



**Universidad**  
Zaragoza

# Trabajo Fin de Grado

GRADO EN QUÍMICA

Valoración del acetaldehído libre y combinado en diferentes vinos sintéticos mediante cromatografía líquida (HPLC) y de gases (GC)

Study of free and combined acetaldehyde in different synthetic wines by liquid chromatography (HPLC) and gas (GC)

Autora

María Paula Pereiro Trejo

Directora

Ana Escudero Carra

Departamento de Química Analítica

Facultad de Ciencias, UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

2021

## RESUMEN:

El acetaldehído se origina en el vino como subproducto del proceso de fermentación y mediante vía radicalaria en procesos de oxidación del etanol. Este aldehído influye en aspectos fundamentales como el aroma, el sabor y el color del vino. Por su naturaleza química electrofílica tiende a formar aductos con compuestos nucleofílicos presentes en el vino incluidos alcoholes, tioles, polifenoles y dióxido de azufre (mayoritariamente en el vino como bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) debido al pH ácido característico del vino (pH entre 3 y 4)). Es muy importante la forma en la que el acetaldehído se encuentra en el vino, ya que cuando está formando aductos no tiene importancia sensorial. Además, los aductos formados no tienen la misma fuerza, compitiendo unas reacciones con otras y dificultando así la medición de acetaldehído. En este trabajo se ha analizado la cantidad de acetaldehído en seis vinos sintéticos diferentes: un testigo, uno con glicerina, otro con ácido gálico y tres con concentraciones crecientes de sulfuroso. Las seis muestras dopadas con 92 mg/L de acetaldehído, se incubaron por triplicado y se analizaron mediante cuatro métodos analíticos diferentes (espacio de cabeza-cromatografía de gases con detección espectrometría de masas (HS-GC-MS), cromatografía de líquidos-UV (HPLC-UV), cromatografía de gases con detección de ionización a la llama (GC-FID) y análisis enzimático), con el objetivo de comparar los métodos y conocer la influencia de la matriz en las formas presentes de acetaldehído. Análisis GC-FID, HPLC-UV y enzimático proporcionan la cantidad de acetaldehído total, siendo el método HPLC-UV el más irreproducible. HS-GC-MS proporciona la cantidad de acetaldehído libre en las muestras. La presencia de glicerina disminuye la cantidad de acetaldehído libre más que la presencia de ácido gálico. La matriz que más disminuye la concentración de acetaldehído libre es aquella que contiene exceso de  $\text{SO}_2$  frente al contenido de acetaldehído.

## ABSTRACT:

Acetaldehyde is originated in wine as a product of the fermentation process and by radical means in ethanol oxidation processes. This aldehyde influences in fundamental aspects such as the aroma, taste and color of the wine. Due to its electrophilic chemical nature, it tends to form adducts with nucleophilic compounds present in wine, including alcohols, thiols, polyphenols and sulfur dioxide (mostly in wine as bisulfite ( $\text{HSO}_3^-$ ) due to the characteristic acidic pH of wine (pH between 3 and 4)). The form in which acetaldehyde is in wine is very important because when it is forming adducts it has not sensory importance. Furthermore, the adducts formed do not have the same strength, some reactions competing with each other, making acetaldehyde measurement difficult. In this work, the amount of acetaldehyde in six different synthetic wines has been analyzed: a control, one with glycerin, another with gallic acid and three with increasing concentrations of sulfur dioxide. The six samples doped with 92 mg/L acetaldehyde were incubated in triplicate and analyzed using four different analytical methods (headspace-gas chromatography with detection mass spectrometry (HS-GC-MS), liquid chromatography-UV (HPLC-UV), gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) and enzymatic analysis), with the aim of comparing the methods and knowing the influence of the matrix on the forms of acetaldehyde present. GC-FID, HPLC-UV and enzymatic analysis provide the amount of total acetaldehyde, being the HPLC-UV method the most irreproducible. HS-GC-MS provides the amount of free acetaldehyde in the samples. The presence of glycerin decreases the amount of free acetaldehyde more than the presence of gallic acid. The matrix that most reduces the concentration of free acetaldehyde is that which contains excess  $\text{SO}_2$  compared to the acetaldehyde content.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS:

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1.1. Reactivos</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1.2. Disoluciones</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1.3. Muestras</b> .....	<b>7</b>
<b>3.1.4. Estudio de la concentración de oxígeno en las muestras</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1.5. Métodos</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1.5.1. Determinación de acetaldehído libre mediante cromatografía de gases con detección espectrometría de masas (HS-GC-MS)</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1.5.2. Determinación de acetaldehído mediante cromatografía de líquidos-UV</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1.5.3. Determinación de acetaldehído mediante cromatografía de gases con detección de ionización a la llama (GC-FID)</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1.5.4. Determinación de acetaldehído mediante análisis enzimático</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>17</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1 Estudio del efecto del tiempo de incubación en las muestras</b> .....	<b>18</b>
<b>4.2 Resultados esperados</b> .....	<b>19</b>
<b>4.3 Resultados experimentales</b> .....	<b>20</b>
<b>4.4 Discusión</b> .....	<b>24</b>
<b>5. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>28</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Como subproducto de la fermentación de la uva y el mosto y de las reacciones de oxidación que tienen lugar en el proceso de fabricación y envejecimiento del vino, se forman diversos compuestos carbonílicos como acetaldehído, ácido pirúvico, acetoína, diacetilo, ácido 2-cetoglutárico, gliceraldehído, formaldehído y ácido glucorónico<sup>1</sup>. Dichos compuestos orgánicos adquieren un papel importante en el vino porque influyen en aspectos fundamentales como el aroma, el sabor y el color del producto<sup>1</sup>. La concentración de cada compuesto carbonílico varía de un tipo de vino a otro porque depende principalmente del proceso de elaboración y el almacenamiento del vino<sup>1</sup>, siendo en general, los niveles de acetaldehído (entre 5-490ppm), ácido pirúvico (460ppm) y acetoína (350ppm) los más elevados.<sup>2</sup> Debido a su papel esencial en el vino, este trabajo se centra en el estudio de acetaldehído en muestras de vino sintético.

El acetaldehído o etanal ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ) es un aldehído que en el vino tiene dos orígenes. Por una parte, es uno de los subproductos de la fermentación. Durante el proceso de fermentación, los sulfitos presentan una gran toxicidad para las levaduras, y como un mecanismo de defensa ante esta situación, las levaduras generan y liberan acetaldehído<sup>3</sup> que reacciona con el dióxido de azufre formando aductos estables como los ácidos hidroxisulfónicos<sup>2</sup>. De esta forma, la concentración de sulfitos presentes en la fermentación disminuye. Esta ruta de obtención de acetaldehído destaca en determinados vinos como son los vinos de Jerez<sup>4</sup>. Por otra parte, el etanal se produce también por vía radicalaria en procesos de oxidación del etanol durante el envejecimiento del vino<sup>2</sup>. Las reacciones de oxidación en el vino comienzan con un proceso redox entre el oxígeno y los metales hierro y cobre<sup>5</sup> (2,8-16 mg/L y 0,11-3,6 mg/L respectivamente)<sup>6</sup>. Tras esta transferencia de electrones se forma peróxido de hidrógeno que, actuando el hierro como catalizador de la reacción, se reduce generando el radical hidroxilo (reacción de Fenton)<sup>7</sup>. Este radical hidroxilo oxida a numerosos sustratos, generando diferentes productos de oxidación que hay que tener presentes en el estudio y análisis de la calidad final del vino. Esta segunda vía de formación de acetaldehído es más relevante en la mayoría de los vinos porque es la que origina una mayor concentración del carbonilo<sup>4</sup>. Por tanto, dependiendo del tipo de vino, la concentración de acetaldehído puede oscilar entre 5-30 mg/L en vinos secos estándares hasta incluso 500 mg/L en vinos tipo Oporto o Jerez<sup>2</sup>.

Con respecto a su reaccionabilidad, el acetaldehído por su naturaleza química electrofílica tiende a formar aductos con compuestos nucleofílicos presentes en el vino incluidos alcoholes, tioles, polifenoles y dióxido de azufre (mayoritariamente en el vino como bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ )<sup>8</sup> debido al pH ácido característico del vino (pH entre 3 y 4))<sup>2</sup>. Sin embargo, los aductos formados no tienen la misma fuerza y por lo tanto en el vino hay competencia entre unas reacciones y otras, dificultando así la medición de acetaldehído<sup>2</sup>. Por consiguiente, los métodos analíticos utilizados para determinar este analito en una muestra de vino deben diferenciar entre acetaldehído libre (concentración de acetaldehído que no está formando aductos) y acetaldehído total.

Al tratarse de un compuesto volátil (punto de ebullición  $21^\circ\text{C}$ <sup>9</sup>), como se ha mencionado antes, el etanal adquiere un papel fundamental en el aroma del vino, sin embargo, su protagonismo en este ámbito depende de la forma en la que se encuentre presente en el vino, ya que cuando está formando aductos no tiene importancia sensorial, sólo la tiene cuando está libre. Por lo tanto, para obtener el aroma deseado la concentración de acetaldehído debe ser mínima, ya que una concentración en exceso imparte un aroma desagradable<sup>10</sup>.

Cabe destacar que el acetaldehído también actúa como nucleófilo atacando la porción electrofílica del catión flavilio (antocianina). Así promueve la polimerización entre compuestos polifenólicos (antocianinas y catequinas o taninos) responsables del color del vino, formando pigmentos poliméricos estables y alterando el color del producto<sup>10</sup>.

Además, el acetaldehído participa en reacciones de acetilación con etanol o glicerol generando acetal dietílico o acetal heterocíclico<sup>2</sup>.

Para determinar acetaldehído, se utilizan diversos métodos analíticos atendiendo a todas estas características volátiles y de reaccionabilidad que se han mencionado. Estos métodos analíticos pueden variar desde cromatografía de capa fina y en papel o métodos de baja sensibilidad basados en la colorimetría como los métodos enzimáticos<sup>11</sup> o la utilización de biosensores enzimáticos<sup>12</sup>, hasta métodos de mayor precisión, sensibilidad y especificidad como la cromatografía líquida o la cromatografía de gases<sup>13</sup>. Un método que, aunque es menos sensible que los métodos cromatográficos, también se utiliza habitualmente es la espectroscopia de RMN, capaz de detectar simultáneamente varios componentes de una muestra de vino y requiriendo una preparación mínima de la muestra<sup>2</sup>. El avance y desarrollo dentro de este último método han conseguido mejorar su selectividad, sensibilidad y resolución para el análisis de vinos por RMN, permitiendo estudiar de esta forma reacciones con acetaldehído que con otros métodos convencionales de cromatografía no se habían conseguido profundizar<sup>2</sup>. Un ejemplo de ello consiste en la reacción de acetaldehído con etanol. Esta reacción genera como producto etil hemiacetal que se pensaba que era un intermedio inestable porque los métodos cromatográficos no eran capaces de medirlo, sin embargo, la espectroscopía de RMN ha permitido determinar que en realidad en el vino una fracción grande de etanal está presente en forma de hemiacetal<sup>2</sup>.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es que el alumno haga uso de los conocimientos adquiridos en el grado a la resolución de un problema químico concreto en el entorno de un grupo de trabajo.

Los objetivos específicos son:

- estudiar cómo afecta la matriz a las diferentes formas en las que se puede encontrar el acetaldehído en un vino sintético.
- comparar cuatro métodos analíticos diferentes (espacio de cabeza-cromatografía de gases con detección espectrometría de masas (HS-GC-MS), cromatografía de líquidos-UV (HPLC-UV), cromatografía de gases con detección de ionización a la llama (GC-FID) y análisis enzimático) y establecer si existen diferencias significativas entre ellos.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

##### 3.1.1. Reactivos

Acetaldehído (99,5%), 2-metilbutirato de metilo (99%) adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España). Ácido Gálico, CAS 149-91-7, adquirido en Sigma, Life Science. Acetonitrilo, CAS 75-05-8, adquirido en Scharlau, Scharlab S.L. Ácido sulfúrico (96%) CAS-No: 7664- 93- 9, Ácido L (+) - Tartárico (99%) CAS-No: 87-69-4, Glicerina (99,5%) CAS-No: 56-81-5, Sodio disulfito (97,0%) CAS-No: 7681-57-4, todos adquiridos en PanReac, AppliChem. Ácido fórmico ( 98 - 100% ) CAS-No: 64- 18- 6, Etanol (99%) CAS-No: 64-17-5, adquiridos en EMD Millipore Corporation. 2,4-dinitrofenilhidrazina CAS 119-26-6, adquirido en Molekua. 2-butanol adquirido en MERCK. Agua Milli-Q, Millipore producido por Advantage Q-POD™.

##### 3.1.2. Disoluciones

Para dopar las muestras con una concentración exacta y conocida de acetaldehído se preparó previamente una disolución madre de acetaldehído que contenía una elevada concentración conocida del carbonilo y conservada en las condiciones adecuadas. Esta disolución madre se utilizó posteriormente para preparar disoluciones de acetaldehído intermedias, denominadas así porque tienen una concentración de acetaldehído menor que la disolución madre, y con estas últimas se doparon todas las muestras.

Al tratarse de una sustancia volátil, el vial que contenía la disolución madre tiene una válvula de cierre diseñada para evitar la volatilización y pérdida del compuesto. El vial utilizado se puede observar en la Figura 1. La válvula de cierre tiene dos modos, abertura cerrada (rojo) o abierta (verde), y un orificio en la parte superior por donde penetra la aguja de la jeringa para extraer sustancia del vial.

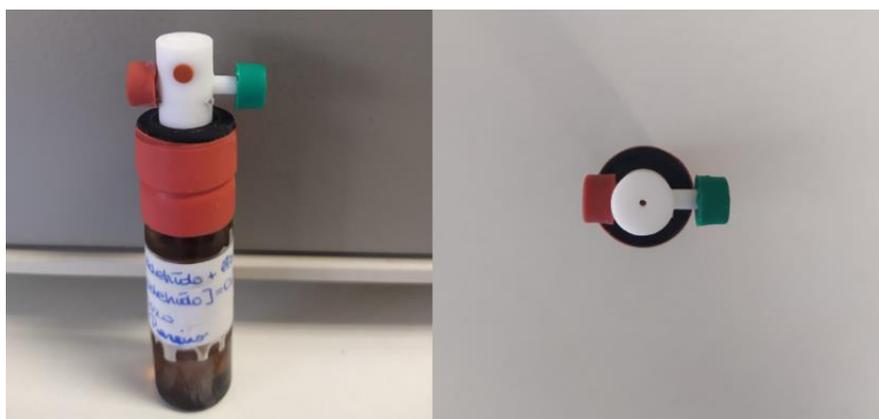


Figura 1. Vial utilizado para el almacenamiento de la disolución madre de acetaldehído

La preparación de la disolución madre consistió en primer lugar en pesar el vial en una balanza analítica, una vez pesado se taró la balanza y se añadieron 5ml de etanol al 99%, utilizado para conservar el acetaldehído. Se pesaron los 5 ml de etanol añadidos y se volvió a tarar la balanza. A continuación, rápidamente, se pesaron los 5 ml de acetaldehído que contenía una ampolla de acetaldehído que se abrió justo en ese momento. Es importante realizar los pasos de manejo de acetaldehído de forma rápida por su volatilidad, pero a la vez de forma segura porque el acetaldehído

a tan elevada concentración es tóxico en contacto con la piel. La disolución madre se conservó en el congelador.

En la preparación de la disolución madre de acetaldehído se obtuvieron los siguientes resultados:

$$\text{Peso de 5ml de etanol} = 3,7951 \text{ g}$$

$$\text{Peso de 5ml de acetaldehído} = 3,6024 \text{ g}$$

Cálculo de la concentración de acetaldehído en la disolución madre (densidad de etanol y acetaldehído 0,79g/ml y 0,788g/ml respectivamente):

$$\text{Volumen real de etanol pesado: } 3,7951 \text{ g etanol} \times \frac{1 \text{ ml}}{0,79 \text{ g}} = 4,803 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen real de Acetaldehído pesado: } 3,6024 \text{ g etanol} \times \frac{1 \text{ ml}}{0,788 \text{ g}} = 4,572 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen total} = 4,572\text{ml acetaldehído} + 4,8039\text{ml etanol} = 9,375 \text{ ml}$$

$$[\text{Acetaldehído en la disolución madre}] = \frac{3,6024 \text{ g}}{9,375 \text{ ml}} = 0,3842 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 384235,6 \text{ ppm}$$

Por lo tanto, la disolución madre de acetaldehído tiene una concentración de 384235,6ppm.

A partir de la disolución madre de acetaldehído, como se ha comentado anteriormente, se prepararon disoluciones intermedias con una concentración de etanol de 1537ppm. Dependiendo del volumen que se requiera de esta disolución se han preparado volúmenes de 10ml o 5ml mediante la siguiente metodología:

Para un volumen de 5ml, en un matraz aforado de 5 ml se vierten aproximadamente 3ml de etanol 99%, con una jeringa específica para disolución madre de acetaldehído se añaden 20μL de disolución madre de acetaldehído (384235,6ppm) y rápidamente se enrasa con etanol 99%.

Además de la disolución madre y de las respectivas disoluciones intermedias de acetaldehído, para preparar las muestras que se analizaron es necesario una disolución de vino sintético. Composición del vino sintético preparado: agua MilliQ; 5% en etanol; 5g/L de ácido tartárico; pH 3,5. El procedimiento de preparación consiste en disolver, en un vaso de precipitados de 500ml, 2,5g de ácido tartárico (pesados con balanza analítica) en 400ml de agua MilliQ. Añadir 25ml de etanol 99% y agitar con agitador magnético. Finalmente medir el pH con un pHmetro y ajustar con disoluciones de NaOH 8M y 4M hasta obtener en la disolución un pH exacto de 3,5. Verter el contenido del vaso en un matraz aforado de 500ml y enrasar con agua MilliQ. Esta disolución se conservó en una botella de vidrio en la nevera. Su grado alcohólico fue inferior al requerido finalmente (12% v/v), teniendo en cuenta que las adiciones posteriores de cada una de las muestras aportarán etanol.

### 3.1.3. Muestras

Antes de preparar las muestras, la disolución de vino sintético se purgó con una corriente de N<sub>2</sub> durante 20 minutos para disminuir lo máximo posible la concentración de oxígeno en la disolución. No se utilizó cámara de anoxia durante la preparación de las muestras, pero los viales se llenaron hasta

arriba (sin espacio de cabeza) y se sellaron con silicona para impedir el acceso del oxígeno. En la Tabla 1. se detalla la composición de cada una de las muestras utilizadas en el estudio.

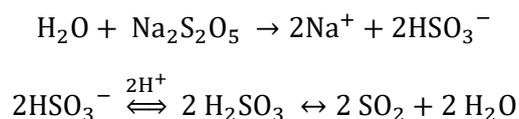
**Tabla 1. Muestras utilizadas en el estudio y composición de cada una de ellas**

Muestras	Composición y condiciones de la muestra
VT	Vino testigo. Composición: agua MilliQ; 12% en etanol; 5g/L de Ácido tartárico; pH 3,5. Estas muestras se incubaron durante 24h a temperatura ambiente del laboratorio (20 °C).
VS2:1 VS2:2 VS2:4	Composición: agua MilliQ; 12% en etanol; 5g/L de Ácido tartárico; pH 3,5; Disulfito sódico (64ppm de SO <sub>2</sub> , 128ppm de SO <sub>2</sub> , 256ppm de SO <sub>2</sub> ). El objetivo es obtener las proporciones 2mM acetaldehído:1mM SO <sub>2</sub> , 2mM de acetaldehído:2mM SO <sub>2</sub> y 2mM de acetaldehído:4mM SO <sub>2</sub> en las muestras VS2:1, VS2:2 y VS2:4 respectivamente. Estas muestras se incubaron durante 24h a temperatura ambiente del laboratorio (20 °C).
VSG	Composición: agua MilliQ; 12% en etanol; 5g/L de Ácido tartárico; pH 3,5; 1,8 g/L de Glicerina. Proporción molar 2mM acetaldehído: 20mM glicerina (1840mg/L de glicerina). Estas muestras se incubaron a 35°C durante 30 días.
VSAG	Composición: agua MilliQ; 12% en etanol; 5g/L de Ácido tartárico; pH 3,5; 2mM de Ácido Gálico. Proporción molar 1:1. Estas muestras se incubaron a 35°C durante 30 días.

Se realizó un total de tres réplicas para cada muestra en cada uno de los cuatro métodos de cuantificación. Todas las muestras se doparon con una concentración exacta de 92,2 ppm de acetaldehído para que, de esta forma, todas las muestras tengan una concentración que nos podemos encontrar en un vino tinto o un vino blanco (entre 3-494 ppm<sup>1</sup>).

Preparación de la muestra VT (Vino testigo). En un matraz de 50ml añadir aproximadamente 35ml de vino sintético 5% en etanol. A continuación, añadir con micropipeta 500µL de etanol 99% para que así la muestra tenga en total un 12% en etanol. Luego añadir con pipeta 3ml de disolución intermedia de acetaldehído (1537ppm), dopando de esta forma la muestra con 92,2ppm de acetaldehído. Enrasar con vino sintético al 5% en etanol y repartir el contenido del matraz en tres viales de 13ml que se utilizarán para obtener las tres réplicas de cada uno de los métodos.

Disolución madre de sulfuroso con una concentración de 5794ppm (Disulfito sódico). Es importante tener en cuenta que por cada mol de disulfito sódico (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) se forman dos moles de SO<sub>2</sub> mediante las siguientes reacciones:



Para preparar esta disolución en una zapatilla de vidrio se pesan 0,2150g de disulfito sódico. A continuación, se disuelve en un vaso y se añade en un matraz aforado de 25ml. Se enrasa con agua MilliQ.

Preparación de la muestra VS2:1. En un matraz de 50ml añadir aproximadamente 35ml de vino sintético 5% en etanol. A continuación, añadir con micropipeta 500µL de etanol 99%, para tener en total en la muestra un 12% en etanol, y 552µL de la disolución madre de SO<sub>2</sub> (5794ppm), para obtener una proporción 2 mM acetaldehído : 1 mM SO<sub>2</sub>. Luego añadir con pipeta 3ml de disolución intermedia de acetaldehído (1537ppm), para dopar así la muestra con 92,2ppm de acetaldehído. Enrasar con vino sintético al 5% en etanol y repartir el contenido del matraz en tres viales de 13ml que se utilizarán para obtener las tres réplicas de cada uno de los métodos.

Preparación de la muestra VS2:2. En un matraz de 50ml añadir aproximadamente 35ml de vino sintético 5% en etanol. A continuación, añadir con micropipeta 500µL de etanol 99%, para tener en total en la muestra un 12% en etanol, y 1,10ml de la disolución madre de SO<sub>2</sub> (5794ppm), para obtener una proporción 2 mM acetaldehído : 2 mM SO<sub>2</sub>. Luego añadir con pipeta graduada 3ml de disolución intermedia de acetaldehído (1537ppm), para dopar así la muestra con 92,2ppm de acetaldehído. Enrasar con vino sintético al 5% en etanol y repartir el contenido del matraz en tres viales de 13ml.

Preparación de la muestra VS2:4. En un matraz de 50ml añadir aproximadamente 35ml de vino sintético 5% en etanol. A continuación, añadir 500µL de etanol 99%, para que de esta forma la muestra tenga en total un 12% en etanol, y 2,20ml de la disolución madre de SO<sub>2</sub> (5794ppm), para obtener una proporción 2 mM acetaldehído : 4 mM SO<sub>2</sub>. Luego añadir con pipeta de 3ml de disolución intermedia de acetaldehído (1537ppm), para dopar así la muestra con 92,2ppm de acetaldehído. Enrasar con vino sintético al 5% en etanol y repartir el contenido del matraz en tres viales de 13ml.

Preparación de la muestra VSG. En un matraz de 100ml pesar con balanza analítica 184mg de glicerina y, una vez pesados, añadir aproximadamente 60ml de vino sintético 5% en etanol. A continuación, añadir 1ml de etanol 99%, para que de esta forma la muestra tenga en total un 12% en etanol. Luego añadir, con pipeta de 10ml, 6ml de disolución intermedia de acetaldehído (1537ppm), para dopar así la muestra con 92,2ppm de acetaldehído. Enrasar con vino sintético al 5% en etanol. Repartir el contenido del matraz en tres viales de 13ml.

Preparación de la muestra VSAG. Pesar en una zapatilla de vidrio 34,024mg de ácido gálico. Una vez pesados, verter el contenido en un matraz de 100ml, añadir aproximadamente 60ml de vino sintético 5% en etanol y 1ml de etanol 99%, para tener en total en la muestra un 12% en etanol. Para disolver completamente el ácido gálico utilizar agitación mediante ultrasonidos (aproximadamente 2 minutos). Finalmente añadir, con pipeta de 10ml, 6ml de disolución intermedia de acetaldehído (1537ppm), para dopar así la muestra con 92,2ppm de acetaldehído, y enrasar con vino sintético al 5% en etanol. Repartir el contenido del matraz en tres viales de 13ml.

Todos los viales finales preparados con las muestras se cerraron herméticamente con silicona para evitar el aumento de la concentración de oxígeno en las muestras.

### **3.1.4. Estudio de la concentración de oxígeno en las muestras**

Como se ha especificado en el apartado anterior, no se trabajó con las muestras en cámara de anoxia. En su lugar, previo a sus respectivas preparaciones, la disolución de vino sintético se purgó con N<sub>2</sub>. Además, los viales se llenaron con muestra hasta arriba (sin espacio de cabeza) y se sellaron con silicona para impedir el acceso de oxígeno durante el tiempo de incubación de la muestra. La desventaja de llevar a cabo este procedimiento consiste en que a pesar de haber purgado y haber

trabajado rápidamente hasta el sellado final de los viales, las muestras pueden haber incorporado oxígeno ambiental, algo que es inevitable sin cámara de anoxia. Para conocer la concentración de oxígeno disuelto en las muestras, algunas muestras preparadas para analizar se adicionaron en viales de 13ml que incorporaban un sensor óptico PSt3 para medir el oxígeno mediante un medidor óptico Nomacor SA (Thimister-Clermont, Belgium).

### 3.1.5. Métodos

En este trabajo las muestras se analizaron mediante cuatro métodos diferentes para dilucidar las formas cuantificadas por comparación de los mismos.

Por una parte, la determinación de acetaldehído libre se realizó mediante el muestreo del espacio de cabeza y posterior análisis mediante cromatografía de gases con detección espectrometría de masas (HS-GC-MS). Por otra parte, la determinación de acetaldehído total en las muestras de vino sintético se realizó mediante tres métodos diferentes. El primer método consiste en la derivatización con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) seguido de un análisis mediante cromatografía de líquidos-UV (HPLC-UV). El segundo método se basa en la determinación mediante cromatografía de gases con detección de ionización a la llama (CG-FID). Finalmente, las muestras de vino modelo se analizaron mediante un método enzimático (Biosystems Enología).

#### 3.1.5.1. Determinación de acetaldehído libre mediante cromatografía de gases con detección espectrometría de masas (HS-GC-MS)

Cromatografía de gases del espacio de cabeza con detección espectrometría de masas (HS-GC-MS) es un método que no es capaz de romper los aductos de etanal formados en las diferentes muestras, determinando acetaldehído libre. Estas características proporcionan que sea un método idóneo para estudiar el porcentaje de analito en las formas no acomplexadas.

#### Equipo del método cromatográfico

El análisis se llevó a cabo en un equipo Varían CP-3800 equipado con un espectrómetro de masas Saturno 2000 con una columna DB-WAX (30m x 0,25id x 0,25 espesor fase), flujo de columna 1,48ml/min, J&W Scientific (Agilent Technologies, Santa Clara, CA., Estados Unidos).

El valor del límite de detección (LD) para HS-GC-MS es 0,56 ppm.

#### Disoluciones del método

Estándar interno 2-metilbutirato de metilo. Para preparar la disolución de estándar interno pesar en una balanza analítica 20μL de patrón interno 2-metilbutirato de metilo, tarar y a continuación pesar 20 ml de etanol 99% (densidad 0,79g/ml).

$$\text{Volumen real de etanol pesado: } 15,1089 \text{ g etanol} \times \frac{1 \text{ ml}}{0,79 \text{ g}} = 19,13 \text{ ml} = 19125,2 \mu\text{L}$$

$$\text{Volúmen total} = 19125,2 \mu\text{L} + 20\mu\text{L} = 19145,2 \mu\text{L}$$

$$[2 - \text{metilbutirato de metilo}] = \frac{0,0177\text{g}}{19125,2 \times 10^{-6}\text{L}} = 0,9245 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 924,5 \text{ ppm}$$

La disolución de estándar interno tiene una concentración de 2-metilbutirato de metilo igual a 924,5ppm. Almacenar en el congelador.

Preparación de la disolución de vino sintético dopada con 92,2 ppm de acetaldehído con un 12% en etanol. En un matraz aforado de 10ml añadir aproximadamente 6ml de vino sintético al 5% en etanol. A continuación, añadir con micropipeta 100μL de etanol (para que la disolución alcance el 12% en etanol) y 600μL de disolución intermedia de acetaldehído (1537ppm). Finalmente enrasar con vino sintético al 5% en etanol. Esta disolución se preparó dos veces para calcular el factor de respuesta medio. Preparación de las disoluciones el mismo día del análisis (preparación diaria).

### Metodología

Para el análisis, se transfirieron con pipeta 5 ml de muestra a un vial SPME de 10 ml, se encapsuló el vial con una cápsula magnética y luego se agregó, utilizando una jeringa específica para el estándar interno y homogeneizada, 26 μL de estándar interno 2-metilbutirato de metilo (924,5 ppm en etanol). A continuación, los viales se incubaron a 40 °C durante 5 min sin agitación. Posteriormente, se inyectaron 400μL del espacio de cabeza en un inyector PTV, trabajando en modo *split* con velocidad de inyección de 100μL/s, *split* 1:16, inyector a 200 °C, *liner* 800μL. La jeringa de 1ml hermética al gas se calentó 10 °C por encima de la temperatura de incubación (por lo tanto, a 50°C). Después de la inyección, la jeringa caliente se limpió purgando con una corriente de nitrógeno puro durante 5 min. El programa de temperatura para el método se inició a 35 °C, esa temperatura se mantuvo durante 4 min y luego se elevó hasta 220°C a 50 °C/min, manteniendo esta temperatura final durante 5 min. El gas portador fue helio a 55,7 cm/s.<sup>14</sup>

### Cuantificación

La adquisición del espectrómetro de masas se realizó en modo SCAN desde m/z 40 a 110. Los m/z usados para la cuantificación fueron 43 + 44 para acetaldehído (tiempo de retención 2,175 min) y 88 para el patrón interno 2-metilbutirato de metilo (tiempo de retención 5,125 min)<sup>14</sup>. Para la calibración del método se obtuvo el factor de respuesta. Para ello, se prepararon dos disoluciones de vino sintético dopadas con 92,2 ppm de acetaldehído con un 12% en etanol que siguieron el mismo procedimiento que las muestras. Cálculo del factor de respuesta (FR):

$$\text{Área relativa (Señal relativa muestra)} = \frac{\text{Área obtenida para acetaldehído}}{\text{Área obtenida para estándar interno}}$$

$$\text{FR} = \frac{\text{Concentración de acetaldehído en el patrón}}{\text{Señal relativa del acetaldehído patrón}}$$

$$\text{FR medio} = \frac{\text{FR disolución 1 de vino sintético dopada} + \text{FR disolución 2 de vino sintético dopada}}{2}$$

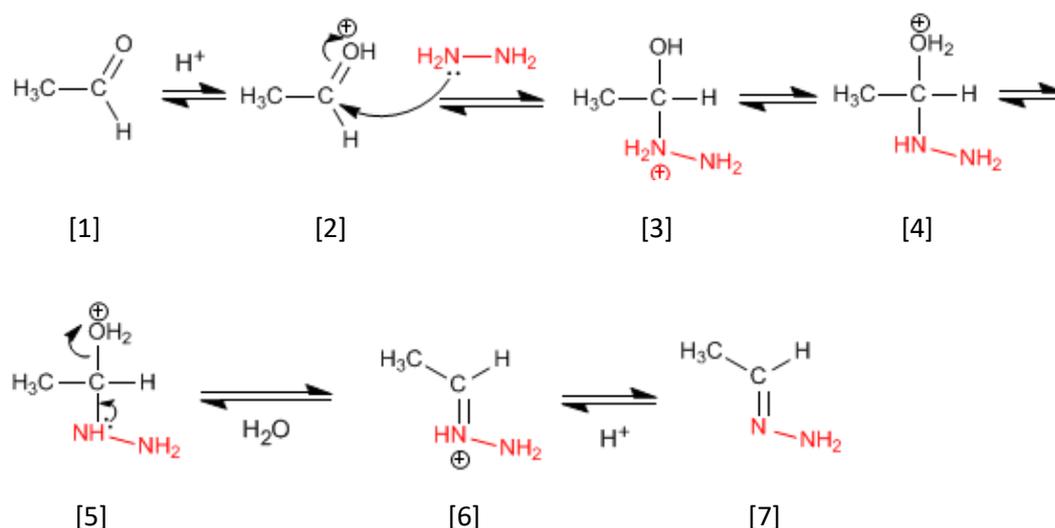
$$\text{FR medio} \times \text{Señal relativa muestra} = \text{Concentración de acetaldehído en la muestra (ppm)}$$

### 3.1.5.2. Determinación de acetaldehído mediante cromatografía de líquidos-UV (HPLC-UV)

El acetaldehído se determinó mediante derivatización con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) a 65 °C y posterior análisis mediante cromatografía de líquidos-UV.<sup>13</sup>

En este método las muestras se acidifican con ácido sulfúrico al 25% con el objetivo de favorecer que la forma mayoritaria del ácido sulfuroso sea SO<sub>2</sub> molecular, bajo esta forma el ácido sulfuroso no es nucleófilo y por lo tanto no forma aductos con los compuestos carbonílicos. Adicionalmente, se añade metabisulfito para prevenir la formación de aldehídos durante el proceso de derivatización a 65°C, debido a que, aunque las condiciones de reacción sean ácidas, se pueden producir reacciones de oxidación en presencia de aire. Por lo tanto, el SO<sub>2</sub> actúa como antioxidante reaccionando con las formas reducidas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno y previniendo así la formación de aldehídos.<sup>13</sup>

Finalmente, la elevada temperatura (65°C) del proceso de derivatización reduce el tiempo de reacción de la hidrólisis ácida. A continuación, se detallan las reacciones que tienen lugar en el proceso<sup>13</sup>:



En primer lugar, debido al pH bajo, se produce la protonación del acetaldehído [1], formando así su ácido conjugado [2] y permitiendo el ataque nucleófilo del DNPH y la formación del intermedio [3]. A continuación, el compuesto [3] intercambia un protón entre el nitrógeno y el oxígeno con el objetivo de transformar el grupo hidroxilo del compuesto [3] en el buen grupo saliente H<sub>2</sub>O<sup>+</sup> del compuesto [4]. Finalmente, el compuesto [4] o [5] pierde este grupo saliente y se transforma en el compuesto [6] cuya desprotonación da lugar a la hidrozona final [7]. De esta forma, el método cuantifica la suma de las formas libres y acomplejadas del acetaldehído, obteniendo como resultado el acetaldehído total de la muestra.

#### Equipo y condiciones del método cromatográfico

Cromatógrafo de HPLC: modelo 1220 Infinity LC de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), acoplado a un detector de UV/VIS.

Columna: Green Core Shell 2,6µm 150x3mm de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

PreColumna: Optiguard 1mm Guard Column C18 Violet Label de Supelco (Ref: 51177-U).

Detección: Longitud de onda 365nm.

Inyección: Volumen de inyección 5µL.

Método cromatográfico: temperatura de la columna 35 °C, flujo de fase móvil 0,75ml/min, tiempo de retención del acetaldehído: 4,47 min.

Condiciones:

Tiempo (minutos)	[FASE A] %	[FASE B] %
0	45	55
5	5	95
7	5	95
8	45	55
12	45	55

Los valores del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) del método son 1mg/L y 3mg/L respectivamente.<sup>13</sup>

#### Fases móviles y disoluciones del método

FASE A. En matraz aforado se prepara una disolución de ácido fórmico al 0,5% en agua MilliQ. Una vez preparada la disolución, se filtra con filtros HATF 0,45µM. Es necesario sonicar. La FASE A debe prepararse el mismo día que se realizarán los análisis, por lo tanto, esta fase no se puede reutilizar para una secuencia de análisis que transcurra otro día (preparación diaria).

FASE B. Acetonitrilo HPLC. Es necesario sonicar para eliminar gases disueltos. La FASE B se puede recuperar de una secuencia de análisis a la siguiente.

Mezcla de fase móvil 45% FASE A y 55% FASE B para diluir la muestra. Utilizando las fases A y B desgasificadas, en un vial de 20 ml añadir 4,5ml de FASE A y 5,5ml de FASE B. Preparación diaria.

Disolución de SO<sub>2</sub> (1120mg/L). En un vial de 20ml disolver 20mg de metabisulfito potásico en 10ml de agua MilliQ medidos con probeta. Preparación diaria.

Disolución de ácido sulfúrico al 25%. En un matraz aforado de 10ml añadir aproximadamente 5 ml de agua MilliQ, a continuación, añadir 2,6 ml de ácido sulfúrico concentrado al 96% medidos con macropipeta y enrasar con agua MilliQ. Verter el contenido del matraz en un vial de 20ml. Esta disolución se puede utilizar durante una semana.

Disolución de DNPH (7,8g/L). Pesar 160mg de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) en un vial de 20ml y añadir 1ml de ácido sulfúrico concentrado al 96%. Sonicar hasta disolver por completo. Para ello es aconsejable dejar sonicando durante 5 minutos, luego con cuidado agitar manualmente el vial para que el sólido que aún no se ha disuelto se coloque en el centro de la disolución y finalmente volver a sonicar durante aproximadamente 2 minutos para que se disuelva el contenido completamente. Mientras el DNPH se disuelve, en un matraz aforado de 20ml añadir 4,4ml de agua MilliQ con macropipeta y enrasar con etanol. Una vez disuelto por completo el DNPH, se filtra esta disolución, utilizando un embudo de vidrio y papel de filtro, a un vial de 20ml cubierto de papel aluminio para

evitar el contacto del DNPH con la luz. Para realizar la filtración, arrastrar varias veces el contenido del vial de origen con la disolución de 4,4ml de agua MilliQ y 15,6ml de etanol preparada previamente. Preparación diaria.

Disolución de vino sintético dopada con 92,2 ppm de acetaldehído con un 12% en etanol siguiendo la misma metodología de preparación descrita en el método HS-GC-MS. Preparación diaria.

Disolución de vino sintético sin dopar. En un matraz aforado de 5ml añadir aproximadamente 3ml de vino sintético al 5% en etanol. A continuación, añadir con micropipeta 350µL de etanol (para que la disolución alcance el 12% en etanol) y finalmente, enrasar con la disolución de vino sintético al 5% en etanol. Preparación diaria.

### Metodología

Una vez preparadas las fases A y B se deben sonicar durante aproximadamente 15 minutos para eliminar las burbujas de aire y no dañar el equipo cromatográfico. Al finalizar los 15 minutos controlar que la temperatura de las fases móviles no aumentó.

Para realizar la derivatización en viales de vidrio de 2 ml se añadieron 100µL de muestra con micropipeta, posteriormente se añadieron en el siguiente orden indicado: 20µL de disolución de SO<sub>2</sub>, 20µL de ácido sulfúrico al 25%, 140 µL de DNPH 7,8g/L. A continuación, se agitó el vial en Vortex (durante 8 segundos) y se incubó en un horno a 65 °C durante 15 minutos exactos. Transcurrido este tiempo, se paró por completo la reacción de derivatización introduciendo los viales en un baño de hielo. Es importante no sumergir los viales ni que el nivel del agua sobrepase la altura de la rosca del vial. Una vez que los viales estén fríos, se añadieron 280µL de fase móvil 45%A 55%B y se filtró el volumen total del vial con filtros HPLC PTFE utilizando jeringas desechables de 1ml. Para trasvasar el líquido del vial origen al cuerpo de las jeringas desechables se utiliza una pipeta pasteur<sup>13</sup>. De esta forma, los viales ya están preparados para el posterior análisis en el cromatógrafo. A la hora de inyectar las muestras es aconsejable colocar los viales de muestra de forma aleatoria en el inyector automático del cromatógrafo para así detectar en los resultados posibles errores.

La derivatización realizada sólo es estable durante 10 horas. Por lo tanto, desde el momento en el que se añade a la muestra la disolución de DNPH hasta el momento en el que se inyecta en el cromatógrafo, no pueden transcurrir más de 10 horas en total.

### Cuantificación

Para realizar la cuantificación de acetaldehído total presente en las muestras se calibró mediante el factor de respuesta realizando varias muestras de control en cada serie de análisis preparadas el mismo día de análisis de las muestras. En primer lugar, para cada serie de análisis se inyectó como vial 1 una muestra de la mezcla de fase móvil 45% FASE A 55% FASE B, preparada el mismo día de análisis. Esta primera muestra inyectada sirve para verificar que la lámpara del detector funciona correctamente, que la presión de la columna es la adecuada y verificar una correcta línea base para comenzar con el análisis de las muestras propiamente. Por otra parte, en el último lugar de inyección se coloca un vial con acetonitrilo HPLC que utiliza el equipo para la limpieza de inyección. Además, en

cada serie de medidas se analizaron también dos muestras de vino sintético 12% en etanol dopadas con 92,2ppm de acetaldehído y una muestra de vino sintético 12% en etanol sin acetaldehído.

Cálculo del factor de respuesta (FR) y concentración de etanol total presente en las muestras:

$$FR = \frac{[Acetaldehído]_{vino\ sintético}}{\text{Área vino sintético dopado} - \text{Área vino sintético no dopado}}$$

$$[Acetaldehído]_{muestra} = FR_{medio} \times (\text{Área de la muestra} - \text{Área del vino sintético sin dopar})$$

### 3.1.5.3. Determinación de acetaldehído mediante cromatografía de gases con detección de ionización a la llama (GC-FID)

Este método determina acetaldehído total porque rompe directamente en el puerto del inyector los aductos del acetaldehído formados en la muestra.

#### Equipo y condiciones del método cromatográfico

Equipo GC 8000 Series. Carlo Erba Instruments.

Columna: Scientific, Catalog 1257334, 30m x 0,530 mm DB-WAXETR, 2.00 Micras de espesor en la fase.

Temperatura del inyector 250 °C con una relación de *split* 1:4.

Se utilizó hidrógeno como gas portador y la presión se mantuvo a 27,5KPa.

El programa de temperatura utilizado una vez la muestra se ha inyectado consistió en mantener una temperatura de 50 °C durante 5 minutos y luego elevar la temperatura hasta 220 °C en 10 minutos.

La temperatura del detector FID fue 250 °C.

El valor del límite de detección (LD) para GC-FID es 0,22 ppm.

#### Disoluciones del método

Disolución de patrón interno 2-butanol. Pesar en una balanza analítica 100μL de patrón interno 2-butanol, tarar y a continuación pesar 20 ml de etanol 99% (densidad 0,79g/ml).

$$\text{Volumen real de etanol pesado: } 15,6598 \text{ g etanol} \times \frac{1 \text{ ml}}{0,79 \text{ g}} = 19,82 \text{ ml} = 19822 \mu\text{L}$$

$$\text{Volúmen total} = 19822 \mu\text{L} + 100\mu\text{L} = 19922 \mu\text{L}$$

$$\frac{0,0730\text{g}}{19922 \times 10^{-6}\text{L}} = 3,6642 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 3664,2 \text{ ppm}$$

La disolución de estándar interno tiene una concentración de 3664,2 ppm 2-butanol. Almacenar esta disolución en el congelador.

Disolución de vino sintético dopada con 92,2 ppm de acetaldehído con un 12% en etanol siguiendo la misma metodología de preparación descrita en el método HS-GC-MS. Preparación diaria.

### Metodología

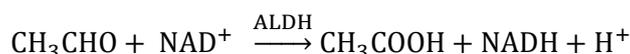
En un vial se añade con pipeta 5ml de muestra y a continuación, con una jeringa específica para el estándar interno y homogeneizada, añadir 100µL de estándar interno 2-butanol (3664,2 ppm). Se inyecta en el cromatógrafo 1µL de esta muestra<sup>15</sup> de forma manual. Para llevar a cabo la inyección es importante homogeneizar previamente la jeringa de inyección con la disolución de muestra y evitar burbujas de aire en el microlitro de muestra cogido.

### Cuantificación

Se trabajó con un factor de respuesta calculado en cada serie de análisis. Para obtener el factor de respuesta se prepararon dos disoluciones de vino sintético (5g/L de ácido tartárico, 12% en etanol y pH 3,5) con una concentración conocida de acetaldehído (92,2ppm). El factor de respuesta se calcula a partir de las áreas de los picos correspondientes (normalizadas por el patrón interno) frente a la masa de acetaldehído<sup>15</sup>. Los tiempos de retención para el estándar interno 2-butanol y para el acetaldehído son 5,9 min y 1,3min respectivamente. Para finalizar, se calculó el factor de respuesta de la misma forma descrita en el método HS-GC-MS.

#### **3.1.5.4. Determinación de acetaldehído mediante análisis enzimático**

A través de un análisis enzimático (Biosystems Enología) se puede determinar la concentración de acetaldehído en la muestra mediante la siguiente reacción:



El NADH absorbe en el visible a una longitud de onda de 340nm y por lo tanto puede ser medido mediante espectrofotometría, pudiéndose relacionar el valor de absorbancia con la concentración de acetaldehído presente en la muestra.

### Equipo y condiciones del método

Espectrofotómetro UV-VIS Spectrophotometer, UV-1700 Pharma Spec, SHIMADZU.

Kit enzimático para determinar acetaldehído en el laboratorio, ByoSystems, Barcelona (España).

### Metodología

Para el blanco pipetear en una cubeta 67µL de agua destilada y 800 µL del reactivo A proporcionado por el kit enzimático. Para el patrón pipetear en una cubeta 67µL de disolución patrón y 800 µL del reactivo A y para las muestras pipetear 67µL de muestra y 800 µL del reactivo A. El reactivo A contiene disolución tampón a pH 9 y NAD, por lo tanto, al mezclarlo con la muestra aún no se produce reacción. Tras la mezcla, dejar que se estabilice la disolución durante 5 minutos a temperatura ambiente (20°C) y leer la absorbancia (A1) a 340nm. A continuación, añadir a las cubetas 200µL del reactivo B. El reactivo B contiene disolución tampón a pH 6 y el catalizador ALDH de la reacción, por lo tanto, es a partir de este momento en el cual la reacción tiene lugar de forma significativa. Dejar estabilizar la disolución durante 20 minutos y leer la absorbancia (A2) a 340nm.

### Cuantificación

La cuantificación se llevó a cabo mediante la calibración de las series de medidas utilizando una disolución patrón de acetaldehído 92,2ppm en 12% de en etanol. Siguiendo esta metodología, la concentración en la muestra se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\frac{(A2 - 0,81 \times A1)_{MUESTRA} - (A2 - 0,81 \times A1)_{BLANCO}}{(A2 - 0,81 \times A1)_{PATRÓN} - (A2 - 0,81 \times A1)_{BLANCO}} \times C_{PATRÓN} \left(\frac{mg}{L}\right) = C_{MUESTRA} (ppm)$$

Los valores del Límite de detección (LD) y Límite de linealidad del método son 0,1mg/L y 200mg/L respectivamente.

### **3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para estudiar el factor método se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor para cada una de las muestras. El objetivo de esta prueba es comparar los resultados obtenidos por los cuatro métodos para cada muestra y establecer si hay diferencias significativas entre ellos. Por otra parte, para evaluar el factor muestra se realizó un análisis de varianza de un factor para todas las muestras en cada uno de los métodos analíticos. Además, previo a cada ANOVA realizado, se comprobó la homogeneidad de las varianzas mediante una prueba de Cochran en la cual la hipótesis nula establece que no hay diferencias significativas entre las varianzas de los valores comparados. Si C experimental obtenida en la prueba es inferior a C teórica, se acepta la hipótesis nula y por lo tanto los resultados concluidos por el ANOVA se pueden asegurar con un nivel de confianza del 95%.

Conociendo los resultados del ANOVA, se aplicó el *test* de Fisher con una *p* igual a 0,05. Esta prueba permite comparar los resultados de todas las muestras y los cuatro métodos y establecer grupos de similitud entre todos ellos. Para finalizar el análisis estadístico, se realizó un ANOVA de dos factores con interacción, en la cual un factor fue el método utilizado y otro factor fue la muestra.

### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Para poder comparar los cuatro métodos analíticos utilizados y conocer la influencia de la matriz en las diferentes formas en las que se puede encontrar el acetaldehído se prepararon muestras de vino sintético con diferente matriz, dopadas todas ellas con una concentración exacta y conocida de acetaldehído (92,2ppm) y se analizaron mediante los cuatro métodos.

Las muestras estaban saturadas de oxígeno disuelto (aproximadamente 8mg/L), pero esto no afectó al estudio debido a la falta de metales catalizadores en las muestras, que pudieran activar reacciones de oxidación del etanol, aumentando la concentración de acetaldehído en la incubación.

#### 4.1 Estudio del efecto del tiempo de incubación en las muestras

Antes de comenzar con el desarrollo experimental de las muestras, se analizó si diferentes tiempos de incubación en las muestras producían diferencias significativas en las respuestas de acetaldehído. Para ello, se analizaron la muestra VS2:1 a 24h y 31 días mediante HS-GC-MS y GC-FID y la muestra VT a 24h y a 48h por GC-FID, los resultados se pueden observar en la Tabla 2. Para establecer si hay diferencia significativa entre ellos se realizó un análisis de varianza de un factor, Tabla 3.

**Tabla 2. Concentración de acetaldehído obtenida mediante HS-GC-MS y GC-FID para las muestras VS2:1 y VT a diferentes tiempos de incubación**

Método	Muestras	[Acetaldehído] media ± incertidumbre <sup>a</sup> (mg/L)	RSD <sup>b</sup>
HS-GC-MS	VS2:1 (24h)	63,2 ± 0,2	0,5
	VS2:1 (31 días)	73,4 ± 1,0	2,2
GC-FID	VS2:1 (24h)	93,6 ± 3,1	5,7
	VS2:1 (31 días)	91,4 ± 1,4	2,6
	VT (24h)	91,9 ± 1,1	2,1
	VT (48h)	90,2 ± 1,4	2,7

<sup>a</sup> La incertidumbre se ha calculado como  $\frac{s}{\sqrt{n}}$ . <sup>b</sup> RSD se ha calculado como  $\frac{100 \times s}{[\text{acetaldehído}] \text{ media}}$

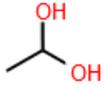
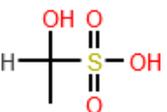
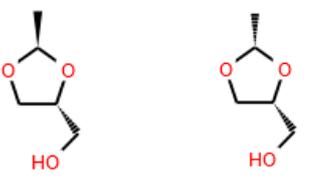
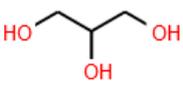
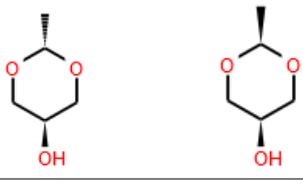
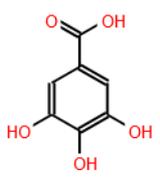
**Tabla 3. Estudio del efecto del tiempo de incubación en las muestras VS2:1 y VT**

Método	Muestras	Prueba de Cochran		Análisis de varianza de un factor	
		C experimental	C teórico	F experimental	F teórico
HS-GC-MS	VS2:1	0,9608	0,9985	67,340	10,128
GC-FID	VS2:1	0,8287	0,9985	0,452	7,709
	VT	0,6174	0,9985	0,918	7,709

Mediante la prueba de Cochran se comprueba que todas las varianzas son homogéneas (C experimental menor que C teórico), por tanto, los resultados obtenidos por el ANOVA se pueden asegurar con un nivel de confianza del 95%. Estudiando los resultados del ANOVA se observa que para la muestra VS2:1 analizada mediante HS-GC-MS sí afecta de forma significativa el tiempo de incubación, sin embargo, para el método GC-FID no se observan diferencias significativas. Esto se debe a que GC-FID, al ser capaz de romper los aductos formados, no se ve alterado por la diferencia de tiempo de incubación. Sin embargo, HS-GC-MS no es capaz de romper estos aductos y al dejar incubar más tiempo una muestra que contiene sulfuroso se pierde sulfuroso por volatilización disminuyendo así su concentración y desplazando la reacción con acetaldehído hacia la izquierda, aumentando de esta forma la concentración de etanal libre. Con respecto a la muestra VT analizada por GC-FID, tampoco hay diferencias significativas en el tiempo de incubación. Como el tiempo no afecta significativamente al método GC-FID, pero sí a HS-GC-MS, se decidió que el tiempo de incubación para VT, VS2:1, VS2:2 y VS2:4 sea el menor tiempo posible (24h).

## 4.2 Resultados esperados

A continuación, se detallan las condiciones de reacción y los principales productos esperados para cada muestra, así como los resultados esperados para las muestras en cada método analítico utilizado.<sup>2</sup>

Muestras	Reactivos	Productos de reacción	Condiciones
VT	Agua y acetaldehído	Forma hidratada del acetaldehído: 	Reacción inmediata. Incubación a 20°C durante 24h, pH 3,5.
	Etanol y acetaldehído	Etil hemiacetal ↔ Dietil acetal + H <sub>2</sub> O 	
VS2:1 VS2:2 VS2:4	Dióxido de azufre (SO <sub>2</sub> cuya forma predominante a pH 3,5 es HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) y acetaldehído	Ácidos hidroxialquilsulfónicos 	Reacción inmediata. Incubación a 20°C durante 24h, pH 3,5.
VSG	Glicerina y acetaldehído.	Isómeros de acetal heterocíclicos + H <sub>2</sub> O Cis-dioxolano      Trans-dioxolano 	Reacción lenta. Los dioxolanos alcanzan el equilibrio después de aproximadamente 12 días, mientras que los isómeros de dioxano tardan 24 días. Incubación a 35°C durante 30 días, pH 3,5.
	Estructura de la glicerina: 	Cis-dioxano      Trans-dioxano 	
VSAG	Ácido gálico y acetaldehído.  Estructura del ácido gálico: 	Se desconoce la formación de aductos por no ser el ácido gálico un fenol flavonoide.	Incubación a 35°C durante 30 días, pH 3,5.
Muestras	Resultados esperados para los diferentes métodos analíticos utilizados		
VT	Al ser una muestra en la que la mayor cantidad de acetaldehído está en forma libre, no se espera obtener resultados significativamente diferentes entre los cuatro métodos.		

<b>VS2:1</b> <b>VS2:2</b> <b>VS2:4</b>	Se esperan máximos resultados para HPLC-UV y GC-FID, debido a la capacidad de ambos métodos analíticos para romper los aductos formados con ácido sulfuroso. Posteriormente se espera una mayor concentración en los resultados del método enzimático y finalmente los resultados de HS-GC-MS. HS-GC-MS se ha colocado en último lugar porque sólo medirá la pequeña porción de etanal libre en cada una de las tres muestras con ácido sulfuroso.
<b>VSG</b>	Se esperan máximos resultados para HPLC-UV y GC-FID, siendo ambos métodos capaces de romper los aductos formados con glicerol. Los resultados más bajos serán para HS-GC-MS. Se desconocen los resultados que se obtendrán por el método enzimático.
<b>VSAG</b>	Se desconoce si el acetaldehído formará aductos con ácido gálico, por lo que se desconocen los resultados por los 4 métodos.

#### 4.3 Resultados experimentales

En la Tabla 4., Tabla 5., Tabla 6. y Tabla 7., se expresan los resultados obtenidos para HPLC-UV, HS-GC-MS, el método enzimático y GC-FID respectivamente. Para estudiar los resultados sospechosos se realizó el test Q de Dixon para n=3, ya que para cada muestra se realizaron tres réplicas, con un valor crítico de Q igual a 0,941 para un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 4. Resultados obtenidos por HPLC-UV**

Muestras	Réplicas	Área de acetaldehído	Tiempo de retención (min)	[Acetaldehído] (mg/L) <sup>a</sup>	[Acetaldehído] media ± incertidumbre <sup>b</sup> (mg/L)	RSD <sup>c</sup>
<b>VT</b>	VT-1	47029871	4,383	100,0*	85,8 ± 0,2	0,3
	VT-2	40586191	4,397	86,0		
	VT-3	40399157	4,393	85,5		
<b>VS2:1</b>	VS2:1-1	40456946	4,363	89,1	93,6 ± 2,6	4,8
	VS2:1-2	44469924	4,360	98,0		
	VS2:1-3	42489620	4,357	93,6		
<b>VS2:2</b>	VS2:2-1	38033526	4,363	83,7	92,5 ± 4,4	8,3
	VS2:2-2	44175269	4,357	97,3		
	VS2:2-3	43847957	4,357	96,6		
<b>VS2:4</b>	VS2:4-1	56682631	4,360	125,2	99,0 ± 13,5	23,7
	VS2:4-2	36336446	4,357	79,9		
	VS2:4-3	41761181	4,357	92,0		
<b>VSG</b>	VSG-1	36500127	4,363	80,1	79,2 ± 2,1	4,5
	VSG-2	37451130	4,353	82,3		
	VSG-3	34321615	4,360	75,3		
<b>VSAG</b>	VSAG-1	34343429	4,387	68,9	78,1 ± 5,5	12,2
	VSAG-2	43701835	4,390	87,9		
	VSAG-3	38474986	4,390	77,3		

<sup>a</sup> Para la muestra VT FR corresponde al valor  $2,2E-06 \pm 4,6E-08$  ppm/área, para las muestras VS2:1, VS2:2 y VS2:4 FR equivale al valor  $2,2E-06 \pm 2,4E-07$  ppm/área, para VSG corresponde a  $2,2E-06 \pm 5,7E-08$  ppm/área y para VSAG  $2,0E-06 \pm 1,0E-08$  ppm/área. <sup>b</sup> La incertidumbre se ha calculado como  $\frac{s}{\sqrt{n}}$ . <sup>c</sup> RSD se ha calculado como  $\frac{100 \times s}{[\text{acetaldehído}] \text{ media}}$  \*Este valor no se tiene en cuenta para la media, ni para RSD.

En HPLC-UV el único resultado sospechoso eliminado por el test Q de Dixon corresponde al valor 100,0 ppm obtenido para la muestra VT-1.

**Tabla 5. Resultados obtenidos por HS-GC-MS**

Muestras	Réplicas	Compuesto <sup>a</sup>	Área	Tiempo de retención (min)	[Acetaldehído] (mg/L) <sup>b</sup>	[Acetaldehído] media ± incertidumbre <sup>c</sup> (mg/L)	RSD <sup>d</sup>
VT	VT-1	A	190805	2,176	96,1	94,0 ± 1,2	2,3
		E	232315	5,135			
	VT-2	A	185525	2,177	91,9		
		E	236339	5,132			
	VT-3	A	184116	2,177	94,1		
		E	229034	5,137			
VS2:1	VS2:1-1	A	165603	2,177	87,1*	63,2 ± 0,2	0,5
		E	222539	5,136			
	VS2:1-2	A	122850	2,194	63,4		
		E	226717	5,140			
	VS2:1-3	A	121158	2,160	63,0		
		E	225268	5,133			
VS2:2	VS2:2-1	A	42348	2,173	28,2	29,6 ± 0,7	3,9
		E	151852	5,125			
	VS2:2-2	A	43806	2,170	30,2		
		E	146978	5,123			
	VS2:2-3	A	44085	2,169	30,3		
		E	147504	5,122			
VS2:4	VS2:4-1	A	8679	2,169	6,2	5,2 ± 0,7	23,4
		E	141035	5,117			
	VS2:4-2	A	5519	2,168	3,9		
		E	144661	5,119			
	VS2:4-3	A	8073	2,184	5,6		
		E	146833	5,125			
VSG	VSG-1	A	171904	2,155	85,7	85,6 ± 1,4	2,8
		E	216594	5,117			
	VSG-2	A	162790	2,157	88,0		
		E	199947	5,117			
	VSG-3	A	154468	2,160	83,1		
		E	200710	5,113			
VSAG	VSAG-1	A	184046	2,144	92,5	90,3 ± 2,2	4,3
		E	223672	5,103			
	VSAG-2	A	178071	2,159	92,6		
		E	216223	5,104			
	VSAG-3	A	159522	2,159	85,9		
		E	208807	5,106			

<sup>a</sup> Compuesto A corresponde a acetaldehído, E corresponde al estándar Interno. <sup>b</sup> Para las muestras VT y VS2:1 FR corresponde al valor  $117,1 \pm 2,4$  ppm/área, para las muestras VS2:2 y VS2:4 FR equivale al valor  $101,3 \pm 4,8$  ppm/área, para VSG corresponde a  $108,0 \pm 1,4$  ppm/área y para VSAG  $112,4 \pm 0,2$  ppm/área. <sup>c</sup> La incertidumbre se ha calculado como  $\frac{s}{\sqrt{n}}$ . <sup>d</sup> RSD se ha calculado como  $\frac{100 \times s}{[\text{acetaldehído}] \text{ media}}$  \* Este valor no se tiene en cuenta para la media, ni para RSD.

En las muestras analizadas por HS-GC-MS el único resultado sospechoso eliminado por el *test* Q de Dixon corresponde al valor 87,1 ppm obtenido para la muestra VS2:1-1.

**Tabla 6. Resultados obtenidos por el método enzimático**

Muestras	Réplicas	Absorbancia A1	Absorbancia A2	[Acetaldehído] (mg/L)	[Acetaldehído] media ± incertidumbre <sup>a</sup> (mg/L)	RSD <sup>b</sup>
<b>Patrón</b>		0,425	1,184			
<b>Blanco</b>		0,313	0,363			
<b>VT</b>	VT-1	0,319	1,061	87,5	87,7 ± 0,2	0,3
	VT-2	0,325	1,273	113,7*		
	VT-3	0,325	1,069	87,9		
<b>VS2:1</b>	VS2:1-1	0,646	1,278	81,5	84,8 ± 3,6	7,4
	VS2:1-2	0,647	1,363	92,1		
	VS2:1-3	0,646	1,274	81,0		
<b>VS2:2</b>	VS2:2-1	0,346	0,974	73,8	80,2 ± 3,7	7,9
	VS2:2-2	0,372	1,047	80,3		
	VS2:2-3	0,360	1,086	86,5		
<b>VS2:4</b>	VS2:4-1	0,397	1,130	88,2	86,4 ± 5,8	11,6
	VS2:4-2	0,396	1,185	95,3		
	VS2:4-3	0,393	1,026	75,5		
<b>VSG</b>	VSG-1	0,726	1,330	79,9	75,5 ± 2,4	5,4
	VSG-2	0,755	1,314	74,9		
	VSG-3	0,786	1,314	71,7		
<b>VSAG</b>	VSAG-1	0,912	1,519	84,7	84,5 ± 0,1	0,2
	VSAG-2	0,890	1,220	49,2*		
	VSAG-3	0,921	1,524	84,4		

<sup>a</sup> La incertidumbre se ha calculado como  $\frac{s}{\sqrt{n}}$ . <sup>b</sup> RSD se ha calculado como  $\frac{100 \times s}{[\text{acetaldehído}] \text{ media}}$  \* Este valor no se tiene en cuenta para la media, ni para RSD.

En las muestras analizadas por método enzimático los resultados sospechosos eliminados por el *test* Q de Dixon corresponden a los valores 113,7 y 49,2 ppm obtenidos para las muestras VT-2 y VSAG-2 respectivamente.

**Tabla 7. Resultados obtenidos por GC-FID**

Muestra	Réplicas	Compuesto <sup>a</sup>	Área	Tiempo de retención (min)	[Acetaldehído] (mg/L) <sup>b</sup>	[Acetaldehído] media ± Incertidumbre <sup>c</sup> (mg/L)	RSD <sup>d</sup>
VT	VT-1	A	2798748	1,367	93,8	91,9 ± 1,1	2,1
		E	3402119	5,940			
	VT-2	A	3062863	1,345	91,9		
		E	3798478	5,860			
	VT-3	A	2784108	1,362	90,0		
		E	3529038	5,933			
VS2:1	VS2:1-1	A	2951482	1,372	96,2	93,6 ± 3,1	5,7
		E	3498081	5,935			
	VS2:1-2	A	2904338	1,368	97,2		
		E	3406760	5,883			
	VS2:1-3	A	2498542	1,358	87,5		
		E	3254953	5,923			
VS2:2	VS2:2-1	A	3087380	1,382	89,3	87,0 ± 3,2	6,4
		E	3977541	5,912			
	VS2:2-2	A	2979555	1,377	80,6		
		E	4252179	5,907			
	VS2:2-3	A	3102342	1,367	91,0		
		E	3924775	5,935			
VS2:4	VS2:4-1	A	2794554	1,377	82,5	85,2 ± 1,4	2,8
		E	3896590	5,955			
	VS2:4-2	A	2887650	1,380	86,0		
		E	3866756	5,942			
	VS2:4-3	A	2856602	1,373	87,2		
		E	3772168	5,887			
VSG	VSG-1	A	2316287	1,408	81,5	78,5 ± 2,6	5,6
		E	3138812	5,947			
	VSG-2	A	2244841	1,407	80,5		
		E	3078928	5,998			
	VSG-3	A	2186530	1,395	73,4		
		E	3289849	5,988			
VSAG	VSAG-1	A	3151381	1,372	89,4	84,3 ± 6,3	13,0
		E	3913193	5,898			
	VSAG-2	A	3068138	1,377	91,7		
		E	3714803	5,985			
	VSAG-3	A	2388315	1,400	71,7		
		E	3700800	5,997			

<sup>a</sup> Compuesto A corresponde a acetaldehído, E corresponde al estándar Interno. <sup>b</sup> Para las muestras VT y VS2:1 FR corresponde al valor 114,0 ± 0,4 ppm/área, para las muestras VS2:2 y VS2:4 FR equivale al valor 115,1 ± 0,2 ppm/área, para VSG

corresponde a  $110,4 \pm 1,2$  ppm/área y para VSAG  $111,1 \pm 0,3$  ppm/área. <sup>c</sup> La incertidumbre se ha calculado como  $\frac{s}{\sqrt{n}}$ . <sup>d</sup> RSD se ha calculado como  $\frac{100 \times s}{[\text{acetaldehído}] \text{ media}}$

#### 4.4 Discusión

Analizando los valores de RSD, se observa que en general la reproducibilidad es buena, teniendo en cuenta que los tres valores corresponden a viales diferentes. El método más reproducible (0,5-4,3% RSD) es el HS-GC-MS, entre otras razones porque se utilizó un inyector automático, cosa que no se utilizó en el GC-FID (2,1-6,4% RSD). El método HPLC-UV es el método que proporciona mayores valores de RSD (0,3-12,2%) siendo por tanto el método analítico más impreciso, debido a las múltiples etapas de preparación de muestra (derivatización). La muestra VS2:4, con mayor proporción de sulfuroso y mayor contenido de aductos tiene en los 4 métodos, excepto GC-FID, irreproducibilidades superiores a 10%, llegando al 23% en HPLC-UV y HS-GC-MS. La muestra VSAG, con ácido gálico no volátil también sube a una RSD del 13% en GC-FID, quizás debido a su mal comportamiento en el inyector.

En la Tabla 8. se observan los resultados del ANOVA de un factor aplicado a cada muestra para comparar los cuatro métodos analíticos utilizados.

**Tabla 8. Estudio del factor método**

Muestra	Prueba de Cochran		Análisis de varianza de un factor	
	C experimental	C teórico	F experimental	F teórico
VT	0,5394	0,6841	12,554	4,757
VS2:1	0,4495	0,6841	18,441	4,347
VS2:2	0,4495	0,6841	76,354	4,066
VS2:4	0,8365	0,6841	33,634	4,066
VSG	0,3557	0,6841	3,976	4,066
VSAG	0,5340	0,6841	1,168	4,347

Mediante la prueba de Cochran se comprueba que todas las varianzas son homogéneas excepto para la muestra VS2:4 en la cual C experimental es mayor que C teórico. Por consiguiente, el análisis de varianza se puede asegurar a un nivel de confianza del 95% para todas las muestras menos para la muestra VS2:4. Por otra parte, analizando los resultados del ANOVA se observa que para las muestras VT, VS2:1, VS2:2 y VS2:4 F experimental es mayor que F teórico, por lo tanto, la hipótesis nula se rechaza y para cada una de estas muestras la concentración de acetaldehído obtenida mediante los cuatro métodos difiere significativamente. Por el contrario, para las muestras VSG y VSAG la hipótesis nula se acepta puesto que F experimental es menor que F teórico, concluyendo que no hay diferencias significativas en los resultados de estas muestras al ser analizadas por los diferentes métodos.

Los grupos de similitud entre los métodos que el test de Fisher determina para cada muestra se resumen en la Tabla 9. comparando dentro de cada fila. Para la muestra VT, los resultados obtenidos mediante HPLC-UV y el método enzimático son similares y por tanto se colocan en el mismo grupo de similitud (grupo A), a su vez, los resultados de GC-FID y HS-GC-MS son similares entre ellos (grupo B) pero difieren significativamente del grupo A. Para VS2:1, los resultados similares corresponden a los obtenidos por GC-FID, HPLC-UV y el método enzimático (grupo A), difiriendo significativamente de HS-GC-MS. En VS2:2 los resultados de GC-FID presentan similitudes a los medidos por HPLC-UV y a su vez

a los del método enzimático, pero entre HPLC-UV y el enzimático hay diferencias significativas. El test de Fisher demuestra que para las muestras que contienen sulfuroso el método HS-GC-MS no presenta similitud con los otros métodos analíticos, esto es debido a que en estas muestras el acetaldehído se encuentra mayoritariamente acomplejado y este método no es capaz de romper estos aductos, por tanto, en HS-GC-MS las medidas de acetaldehído obtenidas disminuyen conforme aumenta la concentración de sulfuroso en la muestra. Por el contrario, HPLC-UV y GC-FID son capaces de romper estos aductos y los resultados no se ven afectados por el aumento de sulfuroso. Finalmente, para las muestras VSG y VSAG el test de Fisher verifica los resultados del ANOVA, para las muestras con glicerina se establecieron similitudes entre HPLC-UV, GC-FID y el enzimático (grupo B) y a su vez entre HPLC-UV y HS-GC-MS (grupo A), mientras que con ácido gálico no se forman prácticamente aductos y los cuatro métodos se colocan en el mismo grupo A.

**Tabla 9. Test de Fisher entre los métodos para cada muestra,  $p = 0,05$**

Muestras	HS-GC-MS	HPLC-UV	GC-FID	Método enzimático
VT	B	A	B	A
VS2:1	B	A	A	A
VS2:2	C	A	AB	B
VS2:4	B	A	A	A
VSG	A	AB	B	B
VSAG	A	A	A	A

En la Figura 2. se comparan en cada muestra los resultados de los cuatro métodos.

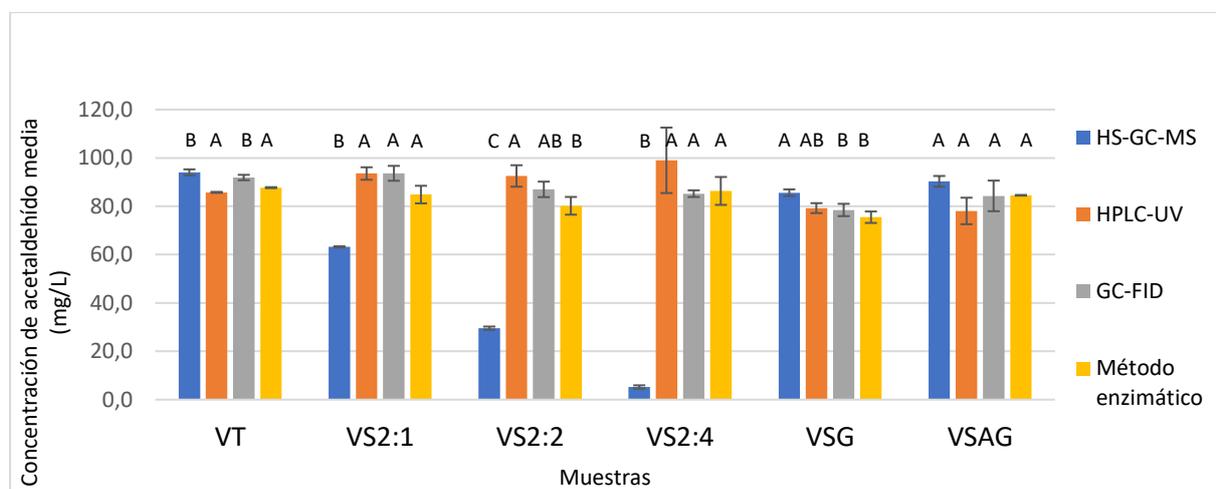


Figura 2. Concentración de acetaldehído media  $\pm$  incertidumbre <sup>a</sup>, para cada una de las muestras y métodos.

<sup>a</sup> La incertidumbre se ha calculado como  $\frac{s}{\sqrt{n}}$

Para evaluar el factor muestra dentro de cada método se realizó un análisis de varianza de un factor cuyos resultados se detallan en la Tabla 10. La prueba de Cochran determina que para todos los métodos analíticos utilizados  $C$  experimental es mayor que  $C$  teórico, rechazando de esta forma la hipótesis nula en cada caso y no pudiéndose asegurar los resultados del ANOVA con un nivel de confianza del 95%.

Con respecto a los resultados obtenidos por ANOVA, el único método analítico para el cual  $F$  experimental es mayor que  $F$  teórico corresponde a HS-GC-MS. Se concluye así que en HS-GC-MS los resultados obtenidos para las diferentes muestras difieren significativamente, situación que se esperaba porque en este método los resultados para cada muestra dependen de los aductos de acetaldehído formados. Por el contrario, en HPLC-UV, GC-FID y el método enzimático los resultados obtenidos entre las diversas muestras no presentan diferencias significativas, demostrando que los tres métodos son capaces de determinar acetaldehído total en las muestras.

**Tabla 10. Estudio del factor muestra**

Método	Prueba de Cochran		Análisis de varianza de un factor	
	C experimental	C teórico	F experimental	F teórico
HS-GC-MS	0,5274	0,4447	785,885	3,204
HPLC-UV	0,7513	0,4447	1,585	3,204
GC-FID	0,5777	0,4447	2,606	3,106
Enzimático	0,5087	0,4447	1,452	3,326

Aplicando el *test* de Fisher entre las muestras analizadas en cada método, los grupos de similitud se resumen en la Tabla 11. comparando dentro de cada fila. En HPLC-UV observamos que las muestras VT, VS2:1, VS2:2, VS2:4 y VSG forman parte del mismo grupo de similitud (grupo A), mientras que VT, VS2:1, VS2:2 y VSG son similares también con los resultados obtenidos en VSAG (grupo B). Por lo tanto, en HPLC-UV las únicas muestras cuyos resultados difieren significativamente corresponden a VS2:4 y VSAG. En GC-FID se obtuvieron resultados similares para las muestras VT, VS2:1, VS2:2, VS2:4 y VSG (grupo A), mientras que los resultados de VS2:2, VS2:4, VSG son similares a su vez con los de la muestra VSAG (grupo B). En el método enzimático, el *test* de Fisher establece que no hay diferencia significativa entre resultados obtenidos por las seis muestras, por tanto, todas corresponden al mismo grupo de similitud (grupo A). Finalmente, como el método HS-GC-MS determina acetaldehído libre, es en el que más diferencias significativas entre las muestras se observan. En este último método, sólo los resultados para las muestras VT y VSAG no difieren significativamente y están colocados en el mismo grupo de similitud (grupo A).

**Tabla 11. Test de Fisher entre las muestras para cada método,  $p = 0,05$**

Método	VT	VS2:1	VS2:2	VS2:4	VSG	VSAG
HS-GC-MS	A	C	D	E	B	A
HPLC-UV	AB	AB	AB	A	AB	B
GC-FID	A	A	AB	AB	B	AB
Método enzimático	A	A	A	A	A	A

En la Figura 3. se comparan los resultados de las diferentes muestras en cada método.

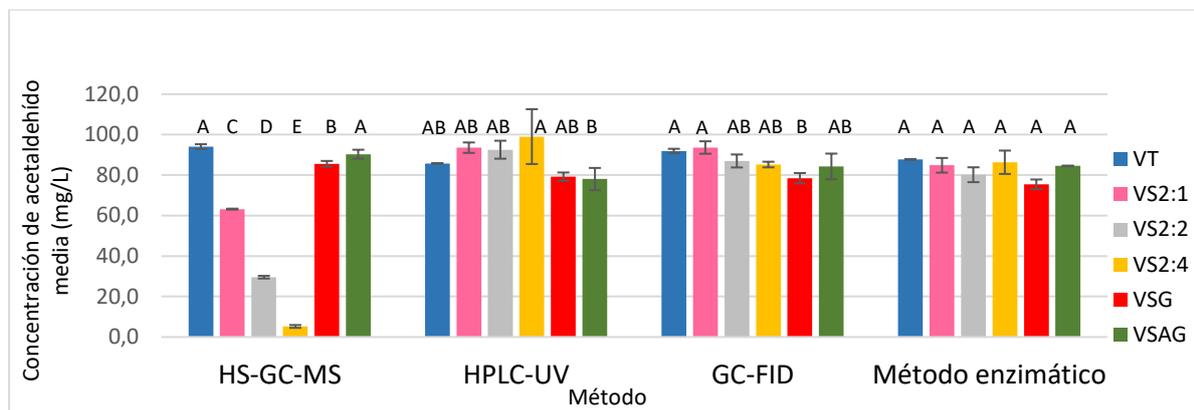


Figura 3. Concentración de acetaldehído media  $\pm$  incertidumbre <sup>a</sup>, para cada una de las muestras y métodos.

<sup>a</sup> La incertidumbre se ha calculado como  $\frac{s}{\sqrt{n}}$

Para finalizar el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos factores con interacción, en la cual un factor fue el método utilizado y otro factor fue la muestra. Este último análisis de varianza estableció que hay diferencias significativas para el factor método, para el factor muestras y también para la interacción muestra por método, significando esto último que las diferencias entre los métodos dependen de la muestra. Aplicando el *test* de Fisher en este análisis de varianza los grupos obtenidos indican que no hay diferencias significativas en general entre los métodos enzimático, HPLC-UV y GC-FID para todas las matrices estudiadas y, con respecto a las muestras, no hay diferencias significativas en general entre VT, VSAG y VS2:1 (grupo A), tampoco hay diferencias significativas en general para VSAG, VS2:1 y VSG (Grupo B) ni en general entre VS2:2 y VS2:4 (grupo C).

## 5. CONCLUSIÓN

Las diferencias observadas en cuanto a la reproducibilidad de los análisis indican que:

- el método más reproducible es el GC-FID, con desviaciones estándares relativas inferiores a 6,4%, con la excepción de la muestra con ácido gálico que sube al 13%.
- El método más irreproducible es el HPLC-UV debido a necesitar una derivatización como tratamiento de muestra.
- Las muestras con más irreproducibilidad son aquellas que tienen más aductos formados, por tener la proporción más alta de SO<sub>2</sub>.

Los métodos GC-FID, enzimático y HPLC-UV determinan el acetaldehído total, no habiendo diferencias significativas en general para todas las matrices estudiadas.

El método HS-GC-MS determina el acetaldehído libre y nos ha posibilitado diferenciar bien entre las muestras y la cantidad de aductos presentes en cada una de ellas, indicando que:

- El ácido gálico no disminuye significativamente la cantidad de acetaldehído libre en las muestras.
- La glicerina sí que disminuye significativamente el acetaldehído libre de la muestra por la formación de dioxanos y dioxolanos
- Los aductos con el SO<sub>2</sub> son los que más disminuyen la cantidad de acetaldehído libre en las muestras, incrementándose esta diferencia al aumentar la cantidad de SO<sub>2</sub>.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Elias, R.J.; Laurie, F.; Ebeler, S.E.; Wong, J.W.; Waterhouse, A.L. Analysis of selected carbonyl oxidation products in wine by liquid chromatography with diode array detection. *Analytica chimica acta*. **2008**, 626, 104-110.
- 2- Peterson, A.L.; Waterhouse, A.L. <sup>1</sup>H NMR: A Novel Approach To Determining the Thermodynamic Properties of Acetaldehyde Condensation Reactions with Glycerol, (+)-Catechin, and Glutathione in Model Wine. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2016**, 64, 6869-6878.
- 3- Aranda, A.; Jiménez-Martí, E.; Orozco, H.; Matallana, E.; Del Olmo, M. Sulfur and adenine metabolisms are linked, and both modulate sulfite resistance in wine yeast. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2006**, 54(16), 5839–5846.
- 4- Li, H.; Guo, A.; Wang, H. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*. **2008**, 108, 1–13.
- 5- Han, G.; Webb, Michael R.; Waterhouse, A.L. Acetaldehyde reactions during wine bottle storage. *Food Chemistry*. **2019**, 290, 208–215.
- 6- Danilewicz, J. C. Mechanism of autoxidation of polyphenols and participation of sulfite in wine: Key role of iron. *American Journal of Enology and Viticulture*. **2011**, 62(3), 319–328.
- 7- Elias, R. J.; Andersen, M. L.; Skibsted, L. H.; Waterhouse, A.L. Identification of free radical intermediates in oxidized wine using electron paramagnetic resonance spin trapping. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, 57(10), 4359–4365.
- 8- De Azevedo, L.C.; Reis, M.M.; Motta, L.F.; Da Rocha, G.O.; Silva, L.A.; De Andrade, J.B. Evaluation of the formation and stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55(21), 8670-8680.
- 9- Wade, L.G, Jr. *Química orgánica*, 7ª ed.; Pearson: México, 2012; pp 812.
- 10- Osborne, J.P.; Mira de Orduña, R.; Pilone, G.J.; Liu, S. -Q. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. **2000**, 191, 51-55.
- 11- Ochando, T.; Mouret, J.R.; Humbert-Goffard, A.; Aguera E.; Sablayrolles, J.M; Farines, V. Comprehensive study of the dynamic interaction between SO<sub>2</sub> and acetaldehyde during alcoholic fermentation. *Food Research International*. **2020**, 136.
- 12- Ghica, M.E.; Pauliukaite, R.; Marchand, N.; Devic, E.; Brett, C.M.A. An improved biosensor for acetaldehyde determination using a bienzymatic strategy at poly(neutral red) modified carbon film electrodes. *Analytica Chimica Acta*. **2007**, 591, 80–86.
- 13- Han, G.M.; Wang, H.; Webb, M.R.; Waterhouse, A.L. A rapid, one step preparation for measuring selected free plus SO<sub>2</sub>-bound wine carbonyls by HPLC-DAD/MS. *Talanta*. **2015**, 134, 596-602.
- 14- Carrascon, V.; Ontañón, I.; Bueno, M.; Ferreira, V. Gas chromatography-mass spectrometry strategies for the accurate and sensitive speciation of sulfur dioxide in wine. *Journal of Chromatography A*. **2017**, 1504, 17–34.
- 15- Bueno, M.; Marrufo-Curtido, A.; Carrascón, V.; Fernández Surbano; Escudero, A.; Ferreira, V. Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation. *Frontiers in Chemistry*. **2018**, 6.