



## Trabajo Fin de Grado

Estudio de la variabilidad en los vinos con respecto a la reaccionabilidad de los aldehídos de Strecker y la acumulación de acetaldehído en condiciones de oxidación.

Autor

Alejandro Rivas Paño

Directora

Ana Escudero Carra

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA



FACULTAD DE CIENCIAS  
2020



## **Resumen**

Las propiedades sensoriales color, sabor y aroma del vino experimentan alteraciones químicas durante el envejecimiento oxidativo del mismo. El papel que desempeñan el acetaldehído y los aldehídos de Strecker durante este proceso es crucial. Su acumulación es la causa del característico aroma a oxidación.

El trabajo estudia la acumulación de acetaldehído y aldehídos de Strecker en 8 vinos tintos, 2 blancos y dos rosados al someterlos a un proceso de oxidación controlado. Se caracterizaron los vinos antes y después de consumir una cierta cantidad de oxígeno. Los análisis de los aldehídos se llevaron a cabo mediante derivatización seguida de una cromatografía líquida y detector ultravioleta-visible en el caso del acetaldehído y una cromatografía de gases y espectrómetro de masas en el caso de los aldehídos de Strecker.

Los resultados indican que solo algunos aldehídos de Strecker, como el metional, se acumula en todos los vinos. Sin embargo, otros aldehídos, como el acetaldehído, dependiendo del vino se acumula, permanece constante o incluso disminuye su concentración tras la oxidación. En los vinos tintos la acumulación de acetaldehído está relacionada positivamente con la cantidad de O<sub>2</sub> no SO<sub>2</sub> consumida y negativamente por el tiempo de incubación, mientras que en el caso de blancos y rosados parece estar relacionada con el SO<sub>2</sub> total inicial del vino. El metional también muestra patrones de acumulación distintos en los vinos tintos, blancos y rosados. En los primeros la acumulación es mayor que la observada en los vinos blancos y rosados.

## **Abstract**

The sensory properties of wine color, flavor and aroma undergo chemical alterations during oxidative aging. The role that acetaldehyde and Strecker aldehydes play during this process is crucial. Its accumulation is the cause of the characteristic oxidation aroma.

The work studies the accumulation of acetaldehyde and Strecker aldehydes in eight red wines, two white and two rosé when subjecting them to a controlled oxidation process. The wines were characterized before and after consuming a certain amount of oxygen. the analysis of the aldehydes was carried out by derivatization followed by a liquid chromatography and ultraviolet-visible detector in the case of acetaldehyde and a gas chromatography and mass spectrometer in the case of Strecker's aldehydes.

The results indicate that only some Strecker aldehydes, such as metional, accumulate in all wines. However, other aldehydes, such as acetaldehyde, depending on the wine, accumulate, remain constant or even decrease in concentration after oxidation. In red wines, the accumulation of acetaldehyde is positively related to the amount of SO<sub>2</sub> not O<sub>2</sub> consumed and negatively related to the incubation time, while in the case of white and rosé it seems to be related to the initial total SO<sub>2</sub> of the wine. Metional also shows distinct accumulation patterns in red, white and rosé wines. In the former, the accumulation is bigger than that observed in white and rosé wines.

# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Envejecimiento del vino .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Aroma a oxidación.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Antioxidantes (SO<sub>2</sub>) .....</b>	<b>2</b>
<b>1.4. Análisis de aldehídos .....</b>	<b>3</b>
<b>2. OBJETIVOS:.....</b>	<b>4</b>
<b>3. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Vinos .....</b>	<b>5</b>
<b>3.2. Método de análisis de acetaldehído.....</b>	<b>5</b>
<b>3.3. Método Rankine .....</b>	<b>6</b>
<b>3.4. Método de análisis de aldehídos de Strecker.....</b>	<b>7</b>
<b>3.5. Medida de oxígeno .....</b>	<b>10</b>
<b>3.6. Diseño de experimento .....</b>	<b>11</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1 Consumo de oxígeno .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2 Desulfitación de los vinos.....</b>	<b>14</b>
<b>4.3. Acumulación de acetaldehído en la oxidación .....</b>	<b>16</b>
<b>4.4 Acumulación de aldehídos de Strecker.....</b>	<b>21</b>
<b>4.5 Conclusiones .....</b>	<b>24</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>26</b>



## **1. INTRODUCCIÓN**

El vino es una matriz muy compleja con gran cantidad de compuestos volátiles. Solo unos pocos de estos tienen las características (volatilidad, concentración por encima del umbral de olfacción) para tener un impacto sobre nuestros sentidos. Cuando hablamos de aroma nos referimos a la combinación de compuestos aptos para interactuar con nuestros receptores sensoriales.

Tal y como sucede en el caso de otras bebidas alcohólicas, el vino además de alcohol contiene otros compuestos procedentes de la fermentación. Los ácidos grasos y sus ésteres etílicos, ácidos grasos ramificados y sus ésteres etílicos, acetoína, diacetilo o acetaldehído son ejemplo de ello<sup>1</sup>.

La variedad de la uva, el proceso de fermentación y el envejecimiento son claves para la definición del aroma.

El aroma del vino se desarrolla durante su envejecimiento, compuesto por dos etapas determinantes del resultado final. Una etapa oxidativa, donde el buqué se formará a base de acetaldehído y derivados aldehídicos. Y una etapa reductora en un ambiente protegido del aire. En ambas etapas el control del oxígeno es clave. Si el consumo es muy alto los vinos tintos pueden pardear y formar aldehídos de oxidación. Y si el contacto con el oxígeno es totalmente nulo y muy continuado, se pueden producir compuestos volátiles azufrados desagradables<sup>2</sup>.

### **1.1. Envejecimiento del vino**

El proceso del envejecimiento engloba una serie de transformaciones químicas que afectan al color, aroma y sabor. El tiempo de envejecimiento adecuado depende de diversos factores, como la uva, la cosecha o el origen. La duración del envejecimiento de los vinos tintos suele ser mayor que la de los rosados o blancos.

Normalmente la etapa oxidativa se produce en la bodega y la etapa reductora se produce en la botella.

Durante la primera etapa se produce oxidación. El vino entra en contacto con microdosis de oxígeno que atraviesan la madera de la bodega por sus poros. Como consecuencia, se disolverán en la matriz, oxidándose lentamente algunos componentes del vino. El resultado será cambios en su composición y características. Esta transformación se aprecia tanto en la variación de color, que cambia de un rojo cereza a un rojo teja en el caso de los tintos, como en el caso del aroma, que pierde las notas vegetales propias de vinos jóvenes y gana otras<sup>3</sup>.

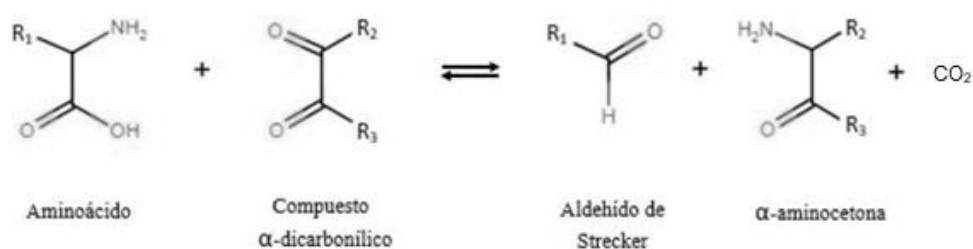
En lo que respecta a la etapa de reducción, nos encontraremos con un vino en casi ausencia de oxígeno. El corcho sellará el interior de la botella aislando el vino del aire, dejando pasar dosis mínimas de oxígeno. Esto proporciona valores mínimos del potencial de oxido-reducción después de meses del embotellado. Como consecuencia, se afinará el aroma y el sabor obtenido en la etapa anterior<sup>2</sup>.

## 1.2. Aroma a oxidación

El papel del oxígeno en la madurez del vino es fundamental. El consumo de oxígeno tiene efectos tanto positivos como negativos. El deterioro del aroma del vino provoca la desaparición de aromas frescos, por ejemplo, debido a la reacción entre mercaptanos polifuncionales y quinonas formadas en la oxidación. Otra de las consecuencias de este proceso es la formación de compuestos odorantes, como el fenilacetaldehído y el metional, que dotan al vino de los olores propios de la oxidación<sup>4-6</sup>.

La acumulación de los aldehídos de Strecker y el acetaldehído es la causa del aroma propio de los vinos oxidados. Esto sucede si la formación es muy acusada por tener el vino muchos precursores, por ejemplo, o cuando no hay especies capaces de reaccionar con los aldehídos ya formados.

Estos aldehídos se pueden obtener mediante la degradación de Strecker o a través de la oxidación de sus correspondientes alcoholes. La degradación de Strecker (ilustración 1) implica la reacción de un aminoácido del medio con un compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico. Como resultado se obtiene un aldehído con un carbono menos que el aminoácido, que se libera en forma de  $\text{CO}_2$ , y una  $\alpha$ -aminocetona<sup>7-9</sup>.



## 1.3. Antioxidantes ( $\text{SO}_2$ )

Son varios los antioxidantes que se pueden encontrar en el vino, ácido ascórbico, taninos, glutatión o sulfuroso. Este último es el más usado. En el vino se puede encontrar como libre o combinado. Al pH del vino el  $\text{SO}_2$  se encuentra mayoritariamente en forma de bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ), este mantiene sus propiedades antioxidantes, aunque su función como bactericida y fungicida es mucho menor que la del sulfuroso molecular. El bisulfito se combina con moléculas orgánicas que contienen el grupo carbonilo, como aldehídos y cetonas, formando  $\alpha$ -hidroxialquil sulfonatos. Principalmente, el bisulfito se combina con el acetaldehído de forma muy estable. La forma libre del  $\text{SO}_2$  se encuentra disuelta en forma de gas, a esta fracción también se la conoce como sulfuroso activo<sup>3,10-12</sup>.

Los aldehídos son compuestos altamente reactivos que pueden reaccionar con diferentes compuestos presentes en la matriz del vino, como el  $\text{SO}_2$ , formando aductos. Como resultado, los aldehídos quedan acomplejados y ya no son volátiles, y por tanto no forman parte del aroma. Los aductos formados se descomponen conforme el  $\text{SO}_2$  desaparece por oxidación, o reacción con otros componentes cuyas constantes de



formación sean más fuertes. Así es cómo los aldehídos vuelven a estar libres, formando parte del aroma. Tal y como citan Bueno y col <sup>4</sup>, en algunos estudios recientes se ha relacionado la tasa de acumulación de aldehídos en vino durante la oxidación, con los niveles de SO<sub>2</sub> combinado.

La cantidad de SO<sub>2</sub> presente en un vino se analizará mediante el método Rankine. Este método se basa en desplazar el sulfuroso en medio ácido a la forma SO<sub>2</sub> gas, que se transforma a ácido sulfúrico con peróxido de hidrogeno. Este se valorará posteriormente con hidróxido de sodio hasta viraje del indicador. El método Rankine nos permitirá obtener de esta manera información cuantitativa sobre el sulfuroso<sup>13</sup>.

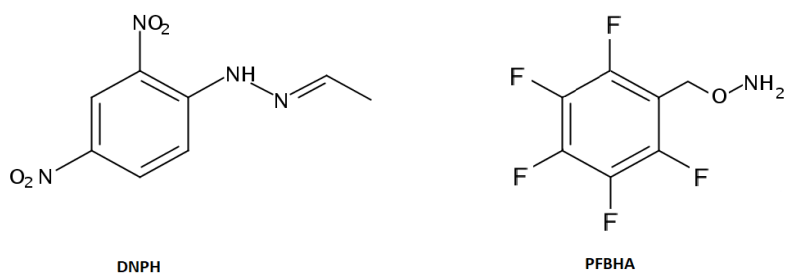
#### **1.4. Análisis de aldehídos**

La naturaleza reactiva, volátil y polar de los aldehídos los convierte en una especie particularmente difícil de tratar para su cuantificación directa. Sus propiedades cromatográficas, y de espectrometría de masas, poco favorables provocan colas y solapamientos<sup>14</sup>.

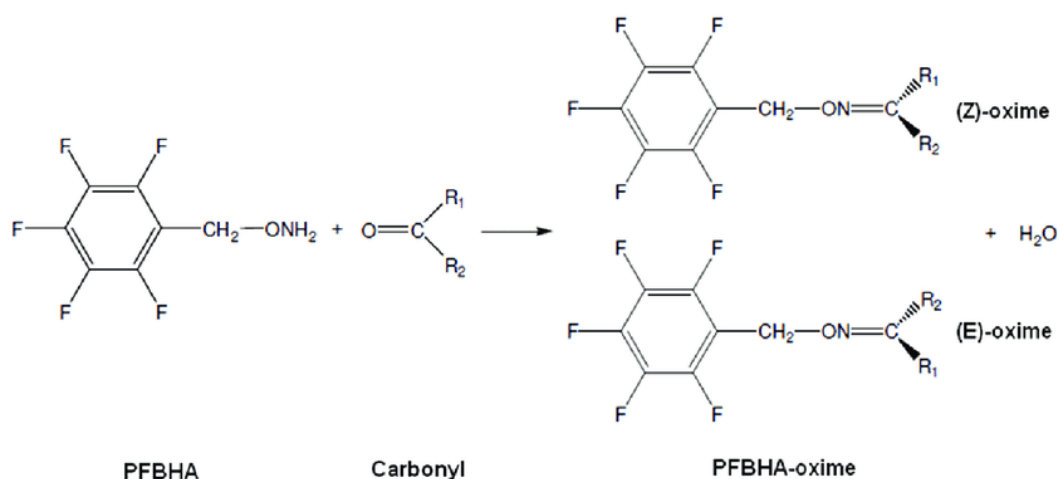
En el caso que nos ocupa, el vino no solo presenta los problemas asociados a esta familia, sino que además posee una matriz con gran contenido alcohólico y de compuestos carbonílicos, como es el caso del ácido pirúvico<sup>15</sup>. Por todo ello, para conseguir cuantificarlos correctamente deberemos someterlos a una derivatización. Con esto, lograremos convertirlos en especies menos polares y con mayor peso molecular <sup>16</sup>. En virtud de este propósito, nos apoyaremos en agentes derivatizantes que a través de una reacción con el analito modifiquen sus propiedades, inicialmente problemáticas. Los agentes más utilizados son 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) y el o-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina (PFBHA).

El DNPH (ilustración 2) se utiliza en los casos en los que se requiera separar mediante cromatografía líquida de alta resolución, y el PFBHA para la separación mediante cromatografía de gases. Para este último se pueden usar detectores como el de ionización a la llama (FID), por captura electrónica (ECD), o por espectrometría de masas (MS).

Con el fin de analizar los aldehídos de Strecker, en nuestro experimento, se realizó una extracción en fase solida (SPE) junto con una derivatización con PFBHA (ver ilustración 3). Como método de análisis se utilizó un instrumento de GC-MS.



**Ilustración 2.** Agentes derivatizantes de aldehídos más utilizados



**Ilustración 3.** Reacción de derivatización con PFBHA

Por el contrario, para la determinación de acetaldehído, el derivatizante usado es DNP, y para el análisis el instrumento fue un HPLC con detector UV.

## 2. OBJETIVOS:

El objetivo principal es el estudio de la variabilidad en los vinos con respecto a la reaccionabilidad de los aldehídos de Strecker y la acumulación de acetaldehído en condiciones de oxidación.

Los objetivos más específicos son:

- Control de la oxidación mediante medidas de oxígeno disuelto
- Análisis de contenido de acetaldehído en diferentes muestras de vino
- Análisis de aldehídos de Strecker en diferentes muestras de vino
- Análisis del contenido de sulfuroso de los vinos.

- Adquisición de competencias en el laboratorio mediante el aprendizaje de nuevas técnicas de tratamiento de muestra, control de oxígeno disuelto y cromatografía.
- Revisión bibliográfica, búsqueda en bases de datos y familiarización con software relacionado.
- Participación en un grupo de investigación y adquisición de competencias para el trabajo en equipo con otros compañeros.

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 Vinos

Los vinos usados en este experimento fueron todos comerciales (Tabla 1). Dos vinos blancos de la variedad Viura (2018); dos vinos rosados (2018) de variedades Garnacha y mezcla de Garnacha, Tempranillo, Merlot y Cabernet-Sauvignon; 4 tintos jóvenes de variedad Garnacha y Tempranillo (2018) y 4 tintos Reserva (2008-2015) de variedades Garnacha, Tempranillo y Cariñena.

Código	Nombre del vino	denominación de origen o región	Variedad de la uva	Tipo de vino	Cosecha
CV	Castillo Viñaral	Cariñena	60% Garnacha, 20% Tempranillo, 20% Cariñena	Tinto	2008
DM	Dama de Oro	Zamora	Tempranillo	Tinto	2012
CL	Castillo San Lorenzo	Rioja	Tempranillo	Tinto	2013
VF	Valdeflor	Campo de Borja	Garnacha	Tinto	2015
MT	Matsu "El Pícaro"	Toro	Tempranillo	Tinto	2018
FP	Federico Paternina	Rioja	Tempranillo	Tinto	2018
BG	Baltasar Gracián El político	Calatayud	Garnacha	Tinto	2018
RB	Ruberte Garnacha	Campo de Borja	Garnacha	Tinto	2018
VT	Viña Temprana	Campo de Borja	Viura	Blanco	2018
VM	Viña Miedes	Calatayud	Viura	Blanco	2018
VMG	Viñas Miedes Garnacha	Calatayud	Garnacha	Rosado	2018
GF	Gran Feudo	Navarra	Garnacha, Tempranillo, Merlot, Carbenet y Syrah	Rosado	2018

*Tabla 1. Vinos utilizados y sus características*

#### 3.2. Método de análisis de acetaldehído

Tal y como hemos comentado con anterioridad, el acetaldehído necesitará ser derivatizado previamente debido a los problemas cromatográficos inherentes al analito. Con este propósito, realizaremos el análisis utilizando un instrumento de HPLC con detector UV.

##### Disoluciones:

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25%
- Disolución de derivatizante
- Disolución de SO<sub>2</sub>
- Disolución madre de 5000ppm de acetaldehído

### Procedimiento:

Utilizaremos el método de patrón externo para llevar a cabo la calibración. Para ello, deberemos construir una recta de calibrado a partir de las medidas de disoluciones con concentraciones diferentes perfectamente conocidas del analito (preparadas a partir de una disolución madre de 5000ppm). En el caso que nos ocupa, vino sintético al que añadiremos acetaldehído y procederemos a derivatizar y analizar como las muestras.

En primer lugar, prepararemos la disolución de derivatizante. Para ello, pesaremos 160 mg de DNPH, al que se le añadirá 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96%. Utilizaremos un ultrasonido como apoyo para disolver la mezcla, obteniendo con seguridad la disolución completa.

A continuación, añadiremos la disolución anterior a una mezcla de 15,6 mL de EtOH y 4,4 de agua miliQ, que finalmente se filtrará para retirar cualquier impureza sólida.

Para la preparación de la muestra tomaremos 100 µL de vino, a los que añadiremos 20 µL de SO<sub>2</sub> (1120ppm), 20 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 25% y 140 µL de la disolución de derivatizante. Posteriormente, agitaremos la mezcla y se incubará a 65 °C durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, utilizaremos un baño de hielo para enfriar la mezcla.

En tercer lugar, añadiremos 280 µL de fase móvil (45% ácido fórmico 0,5% y 55% acetonitrilo), y lo filtraremos a través de un filtro de 0,45 micras para eliminar todo tipo de impurezas que puedan dañar el equipo.

Finalmente, llevaremos a cabo la cromatografía con una columna Green Core Shell (150 x 3 mm x 2,6 µm) acoplada a una precolumna Guard Column C18 Violet Label Supelco 51177-u de 1 cm de longitud. En cuanto a la longitud de onda del detector de UV, esta será de 365nm. Trabajaremos en gradiente, siendo el eluyente A: ácido fórmico al 0,5% y el B: acetonitrilo. Empezaremos por una concentración 45A/55B durante 5 minutos, a la que le seguirá otra de 5A/95B durante 3 minutos y, finalmente, una concentración 45A/55B durante 4 minutos. El flujo de la fase móvil será de 0,75 mL/min y el volumen de inyección de 5µL.

### **3.3. Método Rankine**

#### Disoluciones

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%
- Indicador (mezcla de azul de metileno-rojo de metilo 1:2 en etanol al 50%)
- Disolución de NaOH 0,01 M
- Disolución de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 25%

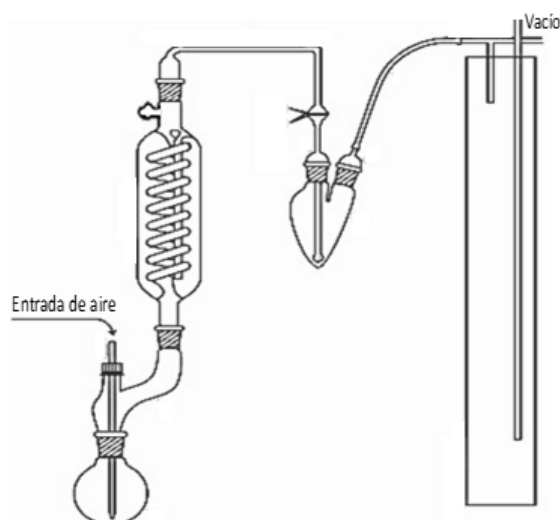
#### Procedimiento

Para la determinación del sulfuroso combinado, colocaremos 10 mL de muestra en un matraz de fondo redondo. Añadiremos sobre la muestra 5 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 25%.

Por otro lado, prepararemos el matraz corazón introduciendo 3 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  junto con dos gotas de indicador. Posteriormente, añadiremos unas gotas de la disolución de  $\text{NaOH}$  0,01M hasta que se consiga un color verde en el matraz corazón, color punto de partida del borboteo para analizar el sulfuroso de la muestra.

Una vez preparados ambos matraces, los incorporaremos al sistema empalmando sus bocas y sujetándolos con pinzas para asegurar la unión. Abriremos la llave del grifo para la refrigeración y colocaremos una manta térmica debajo del matraz redondo, sin llegar a estar en contacto con el fondo de este.

Por último, abriremos la llave de vacío para que los gases generados recorran el circuito borbotando en el matraz corazón.



*Ilustración 4. Montaje Rankine para la determinación de sulfuroso libre y combinado.*

Durante este proceso, en el matraz redondo se libera  $\text{SO}_2$ . Al llegar al matraz corazón, este se oxida por efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  generando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  que cambia el pH de la disolución contenida en este. El cambio de pH se evidencia con el cambio de color, pasando de verde a morado. Tras transcurrir 15 minutos desde que empiece a borbotear desconectaremos el vacío y valoraremos la disolución del matraz corazón con una disolución de  $\text{NaOH}$  0,01M, hasta el cambio de color a verde.

El volumen gastado será anotado y multiplicado por 32, valor obtenido a partir de la estequiometría de la reacción de neutralización, 1:2, y de la masa molar del  $\text{SO}_2$ . De esta manera obtendremos la concentración de sulfuroso total en la muestra, expresado en mg/L<sup>14</sup>.

### 3.4. Método de análisis de aldehídos de Strecker

Se quiere conocer la concentración de aldehídos de Strecker en los vinos antes y después del proceso de oxidación, mediante un proceso de extracción en fase sólida (SPE). Dicho proceso consiste en la retención de los analitos en un lecho adsorbente para su posterior análisis.

### Preparación de disoluciones

El método de análisis de aldehídos de Strecker requiere una adecuación previa de los analitos, además de la preparación de las disoluciones y de los cartuchos para la extracción. Derivatizar los analitos será imprescindible para mejorar la selectividad y sensibilidad del método. En virtud de este propósito, se preparará una disolución 10 g/L de PFBHA en agua destilada.

Por otra parte, la SPE requerirá tanto una disolución de vino sintético (H<sub>2</sub>O/EtOH 13% y ácido tartárico 5g/L a pH 3,5) para un acondicionamiento previo de los cartuchos como una disolución de lavado (disolución acuosa de metanol al 60% en volumen y 1% en masa en hidrogenocarbonato de sodio).

En último lugar, se preparará una única disolución de estándares internos (20 mg/L de fenilacetaldehído deuterado, 20 mg/L de metional deuterado, 20 mg/L 3-metilpentanal y 20 mg/L de 2-metilpentanal en etanol), además de una disolución de dopado con los cinco aldehídos de Strecker en concentración perfectamente conocida (20 mg/L de fenilacetaldehído, isobutiraldehído, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, y 10 mg/L de metional).

### Adición de estándares internos a las muestras

Se toman 12 ml de vino y se añaden 30 µL de disolución IS (20 ppm). En caso de ser una muestra dopada, se añade 120 µL de disolución de dopado. Todo este proceso ha de hacerse en anoxia para evitar la oxidación de las muestras con el oxígeno presente en el aire. Tras añadir a la muestra el dopado y la disolución IS, se lleva en vial de septum a un horno durante 5 horas a 50 °C para el equilibrado.

### Reacción de derivatización

Se añaden 360 µL de disolución de derivatizante a los viales con septum, perforándolo con una jeringuilla. Para que se produzca la reacción entre el derivatizante y los grupos carbonilos de los aldehídos, los viales se han de incubar a 35 °C durante 12 horas. El derivatizante, en nuestro caso PFBHA, reaccionará generando oximas durante el tiempo de incubación, que nos proporcionarán la señal en el cromatograma.

### Extracción en fase sólida

Para llevar a cabo la fase de extracción prepararemos un cartucho de 1 mL introduciendo un fritz y empujando hasta que haga tope al final del cartucho. Posteriormente, pesaremos 30 mg de resina LicrolutEN en el cartucho, para finalmente comprimirlo con otro fritz en la parte superior.

Los cartuchos, que serán tantos como muestras dispongamos, se conectarán a un sistema de vacío por el extremo inferior, mientras que los conectaremos por el superior a un reservorio de plástico. El proceso constará de estas etapas:

i) Acondicionamiento:

Esta etapa se produce por gravedad. En primer lugar, activaremos la resina situada en el interior. Para ello, pasaremos 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y después 1 mL de MeOH. Por último, necesitaremos que la resina se empape de una disolución lo más parecida a nuestra muestra, por lo que haremos pasar 1 mL de vino sintético.

La adición de cada disolución se llevará a cabo una vez la disolución anterior haya pasado a través del cartucho. De esta forma evitaremos que se mezclen en el reservorio y podremos asegurarnos de que las disoluciones abandonen el montaje de forma ordenada.

ii) Carga de muestra:

Tal y como indica su nombre, durante la etapa adicionaremos 10 mL de muestra al reservorio. Las especies que interaccionan con la resina, como los aldehídos y otros compuestos de polaridad similar, serán retenidos en esta. Por el contrario, las especies no afines atravesarán el cartucho sin interaccionar con la resina terminando en los vasos colectores. En esta fase, el control de la velocidad de paso de la muestra a través del cartucho es crucial. En nuestro caso, la limitaremos a 2 gotas/s, haciendo uso del vacío en el caso de ser necesario.

iii) Lavado:

Durante esta tercera etapa separaremos los compuestos, diferentes de los analitos, que han quedado retenidos en la resina debido a su interacción con aquella. Para ello, haremos pasar una disolución con polaridad similar a este tipo de especies. Con todo ello, conseguiremos que al fluir por la resina las arrastre. Adicionaremos 10 mL de disolución de lavado que, por efecto de la gravedad, pasará hasta llegar a los vasos colectores.

iv) Secado:

Finalmente, retiraremos los restos de los disolventes que queden en los cartuchos. Para ello, conectaremos el vacío hasta que la resina palidezca y el fritz superior se separe de esta. Una vez hayan tenido lugar estos cambios, retiraremos los reservorios y adaptadores y reservaremos los cartuchos.

v) Elución:

El objetivo de la elución será transferir los analitos de la resina a un disolvente apto para su análisis. Para ello, utilizaremos una bureta que nos permita adicionar a cada cartucho 1,2 mL de hexano en dos veces, añadiendo 0,6 mL cada vez. Así conseguiremos la preconcentración del analito, al pasar de una muestra de 10 mL a un extracto de 1,2 mL. Los analitos se eluirán a un vial de 2 mL.

vi) Inyección GC-MS

Para analizar los analitos, utilizaremos un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masa con detector cuadrupolo (Gas Chromatography Mass Spectrometer, GC-MS-QP-2010, Shimadzu). Trabajaremos con ventanas en modo SIM

(tabla 2). Utilizaremos una columna DB-WAXetr (30m x 0,25 mm x 0,5  $\mu$ m) y un inyector automático (SPL1 Split/Splitless Shimadzu AOC-5000), en modo Splitless. La temperatura del inyector será 250 °C y el volumen de inyección 3  $\mu$ L.

El gas portador fue Helio y se establecerá la presión en 68,8 kPa. La temperatura se programará de manera que esta sea 40 °C durante los primeros 4 minutos y, tras este intervalo, se usará una rampa de 10 °C/min hasta 250 °C, temperatura final.

Ventana	Comienzo (min)	Final (min)	m/z iones detectados
1	14,6	15,2	181, 195, 239, 253, 250
2	15,6	18,2	181, 195, 239, 253, 266
3	22,2	23,8	181, 252, 299, 302
4	23,8	24,9	91, 96, 181, 297, 301

**Tabla 2.** Ventanas del detector

Una vez obtenidos los cromatogramas, recurriremos al software GC-MS auxiliar para su tratamiento. Se integrarán los picos correspondientes a cada analito. En la tabla 3, se muestran los datos necesarios para la cuantificación de los aldehídos. En la tabla 4 se muestran los límites de detección, LD, y cuantificación, LC, de los aldehídos de Strecker para el método usado.

Ventana	Compuestos	Estandar interno	tr (min)	Ión cuantificación (m/z)	Ión confirmación (m/z)
1	Isobutiraldehído (suma de isómeros)	2- metilpentanal	14,95	250	195,239,181
	2- metilbutanal (suma de isómeros)	2- metilpentanal	15,97	239	253, 195, 181
2	3-metilbutanal (isómero 1)	3- metilpentanal	16,31	239	195, 266, 181
	3-metilbutanal (isómero 2)	3- metilpentanal	16,54	239	195, 266, 181
	2-metilpentanal (IS)		17,04	253	266, 195
	3-metilpentanal (isómero 1)(IS)		17,74	239	266, 181
	3-metilpentanal (isómero 2)(IS)		17,94	239	266, 181
3	Metional deuterado (IS)		22,58	302	252, 181
	Metional (suma de isómeros)	Metional deuterado	22,61	299	252, 181
4	Fenilacetaldéhído deuterado (IS)		24,24	301	96, 181
	Fenilacetaldéhído (suma de isómeros)	Fenilacetaldéhído deuterado	24,31	297	91, 181

**Tabla 3.** Relación de estándares internos para cada aldehído a cuantificar. Tiempos de retención (tR, min). Iones (m/z) usados en la cuantificación y en la confirmación de todas las oximas.

Compuestos	Límite de detección (mg/L)	Límite de cuantificación (mg/L)
Isobutiraldehído	0,004	0,014
2- metilbutanal	0,027	0,091
3- metilbutanal	0,026	0,086
Metional	0,292	0,972
Fenilacetaldéhído	0,154	0,513

**Tabla 4.** Límite de detección y cuantificación  $\mu$ g/L para cada analito a cuantificar.

### 3.5. Medida de oxígeno

Las muestras de los vinos utilizados en este experimento serán introducidas en viales de 60 mL (Wine in tube) con la cantidad de espacio de cabeza necesario para desulfitar



la muestra por completo y 35mg/L de oxígeno en exceso para oxidar los vinos. Cada uno de ellos cuenta con un sensor de oxígeno Pst3, Nomasense. Dos viales para cada una de las muestras se introducirán en un baño de agua (OLS Aqua Pro Shaking Water Bath, GRANT) con agitación a 25 °C con el fin de tener la temperatura controlada durante el experimento.

Utilizaremos un medidor portátil de oxígeno de fibra (fibox 3 LCD-trace. PreSens) con el objetivo de medir el oxígeno en el interior de los viales. Estos serán extraídos del baño de agua individualmente, de modo que se evitarán variaciones significativas de la temperatura de cada uno de ellos. Una vez fuera de la incubadora, limpiaremos y secaremos la superficie donde se encuentra el sensor, evitando que los restos de agua que puedan quedar sobre el sensor den lugar a medidas erróneas. Finalmente, con el medidor de fibra óptica sobre el sensor del vial, tomaremos el segundo dato que nos proporcione. El objetivo es monitorizar la oxidación de las muestras en un ambiente y unas condiciones controladas.

Este proceso se repetirá cada 24 horas durante la primera semana de incubación. A partir de entonces, pasará a repetirse cada 48 horas. Estableceremos el final de la oxidación cuando se haya consumido el 95% del oxígeno inicial, o hayan pasado 54 días desde el comienzo de la oxidación. Entonces se extraerán los viales del baño para el análisis de las muestras.

### **3.6. Diseño de experimento**

Nuestro experimento tendrá lugar en tres fases:

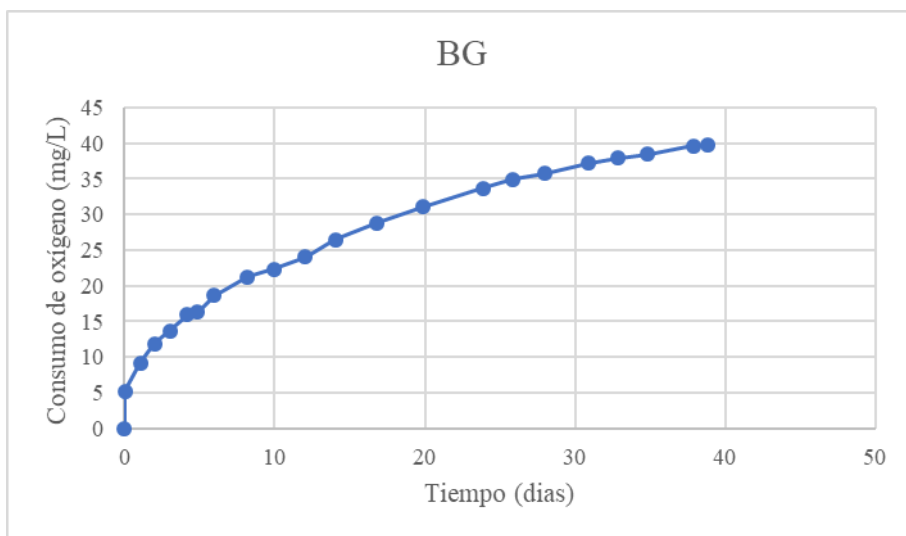
- Una caracterización inicial de las muestras (SO<sub>2</sub> total y libre, cantidad de aminoácidos (fenilalanina, isoleucina, leucina, metionina y valina) por HPLC con detector de fluorescencia, contenido de hierro, aldehídos de Strecker, pH y acetaldehído).
- Proceso de oxidación controlado con medida de oxígeno disuelto.
- Caracterización al final de las muestras oxidadas con la determinación de sulfuroso total, acetaldehído y aldehídos de Strecker.

Cada vino se introducirá en la cámara de anoxia, para igualar al valor máximo el contenido de aminoácidos y hierro, logrando que todos ellos partan de un mismo valor controlado de las especies precursoras o favorecedoras de la formación de aldehídos de Strecker. Posteriormente, se retirarán y pasarán por filtros amicróbicos de 73 mm de diámetro y 0,22 μm de tamaño de poro (MERK, REF: SCGP U02 RE). Las muestras filtradas se saturarán con aire e introducirán por duplicado en WIT, provistos de sensores SPT3 (Nomacroc), dejando un espacio de cabeza que contenga la cantidad estequiométrica necesaria de O<sub>2</sub> para desulfitar la muestra por completo más 35 mg/L de O<sub>2</sub> no SO<sub>2</sub>. Finalmente, se sumergirán en un baño orbital a 25 °C con agitación hasta consumir el 95% del oxígeno disponible o permanecer 54 días<sup>17</sup>. Tras finalizar el proceso de oxidación, mediremos los valores de acetaldehído y SO<sub>2</sub> total, además del contenido de aldehídos de Strecker.

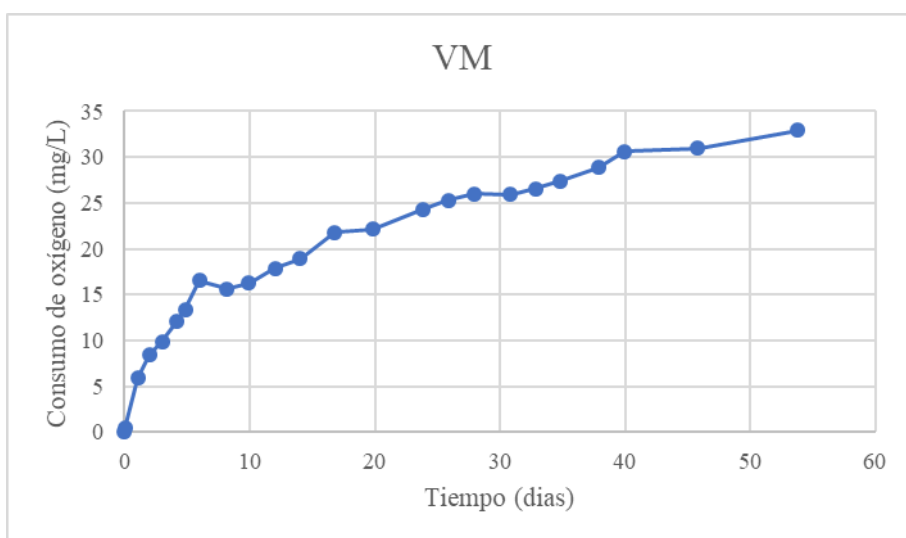
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Consumo de oxígeno

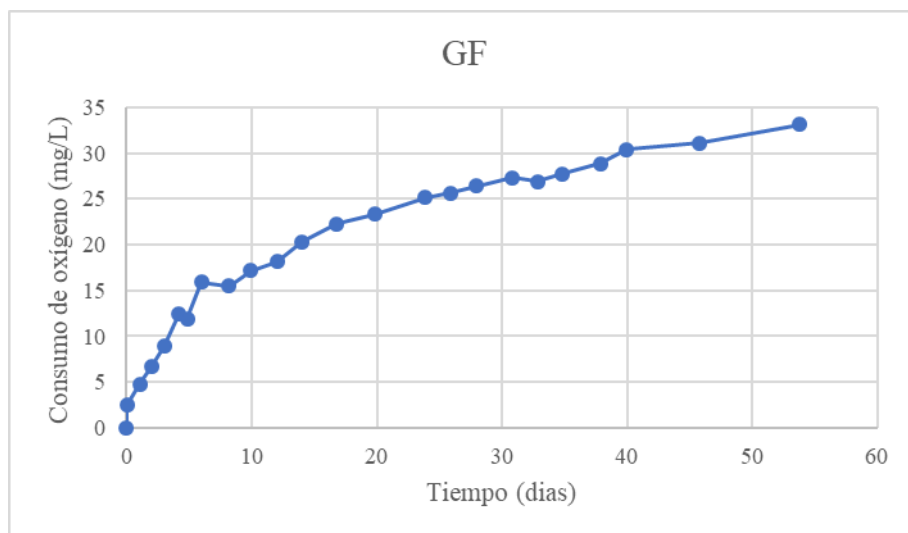
A continuación, presentaremos las gráficas de oxígeno consumido frente al tiempo según el tipo de vino: tinto (gráfica 1), blanco (gráfica 2) o rosado (gráfica 3). Observándolas apreciaremos un comportamiento similar en cuanto al consumo de oxígeno. En los tres casos, aproximadamente la mitad del oxígeno total que se consumirá durante este proceso lo hará durante los 10 primeros días. A partir de entonces, la gráfica refleja una pendiente más suave hasta llegar al final de la oxidación.



*Gráfica 1. Consumo de oxígeno frente a tiempo de la muestra BG, perteneciente al grupo de tintos jóvenes.*



*Gráfica 2. Consumo de oxígeno frente a tiempo de la muestra VM, perteneciente al grupo de blancos.*



**Gráfica 3.** Consumo de oxígeno frente a tiempo de la muestra GF, perteneciente al grupo de rosados.

Por otra parte, al calcular la velocidad de consumo de oxígeno como la relación entre el oxígeno total consumido y los días implicados, se observa (tabla 5) que los vinos tintos poseen las velocidades de consumo de oxígeno más elevadas (entre 0,84 y 1,53mg/Ldía). Mientras, las de los vinos rosados se situarán como las menores (0,56mg/Ldía de media) y los vinos blancos poseerán velocidades intermedias (0,65mg/Ldía de media). Cabe destacar tres casos dentro del grupo de tintos. En primer lugar, el vino DM, que tuvo una oxidación más rápida (1,53mg/Ldía). En segundo lugar, los vinos VF reserva y RB joven, con una oxidación más lenta (0,84mg/Ldía).

Observando los datos reflejados en la tabla 5, podremos clasificar los vinos atendiendo a una primera clasificación en dos grupos:

- Vinos que han consumido todo el oxígeno.
- Vinos que no han consumido todo el oxígeno.

Código	Oxígeno consumido	Tiempo de oxidación	Velocidad de oxidación
CV	38,48	45,83	0,84
DM	36,56	23,86	1,53
CL	49,32	45,83	1,08
VF	49,81	51,82	0,96
MI	43,42	30,86	1,41
FP	43,11	38,83	1,11
BG	39,69	38,83	1,02
RB	43,54	51,82	0,84
VI	27,23	53,78	0,51
VM	32,91	53,78	0,61
VMG	35,15	51,82	0,68
GF	33,13	53,78	0,62

**Tabla 5.** Oxígeno consumido (mg/L) y velocidad de oxidación (mg/L Día) de las 12 muestras de vino.

Los vinos que no llegaron a consumir todo el oxígeno, y fueron retirados de la incubadora cuando finalizó el tiempo previsto, fueron los dos blancos, VT y VM, y uno de los rosados, GF.

#### 4.2 Desulfitación de los vinos

Una vez completada la oxidación, o transcurridos 54 días desde el comienzo del experimento, se analizó el SO<sub>2</sub> total y acetaldehído final de cada muestra. Dada la naturaleza antioxidante del sulfuroso y la dosis de oxígeno aplicada a los vinos cabría esperar que las muestras se hubiesen desulfitado por completo. Sin embargo, como se puede observar en la tabla 6, los porcentajes difieren notablemente de lo esperado. La desulfitación en las muestras fue de 47-65,8% en los vinos blancos, 53,5-59,8% en los vinos rosados y 41,6-87,7% en los tintos.

Código	Oxígeno consumido total mg/L	SO <sub>2</sub> total inicial mg/L	SO <sub>2</sub> total final mg/L	SO <sub>2</sub> eliminado en oxidación mg/L	% de SO <sub>2</sub> eliminado	Oxígeno usado en SO <sub>2</sub> mg/L	O <sub>2</sub> not SO <sub>2</sub> mg/L	Días en oxidación
CV	38,47	29	19,2	9,8	33,79	2,5	36,0	45,8
DM	36,68	20	11,2	8,8	44,00	2,2	34,5	23,9
CL	49,32	81	37,6	43,4	53,58	10,9	38,5	45,8
VF	49,81	124	15,2	108,8	87,74	27,2	22,6	51,8
MT	43,11	57	19,4	37,6	65,96	9,4	33,7	30,9
FP	43,1	52	25,6	26,4	50,77	6,6	36,5	38,8
BG	39,97	37	21,6	15,4	41,62	3,9	36,1	38,8
RB	43,55	96	26,9	69,1	72,01	17,3	26,3	51,8
VT	27,23	115	60,8	54,2	47,13	13,6	13,7	53,8
VM	32,92	97	33,1	63,9	65,86	16,0	16,9	53,8
VMG	35,16	86	40,0	46,0	53,49	11,5	23,7	51,8
GF	33,13	78	31,5	46,5	59,59	11,6	21,5	53,8

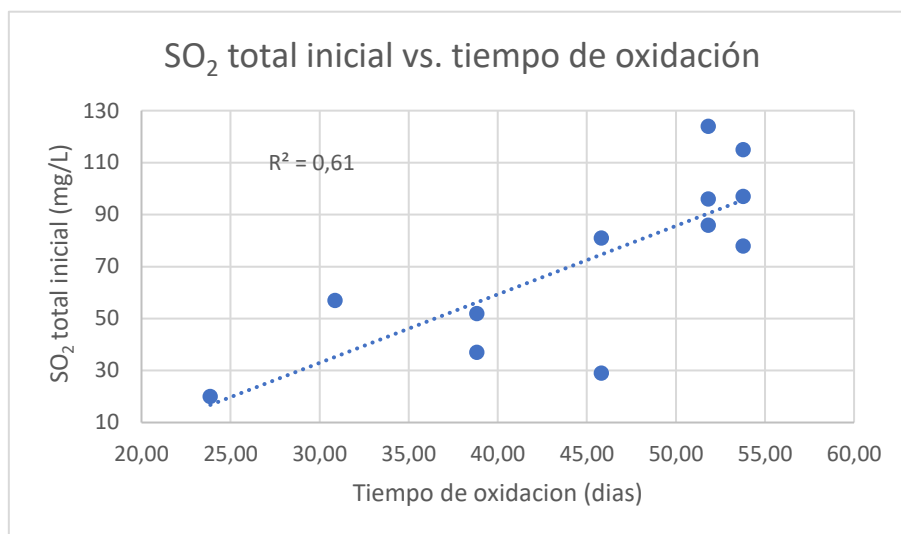
**Tabla 6.** Relación de SO<sub>2</sub> inicial y final y oxígeno consumido por cada muestra. SO<sub>2</sub> eliminado durante la oxidación y porcentaje de SO<sub>2</sub> eliminado. O<sub>2</sub> no SO<sub>2</sub> en cada muestra de vino.

Tal y como se aprecia en la tabla, tres de los vinos tintos se desulfitaron en una proporción notablemente superior a los vinos blancos. Este hecho podría guardar relación con la concentración de polifenoles, siendo mínima en los blancos.

La relación entre la cantidad de SO<sub>2</sub> inicial total de cada muestra y el tiempo de oxidación se verá reflejada en la gráfica 4. Analizaremos la significatividad de la regresión de esta gráfica apoyándonos en el estadístico F. Para una confianza del 95%, dicha regresión es significativa puesto su estadístico F calculado (15,643) es mayor que el valor crítico F tabulado (0,0027). Además, dicha gráfica muestra una relación directa entre las variables. Cuanto mayor sea la concentración de SO<sub>2</sub> inicial, mayor será el tiempo de oxidación. Por otra parte, podremos percibir un comportamiento particular en el caso de los vinos tintos utilizados en nuestro experimento. Los vinos tintos suelen poseer una menor cantidad de SO<sub>2</sub> inicial, encontrando dos excepciones: VF (tinto reserva) y el RB (tinto joven). Estos dos casos han mantenido una evolución más lenta

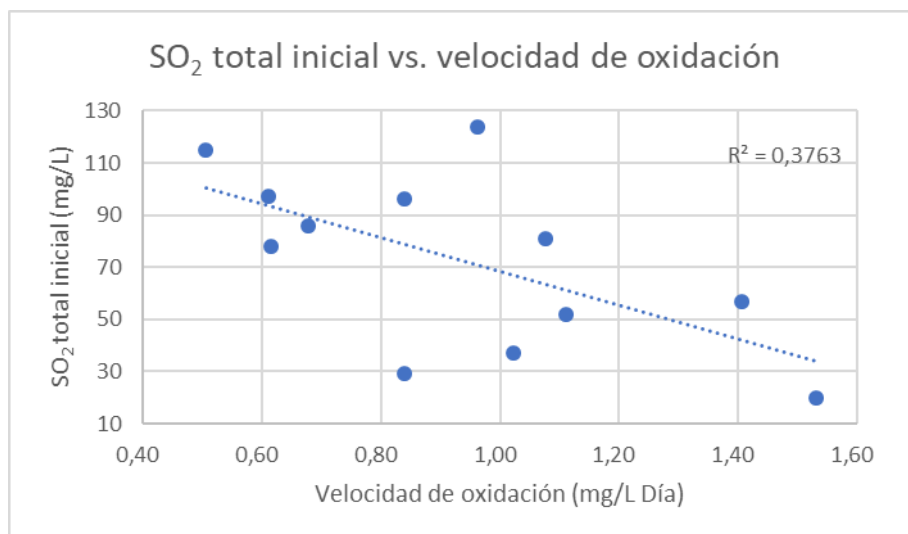
frente a la oxidación. Este hecho puede relacionarse con el alto nivel de SO<sub>2</sub> inicial. Además, en la gráfica vemos representado un vino cuyo comportamiento dista mucho del esperado, el CV (tinto reserva). Pese a su bajo nivel de SO<sub>2</sub> inicial, su tiempo de oxidación es inusualmente elevado.

Para terminar, encontraremos el caso de los vinos rosados y blancos en la parte derecha de la gráfica. Este hecho se debe a su nivel de SO<sub>2</sub>, notablemente superior. Estos vinos han experimentado una evolución muy lenta frente a la oxidación, incluso llegando a ser extraídos dos de ellos antes de que se completase su oxidación (VT y VM blancos y GF rosado).



**Grafica 4.** Relación del SO<sub>2</sub> inicial total frente al tiempo de oxidación de las 12 muestras de vino.

La siguiente gráfica (grafica 5) refleja la relación que existe entre la velocidad de reacción (mg/ L oxígeno/día) y la cantidad inicial de SO<sub>2</sub> en cada muestra. Atendiendo al mismo procedimiento que en la gráfica anterior, el estudio de la regresión muestra que el valor de F estadístico tabulado (0,0338) es menor que el de F calculado (6,033), para el mismo nivel de confianza. Por ello, de nuevo la regresión será significativa. Además, apreciaremos como esta es inversa. Las especies con mayor cantidad de SO<sub>2</sub> total inicial son las que menor velocidad de oxidación tienen; mientras que las muestras con menor cantidad inicial mostrarán velocidades superiores.



**Grafica 5.** Relación del SO<sub>2</sub> total inicial frente a la velocidad de oxidación de las 12 muestras de vino.

En particular, encontraremos dos muestras que experimentan un comportamiento diferente al resto. Estos dos casos coincidirán con los valores atípicos representados en la gráfica 5. La muestra CV, cuya concentración de SO<sub>2</sub> total inicial es de 29 mg/L, tiene una velocidad notablemente inferior a muestras con concentraciones de SO<sub>2</sub> total inicial superiores. Este caso queda reflejado como un valor atípico en la parte inferior de la gráfica. El segundo valor atípico aparece situado en la parte superior de la gráfica, y se corresponde con la muestra VF. En este segundo caso, la muestra tiene una velocidad mucho mayor que la esperada con ese nivel de SO<sub>2</sub> inicial.

### 4.3. Acumulación de acetaldehído en la oxidación

Las medidas de acetaldehído antes y después de la oxidación (tabla 7) nos permitirán conocer la acumulación del mismo. Dicho nivel será el resultado del acetaldehído formado en el proceso de oxidación del etanol de los vinos y la reacción del acetaldehído con los polifenoles para formar pigmentos condensados. De este modo, podremos separar a priori las muestras en tres grupos observando la evolución del acetaldehído en cada una:

- Vinos que aumentan la concentración de acetaldehído.
- Vinos con acumulaciones negativas o consumidores de acetaldehído.
- Vinos que mantienen la concentración de acetaldehído estable.

Código	Acetaldehído inicial (mg/L)	Acetaldehído final (mg/L)	Acetaldehído acumulado (mg/L)	Días en oxidación
CV	28 ± 0,87	31 ± 0,080	3 ± 0,87	45,8
DM	9 ± 0,43	14 ± 0,14	5 ± 0,46	23,9
CL	21 ± 2,1	28 ± 0,58	7 ± 2,1	45,8
VF	54 ± 0,48	44 ± 0,079	(-10) ± 0,48	51,8
MT	14 ± 0,032	19 ± 0,13	5 ± 0,13	30,9
FP	20 ± 0,52	23 ± 0,27	3 ± 0,58	38,8
BG	7 ± 0,33	12 ± 0,57	5 ± 0,66	38,8
RB	21 ± 1,2	18 ± 0,45	(-3)* ± 1,3	51,8
VT	26 ± 1,1	27 ± 0,46	1* ± 1,2	53,8
VM	30,5 ± 0,341	26 ± 0,064	(-4,5) ± 0,35	53,8
VMG	51,3 ± 1,93	57 ± 1,1	5,7* ± 2,2	51,8
GF	22,1 ± 0,012	26 ± 0,64	3,8* ± 0,64	53,8

**Tabla 7.** Relación del acetaldehído inicial, final y acumulado en cada muestra.

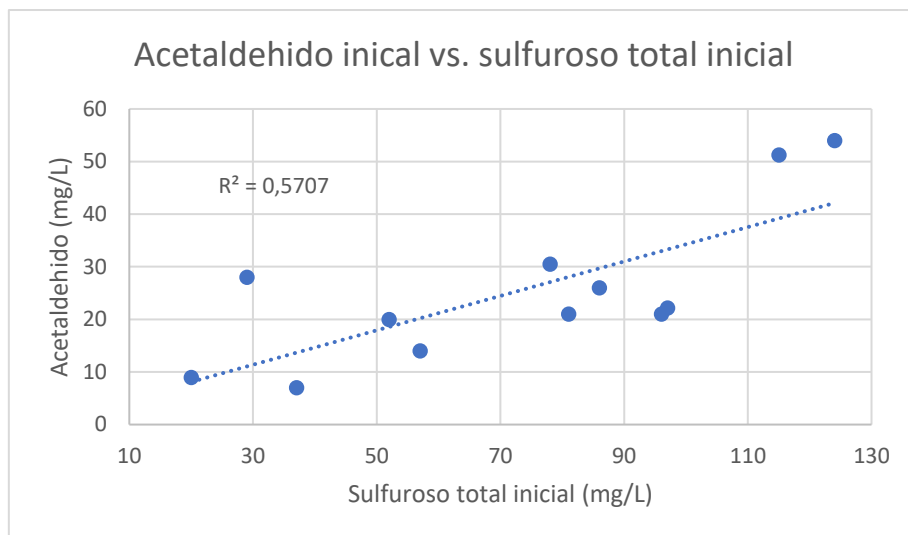
La formación del acetaldehído requiere la producción de radicales altamente reactivos mediante la reacción de Fenton. Para ello es importante que el sulfuroso se haya eliminado por reacción con agua oxigenada. Como hemos visto en el apartado anterior (tabla 6) ninguno de los vinos se desulfitó por completo, lo que se refleja en que tan solo se ha obtenido una ligera acumulación de acetaldehído en los vinos tintos tras la oxidación.

Además, destacaremos el grupo formado por los tintos reserva CV, DM y CL y los tintos jóvenes MT, FP y BG en el que se ha producido un aumento de acetaldehído. Veremos cómo ha tenido lugar una acumulación entre 3 y 7 mg/L. El caso de mayor acumulación (7mg/L en CL) coincide también con el vino con mayor cantidad de sulfuroso final, 37,6mg/L de SO<sub>2</sub> total, dentro de los tintos.

Por otro lado, destacaremos los vinos con acumulación negativa o consumo de acetaldehído. Este grupo estará compuesto por un tinto reserva (VF) y un rosado (VM).

Finalmente, encontraremos marcados con un asterisco, un último grupo de vinos que mantienen la concentración estable. Este es el caso de un rosado (VT), dos blancos (VMG y GF) y un tinto joven (RB). Estos vinos poseen una acumulación de acetaldehído (mg/L) no significativa ( $\alpha=0,05$ ).

A continuación, realizaremos un análisis gráfico que nos permita extraer más conclusiones de nuestros resultados.

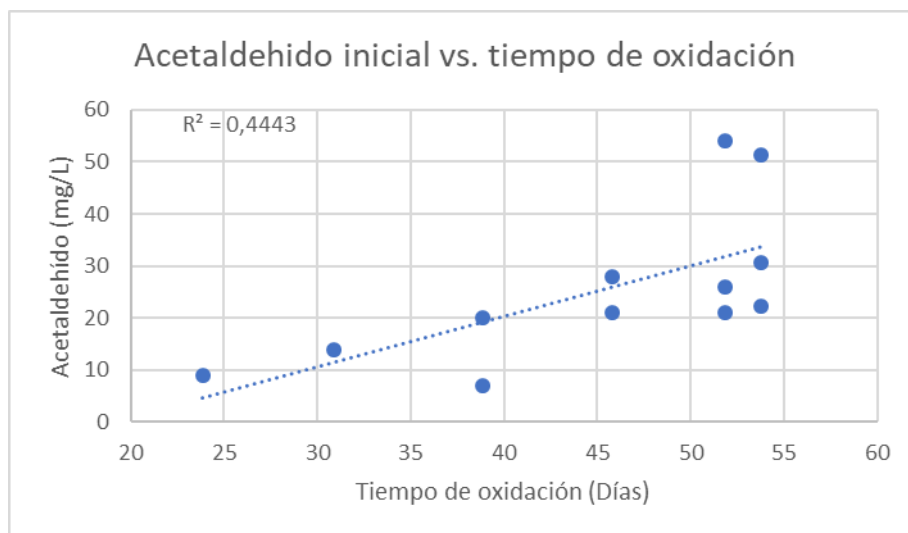


**Grafica 6.** Relación entre el acetaldehído inicial y el sulfuroso total inicial en las 12 muestras.

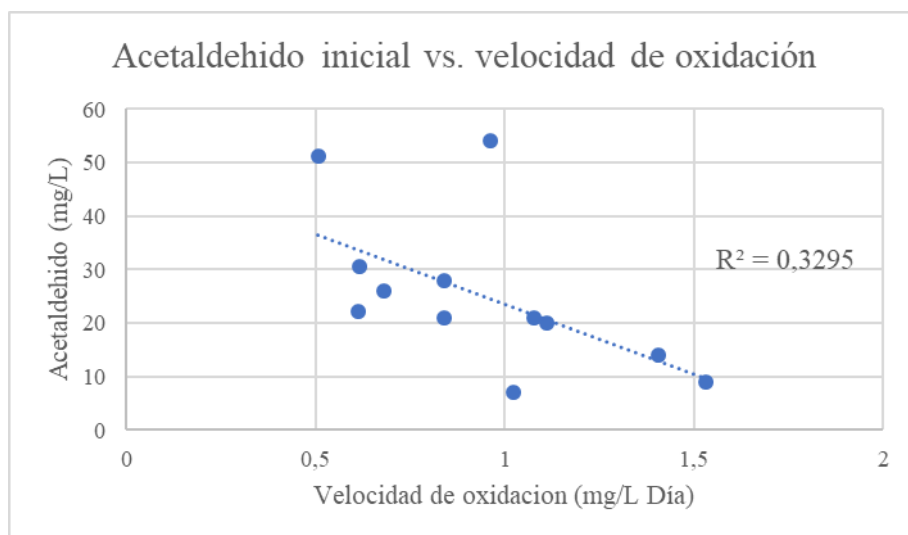
La siguiente gráfica (grafica 6) muestra la relación directa que existe entre la concentración de acetaldehído inicial con la cantidad de sulfuroso total inicial en cada muestra. El estudio de la regresión de esta gráfica muestra que su F crítica (0,0045) es menor que el valor de la F calculado (13,293) para la regresión para nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . Es decir, la regresión será significativa. Las especies con mayor concentración de sulfuroso total inicial tienden a poseer mayores concentraciones de acetaldehído inicial. Si bien, podremos observar el caso de un vino cuyo comportamiento no es el esperado. Este caso, la muestra CV, posee una concentración muy superior de acetaldehído con respecto a las muestras con concentraciones de SO<sub>2</sub> total inicial más próximas.

Por lo general los vinos tintos con menor cantidad de sulfuroso total y acetaldehído iniciales se agrupan en la parte inferior izquierda de la gráfica. En cambio, los blancos y rosados, con mayor concentración de estos dos parámetros, se encuentran en la mitad de la gráfica. Además, apreciaremos dos puntos en el extremo superior de la gráfica correspondientes a un vino blanco, VT, y a un tinto, VF. Sus concentraciones de sulfuroso total y acetaldehído iniciales son apreciablemente superiores al resto de muestras.



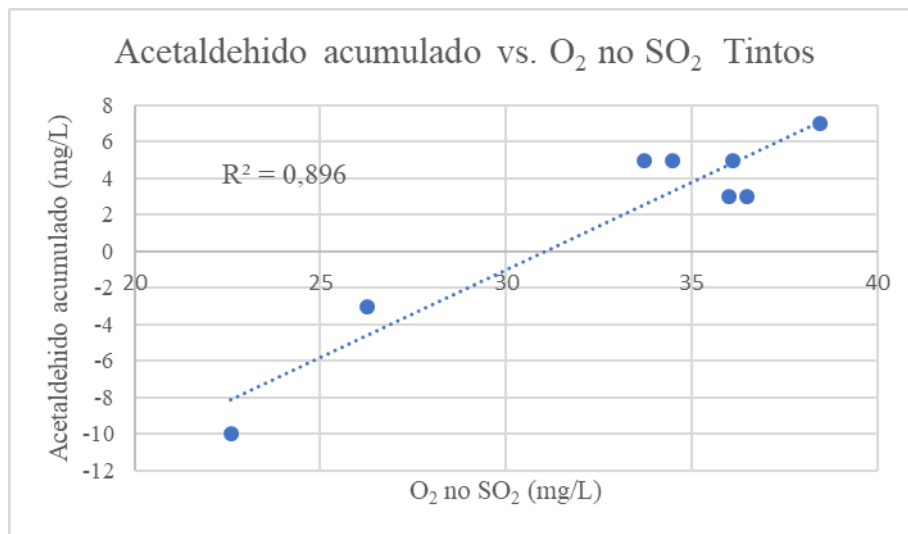


**Gráfica 7.** Relación entre el acetaldehído inicial y el tiempo de oxidación de las 12 muestras.

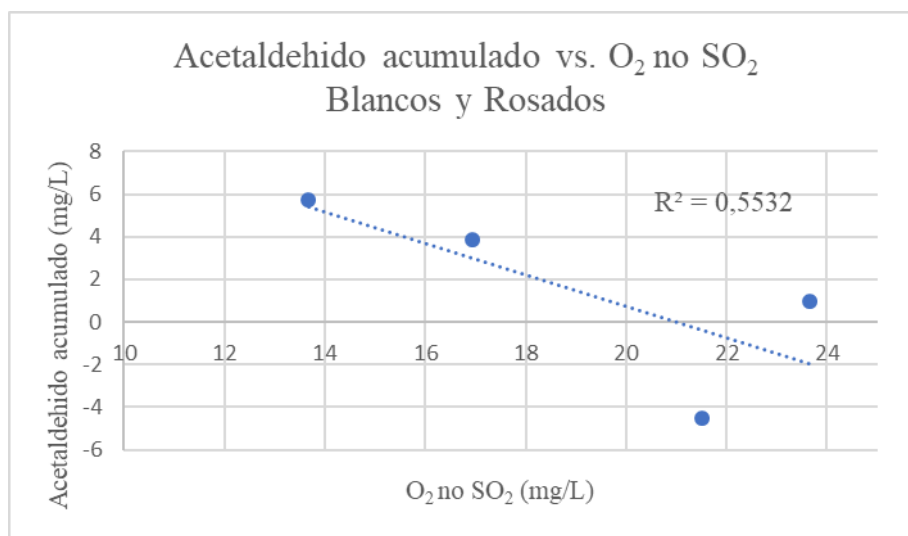


**Gráfica 8.** Relación entre acetaldehído inicial frente a velocidad de oxidación de las 12 muestras.

Las anteriores gráficas (gráfica 7 y gráfica 8) representan la relación que existe entre el acetaldehído inicial y el tiempo y la velocidad de oxidación. Realizando el estudio de la regresión de ambas gráficas, con  $\alpha = 0,05$ , obtendremos que el valor de la F crítica de ambas es menor al valor de la F tabulada. Es decir, sus regresiones serán significativas. Podemos apreciar que, tal y como ocurre en el caso anterior, la relación que mantiene con el tiempo es directa mientras que la que mantiene con la velocidad es inversa. De manera análoga a los gráficos 5 y 6, podemos percibir un comportamiento anómalo en el caso de los vinos VF y VT en el caso del tiempo y VF y BG en el caso de la velocidad. Además, el vino BG se presenta en la gráfica 8 como valor atípico mientras que en la gráfica 5 su comportamiento no dista significativamente de la media. Nos encontraremos con una situación similar al estudiar el VT frente a la velocidad, puesto en la gráfica 8 se presenta como una observación atípica a diferencia de lo que ocurre en la gráfica 5.



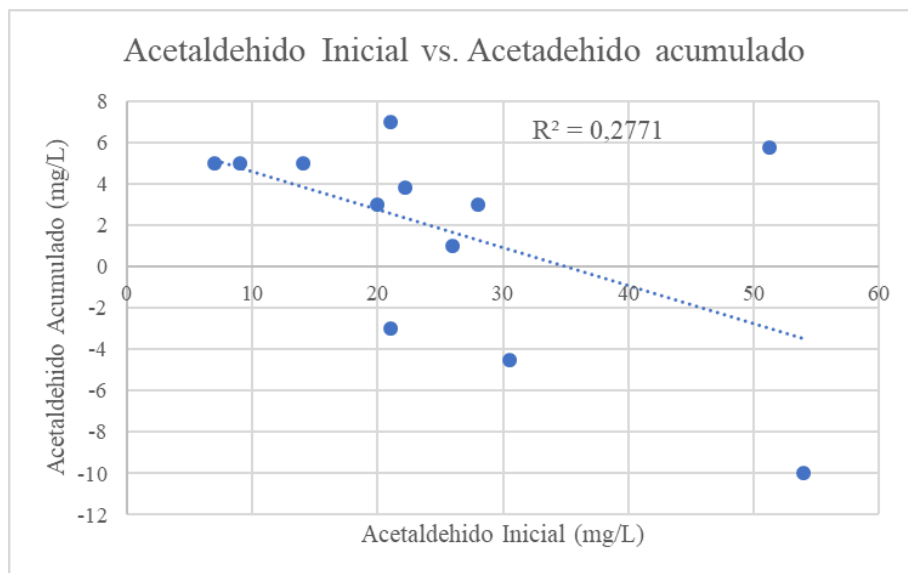
**Gráfica 9.** Relación entre el acetaldehído acumulado y el O<sub>2</sub> no SO<sub>2</sub> en los vinos tintos.



**Gráfica 10.** Relación entre el acetaldehído acumulado y el O<sub>2</sub> no SO<sub>2</sub> en los vinos blancos y rosados.

Las gráficas 9 y 10 representan la concentración de acetaldehído acumulado frente al O<sub>2</sub> no SO<sub>2</sub>. El estudio de la regresión de ambas graficas ( $\alpha = 0,05$ ) nos permitirá determinar la significatividad de la misma, siendo el valor de F tabulado (0,0004 y 0,2562 respectivamente) menor al valor de la F calculado (51,719 y 2,476 respectivamente). Por otra parte, podremos apreciar la existencia de valores que se corresponden con acumulaciones negativas de acetaldehído. Este hecho refleja el comportamiento del VF (tinto reserva), RB (tinto joven) y VM (blanco) en los que el acetaldehído es consumido durante la oxidación en lugar de generarse. Se observa que para los vinos tintos la regresión es positiva y sin embargo para los vinos rosados y blancos es negativa. Para los vinos tintos a mayor O<sub>2</sub> no SO<sub>2</sub> se acumula más acetaldehído, pero en los vinos rosados o

blancos (teniendo en cuenta las pocas muestras de las que disponemos) se acumula menos.



**Gráfica 11.** Relación entre acetaldehído inicial y acumulado en las 12 muestras.

Finalmente, la gráfica 11 muestra la relación entre el acetaldehído inicial y el acetaldehído acumulado. El estudio de la regresión muestra que el valor de del estadístico tabulado F (0,0787) es menor que el valor F calculado (3,832), para una confianza del 95%. Por ello, aun teniendo una  $R^2$  muy baja, podemos decir que es significativo.

La grafica 11 muestra una relación inversa entre las variables, cuando mayor es la concentración de acetaldehído inicial, menor es la concentración de acetaldehído acumulado. A la derecha de esta se pueden observar que los vinos que tienen valores negativos de acetaldehído acumulado se separan mucho del comportamiento del resto. También hay un vino, cuyas concentraciones de acetaldehído acumulado e inicial son muy grandes (VT).

#### 4.4 Acumulación de aldehídos de strecker

La formación de aldehídos de Strecker va ligada al contenido del aminoácido precursor y del Fe como catalizador. Fijadas estas dos condiciones, la variabilidad en el contenido de aldehídos de Strecker en los vinos dependerá de dos factores:

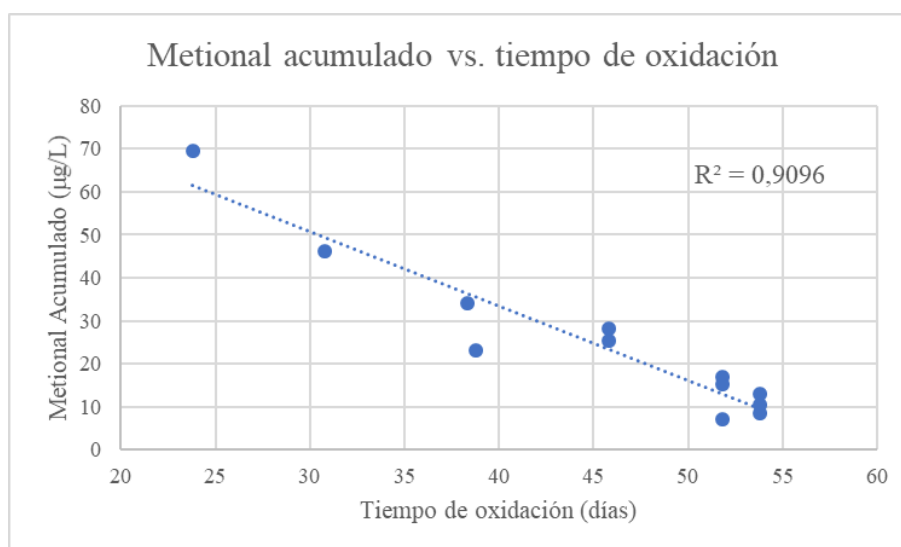
- El contenido de  $\alpha$ -dicarbonilos que participen con los aminoácidos en la formación de Strecker.
- Reaccionabilidad de los aldehídos con material polifenólico de los vinos.

En la siguiente tabla 8 se presentan los datos de los aldehídos de Strecker, en el punto 0 y después del proceso de oxidación. Puede observarse como el metional y fenilacetaldehído siempre aumentan, mientras los otros aldehídos de Strecker a veces incluso disminuyen, como lo hacía el acetaldehído.

Código		isobutiraldehído	s	2-metilbutanal	s	3-metilbutanal	s	metional	s	fenilacetaldehído	s
CV	Inicial	37,6	1,8	8,3	0,4	27,1	1,0	3,1	0,0	19,4	0,6
	Final	37,5	0,6	15,4	0,0	52,1	1,1	31,2	0,6	59,4	1,6
DM	Inicial	29,5	1,2	7,1	0,2	15,7	1,1	1,9	0,3	12,6	1,1
	Final	41,8	1,0	17,9	0,2	178,0	1,0	71,3	0,2	188,0	0,9
CL	Inicial	31,7	0,3	5,1	0,1	69,1	0,9	2,7	0,0	30,7	0,2
	Final	29,3	0,4	9,9	0,3	55,0	8,3	28,1	0,4	63,1	0,2
VF	Inicial	29,0	14,0	6,8	3,3	43,7	21,0	4,9	2,2	43,6	20,0
	Final	31,4	0,7	10,6	0,0	79,3	1,0	21,8	0,3	67,0	0,6
MT	Inicial	18,3	1,7	4,4	0,7	26,9	4,7	1,4	0,4	12,9	1,1
	Final	31,1	1,2	19,1	0,4	93,8	3,3	47,7	0,2	155,0	0,8
FP	Inicial	28,1	1,2	5,2	0,2	38,8	1,2	2,4	0,0	22,3	0,5
	Final	36,2	2,5	16,8	1,1	124,0	10,0	36,5	1,1	112,0	4,3
BG	Inicial	21,3	0,3	4,1	0,1	10,3	0,2	1,4	0,0	11,0	0,0
	Final	29,4	1,0	14,8	0,4	69,9	0,5	24,5	0,6	59,7	0,6
RB	Inicial	44,5	4,6	19,9	2,2	129,0	15,0	3,0	0,0	17,6	0,3
	Final	20,2	0,0	9,0	0,1	53,1	1,8	18,1	0,2	43,6	0,9
VT	Inicial	21,7	0,4	6,6	0,0	21,4	0,0	1,4	0,0	8,7	0,3
	Final	15,6	0,9	5,5	0,2	40,2	0,6	8,4	0,0	28,0	0,4
VM	Inicial	24,8	0,5	4,2	0,3	22,8	0,1	1,7	0,0	7,8	0,3
	Final	16,4	0,5	6,0	0,2	47,2	3,5	14,7	0,4	45,7	1,2
VMG	Inicial	20,5	1,1	4,8	0,1	44,6	3,4	10,9	0,0	18,3	0,3
	Final	13,1	0,4	4,9	0,1	55,3	1,5	19,5	0,1	29,6	0,3
GF	Inicial	27,1	3,7	9,5	1,3	70,5	5,4	2,1	0,0	6,9	0,2
	Final	14,1	0,5	5,0	0,2	41,8	1,9	12,6	0,3	32,4	0,4

**Tabla 8.** Concentración (microgramos/L) de aldehídos de Strecker inicial y final en cada una de las 12 muestras.

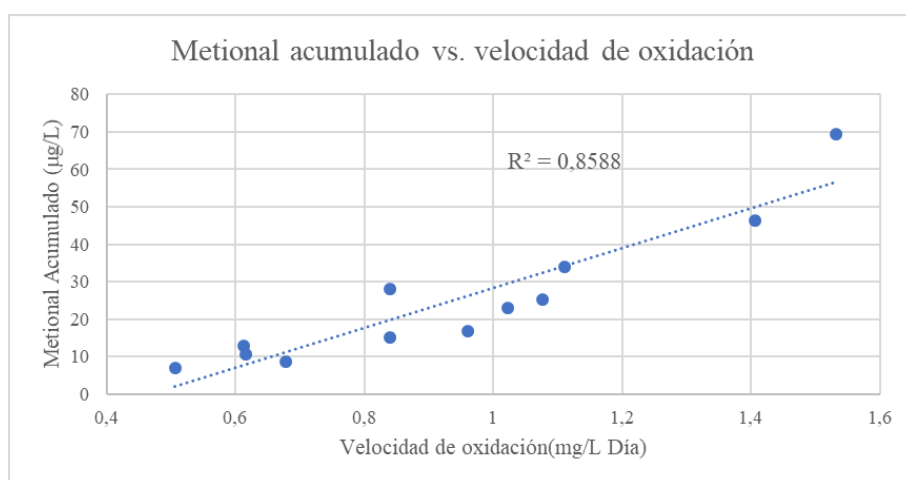
Tomaremos la evolución del metional como aldehído representativo para el estudio de la evolución de los aldehídos de Strecker frente a la oxidación por ser de los más importantes sensorialmente.



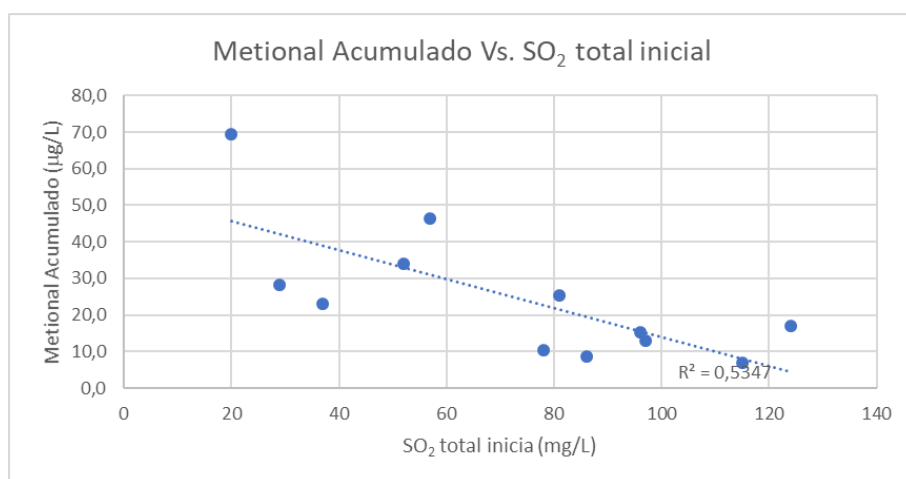
**Gráfica 12.** Relación entre metional acumulado (µg/L) y tiempo de oxidación en las 12 muestras.

Las gráficas 12 y 13 reflejan la relación que existe entre la acumulación del metional y la oxidación de los vinos. El estudio de la regresión en estas graficas concluirá que posee un carácter significativo, puesto que el valor de F tabulado para ambas ( $1,546 \cdot 10^{-6}$  y  $1,469 \cdot 10^{-5}$ ) es menor que el valor calculado (100,6 y 60,836) para un  $\alpha = 0,05$ .

La relación en estas graficas resulta ser inversa en el caso de tiempo y directa en el caso de la velocidad. A mayor tiempo de oxidación, menos se acumula el metioanl. Y a mayor velocidad de consumo de oxígeno, más se acumula el metional. Además, debemos destacar el comportamiento de los vinos puesto que se ajusta adecuadamente a la recta de mínimos cuadrados, lo que se refleja en los elevados coeficientes  $R^2$  (0,9096; 0,8588).



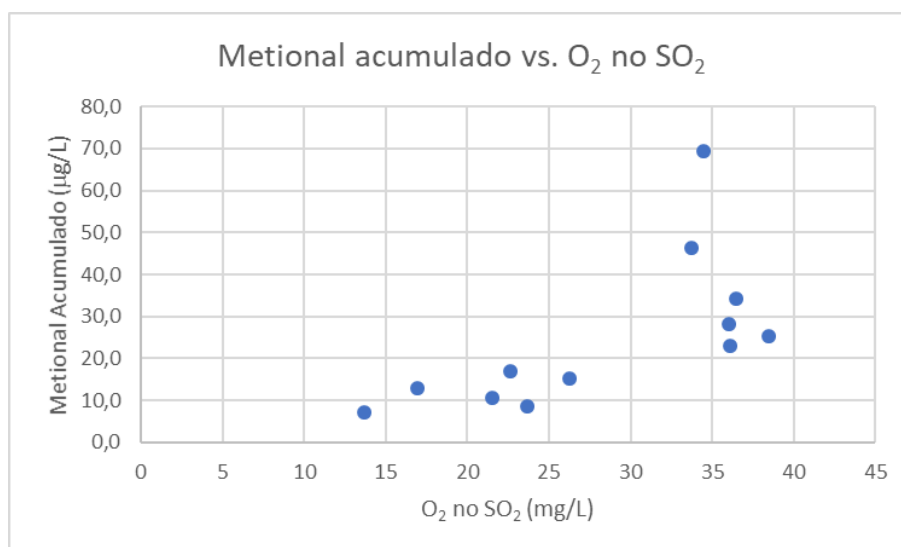
**Gráfica 13.** Relación entre metional acumulado ( $\mu\text{g/L}$ ) y velocidad de oxidación en las 12 muestras.



**Gráfica 14.** Relación entre el metional acumulado ( $\mu\text{g/L}$ ) y el  $\text{SO}_2$  total inicial en las 12 muestras.

La grafica 14 muestra una relación inversa entre el metional acumulado y el  $\text{SO}_2$  total inicial. El estudio de la regresión de esta gráfica muestra que el valor del estadístico F tabulado es menor que el valor de la F calculado, con el mismo nivel de significatividad

de los anteriores estudios. De nuevo, la regresión será significativa. Los vinos con mayor cantidad de  $\text{SO}_2$  inicial muestran menores valores de metional acumulado y viceversa. Los tintos, en general con mayor acumulación de metional, se acumulan a la izquierda de la gráfica, por otro lado, los vinos blancos y rosados, con menor acumulación de metional, se disponen en la parte inferior derecha de la gráfica. A primera vista se puede apreciar un valor atípico en la parte superior izquierda, que corresponde con el tinto reserva DM, con un valor de metional acumulado de 69,5 mg/L. Finalmente cabe destacar el comportamiento anómalo de dos tintos reserva, CL y VF, cuya concentración de  $\text{SO}_2$  inicial es superior a la del resto de vinos tintos y, por tanto, sus valores de metional acumulado son menores.



**Gráfica 15.** Relación entre metional acumulado ( $\mu\text{g/L}$ ) y  $\text{O}_2$  no  $\text{SO}_2$  en las 12 muestras.

Por último, la gráfica 15 muestra la dependencia de la acumulación del metional con el  $\text{O}_2$  no  $\text{SO}_2$ . La gráfica 15 muestra dos grupos claros, el primer grupo, compuesto por vinos con nivel de metional acumulado bajo y con nivel de  $\text{O}_2$  no  $\text{SO}_2$  menor de 30 mg/L, y el segundo con nivel de metional acumulado superior a 20 mg/L y de  $\text{O}_2$  no  $\text{SO}_2$  superior a 30 mg/L. En el primer grupo podemos encontrar los dos vinos rosados (VMG y VG) y los dos blancos (VT y VM), junto con un tinto joven (RB) y un tinto reserva (VF). En el segundo grupo se encuentran tres tintos jóvenes (MT, FP y BG) y tres tintos reserva (CV, DM y CL). Con el número de muestras trabajadas no se puede sacar conclusiones claras en la dependencia de la acumulación del metional con el  $\text{O}_2$  no  $\text{SO}_2$ .

#### 4.5 Conclusiones

Este trabajo ha permitido al estudiante adquirir competencias en el laboratorio analizando los diferentes analitos en las muestras objeto de estudio y participar en un grupo de investigación trabajando en equipo.

En el proceso de oxidación se confirmó la relación negativa entre la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  y la concentración inicial de acetaldehído. Las cantidades de acetaldehído acumuladas, fueron en todos los casos muy pequeñas, incluso negativas, encontrándose patrones de acumulación netamente distintos entre tintos y blancos y rosados. En los

primeros, la acumulación de acetaldehído está relacionada positivamente con la cantidad de O<sub>2</sub> no SO<sub>2</sub> consumida y negativamente por el tiempo de incubación, mientras que en el caso de blancos y rosados parece estar relacionada con el SO<sub>2</sub> total del vino.

Al contrario que en el caso del acetaldehído, el metional se acumula en todas las muestras tras el experimento de oxidación. Se encontró una relación positiva significativa entre la velocidad de oxidación de las muestras y la acumulación de metional. Sin embargo, a mayor cantidad de SO<sub>2</sub> total inicial se observó menor cantidad de metional acumulado. Las gráficas revelan patrones de acumulación diferentes para muestras según su color, influidas por la cantidad de SO<sub>2</sub> total inicial. Se observa una mayor acumulación de metional en los vinos tintos, cuyas concentraciones de SO<sub>2</sub> inicial es generalmente menor que las concentraciones en blancos y rosados, cuya acumulación de metional es mínima.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferreira, V.; La base química del aroma del vino: Un viaje analítico desde las moléculas hasta las sensaciones olfato-gustativas. *Rev. Real Academia de Ciencias. Zaragoza*. **2007**, 62, 7–36.
2. Peynaud, E.; *Enología practica: conocimiento y elaboración del vino*. Madrid: Ed. Mundi-Prensa S.A., **1984**.
3. Gómez, E.; Fundamentos de la microoxigenación de vinos tintos: factores influyentes y aplicaciones. *Acenologia, revista de enología científica y profesional*. **2016**, 25, 17-25.
4. Bueno, M.; Simultaneous determination of free and bonded forms of odor-active carbonyls in wine using a headspace solid phase microextraction strategy. *Journal of Chromatography A*. **2014**, 1369, 33-42.
5. San Juan, F.; Cacho, J.; Ferreira, V.; Escudero, A.; Aroma Chemical composition of red wines from different Price categories and its relationship to quality. *Journal of agriculture and food chemistry*. **2012**, 60, 5045-5056.
6. Escudero, A.; Asensio, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. *An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. Food chemistry*. **2002**, 77, 325-331.
7. Monforte, A.; Martins, S.; Silva, A. Strecker aldehyde formation in wine: new insights into the role of gallic acid, glucosa, and metals in phenylacetaldehyde formation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2017**, 102, 264-274.
8. Pripis-Nicolau, L.; De Revel, G.; Bertrand, A.; Maujean, A. Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48, 3761-3766.
9. Rizzi, G. P. Formation of strecker aldehydes from polyphenol-derived quinones and  $\alpha$ -amino acids in a nonenzymic model system. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2006**, 54, 1893-1897.
10. Ferreira, A. C. S.; Rodrigues, P.; Lopes, C.; de Pinho, P. G.; Hogg, T., Identification of compounds associated with the aroma characteristic of spoiled white wines. *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century*. **2003**, 596-601.
11. Oliveira, C. M.; Ferreira, A. C. S.; De Freitas, V.; Silva, A. M. S., Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*. **2011**, 44, 1115-1126.
12. Ugliano, M., Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, 61 (26), 6125-6136.
13. Rankine, B.C.; Pocock, K. F. Alkalimetric determination of sulfur dioxide in wine. *Aust. Wine Brew. Spirit Rev.* **1970**, 88, 40, 42, 44.
14. Bueno, M. Estrategias analíticas para la determinación de compuestos carbonílicos. Nuevos avances en la comprensión de los procesos de oxidación en carne de cordero y vino. *Ph.D. thesis, Universidad de Zaragoza*, **2016**.
15. Culleré, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. Analysis for wine C5–C8 aldehydes through the determination of their O-(2, 3, 4, 5, 6-pentafluorobenzyl) oximes formed directly in the solid phase extraction cartridge. *Analytica chimica acta*. **2004**, 524, 201-206.



16. Spiteller, G.; Kern, W.; Spiteller, P. investigation of aldehydic peroxidation products by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **1999**, 843, 29-98.
17. Bueno, M.; Marrufo-Curtido, A.; Carrascón, V.; Escudero, A.; Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V. Formation and accumulation of acetaldehyde and Strecker aldehydes during red wine oxidation. *Frontiers in chemistry*. **2018**, 6, 1-20.