es produeixen principalment com a conseqüència de l'alliberació d'enzims procedents de l'autòlisis dels llevats durant la rima. Per aquest motiu, la seva formació està més relacionada amb el temps de rima que no pas amb l'emmagatzematge, i per aquesta raó pot ser millor marcador de la criança que no de la vida comercial.

4.1.4 Evolució de nous marcadors de qualitat de caves comercials amb emmagatzematge accelerat

De la caracterització dels compostos volàtils i semi-volàtils dels caves comercials (l'apartat 4.1.2) es va detectar la presència d'una sèrie de compostos (derivats del furà i compostos sofrats) formats, probablement, en processos de degradació de Strecker (apartat 2.2.2.3) que podrien ser utilitzats com a nous marcadors volàtils de caves comercials. Partint d'aquests resultats, es va plantejar monitoritzar l'evolució d'aquest tipus de compostos durant l'emmagatzematge accelerat produït en el test d'envelliment.

Aquests compostos estan presents a molt baixa concentració en relació als altres compostos volàtils de l'espai de cap. Això va obligar a desenvolupar una adaptació de la metodologia del SPME i a treballar mitjançant la detecció de masses en mode d'ió selectiu (SIM), per tal d'augmentar la sensibilitat del mètode.

Mostres:

Les mostres emprades han estat els caves amb l'emmagatzematge accelerat en contacte amb oxigen i diòxid de carboni del test d'envelliment accelerat descrit a l'apartat 3.3 de la metodologia i pla de treball. S'han seleccionat les mostres control que no han entrat a l'estufa i els caves que han estat 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 i 13 setmanes a 37°C.

Extracció:

S'ha emprat la microextracció en fase sòlida utilitzant una fibra triple (DVB/CAR/PDMS) de 20 mm (referència Supelco 57348-U, Bellfonte, PA, USA). Per efectuar l'extracció es parteix de 4 mL de cava addicionat amb 5 µL d'una solució (p/v) de 2-octanol (1 g/L) com a patró intern. Els 4 mL de cava s'han dipositat en un vial de 10 mL (Referència Supelco 27385) que contenia un

agitador magnètic. Finalment, els vials es tapen amb un sèptum de PTFE. Els vials així preparats s'han col·locat en un bany d'aigua a 30°C on s'han deixat 15 minuts per tal que s'assoleixi l'equilibri entre els analits del cava i els de l'espai de cap. Passat el temps d'equilibri s'introdueix a l'espai de cap la fibra, prèviament activada durant 30 minuts al port d'injecció del cromatògraf de gasos que es troba a 250°C. El temps d'extracció ha estat de 60 minuts, passat aquest temps s'introdueix la fibra a l'injector del GC per la volatilització dels compostos retinguts a la fibra.

Anàlisi cromatogràfic:

La separació cromatogràfica s'ha realitzat en un cromatògraf de gasos acoblat a un detector de masses (*Agilent Technologies 6890N Network GC System coupled to an Agilent Technologies 5973 Network mass spectrometer, Palo Alto, CA, USA*). Les condicions cromatogràfiques seleccionades han estat: Temperatures de l'injector i detector de 250°C i 280°C, respectivament. El programa de temperatura del forn comença a 35°C, seguit d'una rampa de 6°C fins a 240°C on es manté la temperatura durant 10 minuts. La separació cromatogràfica ha estat efectuada en una columna capil·lar Supelcowax-10 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) amb 20M polietilenglicol de fase estacionària (30m x 0,25mm x 0,25µm).

Identificació:

Els compostos han estat identificats comparant els temps de retenció i els espectres de masses amb els estàndards comercials quan aquests estaven disponibles. Pels compostos dels quals no es disposa de patró s'ha utilitzat la llibreria d'espectres Wiley 6.1 (NY, USA). La quantificació de cada compost s'ha realitzat mitjançant la monitorització dels ions descrits a la taula IV – 3.

	Estàndard Comercial	Detecció	Ions monitoritzats (m/z)	Quantificació
Eter difurfurilic	No	Si	61/109/110	Si
Furfural	Si	Si	98/97	Si
2,3,4-Trimetilfuran	No	Si	110/109	Si
2-Acetilfuran	Si	Si	110/109	Si
3-(Metiltio)propanoat d'etil	No	Si	74/61	Si
5-Metilfurfural	SI	Si	110/109	Si
Furoat d'etil	Si	Si	96/95	Si
Metionol	Si	Si	110/109	No
2-Etil-5-propiltiofè	No	Si	98/97	No
5-(Hidroximetil)furfural	No	Si	98/97	No

Taula IV – 3: Llistat de compostos identificats mitjançant GC –MS (sim)

Resultats:

S'ha monitoritzat l'evolució d'un total de 7 compostos (éter difurfurilic, furfural, 2,3,4-trimetilfuran, 2-acetilfuran, 3-(metiltio)propanoat d'etil, 5-metilfurfural i furoat d'etil) al llarg de l'emmagatzematge accelerat. L'origen dels derivats furànics en vins ha estat relacionat amb processos de degradació de sucres (Cutzach et al. 1999 i Câmara et al. 2006).

En condicions oxidatives, l'éter difurfurilic i el 3-(metiltio)propanoat d'etil no han mostrat augments significatius després de 13 setmanes. El 2,3,4-trimetilfuran i el furoat d'etil presenten un augment durant les primeres cinc setmanes del test seguit d'una disminució. Això probablement és degut a què en condicions oxidants aquests compostos són ràpidament degradats, de manera que la taxa de formació és inferior a la de degradació. En canvi, el furfural, el 5-metilfurfural i el 2-acetilfuran revelen un augment lineal significatiu en condicions oxidants i temperatura en funció del temps. Aquests tres compostos, tot i ser molt reactius i participar en reaccions de polimerització, no mostren una disminució durant les 13 setmanes del test. Això fa pensar que la quantitat de sucres en el medi és suficient per que la taxa de formació sigui superior a la de degradació. Resultats similars van ser obtinguts per Cutzach et al. (1999) en vins dolços blancs en condicions oxidants.

En presència de condicions no oxidants (les que presenten els caves realment) el furfural, el 2,3,4-trimetilfuran, el 2-acetilfuran, el 3-(metiltio)propanoat d'etil, el 5-metilfurfural i el furoat d'etil presenten un augment lineal significatiu amb el temps. Les dades d'aquests compostos han estat tractades mitjançant la regressió lineal, per avaluar l'efecte de la variable quantitativa temps a l'estufa, i l'anàlisi d'ANOVA, per la variable qualitativa tipus de cava (Semi sec o Brut) utilitzant el programa estadístic SPSS versió 12.0. A la taula IV - 4 es mostra, el grau de significació (p) i la influència (eta) de les dues variables considerades (temps i categoria de cava) en el contingut dels compostos volàtils possibles marcadors de qualitat comercial.

	Temps			Categoria de Cava	
	p	eta	r	p	eta
Furfural	< 0.0001	89%	0.8815	ns	-
2,3,4-Trimetilfuran	< 0.0001	67%	0.6205	< 0.027	12%
2-Acetilfuran	< 0.0001	68%	0.7356	ns	-
3-(Metiltio)propanoat d'etil	< 0.0001	87%	0.7792	ns	-
5-Metilfurfural	< 0.0001	88%	0.8784	ns	-
Furoat d'etil	< 0.0001	72%	0.7498	< 0.048	10%

Taula IV – 4: Influència de les variables temps i categoria de cava en els nivells dels compostos volàtils possibles marcadors de qualitat. (ns: no significatiu)

L'èter difurfurílic, l'evolució del qual es mostra a la figura IV – 10, no canvia significativament al llarg del temps en condicions no oxidants de manera que no és útil com a indicador de durabilitat.

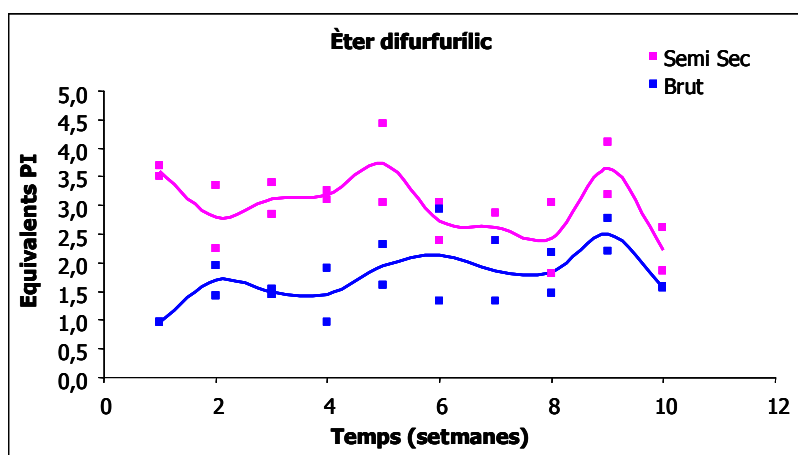


Figura IV – 10: Evolució de l'èter difurfurílic en caves comercials

Les evolucions al llarg del temps del 2,3,4-trimetilfuran i el furoat d'etil es mostren a la figura IV – 11. Aquests compostos tot i mostrar un increment significatiu amb el temps estan afectats pel la variable qualitativa tipus de cava (taula IV – 4), sent la categoria brut la que presenta valors més elevats. A més a més, si s'observa l'evolució d'aquests compostos (figura IV – 11) es veu com només a partir de la quarta setmana es produeix un increment sostingut. De manera que, la viavilitat del 2,3,4-trimetilfuran i del furoat d'etil com a indicadors de l'emmagatzematge és dubtosa.

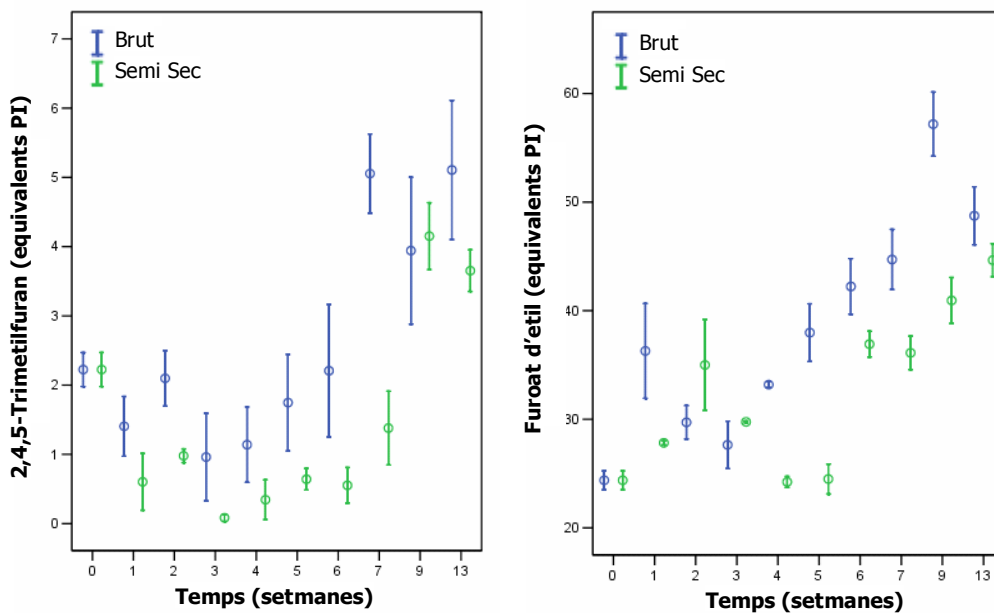


Figura IV – 11: Evolució del 3,3,4-Trimetilfuran i del furoat d'etil durant l'envelliment accelerat de caves comercials

A la figura IV – 12 es mostren les evolucions del furfural, 2-acetilfuran, 3-(metiltio)propanoat d'etil i 5-metilfurfural com a diagrames de capses i bigotis. Tal i com s'indica a la taula IV – 4, les evolucions d'aquests compostos no mostren diferències significatives en funció de si es tracte d'un cava semi sec o d'un brut. Això fa pensar que aquests compostos puguin ser interessants com a marcadors de durabilitat per qualsevol tipus de vi d'escumós independentment de la quantitat de sucre addicionada amb el licor d'expedició.

Resultats i Discussió

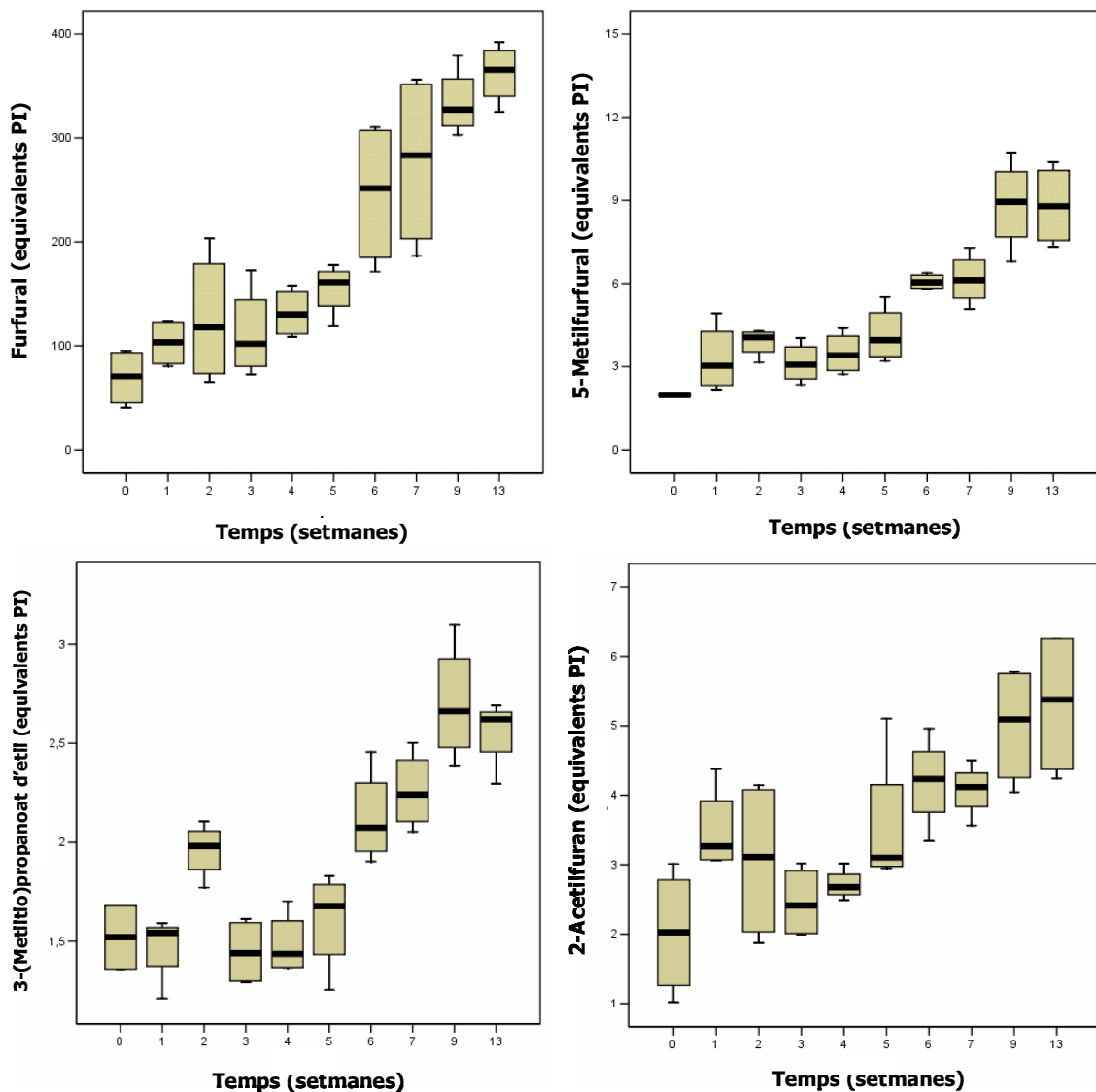


Figura IV – 12: Evolució del Furfural, Metilfurfural, Etil-3-metiltiopropanoat, 2-Acetilfuran durant l'envelliment accelerat de caves comercials

Aquests compostos augmenten amb el temps, però la seva formació pot tendir a estabilitzar-se, podent fins i tot disminuir quan el cava estigui molt envellit. Tal i com han mostrat el 2-acetilfuran i el 3-(metiltio)propanoat d'etil en les mostres en condicions oxidants, on s'ha accelerat més la degradació. En canvi, les evolucions del furfural i del 5-metilfurfural són les que han presentat un augment més progressiu ($r > 0,87$ per ambdós compostos) al llarg de les 13 setmanes de l'envelliment accelerat. Aquests resultats es corresponen amb els

obtinguts per Câmara et al. (2004 i 2006), Pérez-Coello et al. (2003) i Moreno et al. (2005).

Per tant, aquests dos compostos serien els millors indicadors de durabilitat del cava comercial, ja que presenten un augment lineal sostingut en funció del temps i, a més a més, no depenen de la quantitat de sucre del cava ni de la qualitat del vi base (taula IV – 4).

4.2 Marcadors no volàtils de la qualitat durant la criaça i l'emmagatzematge

Gràcies als treballs previs del grup d'investigació amb mostres de cava en fase de rima es coneixia que els compostos fenòlics modificaven el seu contingut durant la criaça real a la bodega. En el treball realitzat per Ibern-Gómez et al (Am. J. Enol. Vitic., 2000) es van detectar canvis en el color dels caves durant la criaça. Segons aquest treball, a mesura que augmentava el temps de criaça es produïa una oxidació dels compostos fenòlics cosa que provocava un enfosquiment del cava pels productes d'oxidació dels fenols. En base a aquests resultats, es va plantejar avaluar el comportament dels compostos fenòlics en les mostres de rima accelerada i mostres comercials sotmeses a 37°C en el test d'envelliment accelerat.

4.2.1 Test accelerat durant la criaça i l'emmagatzematge de vi escumós "Cava"

J. Bosch-Fusté, E. Sartini, C. Flores-Rubio, J. Caixach, E. López-Tamames, and S. Buxaderas. Accelerated test during ageing and storage of sparkling wine "Cava". J. Agric. Food Chem. En fase de revisió.

Resum:

S'ha estudiat la evolució dels compostos fenòlics durant un test accelerat de criaça i envelliment, realitzat amb dos categories de cava i amb tres atmosferes de espai de cap. Els canvis en el perfil fenòlic dels caves s'han determinat mitjançant la cromatografia líquida d'alta eficàcia emprant un detector de fotodiodes (HPLC-DAD). A més a més, s'ha efectuat la mesura de l'absorbància de les mostres per determinar el contingut de polifenols totals (Abs. 280nm), el contingut d'àcids hidroxicinnàmics (Abs. 320nm) i el grau d'enfosquiment (Abs. 420nm).

De l'anàlisi cromatogràfic de les mostres es veu que al llarg de la criaça accelerada i durant l'emmagatzematge es produeix una disminució significativa dels compostos fenòlics (àcids fenòlics i hidroxicinnàmics). Aquesta disminució esta directament relacionada amb el nombre de setmanes d'envelliment accelerat a l'estufa i, inversament relacionada amb un increment de l'enfosquiment de les mostres probablement causat per productes de degradació dels compostos fenòlics. Les mostres que s'han mostrat més estables a l'enfosquiment han estat les que es trobaven en condicions no oxidants (CO₂ i N₂) dels caves de la qualitat brut. Fet que s'ha relacionat amb la major qualitat del vi base que s'ha emprat per elaborar els caves bruts.

També s'ha observat un increment del valor de l'absorbància a 280nm (Abs.280nm) en totes les mostres (criança i comercials) independentment de si es trobaven en una atmosfera oxidant o no. L'augment del valor de l'Abs. 280nm es degut a l'increment de dos compostos no identificats (F3 i F4) que presenten un únic màxim d'absorció entorn a 280nm. Aquests compostos, que en les mostres control ja estan presents, augmenten significativament el seu contingut al llarg del test, esdevenint el compost F3 al final del test el pic majoritari del cromatograma a 280nm. Per aquest motiu el valor de l'Abs. a 280nm no és una mesura adequada i fiable del contingut de polifenols totals ja que el seu valor pot estar alterat per compostos que absorbeixin a la mateixa regió i no siguin fenols.

Per la regió del cromatograma on eluïa el compost F3, entre l'àcid gàlic i l'àcid protocateic, presentava una elevada similitud amb el compost descrit en els treballs de Mayen et al., 1997; Pozo-Bayon et al., 2003 i Benítez et al., 2003. com a semi o hidroquinona formada per oxidació d'algun fenol. Aquests compostos però han presentat un comportament contrari al dels compostos fenòlics ja que augmenten, de manera que, probablement, pertanyen a una família química diferent.

L'evolució dels compostos F3 i F4 és molt interessant des del punt de vista del seguiment de la qualitat del cava durant la fase de rima i al llarg de l'emmagatzematge. Tanmateix al no conèixer la seva estructura fa molt difícil aventurar un possible origen. Aquest, però, pot estar molt relacionat amb els sucres i els processos de degradació que aquests experimenten, ja que en els caves comercials semi-secs (amb sucres addicionats amb el licor d'expedició) és on s'ha format un major quantitat d'aquests compostos. A més a més, F3 es forma en major quantitat (expressat com ppm d'àcid gàlic) en presència de condicions no oxidants (53,5 ppm en el cava comercial semi sec) que en condicions oxidants (23,3 ppm pel mateix cava) de manera que la seva formació no sembla estar relacionada amb fenòmens d'oxidació de fenols.

Resultats i Discussió

Aquests compostos, F3 i F4, que s'han caracteritzat fins obtenir les masses moleculars (178 per F3 i 162 per F4), podrien tenir interès com a marcadors no volàtils de la qualitat organolèptica durant la rima i l'emmagatzematge. Per aquest motiu és necessari una caracterització més profunda per tal d'establir el seu origen en el vi.

Resultats concrets:

- Caracterització del perfil fenòlic dels caves sotmesos al test d'envelliment accelerat mitjançant la HPLC-DAD.
- Detecció de dos possibles marcadors no volàtils de la qualitat organolèptica dels caves en fase de rima i caves comercials per la seva relació amb l'enfosquiment.

Accelerated test during ageing and storage of sparkling wine “Cava”

**Bosch-Fusté, J. ^{1*}; Sartini, E. ²; Flores-Rubio, C.³; Caixach J.³; López-Tamames, E.¹;
and Buxaderas, S¹**

¹Departament de Nutrició i Bromatologia. Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA). Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain

²Alma Mater Studiorum. Campus Universitario di Scienze degli Alimenti. Università di Bologna. P.zza G. Goidanich, 60, 47023. Cesena (FC) Italy.

³ Laboratori d'Espectrometria de Masses. Departament d'Ecotecnologies. IIQAB-CSIC. C/ Jordi Girona 18, 08034 11 Barcelona (Spain)

*Author to whom correspondence should be addressed (Phone: 34 93 4024508. Fax: 34 93 4035931. E-mail: jbosch001@ub.edu)

ABSTRACT

Quality of sparkling wine (cava) is affected by the browning, developed under saturated CO₂ pressure, along its biological ageing and/or commercial life. Ageing test (37°C) of cava was carried out in order to find ageing markers. Two types of storages [*surlie* aged (wines that remained in contact with the lees) and final product (wines after disgorging)] and different headspaces [oxidative (O₂) and not oxidative (N₂ and CO₂)] were considered. In all conditions, phenols decrease and browning increase during the test. Browning was related with the increase of two unidentified compounds (F3 and F4). These compounds could be useful as ageing markers to monitoring the decrease of sparkling wine quality caused by a faulty storage.

KEYWORDS: Cava, oxidative and not oxidative browning, phenolic compounds

Introduction

Browning is one of the major problems that affect many kinds of food (fruits, musts, wine, etc) and it causes the deterioration of food quality and economic losses. Enzymatic or chemical reactions of phenolic compounds are the main factors of food darkening. In enzymatic browning these compounds act as a substrate for polyphenoloxidases (PPOs), while chemical browning could be caused by temperature, oxygen, ascorbic acid degradation, Maillard reactions, and/or interactions between metal ions and phenols (1, 2, 3, and 4). In fruits and musts, phenol oxidation by PPO is the main responsible of browning (enzymatic browning). However, in wine, the PPO is inhibited by many factors: the presence of ethanol produced by yeasts during fermentation, and the presence of SO₂ added to wine as antioxidant (1, 2, 3, 5, and 6). The main stage of browning in wine is the reaction in which *ortho*-diphenols are converted into their corresponding *ortho*-quinones. These reactions are not particularly well-known until now, although, different mechanisms were proposed (4, 7). The *ortho*-quinones could react with other phenolic or not phenolic compounds to form brown pigments.

To study browning process in wines several accelerated browning tests have been carried out on sherry wines (2, 8, and 9), a white wine produced using a biological ageing under flor yeast, where changes in phenolic compounds were related with a browning increase. Some works (7, 10, 11, and 12) also showed the effect of oxygen and temperature on phenolic compounds and color of white wines during storage.

Cava is a white sparkling wine (Certified Brand of Origin) produced by a second fermentation of a base wine blend followed by a biological ageing on lees (*surlie*) for at least 9 months under a high pressure of CO₂ (13). Winemakers believe that the organoleptic characteristics of Cava are delicate and could be altered during ageing and distribution. Browning could be a problem for *surlie* and final product in sparkling wine ageing when storage conditions are not appropriated, because it is associated to a reduction of quality and could have a negative effect on the longer aged Cava. The main phenols involved in white wine oxidation are hydroxycinnamic acids (7 and 10); although other compounds may contribute (7 and 11). There are few studies on the phenolic composition of sparkling wine and about the evolution of these compounds during storage (14, 15, and 16). However, temperature, reducing sugars concentration, and light exposition during the storage and distribution could be involved in chemical browning of sparkling wine (17).

The aim of this work was to study the modifications of Cava phenolics during ageing of sparkling wine, in order to find compounds that could be suitable as ageing markers along the storage (aged *surlie*) and distribution (final product). In the current research several accelerated ageing tests were carried out at 37 °C under oxidative (under oxygen) and not oxidative (under nitrogen or carbon dioxide) headspace conditions. Moreover, two quality types of Cava (medium and high quality) were considered.

Materials and Methods:

Chemical Standards: Commercial standards of phenolic compounds (gallic, coumaric, caffeic, and ferulic acids and (+) catechin) were purchased from Sigma (Barcelona, Spain). Standards solutions were prepared in methanol P.A. (Sigma, Barcelona, Spain) ranged between 0,1 to 100 mg/L.

Samples: A factorial study (Figure 1) was carried out using two different Cava (series A and series B) of different quality produced by a winery in the Cava region (D.O. Cava). Series A and B corresponds to medium dry and brut categories respectively. Aged surlie and final product technological stages were considered for each type of Cava.

Aged surlie: For each quality wine (A, and B), a total of 12 bottles of 75cL were taken containing Cava in contact with yeast lees from second fermentation at one year of cellar ageing. Wine bottles were mixed and degasified in a bulk (10L), and 60 amber glass bottles of 250 mL were filled with 150 mL of homogenized wine (Figure 1).

Final product: For each wine (A, and B), 12 bottles (75cL) containing Cava were taken. These samples were obtained in the winery from the same aged *surlie* Cavas after disgorging and adding the *liqueur d'expédition* (secretly mixture for each winery typically made by a blend of reserve wines, sugar, sulfur dioxide, brandy and/or others distillates). This step just spends the time for disgorging and adds the liqueur. Cava bottles were mixed and degasified in a bulk (10L), and 60 amber glass bottles of 250 mL were filled with 150 mL of blended final product wine (Figure 1).

Three headspace conditions of filling were tested (O_2 , N_2 , and CO_2), using 20 amber bottles for each headspace both for aged surlie and final product (Figure 1). Aerobic conditions (oxygen) were used as browning oxidation control process, while anaerobic conditions were created using nitrogen and carbon dioxide. These headspaces were created with a gas flow of 150mL/min during 5 min. The tests under nitrogen were carried out to create an inert headspace in which oxidative browning was not favored, while not oxidative reactions were improved; carbon dioxide was selected because is the real headspace for sparkling wines during storage.

Ageing tests: The accelerated ageing test was carried out in the dark. A moderated temperature (37°C) was selected to allow the progressive appearance of ageing markers and to avoid the formation of brown pigments which could precipitate under extreme conditions. Samples were taken and analyzed before the test (control) and after 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, and 13 weeks of ageing. The test was replicate on two amber glass bottles for each time point.

General parameters: Total sulfur dioxide (SO_2) (mg/L), titratable acidity (g H_2SO_4 /L), pH, alcohol content (% v:v), reducing sugars (g/L), acetic, citric, malic and lactic acid (g/L) were determined using a WineScan™ FT120 Basic (FOSS Electric Spain S.A.). Absorbances were measured at 280nm (phenolic index), 320nm (hydroxycinnamates index) in 1mm quartz cell and 420nm (browning index) in 10 mm quartz cell, using double distilled water as reference. All

absorbances were performed using a spectrophotometer Shimadzu® UV-160A (Duisburg, Germany).

HPLC-DAD analysis: Two milliliters of sample were filtered through a Waters (Milford MA-USA) 13-mm PTFE filter (0,45 µm pore size) and 20 µL were injected into a reversed-phase Phenomenex Luna C18 high-purity silica column (150mm × 4.6 mm, 5µm, Torrance, CA, USA) with a Phenomenex C18 ODS guard column was used (4mm × 3.0 mm) both at 40°C. A Hewlett-Packard 1050 gradient liquid chromatograph coupled with a DAD 1050M detector was employed. Solvent A was double-distilled water with acetic acid 2% and solvent B was acetonitrile: double-distilled water 80:20 (v/v) with acetic acid 2%. Linear gradient conditions were as follows: 0'- 0 % B, 12'- 16.5% B, 20' - 16.5% B, 58'- 80% B, 60'- 0% B at flow of 1 mL/min. The chromatograms were monitored simultaneously at 280 and 320 nm. Spectra were obtained by scanning from 220 to 450 nm with an acquisition speed of 1s and bandwidth of 4 nm. Chemstation Rev. Asterix 05.02 (Hewlett Packard – Waldbronn – Germany) was used for data acquisition and analysis.

Identification and quantification: Peaks were identified using spectra and retention times of standard for gallic acid, (+) catechin, caffeic, coumaric, and ferulic acid. S-glutathionylcaftaric (SGC), coutaric and caftaric acid were tentatively identified using bibliographic spectra (18, and 19). Moreover, eleven unidentified compounds (F1 to F11) were detected in all the samples analyzed (figure 2, and 3).

The chromatographic data were processed using calibration curves obtained from the standard solutions. The calibration curve obtained from gallic acid was used to quantify the unidentified compounds detected at 280 nm (F1, F2, F3, F4) and the amount of all compounds detected at 280 nm (s280), while the calibration curve obtained from caffeic acid was used to quantify the unidentified compounds detected at 320nm (F5, F6, F7, F8, F9, F10, and F11) SGC, caftaric, and the amount of all compounds detected at 320nm (s320). Coutaric acid was quantified using the calibration data from coumaric acid.

Liquid chromatography / mass spectrometry analysis (LC/ESI-MS)

A quadrupolar mass spectrometer Navigator (Finnigan, MassLab Group, Manchester, U.K.) with an electrospray source was used in negative mode. The pumping system was a P 580 A LPG liquid chromatograph Gynkotec (Munich, Germany) . A reversed-phase Phenomenex Luna C18 high-purity silica column (150mm × 2.0 mm, 5µm) was used. Solvent A was double-distilled water:acetonitrile 95:5 (v/v) with formic acid 0.08% and solvent B was acetonitrile:double-distilled water 95:5 (v/v) with formic acid 0.08%. Linear gradient conditions were as follows: 0'- 0 % B, 2'- 0 % B, 12' - 15% B, 20'- 15% B, 40'- 80% B, 45'- 0% B at flow of 200 µL/min. Mass spectra were obtained in full scan mode over the mass range 50-700 m/z in continuum mode at 2 scans for second with an interscan time of 0,1 s. The working conditions were as follows: ion capillary voltage, -3000 V; cone voltage, 100 V; drying gas (N₂) flow rate, 350 L/h; and source temperature, 180°C. The data were processed using MassLab software version 1.1.

Statistics: Different types of Cava (series A and series B), headspaces (O₂, CO₂, N₂), storages (*surlie* aged and final product), and time point (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, and 13 weeks) were considered as independent variables (factors). Factor analysis, lineal regression and multifactor analysis of the variance (MANOVA) was carried out using STATGRAPHICS Plus Version 5.1. program. Significant results were considered at $p < 0.05$.

Results and Discussion:

Titrateable acidity (ranged 2,9 to 3,4 mg of H₂SO₄ / L), pH (ranged 2,81 to 2,90), and alcohol content (ranged 10,8 to 11,8 %) were according with those expected for cava regulation (20) and they not showed significant differences within samples along the test.

At the beginning of the accelerated ageing differences in SO₂ level was found between aged *surlie* (95 mg/L Cava A and 120 mg/L Cava B) and final product (127 mg/L Cava A and 130 mg/L Cava B) for cava A and B. Due to Sulphur dioxide was added as antioxidant with the *expédition liqueur* to *surlie* Cava during the disgorging process to obtain the final product. During the test, a significantly decrease of total SO₂ was observed in both Cavas, A and B. Aged *surlie* samples of Cava A until 77 mg/L and 80 mg/L and final product samples of Cava A until 86 mg/L and 111 mg/L for oxidative and not oxidative conditions, respectively. The decrement of SO₂ was bigger in samples under oxidative conditions because of SO₂ was more waste in presence of O₂ (5, 6, 10, and 11). In this sense, absorbance at 420 nm for Cava A in oxidative conditions reaches an increase of 240% during the test, while in non oxidative conditions was 100%. For Cava B, the increases of browning expressed as percent were 220% and 60% for oxidative and non oxidative conditions, respectively. The browning produced during the test depends of the type of wine (Medium dry and Brut) and headspace conditions: samples stored with N₂ or CO₂ atmosphere and Cava B (Brut) were more stable to browning.

Cava A and B have different concentration of reducing sugars according with their category and type of *expédition liqueur* added. *Surlie* samples have 0,6 g/L and 2,2 g/L of sugars for Cava A and B respectively, while final product samples have 35,1 g/L and 4,4 g/L of sugars for Cava A (medium dry) and B (brut), respectively. During the browning test sugar contents were not changed significantly in all conditions.

Figure 2 shows HPLC chromatograms obtained at 280nm and 320nm for a final product of Cava A stored under carbon dioxide condition for 7 weeks at 37°C. The UV spectra of the unidentified compounds (F1 - F11) obtained at 280 nm and 320 nm are shown in figure 3. Compounds F1 to F4 show a λ_{max} near 280 nm, while compounds F5 to F11 show a λ_{max} around 320 nm.

A factor analysis (FA) was carried out in order to determine which quantitative variables better explains the distribution of the variance of Cavas samples stored under different conditions. The variables extracted after this statistical treatment (factor score > 0,7) are shown in Figure 4a (Cava A) and 4b (Cava B) as black points. The first factor (figure 4A and 4B) distribute the samples according to the number of weeks of the accelerated ageing and by the browning index (420nm). As expected, the longest stored Cavas (13 weeks) exhibited the highest

degrees of browning and the lowest phenol compounds levels, mainly in oxidative conditions. Under these conditions, s320, caftaric, caffeic, and coumaric acids and SGC were opposite to the vector of 420nm (figure 4a and 4b). So, when the browning increases, the level of these phenolic compounds decreases. The factor 2 distributes the samples in the biplot by the type of storage headspace. As can be seen in Figure 4, the samples were mainly grouped by the kind of headspace (oxidative in red and not oxidative in blue) mostly at the end of the test. In this sense, the samples under not oxidative conditions presents higher values of the variables coumaric acid, s280, F1, F2, F3, F4, F6, F7, F9, and F10 than samples under oxidative conditions.

The quantitative variables with a factor score $>0,7$ in factor analysis are shown in table 1 at 0, 3, 6, and 13 weeks for Cava A. Mean and standard deviation (SD) of table 1 were calculated from the results of two amber glass bottle analyses for samples under oxidative conditions. While the results corresponding to not oxidative conditions were obtained by means of the two not oxidative headspaces conditions ($n=4$), because not significant differences were found between N_2 and CO_2 evolutions.

The s320 value decrease for all conditions tested and for both aged surlie and final product samples of cava A (table 1) and Cava B. The s320 value was inversely and significantly correlated with the increase of browning of cava measured at 420nm (table 2). The browning increase is widely attributed in literature (1, 3, 4, 7, 11, 13, 21, and 22) to the formation of brown macromolecules from the polymerization of *ortho*-quinones compounds. So, the *ortho*-quinones formation could explain the decrease of s320 value. The main hydroxycinnamic acids, caftaric and caffeic acids, decreased in all conditions tested and samples used in the current study (table 1 and 2). These results were in agreement with Benitez et al. (23) for sherry wines. The hydroxycinnamic acids are more oxidizable than others phenols because of four double bonds are present in the structure of cinnamic acid which provides to these phenols a high capacity to delocalization of electrons (4, 11, 18). Furthermore, hydroxycinnamic acids have the lowest red-ox potential of all the phenolic compounds naturally occurring in wines and therefore, these compounds could react very quickly to form the *ortho*-quinones (21, and 24). Then, *ortho*-quinones formed are involved in the coupled oxidation reactions and so they play a key role in the degradation of the other phenols (21). SGC is a product formed by a reaction involving caftaric acid, oxygen, and glutathione in wines (6, 14, 16, and 25). A SGC decrease during accelerated test was observed (table 1 and 2). However, some differences in the evolution of SGC levels can be seen (Figure 5): samples stored under not oxidative conditions show an increase in SGC levels during the first week and during the first two weeks for final product and surlie aged samples, respectively. Followed by a decrease of SGC until the end of test. Because at the beginning of the test the SGC formation-degradation ratio was >1 , due to the oxidation of caftaric acid to form its *o*-quinone took place and SGC could be formed (6). However, after 2 weeks, a diminution of SGC was observed (table 1), this could indicates that the pool of glutathione was depleted (6, 24) and then the SGC ratio was <1 . On the other

hand, with an oxidative headspace the levels of SGC decreased from the beginning to the end of browning test. Under oxidative conditions a high degradation level of caftaric acid occurs and there was not enough o-quinone of caftaric acid to form SGC.

Coutaric acid level also decreased during accelerated ageing test in all samples and experimental conditions tested, except for final product of cava B under oxidative conditions (table 1 and 2). The other hydroxycinnamic compounds coumaric and ferulic acids don't change their levels under oxidative conditions; while in not oxidative conditions an increase was detected, perhaps by hydrolysis of some precursor (table 1). The unidentified compounds (F1, F2, F6, F7, and F10) decreased their levels in all samples tested (aged surlie and final product) only significantly in the presence of an oxidative headspace and some of them, F1, F2, and F6 disappeared before the end of test in Cava A (table 1). On the other hand, in not oxidative storage conditions (N_2 and CO_2), these unidentified compounds did not significantly modify their levels during the test. So that, these compounds not will be adequate ageing markers under the real headspace conditions of cava and we don't focused in these during this study.

Along the ageing test, two unidentified compounds (F3 and F4), which have a λ_{max} at 283nm and 276nm, respectively (figure 3), showed an increase in all samples and under all conditions tested. These compounds elute in the most polar region of the chromatogram, between gallic and protocatechuic acids (Protocatechuic acid was identified with standard, however it not was detected in the samples) The F3 compound shows a special interest due to it represents around 70% of total area at 280 nm after 7 weeks of accelerated ageing (figure 2) and could be a suitable marker of ageing for surlie and final product. We assumed that F3 and F4 formed in the current study are not artifacts originate only under during the accelerated ageing test, because in 54 commercial sparkling wines bought in local stores, we detected these compounds in all sparkling wines. Concentrations expressed as mg/L of acid gallic were from 2,2 to 41,4 for F3 while F4 levels were ranged between 2,7 to 29,9.

Mayén et al. (2), Pozo-Bayón et al. (15), and Benítez et al. (23) detected similar compounds which were described as semi or hydroquinone phenols. However, the formation of F3 was the highest under not oxidative conditions (it reaches 53.5 mg/L for final product of cava A (table 1) and 19,36 mg/L for final product of cava B. In the present study an increase of phenolic index was observed (table 1). F3 and F4 were directly related with the increase of s_{280nm} (table 2), so they were probably the origin of the increase of the absorption at 280nm during the browning test. Therefore the value of absorbance at 280nm as a measure of total phenolic index is fraught with problems because some other compounds than phenols could affect to this value. Furfurals were a kind of compounds that could interfere to total phenol index value because they show a λ_{max} near 280nm.

The levels of sugars added with the expedition liqueur could be related with the formation of F3 and F4. Comparing the final products of cava A (35 g/L of sugars) with the final products of cava B (4,4 g/L of sugars), F3 reaches 23,3 - 53,3 mg/L (table 1) and 18,1 - 19,3 mg/L (oxidative - not oxidative conditions), respectively. While the F4 levels achieves 8,0 - 9,9 mg/L

for final products of cava A (table 1) and 5,48 – 5,95 mg/L (oxidative – not oxidative conditions) for final product of cava B. So, the formation of these compounds was highest in samples with more reducing sugar concentration. Therefore, F3 and F4 could be formed in some reaction related with the reducing sugars levels. On the other hand, furfurals compounds were formed in beverages with sugars due to their degradation.

To have a better knowledge of F3 and F4 formed in cava, final product samples of Cava A after 13 weeks under not oxidant conditions were analyzed by LC/MS. The unidentified compound F3 was also the major peak in LC/ESI-MS chromatogram. The LC/ESI-MS spectrum of F3 and F4 showed two main ions at 177 and 355 m/z for F3, the latter ([2M-H]⁻) could be a dimeric form of the former ([M-H]⁻), and at 161 for F4 (Figure 6). Moreover, LC/MS of standards of gallic, caffeic, coumaric and ferulic acids were obtained in order to confirm the identification of these compounds in our samples (Figure 6). According with data obtained after LC/ESI-MS analysis, F3 and F4 compounds not were any phenolic or furfural compound described in the bibliography and further investigations were required. However, we believe that F3 and F4 could be suitable as ageing markers and to follow the quality of Cava during the storage and the distribution chain.

Acknowledgements

We are grateful to Freixenet SA wineries for providing samples. This study was made possible thanks to financial assistance from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Spain) AGL2005-03451, from Generalitat de Catalunya (Spain), Project 2005SGR-00156 and through a Grant from the Generalitat de Catalunya to the PhD student J. Bosch-Fusté.

References

- 1 Gómez, E.; MArtínez, A.; Laencina J.; Prevention of oxidative browning during wine storage. *Food Research International*. 1995,,28, 213-217,.
- 2 Mayén, M.; Barón, R.; Mérida, J.; Medina, M.; Changes in phenolic compounds during accelerated browning in white wines from cv. Pedro Ximenez and cv. Baladi grapes. *Food Chemistry*. 1997, 58:1-2, 89-95.
- 3 Spagna, G.; Pifferi, P.G.; Rangoni, C.; Mattivi, F.; Nicolini, G.; Palmonari, R.; The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food Research International*. 1996,29:3-4, 241-248.
- 4 Robards, K.; Prenzler, P.D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W.; Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 1999, 66, 401-436.
- 5 Bradshaw, M.P.; Scollary, G.R.; Prenzles, P.D.; Examination of the sulphur dioxide-ascorbic acid anti-oxidant system in a model white wine matrix. *J. Sci. Food Agric*. 2004, 84, 318-324.
- 6 Cheynier, V.; Masson, G.; Rigaud, J.; Moutounet, M.; Estimation of must oxidation during pressing in champagne. *Am. J. Enol. Vitic*. 1993, 44, 393-399.
- 7 Recamales, A.F.; Sayago, A.; González-Miret, M.L.; Hernanz, D.; The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Research International*. 2006, 39, 220-229.
- 8 Fabios, M.; Lopéz-Toledano, A.; Mayen, M.; Merida, J.; Medina, M.; Phenolic compounds and browning in sherry wines subjected to oxidative and biological aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48, 2155-2159.
- 9 Palma, M.; García-Barroso, C.; Application of a new analytical method to determine the susceptibility of wine to browning. *Eur. Food Res. Technol*. 2002, 214, 441-443.
- 10 Sioumis, N.; Kallithraka, S.; Tsoursouras, E.; Makris, D.P.; Kefalas, P.; Browning development in white wines: dependence on compositional parameters and impact on antioxidant characteristics. *Eur. Food Res. Technol*. 2005, 220, 326-330.
- 11 Sioumis, N.; Kallithraka, S.; Makris, D.P.; Kefalas, P.; Kinetics of browning onset in white wines: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food Chemistry*. 2006 94, 98-104.
- 12 Lopez-Toledano, A.; Mayen, M.; Merida, J.; Medina, M.; Yeast used to delay browning in white wines. *Food Chemistry*. 2006 97, 498-504.
- 13 Council Regulation (EC) No. 1493/1999 of 17 may 1999 on the common organization of the market in wine 1179/1-84.
- 14 Ibern-Gómez, M.; Andrés-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R.M.; Buxaderas, S.; Singleton, V.L.; de la Torre-Boronat, M.C.; Browning of Cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. *Am. J. Enol. Vitiv*. 2000, 51:1, 29-36.
- 15 Pozo-Bayón, M.A.; Hernández, M.T.; Martín-Álvarez, P.J.; Polo, M.C.; Study of low molecular weight phenolic compounds during the ageing of sparkling wines manufactured with red and white grapes varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51, 2089-2095.

Resultats i Discussió

- 16 Chamkha, M.; Cathala, B.; Cheynier, V.; Douillard, R.; Phenolic composition of champagnes from chardonnay and pinot noir vintages. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3179-3184.
- 17 Howe, P.; Sparkling wines. In *Fermented Beverage Production*, Second edition; Lea, A., Piggott, J.; Kluwer academic/plenum Publishers: New York, New York, 2003, 423
- 18 Robbins, J.R.; Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2866-2887.
- 19 Antolovich, M.; Bedgood, D.R.; Bishop, A.G.; Jardine, D.; Prenzler, P.D; Robards, K.; LC-MS Investigation of oxidation products of phenolic antioxidants. *J. Agric, Food Chem.* 2004, 52, 962-971.
- 20 Boletín Oficial del Estado (B.O.E.) of 20 november 1991. Reglamento de la Denominación "Cava" y de su consejo regulador. Orden of 14 november BOE nº 189278:37587-93.
- 21 Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V.; Escudero, A.; Cacho, J.; Role of hydroxycinnamic acids and flavanols in the oxidation and browning of white wines. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4937-4944,.
- 22 Lopez-Toledano, A.; Villaño-Valencia, D.; Mayen, M.; Merida, J.; Medina, M.; Interaction of yeast with the products resulting from the condensation reaction between (+)-catechin and acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 2376-2381.
- 23 Benítez, P.; Castro, R.; García-Barroso, C.; Changes in the polyphenolic and volatile contents of "fino" sherry wine exposed to ultraviolet and visible radiation during storage. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6482-6487.
- 24 Cheynier, V.F.; Van Hulst, M.V.J.; Oxidation of *trans*-caftaric acid and 2-S-glutathionylcaftaric acid in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* 1988, 36.10-15.
- 25 Bassil, D.; Makris, D.P.; Kefalas, P.; Oxidation of caffeic acid in the presence of L-cysteine: isolation od 2-S-cysteinylcaffeic acid and evaluation of its antioxidant properties. *Food Research International.* 2005, 38, 395-402.

FIGURE LEGEND

Figure 1. Schematic representation of sampling.

Figure 2. HPLC Chromatograms of Cava A after 7 weeks of storage under CO₂ atmosphere, at 280nm and 320nm. Each identified peak is labeled with the name listed on table 1.

Figure 3. Spectra of unidentified compounds named as F1 to F11.

Figure 4. Plot of variables (factor score > 0.7) extracted after factor analysis of final product (in bold) and aged surlie samples under oxidative and not oxidative conditions for Cava A (figure 4a) and Cava B (figure 4b)

Figure 5. Evolution SGC along the accelerated ageing test.

Figure 6. Reconstructed LC/ESI-MS chromatogram and LC/ESI-MS spectrum of F3 and F4 compounds from cava samples and standards of gallic, coumaric, caffeic and ferulic acids

Figure 1.

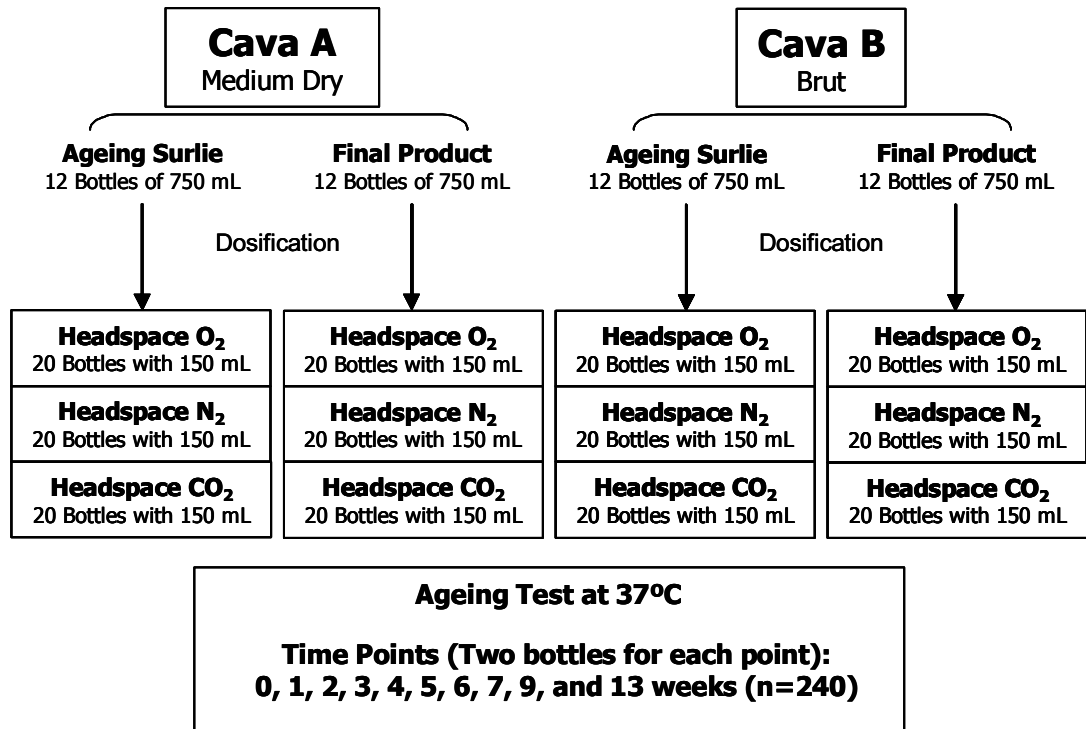


Figure 2.

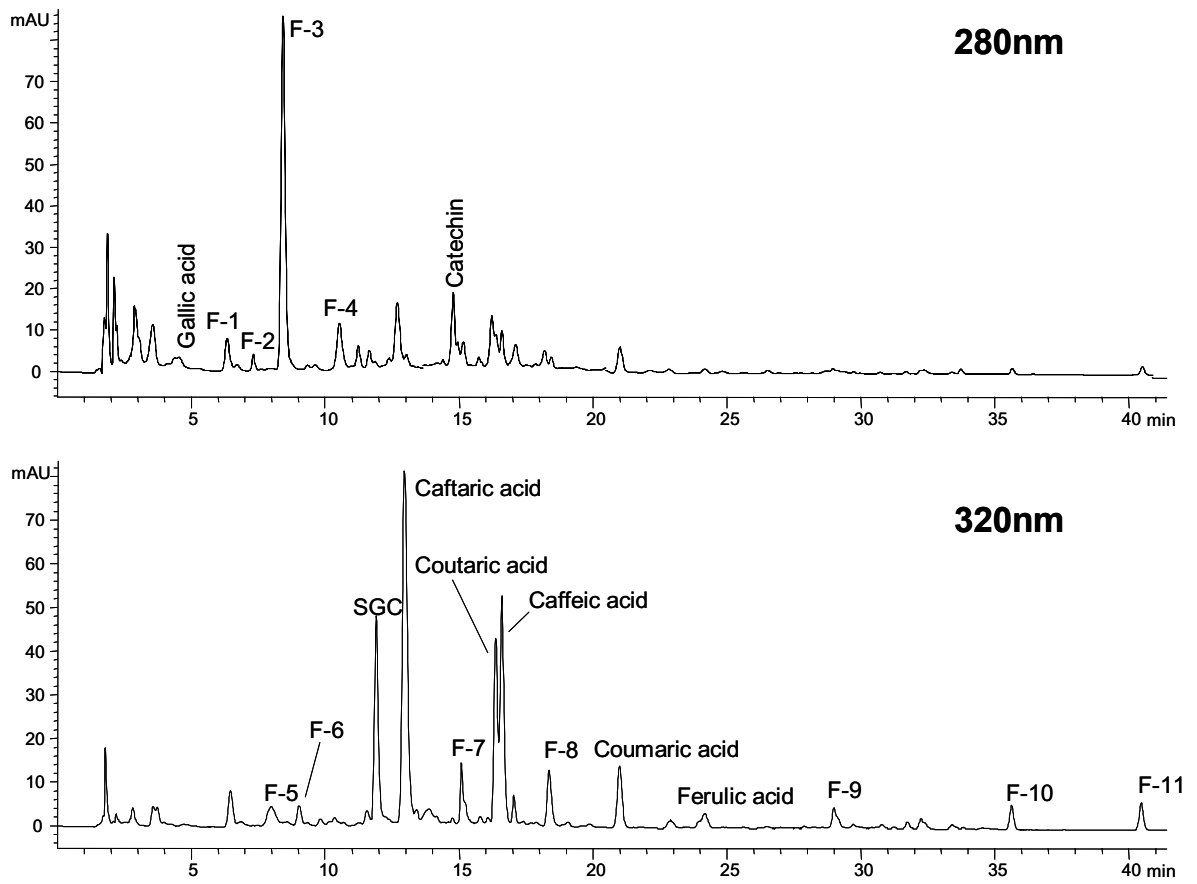


Figure 3.

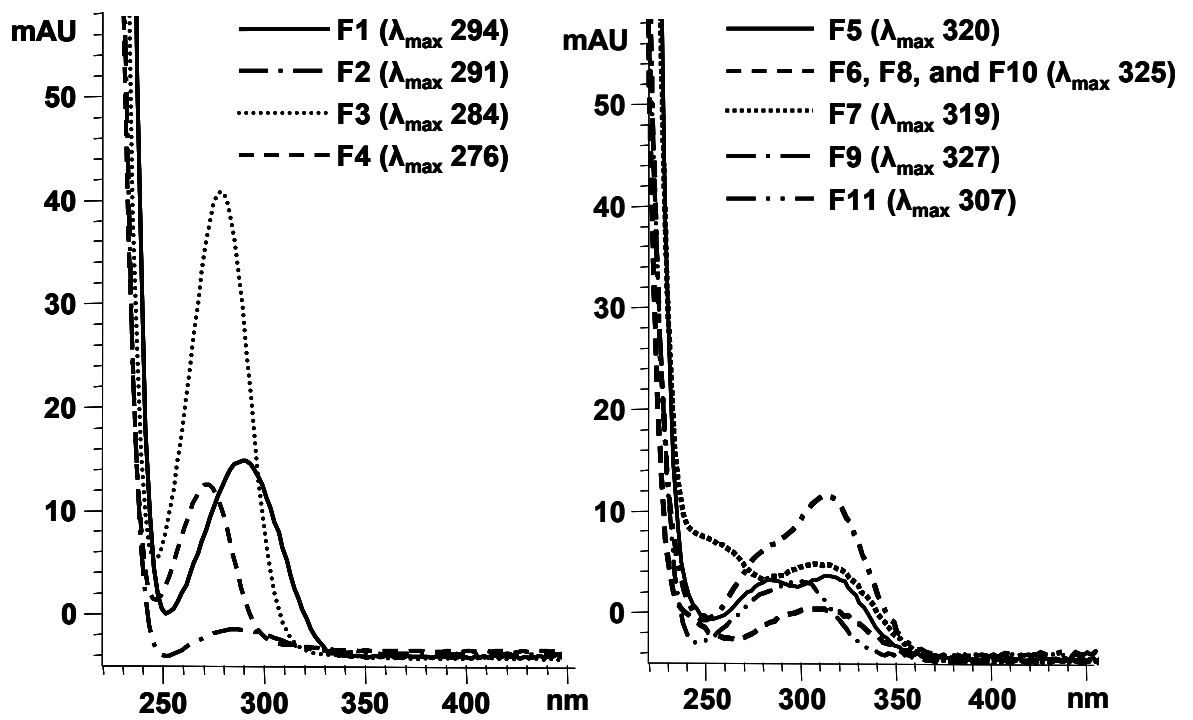


Figure 4a.

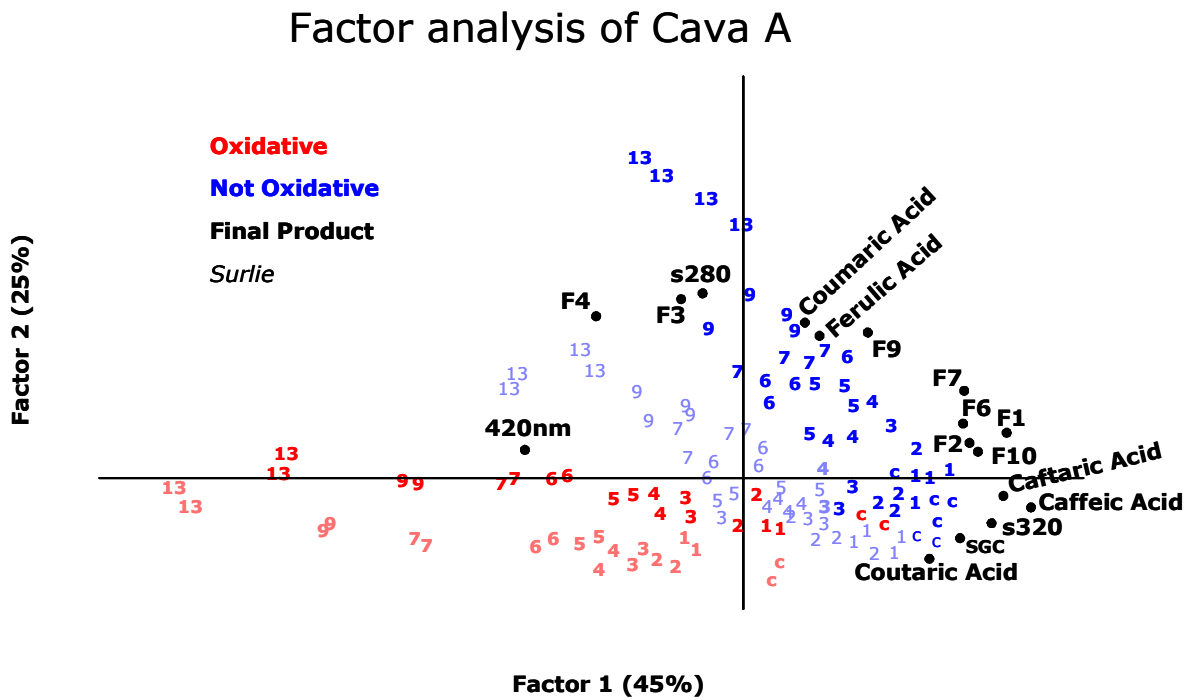


Figure 4b.

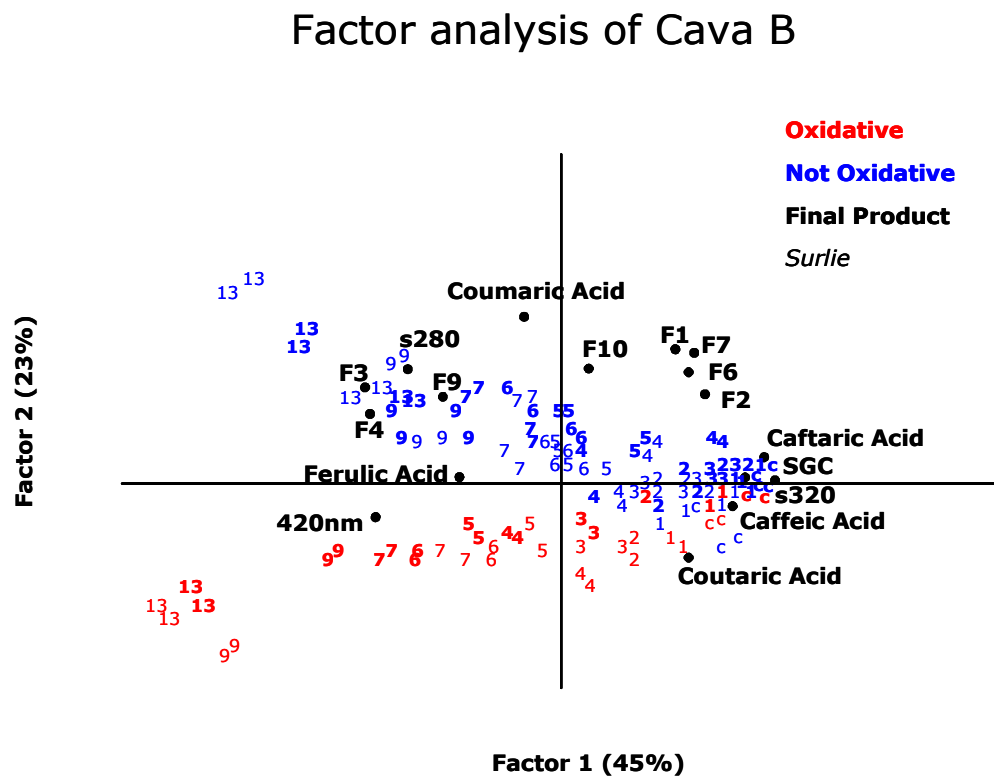


Figure 5.

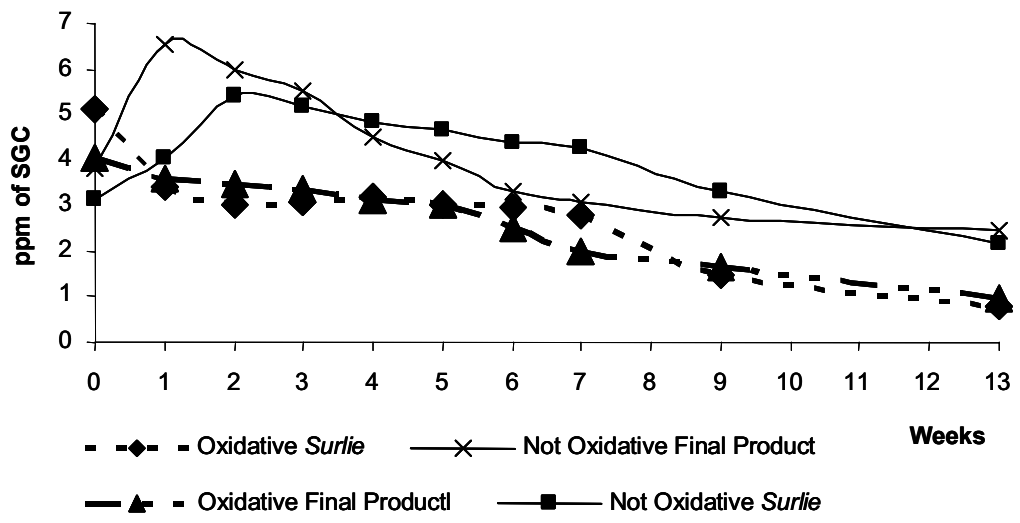
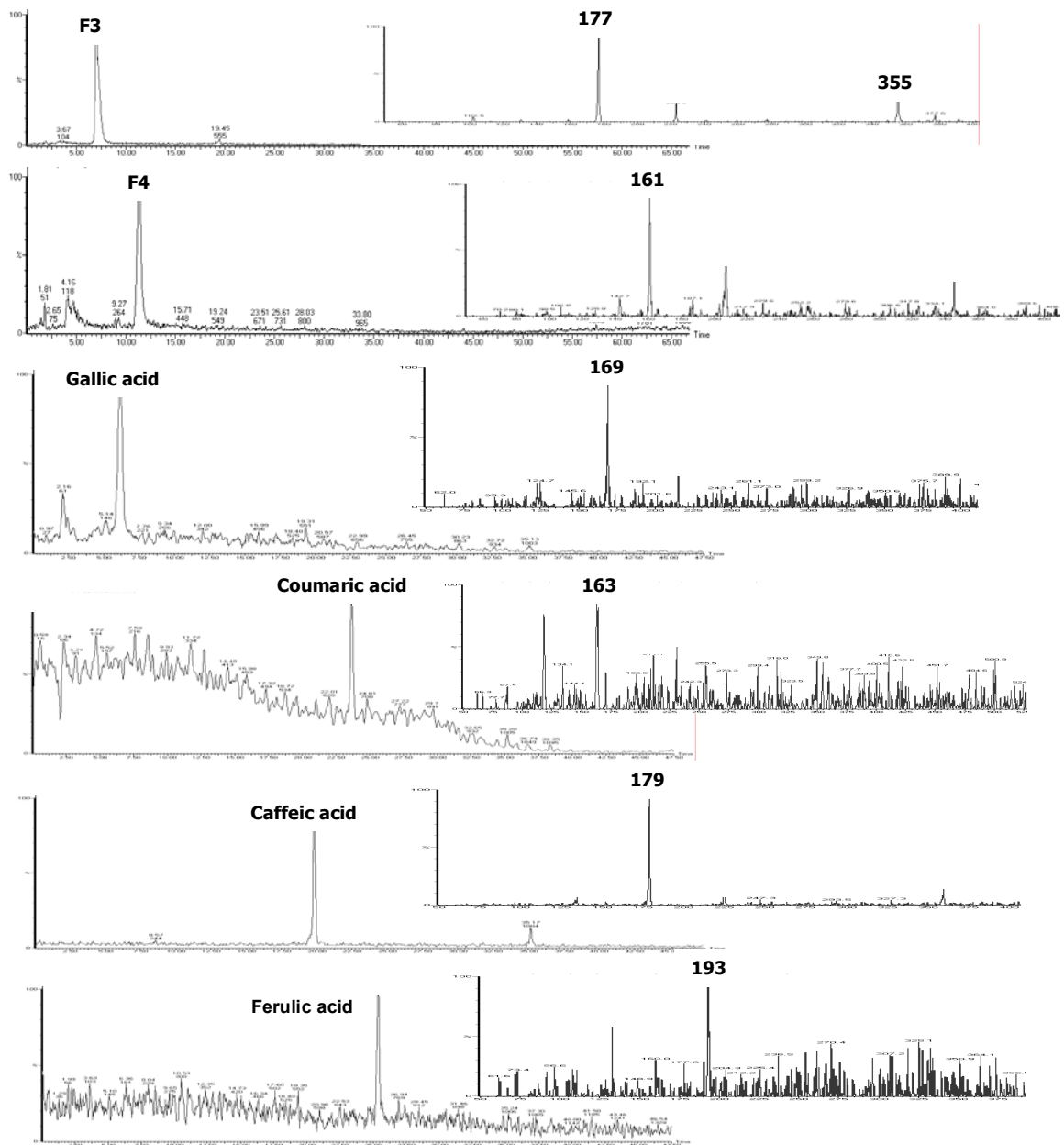


Figure 6.



Resultats i Discussió

Table 1: Table of means (mg/L \pm standard derivation) of quantitative variables along the ageing test under oxidative (n=2) and not oxidative conditions (n=4) for *surlie* and final product of cava A.

Compounds	Conditions	<i>Surlie</i>				Final Product			
		Control	3 weeks	6 weeks	13 weeks	Control	3 weeks	6 weeks	13 weeks
Abs. 420nm (x1000)	Oxidative	83 (4)	98 (1)	137 (15)	192 (4)	67 (3)	91 (6)	125 (1)	228 (17)
	Not Oxidative		103 (6)	116 (8)	187 (16)		74 (4)	77 (12)	134 (10)
Abs. 280nm (x1000)	Oxidative	632 (5)	612 (1)	620 (3)	645 (5)	582 (3)	590 (4)	605 (5)	643 (4)
	Not Oxidative		615 (2)	631 (1)	689 (3)		594 (2)	619 (6)	733 (9)
s320	Oxidative	27 (1)	24 (0,1)	23 (0,1)	15 (0,1)	29 (1)	25 (0,1)	23 (0,2)	17 (0,1)
	Not Oxidative		27,7 (1)	25,9 (1)	20,7 (2)		28,8 (0,5)	26,0 (1)	24,0 (1)
s280	Oxidative	21 (8)	16 (0,1)	18 (0,1)	24 (0,1)	18 (1)	21 (0,1)	25 (0,3)	36 (0,1)
	Not Oxidative		18 (1)	21 (2)	32 (2)		22 (3)	31 (3)	72 (4)
Coumaric acid	Oxidative	1,4 (0,1)	1,3 (0,1)	1,3 (0,1)	1,4 (0,1)	1,5 (0,1)	1,4 (0,1)	1,4 (0,1)	1,4 (0,1)
	Not Oxidative		1,4 (0,1)	1,5 (0,1)	1,7 (0,1)		1,5 (0,1)	1,6 (0,1)	1,7 (0,2)
Ferulic acid	Oxidative	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,7 (0,1)	0,7 (0,1)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)
	Not Oxidative		0,6 (0,5)	0,6 (0,1)	0,7 (0,1)		0,8 (0,1)	0,9 (0,1)	1,0 (0,1)
Caffeic acid	Oxidative	1,7 (0,1)	1,4 (0,1)	1,4 (0,1)	0,6 (0,1)	1,9 (0,2)	1,7 (0,1)	1,4 (0,1)	1,3 (0,1)
	Not Oxidative		1,7 (0,1)	1,5 (0,2)	1,3 (0,2)		1,6 (0,1)	1,6 (0,1)	1,5 (0,2)
Caftaric acid	Oxidative	9,7 (0,3)	9,2 (0,1)	8,6 (0,1)	4,7 (0,1)	10,1 (0,4)	9,2 (0,1)	8,6 (0,1)	5,5 (0,1)
	Not Oxidative		9,3 (0,5)	9,3 (0,2)	7,7 (1,2)		9,7 (0,4)	9,4 (0,5)	8,7 (0,2)
Coutaric acid	Oxidative	5,3 (0,1)	4,8 (0,1)	4,2 (0,1)	3,5 (0,1)	5,3 (0,1)	4,4 (0,2)	4,3 (0,1)	4,2 (0,1)
	Not Oxidative		4,9 (0,3)	4,1 (0,3)	3,8 (0,6)		5,0 (0,1)	4,5 (0,5)	4,2 (0,9)
SGCa	Oxidative	3,8 (1,0)	3,1 (0,1)	3,0 (0,1)	0,8 (0,1)	3,9 (0,5)	3,3 (0,1)	2,5 (0,2)	1,0 (0,1)
	Not Oxidative		5,2 (0,4)	4,4 (0,2)	2,2 (0,4)		5,5 (0,7)	3,3 (0,5)	2,4 (0,5)
F-1	Oxidative	5,2 (0,2)	4,4 (0,1)	3,4 (0,1)	nd	5,7 (0,2)	4,7 (0,1)	4,0 (0,1)	nd
	Not Oxidative		5,1 (0,3)	5,0 (0,3)	4,7 (0,4)		5,4 (0,1)	5,6 (0,2)	5,5 (0,2)
F-2	Oxidative	1,8 (0,5)	nd	nd	nd	2,2 (0,1)	nd	nd	nd
	Not Oxidative		1,8 (0,1)	1,6 (0,1)	1,4 (0,1)		2,0 (0,1)	2,0 (0,3)	1,9 (0,3)
F-3	Oxidative	3,4 (0,2)	5,0 (0,1)	6,8 (0,1)	12,3 (0,1)	4,4 (0,1)	7,8 (0,1)	12,1 (0,1)	23,5 (0,1)
	Not Oxidative		5,1 (1,3)	7,6 (2,2)	15,1 (1,5)		8,5 (1,3)	16,9 (1,7)	53,5 (4,7)
F-4	Oxidative	2,8 (0,1)	3,1 (0,1)	4,3 (0,1)	7,4 (0,1)	2,8 (0,1)	4,2 (0,1)	5,7 (0,1)	8,0 (0,1)
	Not Oxidative		3,4 (0,2)	4,8 (0,3)	9,7 (1,1)		4,1 (0,5)	5,4 (0,8)	9,9 (0,7)
F-6	Oxidative	0,4 (0,2)	nd	nd	nd	0,6 (0,1)	nd	nd	nd
	Not Oxidative		0,4 (0,1)	0,3 (0,1)	0,2 (0,1)		0,5 (0,1)	0,5 (0,1)	0,4 (0,1)
F-7	Oxidative	0,7 (0,1)	0,7 (0,1)	0,7 (0,1)	0,3 (0,1)	0,8 (0,1)	0,7 (0,1)	0,5 (0,1)	0,2 (0,1)
	Not Oxidative		0,7 (0,1)	0,7 (0,1)	0,7 (0,1)		0,8 (0,1)	0,8 (0,1)	0,8 (0,1)
F-9	Oxidative	0,7 (0,1)	0,6 (0,1)	0,5 (0,1)	0,6 (0,1)	0,8 (0,1)	0,8 (0,1)	0,8 (0,1)	0,6 (0,1)
	Not Oxidative		0,7 (0,1)	0,8 (0,1)	0,8 (0,1)		0,8 (0,1)	0,9 (0,1)	0,9 (0,1)
F-10	Oxidative	0,7 (0,1)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,4 (0,1)	0,7 (0,1)	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,4 (0,1)
	Not Oxidative		0,7 (0,1)	0,7 (0,1)	0,6 (0,1)		0,7 (0,1)	0,7 (0,1)	0,7 (0,1)

aSGC: 2-S-glutathionylcaftaric acid; nd: Non Detected

Resultats i Discussió

Table 2: Relationships between quantitative variables (R scores and p levels) along the browning test under oxidative (n=20) and not oxidative (n=40) conditions for *surlie* and final product of cava A and cava B.

		Cava A				Cava B			
		Surlie		Final Product		Surlie		Final Product	
		R	p	R	p	R	p	R	p
Abs. 420nm vs. Weeks of ageing	Oxidative	0,93	<0,01	0,97	<0,01	0,80	<0,01	0,97	<0,01
	Not Oxidative	0,95	<0,01	0,90	<0,01	0,87	<0,01	0,87	<0,01
Abs. 420nm vs. s320	Oxidative	-0,89	<0,01	-0,95	<0,01	-0,87	<0,01	-0,90	<0,01
	Not Oxidative	-0,83	<0,01	-0,72	<0,01	-0,67	<0,01	-0,80	<0,01
Abs. 420nm vs. Caftaric acid	Oxidative	-0,86	<0,01	-0,93	<0,01	-0,89	<0,01	-0,96	<0,01
	Not Oxidative	-0,74	<0,01	-0,49	<0,01	-0,74	<0,01	-0,78	<0,01
Abs. 420nm vs. Caffeic acid	Oxidative	-0,86	<0,01	-0,88	<0,01	-0,78	<0,01	-0,72	<0,01
	Not Oxidative	-0,63	<0,01	-0,42	<0,01	-0,65	<0,01	-0,60	<0,01
Abs. 420nm vs. SGC	Oxidative	-0,80	<0,01	-0,97	<0,01	-0,77	<0,01	-0,80	<0,01
	Not Oxidative	-0,58	<0,01	-0,68	<0,01	-0,67	<0,01	-0,79	<0,01
Abs. 420nm vs. Coumaric acid	Oxidative	-0,88	<0,01	-0,67	<0,01	-0,83	<0,01	-	-
	Not Oxidative	-0,82	<0,01	-0,43	<0,01	-0,80	<0,01	-0,50	<0,01
Abs. 420nm vs. F3	Oxidative	0,90	<0,01	0,99	<0,01	0,84	<0,01	0,95	<0,01
	Not Oxidative	0,94	<0,01	0,92	<0,01	0,89	<0,01	0,85	<0,01
Abs. 420nm vs. F4	Oxidative	0,90	<0,01	0,95	<0,01	0,94	<0,01	0,93	<0,01
	Not Oxidative	0,97	<0,01	0,94	<0,01	0,91	<0,01	0,85	<0,01
s280 vs. F3	Oxidative	0,99	<0,01	0,99	<0,01	0,98	<0,01	0,99	<0,01
	Not Oxidative	0,99	<0,01	0,99	<0,01	0,99	<0,01	0,99	<0,01
s280 vs. F4	Oxidative	0,99	<0,01	0,95	<0,01	0,93	<0,01	0,94	<0,01
	Not Oxidative	0,98	<0,01	0,96	<0,01	0,96	<0,01	0,98	<0,01

4.2.2 Aplicació de l'espectrometria de masses per l'elucidació estructural d'un marcador de cria de vi escumós "Cava"

J. Bosch-Fuste, C. Flores, E. López-Tamames, S. Buxaderas, J. Rivera, J. Caixach. Mass spectrometry approach to elucidate a marker of ageing for sparkling wine (Cava). J. Chromatogr. A. En fase de revisió.

Resum

En l'estudi de l'evolució dels compostos fenòlics en caves, en fase de rima i caves comercials, sotmesos a un envelliment accelerat es va detectar dos compostos no identificats que augmentaven de forma continuada mostrant-se coma possibles indicadors no volàtils de la qualitat. Un d'aquests compostos, F3, esdevenia el pic majoritari del cromatograma a 280 nm. L'objectiu del present article ha estat identificar l'estructura química i poder determinar el seu origen en el vi.

Per efectuar la caracterització química s'han aplicat diferents tècniques d'elucidació estructural, emprant mostres comercials de cava semi-sec envellit durant 13 setmanes a 37°C. El compost aïllat cromatogràficament i liofilitzat es va analitzar mitjançant la cromatografia líquida d'alta eficàcia acoblada amb un detector de masses (HPLC-MS) per tal d'obtenir el seu pes molecular. Posteriorment, es va analitzar mitjançant un detector de masses amb un triple quadrupol (MS-MS), obtenint així l'espectre de fragmentació. S'ha pogut determinar que la massa de l'ió del compost F3 és de 177.04 m/z, sent la fórmula molecular més probable $C_6H_{10}O_6$.

Per tal d'aprofundir més en el coneixement del compost desconegut amb fórmula molecular $C_6H_{10}O_6$ es va analitzar l'extracte liofilitzat mitjançant un detector de masses "time of flight" (Q-TOF) per obtenir la massa exacte del

producte i l'espectre de fragmentació. Resultat d'aquest anàlisi s'ha determinat que la massa exacte de l'ió molecular és de 177,0398 m/z. A més a més, al presentar un valor de DBE (*Double bond equivalent*) de 2 l'estructura no pot tenir cap anell aromàtic (ja que tindria un valor mínim de DBE de 4). Per assignació de les pèrdues observades dels ions de fragmentació amb valors de massa exacte es pot dir que el compost F3 no és cap estructura fenòlica ni cap furfural descrit a la bibliografia. Tanmateix, es creu que el compost pot tenir un nucli furànic polihidroxilat format per degradació de sucres. En aquest sentit, s'ha comprovat que aquest compost es forma en solucions de sucres en aigua a 55°C, sent el monosacàrid fructosa el substrat on es forma en major quantitat.

Resultats concrets:

- S'ha determinat la massa exacte (178,0398), la fórmula molecular ($C_6H_{10}O_6$) i el patró de fragmentació del compost F3
- S'ha establert que el possible origen del compost F3 es troba en els sucres dels caves.

MASS SPECTROMETRY APPROACH TO ELUCIDATE A MARKER OF AGEING FOR SPARKLING WINE (CAVA)

Joan Bosch-Fusté¹, Cintia Flores^{2*}, Elvira López-Tamames¹, Susana Buxaderas¹, Josep Rivera² and Josep Caixach²

¹Departament de Nutrició i Bromatologia. Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA). Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n., 08028 Barcelona, Spain

²Laboratori d'Espectrometria de Masses. Departament d'Ecotecnologies. IIQAB-CSIC. C/ Jordi Girona 18, 08034 11 Barcelona (Spain)

* Corresponding author e-mail: cfreco@iiqab.csic.es

Abstract:

During the storage of sparkling wine a compound with a λ_{\max} of 284 nm gives the major peak in the HPLC-DAD chromatogram at 280 nm (70% of total area). We used liquid chromatography coupled to negative electrospray ionization mass spectrometry with a triple quadrupole and time-of-flight analyzer to elucidate the structure of this compound. The electrospray ionization-mass spectrometry analysis showed two main ions at 177 and 355 m/z. The MS/MS spectrum of the 177 m/z ion ($C_6H_9O_6$) showed several ions from losses of H_2O , CO_2 and $CH_2=CH_2$ groups. The time-of-flight analyzer determined an accurate mass of 177.0398. Analysis of the derivatized compound by gas chromatography coupled to mass spectrometry was also performed.

Keywords: LC/MS, MS/MS, TOF, Accurate mass, GC/MS, Sparkling wine.

1 Introduction

Over 222 million bottles of sparkling wine (Cava) were produced in Spain each year, of which more than 58 % were exported. Cava is produced by the second fermentation of a blend of white wines, followed by biological ageing in contact with lees in a closed bottle at 6 atmospheres of CO_2 . For premium sparkling wines, the ageing period is between nine months and several years. Although sulphite is added to wine as an anti-oxidant, during storage in a cellar (biological ageing) and/or during distribution, several reactions that involve phenols and sugars lead to wine browning. A number of these reactions may produce compounds of interest to wineries as quality markers. In cava samples subjected to a browning test in our laboratory, we detected various unidentified compounds [1]. One, with a λ_{\max} of 284 nm, increased markedly along the test. In the studies of M. Mayén et al. [2], P. Benítez et al. [3], and M.A. Pozo-Bayón et al. [4], about phenolic compounds in wine related to ageing, similar compound was detected. The formation of this compound was related to an increased of browning.

The identification of new compounds formed during wine elaboration and storage is difficult. However, data about the molecular structure of these compounds could contribute to our understanding of the formation mechanism and to the identification of precursors. Hyphenated techniques (Liquid or Gas chromatography coupled to Mass spectrometry) are suitable to identify new compounds formed during wine storage. The most common techniques are liquid chromatography-mass spectrometry (LC/ESI-MS) [5, 6, 7, and 8] and tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) [9, 10, and 11]. Triple quadrupole instruments have been widely used for the study of fragmentation pathways in the characterization of analytes with unequivocal assignment of mass fragments. In recent years, a new tool has become available, time-of-flight mass spectrometry (TOFMS), with high selectivity, resolutions of $\sim 10\,000$ without loss of sensitivity, and high mass accuracy. These techniques are particularly useful for the assignment of elemental composition [12, 13, and 14].

In the current work, we applied LC/ESI-MS, ESI-MS/MS, and TOFMS to elucidate the structure of an unknown compound formed during the biological ageing of cava.

2 Experimental

2.1 Reagents and chemicals: Commercial standards of phenolic compounds (Gallic, coumaric, caffeic, ferulic, and (+) catechin) and sugars glucose, fructose, sucrose and mannose were purchased from Sigma (St. Louis, Missouri). Esculetin was obtained from Extrasynthese (Genay Cedex, France).

2.2 Samples: Commercial cava subjected to an accelerated browning at 37°C under CO₂ atmosphere for 7 weeks was analyzed.

2.3 Sugar Solutions: Glucose, fructose, sacarose and manose sugar solutions in water were prepared at the same concentration of commercial cavas (35 g /L) and stored during 1 month under 50°C.

2.4 Freeze Dry System: Isolated fractions containing the unknown compound (F3) were collected from HPLC-DAD between 8.2 and 8.8 minutes in 10 mL amber vial. Five mL of isolated fractions were dried using a Freeze Dry System Freezone 4.5 lyophilizer (Labconco Corp., Kansas).

2.5 HPLC-DAD analysis

Two millilitres of sample were filtered through a Waters (Milford MA-USA) 13-mm PTFE filter (0.45 µm pore size). Twenty µL were injected into a reversed-phase Phenomenex Luna C18 high-purity silica column (150mm × 4.6mm, 5µm, Torrance, CA, USA) equipped with a Phenomenex C18 ODS guard column (4mm × 3.0mm) at 40°C. A Hewlett-Packard 1050 gradient liquid chromatograph coupled to a DAD 1050M detector was used. Solvent A was double-distilled water with acetic acid 2% (Panreac, Montcada i Reixac, Spain) and solvent B was acetonitrile:double-distilled water 80:20 (v/v) (SDS, Peypin, France) with acetic acid 2%. Linear gradient conditions were as follows: 0' - 0 % B, 12' - 16.5% B, 20' - 16.5% B, 58' - 80% B, 60' - 0% B at a flow rate of 1 mL/min. Chemstation Rev. Asterix 05.02 (Hewlett Packard – Waldbronn – Germany) was used for data acquisition and analysis. Peaks were identified using the standards and bibliographic spectra (Figure 1).

2.6 Liquid chromatography / mass spectrometry analysis

A PE Sciex API 3000 instrument (Perkin-Elmer Sciex, Concord, ON, Canada) equipped with a triple quadrupole mass analyzer (QqQMS) and a TurboIonspray source was used in negative mode for MS/MS fragmentation of the ion 177 m/z from esculetin and isolated fractions of F3. The working conditions were as follows: ion spray voltage, -2500 V; declustering potential, -20 V; focusing potential, -200 V; entrance potential, -10 V; nebulizer and curtain gases (N₂), 6 and 6 arbitrary units (a.u.), respectively. For the HPLC analysis drying gas (N₂) heated to 100°C was introduced at a flow-rate of 6000 cm³min⁻¹. QqQMS data were processed using Analyst software 1.4.1. version.

2.6.1 LC/ESI-MS analysis: The mobile phase pumping system was a Perkin-Elmer (Toronto, Canada) 200 series quaternary pump equipped with an autosampler. A reversed-phase Phenomenex Luna C18 high-purity silica column (150mm × 2.0mm, 5µm) was used. Solvent A was double-distilled water:acetonitrile 95:5 (v/v) with formic acid 0.08% (Panreac, Montcada i Reixac, Spain) and solvent B was acetonitrile:double-distilled water 95:5 (v/v) with formic acid 0.08%. Linear gradient conditions were as follows: 0'- 0 % B, 2'- 0 % B, 12' - 15% B, 20'- 15% B, 40'- 80% B, 45'- 0% B at flow of 200 µL/min. Mass spectra were obtained in full scan mode over the mass range 50-700 m/z in profile mode at cycle time of 2 s with a step size of 0.1 u and an interscan of 2 ms.

2.6.2 ESI-MS/MS analysis: Direct infusion of isolated fractions of F3 and esculetin standard solution (1ng/µL) was performed to identify F3 by comparing the two MS/MS spectra. Infusion mass experiments were carried out using a Harvard 11 syringe driver (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) with a Hamilton 250 µL syringe (Supelco, Poole, U.K.) at a constant flow-rate of 5 µL/min. MS/MS product ions were produced by collision-activated dissociation (CAD) of selected precursor ions in the collision cell of the QqQMS spectrometer and mass was analyzed using the third quadrupole of the instrument. Additional experimental conditions for MS/MS included collision energy, CAD gas (N₂) at 4 a.u., and scan range were necessary for the precursor selected. The collision energy ranged from -15 to -50 V. The precursor ion selected, for esculetin and isolated fractions of F3, was 177 m/z. MS/MS spectra were obtained in full scan mode over the mass range 50-200 m/z in profile mode at cycle time of 1 s with a step size of 0.1 u and an interscan of 2 ms.

2.7 Accurate mass measurements by ESI-TOFMS

A hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer with an orthogonal Z-spray electrospray interface (Micromass, Manchester, UK) was used to determine the accurate mass of the deprotonated F3 compound from isolated fractions. Nitrogen was used as drying (at flow 700-800 L/h) and nebulizing gas (at flow 15 L/h). A cone voltage of 25 V and a capillary voltage of 3500 V were used in negative ionization mode. The nitrogen desolvation temperature was set to 350°C and the source temperature to 120°C. TOFMS resolution was approximately 5000 (fwhm). MS spectra were acquired over a range of 60-600 m/z. Dwell times of 1 s/spectrum were chosen. A suitable MS profile was used. Full scan TOF experiments were carried out with this instrument using the first quadrupole as rf-guide only. Data station operating software was MassLynx 4.0 version. Data processing was performed as described by M. Ibañez et al. [12]. Mass calibration was performed daily using the model 11 single syringe pump (Harvard Instruments, Holliston, MA, USA) directly connected to the interface. Calibration was conducted from 60-600 m/z with a 1:1 mixture of 0.1M NaOH and 10% of formic acid, this mixture was diluted (1:25) with acetonitrile/water (80:20), at a flow rate of 20 µL/min.

A solution of 3,5-diiodo-L-tyrosine (Sigma, St. Louis, MO, USA) in methanol (Panreac, Montcada i Reixac, Spain) at 1 µg/mL was used as lock mass. This solution was post-column introduced

(at a flow rate of 100 $\mu\text{L}/\text{min}$) using a 2150 isocratic HPLC pump (LKB, Bromma, Sweden) by means of a PEEK T-union.

2.8 Silyl derivative: Derivatization of the F3 compound was required for the gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis. Isolated fraction of F3 was spiked with 50 μL of pyridine (Sigma, St. Louis, Missouri) and 100 μL of BSA ([N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide]) - TMCS (trimethylchlorosilane) - TMSI (N-trimethylsilylimidazole) (3:2:3) (Supelco, Bellefonte, USA) and maintained during 1h at 25°C.

2.9 GC/MS analysis: The separation and identification of 0.5 μL aliquot of silyl derivative was carried out by GC/MS using a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) 5890A Series II chromatograph coupled to a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) 5971A mass spectrometer. A SPB-1TM capillary column (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with fused silica stationary phase (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm) was used. The chromatographic conditions followed were as described by S. Francioli et al. [15]. The mass spectrometer parameters were: a mass range of 15-500 m/z, with a cycle time of 2 s, ionization energy of 70 eV, and interface temperature 280°C. Data station operating software was Enhanced Chemstation v. D.00.01.27 (Agilent Technologies) equipped with and electronic library (Wiley 139).

3 Results and Discussion

Figure 1 shows the HPLC-DAD chromatogram (Figure 1A) obtained at 280nm for cava samples and UV-Vis spectra of F3 (Figure 1B). Gallic, protocatechuic, caftaric, coutaric, caffeic, coumaric, and ferulic acids, s-glutathionylcaftaric (SGC), and catechin phenolic compounds were identified using commercial standards and bibliographic spectra. The unidentified compound F3 is of special interest because it represents around 70% of total area at 280 nm and could be a suitable marker of ageing for sparkling wines. To identify F3, we analyzed the cava samples by LC/ESI-MS. The unidentified compound F3 was also the major peak in LC/ESI-MS chromatogram (Figure 2A). The LC/ESI-MS spectrum of F3 showed two main ions at 177 and 355 m/z (Figure 2B). The latter ($[2\text{M}-\text{H}]^-$) could be a dimeric form of the former ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

Pérez-Magariño et al. [16] found that esculetin has two major ions, one at 177 m/z and the other at 133 m/z. Thus, we used LC/ESI-MS/MS to analyze a commercial standard of esculetin and isolated fractions of F3 in order to establish if esculetin corresponds to F3 compound. The fragmentation patterns of the two MS/MS spectra obtained for F3 (Figure 3A) and esculetin (Figure 3B) differed. The fragmentation of deprotonated esculetin ion ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 177 m/z) produced three major fragments (133, 105, and 89 m/z) and the first product ion observed was a $[\text{M}-\text{H}-44]^-$ corresponding to loss of CO_2 or $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$. In contrast, the product ion spectrum generated for the F3 ion ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 177 m/z) gave three major fragments (159, 103 and 59 m/z) and the first ion product (159 m/z) corresponds to a loss of a molecule of H_2O (18 m/z). For high sensitivity quantitation the transition from precursor to predominant ion product was chosen. The esculetin transition precursor \rightarrow predominant ion product was 177 \rightarrow 89 m/z and

the F3 ion was $177 \rightarrow 103$ m/z. Moreover, no characteristic fragments of the phenolic acids were observed in the MS/MS spectrum of the 177 m/z ion of the F3 isolated fraction.

Accurate mass of the deprotonated F3 compound was 177.0398 m/z. Within the fixed limits and using a library search, we propose several molecular formulas for this compound, Table 1 shown the most probable formulas. Accurate mass measurements of compounds with low molecular weights are considered correct when the ppm error of the measure is less than 5 ppm. Therefore the molecular formulas with the least ppm error in mass measurements were $C_6H_9O_6$ and $C_5H_3N_7O$, which showed errors of -0.6 ppm. All analyses were made in negative electrospray ionization mode. Thus the $C_5H_3N_7O$ formula is not possible according to MS and MS/MS spectra of F3, because molecules with nitrogen atoms in their structure ionize in positive mode. Therefore the molecular formula proposed is $C_6H_9O_6$. Moreover, the DBE (double bond equivalent) calculated for $C_6H_9O_6$ was 2.5 (Table 1). On the basis of this observation, F3 is not a phenol structure because all phenols present a minimum DBE of 4. ESI-TOF product ion spectrum was showed in figure 5 with a proposal of the fragmentation pathways. The molecular ion of F3 compound (177.0398 m/z) has two main fragmentation pathways. The first one starts with a loss of water given a fragment of 159.0303 m/z followed by a loss of CO_2 or C_2H_4 producing the fragments 115.0394 m/z and 130.9977 m/z, respectively. This last ion product could have two new fragmentations given a loss of another molecule of water or given two losses, a CO_2 and CO. The second pathway shows a first loss of C_2H_4 and a molecule of HCOOH given an ion product with 103.0027 m/z followed by a loss of water.

To obtain further information about the structure of F3, we performed GC/MS analysis. The mass spectrum obtained after derivatization of the lyophilized F3 is shown in Figure 4. Using the electronic library of GC/MS, a molecule was proposed (Figure 4). Trimethylsilyl (TMS) groups were reacted with five hydroxyl groups of the F3 compound. These hydroxyls gave high polarity to this compound, so F3 elutes in the most polar region of HPLC-DAD chromatogram, between gallic and protocatechuic acids.

In order to found if F3 compound could be some sugar degradation product, solutions of glucose, fructose, sucrose and mannose were analyzed by HPLC-DAD after one month at $50^\circ C$. A compound with a λ_{max} of 284nm, like F3 compound, was detected in all sugar solutions (figure 6). However, its formation was bigger in fructose solution. HPLC-MS technique was used to confirm that the compound formed in all sugars solutions was F3 conditions has a molecular ion of 177 m/z. Due to this, F3 compound was a sugar degradation product which is according to the high polarity of this compound.

4 Conclusions

Here we used mass spectrometry techniques to elucidate the structure of a compound formed in sparkling wine (Cava) during ageing. On the basis of data obtained by LC/ESI-MS, ESI-

MS/MS, accurate mass measurement, and GC/MS, we propose that this compound that have a molecular formula $C_6H_{10}O_6$ was formed from sugar degradation.

Acknowledgements

We are grateful to Freixenet S.A. winery for providing samples. This study was made possible thanks to financial assistance from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Spain) AGL2005-03451, from Generalitat de Catalunya (Spain), Project 2005SGR-00156 and through a Grant from the Generalitat de Catalunya to the PhD student Joan Bosch-Fusté. The authors would like to thank O. Jáuregui and I. Casals from Serveis Científicotècnics-Universitat de Barcelona for the technical support as well as O. J. Pozo and F. Hernández from UJI (Castellón, Spain) for the accurate mass measurement.

References

- [1] J. Bosch-Fusté, E. Sartini, E. López-Tamames, S. Buxaderas, J. Agric. Food Chem. Submitted for publication.
- [2] M. Mayén, R. Barón, J. Mérida, M. Medina, Food Chemistry. 58:1-2 (1997) 89.
- [3] P. Benítez, R. Castro, C. García-Barroso, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 6482.
- [4] M.A. Pozo-Bayón, M.T. Hernández, P.J. Martín-Álvarez, M.C. Polo, J. Agric. Food Chem.. 51 (2003) 2089.
- [5] H. Fulcrand, S. Remy, J.M. Souquet, V. Cheyrier, M. Moutounet, J. Agric. Food Chem.. 47(3) (1999) 1023.
- [6] A. de Villiers, G. Vanhoenacker, P. Majek, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1054(1-2) (2004) 195.
- [7] E. Richling, C. Decker, D. Haring, M. Herderich, P. Schreier, J. Chromatogr. A 791(1 + 2) (1997) 71.
- [8] E.R. Troesken, N. Bittner, W. Voelkel, J. Chromatogr. A 1083(1-2) (2005) 113.
- [9] R. Flamini, Mass Spectrometry Reviews. 22(4) (2003) 218.
- [10] M. de Person, A. Sevestre, P. Chaimbault, L. Perrot, F. Duchiron, C. Elfakir, Analytica Chimica Acta. 520(1-2) (2004) 149.
- [11] M. Reinsch, A. Toepfer, A. Lehmann, I. Nehls, Analytical and Bioanalytical Chemistry. 381(8), (2005) 1592.
- [12] M. Ibáñez, J.V. Sancho, O.J. Pozo, W. Niessen, F. Hernández; Rapid Communications in Mass Spectrometry.19 (2005) 169.
- [13] E. de Rijke, B.J. Ruisch, N. Bouter, T. Koenig, Molecular Nutrition & Food Research 50(4-5) (2006) 351.
- [14] J. L. Gomez-Ariza, T. Garcia-Barrera, F. Lorenzo, Analytica Chimica Acta 570(1) (2006) 101.
- [15] S. Francioli, J. Torrens, M. Riu-Aumatell, E. Lopez-Tamames, S. Buxaderas, Am. J. Enol Vitic 54(3) (2003) 158.
- [16] S. Perez-Magarino; I. Revilla; M.L. Gonzalez-SanJose; S. Beltran, J. Chromatogr. A 847(1-2) (1999) 75.

Figure 1. A: HPLC-DAD chromatogram at 280nm of Cava after 7 weeks of storage under CO₂. **B:** Spectra of unidentified compound F3.

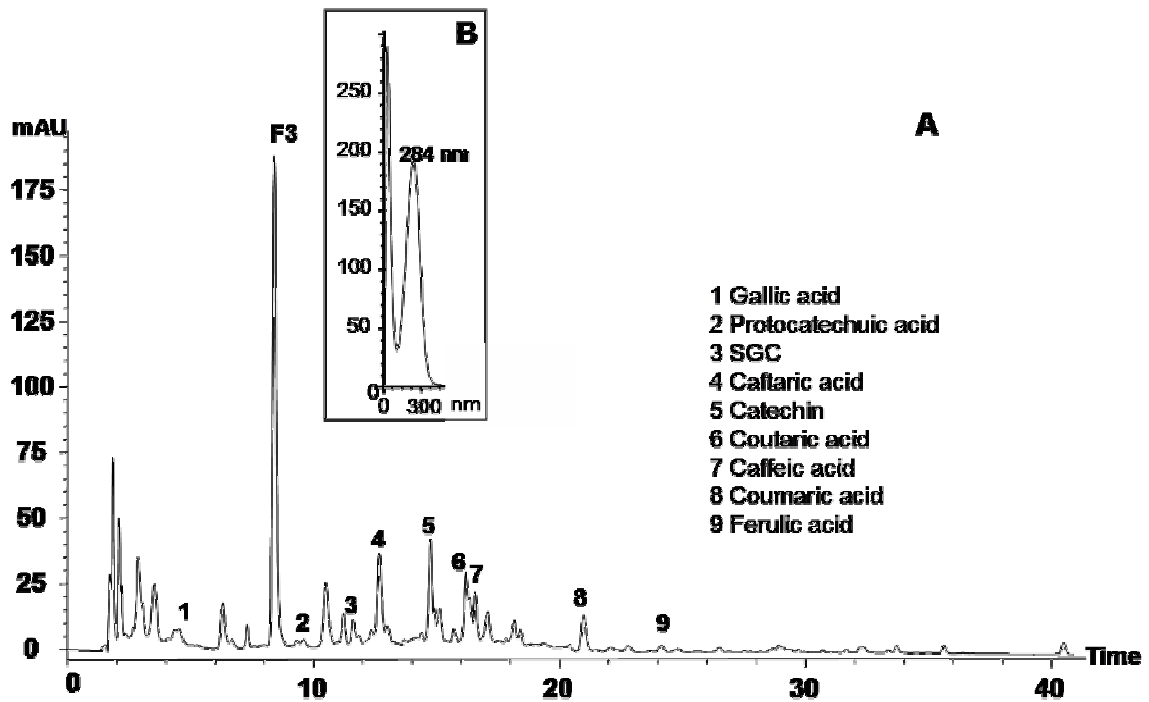


Figure 2. A: Reconstructed LC/ESI-MS chromatogram of ion at 177 m/z of cava sample. **B:** LC/ESI-MS spectrum of F3 compound.

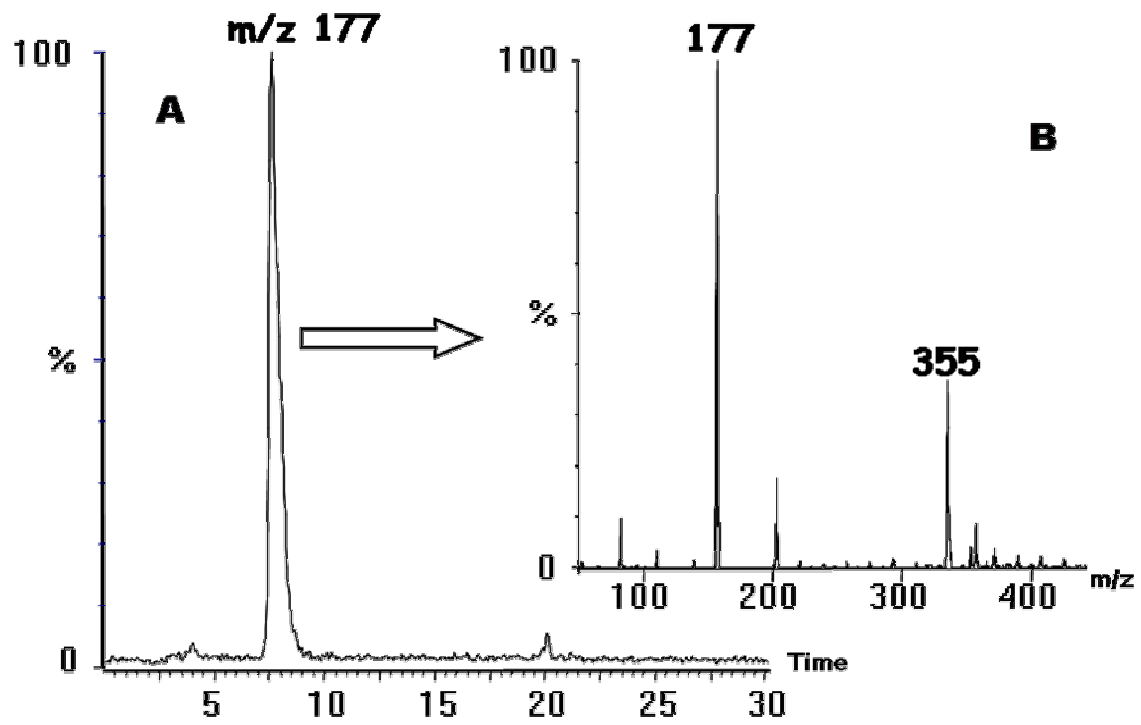


Figure 3.: LC/ESI-MS/MS product ion spectrum of the esculetin ($[M-H]^-$) (A) and F3 compound with 177 m/z (B).

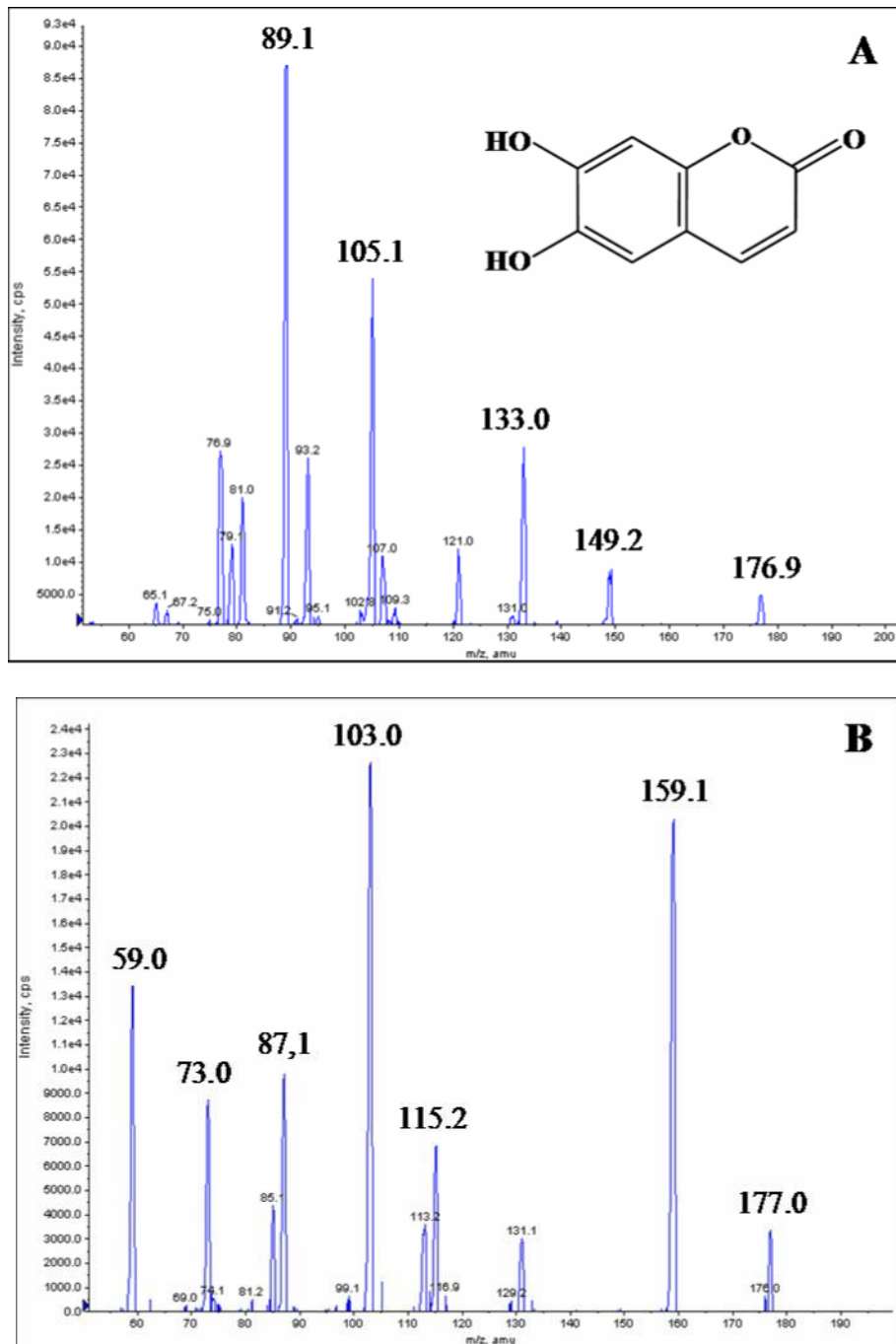


Figure 4. GC/MS spectrum of silyl derivative of lyophilized F3.

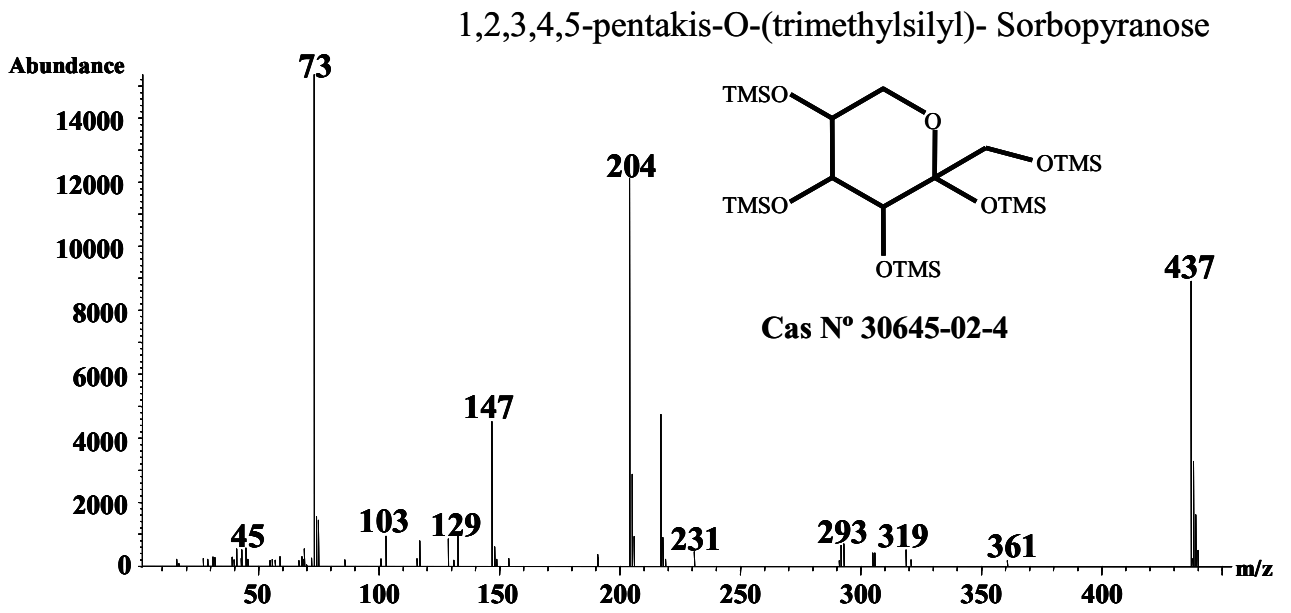


Figure 5. ESI-TOFMS product ion spectrum of F3 compound with accurate mass and tentatively fragmentation assignments.

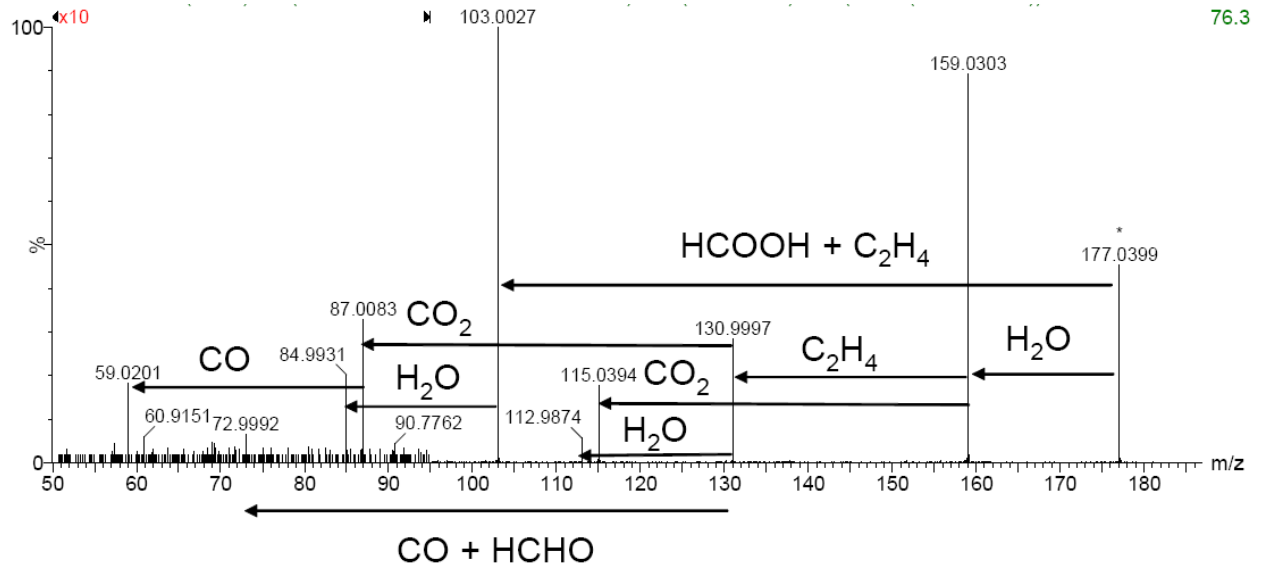


Figure 6. HPLC-DAD chromatograms obtained from sugars solutions.

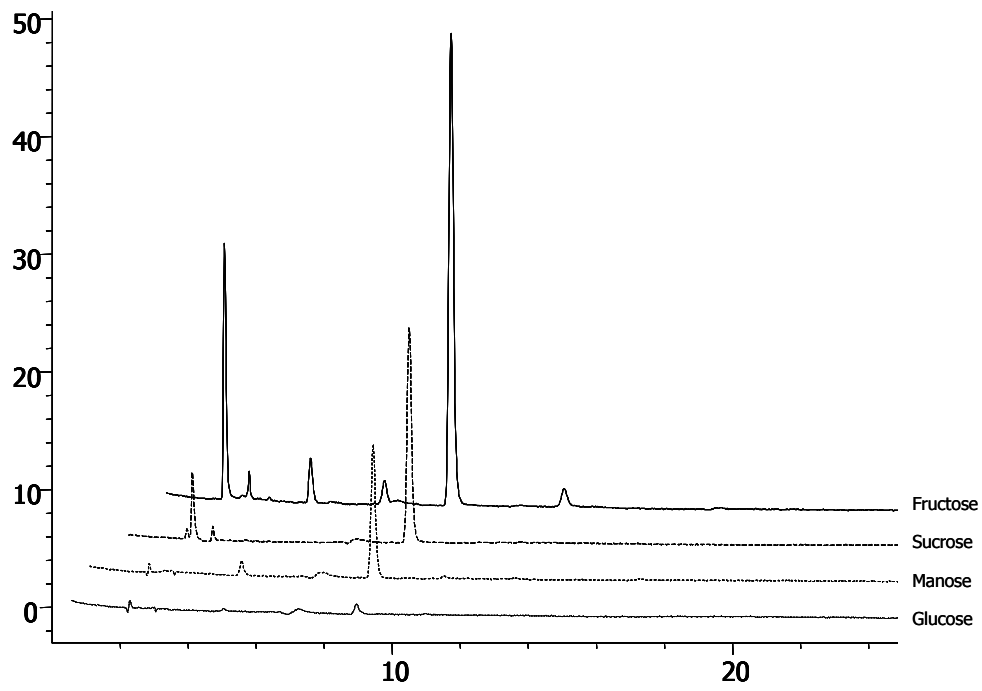


Table 1. Accurate mass and possible molecular formulas of the 177 m/z ion of isolated F3.

Mass	Calculated Mass	mDa	ppm	DBE	Formula
177.0398	177.0399	-0.1	-0.6	2.5	C ₆ H ₉ O ₆
	177.0399	-0.1	-0.6	8.0	C ₅ H ₃ N ₇ O
	177.0386	1.2	6.8	3.0	C ₄ H ₇ N ₃ O ₅
	177.0386	1.2	6.8	8.5	C ₃ HN ₁₀
	177.0413	-1.5	-8.5	7.5	C ₇ H ₅ N ₄ O ₂
	177.0372	2.6	14.7	3.5	C ₇ H ₅ N ₆ O ₄

Comentari dels resultats

V. Comentari dels resultats

S'ha caracteritzat el perfil volàtil i semi-volàtil dels caves durant la fase de rima o criança i dels caves comercials. La caracterització ha permès detectar la presència i augment de determinats compostos (vitispirà, TDN i succinat de dietil) que actuen com a marcadors. Mitjançant aquests compostos pot obtenir-se informació sobre l'evolució aromàtica dels caves. Tot i que aquests marcadors han demostrat la seva capacitat pels caves en fase de rima (apartat 4.1.3.1) i caves comercials (4.1.3.2), són millors marcadors de caves en fase de rima, ja que els seus increments semblen estar condicionats pels canvis bioquímics que es produeixen principalment en el vi quan està en contacte amb els llevats de la segona fermentació. Tanmateix, el TDN s'ha mostrat com a bon marcador de la qualitat organolèptica de caves comercials d'alta gama.

La tècnica extractiva emprada per determinar els compostos volàtils i semi-volàtils, la microextracció en fase sòlida (SPME), s'ha mostrat com una tècnica idònia pel control aromàtic a les bodegues. Les empreses requereixen mètodes ràpids, senzills d'aplicar i respectuosos amb el medi ambient per aplicar-los de forma rutinària en el control de qualitat dels seus productes (apartat 4.1.1). Per tal d'obtenir un perfil complet de volàtils i semi-volàtils del cava i ampliar el ventall de possibles marcadors (nous i/o més adients) de la qualitat organolèptica de caves durant l'emmagatzematge, s'han aplicat dos mètodes (SDE i CLSA) d'elevada capacitat extractiva (apartat 4.1.2). Aquests mètodes han permès obtenir nous possibles marcadors. Tanmateix, les tècniques SDE i CLSA no responen als requeriments que han de tenir els mètodes de control de qualitat per ser aplicats rutinàriament i, per aquest motiu, s'han comparat amb la capacitat extractiva de la SPME. Aquesta última tècnica, tot i presentar limitacions, és una tècnica que permet adaptar les condicions d'extracció al tipus de compostos que es volen obtenir. En aquest sentit, la tècnica SPME s'ha adequat per poder determinar aquells possibles marcadors d'envelliment de caves comercials formats per degradació de sucres i/o aminoàcids, com són els

furfurals (apartat 4.1.4). Així, s'han detectat per primer cop en caves, compostos de nucli furànic (furfural, 5-metilfurfural, 2-acetilfuran, 3,3,4-trimetilfuran i furoat d'etil) i un mercaptà (3-(metiltio)propanoat d'etil) que augmenten en funció del temps i que actuen com a marcadors de possibles alteracions organolèptiques dels caves comercials.

El test d'envelliment accelerat que s'ha dissenyat (apartat 3.3) per la realització de la part experimental de la tesis i poder assolir els objectius plantejats (capítol I) ha resultat molt adient per identificar els compostos en els que s'ha de basar el control de la qualitat organolèptica dels caves, tant a la fase de rima com durant la seva distribució i comercialització. Els compostos assenyalats com a marcadors d'una criança real o accelerada permeten valorar l'evolució dels caves durant la rima. La seva formació està lligada a la bioquímica dels llevats, a l'igual que la dels aromes florals i torrats, que justifiquen els llargs períodes de criança en contacte amb els llevats, dels caves d'alta gama. Mentre que el compostos marcadors de l'emmagatzematge permeten evidenciar els processos de degradació de sucres i/o aminoàcids, fet que pot indicar condicions inadequades d'emmagatzematge i possibles alteracions de l'aroma.

Dels antecedents bibliogràfics de la criança de vi blanc i del cava es coneixia que els compostos fenòlics, relacionats amb el color del vi, modificaven els seus continguts, disminuint durant la criança en contacte amb els llevats. Tanmateix, no es disposava de dades bibliogràfiques del comportament d'aquests compostos durant la vida comercial del cava. Per aquest motiu, s'han determinat els compostos fenòlics mitjançant la HPLC-DAD (apartat 4.2.1) en les mostres del test d'envelliment accelerat [caves de dos categories comercials (semi-sec i brut), amb lies (criança) i amb licor d'expedició (comercials) i en tres condicions atmosfèriques (O_2 , CO_2 i N_2)].

Els resultats mostren l'aparició d'un enfosquiment progressiu al llarg del temps dels caves en totes les condicions d'espai de cap emprades en el test, sent, com era d'esperar, les mostres en contacte amb l'oxigen les que mostren una major

d'alteració del color per oxidació dels fenols. De l'anàlisi del perfil fenòlic dels caves obtinguts en el test d'envelliment accelerat s'observa una disminució dels àcids fenòlics i hidroxicinnàmics en totes les mostres del test, tal i com es produeix en els caves de criança real.

Tanmateix, s'ha detectat la presència d'uns compostos no identificats que augmentaven amb el temps d'envelliment. Aquests compostos tenen un gran interès com a possibles marcadors de la qualitat (apartat 4.2.1), tant durant la fase de rima com de l'emmagatzemat i distribució del producte acabat, ja que els increments són superiors en les mostres en condicions de diòxid de carboni, que és la atmosfera real del cava. Aquests possibles marcadors tenen un únic màxim d'absorció entorn a 280nm produint una alteració de la mesura enològica de l'índex dels compostos fenòlics totals (absorbància 280nm). Aquesta interferència permet explicar els augments en el valor de l'absorbància a 280nm durant la criança i vida comercial del cava, tot i la disminució dels compostos fenòlics. Altrament, el valor de l'absorbància a 280 nm pot ser útil per monitoritzar la formació d'aquests compostos i detectar alteracions del producte abans que es produeixi una modificació significativa de l'absorbància de la 420 nm.

Tot i haver-se determinat la fórmula molecular ($C_6H_{10}O_6$), el valor de la massa exacte (178.0398), i el patró de fragmentació, l'elucidació estructural completa del marcador no ha estat possible (apartat 4.2.2). Tanmateix, s'ha establert que el probable origen de la seva formació podien ser els sucres. Aquests són addicionats als vins base per tal que es pugui produir la segona fermentació i als caves amb el licor d'expedició. Per aquest motiu, utilitzant solucions patró de sucres sotmeses a la temperatura de 37°C, s'ha comprovat la formació d'aquest compost. Per altra banda, en caves adquirits al comerç també s'ha comprovat la presència d'aquesta substància, de manera que es pot afirmar que no és un artefacte de la temperatura del test.

Comentari dels Resultats

Un cop detectats els marcadors químics (volàtils i no volàtils) de la qualitat organolèptica dels caves durant la cria i emmagatzematge, es creu necessari efectuar diferents estudis cinètics de formació en els caves considerant factors com la temperatura, pH, concentració de precursors, etc.

Conclusions

VI. Conclusions

La relació de conclusions que es deriven del treball d'investigació realitzat s'ha ordenat en funció dels objectius:

- S'ha establert que el vitispirà, el TDN i el succinat de dietil són marcadors volàtils que es desenvolupen als caves en funció del temps de criança en contacte amb els llevats i que, per tant, poden ser útils per controlar les qualitats organolèptiques durant la rima. Per caves comercials, sense lies i amb licor d'expedició, només es recomana el TDN com a marcador d'envelliment, especialment en caves d'alta gama.
- S'han identificat, per primera vegada en el cava, uns volàtils de nucli furànic (2,3,4-trimetilfuran, furoat d'etil, el furfural, el 2-acetilfuran, 5-metilfurfural) i un mercaptà (3-(metiltio)propanoat d'etil). Probablement, aquests s'originen en processos de degradació de sucres i aminoàcids. El furfural i el 5-metilfurfural augmenten progressivament durant l'emmagatzematge independentment de la categoria de cava i podrien actuar com a marcadors d'una possible pèrdua de qualitat de caves comercials.
- Es proposa la microextracció en fase sòlida (SPME) com una tècnica d'extracció ràpida, senzilla, respectuosa amb el medi ambient, vàlida per la monitorització dels volàtils i semi-volàtils que augmenten en caves durant la fase de rima i l'emmagatzematge.
- Es suggereix com a marcador no volàtil un compost majoritari relacionat amb la criança i emmagatzematge dels caves. L'estudi d'elucidació d'aquest compost ha permès obtenir la seva fórmula molecular ($C_6H_{10}O_6$), la massa exacte (178,0398) i l'espectre d'absorció (λ_{max} . 284 nm). S'ha comprovat que l'origen d'aquest compost està en els sucres.

Conclusions

- El compost ($C_6H_{10}O_6$) que absorbeix entorn a 280nm pot explicar la paradoxa de l'augment de l'anomenat Índex de Fenols (absorbància a 280nm) durant la cria i l'emmagatzematge, tot i disminuir el contingut de fenols. A més es proposa la mesura d'absorbància a 280nm com indicador d'evolució o l'envelliment del cava complementari a l'absorbància a 420 nm, que únicament mesura enfosquiment.

Referències Bibliogràfiques

Referències Bibliogràfiques

Andrés-Lacueva, C; López-Tamames, E; Lamuela-Raventós, R.M.; Buxaderas, S.; de la Torre-Boronat, M.C. (1996). Characteristics of sparkling base wines affecting foam behaviour. *J.Agric. Food Chem.* (1), 44, 989-995.

Andrés-Lacueva, C; Gallart, M.; López-Tamames, E.; Lamuela-Raventós, R.M. (1996). Influence of variety and aging on foaming properties of Cava (sparkling wine).1 *J.Agric. Food Chem.* (2), 44, 3826-3829.

Andrés-Lacueva, C; Lamuela-Raventós, R.,M.; Buxaderas, S.; De la Torre-Boronat, M.C. (1997). Influence of variety and aging on foaming properties of Cava (sparkling wine).2. *J.Agric. Food Chem.*, 45, 2520-2525.

Athanasios Mallouchos, Panagonis Skandamis, Paul Loukatos, Michael Komaitis, Athanasios Koutinas and Maria Kenellari, (2003) Volatile compounds of wines produced by cells immobilized on grape skins, *J. Agric. Food Chem.*; 51, 3060-3066.

Athar M., Back J.H., Tang X., Kim K.H., Kopelovich L., Bickers D.R. and Kim A.L. (2007). Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*, In Press

Arthur C.L., Pawliszyn J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* 62, 2145-2148.

Barón R., Mayén M., Mérida J., Medina M. (1997). Changes in phenolic compounds and browning during biological aging of sherry-type wine. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1682-1685.

Referències Bibliogràfiques

Berlioz B., Cordella C., Cavalli J.F., Lizzani-Cuvelier L., Loiseau, A.M., Fernandez X. (2006). Comparison of the Amounts of Volatile Compounds in French Protected Designation of Origin Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(26), 10092-10101.

Bianchi F., Careri M., Musci M., Mangia A. (2006). Fish and food safety: Determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC-MS analysis. *Food Chemistry*. 100(3), 1049-1053.

Blanch G.P., Reglero G., & Herraiz M., (1996). Rapid extraction of wine aroma compounds using a new simultaneous distillation-solvent extraction device. *Food Chemistry*, 56 (4), 439-444.

Boletín Oficial del Estado 20 de Noviembre de 1991. Reglamento de la Denominación "Cava" y de su Consejo Regulador. Orden 14 de Noviembre 1991 BOE nº 189278: 37587-93.

Bradshaw M.P., Scollary G.R., Prenzles P.D. (2004). Examination of the sulphur dioxide-ascorbic acid anti-oxidant system in a model white wine matrix. *J. Sci. Food Agric*. 84, 318-324.

Bonnländer B., Baderschneider B., Messerer M., Winterhalter P. (1998). Isolation of two novel terpenoid glucose esters from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem*. 46. 1474-1478.

Boutou S., Chatonnet P. (2007). Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine. *Journal of Chromatography A*, 1141, 1–9.

Referències Bibliogràfiques

Câmara J.S.; Alves M.A. and Marques J.C. (2006). Changes in volatile composition of madeira wines during their oxidative ageing. *Analytica Chimica Acta*. 563, 188-197.

Carro-Marino N., Lopez Tamames E., Garcia-Jares C.M. (1995). Contribution to the study of the aromatic potential of three Muscat *Vitis vinifera* varieties: identification of new compounds. *Food Science and Technology International*. 1, 105-16.

Cheyrier V., Masson G., Rigaud J., Moutounet M. (1993). Estimation of must oxidation during pressing in champagne. *Am. J. Enol. Vitic.* 44(4), 393-399.

Cilliers, J.J.L.; Singleton, V.L. (1990). Nonenzymic autoxidative reactions of caffeic acid in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 84-86.

Cilliers, J.J.L.; Singleton, V.L. (1991). Characterization of the products of nonenzymic autoxidative phenolic reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1298-1303.

Clifford A.J., Ebeler S.E., Ebeler, J.D., Bills N.D., Hinrichs S.H. Teissedre P.L. Waterhouse A.L. (1996). Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. *American Journal of Clinical Nutrition* 64(5), 748-756.

Council Regulation (EC) No 1439/1999 of 17 May 1999 on the common organisation of the market in wine. L179/1-84 (D.O.C.E. L179 de 14 de Julio de 1999).

Cutzach I.; Chatannet P.; Dubourdiou D. (1999). Study of the formation mechanisms of some volatile compounds during the ageing of sweet fortified wines. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2837-2846.

Referències Bibliogràfiques

Daudt C.E., Ought C.S. Variations in some volatile acetate esters formed during grape juice fermentation. Effects of fermentation temperature, SO₂, yeast strain, and grape variety. *Am. J. Enol. Vitic.* 1973, 24(3), 130-135.

Díaz-Maroto M.C., Pérez-Coello M.S., & Cabezudo M.D., (2002). Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices comparison with simultaneous distillation-extraction. *Journal of Chromatography A.* 947, 23-29.

Dugelay I., Baumes R., Günata Z., Razungles A., Bayonove C. (1996). Evolution de l'arôme au cours de la conservation du vin: formation de 4-(1-éthoxyéthyl)-phenol et 4,1-éthoxyéthyl)-gaïacol. *Science des aliments*, 15, 423 – 433.

Efremenko E.; Stepanov N.; Martinenko N.; Gracheva I.; (2006). Cultivation conditions preferable for yeast cells to be immobilized into poly(vinyl alcohol) and used in bottled sparkling wine production. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 12(1), 18-23.

Eggers N., Kenefick S., Richardson S., Wigglesworth T., Girad B., (2003). Evaluation of closed-loop stripping for the isolation of wine aroma compounds from aqueous solution. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 92-98.

Espadaler I., Caixach J., Om J., Ventura F., Cortina M., Paune F., Rivera J. (1997). Identification of organic pollutants in Ter river and its system of reservoirs supplying water to Barcelona (Catalonia, Spain): A study by GC/MS and FAB/MS. *Water Research.* 31 (8), 1996-2004

Es-Safi, N-E.; Cheynier, V.; Moutounet, M. (2000). Study of the reactions between (+)-catechin and furfural derivatives in the presence or absence of anthocyanins and their implication in food color change. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5946-5954.

Referències Bibliogràfiques

Es-Safi, N-E.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M. (2000 b). New phenolic compounds formed by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic solution and their implication in color changes of grape-derived foods. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4233-4240.

Ferrari, G.; Lablanquie, O.; Cantagrel, R.; Ledauphin, J.; Payot, T.; Fournier, N. and Guichard E. (2004). Determination of Key Odorant Compounds in Freshly Distilled Cognac Using GC-O, GC-MS, and Sensory Evaluation. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (18), 5670 -5676.

Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V.; Escudero, A.; Cacho, J. (1998). Role of hydroxycinnamic acids and flavanols in the oxidation and browning of white wines. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4937-4944.

Ferreira, V.; Ortín, N.; Escudero, A.; López, R.; Cacho, J. Chemical characterization of the aroma of Grenache rosé wines. (2002). Aroma Extract Dilution Analysis, quantitative determination and sensory reconstitution studies. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4048-4054.

Francioli S., Guerra M., López-Tamames E., Guadayol J.M. Caixach J. (1999). Aroma of sparkling wines by headspace/solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Am. J. Enol. Vitic.* 50(4),404 – 408.

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. *J. Sci. Food Agric.* 59, 511-520.

Franquet R. (1990).Evolució dels components aromàtics en els vins joves del penedès. *ACE Revista d'Enologia.* Juliol – Setembre, 7-23.

Fumi, M. D.; Trioli, G.; Colombi, M. G.; Colagrande, O. (1988). Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate gel and its application to bottle-

Referències Bibliogràfiques

fermented sparkling wine production. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(4), 267-72.

Gallardo E., Barroso M., Margalho C., Cruz A., Vieira D.N., Lopez-Rivadulla M. (2006) Determination of parathion in biological fluids by means of direct solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 386(6), 1717-1726.

Genovese A.; Gambuti A.; Piombino P. And Moio L. (2007). Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine. *Food Chemistry*. 103, 1228-1236.

Girbau-Solà, T. Aptitud de las variedades Trepát y Monastrell para la elaboración de Cava: espuma y estabilidad del color. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, 2003.

Goldberg, D.M.; Tsang, E.; Karumanchiri, A.; Eleftherios, P.D.; Soleas, G.; Ng, E. (1996). Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Anal. Chem.*, 68, 1688-1694

Gunata Z., Dugelay I., Sapis J.C., BAumes R., Bayonove C. (1990). Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: libération de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques. *Connaissance Vigne Vin* 24, 133-144.

Halasz A., Hawari J. (2006). SPME in Environmental Analysis: Biotransformation Pathways. *Journal of Chromatographic Science*. 44(7), 379-386.

Hour T.C., Liang Y.C., Chu I.S., Lin J.K. (1999). Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-)epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine. *Food and Chemical Toxicology* 37(6), 569-579.

Referències Bibliogràfiques

Houtman A.C., du Plesis C.S. (1986). The effect of grape cultivar and yeast strain on fermentation rate and concentration of volatile components in wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, , 7(1), 14-20.

Ibern-Gomez M., Andres-Lacueva C., Lamuela-Raventos R.M., Buxaderas S., Singleton V.L., De la Torre-Boronat M.C. (2000). Browning of Cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 51(1), 29-36.

Isetun Si., Nilsson U., Colmsjoe A., Johansson R., (2004). Air sampling of organophosphate triesters using SPME under non-equilibrium conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 378(7), 1847-1853.

Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275(5297), 218-220.

Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A.* 880, 35-62.

Liu S.Q., Holland R., Crow V.L. (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal* 14, 923–945.

López- Barajas, M.; Viu-Marco, A.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S.; De la Torre-Boronat, M.C. (1997). Foaming in grape juices of white varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2526-2529.

López-Barajas, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S.; De la Torre-Boronat, M.C. (1998). Effect of vinification and variety on foam capacity of wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49(4), 397-402.

Referències Bibliogràfiques

López-Tamames E., Carro-Marino N., Gunata Y.Z., Sapis C., Baumes R., Bayonove C. (1997). Potential aroma in several varieties of spanish grapes. *J. Agric. Food Chem.* 45. 1729-1735.

Lopez-Toledano A., Mayen M., Merida J., Medina M. (2002). Yeast-Induced inhibition of (+)-catechin and (-)-epicatechin degradation in model solutions *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1631-1635.

Lopez-Toledano A., Mayen M., Merida J., Medina M. (2006) Yeast used to delay browning in white wines. *Food Chemistry.* 97, 498-504.

Lord H., Pawliszyn J. (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A.* 885, 153-193.

Marchal, R.; Tabary, I.; Valade, M.; Moncomble, D.; Viaux, L.; Robillard, B.; Jeandet, P. (2001). Effects of *Botrytis cinerea* infection on champagne wine foaming properties. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 1371-1378.

Malleret L., Bruchet A. Hennion M.C. (2001). Picogram determination of "earthy-musty"odorous compounds in water using modified closed loop stripping analysis and large volum injection GC/MS. *Anal. Chem.* 73, 1485-1490.

Margheri, G.; Gianotti, L.; Pellegrini, R.; Mattarei, C. (1984). Vini spumanti di qualità. Metodo champenoise. *Vini d'Italia.*, 26, 57-63.

Martí I., Lloret R., Martín-Alonso J., Ventura F. (2005). Determination of chlorinated toluenes in raw and treated water samples from the Llobregat river by closed loop stripping analysis and gas chromatography–mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A.* 1077 (1), 68-73.

Referències Bibliogràfiques

Mayén M., Barón R., Mérida J., Medina M., (1997). Changes in phenolic compounds during accelerated browning in white wines from cv. Pedro Ximenez and cv. Baladi grapes. *Food Chemistry*. 58(1-2), 89-95.

Marais J., Pool H.J., (1992) Effect of region on free and bound monoterpene and C13-norisoprenoid concentrations in weisser Riesling wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 13, 71-77.

Merken H.M., Beecher G.R. (2000). Measurement of food flavanoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J. Agric. Food Chem.* 48(3), 577-599.

Mestres M., Sala C., Marit M., Busto O., Guasch J. (1999). Headspace SPME analysis of volatile sulphides and disulphides using carboxen/PDMS fibers in the analysis in the wine aroma. *J. Chrom. A.*, , 835, 137-144.

Mestres M., Busto O., Guasch J. (1998). Headspace SPME of sulphides and disulphides in wine aroma. *J. Chrom. A.*, , 808, 211-218.

Moreno-Arribas, V.; Pueyo, E.; Nieto, F.J.; Martín-Álvarez, P.J.; Polo, M.C. (2000). Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chem.*, 70, 309-317.

Moreno J.A.; Zea L.; Moyano L. And Medina M. (2005), Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to a biological ageing. *Food Control*. 16, 333-338.

Nickerson G.B.; Likens S.T. (1966). Gas Chromatography evidence for the occurrence of hop oil components in beer. *Journal of Chromatography A*, Volume 21, 1-5.

Referències Bibliogràfiques

Noble, A.C., Ough, C.S. and Kasimatis, A.N. (1975). Effect of leaf content and mechanical harvest on wine "quality". *Am J Enol Vitic* 17, 38-47.

Pérez-Coello M. S.; González-Viñas M. A.; García-Romero E.; Díaz-Maroto M.C. and Cabezudo M.D. (2003). Influence of storage temperature on the volatile compounds of young white wines. *Food Control*, Volume 14, Issue 5, Pages 301-306

Pickering, G.J.; Heatherbell, D.A.; Barnes, M.F. (1999). The production of reduced-alcohol wine using glucose oxidase-treated juice. Part II. Stability and SO₂-binding. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 299-306.

Pozo-Bayón M.A., Hernández M.T., Martín-Álvarez P.J., Polo M.C. (2003) Study of low molecular weight phenolic compounds during the ageing of sparkling wines manufactured with red and white grapes varieties. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2089-2095.

Prosen H., Fingler S., Zupancic-Kralj L., Drevenkar V. (2007). Partitioning of selected environmental pollutants into organic matter as determined by solid-phase microextraction. *Chemosphere.* 66(8), 1580-1589.

Razungles A., Gunata Z., Pinatel S., Baumes R. Bayonove C. (1993) Etude quantitative des composés terpéniques, norisoprénoides et de leurs précurseurs dans diverses variétés de raisins. *Sciences des aliments* 13, 59-72.

Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66. 401-136.

Robbins R.J. (2003). Phenolic acids in food: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866-2887.

Referències Bibliogràfiques

Santos F.J., Galceran M.T., Fraisse D. (1996). Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile organic compounds in water. *Journal of Chromatography A*. 742(1+2), 181-189.

Senée, J.; Robillard, B.; Vignes-Adler, M. (1999). Films and foams of champagne wines. *Food Hydrocolloids*, 13, 15-26.

Scibetta L., Campo L., Mercadante R., Foa V. Fustinoni S. (2006). Determination of low level methyl tert-butyl ether, ethyl tert-butyl ether and methyl tert-amyl ether in human urine by HS-SPME gas chromatography/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 581(1), 53-62.

Shinohara T. (1986). Factors affecting the formation of volatile fatty acids during grape must fermentation. *Agric. Biol. Chem.*, 50(12), 3197-3199.

Silva-Ferreira A.C.; Guedes de Pinho P. (2002). Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5919-5924.

Silva-Ferreira A.C.; Guedes de Pinho P. (2004). Nor-isoprenoids profile during port wine ageing-influence of some technological parameters. *Analytical Chimica Acta*. 513, 169 – 176.

Simpson, R.F. (1978), Aroma and compositional changes in wine with oxidation storage and ageing. *Vitis*, 17(3), 274-287.

Singleton, V.L., Zaya J., Trousdale E., Salques M. (1984). Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction product during processing. *Vitis* 23, 113-120.

Singleton, V.L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.* 38 (1), 69-77.

Referències Bibliogràfiques

Singleton, V.L.; Kramling, T.E. (1976). Browning of white wine and an accelerated test for browning capacity. *Am. J. Enol. Vitic.*, 27, 157-160.

Singleton, V.L., Salgues M., Zaya J., Trousdale E. (1985). Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 36(1), 50-56.

Singleton, V.L. (1995). Maturation of wines and spirits: comparisons, facts, and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.* 46(1), 98 – 115.

Tominaga T., Murat M.L., Dubourdieu D. (1998). Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc. *J. Agric. Food Chem.*, , 46, 1044-1048.

Usseglio-Tomasset, L.; Bosia, P.D.; di Stefano, R.; Castino, M. Oggetiva (1983). Influenza del contatto con i lieviti sulle caratteristiche degli spumanti preparati con il metodo classico. *Vini d'Italia.*, 142, 3-9.

Wagener, G.W. (1980). The effect of mechanical harvesting on wines of Chenin blanc grapes in South Africa. *Vitis* 19(4), 338-345.

Williams P.J., Cynkar W., Francis I.L., Gray J.D., Coombe B.G. (1995). Quantification of glycosides in grapes, juices, and wines through a determination of glycosyl glucose. *J. Agric. Food Chem.* 43. 121-128.

Yang X., Peppard T. (1994). Solid phase microextraction for flavor analysis. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1925-1930.

Referències Bibliogràfiques

Yokotsuka, Koki; Yajima, Mizuo; Matsudo, Toshihide. (1997). Production of bottle-fermented sparkling wine using yeast immobilized in double-layer gel beads or strands. *American Journal of Enology and Viticulture*, , 48(4).

Yonamine M., Saviano A.M. (2006). Determination of cocaine and cocaethylene in urine by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 20(10), 1071-1075.

Waterhouse A., Towey J. (1994). Oak lactone isomer ratio distinguishes between fermented in american and french oak barrels. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1971 – 74.

Winterhalter P. (1993). The generation of C-13 norisoprenoids volatils. *Connaissance aromatique des cépages at qualité des vins. Rev. Fr. Oenol. Latters, France.* 65 – 73.

Zalacain, A.; Marin, J.; Alonso, G. L.; Salinas, M. R. (2007). Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta*, 71(4), 1610-1615.

Zhang Z., Pawliszyn J. (1993). Headspace solid-phase microextraction.. *Anal. Chem.* 65, 1843-1852.

Zhang, Z.; Yang, M.J.; Pawliszyn, J. (1994). Solid phase microextraction. *Anal. Chem.*, 66, 844-853.

Referències Bibliogràfiques

Annex I: Abreviatures

Annex I: Abreviatures

TDN:	1,1,6-Trimetil-1,2-dihidronaftalè
SDE:	Extracció i destil·lació simultània
CLSA:	Closed loop stripping analysis
SPME:	Microextracció en fase sòlida
HS-SPME:	Microextracció en fase sòlida en l'espai de cap
PTFE:	Politetrafluoroetilè
DVB:	Divinilbenzè
PDMS:	Polidimetilsiloxà
CAR:	Carboxen
GC:	cromatografia de gasos
FID:	Detector d'ionització de flama
MS (Scan):	Espectrometria de masses en mode scan
MS (Sim):	Espectrometria de masses mitjançant la monitoratge d'ió
m/z:	Relació càrrega massa dels ions
HPLC:	Cromatografia líquida d'alta eficàcia
DAD:	Detector de fotodiodes
UV-Vis:	Ultraviolat visible
TOF-MS:	Espectrometria de masses de temps de vol
RMN:	Ressonància magnètica nuclear

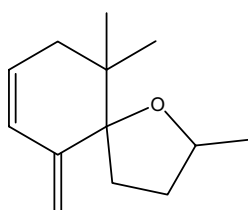
Annex II: Compostos identificats

Annex II: Compostos identificats

Vitispirà

IUPAC: 2,10,10-Trimetil-6-metilen-1-oxaspiro[4,5]dec-7-è

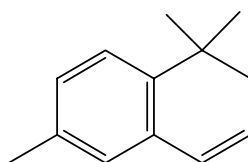
Cas N°: 66965-94-4



TDN

IUPAC: 1,1,6-Trimetil-1,2-dihidronaftalè

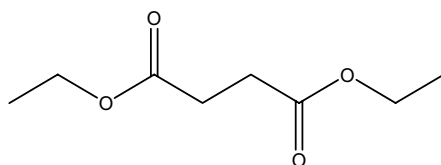
Cas N°: 30364-38-6



Succinat de dietil

IUPAC: Succinat de dietil

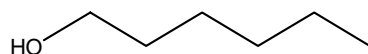
Cas N°: 123-25-1



1-Hexanol

IUPAC: 1-Hexanol

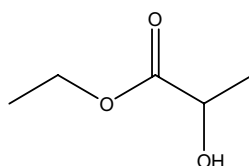
Cas N°: 111-27-3



Lactat d'etil

IUPAC: 2-Hidroxiopropanoat d'etil

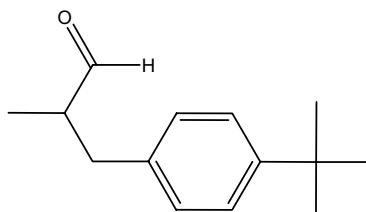
Cas N°: 97-64-3



Lilial

IUPAC: 2-Metil-3-(4-*tert*-butilfenil)propanal

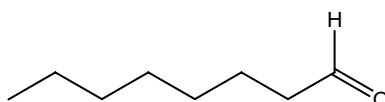
Cas N°: 80-54-6



Octanal

IUPAC: Octanal

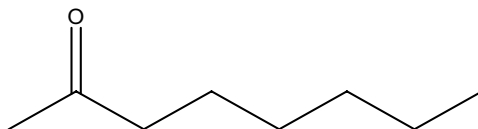
Cas N°: 124-13-0



2-Octanona

IUPAC: 2-Octanona

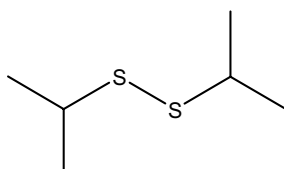
Cas N°: 111-13-7



Disulfur de diisopropil

IUPAC: Disulfur de diisopropil

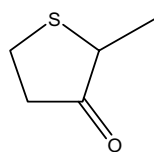
Cas N°: 4253-89-8



2-Metiltiofe-3-ona

IUPAC: 2-Metil-3-oxo-tetrahidrotiofè

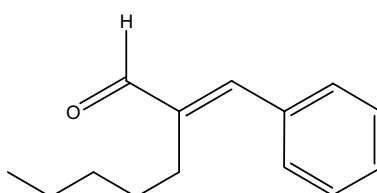
Cas N°: 13679-85-1



α -amil cinnamaldehyd

IUPAC: 3-Fenil-2-pentilpropanal

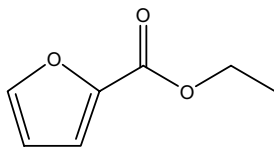
Cas N°: 122-40-7



Furoat d'etil

IUPAC: Furoat d'etil

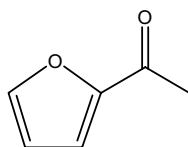
Cas N°: 614-99-3



2-Acetilfuran

IUPAC: 2-Acetilfuran

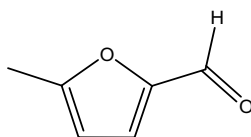
Cas N°: 1192-62-7



5-Metilfurfural

IUPAC: 5-Metil-2-furaldehid

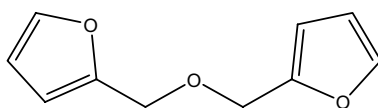
Cas N°: 620-02-0



Èter difurfurílic

IUPAC: Èter difurfurílic

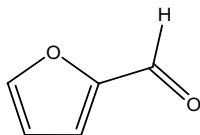
Cas N°: 4437-22-3



Furfural

IUPAC: 2-Furaldehyd

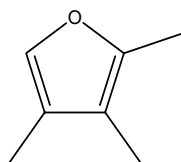
Cas N°: 98-01-1



2,3,4-Trimetilfuran

IUPAC: 2,3,4-Trimetilfuran

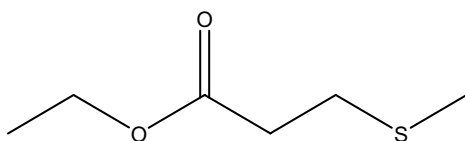
Cas N°: 10599-57-2



3-(Metiltio)propanoat d'etil

IUPAC: 3-(Metilsulfanil)propanoat d'etil

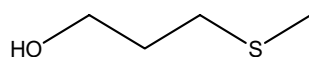
Cas N°: 13327-56-5



Metionol

IUPAC: 3-(Metilsulfanil)propan-1-ol

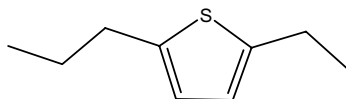
Cas N°: 505-10-2



2-Etil-5-propiltiofè

IUPAC: 2-Etil-5-propiltiofè

Cas N°: 54244-74-5



5-Hidroxi metilfurfural

IUPAC: 5-Hidroxi metil-2-furaldehid

Cas N°: 67-47-0

