



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**MÁSTER CALIDAD, DESARROLLO E INNOVACIÓN DE
ALIMENTOS**

**LOS TANINOS DE LA MADERA EN EL
ENVEJECIMIENTO DE VINOS**

Alumno: Diego Hernando Arroyo Almeida
Tutora: María del Álamo Sanza
Cotutor: Ignacio Nevares Domínguez

Julio 2013

Resumen

Los elagitaninos de la madera que se encuentran en los vinos que han envejecido en barricas o con productos alternativos, son un grupo de compuestos que afectan directamente a las propiedades finales del vino debido a su gran facilidad para interaccionar con sus componentes. Varios estudios se han llevado a cabo, con el propósito de comprender la importancia de los elagitaninos en el vino, su procedencia e interacciones. En esta revisión el objetivo principal se centra en los métodos de análisis utilizados para evaluar la concentración de elagitaninos tanto en la madera como en el vino que envejece. Por una parte se han estudiado los diferentes métodos de preparación de las muestras de madera y vino para su posterior análisis y también los métodos de análisis para determinar la cantidad de elagitaninos en ambos casos, y por otro se ha analizado la complejidad de las estructuras de elagitaninos y la evolución que sufren durante los tratamientos de la madera de tonelería. Se ha encontrado que si bien hay un buen número de investigaciones que abordan la cuantificación de elagitaninos mediante HPLC, optimizando las condiciones de separación y detección, hay una buena parte optimizando la preparación de la muestra para asegurar la correcta cuantificación de todos los elagitaninos presentes.

Abstract

The Ellagitannins from wood found in wines that have been aged in barriques or with alternative products, are a group of compounds that directly affect the final properties of the wine due to its ease to interact with constituents. Several studies have been conducted, in order to understand the importance of the Ellagitannins in wine, its origin, and interactions. In this review the main objective focuses on the methods of analysis used to evaluate the concentration of Ellagitannins in wood and wine aging. On the one hand the different methods of preparation of samples of wood and wine have been studied for further analysis as well as methods of analysis to determine the amount of Ellagitannins in both cases, and on the other it has analyzed the complexity of the structures of Ellagitannins and evolution that suffer during cooperage timber treatments. Found that while there are a good number of researches that address the quantification of Ellagitannins by HPLC, optimizing the conditions of separation and detection, there is much optimizing the preparation of sample to ensure proper quantification of all present Ellagitannins.

LOS TANINOS EN EL ENVEJECIMIENTO DE VINOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Taninos condensados	1
1.2 Taninos hidrolizables.....	1
1.3 La composición química de la madera de roble	2
1.3.1 Elagitaninos en madera verde	3
2. ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN	4
2.1 Galotanimos	4
2.2 Taninos condensados.....	4
2.3 Elagitaninos.....	5
3. PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y SENSORIALES.....	7
4. EVOLUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE MADERA DE TONELERÍA.....	7
4.1 Secado de la madera	8
4.2 Tostado	10
5. EFECTO DE LOS TANINOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO DEL VINO	11
6. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN.....	14
6.1 Extracción de compuestos de la madera	14
6.2 Método de determinación de taninos de la madera	16
6.3 Extracción de compuestos de la madera presentes en vino	17
6.4 Método de determinación de taninos de la madera presentes en vino	18
7. CONCLUSIONES	22
8. BIBLIOGRAFÍA	23

LOS TANINOS EN EL ENVEJECIMIENTO DE VINOS

1. INTRODUCCIÓN

Los taninos son compuestos químicamente conformados por fenoles de origen vegetal con estructuras muy complejas, debido a esta complejidad estructural su clasificación se basa en las características estructurales específicas y propiedades químicas. Muchos taninos pueden ser fraccionados hidrolíticamente en sus componentes, ya sea por tratamiento con agua caliente o con enzimas "taninasas", clasificándolos como 'taninos hidrolizables. Por tanto, el término "tanino hidrolizable" incluye tanto los galotaninos y los elagitaninos. Dentro de estos últimos existen elagitaninos que no son hidrolizables debido a un acoplamiento adicional C-C de su residuo polifenólico con la unidad de poli-ol. Para colocar correctamente estos "taninos no clasificados" en algún esquema, se establecieron los términos "taninos complejos" y flavanoelagitaninos (Figura 1) (Khanbabae K., et al. 2001).

1.1 Taninos condensados

Los taninos condensados son productos de bajo peso molecular formados a partir de las antocianidinas (responsables de los colores a las flores y a las cáscaras de muchas frutas), dando compuestos principalmente de colores marrones, rojos oscuros y otros similares (González G. 2012). El tanino se define como protoantocianidólico (que produce un antocianidol). La naturaleza del antociano permite diferenciarlos si es un cianidol como en la pepita de la uva, se hablará de cianidoles, y si se trata de un delfinidol, se clasificarán como prodelfinidoles (Vivas N. 2005). Además, tanto las proantocianidinas oligoméricas, como las poliméricas no hidrolizables y los flavanotanninos (poliméricos acoplados construidos a partir de unidades flavan-3-ol (catequina) se clasifican como taninos condensados (Khanbabae K., et al. 2001).

1.2 Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables provienen de condensaciones y polimerizaciones del ácido gálico, que a su vez forma el ácido elágico (González G. 2012). Los elagitaninos C-glucosídicos presentan una especificidad estructural de que tiene un enlace C – C, muy característico entre el átomo de carbono 1 de un núcleo de glucosa de cadena abierta y el átomo de carbono-20 de una unidad de galloilo derivado esterificado a la posición 2 del núcleo de la glucosa. Estas moléculas son solubles en medio

hidroalcohólico, es por eso que se extraen poco a poco por el vino durante su crianza en barricas de roble. Además, el nivel de los elagitaninos de la madera de roble utilizada para fabricar barricas depende en parte de la especie, edad, origen geográfico, las prácticas de manejo forestal de los árboles, la posición de muestreo en el árbol de utilizarse y la transformación de la madera en tonelería como el tipo y duración de secado y el tostado (Michel J. 2011). En la madera de roble (*Quercus robur* y *Quercus petraea*), y de castaño (*Castanea sativa*) se han encontrado mayoritariamente los dos isómeros castalagina y vescalagina (Vivas N 2005).

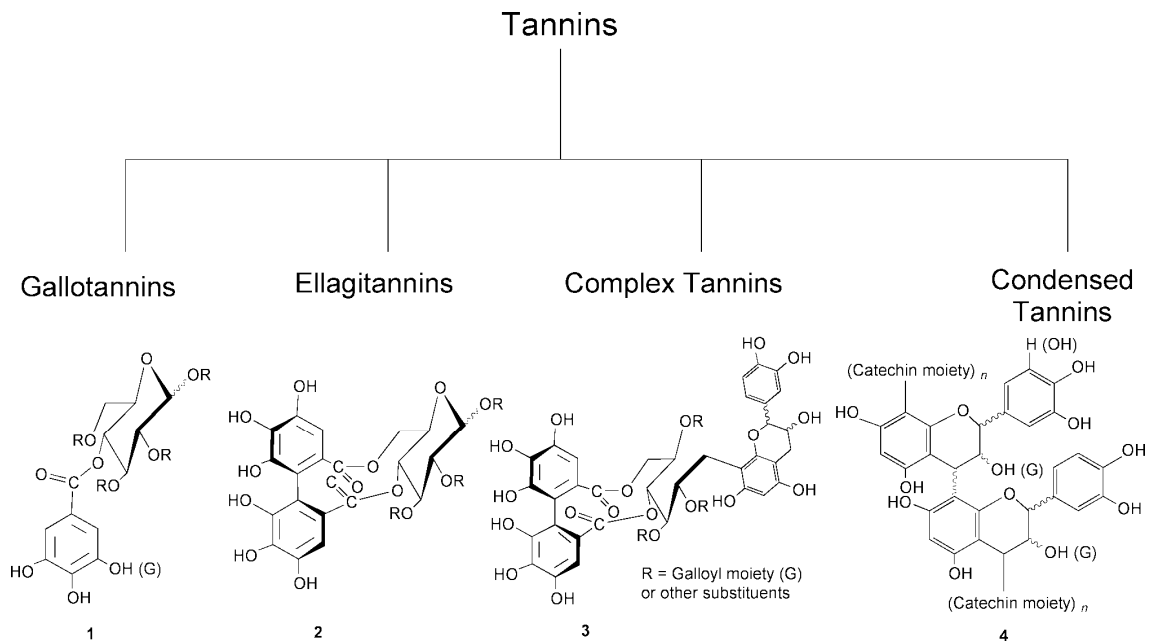


Fig. 1 Clasificación de los taninos. (Khanbabaee K., et al. 2001)

1.3 La composición química de la madera de roble

El duramen está formado por 40% de celulosa, 20% de hemicelulosa, 25% de lignina, 10% de elagitaninos, y 5% de componentes de naturaleza química diversa. El resto de componentes constituyen la llamada fracción extraíble, y pueden hallarse mezclados con los polímeros en la pared celular o como formaciones en los lúmenes celulares. (Fernández de Simón B, et al., 2007)

Las concentraciones más altas de taninos se encuentran en tejidos leñosos, que contienen una alta proporción de células de parénquima, especialmente madera temprana del parénquima, y en los radios de madera. Estos taninos pueden estar presentes de forma libre, o unidos a polisacáridos (Puech J, L., et al. 1999). Además contribuyen a propiedades de la madera como: color, olor, sabor y resistencia a la

descomposición. Los elagitaninos son los compuestos más abundantes, pero también se encuentran otros componentes de estructuras químicas muy diferentes, como los polifenoles, los compuestos furánicos, lactonas, ácidos grasos, entre otros. Algunos de estos compuestos serán el origen de muchas de las sustancias de interés organoléptico que se encuentran en los vinos de crianza (Fernández de Simón B. et al. 2007).

1.3.1 Elagitaninos en madera verde

Las concentraciones de los compuestos de bajo peso molecular presentes en maderas verdes procedentes de roble son muy variadas (Cadahía et al. 2008). Mediante los análisis químicos de las maderas verdes de las especies de roble, en este caso de origen español. Cadahía et al. (2001) han identificado ácidos, aldehídos fenólicos, cumarinas y elagitaninos que ya habían sido descritos para otras especies y orígenes de roble. La composición en polifenoles de bajo peso molecular y elagitaninos de la madera de roble de origen español en verde, es cualitativamente idéntica a la de origen francés y americano, presentando sólo diferencias cuantitativas (Fernández de Simón B. et al 2009), destacando que la madera procedente de roble francés, cede al menos siete veces más fenoles extraíbles que la madera de roble americano, por lo que los vinos así envejecidos resultarán mucho más "tánicos" (García M, P., 1997). Estas diferencias permiten distinguir la madera según su origen geográfico, a pesar de la fuerte variabilidad individual, que puede ser mayor que la variabilidad entre especies debido a la gran influencia de las condiciones de suelo, manejo forestal, climatología y edad de los árboles influyendo sobre los caracteres estructurales de la madera (Fernández de Simón B. et al 2009).

Puech J, L., et al. (1999) han observado un incremento de la variación en el nivel de elagitaninos entre los diferentes árboles, poblaciones y especies de roble. Sin embargo, pocos estudios han logrado controlar adecuadamente otros factores que pueden influir en el nivel de taninos (como la edad y el tratamiento de la madera), garantizando al mismo tiempo la identificación cuidadosa de origen biológico y geográfico de las muestras y el adecuado proceso de muestras replicadas. Se ha encontrado que la diferencia más evidente es el nivel de extractos fenólicos entre las especies de roble europeas y americanas utilizadas para la tonelería. Tanto los estudios más recientes como los anteriores, indican los niveles más bajos de compuestos fenólicos y elagitaninos extraídos de la madera en el caso de maderas de roble americano en comparación con las maderas de roble europeo empleadas en tonelería (tabla 1).

Tabla. 1 Elagitaninos de extractos de madera de corazón de roble y castaño
(Resultados mg/g de madera) (Vivas N. 2005)

Elagitaninos Monómeros	Q. <i>robur</i>	Q. <i>petraea</i>	Q. <i>farnetto</i>	Q. <i>alba</i>	Q. <i>stellata</i>	Q. <i>oocarpa</i>	Q. <i>sativa</i>
Vescalagina	26,7	8,7	15,7	3,8	16,3	6,5	22,6
Castalagina	30,1	12,4	14	26,4	29,6	23,7	17,4
Grandinina	8,5	5,8	5,2	tra	6,4	6,2	Tra
Roburina E	4	4,7	8,7	2,8	8,5	2,9	0
Dímeros							
Roburina A	8,7	2,4	12,2	tra	1,9	0	3,8
Roburina D	2,3	0,4	5,2	0	0	0	0
Roburina B	3,6	2,6	26	tra	2,3	0	Tra
Roburina C	3,5	2,1	21	tra	1,9	0	0
% dímeros	21	19	58,5	<1%	9	0	9
% monómeros	79	81	41,5	>99%	91	100	91
% elagitaninos pentosilados*	22,5	39	55	9	28	23	<1%
vescalagina libre / castalagina libre	0,88	0,7	1,1	0,14	0,55	0,27	1,3
vescalagina total / castalagina total**	1,7	2	4,6	0,26	1,25	1,25	1,5

Tra (niveles encontrados de trazas) Manual de tonelería

2. ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

2.1 Galotaninos

Los galotaninos son los taninos más simples que existen, están formados por unidades galoil o di-galoil esterificadas a un núcleo de glucosa u otro alcohol polivalente (Figura 1 (1)). Los elagitaninos son ésteres del ácido hexahidroxi-difénico (HHDP); después de la hidrólisis de los elagitaninos, el grupo HHDP se deshidrata y lactoniza espontáneamente, formando ácido elágico.

2.2 Taninos condensados.

Los taninos condensados son proantocianidinas oligoméricas y poliméricas consistentes en unidades de flavan-3-ol (catequina) o flavan-3-4-ol unidas entre sí por enlaces C-C (Figura 1 (4)). La estructura de los taninos complejos está construida sobre una unidad de galotanino o elagitanino y una de catequina (Khanbabaee, K. 2001).

2.3 Elagitaninos

Taninos elágicos conocidos como también como taninos hidrolizables ya que en medio ácido se hidrolizan dando lugar a ácido gálico. Están constituidos por la unión de varias moléculas de ácido gálico esterificadas con glucosa en forma lineal. Son muy abundantes en la madera y contribuyen a consolidar la estructura del vino (Moreno J. et al. 2010). Se han identificado en la madera de roble ocho elagitaninos: Vescalagina, Castalagina, Grandinina, Roburina A, Roburina B, Roburina C, Roburina D y Roburina E. De los cuales los más abundantes son Castalagina, Vescalagina, Roburina E y Grandinina (Figura 2). De estos compuestos se conoce que se comportan como antioxidantes por su gran capacidad de consumir oxígeno; también que aceleran la condensación de antocianos y taninos con acetaldehído, por su capacidad de formación de etanal; que favorecen la polimerización de los flavanoles del vino, y que pueden unirse a ellos formando complejos flavanoelagitaninos. Por ello, parece que solo una pequeña parte de los elagitaninos aportados por la madera se encuentran en el vino en forma libre, contribuyendo a las sensaciones de amargor y astringencia, especialmente Grandinina y Roburina E. En el caso de que se llegaran a alcanzar concentraciones muy elevadas, esto daría lugar a vinos con características organolépticas no deseadas, lo que se denomina “sabor a tablón” (Cadahía E. et al. 2008).

Los taninos del duramen de numerosas especies de roble (*Quercus sp*) pertenecen al grupo de los taninos hidrolizables, que incluye los galotaninos y elagitaninos, generando respectivamente ácido gálico y ácido elágico después de la hidrólisis ácida.

En la madera de roble (*Quercus petraea*, *Quercus robur*) y el castaño (*Castanea sativa*), encontramos en su mayoría dos elagitaninos y particularmente dos isómeros: Vescalagina y Castalagina. Estas estructuras están constituidas por una cadena de glucosídico lineal en el que el OH está esterificado por las funciones carboxílicas de los grupos hexahidroxidifenico y nonahidroxitriphenico. Estos diferentes elagitaninos son hidrosolubles y solubilizados rápidamente en medios hidroalcohólicos como vinos y licores. Su potencial oxidante y sus propiedades de sabor les dan un papel real en el proceso de envejecimiento de los vinos tintos (Vivas N., et al. 1996 a). La cantidad de elagitaninos libre presente en las bebidas envejecidas va a depender de la cantidad de elagitaninos que aporta la madera de la barrica y de los tratamientos realizados a la madera, ya que durante el secado natural de la madera al aire libre disminuyen notablemente, y de igual forma, como veremos más adelante, se ven afectados por el tostado realizado a la barrica durante su fabricación.

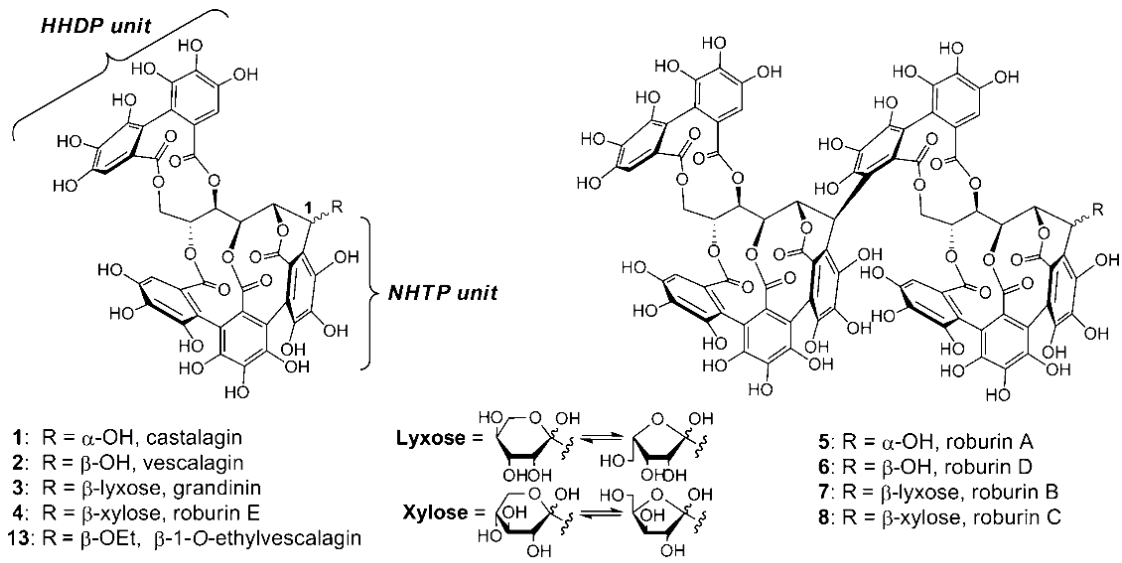


Fig. 2. Estructura de *elagitaninos* presentes en la madera de roble (Joudres et al 2011)

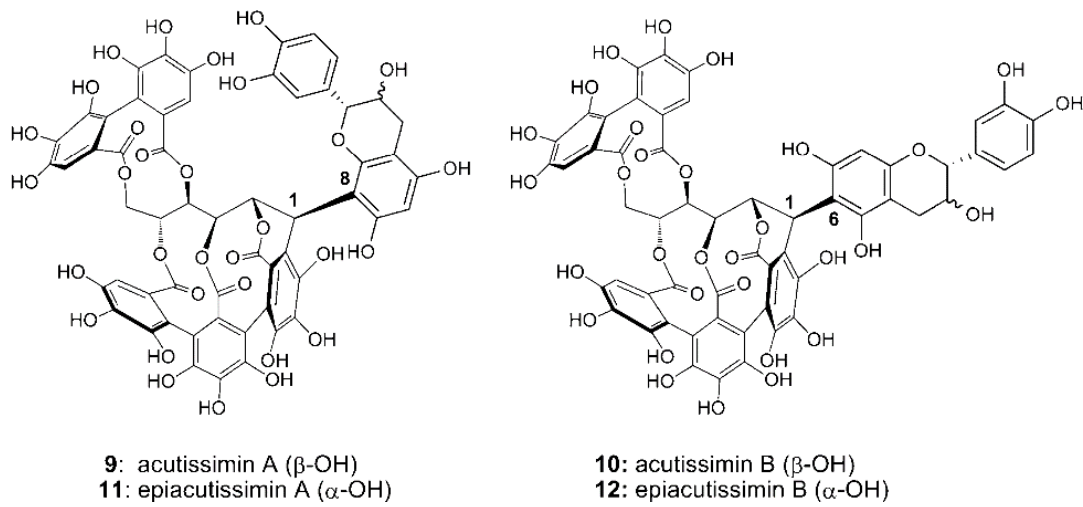


Fig. 3. Estructura de *elagitaninos* presentes en la madera de roble (Joudres et al 2011)

3. PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y SENSORIALES

Las características sensoriales más reconocidas de los taninos son la astringencia, aspereza y amargor, principalmente presentes en vinos blancos y tintos almacenados en barricas o tratadas con virutas de roble (García M, P., 1997).

Puech J, L., et al. (1999) han sugerido que los elagitaninos abundantes de madera de roble pueden aumentar la astringencia y el amargor de los vinos madurados en barricas de roble. Los estudios experimentales, sin embargo, aún no han sido capaces de demostrar dichos atributos y la relación entre ellos. Degustaciones directas de elagitaninos de roble purificado, sugieren que incluso los compuestos más astringentes Roburina A, B y D, son, sin embargo, relativamente débiles en comparación con otros taninos. Cualquier efecto organoléptico proveniente de taninos de roble sigue siendo incierto y sólo aparece probablemente a través de un efecto sinérgico con otros compuestos fenólicos del vino.

Vivas N., et al., (1996 a) mencionan que los elagitaninos mejoran la estabilidad del color y reducen la astringencia del vino tinto, favoreciendo reacciones de condensación de taninos y antocianinas, y actúan como un eficiente catalizador de las reacciones de oxidación de los vinos tintos.

Por otro lado, Puech J, L., et al. (1999) examinaron el efecto organoléptico de los elagitaninos por adición de extractos totales y fraccionados de roble al vino, evaluando la astringencia. Estos resultados sugieren que son los compuestos distintos de los elagitaninos los responsables, en gran parte, de cualquier aumento de la astringencia del vino causada por extractos de roble.

4. EVOLUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE MADERA DE TONELERÍA

Los tratamientos a los cuales es sometida la madera en tonelería pueden condicionar posteriormente la calidad enológica de la barrica. En primer lugar es necesario seleccionar los árboles de los que se va a obtener la madera, y cortarlos de forma adecuada para poder obtener las duelas que van a conformar la barrica. Una vez obtenidas las duelas es necesario secar apropiadamente la madera para proceder a la siguiente fase, la de montaje de la barrica, curvado y tostado de las duelas. (Fernández de Simón B., et al. 2007)

La elección de la madera de roble ara su uso en tonelería se realiza no solo por el origen geográfico de la madera, sino también por el tipo de grano, ya que granos más gruesos (mayor velocidad de crecimiento del árbol) da lugar a maderas más tánicas. Por lo tanto, las características del crecimiento del roble determinan también el contenido en elagitaninos de la madera. La tabla 2 muestra los resultados de la evaluación del contenido en los diferentes elagitaninos de maderas de distintos orígenes y con crecimiento lento (grano fino) y crecimiento más rápido (grano medio). Se observa que el grano medio contiene mayor cantidad de elagitaninos en el caso del roble francés. Esto se debe a que el crecimiento rápido, y por lo tanto grano medio, se centra en la madera de verano que es rica en elagitaninos. Sin embargo, en el caso de la madera americana, que presenta menor cantidad de taninos, el anterior resultado solo se da en el caso de vescalagina.

Tabla. 2 Elagitaninos individuales y contenido de ácido elágico en virutas de madera de roble portugués (*Quercus pyrenaica* Willd.) de dos diferentes orígenes geográficos en comparación con otras especies botánicas con diferente grosor del grano. (Jordao et al 2007)

Compuesto	<i>Q. pyrenaica</i>		<i>Q. petraea</i>		<i>Q. alba</i>	
	Portugal		Allier Region		Missouri	
	Bosque 1 Grano medio	Bosque 2 Grano medio	Grano fino	Grano medio	Grano fino	Grano medio
Vescalagina	30.42±4.26	10.88±3.19	15.03±0.71	21.80±4.50	1.89±0.42	6.44±1.41
Castalagina	26.93±3.22	19.48±4.01	17.87±3.20	24.81 ±3.20	4.45± 1.03	2.49±0.72
Roburina D	4.53± 1.05	9.08±2.10	1.95±0.02	3.81 ±0.71	n.d.	n.d.
Roburina E	10.67±4.20	7.49± 1.92	5.83±1.20	9.60± 1.81	0.59±0.04	n.d.
Grandinina	5.35±1.40	7.35±2.32	12.20±0.41	13.50±2.34	n.d.	n.d.
Elagitaninos totales	77.90A	54.2B	52.88B	73.52A	6.93C	8.93C
Acido elágico	1.06±0.49A	4.39±0.20B	2.28±0.66A	3.79±0.37B	1.92±0.37A	1.67±0.10A

Resultados son promedio ± SD calculada para dos muestras de 100 mg de virutas de roble, que se presentan como mg/g de ácido elágico de madera seca. Para elagitaninos totales y ácido elágico, la comparación de medias se realizó por el método de LSD. Los promedios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). n.d., no se detecta

4.1 Secado de la madera

El secado idóneo de la madera es el que se realiza de modo natural a la intemperie, que suele llevarse a cabo durante dos o tres años, dependiendo del grosor de la pieza. Durante este proceso se produce una cierta contracción de las fibras y reducción de la humedad, (Fernández de Simón B., et al. 2009). Sin embargo, el secado natural,

además de una etapa de deshidratación de la madera, es una etapa de curado, lenta y compleja, comparable a la maduración de la uva. Se pasa de una madera verde y agresiva, a una madera seca y aromática, en la que los elementos solubles son más suaves y más agradables, perdiendo amargor y astringencia. Así, se produce una disminución del contenido en elagitaninos, y de determinados componentes volátiles que se relacionan con la aparición de un carácter vegetal en los vinos. (Fernández de Simón B, et al. 2007).

El comportamiento de cada compuesto es variable durante todo el proceso, se puede apreciar al final del mismo, una tendencia de la mayoría de ellos a reducir su concentración (a excepción de la castalagina y vescalagina), que se traduce en una disminución del contenido total. (Cadaña E., et al. 2008). Esto se debe a una serie de reacciones bioquímicas que se ven influidas por mecanismos físicos asociados a la pluviosidad, las radiaciones ultravioleta y las variaciones de temperatura (amplitudes térmicas), como son los procesos de lixiviación y de degradación hidrolítica oxidativa.

Al mismo tiempo, en la superficie, en los primeros milímetros de las duelas se desarrolla una importante actividad fúngica, que produce una liberación de azúcares por la destrucción de determinadas estructuras fenólicas cumarinas, taninos hidrolizables, con la consiguiente modificación de las propiedades organolépticas, como es la disminución de la astringencia y del sabor amargo (Fernández de Simón B, et al. 2007). Esta disminución de elagitaninos durante el secado está relacionada con la especie botánica y el origen geográfico de la madera, ya que sus caracteres físico-mecánicos condicionan la efectividad de los mecanismos físico-químicos de degradación. Así, en la madera de *Quercus robur*, *Quercus petraea* y *Quercus pyrenaica* de origen español, y en *Quercus petraea* francés se produce una disminución de entre el 30-40% de los elagitaninos a lo largo de los 2-3 años que dura el secado natural, en *Quercus robur* francés la disminución es del 75%, y en la madera de *Quercus alba* americano la disminución es menor, en torno al 15% (Fernández de Simón B, et al. 2007).

García M, P., (1997) ha comparado las modificaciones que se producen en la madera en el curso de un secado lento tradicional o bien acelerado por estufa, así como su incidencia en la calidad de los vinos y los espirituosos. En general resulta, aunque no sistemáticamente, que el secado natural permite obtener resultados cualitativamente superiores al secado artificial. A pesar de esto, no siempre es evidente el relacionar este resultado a la composición química de la madera desde el punto de vista analítico el

secado natural ya que este entraña un empobrecimiento de la madera en relación con el secado artificial. (Tabla 3)

Tabla. 3 *Influencia del sistema de secado sobre el contenido en ácidos fenoles, obtenidos por maceración hidroalcohólica de madera de roble. IFC: índice de FoulinCiocalteau.*
(García M, P., 1997)

	Madera verde	Secado natural	Secado artificial
Ácido gálico (mg/l)	144,0	64,0	98,0
Ácido elágico (mg/l)	72,0	58,0	70,0
IFC	86,0	49,0	67,0
I elagitaninos	0,23	0,08	0,12
I galotaninos	1,02	0,26	0,68

Además García M, P., (1997) menciona que los elagitaninos extraíbles, incoloros y abundantes en la madera verde, sufren una disminución importante tras tres años de envejecimiento, a diferencia de los taninos catéquicos. La desaparición de elagitaninos oligómeros de la madera puede tener varios orígenes: por su solubilidad en agua, o por ser compuestos degradables por oxidación cuando son conservados en presencia de agua y aire.

4.2 Tostado

El efecto del tostado se manifiesta también en la variación que experimenta la composición tánica de la madera. Las dos intensidades de tostado más utilizadas en tonelería (media y media plus), suponen reducciones de las concentraciones de elagitaninos más acusadas según se incrementa la intensidad del tostado (Cadahía E., et al. 2008).

Según Puech J., et al. (1999) señalan que con el nivel más bajo de tostado se reduce, en la capa superficial de la madera, el nivel de vescalagina en un 73% y de castalagina un 46%. El tostado más fuerte eliminará casi por completo los elagitaninos de las capas superficiales de la madera, aunque incluso después del tostado más fuerte el descenso en el nivel de elagitaninos sólo afecta hasta una profundidad de unos pocos milímetros. Este factor, es el que en parte explica los bajos niveles de elagitaninos que se encuentran en los vinos.

Fernández de Simón B., et al. (2009) encontraron en las maderas de roble español sometidas a un proceso de tostado de intensidad media (durante 35 minutos, a 160-170°C) que las concentraciones de elagitaninos, se redujeron, particularmente en el caso de los monómeros y los monómeros pentosilados. Estos importantes cambios en el perfil polifenólico provocan una disminución de la variabilidad natural entre especies y orígenes de las maderas, resultando al final del proceso de tostado que la composición tánica de las maderas españolas *Quercus robur*, *Quercus petraea* y *Quercus pyrenaica* son muy semejantes a las francesas de *Quercus robur* y *Quercus petraea*.

La especie *Quercus alba* muestra, después del tostado, mayores diferencias respecto a todas las demás. Por lo tanto, el tostado de la madera, además de provocar la formación de nuevos compuestos debido a la degradación térmica de la madera, es capaz de producir la degradación de los elagitaninos, acentuándose este efecto al aumentar el tiempo y la temperatura de tratamiento, hasta llegar incluso a la eliminación total de los elagitaninos en la capa superficial de madera tostada de las duelas (Fernández de Simón B, et al. 2007).

5. EFECTO DE LOS TANINOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO DEL VINO

Se pueden distinguir tres cuestiones centrales sobre el efecto de los taninos de roble en el vino. Teniendo en cuenta que los niveles de elagitaninos que se encuentran en los vinos de crianza en roble son bajos, los efectos organolépticos directos e indirectos sobre el sabor del vino dependen del tipo de vino y de madera, así como de la influencia de otras prácticas enológicas realizadas durante el proceso de envejecimiento de vinos. Entre las transformaciones esperadas, las más importantes son la oxidación y la interacción entre los elagitaninos - polisacáridos, proteínas de levadura o mano-proteínas (Puech J, L., et al. 1999).

La lenta y constante penetración del oxígeno a través de las duelas de la barrica y la disolución gradual de los elagitaninos de la madera de roble forma un buffer efectivo contra la oxidación durante el proceso de envejecimiento, ya que los elagitaninos son fácilmente oxidados, siendo estas las principales características del vino tinto envejecido en barrica. La gran capacidad de estas sustancias para consumir oxígeno es debida a la presencia de varias funciones hidroxilo en posición orto en su configuración (García M, P., 1997), de forma que el estudio realizado por Vivas N. et al., (1996 a) demuestran que los elagitaninos (E[OH]) tienen un mayor poder oxidativo que los polifenoles del

vino, participando en reacciones de peroxi-radical que dan lugar a quinonas ($E=O$), fenoles radicales libres (EO°), hidroperóxidos orgánicos ($E[OOH]$) y H_2O .

En consecuencia, los elagitaninos se revelan como reguladores de la oxidación, absorbiendo rápidamente el oxígeno disuelto y facilitando la hidropoxidación de los compuestos del vino. Esta reacción estimula la condensación de tanino / antociano vía acetaldehído, favoreciendo la estabilización y aumento del color morado y previniendo el desarrollo del color amarillo. Además, la estructura de los taninos del vino se modifica, reduciendo su astringencia y limitando la precipitación de materia colorante, debido a su alto nivel de polimerización (García M, P., 1997). En la figura 4 se expone un esquema de la condensación entre antocianos del vino y la vescalagina de la madera propuesto por Chassaing et al en 2010. Se trata de compuestos

En trabajos sobre los efectos organolépticos del vino como el realizado por Chira K. et al., (2013 a) han observado que la intensidad del amargor y la astringencia del vino disminuyeron durante el tiempo de contacto con la madera. Esta reducción en la sensación de astringencia seguramente podría ser causada por la formación de un complejo químico entre taninos del vino, polisacáridos y péptidos, o incluso debido a las reacciones entre los elagitaninos de la madera y las moléculas de vino.

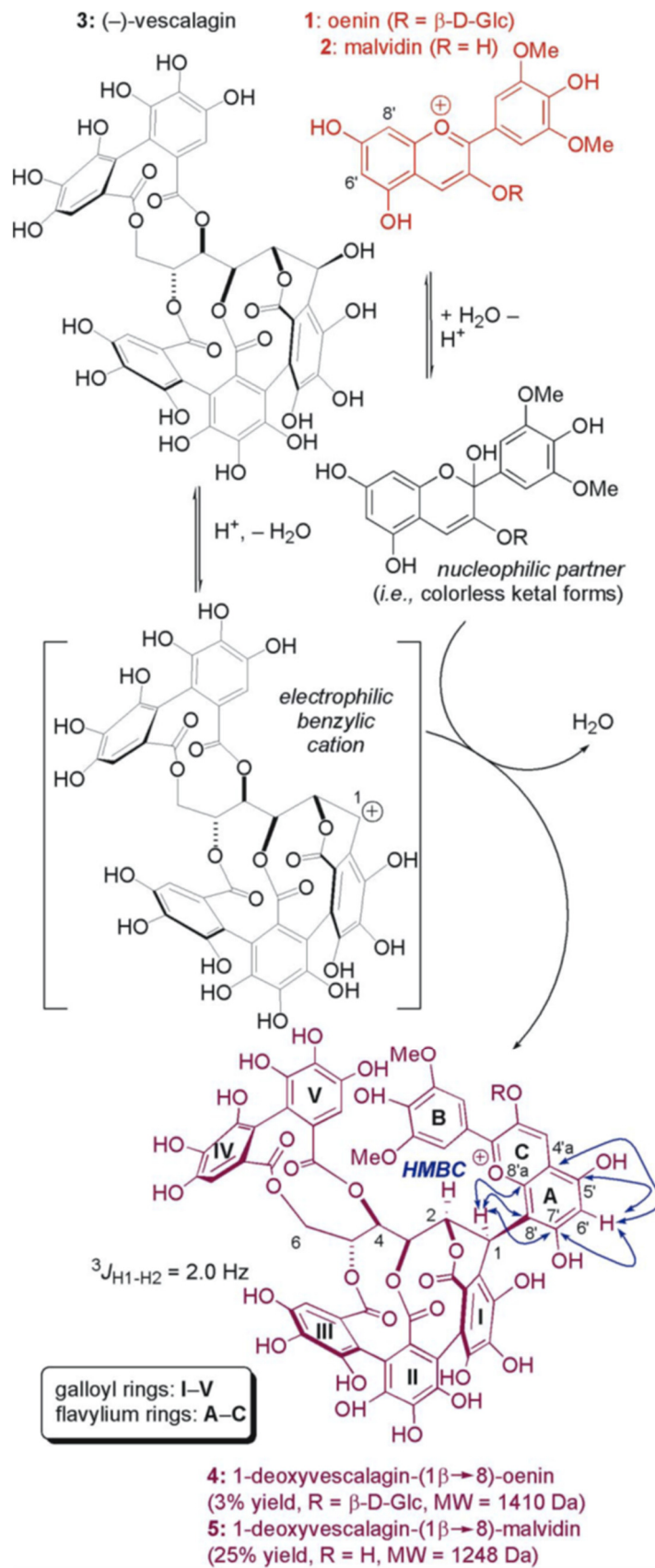


Fig. 4 Esquema de los productos de condensación entre antociano-vescalagine (Chassaing et al, 2010)

6. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

Muchos métodos analíticos han sido utilizados para cuantificar taninos en materiales vegetales. Métodos comúnmente usados incluyen: Cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) son las dos técnicas más comunes en la separación de taninos, Aunque es resulta ser un método rápido, la TLC no es considerado generalmente como un método cuantitativo. En comparación con TLC, HPLC es una herramienta poderosa y ha sido utilizado con éxito en la separación y cuantificación de elagitaninos (Bianco et al, 1998; Peng et al, 1991). Pocos estudios han abordado directamente el protocolo de extracción y cómo se modifica los rendimientos elagitaninos. Generalmente estos se centran en la optimización de las condiciones de separación tales como la elección de las fases móviles y condiciones de gradientes (Bianco et al, 1998; Peng et al, 1991). No todos los elagitaninos se pueden quitar de la madera por extracción con disolvente (Peng et al., 1991).

La recolección inicial, los métodos de secado y extracción tienen efectos significativos en el análisis de elagitaninos, es así que los métodos de determinación de los taninos presentes en madera para tonelería y en vinos de crianza, son complejos debido a la dificultad en la preparación de la muestra y en la detección de los compuestos de interés. A continuación se hará referencia a diferentes trabajos encontrados en cuanto a los métodos de preparación de muestra tanto de madera y de vino, y en cuanto a los métodos de determinación de estos compuestos en madera y en vino.

6.1 Extracción de compuestos de la madera

La preparación de la madera para análisis es un proceso fundamental para obtener datos reales, debido a que la necesidad de realizar la completa extracción de taninos en estudio para poder determinar las cantidades presentes en la muestra. En la tabla 4 se presentan distintos compuestos extractantes empleados por los diferentes autores, al igual que el tipo y formato de la muestra de madera.

Tabla. 4 Extracción de compuestos de la madera

Autor	Madera	Formato	Extractante	Año
Peng S., et al.	4-5	Polvo/molido	H ₂ O	1991
Catherine L. M., et al	1	Polvo/molido	Me ₂ CO	1991
Viriot C., et al.	4-5	Polvo/molido	MeOH / H ₂ O H ₂ O / Me ₂ CO	1994
Klumpers J., et al.	1-4	Liofilizada	H ₂ O / Me ₂ CO	1994
Masson G., et al.	1-4	Polvo/molido	H ₂ O / Me ₂ CO	1994
Vivas N., et al.	1-3-4-5-6-7-8	Liofilizada	Me ₂ CO / H ₂ O	1995
Biancoa M.A., et al.	roble, pino, abeto, castaño y acacia	Polvo/molido	MeOH/ H ₂ O	1997
Bianco M. A., et al.	1-3-5-9	Polvo/molido	MeOH	1998
Mämmelä P., et al.	1-3	Polvo/molido	MeOH / H ₂ O	2000
Vivas N., et al.	1	Liofilizada	MeOH / HCL	2004
Françoise Nonier M., et al.	4	Molido	Me ₂ CO / H ₂ O	2005
Vivas N	1-4-5-6-7-8-10	Polvo/molido	Me ₂ CO / H ₂ O	2005
Michel J., et al.	1-4	Polvo/molido	Me ₂ CO / H ₂ O	2011
Jordão A, M., et al.	2-3-4	Astillas	H ₂ O / Me ₂ CO	2011

Maderas: 1- *Quercus robur*, 2- *Quercus pyrenaica*, 3- *Quercus alba*, 4- *Quercus petraea*, 5- *Castanea sativa*, 6- *Quercus farnetto*, 7- *Quercus stellata*, 8- *Quercus oocapa*, 9- *Juglas nigra*, 10- *Quercus toza*.

Desde el los años 1990 se han empleado extractantes muy similares, siendo actualmente mezclas como agua y acetona las más empleadas debido a su gran capacidad de extracción, en comparación con otras mezclas como: metanol y ácido clorhídrico empleada por Vivas N., et al. (2004), que se fundamentan en la hidrólisis ácida de los elagitaninos en un baño de agua, midiendo la presencia de ácido elágico. O mezclas de metanol usadas por Bianco M., et al. (1998) debido a que el metanol tiende a ser el mejor disolvente para taninos de bajo peso molecular (Mueller-Harvey, 2001). Y agua propuestas por Peng S., et al. (1990). En este último demuestran la disminución de la concentración de taninos solubles en madera, debido a una insolubilidad producida por una oxidación lenta, lo que conduce a una polimerización o co-polimerización con los componentes de la pared celular. En trabajos como el realizado por Viriot C., et al. (1994), ponen de manifiesto que la mezcla de acetona: agua o metanol: agua resulta eficaz para la extracción de taninos provenientes de la madera, ya que la gran mayoría de estos extractos son polifenoles hidrosolubles.

6.2 Método de determinación de taninos de la madera

La tabla 5 recoge información relevante hallada sobre los métodos de determinación de los taninos presentes en la madera mediante análisis por HPLC. Además se indica el tipo de muestra analizada, el detector empleado en el equipo HPLC así como la fase móvil y los compuestos establecidos en cada una de las investigaciones efectuadas.

Tabla. 5 Determinación de los taninos en la madera

Autor	Muestra	Método	Fase Móvil	Compuestos	Año
Peng S. et al	4-5	280 nm	A: H ₂ O / H ₃ PO ₄ B: MeOH / H ₃ PO ₄	1	1991
Catherine L. M. et al.	1	240/ 400 nm	A: H ₂ O / H ₃ PO ₄ B: MeOH / H ₃ PO ₄	1-2-3	1991
Viriot C. et al.	4-5	370nm	A: H ₂ O / H ₃ PO ₄ B: MeOH	1-2-3-6	1994
Klumpers J. et al.	1-4	-	A: H ₂ O B: MeOH / H ₂ O	2	1994
Masson G. et al.	1-4	240nm	A: H ₂ O / H ₃ PO ₄ B: MeOH	3-7	1994
Vivas N. et al.	1-3-4-5-6-7-8	220/ 230 nm	A: H ₂ O / H ₃ PO ₄ B: MeOH / H ₃ PO ₄	1-2-8-9	1995
Biancoa M.A, et al.	Roble, Pino, Abeto, Castaño Y Acacia	-	MeOH / Na ₂ SO ₄	8-9-10	1997
Bianco M. A. et al.	1-3-5-9	254nm	MeOH	8	1998
Mämmelä P, et al.	1-3	Masas	A: MeOH / 1% CH ₂ O ₂ B: H ₂ O / 1% CH ₂ O ₂	1-2-7	2000
Vivas N. et al.	1	370 nm	A: H ₂ O / H ₃ PO ₄ B: MeOH / H ₃ PO ₄	Elagitaninos Solubles, 8	2004
Françoise Nonier M., et al.	4	280nm	A: H ₂ O/H ₃ PO ₄ B:MeOH/H ₃ PO ₄	Elagitaninos	2005
Vivas N	1-4-5-6-7-8-10	-	A: H ₂ O / H ₃ PO ₄ B: MeOH / H ₃ PO ₄	Elagitaninos Solubles	2005
Michel J. et al.	1-4	280 nm	A: H ₂ O / CH ₂ O ₂ B: MeOH / CH ₂ O ₂	1-2-3-4-5-6-7-11	2011
Jordão A, M. et al.	2-3-4	280 nm	A: H ₂ O / H ₃ PO ₄ B: MeOH	3-4-5-8	2011

Compuestos: 1- Castalagina, 2- Vescalagina, 3- Roburina A, 4- Roburina B, 5- Roburina C, 6- Roburina D, 7- Roburina E, 8- Ácido Elágico, 9- Ácido Gálico, 10- Ácido Vanílico, 11- Grandinina.

Maderas: 1- *Quercus robur*, 2- *Quercus pyrenaica*, 3- *Quercus alba*, 4- *Quercus petraea*, 5- *Castanea sativa*, 6- *Quercus farnetto*, 7- *Quercus stellata*, 8- *Quercus oocapa*, 9- *Juglas nigra*, 10- *Quercus toza*.

La gran mayoría de los análisis para determinar los compuestos presentes en la madera se basan en métodos de HPLC equipados con detectores UV con frecuencias entre los 240 a 400nm, además empleando como fase móvil solventes en gran parte soluciones de agua : ácido fosfórico y metanol : ácido fosfórico. Estudios de Peng J., et al. (1991), Klumpers J., et al. y Viriot C., et al. (1994) han afirmado que las concentraciones de elagitaninos en el duramen de roble (*Quercus robur* y *Quercus petraea*) disminuyen con el aumento de ácido elágico libre y elagitaninos insolubles en robles de edad. Otros autores evalúan la inestabilidad de los diferentes elagitaninos durante el secado natural de madera de roble, proceso de secado de maderas al aire libre a temperatura ambiente (Cadahia et al., 2001). Estos mismos autores mencionan que una disminución más rápida de los elagitaninos se produce a temperaturas elevadas, como las alcanzadas durante el tostado de la madera de roble.

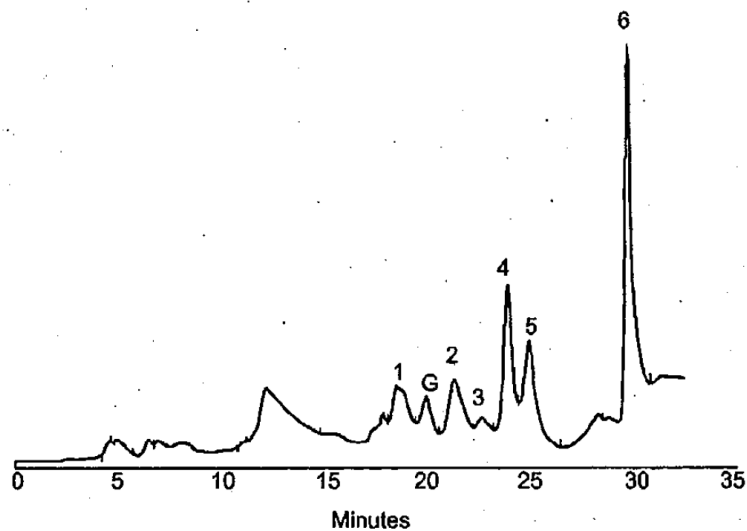


Fig. 5 Cromatograma de los elagitaninos procedentes de madera de *Quercus pyrenaica* Willd. (1)-roburinas A-B-C, (2)-grandinina, (3)-roburina, (4)-vescalagina, (5)- roburina E, (6)-castalagina, (7)-ácido gálico. (Jordao et al 2007)

6.3 Extracción de compuestos de la madera presentes en vino

Al igual que la madera, la preparación del vino es fundamental para obtener información sobre los compuestos que son cedidos por la madera. En la tabla 6 se muestra una recopilación de los extractantes empleados en varios análisis realizados a vinos envejecidos en madera

Tabla. 6 Extracción de compuestos presentes en vino

Autor	Muestra De Vino	Extractante	Año
Vivas N., et al.	Cabernet Sauvignon	MeOH/HCl	1996
Saucier C., et al.	Burdeos	H ₂ O	2006
García-Estévez I., et al.	Graciano, Tempranillo	CH ₃ -COOH / H ₂ O	2010
Jourdes M., et al.	Merlot , Cabernet Sauvignon	H ₂ O/CH ₃ -COOH	2011
Michel J., et al.	Merlot , Cabernet Sauvignon	MeOH	2011
Chira K et al.	Burdeos	MeOH	2013

Autores como Saucier C., et al. (2006) y Jourdes M., et al. (2011) sugieren que la preparación previa de la muestra antes del análisis debe incluir una etapa de concentración a bajas presiones y con posterior dilución en medios acuosos ácidos para eliminar compuestos altamente polares tales como el ácido tartárico y glicerol. En el trabajo realizado por García-Estévez I., et al. (2010) en vinos moscatel, hacen uso de un doble fraccionamiento de la muestra para el aislamiento de compuestos conjugados de ácido elágico y polifenoles.

6.4 Método de determinación de taninos de la madera presentes en vino

En la tabla 7. Se cita algunos métodos empleados para la detección de los compuestos cedidos por la madera, los compuestos hallados, y la fase móvil empleada en la detección.

Tabla. 7 Determinación taninos cedidos por la madera al vino

Autor	Muestra	Metodo	Fase Movil	Compuestos	Año
Vivas N., et al.	Cabernet Sauvignon	220-230 nm	MeOH / H ₂ O	Elagitaninos	1996
Saucier C., et al.	Burdeos	masas (280nm)	MeOH / H ₂ O	Elagitaninos	2006
García-Estévez et al.	Graciano, Tempranillo	HPLC-DAD	- H ₂ O/CH ₃ -COOH - C ₃ H ₈ O	Vescalagina Castalagina	2010
Jourdes M., et al.	Cabernet Sauvignon, merlot.	220-230 nm	- H ₂ O-HCOOH - MeOH-HCOOH	C-Glicosídicos Elagitaninos	2011
Michel J., et al.	Merlot, Cabernet Sauvignon	280nm	H ₂ O / CH ₃ -COOH	Castalagina Vescalagina	2011
Chira K., et al.	Burdeos	370 nm	- H ₂ O / H ₃ PO ₄ - MeOH/H ₃ PO ₄	Elagitaninos	2013

En investigaciones realizadas por Vivas N., et al. (1996) definen que para determinar los elagitaninos totales encontrados en vinos madurados en madera es necesario emplear una mezcla de metanol ácido clorhídrico, la cual libera cantidades variables de ácido elágico. La evaluación de este proceso de liberación indica que los elagitaninos se solubilizan durante los primeros meses de maduración del vino en la bodega, y después su contenido disminuye rápidamente, debido a las reacciones de oxidación-reducción que ocurren durante el envejecimiento. Asimismo Michel J., et al. (2012) y Chira K., et al. (2013) expresan que en casi todos los vinos se obtiene una extracción máxima de elagitaninos después los primeros meses en contacto con la madera, posteriormente se observa una disminución de estos compuestos con el tiempo de maceración o envejecimiento. Por lo tanto, cuando la mayor parte de los elagitaninos se han extraído de los primeros milímetros de la madera, la solución vino tinto continúa accediendo a capas más profundas de la madera para extraer más elagitaninos a un ritmo más lento de extracción, lo que supone que la concentración global de elagitaninos se mantendría estable en el tiempo.

Los elagitaninos se pueden cuantificar mediante el uso de HPLC de fase inversa, este método se ha usado para la separación de taninos hidrolizables de peso molecular bajo. Varios métodos de detección se han aplicado en conjunción con HPLC para la determinación de elagitaninos como la detección ultravioleta (UV), siendo el más utilizado (Peng et al, 1991; Bianco et al, 1998; Viriot et al, 1994). Sin embargo, el uso de HPLC junto con diversos métodos de detección, sin duda, seguirá aumentando y jugará un papel importante en la elucidación de la complejidad de taninos hidrolizables.

La siguiente figura muestra el perfil HPLC/MS de la fracción de elagitaninos presentes en un vino tinto envejecido (Saucier et al, 2006).

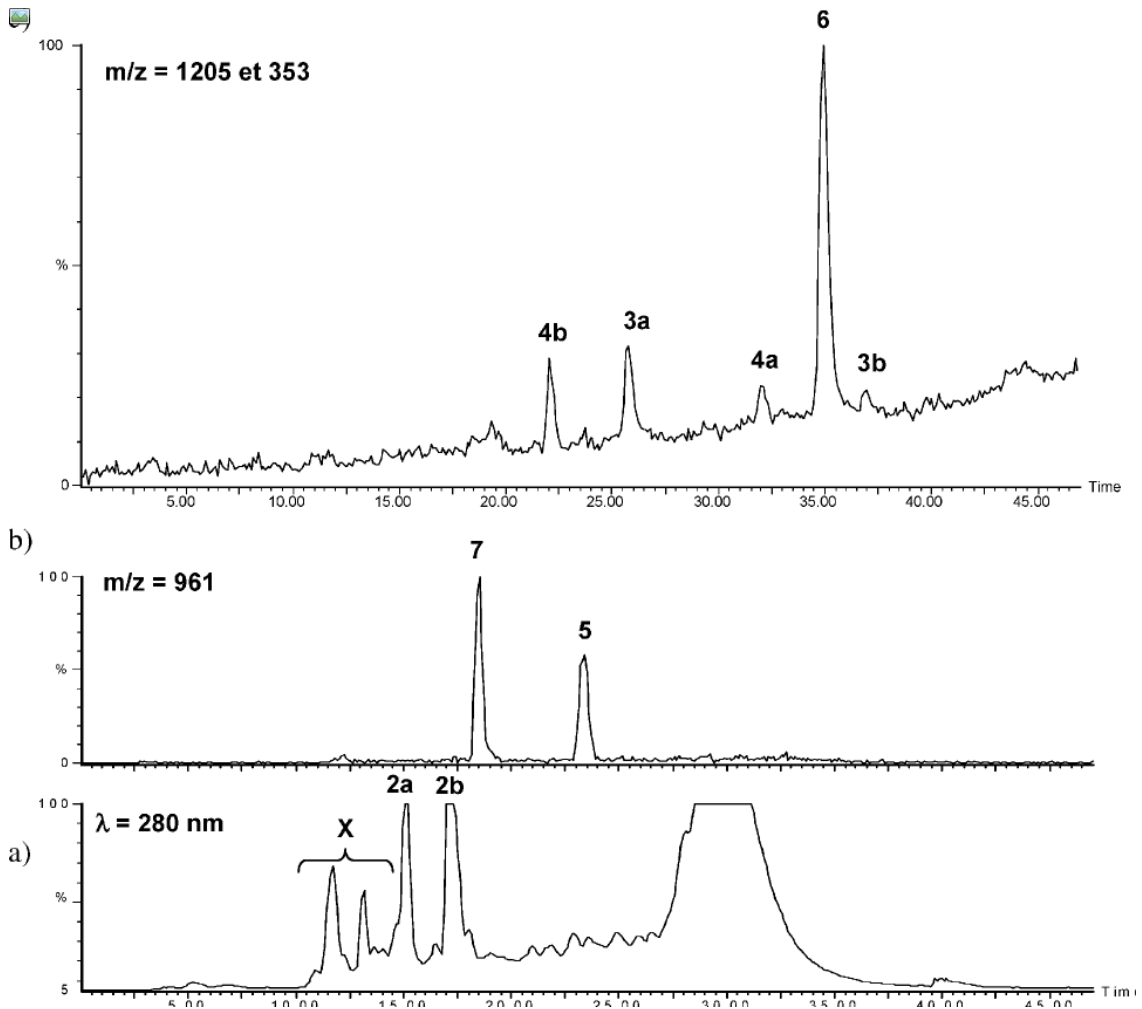


Fig. 6 perfil HPLC/MS de la fracción de elagitaninos presentes en un vino tinto envejecido (a) detección a 280 nm UV; (b) señal (m/z) 961; (c) señal (m/z) 1205-353 (X)- roburinas A-C + grandinina; (2a)-vescalagina;(2b)-castalagina; (5)-1-O-ethylvescalagin; (7), compuesto desconocido, (3a/b)- acutissiminas, (4a/b)- epiacutissiminas; y (6)- ácido clorogénico (patrón interno). (Saucier et al, 2006)

El contenido encontrado en los vinos depende del tipo de madera empleada y del tipo de vino, en la siguiente figura se presenta la evolución de los elagitaninos obtenidos por Joudes et al, 2011 tras envejecer un vino tinto en barricas nuevas de roble Francés. Se observa que el elagitanino mayoritario es la castalagina seguida de la vescalagina, y que la concentración de todos ellos en el vino aumenta muy rápidamente en los 3 meses de envejecimiento en barricas. Posteriormente, su contenido en el vino disminuye posiblemente debido a los procesos de oxidación y condensación que sufren.

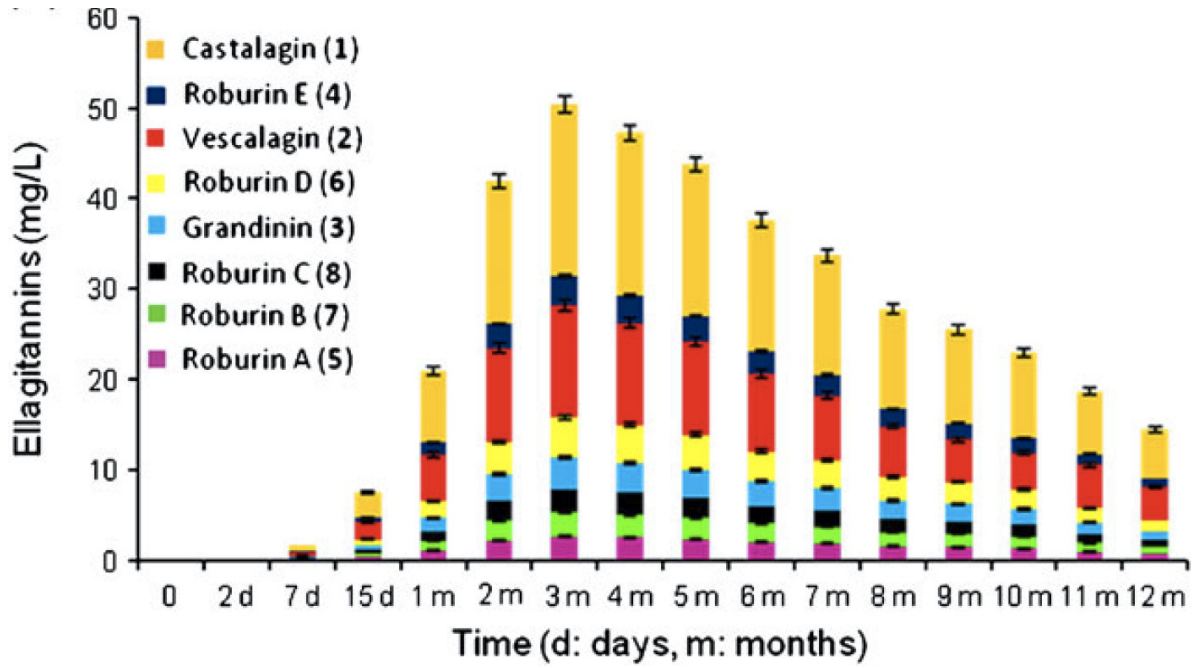


Fig. 7 Evolución de los elagitaninos durante el envejecimiento de un vino tinto en barricas nuevas de roble Francés (Jourdes et al,2011)

7. CONCLUSIONES

Los componentes de la madera en el vino, su variedad estructural, la complejidad y amplia distribución, son las principales dificultades que búsqueda de métodos selectivos para el análisis de los elagitaninos, para cuantificar los diversos compuestos presentes en madera, en especial los compuestos que son cedidos al vino. Investigadores de diferentes campos han dirigido su atención hacia la implementación de mejores metodologías para la extracción, purificación y detección de elagitaninos. Tratando la preparación de la muestra tanto de madera como de vino. Varios autores han coincidido que el uso de mezclas de como agua/metanol resultan ser eficaces para la extracción de taninos de la madera, siendo un factor muy importante la selección del extractante, para que permita una completa extracción de los taninos presentes en cada muestra. Para detectar y cuantificar las cantidades de los compuestos se han empleado mayoritariamente análisis por cromatografía de alto rendimiento (HPLC) equipado con detector Ultra Violeta y Masas, usando como fases móviles mezclas de solventes como agua:metanol, que han demostrado ser eficaces para separar la gran mayoría de estos compuestos que son polifenoles hidrosolubles y también los taninos hidrolizables de bajo peso molecular. Sin embargo se trata de procesos de preparación de muestra y cuantificación largos, por tanto todavía hay una necesidad general de técnicas analíticas capaces de ayudar al establecimiento de nuevos métodos, rápidos, precisos, eficaces para la identificación y cuantificación de los elagitaninos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Bianco, M. -, and Savolainen H. (1997). Phenolic acids as indicators of wood tannins. *Science of the Total Environment* 203. 79-82
- 2) Bianco, M. -, Handaji, A., and Savolainen, H. (1998). Quantitative analysis of ellagic acid in hardwood samples. *Science of the Total Environment*, 222(1–2), 123-126.
- 3) Cadahía, E., Fernández de Simón, B., Poveda, P., and Sanz M., (2008). Utilización de *Quercus pireaica* Willd. de Castilla y León en el envejecimiento de vinos. Comparación con roble francés y americano. Ed. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. España.
- 4) Cadahía, E., Varea, S., Muñoz L., Fernández de Simón, B, and Garcia-Vallejo, M C., (2001). Evolution of Ellagitannins in Spanish, French, and American Oak Woods during Natural Seasoning and Toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., 49, 3677-3684
- 5) Catherine, L. M., Herve Du Penhoat, Veronique, M. F., Michon, Ohassan A., Peng, S., Scalbert, A., and Gage, D., (1991). Roburin A, a Dimeric Ellagitannin from Heartwood of *Quercus robur*. *Phytochemistry*, Vol. 30, N°. 1, p p. 329-332.
- 6) Chira, K., and Teissedre, P. (2013 a). Extraction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profile of wine aged with french winewoods subjected to different toasting methods: Behaviour during storage. *Food Chemistry*, 140(1–2), 168-177.
- 7) Chassaing, S.; Lefeuvre, D.; Jacquet, R.; Jourdes, M.; Ducasse, L.; Galland, S.; Grelard, A.; Saucier, C.; Teissedre, P.-L.; Dangles, O.; Quideau, S., Physicochemical Studies of New Anthocyano-Ellagitannin Hybrid Pigments: About the Origin of the Influence of Oak C-Glycosidic Ellagitannins on Wine Color. *European Journal of Organic Chemistry* 2010, 2010, 55-63.
- 8) Chira, K., and Teissedre, P, L., (2013). Relation between volatile composition, ellagitannin content and sensory perception of oak wood chips representing different toasting processes. *European Food Research and Technology* 236:735
- 9) Fernández de Simón B, Cadahía E., (2007). Tratamiento de la madera de roble para tonelería centro de investigación forestal. *Revista enología* nº4. CIFOR-INIA. Madrid
- 10) Fernández de Simón, B., and Cadahía, E., (2009). Barricas de Roble Español ¿Un nuevo escenario? Centro de Investigación Forestal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid.
- 11) Françoise Nonier, M., Vivas, N., Vivas De Gaulejac, N., Absalon, C., Vitry, C., and Fouquet, E., (2005). Global fractionation of oak heartwood extractable polymers

- (lignins, polysaccharides and ellagitannins) by selective precipitations. *Journal of the Science of Food Agriculture* 85:343–353.
- 12) García M, P., (1997). Envejecimiento de vino tinto de la D.O. Tacoronte-Acentejo: influencia de la madera de roble y de las condiciones de vinificación en la evolución de parámetros físico-químicos de interés enológico y su impacto sensorial. Departamento de Ingeniería Química y T.F. Universidad de la Laguna. Tenerife España.
 - 13) García-Estévez, I., Escribano-Bailón, M, T., Rivas-Gonzalo, J, C., and Alcalde-Eon C., (2010) Development of a fractionation method for the detection and identification of oak ellagitannins in red wines. *Analytica Chimica Acta.* 660 171–176.
 - 14) González G. (2012). Tesina. Patologías Bióticas de la Madera De los Bosques Templados de Chile, a la Selva Atlántica de Misiones. Universidad del Bío-Bio Concepción Chile.
 - 15) Jordao, A.M., Ricardo-da-Silva, J.M., Laureano, O. (2011). Ellagitannins from Portuguese oak wood (*Quercus pyrenaica* Willd.) used in cooperage: influence of geographical origin, coarseness of the grain and toasting level. *Holzforschung* 61(2). 155-160.
 - 16) Jourdes M., Michel J., Saucier C., Quideau S., Teissedre P, L., (2011). Identification amounts and kinetics of extraction of C-glucosidic ellagitannins during wine aging in oak barrels or in stainless steel tanks with oak chips. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 401:1531–1539
 - 17) Khanbabaee, K. and Van Ree, T., (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports Articles* 18 (6): 641 – 649
 - 18) Klumpers, J., Scalbert, A., and Janin, G. (1994). Ellagitannins in european oak wood: Polymerization during wood ageing. *Phytochemistry*, 36(5), 1249-1252.
 - 19) Mämmelä, P., Savolainen, H., Lindroos, L., Kangas, J., and Vartiainen, T. (2000). Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 891(1), 75-83.
 - 20) Masson, G., Puech, J., and Moutounet, M. (1994). Localization of the ellagitannins in the tissues of *quercus robur* and *quercus petraea* woods. *Phytochemistry*, 37(5), 1245-1249.
 - 21) Michel, J., Jourdes, M., Silva, M. A., Giordanengo, T., Mourey, N., and Teissedre, P., (2011). Impact of Concentration of Ellagitannins in Oak Wood on Their Levels and Organoleptic Influence in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 59, 5677–5683.

- 22) Michel J., Jourdes M., Silva M., and Teissendré L, P., (2012). Oak Ellagitannins Concentration Influences Organoleptics of Red Wine. Université de Bordeaux. Journal of Agricultural and Food Chemistry..
- 23) Moreno Vigara J., Peinado Amores R., 2010. Química Enológica. Ed. AMD Ediciones. España.
- 24) Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. Animal Feed Science and Technology, 91(1–2), 3-20.
- 25) Peng, S., Scalbert, A., and Monties, B. (1991). Insoluble ellagitannins in castanea sativa and quercus petraea woods. Phytochemistry, 30(3), 775-778.
- 26) Puech, J, L., Feuillat, F., and Mosedale, J. R., (1999). The Tannins of Oak Heartwood: Structure, Properties, and Their Influence on Wine Flavor. American Journal of Enology and Viticulture., Vol. 50, No. 4.
- 27) Saucier, C., Jourdes, M., Glories, Y., and Quideau S., (2006). Extraction, Detection, and Quantification of Flavano-Ellagitannins and Ethylvescalagin in a Bordeaux Red Wine Aged in Oak Barrels. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 54, 7349-7354 7349
- 28) Viriot, C., Scalbert, A., Catherine, L. M. Herve Du Penhoat., and Moutounet, M., (1994). Ellagitannins In Woods of Sessile Oak and Sweet Chestnut Dimerization and Hydrolysis During Wood Ageing Phytochemistry. Vol. 36, No 5. pp. 1253 1260.
- 29) Vivas, N., (2005). Manual de tonelería destinado a usuarios de toneles. Ed. Ediciones Mundi-Prensa. España.
- 30) Vivas, N., and Glories, Y., (1996 a). Role of Oak Wood Ellagitannins in the Oxidation Process of Red Wines During Aging. American Journal of Enology and Viticulture., Vol. 47, No. 1.
- 31) Vivas, N., Glories, Y., Bourgeois, G., and Vitry, C., (1996). The haertwood ellagitannins of different oak (Quercus sp) and Chestnut species (Castenea sativa Mill) Quantity analysis of red wines aging barrels. Journal des sciences et techniques de la tonnellerie 2, 51-75. France.
- 32) Vivas, N., Laguerre, M., Glories, Y., Bourgeois, G., and Vitry, C., (1995). Structure Simulation of Two Ellagitannins from Quercus Robur L. Phytochemistry, Vol. 39, No. 5, pp. 1193 1199, Elsevier Science Ltd. Talence, France
- 33) Vivas N., Nonier M, F., Vivas de Gaulejac N., Pianet I., 2004. Occurrence and partial characterization of polymeric ellagitannins in Quercus petraea Liebl. and Q. robur L. wood. Comptes Rendus Chimie, 945–954. Talence, France.