

Almudena Marrufo Curtido

Formación, reacción y
acumulación de acetaldehído y
aldehídos de Strecker durante la
oxidación del vino

Director/es

Escudero Carra, Ana
Ferreira Gonzalez, Vicente

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

FORMACIÓN, REACCIÓN Y ACUMULACIÓN DE
ACETALDEHIDO Y ALDEHIDOS DE STRECKER
DURANTE LA OXIDACIÓN DEL VINO

Autor

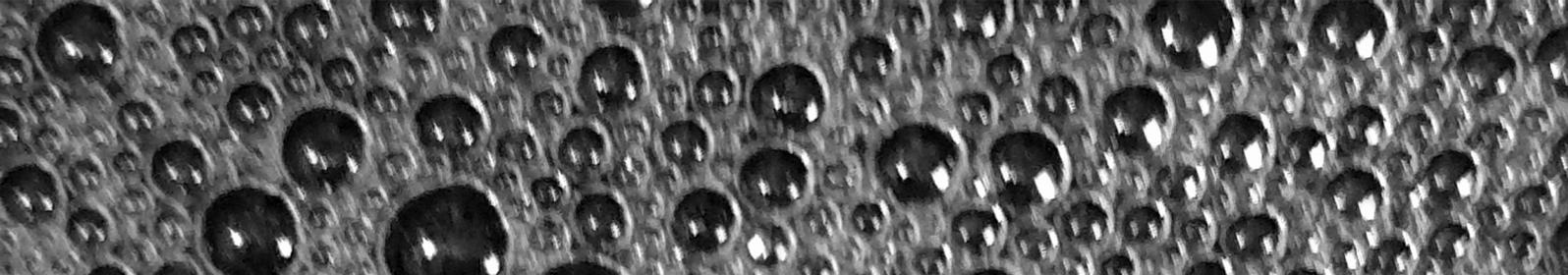
Almudena Marrufo Curtido

Director/es

Escudero Carra, Ana
Ferreira Gonzalez, Vicente

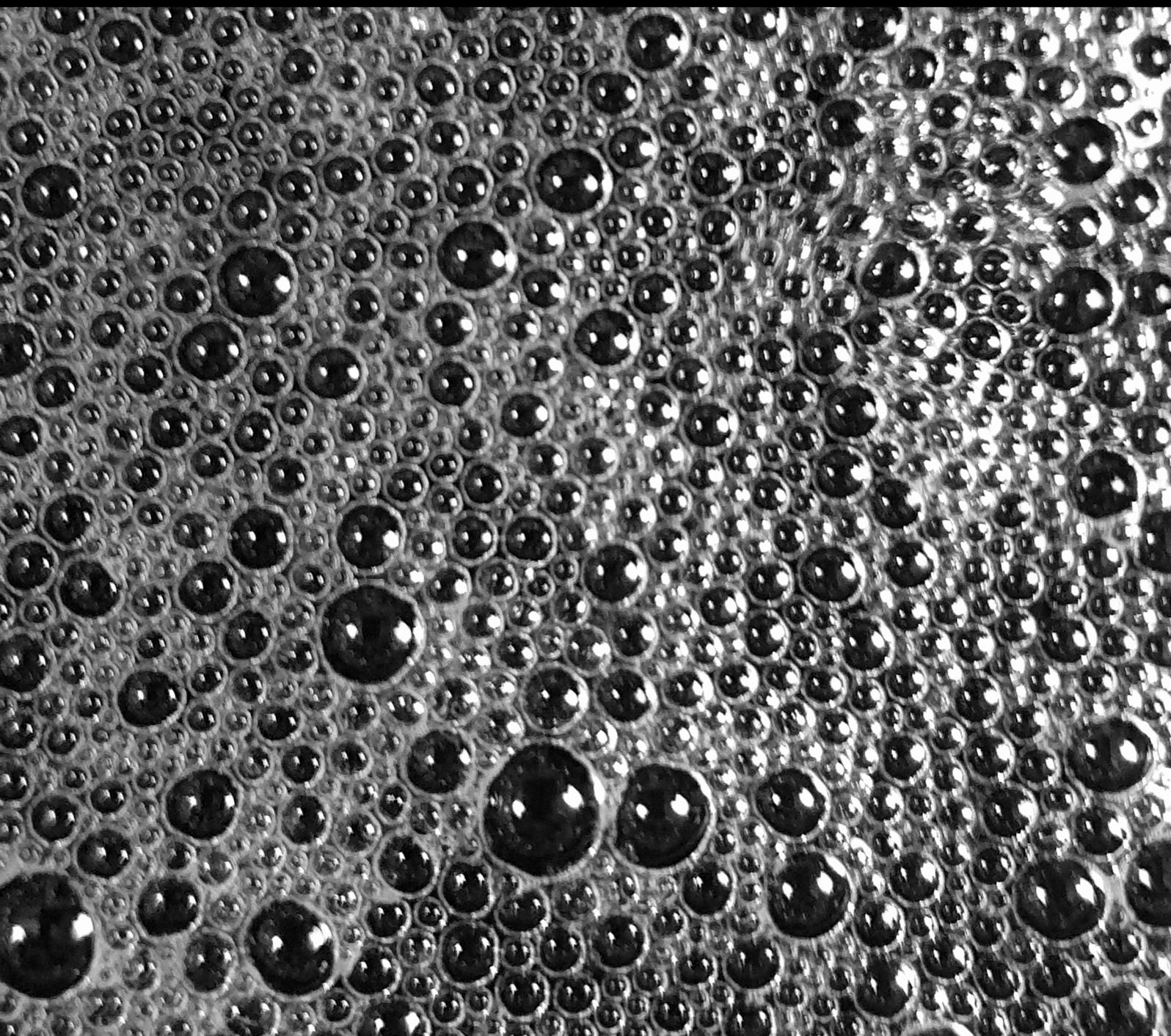
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2021



Tesis Doctoral
Almudena Marrufo Curtido

Formación, reacción y acumulación
de acetaldehído y aldehídos de Strecker
durante la oxidación del vino



Formación, reacción y acumulación de acetaldehído y aldehídos de Strecker durante la oxidación del vino



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza

Tesis Doctoral

Almudena Marrufo Curtido

Para optar al Grado de Doctor
con Mención Internacional

Diciembre 2020

Directores:

Ana Escudero Carra

Vicente Ferreira González



Laboratorio de Análisis
de Aroma y Enología



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza

Dña. ANA ESCUDERO CARRA, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza y D. VICENTE FERREIRA GONZÁLEZ, Catedrático del Departamento de Química Analítica

CERTIFICAN

Que la presente memoria, titulada "*FORMACIÓN, REACCIÓN Y ACUMULACIÓN DE ACETALDEHÍDO Y ALDEHÍDOS DE STRECKER DURANTE LA OXIDACIÓN DEL VINO*", correspondiente al Proyecto de Tesis aprobado por el Departamento de Química Analítica en fecha 23 de Junio de 2016 y presentada para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección por *Dña. ALMUDENA MARRUFO CURTIDO*, autorizando su presentación para proseguir los trámites oportunos y proceder a su calificación por el tribunal correspondiente.

Zaragoza, 04 Diciembre de 2020.

Fdo. Dr. Vicente Ferreira González

Fdo. Dra. Ana Escudero Carra

Este trabajo ha sido realizado gracias a la siguiente Beca Pre-doctoral que le ha sido concedida a Dña. Almudena Marrufo Curtido:

2015-2019 Beca Pre-doctoral del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador (FPI, BES-2015-073499) asociada al proyecto AGL2014-59840-C2-1-R concedida por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Los proyectos en los que se ha emmarcado la presente Tesis son:

Proyecto AGL2014-59840-C2-1-R concedido por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Proyecto AGL2017-87373-C3-1R concedido por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones en revistas científicas internacionales:

- Marrufo-Curtido, A.; Carrascón, V.; Bueno, M; Ferreira, V.; Escudero, A.; *A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines and some observations about the influence of wine initial chemical composition*. Food Chemistry, 2018. 248: p. 37-45.
- Bueno, M., Marrufo-Curtido, A.; Carrascón, V.; Fernández- Zurbano, P.; Escudero, A. Ferreira, V *Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation*. Frontiers in Chemistry, 2018. 6.

AGRADECIMIENTOS

Nada de esto hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de **mi familia**, gracias a mis padres, a mis hermanos y a Sergio. A ustedes cinco mil gracias por ser mi fuente de inspiración, fortaleza y de buen humor. A Nazaret gracias por regalarme la mejor sonrisa del mundo y a Valentina gracias por todo lo que nos enseñas cada día.

Gracias al **EQUIPO LAAE**, a todos los que formáis este tremendo grupo:

Gracias a mis directores Ana y Tito por dirigirme y corregir la presente tesis. Gracias por vuestra disposición y ayuda.

Gracias a todos los compañeros: Belén, Nacho, Eduardo, Yohanna, Inés, Marie, Naxiño, Elena, Alexis, Paula, Ernesto, Mónica, Vanesa, Yan, Marta, Diego, Sara, Manuel, Arancha (la *mujé* más *apañá* del mundo), Elayma, Oscar (er *Greñuo que recogimos de prácticas*) y Jorge (*ese mushasho que me habla Carnavales*). Gracias porque ha sido muy fácil trabajar en el laboratorio y vivir en la hemeroteca. ¡Nos vemos en el Laser Tag Equipoooo!!

A Ricardo, Laura, Cristina, Puri Her, Puri Fer y Maria Pilar, muchas gracias por atenderme siempre con una sonrisa. Mil gracias Puri y Pepe por invitarme y enseñarme Soria al detalle.

Muchísimas gracias a nuestro Juan Cacho, gracias Juan por mantener unido al equipo y tus incansables ganas de organizar catas y excursiones con nosotros.

Gracias a **mi familia del norte**: Gracias a *La Rubia* y a *Belensita* por formar este trío conmigo, (4 contando a Mara). A *Yuyu* y Marie (*Marie no necesitas mote chicaaa!*). A *el α y/o el Gallego*, *Little* y *Edú*. A todos vosotros (*ustedes*), gracias por hacerme la vida tan fácil, cultural y divertida en Zaragoza, por enseñarme a disfrutar las costumbres y fiestas más arraigadas de la zona y el vermú torero. Mil gracias por estar conmigo desde el principio hasta siempre, por quedar conmigo para ir de museos (¡uy uy uy!). Gracias por cenar conmigo el San Juan de 2016. Gracias por dejarme caer en tu boda. Gracias por los viernes arrastrados y los domingos felices con licoroso café. ¡Gracias por formar conmigo el Club los chicos de ... ! Gracias por los temas taurinos de las 5 de la tarde y esa santa esquina de reunión. ¡Gracias por acercarme *el caló de las playas de invierno* hasta el Norte y empezar la vendimia por el Jamón! ¡Gracias por ir a visitarme, encargarme de las llaves y salir de las cenizas esquivando la tortilla! Mil gracias por pasar conmigo el primer confinamiento (pasaría mil más con ustedes dos) y celebrarlo cabalgando por la feria de Abril.

Por ser todos tan buenos anfitriones de los mejores pueblos, casas y fiestas de España y del extranjero (Casa Marie, Casa Galicia y Logroño, Casa Little, Morales del Rey, Tabuenca, Mara, Verona y Dinamarca). Gracias Belén por ofrecernos la sede oficial del Club de la Cata. Porque nos vemos en Málaga y en Córdoba.

A mis **amigos**. Muchas gracias a las chicas de oro por acompañarme a San Sebastián y a los que se lían con las croquetas flamencas. Gracias a Jorge Temprado por recordarnos porque somos enólogos, por invitarnos a vendimiar en La Vilueña y catar con nosotros tantas veces. Gracias a aquellos que no hablan de vino pero que beben (mucho) cerveza, gracias a Albita, amiga eres el único camarón que se ahoga en 1 mL, gracias por tu hospitalidad hortelana, Sofi y Javi (gracias por mi vídeo de tesis). ¡Merci & Tak Jesús por reírte de tó"! Gracias a mi equipo de natación y a mis chicas del inglés. A toda mi gente de Rota, al que me visitó en el norte (Emilio) y el que me aguanta a ritmo de Galicia (Cohete). A Ishtar, Cristina y Alberto por estar desde siempre. A mis enólogas Isa y Lore. A mis químicas. A mis cuquis.

A todos y cada uno de vosotros, gracias por hacerme sentir en casa cada que vuelvo o que voy.

Gracias a Veronique Cheynier por atenderme, enseñarme y debatir conmigo sobre polifenoles y oxidación. Gracias por tu hospitalidad. Gracias a la gente del INRA de Montpellier: Emmanuelle, Helene, Lea, Anaïs, Gabriel, Rafa y Thierry. Muchas gracias a Diego Paladines y Pascale Williams por las excursiones.

Gracias a los que creyeron en mí y me iniciaron en el mundo de la investigación: gracias a Kike y Reme de la Universidad de Cádiz. A Emma Cantos y María José Ruiz de IFAPA mil gracias por la confianza y consejos.

Gracias a Sergio Cerpa por la foto de la portada y a Jorge Temprado por la foto de la contraportada.

*Adiós tiene nombre de drama
Adiós es la muerte en persona
No es lo mismo que decir
Hasta mañana
O dejadme descansar
Que vuelvo ahora
Adiós cuando suena devora
Cual si todos fueran la nada
Pero solo es un momento
Elegido por el tiempo
Para anunciar que ha llegado
El final que represento
Y que el cuento se ha acabado
Un adiós bien entendido no duele
Porque ni los dioses son inmortales
Un adiós que está llegando se muere
En los mismos carnavales
Si quieres saber la señal
Contempla a tu alrededor
Y eso te debe servir
Para sin vanidad
Saber decir adiós
Cuando viene a mi memoria
De trovador gaditano
Aquel Tinto de Verano
Con el que entraba en la historia
Abrazado a la victoria
Que el pueblo me vino dando
Me he sentido gateando
En el umbral de la gloria
Y por más que he disfrutao
Y por más que he disfrutao
A lo largo del camino
He visto como han cortao
He visto como han cortao
Las barbas de mi vecino
Por eso las mías
Ya estoy remojando
Para cuando
Me anden recordando
Que mi final está llegando
Sea yo de verdad
Quien sepa decir adiós
Dando gracias al mundo
Y la ciudad me recuerde cantando*

La Eterna Banda del Capitán Veneno – Juan Carlos Aragón

Carnaval de Cádiz 2020

A mis padres

A mis hermanos

A Sergio

INDICE

INDICE

PRESENTACIÓN	1
SUMMARY Formation, reaction and accumulation of acetaldehyde and Strecker aldehydes during wine oxidation	5
Introduction	7
Structure of the Thesis	9
CHAPTER 1.- A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines along with observations of the influence of initial wine chemical composition [27]	11
CHAPTER 2.- Temporal patterns of 'de novo' formation and accumulation of acetaldehyde and Strecker aldehydes during wine oxidation [28]	12
CHAPTER 3.- An accelerated index to evaluate the capacity of the wines to produce Strecker aldehydes and some observations about their accumulation.	13
CHAPTER 4.- Evaluation of some hypothesis related to the accumulation of Strecker aldehydes during oxidation	17
CHAPTER 5.- Development and evaluation of an index to measure acetaldehyde reactive polyphenols (ARPs).....	19
CHAPTER 6: Studies on acetaldehyde consumption kinetics of wines and phenolic fractions extracted from grapes (FFAs).....	21
CHAPTER 7: About mass balances in wine oxidation.....	25
References.....	29
INTRODUCCIÓN	33
1. Oxígeno y enología.....	35
2. La química del oxígeno.....	36
3. El papel de los metales en la oxidación del vino	38
4. Primeras etapas del mecanismo de oxidación del vino	40
5. Reacción de Fenton	41
6. Los polifenoles en el vino.....	43
7. La implicación de los polifenoles en la oxidación	45
8. Las principales reacciones de las quinonas.....	46
9. Los antioxidantes del vino: dióxido de azufre y ácido ascórbico.....	48
10. Formación de acetaldehído.....	50
11. Formación de aldehídos de Strecker	50
12. Reactividad del acetaldehído y los aldehídos de Strecker.....	53
13. Referencias.....	57
OBJETIVOS	65

CHAPTER I A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines and some observations about the influence of wine initial chemical composition 69

1. Introduction	71
2. Materials and methods.....	73
2.1. <i>Solvents and Chemicals</i>	73
2.2. <i>Samples and oxidation procedure</i>	73
2.3. <i>Wine chemical characterization</i>	76
3. Results and discussion	81
3.1. <i>O₂ consumption plots</i>	81
3.2. <i>Kinetic segments in R procedures</i>	85
3.3. <i>Description of the different kinetic segments</i>	86
3.4. <i>Dimensions required to understand red wine oxygen consumption</i>	89
3.5. <i>PLS models relating wine consumption kinetics to the wine initial chemical composition</i>	91
4. References	97

CHAPTER II Formation and accumulation of acetaldehyde and Strecker aldehydes during red wine oxidation. 109

1. Introduction	111
2. Material and methods.....	113
2.1. <i>Wines</i>	113
2.2. <i>Wine oxidation procedure</i>	115
2.3. <i>Solvents and Chemicals</i>	116
2.4. <i>Analytical Characterization</i>	117
2.5. <i>Data treatment and statistical analysis</i>	120
3. Results and discussion	122
3.1. <i>Fate of acetaldehyde</i>	125
3.2. <i>Clues about the nature of ARPs</i>	129
3.3. <i>Dynamics of wine oxidation when free SO₂ levels are fading</i>	130
3.4. <i>The case of diacetyl</i>	131
3.5. <i>Strecker aldehydes</i>	132
3.6. <i>Clues about the origin and fate of Strecker aldehydes</i>	134
3.7. <i>Fusel alcohols as precursors of Strecker aldehydes</i>	138
3.8. <i>Patterns of accumulation of aldehydes and potential sensory effects</i>	141
4. Conclusions	143
5. References	144

CAPÍTULO III Un índice acelerado para evaluar la capacidad de los vinos para producir aldehídos de Strecker. Comparativa de los procesos oxidativos a 25 y 45°C.
.....151

1. Introducción.....	153
2. Materiales y métodos	155
2.1. <i>Muestras de vino y procedimiento de oxidación</i>	155
2.2. <i>Cálculo de los parámetros cinéticos</i>	156
2.3. <i>Caracterización química inicial</i>	156
2.4. <i>Caracterización química en el punto final de oxidación</i>	159
2.5. <i>Estudio de la reactividad de los aldehídos de Strecker</i>	159
2.6. <i>Tratamiento de datos y análisis estadístico</i>	159
3. Resultados y discusión	160
3.1 <i>Cinética de consumo de Oxígeno</i>	160
3.2 <i>Acumulación de aldehídos</i>	165
3.3 <i>Estudio de la reactividad (aldehídos de Strecker-material polifenólico)</i>	180
4. Conclusiones	186
5. Referencias.....	187

CAPITULO IV Evaluación de algunas hipótesis acerca de la formación de aldehídos de Strecker191

1. Introducción.....	193
2. Materiales y métodos	195
2.1. <i>Determinación de aldehídos de Strecker por CG-MS previa derivatización con o-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina PFBHA</i>	195
2.2. <i>Estudio del origen de los aldehídos de Strecker- Experimentos 1 y 2</i>	201
2.3. <i>Acumulación de aldehídos de Strecker en vinos tintos, rosados y blancos tras procesos de oxidación y cálculo de las tasas de acumulación, reacción y formación de aldehídos de Strecker en vinos tintos y - Experimento 3</i>	203
3. Resultados y discusión	206
3.1. <i>El diacetilo como α-dicarbonilo en la degradación de Strecker</i>	206
3.2. <i>Acumulación de aldehídos de Strecker en vinos tintos, rosados y blancos con niveles de Fe y aminoácidos igualados</i>	208
4. Conclusiones	219
5. Referencias.....	220

CAPÍTULO V Desarrollo y evaluación de un índice para la medición de los polifenoles reactivos con el acetaldehído (ARPs)	223
1. Introducción	225
2. Materiales y métodos	228
2.1. <i>Determinación de acetaldehído total</i>	228
2.2. <i>Desarrollo de un índice para medir ARPs:</i>	228
3. Resultados y discusión	231
3.1. <i>Estudio del consumo acelerado de acetaldehído en diversas condiciones para el desarrollo de un índice de polifenoles reactivos con aldehídos (ARPs) en vinos</i>	231
3.2. <i>Evaluación del índice de ARPs</i>	237
4. Resumen y conclusiones	251
5. Referencias	252
CAPÍTULO VI Estudios acerca de la cinética del consumo de acetaldehído por vinos y fracciones fenólicas extraídas de mistelas almacenadas en anoxia (FFAs)	255
1. Introducción	257
2. Materiales y métodos	257
2.1. <i>Consumo de acetaldehído en anoxia por fracciones fenólicas extraídas de mistelas (FFAs)</i>	257
2.2. <i>Consumo de acetaldehído en anoxia por vinos dopados</i>	258
2.3. <i>Consumo de acetaldehído en vinos en situación de equilibrio</i>	258
3. Resultados y discusión	259
3.1. <i>Consumo de acetaldehído en anoxia por fracciones fenólicas extraídas de mistelas (FFAs)</i>	259
3.2. <i>Consumo de acetaldehído en vinos dopados</i>	266
3.3. <i>Consumo de acetaldehído en vinos en situación de equilibrio</i>	269
4. Resumen y conclusiones	286
5. Referencias	287

CAPÍTULO VII Acerca de los balances de materia en la oxidación del vino	289
1. Introducción.....	291
2. Materiales y métodos	291
2.1. Efecto de la procedencia del acetaldehído (formado o añadido) sobre la velocidad de consumo de acetaldehído en disoluciones de malvidina-3-O-glucósido y catequina y sobre la naturaleza de los productos formados	291
2.2. Determinación de la velocidad de consumo de O ₂ por las FFAs (material polifenólico directamente extraído de las uvas)	293
2.3. Estimación del H ₂ O ₂ no SO ₂ empleado en la formación de acetaldehído usando FFAs. Relación entre la cinética de consumo de oxígeno y la formación de acetaldehído ..	293
2.4. Estudio del efecto de la presencia de compuestos azufrados en el rendimiento de la formación de acetaldehído a partir del oxígeno consumido	294
3. Resultados y discusión	295
3.1. Efecto de la procedencia del acetaldehído (formado o añadido) sobre la velocidad de consumo de acetaldehído en disoluciones de malvidina-3-O-glucósido y catequina y sobre la naturaleza de los productos formados	295
3.2. Determinación de la velocidad de consumo de O ₂ por las FFAs (material polifenólico directamente extraído de las uvas)	300
3.3. Estimación del H ₂ O ₂ no SO ₂ empleado en la formación de acetaldehído usando FFAs. Relación entre la cinética de consumo de oxígeno y la formación de acetaldehído. .	302
3.4. Estudio del efecto de la presencia de compuestos azufrados en el rendimiento de la formación de acetaldehído a partir del oxígeno consumido	315
3.5. Reinterpretación de los modelos del capítulo 2	319
4. Conclusiones	321
5. Referencias.....	322
CONCLUSIONES	325
ANEXOS.....	331
Anexo 1. Información suplementaria del Capítulo III	333
Anexo 2. Información suplementaria del Capítulo IV.....	337
Anexo 3. Información suplementaria del Capítulo V	341
Anexo 4. Información suplementaria del Capítulo VII	343

Anexo 5. Importancia sensorial de los aldehídos de Strecker en vinos tintos.	
Evaluación de la eliminación de aldehídos de Strecker mediante resinas	345
1. Introducción	345
2. Materiales métodos	346
2.1. <i>Análisis sensorial de aldehídos de Strecker-Experimento 1</i>	346
2.2. <i>Estudio acerca de la capacidad potencial de distintas resinas para eliminar aldehídos en vinos-Experimento 2.</i>	350
3. Resultados y discusión	352
3.1. <i>Análisis sensorial de aldehídos de Strecker – Experimento 1</i>	352
3.2. <i>Estudio acerca de la capacidad potencial de las distintas resinas para eliminar aldehídos en vinos- Experimento 2.</i>	355
4. Conclusiones	361
5. Referencias	362
Anexo 6. Elucidación de los productos de reacción entre el metional y el fenilacetaldehído con los polifenoles del vino.	365
1. Introducción	365
2. Materiales y métodos	365
3. Resultados preliminares	367
4. Referencias	368

PRESENTACIÓN

PRESENTACIÓN

La presente tesis doctoral se ha realizado en el grupo de Investigación Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza, dentro de una de sus principales líneas de investigación: modelización y optimización de la crianza y envejecimiento.

La tesis doctoral recoge una serie de experimentos realizados para estudiar la formación, reacción y acumulación de acetaldehído y aldehídos de Strecker durante la oxidación del vino. En esta tesis se ha desarrollado un método de oxidación que permite suministrar dosis conocidas e importantes de oxígeno y controlar de manera muy reproducible el consumo de oxígeno. Gracias a esta herramienta de oxidación se ha logrado caracterizar la cinética de consumo de oxígeno a dos temperaturas (25 y 45 °C). Varios lotes de vinos en diferentes condiciones han sido sometidos a esta oxidación controlada para conseguir la caracterización de la acumulación de acetaldehído y aldehídos de Strecker, y la evaluación de la hipótesis de la existencia de polifenoles reactivos con aldehídos (ARPs). También ha tenido especial relevancia el desarrollo de estrategias para realizar experimentos en anoxia para el estudio de la capacidad de los vinos para consumir acetaldehído. Por último, se ha calculado que proporción de agua oxigenada se destina a la formación de acetaldehído en el proceso de oxidación de un vino.

Este manuscrito contiene los siguientes apartados:

Resumen en inglés. Consta de una breve introducción general y un sumario de los objetivos, metodologías, resultados y conclusiones de los 7 capítulos.

Introducción. En este apartado se describen en español los mecanismos de reacción del oxígeno en el vino, así como los principales procesos que intervienen en la formación y reacción de acetaldehído y aldehídos de Strecker.

Objetivos. Se exponen los objetivos principales y se enumeran los objetivos específicos que se han propuesto a lo largo de la tesis.

Capítulos. Se han desarrollado 7 capítulos. Los dos primeros están redactados en inglés y corresponden con dos trabajos publicados en Food Chemistry y Frontiers. El resto de los capítulos están escritos en español. Todos los capítulos cuentan con una introducción, un apartado de materiales y métodos, otro de resultados y discusión, conclusiones y por último el listado de referencias bibliográficas.

Conclusiones. Se hace una recopilación de las principales conclusiones de cada capítulo.

Anexos. Se presentan 6 anexos. Los cuatro primeros complementan algunos capítulos. En el anexo 5 se recogen dos trabajos con aldehídos de Strecker: uno para valorar la importancia sensorial de estos compuestos en dos matrices sintéticas distintas de vino tinto y otro investigando las posibilidades de diferentes resinas para eliminar aldehídos de Strecker. En el anexo 6 se presenta el experimento llevado a cabo en el grupo de la Doctora Veronique Cheynier, en la estancia internacional desarrollada en Montpellier, y que está incluido en el proyecto de investigación de la presente tesis. Los resultados de este experimento están siendo actualmente analizados. El anexo IV y V consta de los mismos apartados que los capítulos.

SUMMARY

Formation, reaction and accumulation of acetaldehyde and Strecker aldehydes during wine oxidation

SUMMARY

Formation, reaction and accumulation of acetaldehyde and Strecker aldehydes during wine oxidation

Introduction

Oxygen is key in the elaboration of quality wines [1]. Throughout the winemaking process the wine must have controlled contact with oxygen due to the roles it plays in the development and stabilization of color [2-4] along with the balancing of astringency and bitterness [5]. Some authors and winemakers also report that oxygen improves the aromatic quality of wines by reducing green and vegetal aromas [5, 6]. However, excessive exposure to oxygen can negatively influence wine color by causing an evolution toward yellow or brown tones [7]. Overexposure to oxygen can also be detrimental to the aromatic quality due to the accumulation of acetaldehyde and of Strecker aldehydes which can produce honey and cooked potato aromas [1, 8]. On the other hand, keeping wine under anoxic conditions can cause fermentation to stop [9] along with the appearance of compounds from reduction reactions which smell like rotten eggs, garlic and cauliflower [10]. Consequently, there is an optimum oxygen dose throughout the winemaking process which maximizes the positive influences and avoids the negative effects of overexposure. However, this optimum balance is not easy to achieve as it depends on the many factors that ultimately determine the kinetics, not only of the consumption of oxygen by the wine, but also of those linked to the appearance of unpleasant aromatic components.

Acetaldehyde is one of the primary products of wine oxidation [11]. Following the accepted oxidation mechanism, its formation takes place when the concentration of free sulfur dioxide is too low to remove all the hydrogen peroxide formed during wine oxidation. Hydroxyl radicals ($\text{HO}\cdot$), formed in the Fenton reaction, are generated when the hydrogen peroxide formed in the first reduction of the oxygen molecule, interacts with Fe^{2+} cations. These radicals are extremely reactive so that they react indiscriminately with any organic molecule present in the surrounding media, abstracting a H atom. Being that ethanol constitutes approximately 85% of the organic material of wine, it is the main sink of the hydroxyl radicals. Consequently, 85% of the hydroxyl radicals are typically consumed mostly in the formation of the radical, 1-hydroxyethyl ($1\text{-HER}\cdot$) which is the precursor of acetaldehyde [11-13]. At the beginning of this Thesis it was, at least implicitly, assumed that nearly all $1\text{-HER}\cdot$ formed, ended under the form of acetaldehyde [14].

Being a strong electrophile, acetaldehyde can react with the different nucleophiles present in wine. It reacts reversibly with sulfur dioxide to form hydroxyethylsulphonic acid [15]. As hydroxyalkylsulphonic acids are relatively stable and non-volatile, acetaldehyde and other aldehydes can accumulate and stay protected from other reactions while SO₂ persists. Acetaldehyde also reacts reversibly with glycerol and glutathione to form acetates and thiohemiacetals, respectively. But surely, the main reactions of acetaldehyde in wine take place with polyphenols, with which it reacts irreversibly to form ethyl bridges between different oligomers and vitisin B-type structures [16, 17]. In a synthetic wine without added sulfur, Peterson and Waterhouse [18] studied the equilibrium constants of these processes. They found quantities of acetaldehyde to range from 16 to 33 % in the form of glycerol, 10 to 52 % in glutathione, from 13 to 16% in flavanols and approximately 32% in anthocyanins.

Strecker aldehydes can be formed in wine from the degradation of Strecker and, to a lesser degree, via oxidation of higher alcohols [19]. The main pathway is the degradation of Strecker [20], which consists of the oxidative decarboxylation of an α -amino acid in the presence of an α -dicarbonyl. The result of this process is the formation of an aldehyde that contains one less carbon atom than the original amino acid. The Strecker aldehydes are 2-methylpropanal (from valine), 3-methylbutanal or isovaleraldehyde (from leucine), 2-methylbutanal (from isoleucine), phenylacetaldehyde (from phenylalanine) and methional (from methionine). Any α -dicarbonyl can lead to the formation of Strecker aldehydes [21]. This includes many ortho-quinones formed by the oxidation of ortho-diphenols, as was long time ago reported in tea leaf extracts [22]. Strecker aldehydes can react and interact with the same types of compounds as acetaldehyde, including sulfur dioxide. However, the formation constants of the corresponding hydroxyalkylsulphonates are lower than that of acetaldehyde [23]. The practical consequence of this fact is that, during the oxidation of wine, and as a consequence of the elimination of SO₂ and the production of acetaldehyde, Strecker aldehydes will be progressively released from their hydroxyalkylsulphonated forms generating sensorial problems if they were present at relevant concentrations [24].

Due to the importance of these processes to wine quality and longevity, the main objective of this Thesis is to study and understand the different variables that affect the formation, reaction and accumulation of Strecker aldehydes and acetaldehyde during the oxidation of wine.

Structure of the Thesis

This Thesis has had a quite winding development, since the first results obtained during 2017 led us to very attractive working hypotheses that, after all, were wrong. The two first chapters of this Thesis are corollaries of two previous doctorates and provide the experimental background for setting the initial working hypothesis of the rest of the present Thesis. Those doctorates were those of Vanesa Carrascón (2017) [25] and Mónica Bueno (2016) [26].

In **Chapter 1** a new procedure to study the kinetics of wine oxidation at levels of O₂ consumption well above those used in previous studies, is developed and characterized [27]. The methodology makes it possible to reach levels of oxidation compatible with the nearly complete elimination of the SO₂ contained in wine, which is essential to observe the net formation of aldehydes. It also revealed a complex kinetical pattern of O₂ consumption, and pointed to total acetaldehyde as a key chemical determining or at least closely related to the rates at which wine consumes O₂.

In **Chapter 2**, such procedure is applied to the controlled oxidation of a set of 8 red wines wherein the concentrations of acetaldehyde and Strecker aldehydes are measured [28]. In the case of acetaldehyde, it was assumed that most of the H₂O₂ formed by the first reduction of O₂, in the absence of SO₂ (quantitatively defined as “O₂ not SO₂”), formed acetaldehyde. As little accumulation was observed, except in some aged wines, it was assumed that most of it had reacted with wine polyphenols. The models relating the fraction of acetaldehyde remaining (being the total, the stoichiometrically expected amounts from the “O₂ not SO₂” consumed), were highly satisfactory and significant, and suggested that wine polyphenols, notably anthocyanins, were mostly responsible for the scarce accumulation of acetaldehyde. As the models explaining the accumulation of Strecker aldehydes had the same structure, the first conclusion of this research was that the key to understanding the accumulation of aldehydes in wine is the reactivity between the aldehydes and the specific polyphenolic composition of the wine. The fraction of phenolic material particularly reactive with aldehydes was, therefore, denominated as Aldehyde Reactive Polyphenols (ARPs). This, together with results from the first chapter, made us think that measuring the reactivity of acetaldehyde in wine was a priority and much effort was invested into this topic.

Nevertheless, the two following chapters cover other aspects mainly related to Strecker aldehydes. **Chapter 3** explores the feasibility to predict the capacity of a wine to accumulate acetaldehyde and Strecker aldehydes during oxidation, using an accelerated oxidation

procedure. **Chapter 4** assesses the reliability of two hypotheses derived from the models in Chapter 2 related to the accumulation of Strecker aldehydes. The first is whether diacetyl is the α -dicarbonyl specifically promoting the Strecker degradation of phenylalanine to form phenylacetaldehyde. The second has to do with whether different wine polyphenolic compositions and similar metal and amino acid profiles, really translate into different patterns of accumulation of Strecker aldehydes.

Chapter 5 includes the results of all the efforts invested in the generation of a general index to evaluate the fraction of ARPs of the wines and in assessing whether such index is really able to predict the ability of wine to consume O_2 and accumulate aldehydes. **Chapter 6** addresses specific studies to measure and model the kinetics of acetaldehyde consumption by wine and by polyphenolic fractions extracted directly from grapes (FFAs). **Chapter 7** introduces first an experiment to verify whether the poor rates of acetaldehyde consumption obtained in Chapter 6 are also observed in conditions in which acetaldehyde is continuously formed from the oxidation of ethanol. This seeks just to discard the possibility that some of the intermediate species in acetaldehyde formation is more reactive towards polyphenols than acetaldehyde itself. Following, acetaldehyde consumption rates together with other data obtained "ad hoc", were used to estimate the mass balances corresponding to the second reduction of O_2 , i.e., the step from H_2O_2 to H_2O during wine oxidation. In particular, our interest is to estimate the proportion of H_2O_2 which ends up forming acetaldehyde. This fraction is denominated " H_2O_2 CH_3CHO ". Our estimations indicate that in the majority of the cases this fraction is small ($8\% < H_2O_2, CH_3CHO < 50\%$), implicating that there is an important complementary fraction of " H_2O_2 not CH_3CHO " which has to oxidize molecules other than ethanol. The chapter ends with a study demonstrating how the mercaptans in wine are also capable of preventing the oxidation of ethanol by H_2O_2 , contributing up to 10% to the fraction " H_2O_2 not CH_3CHO ". Due to lack of time to finish the demanding data analysis within the restricted time frame, results from a project carried out in Montpellier with Professor V. Cheynier whose aim is to elucidate the products of the reaction between methional and phenylacetaldehyde and wine polyphenols are presented in an appendix.

Next, the summaries of the different chapters are presented.

CHAPTER 1.- A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines along with observations of the influence of initial wine chemical composition [27]

The main goal of the present research was to develop a general, simple and reproducible experimental strategy specifically designed to obtain a detailed description of the kinetics of oxygen consumption in wines exposed to a broad range of O₂ levels. Previous procedures were extremely tedious and required a too long and complicated sample workout [29]. Additional objectives were to determine the kinetic parameters required to provide a complete description of the O₂ consumption pattern of wine and to relate those kinetic parameters to the wine chemical composition. For this study, eight Spanish red wines of different vintages (between 2009 and 2014) made mainly with Garnacha (Grenache) and Tempranillo, were purchased locally. Two different forced oxidation procedures were used in this research. The first one (S procedure) was previously described [29] and uses sequential cycles of wine oxidation, beginning each with a complete air saturation of wine (around 8 mg/L O₂). The second forced oxidation procedure (R procedure) is simply based on storing a measured volume of wine with a well measured headspace volume of air (21% in O₂) in a tightly closed container (wine in tube, WITs) whose exact interior volume had been previously carefully measured. In all the cases, levels of oxygen were controlled with PST3 (Nomacorc) sensors. In the R procedure, 3 levels of oxidation (R1, R2 and R3) were studied in duplicate. In R1, wines were exposed to 9-11 mg of oxygen per liter of wine; in R2, each wine was exposed to 18 mg/L of O₂ plus the stoichiometrically required amount to oxidize all the SO₂ contained in that specific wine, and in R3, to this same variable amount per wine plus 32 mg/L. The tubes were incubated in a Grant OLS23 thermostatic bath at 25°C with orbital shaking (90 rpm) to ensure equilibrium between the liquid and gas phases. The oxygen consumption rates measured with the procedure were highly reproducible (RSD < 5%). At each oxygen level of the R procedure, 2-4 independent segments following pseudo-first order kinetics were identified, along with an initial segment at which the wine consumed O₂ very fast. Overall, multivariate data techniques identify six different Oxygen-Consumption-Rates (OCRs) as required to completely define wine O₂ consumption. Except the last one, all could be modeled from the initial chemical composition of the wine. Total acetaldehyde, Mn, Cu/Fe, blue and red pigments and gallic acid seemed to be essential to determine these OCRs.

CHAPTER 2.- Temporal patterns of 'de novo' formation and accumulation of acetaldehyde and Strecker aldehydes during wine oxidation [28]

The main aim of the present research was to characterize the chemical processes responsible for the formation and accumulation of acetaldehyde and Strecker aldehydes (isobutyraldehyde, 2-methylbutyraldehyde, isovaleraldehyde, methional, and phenylacetaldehyde) in red wines. For this, eight different wines were subjected to three different controlled O₂ exposure conditions at 25°C: low (10 mg/L), medium (18 mg/L) and high (32 mg/L) plus the required amount to oxidize all wine SO₂. Initial wines were completely characterized in terms of volatile and non-volatile chemical composition. Additionally, total levels of the different volatile aldehydes and carbonyls were determined in the oxidized samples. Results were processed by chemometric and modeling strategies in order to understand the relationship between aldehyde formation and accumulation and the chemical composition of the wine. Results suggested that the accumulation of acetaldehyde in a given wine depended on three different compositional/reactive aspects:

1. The reactivity towards acetaldehyde of the specific polyphenolic profile of the wine, i.e., the wine content in ARPs.
2. The wine content in free SO₂, and in weak SO₂ binders which could be displaced by acetaldehyde, protecting this molecule from its reaction with ARPs.
3. The relative rates at which the wine consumes oxygen, and hence produces H₂O₂, and the rate at which its available SO₂ can effectively consume the H₂O₂ produced.

Furthermore, the models suggested that ARPs should be mostly anthocyanins and small tannins. This is consistent with experimental results in **figure 1**, in which a nearly null accumulation of acetaldehyde was observed in young wines, regardless of the O₂ consumed. On the contrary, acetaldehyde accumulates in aged wines as long as there is SO₂ to prevent its reaction with ARPs. Further accumulation seems to be only possible after ARPs have been consumed.

The models also suggested that Strecker aldehydes are mainly formed through the Strecker degradation of the corresponding amino acids. This would explain why Strecker aldehydes accumulate before acetaldehyde. Among Strecker aldehydes, phenylacetaldehyde followed a completely different accumulation pattern characterized by an intense accumulation in young wines shortly after wine SO₂ is depleted. The models suggested that such different pattern could be related to two specificities of this aldehyde:

1. A reduced reactivity towards ARPs, in comparison to the aliphatic Strecker aldehydes, whose reactivity would be closer to that of acetaldehyde.

- The Strecker degradation of its amino acid precursor, phenylalanine, would be induced by a different set of α -dicarbonyls, in comparison to the other Strecker aldehydes. In the case of phenylacetaldehyde active α -dicarbonyls would be diacetyl and quinones derived from catechin.

A relevant final conclusion is that in all cases Strecker aldehydes are responsible for sensory changes long before acetaldehyde becomes perceptible.

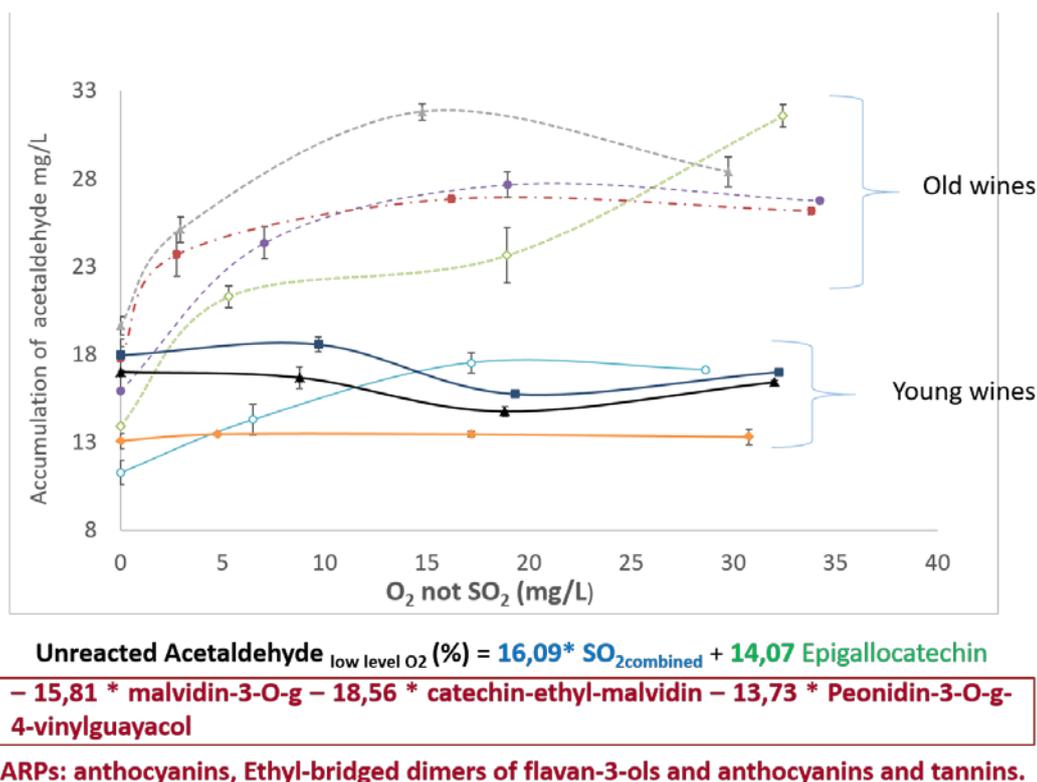


Figure 1. Different patterns of acetaldehyde accumulation as a function of the type of wine. This model relates the unreacted acetaldehyde fraction with the initial composition where the anthocyanins and small tannins obtain negative coefficients and are interpreted as Acetaldehyde Reactive Polyphenols (ARPs).

CHAPTER 3.- An accelerated index to evaluate the capacity of the wines to produce Strecker aldehydes and some observations about their accumulation.

The comparison of the kinetics of the consumption of O₂ at 45°C and at room temperature illustrates the existence of notable differences. The wines consuming O₂ faster at room temperature are not necessarily those consuming it faster at 45°C. In spite of that, it would be possible, through multivariate modeling techniques, to predict in a limited number of the previously defined kinetic steps, the consumption kinetics at room temperature from the kinetic pattern at 45°C. With respect to the accumulation of aldehydes during oxidation, the quantities of 2- methylbutyraldehyde, methional, isovaleraldehyde and, to a lesser degree,

isobutyraldehyde accumulated at 45°C are very similar and are very well correlated to those quantities accumulated at 25°C (**figures 2-4**). This indicates that the mechanisms affecting the accumulation of these aldehydes are not much affected by temperature and suggests that accelerated oxidation can constitute a predictive tool with great practical use in the cellar. On the contrary, in the cases of phenylacetaldehyde and acetaldehyde, the accumulation patterns at both temperatures change notably and follow opposite trends, as can be seen in **figures 2 and 4**. Phenylacetaldehyde only accumulates in young wines at 25°C, while acetaldehyde only accumulates in young wines at 45°C. With respect to aged wines, the accumulation of phenylacetaldehyde at 45°C was strictly proportional to that observed at 25°C, but much higher, while for acetaldehyde, the opposite occurred. I.e., the ratio accumulated phenylacetaldehyde/accumulated acetaldehyde increased with temperature in aged wines and decreased with temperature in young wines.

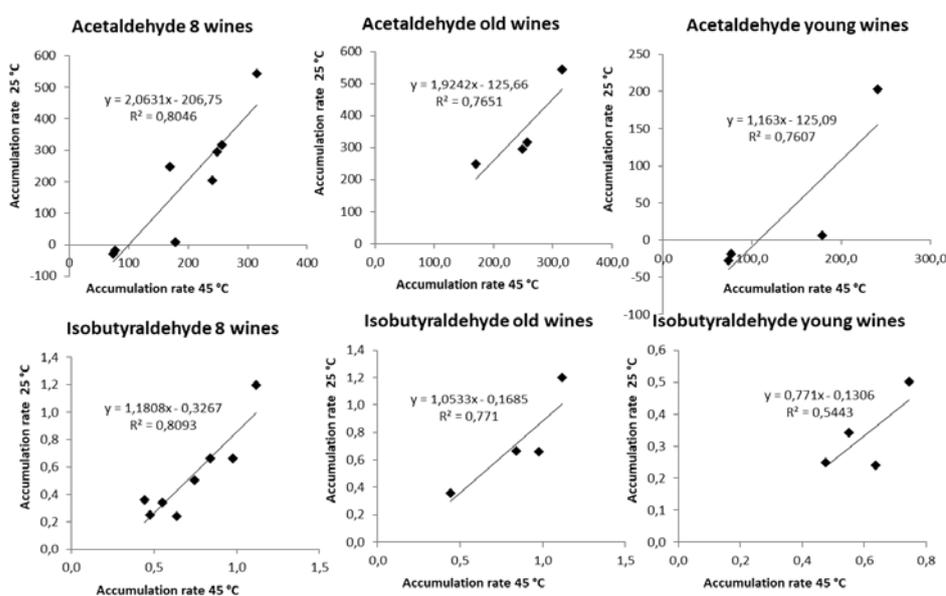


Figure 2. Representation of the accumulation rates ($[[\text{aldehydes}]_{\text{final}} - [\text{aldehydes}]_{\text{initial}}]/O_2 \text{ not } SO_2$) at 45 degrees compared to those at 25 degrees for acetaldehyde and isobutyraldehyde.

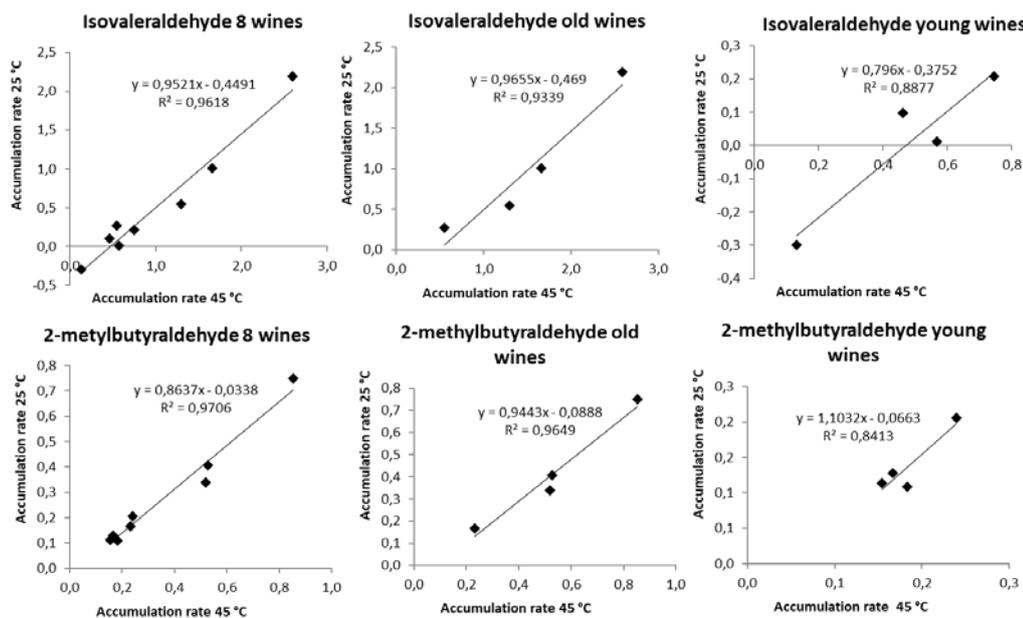


Figure 3. Representation of the accumulation rates $(([\text{aldehydes}]_{\text{final}} - [\text{aldehydes}]_{\text{initial}})/O_2 \text{ not } SO_2)$ at 45 degrees compared to those at 25 degrees for isovaleraldehyde and 2-methylbutanal.

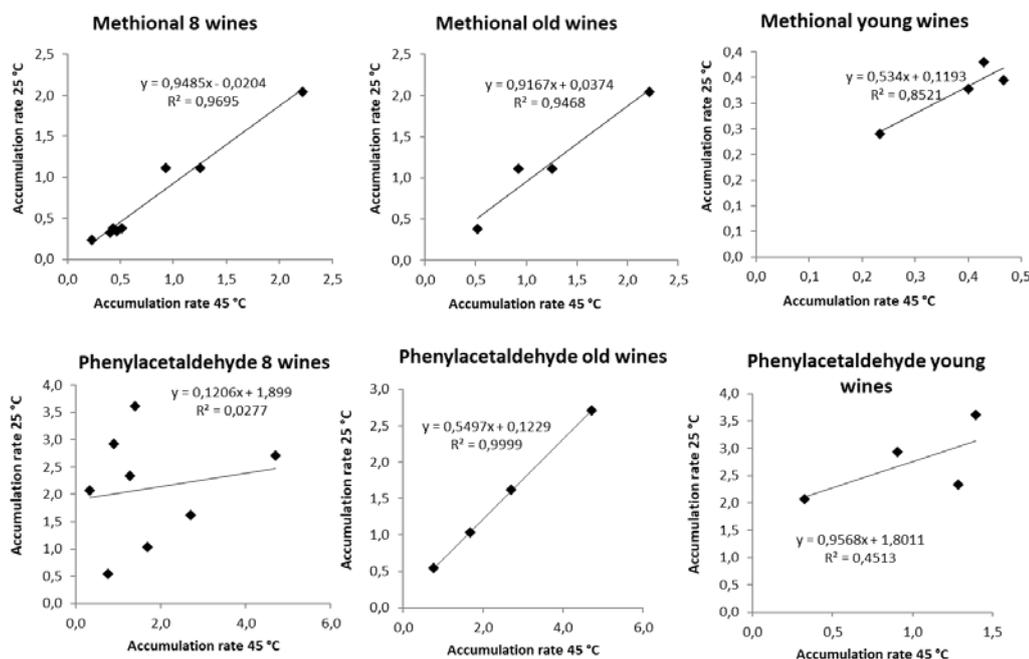


Figure 4. Representation of the accumulation rates $(([\text{aldehydes}]_{\text{final}} - [\text{aldehydes}]_{\text{initial}})/O_2 \text{ not } SO_2)$ at 45 degrees compared to those at 25 degrees for methional and phenylacetaldehyde.

These differences between phenylacetaldehyde and the other Strecker aldehydes are also seen in the PLS (Partial least squares regression) models built to predict their accumulation.

Some essential elements of the model are kept the same at both temperatures, such as the positive coefficients for amino acids as precursors, the also positive coefficients of Fe, which could play a catalyst role, the negative coefficients of anthocyanins (suspected ARPs) or, in the case of phenylacetaldehyde, the positive coefficients for catechin in tannins. However, some very notable changes can be also observed between the models at the two temperatures. The most important is that at 45°C, anthocyanins play a positive role only in the model for phenylacetaldehyde, but not in the models for the other aldehydes. For these aldehydes, tannins or tannin-related compositional parameters replace anthocyanins in the models. All these observations are exactly the opposite of what was observed at 25°C. All of this suggests that the temperature affects quite differently the two processes affecting the generation of aldehydes: the generation of quinones and the reactions aldehyde-anthocyanins, with phenylacetaldehyde following a completely different pattern in any case. The model for methional has also some specificities related to the presence in the model of tannins and methionine sulfoxide, both with negative coefficients. This suggests a different pattern of interaction methionine-polyphenols and that the direct oxidation of methionine to the sulfoxide is a competing pathway in methionine degradation.

Surprisingly, an independent experiment carried out with the same wines of the previous experiment (but from different vintages) showed that the stability of Strecker aldehydes in the different wines, was relatively independent from the wine polyphenolic composition. Such stability was mainly related to the relative strengths of the adducts aldehyde-SO₂, and to the levels of SO₂ available in each wine, and apart from this, it was quite uniform. This result is in contradiction to the interpretations made in this and previous chapters about the negative coefficients observed for the anthocyanins in the predictive models. Previous interpretations assumed that negative coefficients were related to the role of anthocyanins as sinks of aldehydes. If this is true, however, strong differences in aldehyde stability would have been expected between the different wines. This should make us think that either the coefficients taken in the models were casual, or they reflect a quite different role of anthocyanins. Maybe these molecules are relevant to aldehyde production, not only because of their reactivity towards aldehydes, but because anthocyanins play an unknown role on the fate of H₂O₂ during wine oxidation.

CHAPTER 4.- Evaluation of some hypothesis related to the accumulation of Strecker aldehydes during oxidation

The objectives of this chapter were to assess some of the hypotheses about the formation of Strecker aldehydes raised in **chapter 2** of this Thesis [28]. In a first experiment, the capacities of diacetyl and of the quinone from 4-methylcatechol to act as α -dicarbonyls in the Strecker degradation of amino acids were evaluated. To carry this out, synthetic wines containing Strecker amino acids (valine, leucine, isoleucine, methionine and phenylalanine) and diacetyl or 4-methylcatechol were used. In the first case, the wines were incubated under anoxia at room temperature. In the second case, the wines contained additionally metal cations and were incubated with air in the headspace at 35 degrees. Results from diacetyl suggest that it is not particularly active at provoking Strecker degradation. Under the conditions tested, the yields were very low (between 0,007 and 0,07% after a month of reaction). In any case, diacetyl does not seem to be a specific activator of phenylalanine degradation, as the models had suggested. In fact, the aldehyde most produced in the presence of diacetyl was methional, which was produced six times more than phenylacetaldehyde. In contrast, the O_2 /4-methylcatechol system proved to be surprisingly effective at activating the Strecker degradation of amino acids, producing yields of 9% for 2-methylbutanal, 16% for phenylacetaldehyde and 40% for methional.

The objective of the second experiment was to assess the magnitude of the differences introduced by wine compositional factors other than amino acids and Fe, in the accumulation of Strecker aldehydes during oxidation. To do this, a forced oxidation procedure was applied to a set of 12 wines (8 reds, 2 roses and 2 whites) whose levels of Strecker amino acids and iron had been previously normalized, so that all wines contained the same levels of these components. As amino acids and Fe are fundamental parts of the models, differences in the accumulation of aldehydes should be entirely attributed to the specific polyphenolic composition, or to other specific compositional parameters of the wines. The analysis of the wines after the experiment revealed differences between whites and roses on the one hand, and reds on the other hand. However, differences were contrary to what was expected. In agreement with our initial interpretation of the models, white and rose wines should have accumulated Strecker aldehydes easier since they lack anthocyanins, which were proposed as main ARPs. However, whites and roses presented negative accumulations for isobutyraldehyde, whose levels at the end of the oxidation were inferior to the initial amounts, and in general, accumulated smaller concentrations of the other aldehydes.

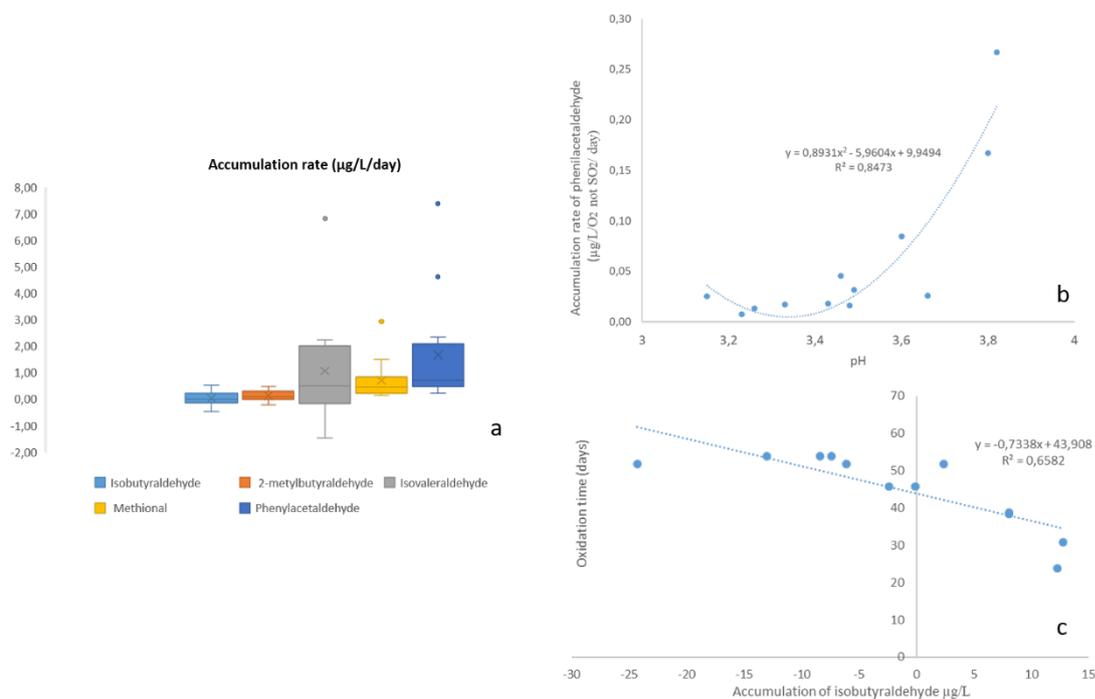


Figure 5. a) Box plot representation of the accumulation rates of Strecker aldehydes (µg/L/day). b) Correlation between the accumulation rate of phenylacetaldehyde (µg/L)/O₂ not SO₂/day) and wine pH. c) Correlation between the accumulation of isobutyraldehyde (µg/L) and the time required to consume all O₂ (oxidation time in days).

As can be observed in **figure 5a**, only methional and phenylacetaldehyde were accumulated in all the wines during oxidation. 2-methylbutyraldehyde and isovaleraldehyde were accumulated in 9 out of the 12 wines, whereas isobutyraldehyde was accumulated only in 5 out of the 12. 2-methylbutyraldehyde was, in average, the least accumulated aldehyde, reaching a maximum rate of 0,52 µg/L per day and a minimum rate of -0,47 µg/L per day. On the other hand, phenylacetaldehyde had the greatest accumulation rates reaching a maximum of 7,37 µg/L per day in one of the wines and a minimum of 0,21 µg/L per day (**figure 5a**). The rates of aldehyde production, standardized by unit of time and by amount of “O₂ not SO₂” consumed, differed considerably between wines, with RSDs (%) above 100%. Methional was the aldehyde formed most homogeneously, even though the differences between the maxima and minima levels accumulated amounted to a factor 6. Remarkably, most of the observed differences can be attributed to only two factors: the pH and the time required by each wine to consume all the O₂ delivered (oxidation time). The influence of pH was particularly intense in the cases of phenylacetaldehyde (**figure 5b**) and methional, while the oxidation time was more important for isobutyraldehyde (**figure 5c**) and 2 and 3-methylbutanals. Given that pH and oxidation time are both related to the stability of the aldehydes in the medium and pH is also likely associated to the Strecker

degradation kinetics, the results strongly suggest that the role played by wine polyphenolic composition on the accumulation of aldehydes is of secondary importance.

CHAPTER 5.- Development and evaluation of an index to measure acetaldehyde reactive polyphenols (ARPs)

The objective of this chapter was to develop an index to assess the presence and quantity of “aldehyde reactive polyphenols” in wines. To this end different acetaldehyde incubation conditions were evaluated in different wines. To observe consistent and rapid acetaldehyde consumption it was necessary to incubate at 70°C with a large excess acetaldehyde (300 mg/L). For an optimum differentiation between wines, 4 days of incubation were required. However, the values obtained with this index were highly correlated with TPI (Total Polyphenols Index), which indicates that in these conditions acetaldehyde is simply a general polyphenolic reagent for wine polyphenols, and it is not really able to discriminate between the polyphenols which are more or less reactive to acetaldehyde at room temperature.

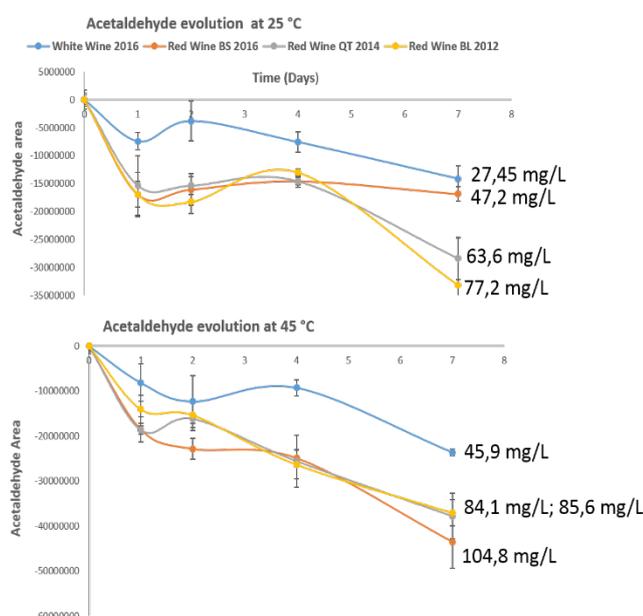


Figure 6. Consumption of acetaldehyde in 4 different commercial wines. Wines were spiked with 300 mg/L of acetaldehyde and were further incubated during 7 days at 25 and 45 °C.

At 45°C, 7 days of reaction with 300mg/L of added acetaldehyde were required to achieve an optimal differentiation between wines. Even though the indexes so obtained were not correlated with TPI, differences between wines were quite limited and, in any case, were not correlated with the consumption of acetaldehyde measured at 25°C (figure 6). To

obtain an index in a reasonable amount of time at room temperature, the reaction was accelerated with acidic pHs. At a pH of 1, a good reactivity was obtained, yet an excessive imprecision was observed in some of the wines. The best solution, considering the different factors, was to incubate the wines, spiked with 35 mg/L of added acetaldehyde, for 7 days under anoxia at 25°C.

To assess the real ability of this index to evaluate the differential abilities of the wines to consume acetaldehyde, 12 different wines were subjected to controlled oxidation. Attending to our expectations, the higher the acetaldehyde consumption rate measured by the index, and corrected at the real wine pH, the smaller the amount of acetaldehyde that this wine should accumulate during its oxidation. However, this was not observed. The reactivity towards acetaldehyde measured with the developed index, did not show any consistent correlation or trend with the amount of acetaldehyde accumulated during the oxidation. This result strongly suggests that the reactivity of acetaldehyde is not a limiting factor in its accumulation during oxidation, contrarily to what we had interpreted previously.

Analyzing in more detail the acetaldehyde consumed by the 12 wines, it was possible to confirm the previously observed negative correlation between the rate of O₂ consumption and the initial concentration of acetaldehyde. Another most remarkable observation is that in all cases, the quantities of accumulated acetaldehyde were very low, even negative. Accumulation patterns found in red wines were different to those observed in white and rose wines. In red wines, the accumulation of acetaldehyde during oxidation was positively correlated to the amount of "O₂ not SO₂" consumed and negatively to the incubation time. In the case of white and rose wines, on the other hand, it appears to be related to the total SO₂ contained in the wine.

A final and general conclusion derived from all the different experiments carried out so far about the reactivity of acetaldehyde, is that such reactivity is too little and too erratic to explain the low quantities of acetaldehyde accumulated in the oxidation experiments. In other words, it is extremely unlikely that the low amounts of acetaldehyde accumulated during wine oxidation, in comparison to the expected amounts estimated from the levels of "O₂ not SO₂" consumed, are due to the consumption of acetaldehyde by wine polyphenols as we had previously assumed.

CHAPTER 6: Studies on acetaldehyde consumption kinetics of wines and phenolic fractions extracted from grapes (FFAs)

The objective of this chapter was to obtain more data on the capacity of wines or polyphenolic fractions to consume acetaldehyde in anoxic conditions. Three different studies have been carried out. The first study involved the acetaldehyde consumption rates of polyphenolic fractions (FFAs) extracted from grapes. Variables, such as acetaldehyde concentration, previous consumption history, and the origin of the grape extract were considered. The second study evaluated the consumption of acetaldehyde by different wines whose initial levels of acetaldehyde had been adjusted. As SO₂ was not adjusted, in this study wines contained different levels of free acetaldehyde depending on their original SO₂ content. The third study analyzed the consumption of acetaldehyde by unaltered wines stored under anoxia for almost 4 months.

Consumption of acetaldehyde by FFAs. The interest in using FFAs to study their acetaldehyde consumption rates, is that these extracts are the most similar materials to wine, regarding polyphenolic composition, and have had no previous contact with SO₂. The presence of this antioxidant causes an annoying interference in this type of studies because of its large reactivity to aldehydes. Additionally, as the phenolic material contained in the FFAs has been directly extracted from grapes and has had no previous contact with acetaldehyde, a maximum reactivity toward this molecule can be expected.

Results, however, demonstrated that even in these media the reaction between acetaldehyde and the FFAs phenolic material was slow and extremely dependent on the concentration of added acetaldehyde. If the amount of acetaldehyde added was 15 mg/L, the reaction was practically non-existent. In fact, only one of the studied FFAs showed a slight acetaldehyde consumption of just 4 mg/L in the first 10 days. Significant differences were not obtained for acetaldehyde consumption, neither between FFAs nor within each FFA evaluated over consecutive 10-day periods. This seems to confirm that the consumption was not dependent on the polyphenolic composition of the FFAs.

At higher acetaldehyde concentrations the reactions took place much quicker. In fact, the apparent kinetical order of the reaction is well above 3. In some of the FFAs a large level of imprecision was observed, so large that in some experiments the lines representing the evolution of the levels of acetaldehyde with time from samples spiked at quite different levels of acetaldehyde intersected and crossed. The reaction rate seems to also be strongly dependent on the previous history of acetaldehyde consumption. After the consumption of

the first quantity, the same concentration of acetaldehyde would react much slower (figure 7).

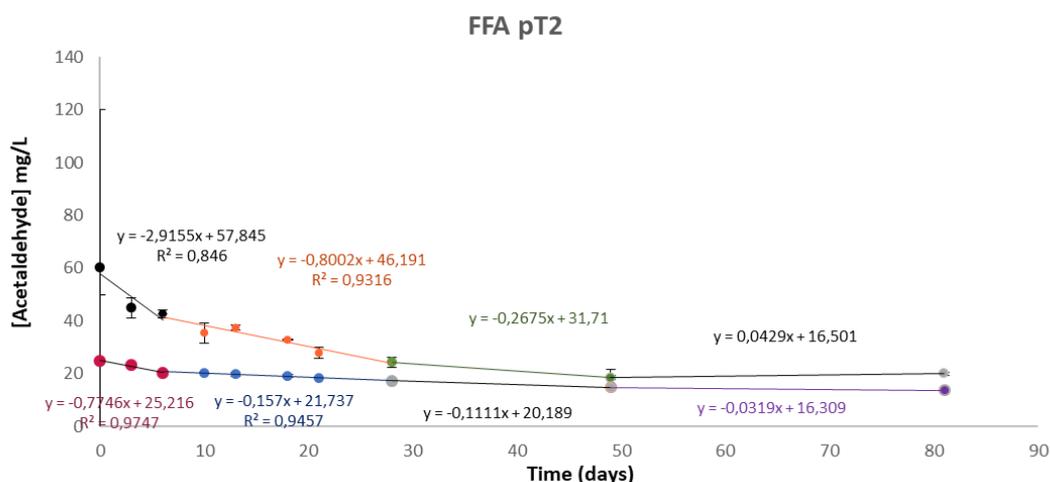


Figure 7. Evolution of acetaldehyde at 35 °C in a FFA (pT2) spiked with 25 and 60 mg/L of added acetaldehyde. The error bars in each point represent the mean error as s/\sqrt{n} . FFA pT2 (p= pre-harvest quality, T= variety of grape in this case Tempranillo, 2= meaning that is from Spanish winery 2).

Given that the FFAs do not have different levels of neither ethanol nor glycerol with which acetaldehyde can form acetals and dioxanes, respectively, the low acetaldehyde consumptions at low acetaldehyde levels, suggest that acetaldehyde has to be forming diverse complexes with polyphenols from the wine. These complexes have sufficient stability to hinder or completely impede reactions with the reactive polyphenols, yet not enough to cancel the analytical signals. Since free acetaldehyde was not monitored in this study, it is not possible to determine the strength or the time required for these associations to establish. Notwithstanding this, in the case that the processes were slow, the loss of reactivity observed after repeated exposures to acetaldehyde could be due to the formation of these complexes. In any case, the results illustrate that the most reactive FFA only consumes 0,9 mg/L per day at 35°C when it was spiked with 35 mg/L of added acetaldehyde.

Consumption of acetaldehyde in wines with different levels of free acetaldehyde.

The concentration of total acetaldehyde in the set of wines was adjusted to 38 mg/L. This made the wines to differ substantially in the quantity of acetaldehyde readily available for reaction (between 0 and 29,6 mg/L), since the levels of SO₂ were different for each wine. These levels were denominated acetaldehyde in excess and refer to the amount of total acetaldehyde present in the wine, after subtracting the amount of acetaldehyde

stoichiometrically reacting to free SO₂. In these conditions, 28,4 mg/L was the maximum quantity of acetaldehyde consumed in 36 days at 25°C. Such maximum was observed in the wine with the greatest initial quantity of acetaldehyde in excess (29,6 mg/L). The value of this consumption rate (0,79 mg/L per day) is consistent with the maximum consumption rate measured in the FFAs at 35°C with similar levels of added acetaldehyde. Notably, the rate of acetaldehyde consumption was fairly homogenous for all the wines, except for those containing maximum or minimum initial levels of free SO₂. In the 5 samples with levels of free O₂ between 7 and 18 mg/L, the consumption was 15,5 ± 1,4 mg/L in 36 days, or 0,43 ± 0.04 mg/L per day (**figure 8a**). The rate of consumption is even relatively independent from the initial quantity of acetaldehyde in excess. Thus, for levels between 2 and 22 mg/L of acetaldehyde in excess, the exact consumption was 15,5 ± 1,4 mg/L, provided that the levels of free SO₂ were not above 20 mg/L. With higher levels of initial free SO₂ the consumption was slightly lower (11,3 mg/L). If there is no acetaldehyde in excess, i.e.; if the free acetaldehyde available is simply that remaining in equilibrium with the SO₂ of the wine, the consumption rate is 8 mg/L in 36 days, or 0,22 mg/L per day (**figure 8b**). This result suggests that the acetaldehyde consumption rate for each wine is slow, constant and practically independent of the polyphenolic composition.

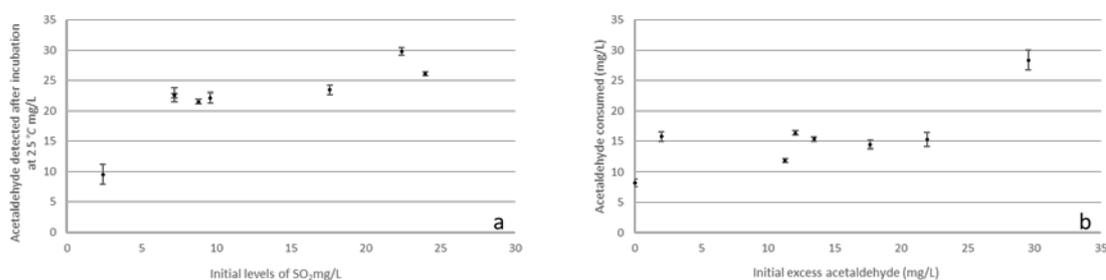


Figure 8. a) Level of acetaldehyde detected after incubation at 25 °C for initial levels of free Sulfur dioxide. b) Acetaldehyde consumed in the incubation at 25 °C (mg/L) for initial excess acetaldehyde in (mg/L).

Consumption of acetaldehyde of unaltered wines. In this case the wines were stored under anoxia for 112 days without altering their initial composition. For red wines, maximum consumption rates were obtained from the samples that initially contained the highest levels of acetaldehyde. These rates were just 0,2 mg/L/day, which are consistent with those measured in the previous experiment for wines not having acetaldehyde in excess. Clearly, wines with lower initial quantities of acetaldehyde consumed much lower quantities. The acetaldehyde consumption rates could be perfectly modeled ($R^2 = 0,9899$) with just three variables: the initial acetaldehyde concentration, the pH, and the age of the wine, attending to the following equation:

$$U_{acetaldehyde} = 0.01795 \cdot \frac{C_{acetaldehyde}^0}{pH \cdot F_{age}} - 0.00063$$

Where F_{age} is a factor taking values between 1 and 2 whose value increases with wine age attending to the following expression:

$$F_{age} = \frac{\text{Log}(age)}{1.3} + 1$$

In accordance to the model, the acetaldehyde consumption rate is positively dependent on the initial levels of acetaldehyde and negatively on wine pH. These two relationships were expected since they both are related to the availability of acetaldehyde. The negative dependence with pH is due to both, the higher proportion of SO₂-bonded acetaldehyde at higher pHs, and to the fact that the reactive species is the protonated form of acetaldehyde. The dependency on the age of the wine is interesting because it suggests a dependency on the chemical composition of the wine; it is probably related to the proportion of the polymeric material present which causes the oldest wines to consume acetaldehyde slower. As the previous acetaldehyde contact history is influential, this observation may be consistent with those made in the FFAs.

Acetaldehyde consumption rates can be interpreted by pseudo-first order kinetics wherein the fraction of the acetaldehyde in wines that reacts daily is between 0,35 and 1% (k_0 in **table 1**). For daily consumptions lower than 0,75%, the constant can be modeled perfectly with a mathematical expression very similar to the anterior model. The pseudo-first order approximation does not seem to be valid for higher consumptions, however.

		Initial CH ₃ CHO (mg/L)	k_0	1 day	1 week	1 month	3 months	6 months
All of the wines	Mean	25,2	0,00677	0,17	1,19	4,67	11,4	17,3
	min	7,30	0,00352	0,03	0,24	0,97	2,61	4,44
	max	53,8	0,01007	0,44	3,03	11,8	27,8	40,6
	desv	14,6	0,00236	0,12	0,81	3,14	7,40	10,7
Red wines	Mean	21,6	0,00585	0,12	0,82	3,27	8,27	13,2
	min	7,30	0,00352	0,03	0,24	0,97	2,61	4,44
	max	53,8	0,01007	0,26	1,80	7,31	19,1	31,4
	desv	14,7	0,00229	0,08	0,53	2,12	5,30	8,50

Table 1. Prediction of acetaldehyde consumption (mg/L) in unaltered wines. Mean, minimum and maximum values taking into account all of the wines and only the red wines.

CONCLUSIONS. Wine consumes acetaldehyde very slowly, at a relatively constant rate, and poorly dependent on the polyphenolic composition of the wine. The influence of wine

polyphenolic composition seems to be well represented by a factor related to wine age whose variability is very limited (from 1 to 2). Apart from this, the kinetics of acetaldehyde consumption seems to be essentially determined by the availability of the free acetaldehyde and by the stability of the carbocation, which explains the negative dependence with pH. In normal conditions, without added acetaldehyde, consumption progresses at rates lower than 0,2 mg/L per day following pseudo-first order kinetics when the daily consumption is lower than 0,75%. In those cases where there can be an accumulation of acetaldehyde, the consumption rate appears to become constant taking at 25°C the value of $0,43 \pm 0,04$ mg/L of acetaldehyde consumed per day. In extreme cases, with maximum acetaldehyde accumulation and minimum presence of SO₂, the rate can reach up to 0,79 mg/L/day (at 25°C).

CHAPTER 7: About mass balances in wine oxidation

This chapter deals with various questions that may be key to understand some aspects of the mass balances of wine oxidation, some of which could have been misinterpreted in the scientific literature. The first is a simple verification that the low rates of acetaldehyde consumption, observed in all the experiments herein, are maintained in case that the generation of acetaldehyde takes place in situ. I.e., that the low rates are observed even when polyphenols are in potential contact not only with acetaldehyde, but with its precursor radicals: α -hydroxyethyl and hydroxyethyl peroxide. For this verification, synthetic matrices containing catechin, malvidin-3-glucoside or a mixture of both were exposed to acetaldehyde, either directly added and kept under anoxia, or by adding the quantity of oxygen necessary to form the same amount of acetaldehyde by oxidation of ethanol. Results showed that the samples directly spiked with acetaldehyde were those which consumed the most acetaldehyde; a result consistent with the comparatively longer reaction time that these samples had, since concentration of acetaldehyde was maxima from the beginning. In any case, the result makes it possible to reject the hypothesis stating that the acetaldehyde-polyphenol reactivity is superior when acetaldehyde is formed in situ. Consistently with this result, ethyl bridge polyphenol condensation products, measured by UPLC/MS, were found at levels up to 6 times more concentrated in the vials where acetaldehyde was added from the beginning.

In the second part of the chapter we tried to assess the proportion of H₂O₂ formed during wine oxidation, which in the absence of SO₂, is ultimately used in the oxidation of ethanol by the direct action of the Fenton reaction. To discern this, two aliquots from the same grape-extracted FFA, whose acetaldehyde consumption kinetics were previously extensively characterized, were oxidized under controlled conditions. Levels of acetaldehyde were

measured during the experiment. In addition, one of the aliquots of the FFA had been previously incubated with high levels (90 mg/L) of acetaldehyde to ensure a more limited capacity of consumption. Results revealed that in the first stages of the oxidation, corresponding to the consumption of the first 15 mg/L of O_2 , the proportion of ethanol actually oxidized, which will be noted as “ H_2O_2 CH_3CHO ” was lower than 13.7% in the original FFA. This implies that 86.3% of the H_2O_2 formed was actually used to oxidize other different wine metabolites. This fraction will be noted as “ H_2O_2 not CH_3CHO ” (**figure 9**). In the acetaldehyde incubated-FFA, these proportions were 45,3% and 54,7% for “ H_2O_2 CH_3CHO ” and “ H_2O_2 not CH_3CHO ”, respectively. In both cases, as the oxidation progresses, the percentage of H_2O_2 invested into the oxidation of alcohol (“ H_2O_2 CH_3CHO ”) increases steadily reaching figures close to 100% in the final periods, characterized by little O_2 remaining in the systems and hence, by very low O_2 consumption rates. In any case, during the periods in which the samples were consuming O_2 at rates not smaller than 0,6 mg/L per day, the proportion of “ H_2O_2 CH_3CHO ” was only 34,3% or 40,8%, with the original or acetaldehyde-incubated FFA, respectively. Consequently, in this period the “ H_2O_2 not CH_3CHO ” was between 65,7% and 59,2% (**figure 9**).

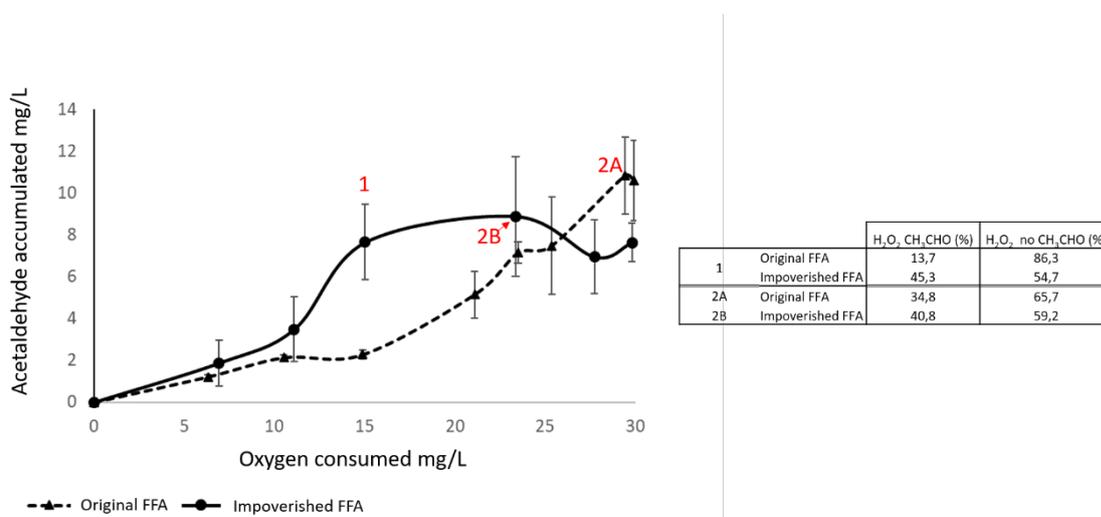


Figure 9. Evolution of acetaldehyde accumulated (mg/L) as a function of the amounts of O_2 consumed (mg/L). The imbibed table gives the % of “ H_2O_2 CH_3CHO ” and “ H_2O_2 not CH_3CHO ” estimated in the points labeled in red.

These data show that the FFAs contain enough cinnamic acids, and probably other antioxidant materials able to interfere with the Fenton reaction and importantly affect the final mass balances of wine oxidation in the absence of SO_2 . The interference on the Fenton process could take place by a reagent directly reacting with H_2O_2 , as can happen in the cases of H_2S and mercaptans, or by quenching the 1-HER radical, as it has been demonstrated to

occur with cinnamic acids [30]. Results also reveal that these mass balances are dependent on the rate of O_2 consumption and on the previous contact with acetaldehyde. From the scarce set of data analyzed, it seems that only at very low rates of O_2 consumption, the proportion of " H_2O_2 CH_3CHO " becomes predominant.

In the third part of the chapter the wine oxidation data studied in **chapter 3** are revisited in light of the mass balances for H_2O_2 , and using the different estimations obtained in **Chapter 6** for acetaldehyde consumption. Assuming that at 25°C, acetaldehyde will be most likely consumed at a constant rate of $0,43 \pm 0,04$ mg/L per day, it is possible to estimate the quantity of total acetaldehyde formed in each case and derive the fractions " H_2O_2 CH_3CHO " and " H_2O_2 not CH_3CHO ". These fractions were highly variable among aged wines for which " H_2O_2 CH_3CHO " values were as low as 8,85% and as high as 61,8%. On the other hand, in young wines they varied between 30,6 and 48,7%, values which are very similar to those obtained with the FFAs. This continues to confirm that the oxidation of alcohol is not the predominant process in the mass balances for the second reduction of O_2 in the absence of SO_2 .

The fourth and last question addressed in this chapter studies the effects that the normal sulfur compounds of wine may have on the accumulation of acetaldehyde. In this case, to avoid parasitic reactions between the mercaptans and quinones produced during oxidation, H_2O_2 was directly used. Results revealed that the presence of normal quantities of glutathione, cysteine, methionine and H_2S have a notable effect on the quantity of acetaldehyde accumulated, which was reduced by a 17%. This implies that about 10% of the H_2O_2 added was used in the oxidation of the sulfur compounds. Considering the quantities of the added sulfur compounds and the stoichiometric characteristics of the reactions, it can be hypothesized that H_2O_2 completely oxidizes wine mercaptans to their disulfide forms, that wine H_2S is oxidized to tetrasulfide and tetrasulfane forms (or even higher) and that up to 25% of wine methionine could have been oxidized to its sulfoxide. However, the assumption that in this process the oxidization of sulfur compounds proceeds to higher valence states, such as sulfone or sulfonate, can be discarded.

Now, analyzing the mass balance for H_2O_2 in the present experiment, in which this reagent was added all at once in concentrations highly improbable for wine, only 46,5% of the H_2O_2 was consumed following the Fenton scheme to produce acetaldehyde and other aldehydes. It can be estimated that approximately 8% of the H_2O_2 was consumed in the oxidation of cations and natural wine mercaptans, an additional 9,5% in the oxidation of added mercaptans which lefts and additional 30% which must have been used to oxidize

polyphenols (**figure 10**). It is expected that this proportion will be greater if the H_2O_2 had been added slower.

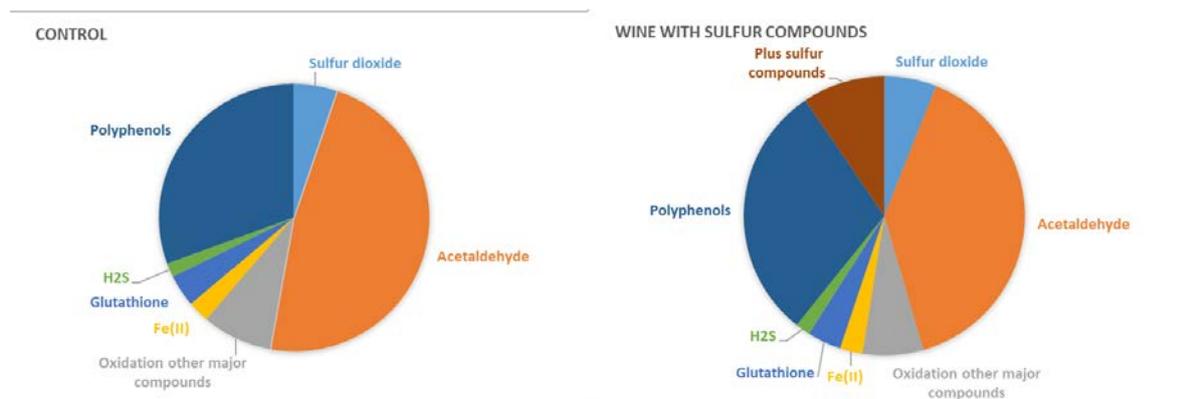


Figure 10. Comparison of the destination of the added peroxide (%) in the oxidation of red wine control and red wine with added sulfur compounds.

As a final conclusion, it has been demonstrated that the oxidation of ethanol is not the main fate for the H_2O_2 formed during wine oxidation in the absence of SO_2 , contrary to what was commonly believed to date. Such H_2O_2 oxidizes wine H_2S and natural mercaptans to disulfides and polysulfides, also an important proportion of other wine components, most likely polyphenols. Attending to current knowledge, the oxidation could take place directly, or indirectly by quenching the hydroxyethyl radical. In any case, these processes influence O_2 consumption rate and, of course, the mass balances of wine oxidation.

At this final time, it is mandatory to question about the reasons why anthocyanins and other polyphenols had such a conspicuous role in the models for the accumulation of acetaldehyde and Strecker aldehydes obtained in Chapter 2. It should be noted that what it was modelled in the case of acetaldehyde, was the fraction of unreacted acetaldehyde, which was estimated assuming that most " O_2 not SO_2 " went into acetaldehyde. It can be therefore hypothesized that the presence of polyphenols with negative coefficients in the models is simply because those polyphenols are readily being oxidized by H_2O_2 and, therefore, are consuming the " O_2 not SO_2 ". I.e.; in wines containing many anthocyanins there will be a much-limited formation of acetaldehyde during wine oxidation because most H_2O_2 oxidizes anthocyanins instead of ethanol. This explains the negative coefficients in the models for anthocyanins. The same reasons can also explain the case of Strecker aldehydes, whose accumulation rates were normalized by the " O_2 not SO_2 " consumed by the wine. Therefore, any compound consuming H_2O_2 is artificially lowering the accumulation rate and will

appear in the model with a negative coefficient. The demonstration of these hypothesis is left for other future works.

References

1. Ugliano, M., *Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(26): p. 6125-6136.
2. Boulton, R.B., et al., *Principles and practices of winemaking*. Beijing: China Light Industry Press., 2001(1): p. 15-27.
3. Cano-Lopez, M., et al., *Effect of micro-oxygenation on color and anthocyanin-related compounds of wines with different phenolic contents*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(14): p. 5932-5941.
4. Wirth, J., et al., *The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines*. Food Chemistry, 2010. **123**(1): p. 107-116.
5. Cejudo-Bastante, M.J., M.S. Pérez-Coello, and I. Hermosín-Gutiérrez, *Effect of wine micro-oxygenation treatment and storage period on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics*. LWT - Food Science and Technology, 2011. **44**(4): p. 866-874.
6. Heras, M.O., et al., *Changes in the volatile composition of red wines during aging in oak barrels due to microoxygenation treatment applied before malolactic fermentation*. European Food Research and Technology, 2008. **226**(6): p. 1485-1493.
7. Singleton, V.L. and T.E. Kramling, *BROWNING OF WHITE WINES AND AN ACCELERATED TEST FOR BROWNING CAPACITY*. American Journal of Enology and Viticulture, 1976. **27**(4): p. 157-160.
8. Ferreira, et al., *Key Changes in Wine Aroma Active Compounds during Bottle Storage of Spanish Red Wines under Different Oxygen Levels*. Journal of agricultural and food chemistry, 2014. **62**(41): p. 10015-27.
9. du Toit, W., et al., *Oxygen in Must and Wine: A review*. S. Afr. J. Enol. Vitic., 2006. **27**: p. 76-94.
10. Schneider, V., *Must hyperoxidation: A review*. American Journal of Enology and Viticulture, 1998. **49**(1): p. 65-73.
11. Elias, R.J., et al., *Identification of Free Radical Intermediates in Oxidized Wine Using Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(10): p. 4359-4365.
12. Waterhouse, A.L., G.L. Sacks, and D.W. Jeffery, *Understanding Wine Chemistry*. Understanding Wine Chemistry 2016, Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 1-443.
13. Danilewicz, J.C., *Reactions Involving Iron in Mediating Catechol Oxidation in Model Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2013. **64**(3): p. 316-324.
14. Danilewicz, J.C., *Reactions Involving Iron in Mediating Catechol Oxidation in Model Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2013.

15. de Azevedo, L.C., et al., *Evaluation of the formation and stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(21): p. 8670-8680.
16. Timberlake, C.F. and P. Bridle, *INTERACTIONS BETWEEN ANTHOCYANINS, PHENOLIC COMPOUNDS, AND ACETALDEHYDE AND THEIR SIGNIFICANCE IN RED WINES*. American Journal of Enology and Viticulture, 1976. **27**(3): p. 97-105.
17. Bakker, J., et al., *Identification of an anthocyanin occurring in some red wines*. Phytochemistry, 1997. **44**(7): p. 1375-1382.
18. Peterson, A.L. and A.L. Waterhouse, *H-1 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**(36): p. 6869-6878.
19. Escudero, A., et al., *Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 4268-4272.
20. Strecker, A., *On a peculiar oxidation by alloxan*. Justus Liebigs Annalen der Chemie 1862. **123**: p. 363-367.
21. Rizzi, G.P., *The strecker degradation of amino acids: Newer avenues for flavor formation*. Food Reviews International, 2008. **24**(4): p. 416-435.
22. Saijō, R. and T. Takeo, *The Formation of Aldehydes from Amino Acids by Tea Leaves Extracts*. Agricultural and Biological Chemistry, 1970. **34**(2): p. 227-233.
23. Bueno, M., J. Zapata, and V. Ferreira, *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**: p. 33-42.
24. Bueno, M., V. Carrascón, and V. Ferreira, *Release and Formation of Oxidation-Related Aldehydes during Wine Oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(3): p. 608-617.
25. Carrascón, V., *Tesis doctoral titulada "Caracterización de los procesos químicos asociados a la oxidación del vino" Directores: V. Ferreira y P. Fernandez-Zurbano*. 08-05-2017.
26. Bueno, M. *Tesis Doctoral titulada "Estrategias analíticas para la determinación de compuestos carbonílicos. Nuevos avances en la comprensión de los procesos de oxidación en carne de cordero y vino" Directores: V. Ferreira y A. Escudero*. 02-2016.
27. Marrufo-Curtido, A., et al., *A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines and some observations about the influence of wine initial chemical composition*. Food Chemistry, 2018. **248**: p. 37-45.
28. Bueno, M., et al., *Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation*. Frontiers in Chemistry, 2018. **6**.

29. Ferreira, et al., *Oxygen Consumption by Red Wines. Part I: Consumption Rates, Relationship with Chemical Composition, and Role of SO₂*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015. **63**(51): p. 10928-10937.
30. Gislason, N.E., B.L. Currie, and A.L. Waterhouse, *Novel Antioxidant Reactions of Cinnamates in Wine*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. **59**(11): p. 6221-6226.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Oxígeno y enología

El oxígeno es una pieza clave en la elaboración de vinos de calidad [1]. Desde el momento de vendimia hasta las etapas postfermentativas se extreman los cuidados frente a los procesos de oxidación. En las primeras etapas de la vinificación, cuando estamos tratando con el mosto, tiene lugar la oxidación enzimática. Las enzimas causantes son las polifenol oxidasas (laccasa y peroxidasa) [2] y están presentes en las partes sólidas de la uva, es decir en la piel de la uva u hollejo. Este tipo de oxidaciones son muy rápidas, ya que una vez que las enzimas entran en contacto con los polifenoles el proceso puede darse en minutos u horas. Es por ello, que en el transporte de la uva al lagar, se usen camiones refrigerados o sistemas de inyección de gases inertes como el nitrógeno, sobre todo para variedades blancas muy sensibles a la oxidación. La oxidación química es un proceso más lento y se ha descrito mayoritariamente en vinos terminados, aunque las últimas investigaciones indican la generación de aldehídos de oxidación en la fermentación alcohólica [3]. El pH, la temperatura y la concentración de sustancias antioxidantes como el sulfuroso o el ácido ascórbico influyen directamente en ambas oxidaciones [4] y se explicará detenidamente más adelante.

Cualquier exposición excesiva al oxígeno puede influir negativamente en el color (evolución del color hacia amarillos y marrones) [5] y un detrimento en el aroma debido a la acumulación de aldehídos de Strecker y acetaldehído (notas rancias, miel y patata cocida) [1, 6]. Mantener el vino en condiciones muy anóxicas puede suponer en la elaboración paradas fermentativas [7] y en vinos terminados, la aparición de compuestos de reducción (notas a huevos podridos, ajos y coliflor) [8]. Sin embargo, a lo largo de la vida de un vino es necesario que los mismos tengan contacto con el oxígeno de forma controlada; ya que estas exposiciones moderadas ayudan a estabilizar el color [9-11] y equilibran las sensaciones de astringencia y amargor [12]. Desde el punto de vista aromático pueden disminuir los aromas verdes o vegetales [12, 13].

La mayoría de las prácticas enológicas llevadas a cabo en bodega implican contacto con el oxígeno. Durante la fermentación se puede exponer a los vinos a dosis comprendidas entre 5 y 20 mg/L de oxígeno [14, 15], este aporte favorece por ejemplo la rápida conversión del ácido málico en láctico y evita paradas fermentativas ya que existe una apropiada síntesis de lípidos [4]. La filtración puede aportar al vino entre 2 y 7 mg/L de oxígeno, y la centrifugación, algo más, 8 mg/L de oxígeno. El aporte de oxígeno que implica el envejecimiento del vino en barricas de madera está entre 20 y 45 mg/L/año [7, 16]. Una

técnica muy usada en las bodegas actualmente es la microoxigenación. Se basa en aplicar dosis controladas de oxígeno entre 2 y 15 mg/L/mes [17] en depósitos de acero inoxidable después de la fermentación maloláctica. Hay estudios que evidencian que con la microoxigenación se consiguen obtener parte de los efectos positivos del envejecimiento en barrica (estructura polifenólica y aroma) en mucho menos tiempo [10, 17, 18]. Durante el embotellado se puede aportar entre 1 y 9 mg/L de oxígeno y la conservación en botella expone al vino a dosis de entre 0,005 y 5 mg/L/año dependiendo del tipo de cierre (screw cap < corcho sintético < corcho micro granulado < corcho natural) [4, 19].

Determinar el oxígeno necesario para elaborar un vino, de forma que se minimicen todos los efectos negativos y se consiga obtener un vino de calidad máxima no es fácil; porque depende de muchos factores como el pH y la composición química. El momento óptimo de aplicación también es un tema bajo discusión.

La calidad de algunos vinos decae prematuramente debido al desarrollo de notas de aroma a oxidación. Estas notas pueden aparecer incluso antes de que se deteriore el color del vino. Los responsables de estas notas son los aldehídos de Strecker y el acetaldehído. La presente tesis tiene como objetivo entender los procesos de oxidación y los patrones que determinan la acumulación de aldehídos. Nos centraremos en la oxidación química y en estudiar las variables que afectan a la formación, reacción y acumulación de los aldehídos de Strecker y acetaldehído.

2. La química del oxígeno

Una reacción de oxidación implica la liberación de electrones y el aumento del estado de oxidación de un átomo o compuesto. También supone la adición de oxígeno y/o una pérdida de hidrógeno. Como en todo par redox, la reacción opuesta es la reacción de reducción, donde se ganan electrones y se disminuye el estado de oxidación. En este caso se pierden enlaces covalentes con el oxígeno y se aumentan el número de hidrógenos [2].

La tendencia de los compuestos a ser oxidados o reducidos está definida por su potencial de reducción, E . Desde el punto de vista termodinámico, todo par redox con un potencial de reducción menor al de O_2 / H_2O (1,00 V a pH 3,5) tendería a oxidarse. Atendiendo exclusivamente a los valores de potencial redox, esta afirmación implicaría que todos los sulfitos (HSO_3^-) ($E_{SO_4^{2-}/HSO_3^-} = -0,6$ V a pH 3,5) deben convertirse a sulfato (SO_4^{2-}) antes de que los orto-difenoles ($E_{quinona/o-difenol} = 0,6$ V a pH 3,5) se oxiden hasta quinonas, hecho que no se sustenta con el ciclo de oxidación aceptado [20]. Por ello, además del estudio termodinámico, es necesario un análisis de la cinética de reacción y entender correctamente

los mecanismos de oxidación para poder predecir el orden de las reacciones que tendrán lugar [2].

El oxígeno en su estado fundamental de mínima energía tiene la configuración electrónica de triplete, con dos electrones desapareados. Su reactividad está por tanto limitada, porque sólo puede aceptar electrones de uno en uno y solo lo consigue interaccionando con metales de transición y radicales libres. Debido a esta configuración electrónica, el oxígeno molecular no puede reaccionar directamente con el material polifenólico o el sulfuroso ya que tienen todos sus electrones apareados [21, 22]. El oxígeno en su estado singlete sería mucho más reactivo e inestable, este estado se podría conseguir empleando luz ultravioleta o pigmentos fotoexcitados. Sin embargo, a efectos prácticos es poco probable que se produzca en vino, ya que los polifenoles y carotenoides lo eliminarían con facilidad [2, 21].

La molécula de oxígeno (estado de oxidación cero) conforme oxida, se reduce (va aceptando electrones de los cationes metálicos que hay en disolución Fe^{2+}) y va pasando por diferentes estados de oxidación. Durante este proceso se van formando radicales libres de alta reactividad que se conocen como "ROS" (en inglés *Reactive Oxygen Species*). A continuación se detallan las reacciones de reducción del oxígeno [23] (ver **figura 1**):

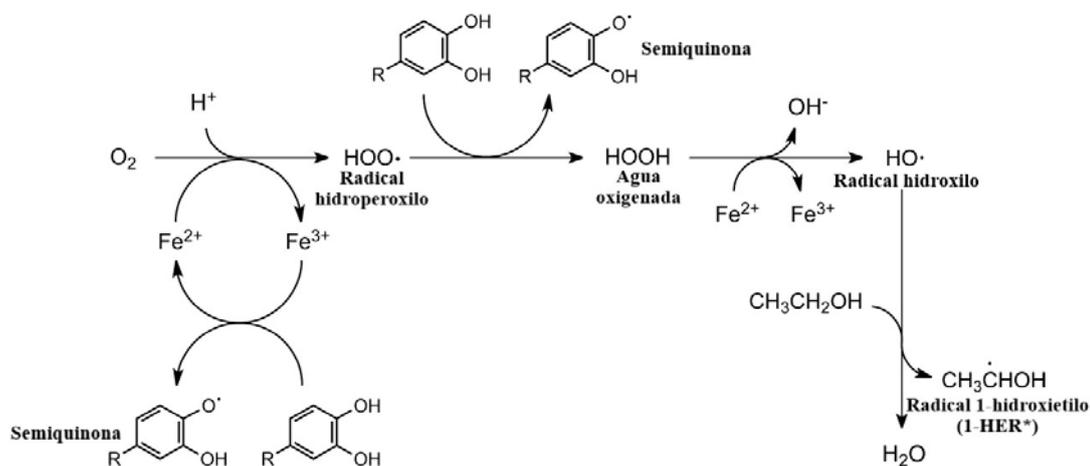


Figura 1. Reacciones de reducción del oxígeno en vino. Principales radicales implicados en el ciclo de oxidación. Figura adaptada de la referencia [24].

1. Al aceptar un primer electrón la reactividad aumenta de forma notable, se obtiene en este paso el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Tiene en este momento un solo electrón desapareado y al pH del vino el radical está protonado en forma de radical hidroperoxilo (HO_2^{\bullet}) [21]. Este radical juega un papel muy importante

en la oxidación de los vinos porque es el responsable de oxidar los ortodifenoles a quinonas [20, 21].

2. El radical hidroperoxilo (HO_2^{\bullet}) puede aceptar un electrón más y se produce el peróxido (O_2^{2-}), que en el vino estaría protonado en forma de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (estado de oxidación -1).
3. El agua oxigenada (H_2O_2) puede seguir reduciéndose hasta formar el radical hidroxilo (HO^{\bullet}). Este radical es extremadamente reactivo y es el encargado de iniciar la reacción de Fenton. El radical hidroxilo actúa por difusión, es decir, reacciona con las especies oxidables del medio en función de la concentración [25].
4. Por último, el radical hidroxilo se reduce hasta dar lugar al anión hidróxido (OH^-), que a pH 3,5 se protona dando lugar a agua (estado de oxidación -2). El agua (H_2O) es el producto final de la reducción del oxígeno.

3. El papel de los metales en la oxidación del vino

La baya de uva es la fuente principal de los metales en el vino, la uva puede incorporar metales del suelo, del riego, del ecosistema (viñedos cercanos a la costa) y de las prácticas vitivinícolas que incluyan el uso de fertilizantes, fungicidas o pesticidas. A lo largo de la vinificación la concentración de metales puede aumentar debido al contacto directo con algunos depósitos de acero inoxidable o por el uso de agentes clarificantes o estabilizantes de potasio o sodio (como el metabisulfito (adición de SO_2)) [2].

Independientemente del origen, el vino tiene una alta diversidad de cationes metálicos en disolución: potasio (K) es el metal mayoritario en el vino, hierro (Fe), sodio (Na), cobre (Cu), calcio (Ca), magnesio (Mg), aluminio (Al), manganeso (Mn) y zinc (Zn) [2]. Sus homólogos inorgánicos cargados negativamente (aniones) incluyen fosfato, sulfato/sulfito, nitrato, bromuro y cloruro, haciendo que el contenido mineral de los vinos esté comprendido entre 1,5-3 g/L.

El hecho de que el oxígeno no pueda reaccionar directamente con los componentes del vino otorga a los metales de transición un papel fundamental en la oxidación [26, 27]. El hierro (Fe^{2+}) y el cobre (Cu^+) en sus estados reducidos son los principales catalizadores de la oxidación y en menor medida también el manganeso. El manganeso no influye directamente en el ciclo de oxidación, sino que presenta un efecto sinérgico con el resto de metales, es decir, su acción catalítica depende sobre todo de la concentración de hierro y cobre en el vino [28, 29]. Como hemos comentado anteriormente, durante la oxidación del vino, el

oxígeno se irá reduciendo tomando electrones de los pares $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ y $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$, hasta llegar a agua. Una vez oxidado el metal, el estado reducido se regenera a través del ciclo redox por medio de los polifenoles, permitiendo que el mecanismo de oxidación continúe. En el apartado siguiente se explica el mecanismo de oxidación dónde participan los metales.

Hay que tener en cuenta que cuando un vino está resguardado del aire un tiempo, todo el hierro está en su estado reducido o ferroso Fe (II) $E_{3,5}$ (25 °C) $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} = 0,77$ V, porque existen en el vino agentes más reductores, como por ejemplo $E_{3,5}$ (25 °C) $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+ = 0,15$ V [2].

La reactividad del Fe (II) hacia el oxígeno está determinada por el potencial redox de la pareja Fe (III) /Fe (II), que en condiciones estándares es $E_0 = 0,77$ V. Sin embargo, este potencial de reducción puede verse alterado por que el hierro se puede acomplejar con diferentes compuestos como vemos a continuación:

1. El ácido tartárico (ácido mayoritario del vino) acompleja al Fe (III) haciendo que el potencial redox Fe (III) /Fe (II) disminuya hasta 0,34 V. Bajo estas condiciones está favorecido el hierro en su forma oxidada Fe (III) y la generación de agua oxigenada, aumentando por tanto la velocidad de oxidación [30-32]. Sin embargo, la disminución en el potencial de reducción de Fe (III)/Fe (II) provocada por la quelación de tartrato de Fe (III) impide la oxidación directa de o-difenoles a quinonas catalizada por Fe (III), desfavoreciendo la oxidación. Este efecto puede ser contrarrestado por la presencia de fuertes quelantes de Fe (II), lo que devuelve el potencial redox más cercano al valor de referencia [33].
La quelación del Fe (III) por el ácido tartárico tendrá especial relevancia en los vinos blancos, ya que en este tipo de vinos la concentración de ácidos (málico y tartárico) está en exceso frente a los polifenoles.
2. Además hay ligandos que incrementan la reactividad de la reacción de Fenton por aumentar la solubilidad del Fe (II) y Fe (III) [34].
3. Algunos autores han expuesto que los polifenoles pueden ser agentes quelantes de los metales de transición modificando por tanto la reactividad del sistema Fenton [2, 35]. Se han descrito dos tipos de comportamiento: pro y antioxidante en función de la especiación del metal y el pH [31, 36, 37].

Desde el punto de vista cuantitativo, el hierro suele estar en concentraciones máximas de 5 mg/L (aunque no está reglado), el cobre sin embargo, está presente entre 0,2 y 5 mg/L dependiendo del país [38].

4. Primeras etapas del mecanismo de oxidación del vino

El primer paso del mecanismo (**figura 2**) es la activación del oxígeno, para ello el oxígeno reacciona con un complejo binuclear de Fe-Cu, que actúa como catalizador del consumo de oxígeno [22, 39]. En este momento, el Fe (II) se oxida a Fe (III) y el oxígeno se reduce hasta la formación del radical hidroperoxilo (HO_2^\bullet). El Fe (III) formado puede oxidar a los ortodifenoles y se obtiene en primer lugar un intermedio "Fe (III)- catecolato" que se descompone después en una especie radical denominada semiquinona (HQ^\bullet) y Fe (II). En este punto el mecanismo puede verse ligeramente modificado en los vinos blancos, por competencia de los ácidos y los polifenoles a reaccionar con el Fe (III).

Para la evolución de la semiquinona (HQ^\bullet) se han propuesto dos vías: a) que la semiquinona reaccione con Fe (III) obteniéndose la quinona y Fe (II) [40], o b) dada la inestabilidad de la semiquinona, se produzca una dismutación que dé lugar a la quinona y al o-difenol reducido [23].

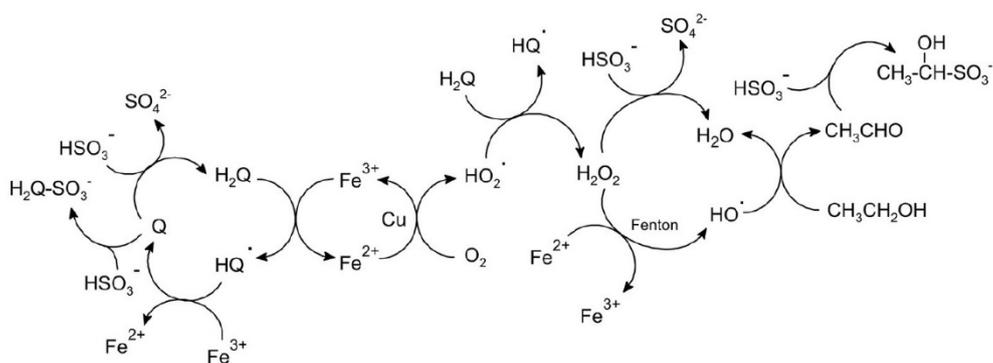


Figura 2. Mecanismo de oxidación en vinos con sulfuroso. Figura de la referencia [41].

Para el siguiente paso: la reducción de (HO_2^\bullet) a H_2O_2 , hay dos posibles rutas. La primera defiende que es el Fe (II) el que continúa siendo el agente reductor [20] y la segunda opción sería que el grupo catecol (orto-dihidroxibenceno) y pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno) de los polifenoles son los que reaccionan con los radicales hidroperoxilo (HO_2^\bullet) [23]. Es decir, la catequina, epicatequina, galocatequina, ácido gálico y sus ésteres y el ácido cafeico son los polifenoles que se oxidarán con facilidad [42, 43]. Otros compuestos polifenólicos como la malvidina, el ácido *para*-cumárico y el resveratrol, se oxidarán a potenciales mayores [44]. Danilewicz propuso en 2013 que los radicales hidroperoxilo (HO_2^\bullet) no llegan a formarse y que lo que se forma es un complejo $[\text{Fe}^{(III)} - \text{O}_2^\bullet]^{2+}$ que reacciona con el Fe(II) y se descompone en H_2O_2 y Fe (III) [20]. Los últimos avances en el mecanismo de oxidación para vinos blancos proponen que la semiquinona se oxida hasta quinona, mientras que el

oxígeno es reducido hasta el radical hidroperoxilo ($\text{HO}_2\cdot$) el cual dismuta para formar agua oxigenada [45].

5. Reacción de Fenton

El agua oxigenada formada en el ciclo de oxidación interviene principalmente en dos reacciones: la reacción con el ion metabisulfito (HSO_3^-) y la reacción de Fenton.

1. El peróxido de hidrógeno reacciona de manera directa con el sulfuroso (en forma de ion bisulfito HSO_3^-); el agua oxigenada se reduce hasta agua y el ion metabisulfito se oxida hasta sulfato [46]. Algunos autores han defendido que para que se inicie la reacción de Fenton es necesario que no exista sulfuroso en el medio [20] o quede muy poca concentración [2]. Sin embargo, Elias y col, determinaron en 2009 radicales hidroxilo en la oxidación de vinos con 15 mg/L de SO_2 total [25].

2. La reacción de Fenton (figura 3):

A bajos niveles de sulfuroso el peróxido de hidrógeno forma radicales hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) en una reacción catalizada por Fe (II) [2]. El radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) es extremadamente reactivo y puede interaccionar con todos los sustratos susceptibles de oxidación, en reacciones no selectivas [47]. Actúa por difusión, es decir, abstrae hidrógenos de las primeras especies que encuentra en función de su concentración, así reaccionará preferentemente con los compuestos mayoritarios del vino. Teniendo en cuenta que el etanol representa más del 85 % de la materia orgánica del vino, uno de los principales productos de oxidación será el acetaldehído [20]. Elias y col, determinaron en 2009 que el radical hidroxilo abstrae un hidrógeno del etanol y forma preferentemente el radical 1-hidroxietilo (1-HER \cdot) en un 85 % (**figura 3**), que posteriormente puede ser oxidado por Fe (III), oxígeno, semiquinonas o quinonas hasta formar acetaldehído. El 15 % del agua oxigenada restante oxidaría otros compuestos mayoritarios como el ácido tartárico, glicerol o polifenoles. Aunque en la oxidación de soluciones etanólicas acidificadas también se ha cuantificado el radical 2-hidroxietilo (2-HER \cdot) con un rendimiento del 13 % [21, 48], nunca se ha encontrado este radical al oxidar vinos o muestras sintéticas vínicas [25, 33]. Por lo que se puede asumir que el radical 1-hidroxietilo (1-HER \cdot) es el radical mayoritario y el producto mayoritario encontrado en la oxidación [33, 49].

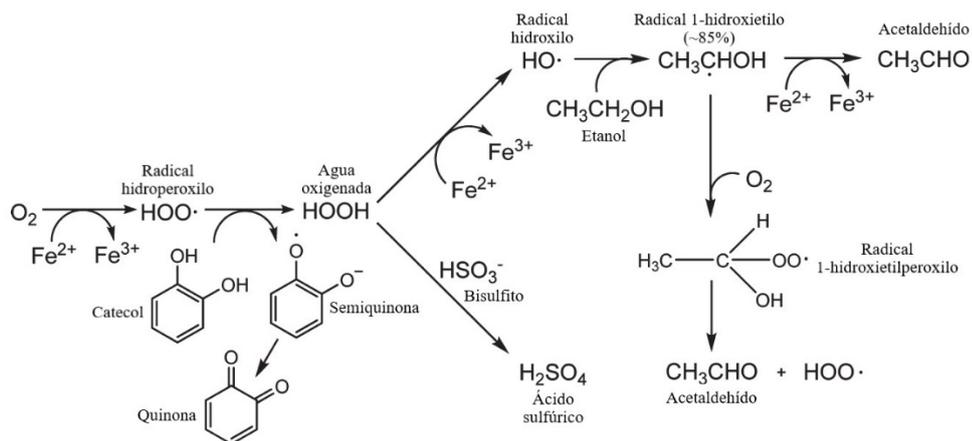


Figura 3. Reacción de Fenton. Figura adaptada de la referencia [25].

3. Consumo de oxígeno durante la reacción de Fenton:

Se ha propuesto que el consumo de oxígeno se acelera durante la reacción de Fenton [20, 33], ya que el oxígeno reaccionaría con el radical 1-hidroxietilo (1-HER \cdot) con la formación muy favorecida del radical hidroxietilperoxilo (figura 4) [21, 33], y que de manera más lenta se descompone para formar acetaldehído y radicales hidropéroxilo [21]. La entrada del oxígeno en este punto del ciclo es factible, ya que la reacción con el radical 1-hidroxietilo supone el intercambio de un solo electrón, lo que permite superar el estado triplete que es termodinámicamente desfavorable (apartado 2).

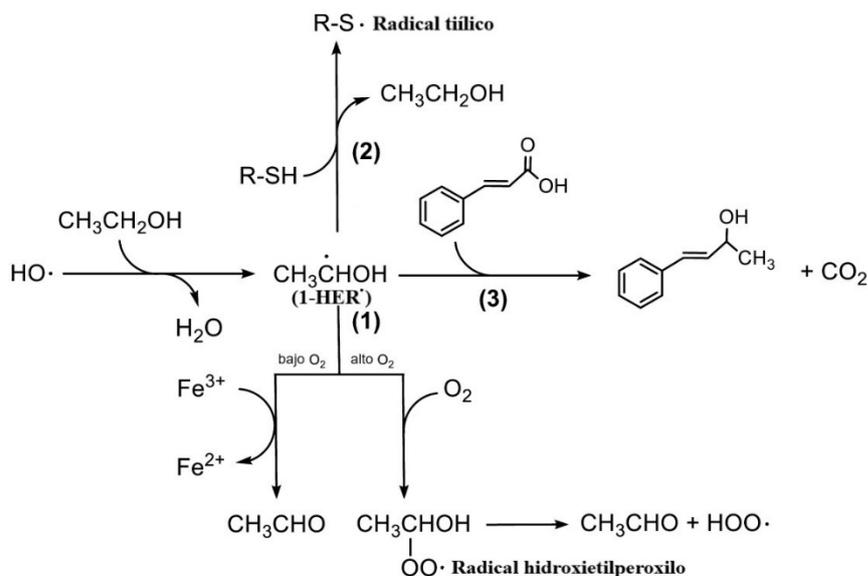


Figura 4. Reacción de Fenton bajo diferentes niveles de oxígeno. Figura adaptada de la referencia [50].

4. Reactividad de los radicales formados en la reacción de Fenton:

- a. Todos los compuestos hidroxilados saturados, además de los α -hidroxiácidos (ácido tartárico) son susceptibles de la reacción de Fenton (reaccionar con el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$)). Algunos ejemplos recogidos de bibliografía son: el glicerol (5-20 g/L)[51], los compuestos polifenólicos (1-3 g/L) y el ácido tartárico (5g/L), para obtenerse gliceraldehído, quinonas y ácido glicoxílico respectivamente [25, 45, 51, 52]. Aunque hay autores que han descrito que los aldehídos y las quinonas son los principales productos de la oxidación (los radicales hidroxilos oxidarían el metionol o el feniletanol para formar metional [53] y fenilacetaldehído [54]); la reacción de Fenton no sería la vía principal de la formación de aldehídos de Strecker, cobrando más relevancia la degradación de Strecker a partir de sus aminoácidos precursores y compuestos α -dicarbonílicos [41]. Desde el punto de vista sensorial, el metional y el fenilacetaldehído junto con el acetaldehído son compuestos clave de los aromas en vinos oxidados [6].
- b. El radical 1-hidroxietilo ($1\text{-HER}\cdot$) puede oxidarse hasta formar acetaldehído, pero también puede reaccionar con otras especies como **(figura 4)**:
 - i. Los tioles (hasta la formación de disulfuros), inhibiendo un 2% la formación de acetaldehído[55].
 - ii. Ácidos hidroxicinámicos para formar primero un radical bencilo que en presencia de Fe (III) forma finalmente el correspondiente alcohol alílico [55]. Se ha comprobado en matrices sintéticas que la presencia de ácidos hidroxicinámicos inhibe la formación de acetaldehído hasta un 30 % [56].

6. Los polifenoles en el vino

Los polifenoles representan uno de los grupos de compuestos mayoritarios del vino. El contenido total de polifenoles depende del tipo de vino; de manera general los vinos blancos cuentan aproximadamente con 200 mg/L de unidades equivalentes de ácido gálico (GAEs) frente a los 2000-3500 mg/L de tintos [2]. Desde el punto de vista químico, los polifenoles son compuestos con al menos un anillo bencénico y uno o más grupos hidroxilo. Se clasifican según su tamaño y complejidad:

- a) Los polifenoles no – flavonoides son compuestos pequeños y simples y agrupan varias familias como los ácidos benzoicos, los ácidos cinámicos y estilbenos. Se encuentran principalmente en la pulpa de la uva.
- b) Los polifenoles flavonoides: estos polifenoles se concentran en el hollejo (piel de la baya de uva), pepitas y raspones del racimo. Tienen una estructura más compleja basada en dos anillos bencénicos (anillos A y B) y un tercer heterociclo con un oxígeno (anillo C) fusionado al anillo A [57]. El anillo C tiene diferentes estados de oxidación y sustituyentes que definen las diferentes clases de flavonoides [2].

i. Flavan-3-oles: Es la clase más abundante de los flavonoides. El término “flavan” indica que el anillo C está saturado y el “3-ol” significa que hay un grupo hidroxilo en la posición 3 [2]. Dentro de esta categoría están las catequinas monoméricas, pero la mayoría se encuentra en forma de proantocianidinas (PAs) oligoméricas y poliméricas o taninos condensados presentes en las semillas y hollejos. Esta distribución en la baya hace las PAs estén mayoritariamente en los tintos y casi no se encuentren en los vinos blancos.

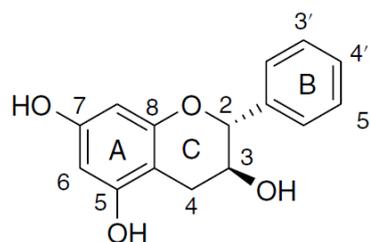


Figura 5. Patrón de anillos para los Flavan-3-oles. Figura adaptada de la referencia [2].

En función del grado de hidroxilación del anillo B, se distinguen dos tipos de PAs: procianidinas formadas principalmente por catequina y epicatequina, y prodelfinidinas formadas principalmente por unidades de galocatequina y epigalocatequina.

En el vino también se pueden encontrar taninos hidrolizables, pero éstos no provienen de la uva. Se extraen de la madera durante la crianza en barrica o se añaden al vino como aditivo. Pueden ser galotaninos o elagitaninos dependiendo si es la hidrólisis se produce ácido gálico o elágico.

ii. Flavonoles: tienen un grupo *ceto* en la posición 4 y una insaturación entre el carbono 2 y carbono 3 (una flavona) y un grupo hidroxilo en el carbono 3. Están en el hollejo de la uva.

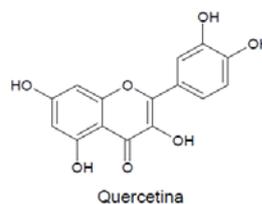


Figura 6. Quercetina como ejemplo de los flavonoles. Figura adaptada de la referencia [2].

iii. Antocianos: se caracterizan por estar cargados positivamente. Son los principales responsables del color de los vinos tintos, se encuentran en el hollejo. El antociano mayoritario es la malvidina-3-*O*-glucósido.

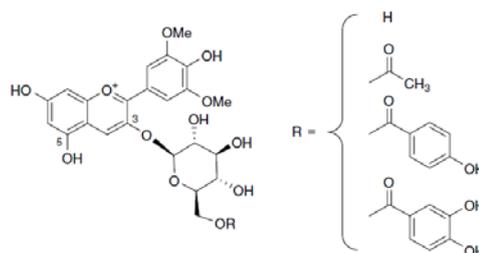


Figura 7. Malvidina como ejemplo de antocianos. R= H (Malvidina 3-glucósido) Figura adaptada de la referencia [2].

7. La implicación de los polifenoles en la oxidación

Los polifenoles están entre los compuestos más reductores que se encuentran en el vino, y por ello son los principales sustratos de la oxidación ($E_{\text{quinona/catecol}}(\text{pH}_{3,5})=0,6 \text{ V}$). Aunque los ortodifenoles juegan un papel esencial en la oxidación, no son los que impulsan la oxidación; esto se debe a que el potencial redox $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{O}_2$ a pH 3,5 es menor (0,45 V). Atendiendo a estos valores de potencial redox, podemos decir:

- La fuerza que conduce la oxidación y el aceptor de los electrones de las compuestos que se oxidan es el oxígeno [2].
- Atendiendo a los valores de potencial redox a pH del vino el equilibrio quinona/difenol estaría fuertemente desplazado hacia el 1,2-difenol, por ello sólo se produciría una pequeña oxidación a menos haya algún nucleófilo disponible para consumir la quinona. Es decir, el consumo de la quinona por nucleófilos y la aplicación del principio de Le Chatelier es lo que permite el consumo de oxígeno[58].

Además, los polifenoles (o-difenoles) son los encargados de quelar el Fe (III) y reducirlo a Fe (II), favoreciendo así la continuación de su ciclo catalítico [38], también son capaces de reaccionar con radicales libres como ($\text{HO}_2\cdot$) o los radicales procedentes de la oxidación del sulfuroso, sobre todo el ($\text{SO}_5^{\cdot-}$).

Los principales cambios en la composición polifenólica asociados al envejecimiento oxidativo y la conservación en botella son:

- a) disminución de los antocianos libres y totales, así como los flavanoles [59-61]
- b) aumento de los ácidos hidroxicinámicos, proantocianidinas (polímeros más pequeños formados por flavanoles) y pigmentos poliméricos [60, 62, 63]
- c) formación de flavanoles sulfonados (resultado de la reacción de catequinas y proantocianidinas con bisulfito)
- d) hidrólisis de flavonoles glicosilados [61].

Los flavanoles (T) y antocianos (A) se pueden polimerizar directamente (T-T), (A-A), (A-T) y (T-A), o por medio de un puente de etilo (acetaldehído) [40, 64]. Conforme se van condensando los polifenoles (mediados por acetaldehído o directamente) su potencial redox es menor que el de su ortodifenol original [42], por ello con cada fenol que se incorpora al polímero, se favorece más la condensación [43]. También se ha descrito que durante la oxidación del vino se pueden formar el enlace “*carboxi methine* (CH-COOH)” entre dos catequinas, como producto de oxidación del ácido tartárico [65]. Los antocianos monoméricos (A) (pigmentos rojos) se encuentran en altas concentraciones en la uva y van disminuyendo en los procesos de elaboración y envejecimiento, debido a reacciones de degradación hasta ácidos fenólicos y a otros compuestos de diferentes tonalidades (incolores, amarillos y marrones). Los antocianos pueden sufrir reacciones de cicloadición con acetaldehído y ácido pirúvico para obtenerse piroantocianos [66, 67]. En general, los pigmentos derivados de los antocianos son más resistentes a los cambios de pH y a la decoloración por el bisulfito que los antocianos precursores, haciendo que se establezca el color de los vinos [11, 60, 68].

8. Las principales reacciones de las quinonas

Las quinonas formadas en la oxidación de los polifenoles son especies inestables que tienden a reaccionar con otras y polimerizarse [43]. Tienen un fuerte carácter electrófilo (las dos posiciones que sustentan el carbonilo); por ello son capaces de reaccionar de forma espontánea con los nucleófilos, asegurando la continuación del ciclo de oxidación [2]. Las dos reacciones que siguen son:

- a) Reacción con los nucleófilos presentes en el vino [69] : polifenoles, ácido ascórbico, sulfuroso y tioles (ácido sulfhídrico, glutatión, cisteína), por reacción de condensación o adición nucleófila [2, 69].
- b) Las quinonas reaccionan con sulfuroso y ácido ascórbico que actúan como agentes reductores obteniéndose el difenol original [2]. El sulfuroso además puede protagonizar reacciones de condensación hasta formar el aducto sulfonato [2].

Una de las principales reacciones de las quinonas es la interacción con los polifenoles. Están tanto más favorecidas cuánto más nucleófilo sea el fenol, por ejemplo el floroglucinol (que se encuentra en el anillo A de los flavanoles) puede atacar desde los carbonos 6 y 8 a las quinonas en sus posición 5, de forma que los polímeros resultantes son del tipo C₆-C₅ y C₈-C₅ [2]. Estos polímeros quinona-difenol son distintos a los encontrados de forma natural en las uvas (C₄-C₈ y C₄-C₆ o C₅-C₂ y C₇-C₂) y no pueden ser hidrolizados en medio ácido, de forma que podrían ser usados como marcadores de oxidación [70]. Los dímeros o polímeros producidos pueden reorganizar su estructura a través de una conversión enol hasta formar nuevos dihidroxibencenos [71]. Éstos dímeros o polímeros tienen potenciales redox más bajos que sus fenoles iniciales y por ello se oxidan más fácilmente [42, 71]. Se propone que la oxidación de estos productos dé como resultado una aceleración del proceso de polimerización [72]. La reacción de las quinonas con otros polifenoles está también muy correlacionada con procesos de pardeamiento enzimático. Este proceso se observa en mostos cuando se forman las quinonas de los hidroxicinamatos por la acción de las enzimas polifenoloxidasas (PPO). La consecuencia directa del pardeamiento es un aumento de la absorbancia a longitudes de onda de 420 nm (tonos amarillos) [2, 73].

La reacción de los tioles con las quinonas es muy rápida, en ella se regenera el o-difenol pero con un nuevo sustituyente (-SR), lo cual influye en la reactividad del mismo (menor potencial para producir pardeamiento) [23]. El glutatión es el tiol mayoritario de los vinos (40 mg/L), seguido de la metionina (30 mg/L), cisteína (10 mg/L) y el ácido sulfhídrico (0,5 mg/L) [41, 74-76]. En una concentración mucho menor (ng/L) están el 3-mercaptohexanol y la 4-metil-4-mercaptopentanona, pero su pérdida implica la pérdida del carácter varietal de los vinos y consigo una disminución de la calidad de los mismos [2]. El GRP del inglés (*grape reaction product*) es un aducto tiol-quinona fácil de encontrar en los vinos, se forma por la reacción de la quinona del ácido caftárico (oxidación enzimática) y el glutatión [2].

9. Los antioxidantes del vino: dióxido de azufre y ácido ascórbico

El dióxido de azufre (SO₂)

El sulfuroso o dióxido de azufre es uno de los aditivos más usados en enología debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. A pH del vino, el sulfuroso se presenta mayoritariamente como ion bisulfito (HSO₃⁻). A continuación se detallan las principales funciones del sulfuroso en el vino [2]:

- a) Nucleófilo: el ion bisulfito (HSO₃⁻) puede formar enlaces covalentes con aldehídos y otros compuestos electrófilos como las quinonas.
- b) Agente reductor/ antioxidante: el sulfuroso es uno de los compuestos más reductores encontrados en el vino ($E \text{ SO}_4^{2-} / \text{HSO}_3^- \text{ pH } 3,5 = -0,6\text{V}$).
- c) Desactivación enzimática: el ion metabisulfito puede inhibir la actividad de muchas enzimas como la polifenoloxidasasa (PPO), disminuyendo la velocidad de pardeamiento de los mostos.
- d) Antimicrobiana: el sulfuroso molecular (SO₂) inhibe el crecimiento de levaduras y bacterias.

Aunque se ha documentado que el sulfuroso puede producir procesos de autoxidación generando una serie de radicales altamente reactivos (capaces de dejar al vino desprotegido frente a la oxidación y formar acetaldehído); se ha comprobado que los polifenoles eliminarán todos los radicales libres reactivos procedentes de ese proceso. Es decir, los polifenoles aseguran que el papel oxidativo del sulfuroso no sea viable en el vino real [28].

El sulfuroso participa activamente en el ciclo de oxidación, una de sus principales funciones como antioxidante es la eliminación del agua oxigenada formada durante la oxidación de los polifenoles [28], evitando la reacción de Fenton e inhibiendo la formación de acetaldehído. Elias y col, determinaron radicales hidroxietilo (1-HER•) en la oxidación de vinos con 15 mg/L de SO₂ total [25], poniendo de manifiesto que cierta formación de acetaldehído podría convivir con la presencia de sulfuroso en la muestra.

Es decir, los efectos antioxidantes del sulfuroso y los polifenoles se complementan: el sulfuroso es necesario para eliminar el producto de la oxidación de los polifenoles (agua oxigenada) y los polifenoles son los responsables de la eliminación los radicales oxidantes de la autoxidación del sulfuroso [25]. Y en definitiva, se requiere la presencia de ambos para evitar la oxidación de los vinos.

El hecho de que el sulfuroso (como nucleófilo) pueda reaccionar con las quinonas es esencial para que el ciclo de oxidación pueda tener lugar (apartado 7). Tal y como se explicó en el

apartado 8, la reacción puede darse por dos vías: a) el sulfuroso se oxida hasta sulfato y se reduce la quinona hasta el difenol de partida y b) reacción directa con la quinona, hasta obtener un compuesto de adición nucleofílica [2]. El rendimiento de estas dos reacciones de reducción y adición depende de la quinona y del pH. En vinos se ha encontrado favorecida la obtención del o-difenol frente a la formación del sulfonato (25%) [2]. Otra reacción del sulfuroso como nucleófilo es la reacción con los aldehídos para formar hidroxialquilsulfonatos. Este tipo de reacciones son muy importantes a nivel sensorial, ya que una vez que los aldehídos están formando aductos con el sulfuroso no se pueden percibir. Conforme se oxida el vino, se consume el sulfuroso libre del medio y el equilibrio se puede ir desplazando hacia las formas libres de los aldehídos [77]. Los hidroxialquilsulfonatos se estudiarán en detalle más adelante.

En el mecanismo de reacción, por cada mol de oxígeno que toma el vino, se consumirán 2 moles de sulfuroso: uno mol reacciona con el peróxido de hidrógeno y el otro con las quinonas. Se ha comprobado que esta relación molar $\text{SO}_2:\text{O}_2$ tiende a la teórica (2:1) sólo en disoluciones modelo, ya que en el vino existen numerosos nucleófilos que compiten con el sulfuroso por reaccionar con las quinonas, haciendo que la relación molar real sea menor (1,7:1) [78]. Danilewicz demostró en 2016, que la reducción de las quinonas a catecoles por el SO_2 no alcanza el 100 % de rendimiento, mientras que el sulfuroso elimina el agua oxigenada de manera muy eficaz, evitando por tanto la reacción de Fenton. Hay que tener en cuenta que en este ensayo no determinó acetaldehído; por lo que es posible que pudiera formarse algo de este aldehído, tal y como encontró Elias y col en muestras sulfitadas [25].

Ácido ascórbico

El ácido ascórbico no es tan antioxidante como el sulfuroso, pero puede reducir quinonas a catecoles muy rápidamente [79] y consumir oxígeno de manera muy eficaz. Se encuentra de manera natural en las uvas (5-150 mg/Kg) dependiendo de la variedad, durante la vinificación reacciona con el oxígeno y las quinonas, consumiéndose hasta casi desaparecer.

El ácido ascórbico puede reaccionar con el oxígeno molecular muy rápidamente en presencia de hierro y cobre [78], el oxígeno se reduce a agua oxigenada y el ácido ascórbico se oxida a ácido deshidroascórbico, que puede sufrir una adición nucleofílica por parte del sulfuroso [78].

El uso de este antioxidante puede conllevar varios inconvenientes:

- a) El ácido deshidroascórbico se degrada rápidamente produciendo ácidos carboxílicos, cetonas y aldehídos que pueden afectar al aroma y acelerar el pardeamiento de los vinos blancos [80].

- b) Formación de agua oxigenada que puede iniciar la reacción de Fenton y la formación de acetaldehído.

Es por ello que suele añadirse a vinos blancos antes del embollado mezclado con sulfuroso.

Actualmente existe mucho interés por reducir el uso de sulfuroso ya que son cada vez más las personas que pueden presentar intolerancia a los sulfitos [81]. Se han probado nuevas prácticas para sustituirlo: enriquecer el vino en ácido gálico o cafeico, glutatión, lías, autolisados de levaduras, quitosano o el uso de métodos físicos como el ultrasonido, radiación ultravioleta y campos eléctricos pulsados [82]. Algunos estudios han demostrado que un reemplazo parcial puede ser posible si se combinan varios tratamientos [81]. Por ejemplo, el glutatión reduce los radicales libres, pero no elimina el oxígeno ni evita el pardeamiento. Sin embargo, el uso del glutatión, ácido gálico y cafeico conjuntamente podrían proteger eficazmente el aroma [83]. A día de hoy no existe una alternativa eficaz y económica que cumpla todas las funciones del sulfuroso: antioxidante, antimicrobiana y de conservación de las propiedades organolépticas de los vinos.

10. Formación de acetaldehído

El acetaldehído se forma por la acción de las levaduras en la penúltima etapa de la fermentación alcohólica, por ello la cantidad de acetaldehído total formada es equivalente a la cantidad molar de etanol producido (en torno a 2 M o 90 g/L). Sin embargo como la mayoría del acetaldehído es reducido hasta etanol por las levaduras, la cantidad total de acetaldehído que suele encontrarse de media es 25 mg/L en vinos tintos y 40 mg/L para vinos blancos [84] (estos valores pueden variar en función de la cepa de levadura y la concentración de sulfuroso que tenga el mosto) [2, 85].

Después de la fermentación, la formación de acetaldehído se debe principalmente a la oxidación del etanol (**figuras 3 y 4**) según la reacción de Fenton (apartado 5). Los radicales hidroxilo actúan por difusión [51], es decir, reaccionan con la primera especie que encuentren (las más concentradas). Teniendo en cuenta que el etanol representa el 85 % de la materia orgánica del vino, se asume que el acetaldehído es uno de los principales productos de la oxidación del vino [20, 45]. Por cada mol de oxígeno consumido se forman 0,85 moles de radical 1-hidroxietilo (1-HER•) que pueden seguir oxidándose hasta la formación de acetaldehído [25] o reaccionar con tioles y/o ácidos hidroxicinámicos inhibiendo la formación de acetaldehído hasta en un 30 % [55, 56].

11. Formación de aldehídos de Strecker

Las vías por las que se pueden formar los aldehídos de Strecker en vino son las siguientes:

a) Ruta de Ehrlich

Durante la fermentación alcohólica en la levadura *S. cerevisiae*, la última reacción en la biosíntesis de aminoácidos y la primera involucrada en su catabolismo se debe a la acción de la enzima aminotransferasa. Estas enzimas catalizan la transferencia de grupos amino entre aminoácidos y sus correspondientes α -cetoácidos, precursores de los alcoholes superiores. Los aldehídos se obtienen tras las descarboxilación del α -cetoácidos (**Figura 8**) [86, 87].

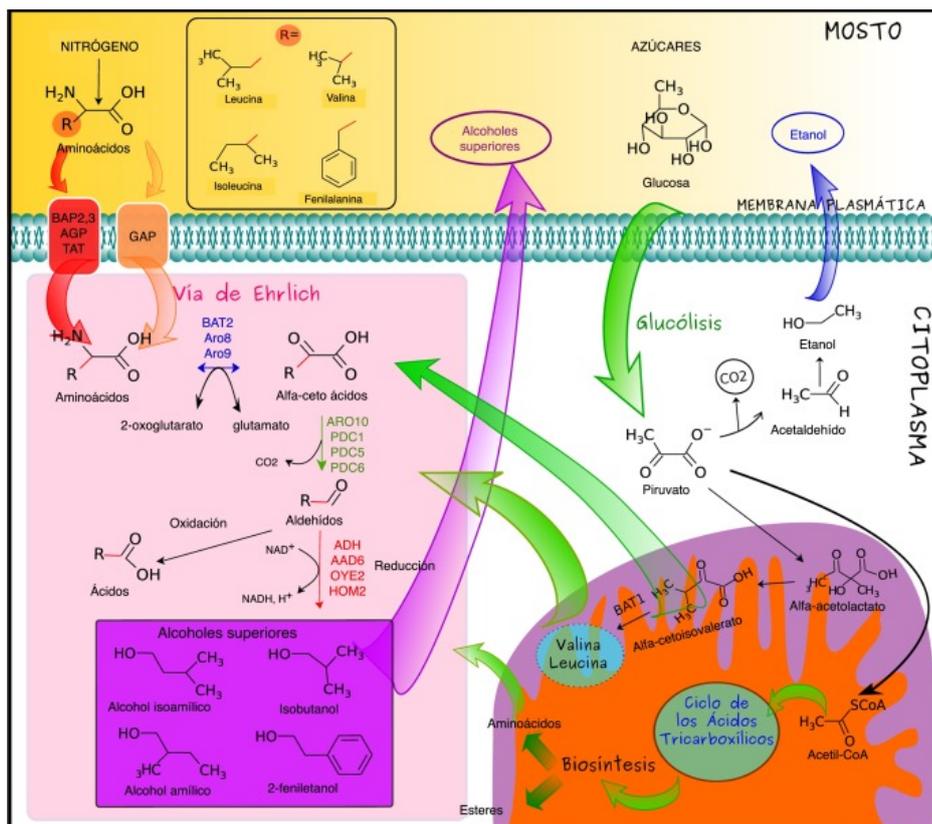


Figura 8. Ruta de Ehrlich, formación de aldehídos y alcoholes superiores en mosto de cerveza [86].

b) Oxidación de alcoholes superiores

Esta vía se basa en la oxidación de los alcoholes superiores por los radicales hidroxilos ($\text{OH}\cdot$) generados en la reacción de Fenton. Se puede considerar como una vía minoritaria de formación, porque estos radicales actúan por difusión y oxidarán principalmente el etanol (12-15%), el glicerol (5-20 g/L) y los polifenoles presentes en 2-3 g/L en vinos tintos. No obstante, en vino se ha comprobado que al añadir metionol (0,1 mmol) en condiciones de oxidación la concentración de metional aumentaba (18 $\mu\text{g/L}$) [53].

c) Degradación de Strecker

La degradación de Strecker consiste en la desaminación oxidativa y descarboxilación de un α -aminoácido en presencia de un compuesto α -dicarbonilo (**figura 9**). La reacción conduce a la formación de un aldehído (de Strecker) que contiene un átomo de carbono menos que el aminoácido original y una α -aminocetona [88]. La valina es el precursor del 2-metilpropanal o isobutiraldehído, la leucina lo es para el 2-metilbutanal y la isoleucina para el 3-metilbutanal o isovaleraldehído. El fenilacetaldehído se forma a partir de la fenilalanina y el aminoácido precursor del metional es la metionina.

Cualquier compuesto α -dicarbonilo presente en el vino podría llevar a cabo la degradación de Strecker como por ejemplo el metilglioxial y el diacetilo formados por la actividad microbológica y en el envejecimiento del vino [89]. El oxígeno incide directamente en esta reacción ya que al oxidar o-difenoles hasta o-quinonas estaría enriqueciendo al vino en α -dicarbonilos y favoreciendo por tanto la generación de aldehídos de Strecker [90].

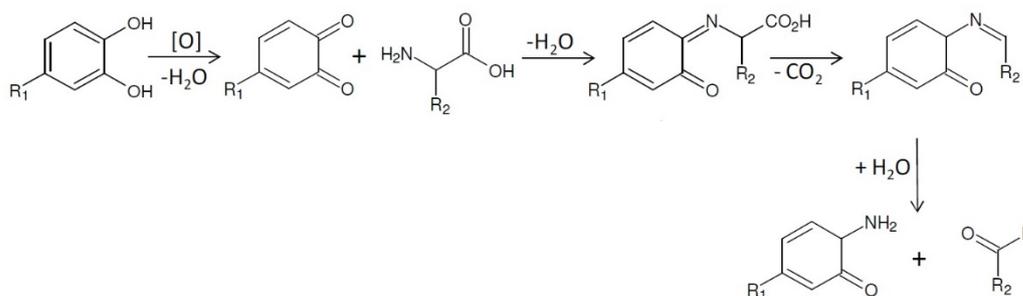


Figura 9. Degradación de Strecker a partir de una o-quinona actuando como α -dicarbonilo. Figura adaptada de Oliveira y col. [91].

Recientemente se ha señalado que la formación de fenilacetaldehído se favorece por la presencia de quinonas procedentes de polifenoles con los grupos hidroxilo en *para* y *orto*, mientras que cuando están dispuestos en *meta* se inhibiría su formación [92].

d) Reacción de Maillard y la degradación oxidativa de los compuestos de Amadori

La reacción de Maillard ocurre principalmente en alimentos que contienen azúcares reductores o lípidos oxidados y grupos amino de un aminoácido, péptido o proteína, que sufre procesado térmico. El resultado es la formación de pigmentos pardos con modificación de aroma, color y sabor de los alimentos. Se origina entre el grupo amino de un aminoácido, péptido o proteína y el grupo carbonilo de un azúcar reductor o un lípido oxidado, dando lugar a los productos de la reacción de Maillard. Esta reacción es muy importante en los procesos alimentarios que incluyen horneado, tostado y fritura, por lo que tendría poca repercusión en la elaboración de vinos.

Los compuestos de Amadori e intermedios de Heyns son intermedios de la reacción de Maillard y pueden deshidratarse de manera suave, produciendo dicarbonilos, que a su vez pueden formar otros aldehídos por la degradación de Strecker y la degradación retroaldohólica [93].

12. Reactividad del acetaldehído y los aldehídos de Strecker

Para terminar la introducción vamos a tratar la reactividad del acetaldehído y los aldehídos de Strecker. La mayoría de los trabajos publicados se basan en estudios con el acetaldehído ya que al estar presente en concentraciones 25-40 mg/L se van a dar con mayor facilidad, frente a productos de aldehídos de Strecker que se encuentran en $\mu\text{g/L}$.

En la **figura 10**, se adjunta el diagrama general de las principales reacciones que sufre el acetaldehído en vino tinto. Nos servirá de guía en este apartado.

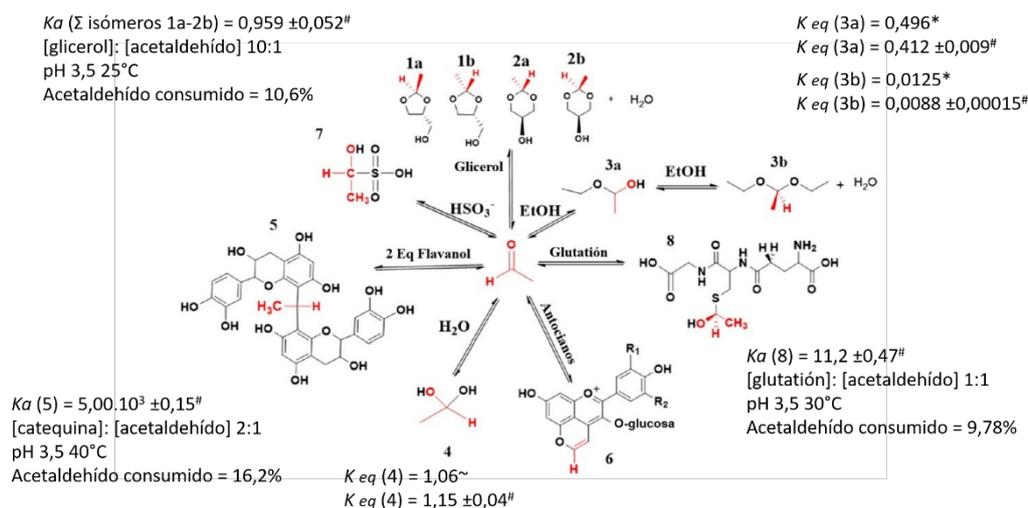


Figura 10. Principales equilibrios de reacción del acetaldehído en vino: (1a y 1b) *trans*- y *cis*-dioxolano, (2a y 2b) *trans* y *cis*-dioxano, (3a) etil hemiacetal (3b) acetal, (4) acetaldehído hidratado, (5) Dímero de catequinas mediados por puente de etilo, (6) Se forma la Vitisina B (piroantociano) tras reaccionar antocianos como la malvidina-3-O-glucósido con el acetaldehído en forma enol [94], (7) ácido dihidroxietilsulfónico y (8) aducto de glutión; figura adaptada de la referencia Peterson y col. [95]. Referencias de las constantes de equilibrio y las constantes de equilibrio aparentes # [95] (constantes y consumos de acetaldehído determinadas en vino sintético sin contener sulfuroso); \sim [73]; * [96].

Para abordar la reactividad de los aldehídos lo primero que hay que tener en cuenta es que son especies electrofílicas. El carbono que sustenta el carbonilo es un punto electrófilo, ya que la densidad de carga negativa está desplazada hacia el oxígeno debido a su alta electronegatividad. Por ello, (al igual que las quinonas) los aldehídos pueden ser atacados por los nucleófilos del vino: polifenoles, sulfuroso y tioles (ácido sulfhídrico, glutión, cisteína) [69]. A continuación, se detallan las reacciones siguiendo el esquema de la **figura 10** [95]:

a) Reacción con etanol y glicerol para obtener hemiacetales y acetales (productos 1-3 de la figura 10):

En medio ácido los aldehídos reaccionan con alcoholes formando hemiacetales, que después reaccionan con una segunda molécula de alcohol para formar acetales. El hemiacetal (3a) tiene una constante de equilibrio de $0,412 \pm 0,009 \text{ M}^{-1}$ [95]. La formación del etil hemiacetal (3b figura 10) está menos favorecido con una constante de equilibrio de $0,00880 \pm 0,00015 \text{ M}^{-2}$ [95]. Los acetales (3b) aportan el carácter frutal de la crianza biológica de los vinos generosos de Jerez (DO Sherry)[97].

Los dioxolanos y dioxanos se forman al reaccionar el glicerol con el acetaldehído. Los 4 isómeros (1a-1b y 2a-2b) han sido identificados como marcadores de la oxidación en vinos fortificados de Portugal [98]. En vinos blancos españoles oxidados se detectó mediante olfatometría el 2, 4, 5-trimetildioxolano, isómero del dioxolano [99]. La reacción con el glicerol puede suponer hasta un 10 % del consumo de acetaldehído en muestras sintéticas que no contienen sulfuroso (figura 10) [95].

b) Acetaldehído hidratado (producto de reacción 4)

Teniendo en cuenta que el 85 % del vino es agua es lógico pensar que los aldehídos tenderán a hidratarse con relativa facilidad. La constante de formación de este producto en equilibrio a pH 3,5 y 30 grados es de $1,15 \pm 0,04$, indicando que en vino una fracción importante de acetaldehído estará bajo esta forma (obviando la formación de aductos con sulfuroso) figura 10 [95].

El acetaldehído hidratado (4) y el hemiacetal (3a) en la figura 10, junto con el acetaldehído en forma libre constituyen la fracción libre y activa, es decir, el acetaldehído hidratado y el hemiacetal sirven de reserva alimentando a la forma libre conforme ésta se va consumiendo [95].

c) Reacción con polifenoles: Reacción con uniones de flavanol mediado por puente de etilo (acetaldehído) (5), antocianos (6, vitisina B). También existen reacciones mediadas por aldehídos de Strecker.

i. Acetaldehído

El mecanismo para la reacción del acetaldehído y los polifenoles se basa en el ataque nucleofílico de los polifenoles al aldehído protonado (carbocación) (Figura 11), por ello esta reacción está más favorecida conforme el vino es más ácido [100]. Lo propuso Timberlake en 1976 [64] y más tarde Fulcrand y col lo confirmaron mediante análisis de Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (LC-ICP-MS) [101]. La cinética de la reacción se acelera conforme se aumenta la concentración de acetaldehído

[102, 103]. La reacción con catequina puede suponer el consumo del 16% (**figura 10**) del acetaldehído inicial, considerando muestras sintéticas sin añadir sulfuroso [95].

Para evaluar el efecto de la temperatura en la reacción hay que tener en cuenta la estabilidad de los aductos formados y que la temperatura de degradación de los polifenoles es 50 grados [102]. A bajas temperaturas (25 grados), la reacción es muy lenta y conforme se van formando aductos (muy estables) se va favoreciendo la reacción de condensación porque el polímero tiene menor potencial redox que los ortodifenoles originales[42]. Cuando se incuban las muestras sintéticas en anoxia y a 42 grados, la reacción al principio es muy rápida (incluso duplica la velocidad con respecto la temperatura ambiente) pero al ir aumentando tan rápido el tamaño del polímero, este precipita y el consumo de acetaldehído se ralentiza. A tiempos largos de incubación y temperaturas suaves el consumo de acetaldehído puede ser superior al consumo de las muestras mantenidas a 40-50 °C [102, 104].

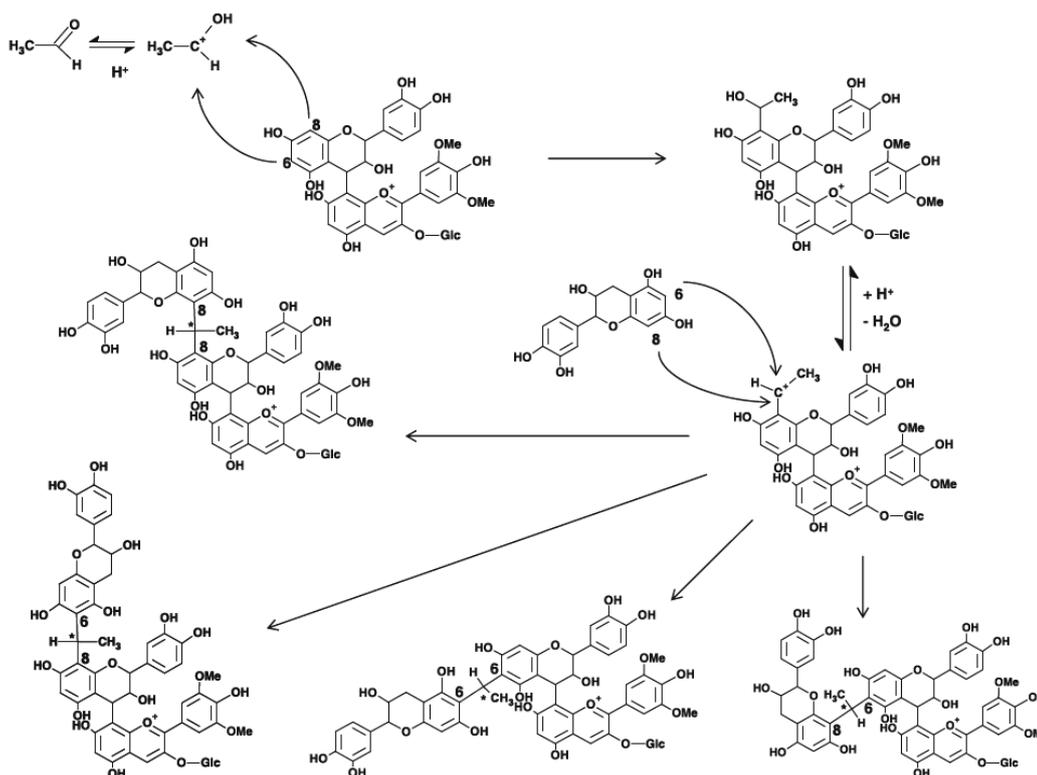


Figura 11. Mecanismos propuestos para la formación de polímeros de polifenoles, reacción mediada por puentes de etilo[105]. En la figura se presentan los isómeros posibles en la reacción entre la catequina y el acetaldehído; y el dímero catequina-malvidina 3-glucósido y acetaldehído. Figura de la referencia [100].

Los piroantocianos se forman mediante una cicloadición del acetaldehído en forma enol a antocianos como la malvidina 3- glucósido (compuesto 6 **figura 10**).

ii. Aldehídos de Strecker

Se ha caracterizado el producto de reacción entre el isobutiraldehído, 3-metilbutanal y 2-metilbutanal con catequina y malvidina tanto en muestras sintéticas como en vinos fortificados de Portugal [105-109]; así como el producto de reacción entre el fenilacetaldehído y la malvidina en vino sintético [110]. El mecanismo propuesto es análogo al del acetaldehído [64, 101].

d) Formación de aductos con bisulfito (producto de reacción 7) (figura 10)

El acetaldehído tiene una gran afinidad (constante de formación $485 \cdot 10^3$) [111] por formar aductos con el sulfuroso (hidroxialquilsulfonatos) tanto que una vez que el acetaldehído entra en contacto con el sulfuroso menos del 1% del acetaldehído está en forma libre [2]. Aunque de forma más discreta, los aldehídos de Strecker también forman estos compuestos [112] Isobutiraldehído $K_a = 2,8 \times 10^3$, Isovaleraldehído $K_a = 29 \times 10^3$, 2-metilbutanal $K_a = 2,6 \times 10^3$, metional $K_a = 50 \times 10^3$, y fenilacetaldehído $K_a = 17 \times 10^3$. Los hidroxialquilsulfonatos son especies no volátiles y podrían suponer una ventaja sensorial porque no se pueden percibir. Al igual que pasara con el acetaldehído hidratado y el hemiacetal (**figura 10**) los aductos de acetaldehído (en menor medida) y aldehídos de Strecker con el sulfuroso, se consideran un reservorio de éstos porque se pueden liberar por oxidación [77]. Conforme el vino se va oxidando, el sulfuroso libre del vino irá disminuyendo (por reacción con el agua oxigenada formada) y el equilibrio se puede desplazar según el principio de Le Châtelier para mantener la concentración de sulfuroso, y con ello aumenta la concentración de aldehídos libres [77].

e) Reacción con compuestos azufrados (producto de reacción 8, figura 10)

La máxima concentración de glutatión de los vinos es 30-40 mg/L, esto supone que pueda estar en exceso con respecto al acetaldehído. En muestras sintéticas, con un ratio de concentración 10:1 (glutatión: acetaldehído) la constante de equilibrio de formación del aducto fue $11,02 \pm 0,32 \text{ M}^{-1}$ y el consumo de acetaldehído es del 52 % del valor inicial [95]. Cuando están en una relación equimolar el consumo de acetaldehído fue de 9,78% (**figura 10**) [95]. Los datos de consumo de acetaldehído y constantes de equilibrio aparentes se determinaron en muestras sintéticas sin sulfuroso [95].

13. Referencias

1. Ugliano, M., *Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(26): p. 6125-6136.
2. Waterhouse, A.L., G.L. Sacks, and D.W. Jeffery, *Understanding Wine Chemistry*. Understanding Wine Chemistry 2016, Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 1-443.
3. Oliveira, I. and V. Ferreira, *Modulating Fermentative, Varietal and Aging Aromas of Wine Using non-Saccharomyces Yeasts in a Sequential Inoculation Approach*. Microorganisms, 2019. **7**(6).
4. Tarko, T., et al., *The Impact of Oxygen at Various Stages of Vinification on the Chemical Composition and the Antioxidant and Sensory Properties of White and Red Wines*. International journal of food science, 2020. **2020**: p. 7902974-7902974.
5. Singleton, V.L. and T.E. Kramling, *BROWNING OF WHITE WINES AND AN ACCELERATED TEST FOR BROWNING CAPACITY*. American Journal of Enology and Viticulture, 1976. **27**(4): p. 157-160.
6. Ferreira, et al., *Key Changes in Wine Aroma Active Compounds during Bottle Storage of Spanish Red Wines under Different Oxygen Levels*. Journal of agricultural and food chemistry, 2014. **62**(41): p. 10015-27.
7. du Toit, W., et al., *Oxygen in Must and Wine: A review*. S. Afr. J. Enol. Vitic., 2006. **27**: p. 76-94.
8. Schneider, V., *Must hyperoxidation: A review*. American Journal of Enology and Viticulture, 1998. **49**(1): p. 65-73.
9. Boulton, R.B., et al., *Principles and practices of winemaking*. Beijing: China Light Industry Press., 2001(1): p. 15-27.
10. Cano-Lopez, M., et al., *Effect of micro-oxygenation on color and anthocyanin-related compounds of wines with different phenolic contents*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(14): p. 5932-5941.
11. Wirth, J., et al., *The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines*. Food Chemistry, 2010. **123**(1): p. 107-116.
12. Cejudo-Bastante, M.J., M.S. Pérez-Coello, and I. Hermosín-Gutiérrez, *Effect of wine micro-oxygenation treatment and storage period on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics*. LWT - Food Science and Technology, 2011. **44**(4): p. 866-874.
13. Heras, M.O., et al., *Changes in the volatile composition of red wines during aging in oak barrels due to microoxygenation treatment applied before malolactic fermentation*. European Food Research and Technology, 2008. **226**(6): p. 1485-1493.
14. Rosenfeld, E., et al., *Oxygen consumption by anaerobic Saccharomyces cerevisiae under enological conditions: Effect on fermentation kinetics*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(1): p. 113-121.
15. Gonzalez-Marco, A., N. Jimenez-Moreno, and C. Ancin-Azpilicueta, *Concentration of volatile compounds in Chardonnay wine fermented in stainless steel tanks and oak barrels*. Food Chemistry, 2008. **108**(1): p. 213-219.
16. Smith, P.A., J.M. McRae, and K.A. Bindon, *Impact of winemaking practices on the concentration and composition of tannins in red wine*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2015. **21**: p. 601-614.

17. Gambuti, A., et al., *Sulfur Dioxide and Glutathione Alter the Outcome of Microoxygenation*. American Journal of Enology and Viticulture, 2015. **66**.
18. Cano-Lopez, M., et al., *Oak barrel maturation vs. micro-oxygenation: Effect on the formation of anthocyanin-derived pigments and wine colour*. Food Chemistry, 2010. **119**(1): p. 191-195.
19. McRae, J.M., et al., *Effect of Wine pH and Bottle Closure on Tannins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(47): p. 11618-11627.
20. Danilewicz, J.C., *Reactions Involving Iron in Mediating Catechol Oxidation in Model Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2013.
21. Danilewicz, J.C., *Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper*. American Journal of Enology and Viticulture, 2003. **54**(2): p. 73-85.
22. 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): p. 319-328.
23. Waterhouse, A.L. and V.F. Laurie, *Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses*. American Journal of Enology and Viticulture, 2006. **57**(3): p. 306-313.
24. Kreitman, G.Y., et al., *Reaction Mechanisms of Metals with Hydrogen Sulfide and Thiols in Model Wine. Part 1: Copper-Catalyzed Oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(20): p. 4095-4104.
25. Elias, R.J., et al., *Identification of Free Radical Intermediates in Oxidized Wine Using Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(10): p. 4359-4365.
26. Danilewicz, J.C., *Fe(II):Fe(III) Ratio and Redox Status of White Wines*. American Journal of Enology and Viticulture, 2016. **67**(2): p. 146-152.
27. Kreitman, G., A. Cantu, and A. Waterhouse, *Effect of Metal Chelators on the Oxidative Stability of Model Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**.
28. Danilewicz, J.C., *Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper*. American Journal of Enology and Viticulture, 2007. **58**(1): p. 53-60.
29. Danilewicz, J.C., *Chemistry of Manganese and Interaction with Iron and Copper in Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2016. **67**(4): p. 377-384.
30. Danilewicz, J.C., *Role of Tartaric and Malic Acids in Wine Oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(22): p. 5149-5155.
31. Melin, V., et al., *Reduction reactivity of catecholamines and their ability to promote a Fenton reaction*. Inorganica Chimica Acta, 2016. **453**: p. 1-7.
32. Salgado, P., et al., *The Reactivity and Reaction Pathway of Fenton Reactions Driven by Substituted 1,2-Dihydroxybenzenes*. Environmental Science & Technology, 2017. **51**(7): p. 3687-3693.
33. Elias, R.J. and A.L. Waterhouse, *Controlling the Fenton Reaction in Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(3): p. 1699-1707.
34. Remucal, C. and D. Sedlak, *Ligand-Enhanced Reactive Oxidant Generation by Nanoparticulate Zero-Valent Iron and Oxygen*. Environmental Science & Technology, 2008. **42**: p. 6936-41.

-
35. Sun, Y.F. and J.J. Pignatello, *CHEMICAL TREATMENT OF PESTICIDE WASTES - EVALUATION OF FE(III) CHELATES FOR CATALYTIC HYDROGEN-PEROXIDE OXIDATION OF 2,4-D AT CIRCUMNEUTRAL PH*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. **40**(2): p. 322-327.
 36. Rietjens, I., et al., *The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2002. **11**(3-4): p. 321-333.
 37. Mahmoud, M.A.A., et al., *Ascorbic acid modifies the free radical scavenging behaviour of catechin: An insight into the mechanism*. Food Research International, 2013. **51**(2): p. 907-913.
 38. Zoecklein, B.W.F., K. C.; Gump, B. H.; Nury, F. S., *Wine Analysis and Production*. 2013(3).
 39. Danilewicz, J.C. and P.J. Wallbridge, *Further Studies on the Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfite in Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2010. **61**(2): p. 166-175.
 40. Cheynier, V., *Oxygen in wine and its role in phenolic reactions during aging*. Uses of gases in winemaking, 2002. (eds Allen, M., Bell, S., Rowe, N., Wall, G.), Australian Society of Viticulture and Enology. Adelaide, SA, Australia,(5): p. 23-27.
 41. Bueno, M., et al., *Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation*. Frontiers in Chemistry, 2018. **6**.
 42. Singleton, V.L., *OXYGEN WITH PHENOLS AND RELATED REACTIONS IN MUSTS, WINES, AND MODEL SYSTEMS - OBSERVATIONS AND PRACTICAL IMPLICATIONS*. American Journal of Enology and Viticulture, 1987. **38**(1): p. 69-77.
 43. CHEYNIER, V., C. OWE, and J. RIGAUD, *Oxidation of Grape Juice Phenolic Compounds in Model Solutions*. Journal of Food Science, 1988. **53**(6): p. 1729-1732.
 44. Kilmartin, P.A., H.L. Zou, and A.L. Waterhouse, *A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(4): p. 1957-1965.
 45. Marquez, K., et al., *Production of hydroxyl radicals and their relationship with phenolic compounds in white wines*. Food Chemistry, 2019. **271**: p. 80-86.
 46. McArdle, J.V. and M.R. Hoffmann, *KINETICS AND MECHANISM OF THE OXIDATION OF AQUATED SULFUR-DIOXIDE BY HYDROGEN-PEROXIDE AT LOW PH*. Journal of Physical Chemistry, 1983. **87**(26): p. 5425-5429.
 47. Kaur, H. and B. Halliwell, *DETECTION OF HYDROXYL RADICALS BY AROMATIC HYDROXYLATION*, in *Oxygen Radicals in Biological Systems, Pt C*, L. Packer, Editor 1994. p. 67-82.
 48. Masarwa, M., et al., *REACTIONS OF LOW-VALENT TRANSITION-METAL COMPLEXES WITH HYDROGEN-PEROXIDE - ARE THEY FENTON-LIKE OR NOT .1. THE CASE OF CU+AQ AND CR-2+AQ*. Journal of the American Chemical Society, 1988. **110**(13): p. 4293-4297.
 49. Elias, R.J., et al., *Key Factors Affecting Radical Formation in Wine Studied by Spin Trapping and EPR Spectroscopy*. American Journal of Enology and Viticulture, 2009. **60**(4): p. 471-476.
 50. Kreitman, G.Y., et al., *Reaction Mechanisms of Metals with Hydrogen Sulfide and Thiols in Model Wine. Part 2: Iron- and Copper-Catalyzed Oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(20): p. 4105-4113.
-

51. Laurie, V.F. and A.L. Waterhouse, *Oxidation of glycerol in the presence of hydrogen peroxide and iron in model solutions and wine. Potential effects on wine color.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(13): p. 4668-4673.
52. Es-Safi, N.E., et al., *New polyphenolic compounds with xanthylum skeletons formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(12): p. 5211-5217.
53. Escudero, A., et al., *Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 4268-4272.
54. Ferreira, A.C.S., T. Hogg, and P.G. de Pinho, *Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(5): p. 1377-1381.
55. Kreitman, G.Y., V.F. Laurie, and R.J. Elias, *Investigation of Ethyl Radical Quenching by Phenolics and Thiols in Model Wine.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(3): p. 685-692.
56. Gislason, N.E., B.L. Currie, and A.L. Waterhouse, *Novel Antioxidant Reactions of Cinnamates in Wine.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(11): p. 6221-6226.
57. Ribéreau-Gayon, P., et al., *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments.* New York ed. Vol. 2. 2006, Chichester: John Wiley & Sons.
58. Danilewicz, J.C., J.T. Secombe, and J. Whelan, *Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine.* American Journal of Enology and Viticulture, 2008. **59**(2): p. 128-136.
59. Monagas, M., C. Gomez-Cordoves, and B. Bartolome, *Evolution of polyphenols in red wines from Vitis vinifera L. during aging in the bottle - I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins.* European Food Research and Technology, 2005. **220**(5-6): p. 607-614.
60. Petrozziello, M., et al., *Impact of Increasing Levels of Oxygen Consumption on the Evolution of Color, Phenolic, and Volatile Compounds of Nebbiolo Wines.* Frontiers in Chemistry, 2018. **6**.
61. Arapitsas, P., et al., *The influence of storage on the "chemical age" of red wines.* Metabolomics, 2014. **10**(5): p. 816-832.
62. Puertolas, E., et al., *Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle.* Food Chemistry, 2010. **119**(3): p. 1063-1070.
63. Monagas, M., B. Bartolome, and C. Gomez-Cordoves, *Evolution of polyphenols in red wines from Vitis vinifera L. during aging in the bottle - II. Non-anthocyanin phenolic compounds.* European Food Research and Technology, 2005. **220**(3-4): p. 331-340.
64. Timberlake, C.F. and P. Bridle, *INTERACTIONS BETWEEN ANTHOCYANINS, PHENOLIC COMPOUNDS, AND ACETALDEHYDE AND THEIR SIGNIFICANCE IN RED WINES.* American Journal of Enology and Viticulture, 1976. **27**(3): p. 97-105.
65. Fulcrand, H., et al., *An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation.* Phytochemistry, 1997. **46**(2): p. 223-227.
66. Bakker, J., et al., *Identification of an anthocyanin occurring in some red wines.* Phytochemistry, 1997. **44**(7): p. 1375-1382.

67. Fulcrand, H., et al., *A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins*. *Phytochemistry*, 1998. **47**(7): p. 1401-1407.
68. SarniManchado, P., et al., *Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments*. *Journal of Food Science*, 1996. **61**(5): p. 938-941.
69. Ma, L., et al., *Tracing oxidation reaction pathways in wine using ¹³C isotopolog patterns and a putative compound database*. *Analytica Chimica Acta*, 2018.
70. Mouls, L. and H. Fulcrand, *Identification of new oxidation markers of grape-condensed tannins by UPLC-MS analysis after chemical depolymerization*. *Tetrahedron*, 2015. **71**.
71. Li, H., A. Guo, and H. Wang, *Mechanisms of oxidative browning of wine*. *Food Chemistry*, 2008. **108**(1): p. 1-13.
72. Boulton, R.B., et al., *Principles and practices of winemaking*. New York ed2001, Chichester: John Wiley & Sons.
73. Oliveira, C.M., et al., *Oxidation mechanisms occurring in wines*. *Food Research International*, 2011. **44**(5): p. 1115-1126.
74. Ugliano, M., et al., *Evolution of 3-Mercaptohexanol, Hydrogen Sulfide, and Methyl Mercaptan during Bottle Storage of Sauvignon blanc Wines. Effect of Glutathione, Copper, Oxygen Exposure, and Closure-Derived Oxygen*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. **59**(6): p. 2564-2572.
75. Fracassetti, D., et al., *Light-induced reactions of methionine and riboflavin in model wine: Effects of hydrolysable tannins and sulfur dioxide*. *Food Chemistry*, 2019. **298**.
76. Martínez, J. and E.L.y.E. García-Escudero, *Efecto varietal sobre el contenido de glutati6n en mostos y vinos blancos*. 37th World Congress of Vine and Wine and 12th General Assembly of the OIV (Part 2), 2014: p. 06003.
77. Bueno, M., V. Carrasc6n, and V. Ferreira, *Release and Formation of Oxidation-Related Aldehydes during Wine Oxidation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016. **64**(3): p. 608-617.
78. Danilewicz, J.C., *Reaction of Oxygen and Sulfite in Wine*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2016. **67**(1): p. 13-17.
79. Nikolantonaki, M. and A.L. Waterhouse, *A Method To Quantify Quinone Reaction Rates with Wine Relevant Nucleophiles: A Key to the Understanding of Oxidative Loss of Varietal Thiols*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. **60**(34): p. 8484-8491.
80. Bradshaw, M.P., P.D. Prenzler, and G.R. Scollary, *Ascorbic acid-induced browning of (+)-catechin in a model wine system*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(2): p. 934-939.
81. Fredericks, I.N., M. du Toit, and M. Krugel, *Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines*. *Food Microbiology*, 2011. **28**(3): p. 510-517.
82. Guerrero, R.F. and E. Cantos-Villar, *Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review*. *Trends in Food Science & Technology*, 2015. **42**(1): p. 27-43.
83. Roussis, I.G., M. Patrianakou, and A. Drossiadis, *Protection of Aroma Volatiles in a Red Wine with Low Sulphur Dioxide by a Mixture of Glutathione, Caffeic Acid and Gallic Acid*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2013. **34**(2): p. 262-265.

84. Jackowetz, J.N. and R.M. de Orduna, *Survey of SO₂ binding carbonyls in 237 red and white table wines*. Food Control, 2013. **32**(2): p. 687-692.
85. Marrufo-Curtido, A., et al., *Evidencias de los diferentes equilibrios acetaldehído - material polifenólico de los vinos*. Libro de comunicaciones del XIV Congreso Nacional de Investigación Enológica 2018: p. 194-198, ISBN: 978-84-09-12074-1.
86. Loviso, C.L. and D. Libkind, *Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: fusel alcohols*. Revista Argentina De Microbiología, 2019. **51**(4): p. 386-397.
87. Rapp, A. and G. Versini, *Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines*. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine, ed. J.M. Rantz 1991. 156-164.
88. Strecker, A., *On a peculiar oxidation by alloxan*. Justus Liebigs Annalen der Chemie 1862. **123**: p. 363-367.
89. Pripis-Nicolau, L., et al., *Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 3761-3766.
90. Rizzi, G., *Formation of Strecker Aldehydes from Polyphenol-Derived Quinones and α -Amino Acids in a Nonenzymic Model System*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**: p. 1893-7.
91. Oliveira, C.M., et al., *Quinones as Strecker degradation reagents in wine oxidation processes*. Food Chemistry, 2017. **228**: p. 618-624.
92. Delgado, R., *Contribution of Phenolic Compounds to Food Flavors: Strecker-Type Degradation of Amines and Amino Acids Produced by o- and p-Diphenols*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **63**.
93. Hofmann, T. and P. Schieberle, *Formation of aroma-active Strecker-aldehydes by a direct oxidative degradation of Amadori compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 4301-4305.
94. Bakker, J. and C.F. Timberlake, *Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(1): p. 35-43.
95. Peterson, A.L. and A.L. Waterhouse, *H-1 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**(36): p. 6869-6878.
96. Guthrie, J. *Carbonyl Addition Reactions: Factors Affecting the Hydrate Hemiacetal and Hemiacetal Acetal Equilibrium Constants*. 1975.
97. Moyano, L., et al., *Analytical study of aromatic series in sherry wines subjected to biological aging*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(25): p. 7356-7361.
98. Camara, J.S., M.A. Alves, and J.C. Marques, *Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing*. Analytica Chimica Acta, 2006. **563**(1-2): p. 188-197.
99. Escudero, A., J. Cacho, and V. Ferreira, *Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study*. European Food Research and Technology, 2000. **211**(2): p. 105-110.

-
100. Nave, F., et al., *The fate of flavanol-anthocyanin adducts in wines: Study of their putative reaction patterns in the presence of acetaldehyde*. Food Chemistry, 2010. **121**(4): p. 1129-1138.
 101. Fulcrand, H., et al., *Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography ion spray mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1996. **752**(1-2): p. 85-91.
 102. Baranowski, E.S. and C.W. Nagel, *KINETICS OF MALVIDIN-3-GLUCOSIDE CONDENSATION IN WINE MODEL SYSTEMS*. Journal of Food Science, 1983. **48**(2): p. 419-&.
 103. Sheridan, M.K. and R.J. Elias, *Reaction of Acetaldehyde with Wine Flavonoids in the Presence of Sulfur Dioxide*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(45): p. 8615-8624.
 104. Rivasgonzalo, J.C., S. Bravocharo, and C. Santosbuelga, *DETECTION OF COMPOUNDS FORMED THROUGH THE REACTION OF MALVIDIN 3-MONOGLUCOSIDE AND CATECHIN IN THE PRESENCE OF ACETALDEHYDE*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(6): p. 1444-1449.
 105. Pissarra, J., et al., *Reaction Between Malvidin 3Glucoside and (+)Catechin in Model Solutions Containing Different Aldehydes*. Journal of Food Science - J FOOD SCI, 2003. **68**: p. 476-481.
 106. Pissarra, J., et al., *Structural characterization of new malvidin 3-glucoside-catechin aryl/alkyl-linked pigments*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(17): p. 5519-5526.
 107. Pissarra, J., et al., *Isolation and structural characterization of new anthocyanin-alkyl-catechin pigments*. Food Chemistry, 2005. **90**(1-2): p. 81-87.
 108. Pissarra, J., et al., *Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl-flavanol pigments in model solutions*. Analytica Chimica Acta, 2004. **513**(1): p. 215-221.
 109. Pissarra, J.I., et al., *Contribution and importance of wine spirit to the port wine final quality - initial approach*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. **85**(7): p. 1091-1097.
 110. Escott, C., et al., *Study of the Interaction of Anthocyanins with Phenolic Aldehydes in a Model Wine Solution*. Acs Omega, 2018. **3**(11): p. 15575-15581.
 111. de Azevedo, L.C., et al., *Evaluation of the formation and stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(21): p. 8670-8680.
 112. Bueno, M., J. Zapata, and V. Ferreira, *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**: p. 33-42.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de la tesis es caracterizar los procesos químicos que concurren durante la oxidación del vino, prestando especial atención a la cinética de consumo de oxígeno, la formación, reacción y acumulación de acetaldehído y aldehídos de Strecker.

Objetivos operativos son:

1. Desarrollo de un método de oxidación reproducible que permita suministrar dosis de oxígeno suficientes para alcanzar la formación de *novo* de acetaldehído y aldehídos de Strecker. Desarrollo de un método de oxidación acelerado que permita trabajar de una forma rápida y eficaz.
2. Estudiar las velocidades de consumo de oxígeno y acumulación de acetaldehído y aldehídos de Strecker en vinos y establecer relaciones entre dichas cinéticas y la composición química, buscando modelos que dilucidan qué componentes influyen más en estos procesos.
3. Desarrollar un método que mida la capacidad potencial que tienen los polifenoles de los vinos tintos de consumir aldehídos (ARPs).
4. Caracterizar la cinética de consumo de acetaldehído en los vinos
5. Establecer que proporción de agua oxigenada producida durante la oxidación de los vinos se destina a la oxidación de los diferentes compuestos mayoritarios del vino.

CHAPTER I

A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines and some observations about the influence of wine initial chemical composition

CHAPTER I**A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines and some observations about the influence of wine initial chemical composition****1. Introduction**

The study of the effects of oxygen on the wine chemical and sensory characteristics has been the subject of a number of recent researches [1, 6, 74, 113-116]. Nowadays, it is generally accepted that a moderate exposure to oxygen will have beneficial effects on wine quality by minimizing reduction aromas, stabilizing the color and softening the mouthfeel, while an excess of oxygen will lead to the formation of oxidative off-odors [113, 114, 116]. One of the major difficulties in this context is to assess for a given wine which dose of oxygen should be considered moderate and when will it become excessive. The answer to this question requires an understanding of the relationship between the specific wine chemical composition and the effects linked to the consumption of different doses of oxygen.

The general chemical mechanisms of wine oxidation have been well established in recent years [1, 22, 28, 117-119]. Molecular oxygen is transformed into activated oxygen by an iron-copper complex. Activated oxygen can accept electrons from iron, forming a hydroperoxyl radical $\text{HO}_2\cdot$. This radical oxidizes phenolic compounds with a catechol moiety, forms a quinone, and oxygen is then reduced to hydrogen peroxide. In presence of sulfur dioxide, hydrogen peroxide is further reduced to water, and the quinone is reduced back to the catechol form or, alternatively, reacts with HSO_3^- to form a sulfonated catechol. In the absence of SO_2 , hydrogen peroxide can take part in the Fenton reaction [17] where iron and copper interact with H_2O_2 forming the hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$). This radical is a strong oxidant that oxidizes most of the organic compounds present in wine.

One of the aspects which has received limited attention is the study of the rates at which wine consumes oxygen. This strategy however, has been proved to be quite efficient and enlightening when applied to synthetic wine models, and has in fact been essential to elucidate the mechanisms through which wine consumes oxygen [28, 78, 117]. One of the

consequences is that so far there is not a commonly accepted procedure to study oxygen consumption kinetics, which hampers the use of this strategy as a means to explore the existence of specific O₂ consumption patterns and to relate Oxygen Consumption Rates (OCRs) to wine chemical composition. The existence of a relationship between OCRs and the wine chemical composition has been already established [120, 121], although works in this area are scarce. Some authors have documented that OCRs increase with the addition of ellagitannins [122, 123], while another recent report identifies copper, tannins rich in epigallocatechin-structural units and blue pigments as key elements determining wine OCR [124]. In this study, it was suggested that at least two different OCRs (initial and average) are required to characterize the O₂ consumption pattern of a red wine [124]. In the case of whites and rosés, a similar study computed three different OCRs [125]. Another recent study has proposed a new promising experimental setup for a detailed study of the O₂ consumption kinetics of wine and has further used artificial neural networks to look for patterns [126].

The present work has as major goal to develop a general, reproducible and simple experimental strategy specifically designed to get a detailed description of the kinetics of oxygen consumption of wines exposed to a broad range of O₂ levels. Additional objectives are to determine the minimum amount of kinetic parameters required to get a complete description of the O₂ consumption pattern of the wine and to relate those parameters to its initial chemical composition.

2. Materials and methods

2.1. Solvents and Chemicals

Sodium metabisulfite 99% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), tartaric acid (99%), glycerol (99,5%), 1,2-propanediol (99,5%), sodium hydroxide (98%), ortho phosphoric acid (85%), hydrogen peroxide 3 % stabilized w/v VINIKIT, indicator 4.4, mixed (methyl red-methylene blue) VINIKIT, sodium hydroxide 0,01 mol/L VINIKIT were from Panreac (Barcelona, Spain). Dichloromethane, ethanol and methanol for gas chromatography analyses were purchased from Merk (Darmstadt, Germany). Methanol and acetonitrile of HPLC quality were obtained from Fluka Analytical (Buchs, Switzerland). Hydrochloric acid 37%, formic acid and ammonium formate high purity grade were purchased from VWR Prolabo (Fontenay sous Bois, France). Phloroglucinol, ascorbic acid ($\geq 99\%$), acetaldehyde ($\geq 99.5\%$), 2-chloroethanol ($\geq 99.0\%$), methyl 2-methylbutyrate ($\geq 99\%$), 2-butanol ($\geq 99\%$), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate ($\geq 99\%$), gallic acid ($\geq 99\%$) and (+)-catechin ($\geq 99\%$) were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Standards and reagents for the determination of amino acids from Sigma-Aldrich. Water was purified in a Milli-Q system from Millipore (Bedford, Germany) to get a resistance of $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2. Samples and oxidation procedure

For this study, eight Spanish red wines of different vintages (between 2009 and 2014) made mainly with Garnacha (Grenache) and Tempranillo, were purchased at a local store. Details of the samples together with some compositional parameters are shown in **table 1**.

Two different forced oxidation procedures have been used in this work. The first one (S procedure) has been previously described in reference [124]. Briefly, in this procedure samples were oxidized in duplicate by saturating the wine with air, which was done by gentle shaking 500 mL of wine in a 1 L closed flask for 10 seconds, after which the cap was opened to let fresh air in, and the shaking operation was repeated 2 more times. Air-saturated wine was then

Wine Code	Region	Grape Variety	Vintage	Oak aging (months)	Bottle aging (months) Approximate	Ethanol % (v/v)	Total SO ₂ (mg/l)	Free SO ₂ (mg/l)	pH	Abs420	Abs520	Abs620	Colour total	TPI	Folin-Ciocalteu (mg/L GAE)
SL	Rioja	Tempranillo. Mazuelo. Graciano	2011	12	3,00	13,5	75,6	24,7	3,51	3,82	4,24	0,95	9,01	61,8	2435,1
TS	Toro	Tinta de Toro	2012	14	1,84	14,5	76,8	33,7	3,60	3,79	4,27	0,99	9,05	63,1	2591,4
BL	Rioja	Tempranillo	2010	20	3,34	13,5	40,0	13,3	3,61	4,11	4,40	1,15	9,65	58,2	2304,7
CH	Borja	Garnacha	2009	15	4,75	14,0	31,2	2,61	3,32	5,04	5,35	1,25	11,6	71,5	2654,8
MF	Rioja	Tempranillo	2014	0	1,00	13,5	25,6	10,6	3,58	3,31	4,37	1,14	8,82	48,8	2067,2
TP	Borja	Garnacha	2013	5	1,59	15,0	28,0	9,83	3,26	4,09	5,73	1,33	11,1	50,8	2051,1
HV	Calatayud	Garnacha	2014	0	1,00	14,5	12,8	13,6	3,29	3,15	4,06	0,91	8,12	53,0	2384,4
BS	Borja	T-G-CS	2014	0	1,00	13,5	32,0	11,3	3,31	3,08	4,29	0,91	8,28	46,9	2094,1

Table 1.- Characteristics of the samples and some compositional parameters.

distributed in screw capped 60 mL vials strictly avoiding any headspace. Dissolved oxygen was monitored at least twice a day with PSt3 sensors and an oxygen analyzer from Nomatic SA (Thimister-Clermont, Belgium). Each saturation cycle was considered complete when the wine consumed 90% of the initial oxygen or after one week. At that time, the vials were opened inside a glove chamber from Jacomex (Dagneux, France) with oxygen levels below 0,002% to prepare samples for analysis avoiding any further oxidation. The rest of the wine was taken out of the chamber to undergo a new saturation. Initial and average oxygen consumption rates of each wine were determined in duplicate following the method formerly described.

In the procedures named as R, samples were oxidized with three different amounts of total oxygen (R1, R2 and R3) in duplicate (replicate A, replicate B). The accurate internal volumes (V_{int}) of 60 mL nominal internal volume WIT tubes, containing PSt3 oxygen sensors were previously carefully determined by filling them completely with distilled water and correcting by its density. The mass of each tube was also previously determined. Once each tube was calibrated, 5 bottles of each one of the 8 wines used in the experiment were opened, mixed in a large beaker and redistributed in the 5 bottles. The bottles are purged for 1 min with a 415 mL/min flow of Ar and are further resealed with a Nomatic Select 300 CP closure and stored in the fridge until the beginning of the experiment. This begins for replicate A, opening a bottle, transferring a specific volume of wine to a graduated cylinder and carefully closing the bottle with a wine saver vacuvin closure (IIC Brands, The Netherlands). Then, the volume of wine was quickly transferred to the calibrated vial, which was immediately weighted and closed. The time elapsed between uncorking and closing the WIT tube with the wine was less than 2 minutes. The exact volume of wine transferred to the wine (V_l) was estimated from its density, which was repeatedly determined ($n=5$). The exact volume of headspace (V_g) was estimated by subtracting the V_l from V_{int} . The total amount of oxygen contained in the tube, was then determined by introducing synthetic wine inside the tubes following exactly the same procedure used for the wines followed by the

measurement of the dissolved oxygen in the liquid phase after half an hour in the incubator shaker (determined to be the minimum time required for ensuring that gas-liquid equilibrium has been reached and that sensors give stable and reliable signals). Those concentrations in the liquid phase of equilibrated synthetic wines were R1: $5,0 \pm 0,13$ mg/L, R2: $6,35 \pm 0,04$ mg/L y R3: $6,75 \pm 0,02$ mg/L (means of 4 replicates each). The total amount of oxygen contained initially in the tube was then estimated by assuming that the oxygen in the headspace of the tube is in equilibrium with that in the liquid phase. For such calculations we determined that the saturation concentration of O₂ in our wine models completely equilibrated with air (21% v/v in Oxygen) was $7,73 \pm 0,07$ mg/L (n=4).

Three different amounts of total oxygen were essayed. In R1 experiments, the total amount of oxygen contained in the tube corresponded to 9-11 mg of oxygen per liter of wine; in R2 experiments, the total amount within the tubes ranged from 22 to 35 mg of oxygen per liter of wine. In this case, the exact amount depended on its determined level of total SO₂ so that the oxygen given to each wine was approximately 18 mg/L plus the stoichiometrically required amount to oxidize all its SO₂. Finally, in R3 experiments, the oxygen given to each wine was 32 mg/L plus the stoichiometrically required amount to oxidize all its SO₂ and ranged from 35 to 53 mg of oxygen per liter of wine. The tubes were then left in a thermostatic bath Grant OLS23 with orbital shaking (90 rpm) at 25°C to ensure equilibrium between liquid and gas phases. Oxygen was measured with an oxygen analyzer from Nomaorc SA (Thimister-Clermont, Belgium). Oxygen level was monitored each 30 min during the first 3 hours, and then once per day.

2.3. Wine chemical characterization

Initial wines were analyzed for free and total SO₂ as well as for free and total acetaldehyde, color parameters, total polyphenol index and Folin-Ciocalteu index, phenolic and tannin composition, metals, and amino acids. Final samples of S and R procedures were analysed for total SO₂ as well as acetaldehyde, color parameters and total polyphenols.

2.3.1. Sulfur dioxide and acetaldehyde determination

Free sulfur dioxide and free acetaldehyde were determined by headspace gas chromatography with a mass spectrometer detector (HS-GC-MS) in a QP 2010 GC-MS from Shimadzu (Kyoto, Japan) following the procedure described in previous works [124]. For the analysis, 4,5 mL of acidified sample were incubated at 40 °C for 15 min. Then, 400 µL of the headspace were injected in a split/splitless injector. External calibration curves in model wine containing known amounts of sulfur dioxide or acetaldehyde were prepared to quantify both compounds.

For total sulfur dioxide determination, the aspiration/titration method recommended by the OIV (International Organization of Vine and Wine) was used [127].

Total acetaldehyde was determined by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) by injection of 1 µL of wine sample spiked with 2-butanol as internal standard.

2.3.2. Spectrophotometric measurements

For color determination, absorbances at wavelengths 420, 520, and 620 nm of undiluted wine were measured using glass cells with optical paths of 1, 2 or 5 mm, as recommended by the OIV [128]. Total Phenolic Index (TPI) was determined as OD 280 as described by Ribereau-Gayon et al [57]. Folin-Ciocalteu assay was performed following the method described by Singleton *et al.* [129] using 1 cm quartz cuvettes. All the absorbance measurements were taken using a UV-vis spectrophotometer UV-17000 Pharma Spec from Shimadzu (Kyoto, Japan).

2.3.3. Metal analyses

Samples were treated by microwave-assisted digestion and further analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) as described by Gonzalez *et al.* [130]. Metals quantified were iron, copper, zinc and manganese.

2.3.4. Amino acid analyses

For the determination of amino acids (valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, cysteine), a derivatization procedure with aminoquinolyl-N-hydrosysuccinimidyl carbamate (AQC) followed by an analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC) was carried out according to the method reported by Hernandez-Orte *et al.* [131]. A quaternary HPLC system Waters 2695 from Waters (Milford, MA) with a fluorescence detector ProStar 363 from Varian (Walnut Creek, CA) were used.

2.3.5. Polyphenols analyses

Phenolic acids, flavanols and anthocyanins were determined by Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC)-mass spectrometry (MS) for phenolic acids and flavanols and with diode array detector (DAD) for anthocyanins. Wines were analyzed in triplicate following the procedure described by Vallverdu-Queralt *et al.* [132] in a Waters Acquity UPLC-DAD system (Waters, Milford, MA, USA), with a reverse phase Acquity BEH C18 column (150mm length, 1 mm internal diameter, 1.7 μ m particle size) from Waters (Milford, MA, USA) and a Bruker Daltonics Amazon (Bruker, Darmstadt, Germany) mass spectrometer.

Phloroglucinolysis reaction was used for studying the composition of condensed tannins following the procedure described by Ducasse [133]. The reaction was performed in triplicate and depolymerized samples were analysed by UPLC-DAD at 280nm as explained before. The molar ratio of total amount of depolymerized subunits to terminal subunits provides the mean degree of polymerization (mDP).

2.3.6. O₂ consumption kinetics

The O₂ consumed at each time point was directly determined from the measured dissolved O₂, assuming that liquid and vapor phases were in equilibrium regarding the distribution of O₂ and that their corresponding volumes had not changed during the experiment. The direct

representation of the mass of oxygen consumed per volume of wine versus time is given in **Figure 1a**.

Assuming first order kinetics

$$\frac{d[O_2]}{dt} = -k[O_2]_0 \implies \frac{d[O_2]}{[O_2]_0} = -k dt$$

Integrating

$$\int_{[O_2]_0}^{[O_2]_t} \frac{d[O_2]}{[O_2]} = -k \int_0^t dt \implies \ln[O_2]_t - \ln[O_2]_0 = -kt$$

$$\ln \frac{[O_2]_t}{[O_2]_0} = -kt$$

The quotients $[O_2]_t/[O_2]_i$ were then determined, where $[O_2]_t$ is the concentration of dissolved oxygen at time t , and $[O_2]_i$ is the initial concentration of dissolved oxygen (assumed to be 7,0 mg/L). The decimal logarithm of these quotients was represented versus time for each experiment. From those representations, as shown in **figures 1b-1d**, the time segments in which experimental points followed a linear trend were selected by careful visual inspection and by studying the corresponding regression residuals. As within a linear segment it can be assumed that the kinetics follow a pseudo first order model, the integral equation for such a model was applied:

$$\log \frac{[O_2]_t}{[O_2]_0} = -0,43 kt$$

Then, within each linear segment, linear regression analysis was applied in order to determine the corresponding slopes which were divided by -0,43 to obtain the corresponding apparent kinetic constant for such linear segment. As in our experiment, oxygen was also present in the headspace, the apparent constant has to be corrected to take into account such fact. This was done by using the expression:

$$k_{\text{aparent}} = \frac{k_{\text{real}}}{1 + \frac{x}{1-x}}$$

where x represents the fraction of O_2 present in gas phase referred to the total amount of O_2 contained in the tube. Attending to the model, for one unit of time (expressed in days in our case), it holds that:

$$\frac{[O_2]_t}{[O_2]_0} = e^{-k}$$

which indicates that e^{-k} represents the fraction of dissolved O_2 not consumed by the wine in one day, and hence, that $1 - e^{-k}$ represents the fraction of dissolved O_2 consumed by the wine in one day. In the first 30 minutes the amount of O_2 consumed was directly measured.

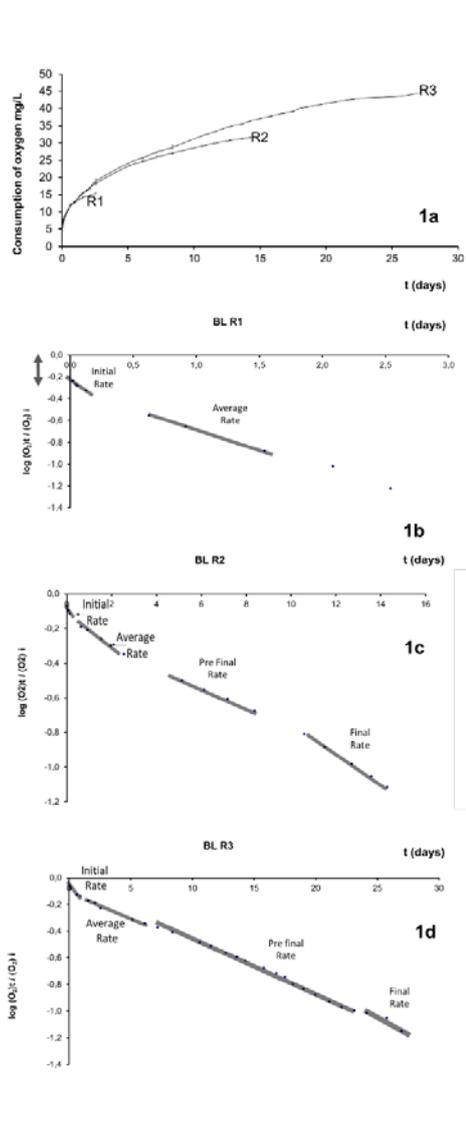


Figure 1. Figure 1a. Mass of oxygen consumed per volume of wine versus time, sample BL. R1 (9-11 mg of oxygen per liter of wine), R2 (22 to 35 mg of oxygen per liter of wine), R3 (35 to 53 mg of oxygen per liter of wine). Logarithm of the quotients $[O_2]_t/[O_2]_i$ versus time, sample BL. $[O_2]_t$: concentration of

dissolved oxygen at time t . $[O_2]_i$: initial concentration of dissolved oxygen. R1 (9-11 mg oxygen/L wine) (1b), R2 (22 to 35 mg oxygen/L wine) (1c), R3 (35 to 53 mg oxygen/L wine) (1d).

2.3.7. Data treatment and Statistical Analysis

The different OCRs were compared by means of two-way ANOVA and Duncan tests using SPSS v15. (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, IL, USA). Correlation studies and simple Student t test were directly carried out with Excel 2013 (Microsoft, Washington, USA). Cluster analysis using Pearson Correlation coefficient as similarity measurement was carried out with SPSS. Principal Component Analysis and Partial Least Square Regression analysis were carried out using The Unscrambler 9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway).

3. Results and discussion

3.1. O₂ consumption plots

Eight different red wines have been subjected to 4 different controlled oxidation procedures (R1, R2, R3 and S). Basic data about the duration of each experiment and the total amounts of O₂ consumed are summarized in **table 2**. The procedure name S was similar to that described in a previous paper in which the wine was saturated with air in consecutive air saturation cycles [124]. This procedure makes it possible to obtain two different OCRs per wine (initial and average), which in this paper will be used for reference purposes. In the procedures named as R, a controlled volume of wine was contacted with a perfectly known amount of air and enclosed in a completely air-tight tube containing oxygen sensors (see methods). The tubes were then incubated at controlled temperature in a shaker. Shaking was essential to ensure a perfect mixing of the wine and the air, so that it can be assumed that the amount of oxygen dissolved in wine is at any time in equilibrium with the oxygen remaining in the headspace. This assumption makes it possible to get an estimation of the total mass of oxygen contained in the tube just by measuring the oxygen dissolved in the liquid. This is convenient since sensors in the gas phase often give biased results because of the vapours condensed in the walls of the tubes. In R1 experiments, the volume of air within the tubes was chosen so that the total amount of O₂ within the tube was between 9-11 mg

per L of wine, as seen in **table 2**. In in R2 the tubes contained between 22 and 35 mg/L of O₂, and in R3 between 35 and 53 mg/L. In these two last experiments the exact amount of O₂ was chosen so that each wine was exposed to approximately a fixed amount of O₂ (18 mg/L in R2 or 32 mg/L in R3) plus to the amount required to completely oxidize its total SO₂.

Experiment	Duration		O ₂ consumed		Overall Average OCR	
	(days, except otherwise indicated)		(mg/L)		(mg/L/day)	
	Overall range	Overall average	Overall range	Overall average	Overall range	Overall average
R1	2.54-7.86	5.45	9.35-11.3	10.3	1.3-4.2	2.19
R2	14.3-33.7	21.1	22.5-35.4	27.7	0.9-2.0	1.39
R3	19.5-52.7	36.7	35.0-53.0	41.8	0.8-1.8	1.23
S	13.7-20.7	16.9	19.0-21.2	20.2	1.0-1.6	1.22

Time Segment	Segment range	Segment average	Segment range	Segment average	Segment range	Segment average
Explosive (R1)	30 min	-	0-3,31	1,63	0-159	77,4
Initial-R1	0,72-2,86 h	1,34 h	0,34-3,1	1,39	9,85-44,3	24,6
Initial-R2	0,72-2,77 h	1,26 h	0,05-1,82	0,81	1,67-60,7	18,2
Initial-R3	0,72-2,64 h	1,71 h	0,09-2,25	1,09	0,90-34,3	17,6
Average R1	1,49-5,07	2,38	0,93-8,0	6,68	1,10-4,24	2,21

Average R2	2,49-5,85	4,16	8,58-13,6	11,1	2,15-1,05	2,84
Average R3	2,18-16,4	7,45	9,23-25,0	16,0	1,37-4,34	2,84
Pre-final R2	5,02-21,8	9,70	5,95-19,4	10,6	0,74-1,92	1,20
Pre-final R3	7,96-27,6	16,2	7,10-22,8	16,3	0,68-1,52	1,05
Final R2	3,71-12,2	6,90	2,22-6,37	4,36	0,33-0,85	0,65
Final R3	2,92-35,9	12,7	1,38-19,8	6,58	0,31-1,04	0,56

Table 2. Basic details about the consumption of O_2 in the four different oxidation experiments and in the different time segments identified in the R procedures

The original O₂ consumption plots for the three R procedures applied to one of the wines (coded as BL) can be seen in **figure 1a**. The equivalent S plot is given as supplementary material (SM). The error bars correspond to the standard deviation of two independent replicates, and in all cases were very low, which confirmed that the R procedures were very reproducible. The average duration of the oxidation experiments ranged from 5,5 days for R1 to 37 days for R3, as can be seen in **table 2**. Differences between wines regarding the time required to consume all the O₂ were close to a factor 3 for R1, 2.4 for R2 and 2.7 for R3. This is also appreciated in the ranges of overall average OCRs shown in **table 2**. Those overall average OCR are gross measurements of the relative ability of different wines to consume O₂ and, as expected, tend to decrease when the wine is exposed to larger amounts of O₂, just reflecting the fact that during oxidation wines lose progressively their most active antioxidants. It is remarkable that overall average OCRs are not significantly correlated to any basic wine parameter, except in R3, which keeps a negative correlation to TPI and Folin index (R=-0,73 and -0,77, significant at P<0,05, respectively). A detailed analysis of data derived from the primary plots as the one shown in **Figure 1a** will reveal some important differential features about the way in which different wines consume O₂.

3.2. Kinetic segments in R procedures

Data from the R procedures were logarithmically transformed and the logarithm of the quotients $[O_2]_t/[O_2]_i$ were then plotted versus time, as illustrated in **figure 1b-1d**. The time segments in which there was a linear pattern, typical of pseudo first order kinetics, were carefully selected in each one of the plots. In the particular case represented in **figure 1**, two time segments displaying pseudo-first order kinetics emerged for R1 (**figure 1b**), while four different linear segments could be identified in R2 (**figure 1c**) and R3 (**figure 1d**). Similar patterns were observed in all wines, indicating that the kinetics of O₂ consumption in red wines can be satisfactorily interpreted by pseudo-first order kinetic models in different consecutive time segments whose corresponding kinetic constants change with time. Then, within each linear segment, linear regression analysis was applied in order to determine

the corresponding slopes which were divided by -0,43 (conversion between ln and lg) to obtain the corresponding apparent kinetic constant for such linear segment. Then apparent constants are converted to real kinetic constant to take into account the different relation headspace-liquid for each amount of total oxygen (R1, R2 and R3).

Basic information about the different time segments identified in the three R experiments is summarized in **table 2**. A particularly special case is the oxygen consumption in the first 30 min. Our experiments revealed that some wines are able to consume very fast O₂ when they are first exposed to air after a period in an anoxic environment such as a bottle. This very fast initial OCR was denominated “explosive”, was observed in all R procedures but was measured with precision only in the R1 procedures. Linear segments were named as initial, average, pre-final and final. The two first were identified in the three R experiments, the two latter, just in R2 and R3.

The existence of different kinetic steps has been previously reported. In our previous works using a forced oxidation procedure in consecutive air-saturation cycles, two different kinetic segments were defined, while in a recent work carried out in oak barrels, up to three different steps were identified [134].

3.3. Description of the different kinetic segments

Table 3 summarizes the 13 different kinetic coefficients measured in each one of the eight wines in the S and R1-R3 experiments. In this table, and with the exclusive purpose of comparing rates, all of them are expressed as the (1-e^{-k}) coefficients obtained assuming a pseudo-first order behavior. These coefficients give the proportion of oxygen consumed per day if kinetics would follow a 1st order model (valid for all R rates except “explosive” rates). For instance, 0,732 which is the value given for S initial in SL wine (**table 3**), indicates that this wine would consume 73% .

	S procedure				Explosive Rate		Initial Rate														
	Initial		Average		R1		R1		R2		R3										
	Average	%RSD	Average	%RSD	Average	%RSD	Average	%RSD	Average	%RSD	Average	%RSD									
SL	E	0,732	2,42	C	0,326	4,13	G	0	-	AB	0,963 ^a	3,90	A	0,979 ^a	1,45	B	0,688 ^b	7,29			
TS	C	0,898	5,12	A	0,361	3,22	B	10,7	2,64	AB	0,970 ^a	3,68	A	0,973 ^a	0,505	A	0,978 ^a	0,54			
BL	A	1,55	0,409	B	0,50	2,81	C	8,75	8,88	A	0,999 ^a	6,87E-03	A	1,00 ^a	2,09E-02	A	0,998 ^a	0,14			
CH	F	0,631	2,58	C	0,311	4,78	E	5,10	16,6	AB	0,940 ^a	1,25	A	0,936 ^a	3,65	A	0,978 ^a	1,43			
MF	B	0,985	3,59	B	0,490	2,17	CD	7,60	7,44	B	0,877 ^a	1,49	C	0,766 ^a	8,75	A	0,860 ^a	8,41E-02			
TP	C	0,892	0,793	D	0,269	0,526	A	16,1	1,75	AB	0,913 ^a	2,22	A	0,960 ^a	2,24	A	0,929 ^a	2,92			
HV	G	0,299	8,99	D	0,245	1,73	F	3,00	4,71	C	0,612 ^a	18,2	B	0,839 ^a	4,14	B	0,708 ^a	20,5			
BS	D	0,818	3,89	C	0,313	2,04	D	7,05	17,1	B	0,864 ^a	6,01	A	0,969 ^a	1,02	A	0,958 ^a	2,85			
Average	0,851		0,352		7,28		0,892		0,928		0,887										
max/min	5,20		2,04		Large		1,63		1,31		1,45										
	Average Rate						Pre- final Rate				Final Rate										
	R1		R2		R3		R2		R3		R2		R3								
	Average	%RSD	Average	%RSD	Average	%RSD	Average	%RSD	Average	%RSD	Average	%RSD	Average	%RSD							
SL	DE	0,463 ^a	5,93	DE	0,373 ^b	2,26	C	0,335 ^b	2,08	F	0,268 ^a	4,05	E	0,209 ^b	3,55	D	0,365 ^a	3,98	E	0,401 ^a	9,64
TS	B	0,676 ^a	1,29	B	0,487 ^b	1,48	A	0,490 ^b	1,66	EF	0,328 ^a	4,55	DE	0,242 ^b	7,81	C	0,445 ^b	2,75	BC	0,555 ^a	4,03
BL	A	0,866 ^a	2,02	A	0,580 ^b	3,03	A	0,498 ^c	4,64	A	0,506 ^a	7,73	A	0,364 ^b	0,116	A	0,631 ^a	4,85	CD	0,509 ^b	2,57
CH	D	0,515 ^a	3,73	DE	0,359 ^b	5,36	C	0,335 ^b	10,7	DE	0,343 ^a	2,27	E	0,216 ^b	11,5	C	0,431 ^a	3,05	DE	0,439 ^a	14,5
MF	BC	0,644 ^a	5,26	C	0,453 ^b	0,396	B	0,421 ^b	0,64	B	0,426 ^a	0,516	B	0,327 ^b	3,18	B	0,568 ^b	0,113	AB	0,648 ^a	3,35
TP	B	0,763 ^a	8,46	E	0,345 ^b	0,218	C	0,318 ^b	5,88	DE	0,356 ^a	0,650	BC	0,301 ^b	6,89	A	0,661 ^a	1,73	BC	0,571 ^b	8,36
HV	E	0,440 ^a	0,238	D	0,381 ^b	0,444	C	0,296 ^c	0,333	CD	0,378 ^a	1,53	CD	0,269 ^b	0,451	C	0,422 ^b	9,03	A	0,697 ^a	0,216
BS	C	0,663 ^a	3,44	B	0,491 ^b	4,58	A	0,475 ^b	3,22	BC	0,399 ^a	2,36	E	0,230 ^b	9,23	C	0,443 ^a	7,40	DE	0,424 ^a	13,2
Average	0,629		0,434		0,396		0,379		0,270		0,496										
max/min	1,97		1,69		1,69		1,70		1,75		1,81										

Table 3. Kinetic coefficients expressed as $1-e^{-k}$ (days⁻¹) measured in each one of the eight wines in the S and R1-R3 experiments. These coefficients represent the fraction of dissolved O₂ consumed by the wine in one day. R1 (9-11 mg oxygen/L wine). R2 (22 to 35 mg oxygen/L wine). R3 (35 to 53 mg oxygen/L wine). Different capitals indicate significant differences between wines within each procedure and oxygen level (Duncan test $p = 0.05$). Different lowercase letters in superscript indicate significant differences between oxygen level (Duncan test $p = 0.05$).

of its content in oxygen in one day (if the 1st order approximation holds true). The table also summarizes the existence of significant differences within each OCR type. In fact, a wine in R1 procedure consumed 3,3 mg/L in just 30 minutes, as shown in **table 2**, in clear contrast with another wine which did not consume any.

Explosive rates: These are the largest rates observed. As seen in **table 2**, they range from 0 to 3,3 mg/L in just 30 minutes, although most are between 1 and 1,6 mg/L. If such a rates could be kept for a whole day, this would be equivalent to a consumption above 150 mg/L/day (**table 2**), or to the ability to consume 16 times the initial oxygen content, whatever this is (**table 3**). These so-large values have not been previously reported; for instance, the largest value found in a recent work was 0,85 mg/L in 30 min [126], but they have been consistently reproduced in our laboratory. As seen in **table 3**, seven out of the 8 explosive OCRs significantly differed between samples.

Initial OCRs were the fastest after explosive rates and were observed in quite short periods of time, between 1 and less than 3 hours, as seen in **tables 2-3**. This fact made that their measurement was difficult and in some cases imprecise, which was particularly evident for the HV sample (see **table 3**). The amounts of oxygen consumed during those periods were quite variable, between less than 0,1 mg/L and more than 3 mg/L, which accounts for something between 1 and 7% of the total oxygen consumed. The rates were quite high and in all cases ranged between 0,612 and 1, meaning that in this kinetic segment the wines are able to consume between 61% and 100% of the oxygen present per day. Because of the imprecision only 2 or 3 significantly different levels were identified.

Average rates were observed during longer periods of time, ranging from 1,5 days to more than 16 days, as seen in **table 2**. The amounts of oxygen consumed in these segments were also quite variable, between just 0,9 mg/L and 25 mg/L. Average rates measured in R1 were higher than those measured in R2 and these ones higher than those measured in R3. In these

kinetic segments the proportion of oxygen consumed ranged from 17 to 54% of the total, depending on the wine and the dose. Up to five significantly different levels were identified, as seen in **table 3**.

Pre-final rates could be measured only in R2 and R3, and were also highly variable regarding both the duration (5-27 days) and the amount of oxygen consumed (6-23mg/L), as seen in **table 2**. In kinetic terms, the pre-final kinetic segments were the slowest with OCRs below 0,36 in R3 and below 0,51 in R2 as seen in Table 3. Regarding duration, pre-final segments were in general the longest of all kinetic segments with 10,6 and 16,3 days, respectively. In this segment on average 30% of the total oxygen was consumed. Up to six significantly different levels were identified.

In the final kinetic segment, differences between rates measured in R2 and R3 were very large. The duration in R3 lasted from less than 3 days to more than 35, and the oxygen consumption during the segment ranged from just 1,4 mg/L to nearly 20 mg/L, as seen in **table 2**.

3.4. Dimensions required to understand red wine oxygen consumption

One remarkable question is how much variability is there among wines and procedures regarding the way in which red wine consumes oxygen, and how many variables should be really measured in order to retain a significant part of such variability. These questions were addressed by using Principal Component Analysis and Cluster Analysis on the data summarized in **table 3**. The Principal Component Plot is given in **figure 2**, which also contains the most relevant information obtained from the Cluster analysis (not shown). As can be seen in the figure, cluster analysis identifies 4 major independent dimensions in the whole dataset, one of which can be further subdivided into three additional subdimensions. Therefore, it can be stated that in order to completely retain most of the information provided by O₂ consumption kinetics, six independent dimensions or oxidation stages should be considered:

- A. Explosive stage: Explosive rate or R3 initial rate
- B. Preinitial stage: R1 initial rate or R2 initial rate
- C. Final stage: R3 final rate
- D. Rest of rates
 - 1. Initial stage: R1 Average rate or S Initial rate
 - 2. Average stage: R2 Average rate or R3 Average rate or S Average rate
 - 3. Prefinal stage: R2 pre-final rate or R3 pre-final rate or R2 final rate.

Quite surprisingly, the two kinetic parameters defined in a previous work using the S procedure, are both contained within one of the four major dimensions. This suggests that the S procedure, at least as it was initially proposed, losses potentially important information regarding OCRs at the beginning (preinitial and explosive stages) and at the end (final phase) of the oxidation. This should have been expected, explosive and initial rates take place in very short periods of time and in S procedures the control of oxygen level was not as fast as to be able to describe these kinetic segments. For the final part, S procedures in the present experiment involved the consumption of “only” 19-21 mg/L and in the previous one up to 22 mg/L, while final stage takes place after the wine has consumed more than 30 mg/L of oxygen. Anyway, it is clear that R procedures do provide kinetic information which includes that contained in S procedures. In particular, initial rates in S procedures are equivalent to R1 average rate (initial phase), while average rates in S procedures are equivalent to R2 or R3 average rates (average stage). It should be also remarked, that the Overall Average OCRs described at the beginning of the paper do not add any additional dimension as they are a mere average between average and pre-final rates (data not shown).

Regarding the studied wines, not much can be said about their relative position in the PCA plane (**figure 2**). Wine HV is the slowest in all kinetic segments, except in R3 final. This was a young Grenache wine with the slowest total SO₂ dose. On the other hand, the fastest in all kinetic segments was BL, which was an old wine from Tempranillo. With the present

dataset, the influence on O₂ consumption kinetics of varietal origin, wine age or aging time is not obvious.

The previous discussion suggests that in order to retain most of the kinetic information two independent oxidation procedures providing information about the six basic dimensions should be carried out. The first one should reproduce R1 procedures and provide measurements about explosive, preinitial and initial stages. The second one would reproduce R3 procedure and should provide a measurement for average, prefinal and final stages.

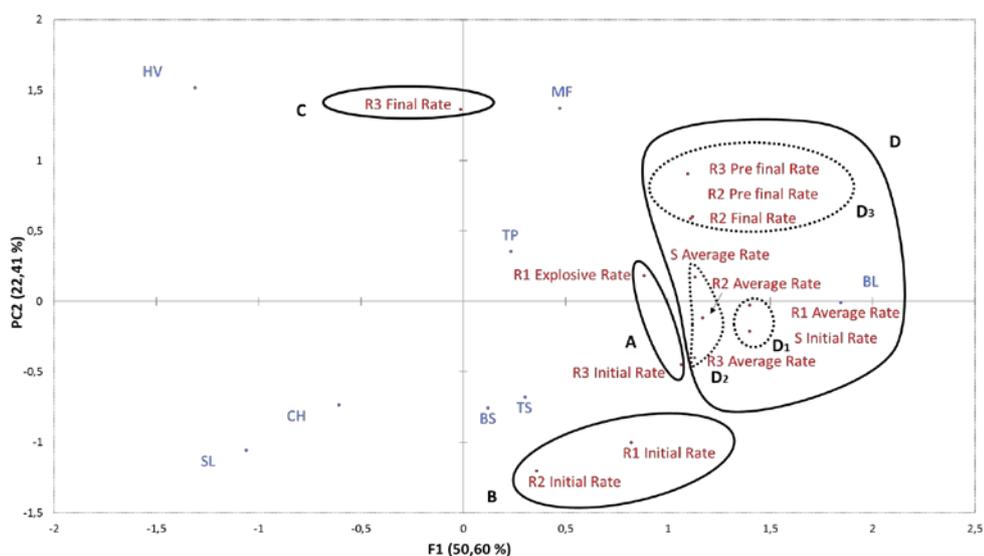


Figure 2. PCA showing the projection of samples and kinetic parameters. A: Explosive stage, B: Pre initial stage, C: Final stage, D1: Initial stage, D2: Average stage, D3: Pre final stage.

3.5. PLS models relating wine consumption kinetics to the wine initial chemical composition

As found in previous reports, kinetic parameters are just poorly correlated to the wine chemical composition and, in fact, no component was found to be positively correlated to the kinetic coefficients. This simply confirms that O₂ consumption kinetics are contributed by multiple factors none of which becomes systematically dominant in all samples and segments. PLS modelling, however, has made it possible to obtain models with a

satisfactory predictive power for all the previous six stages, but for the final one. Results are summarized in **table 4**.

Model quality parameters	Explosive	Preinitial	Initial	Initial	Average	Average	Prefinal	Prefinal
Explained variance (%)	99,7	99,9	99,3	99,4	100	99,9	99,1	98,4
Explained variance by cross validation (%)	94,2	95,6	97,0	95,6	92,9	83,25	94,3	90,2
RMSE (days-1)	0,23	0,0044	0,012	0,010	0,0012	0,0022	0,0050	0,0066
RMSE (days-1, cross validation)	1,3	0,028	0,027	0,033	0,024	0,037	0,014	0,0188
N° of principal components	5	5	4	4	5	5	4	4
Model components								
B0	7,2875	0,8922	0,6289	0,6289	0,3962	0,3961	0,2698	0,2699
Total Acetaldehyde	-2,117	-0,0346	-0,0888	-0,0946	-0,0607	-0,0463	-0,0221	-0,0272
Free Acetaldehyde	-2,245	-	-	-	-0,0534	-0,0583	-0,0052	0,0042
Cu	-	-	-	-	0,0111	-	-	-
Cu/Fe	3,032	-	-	0,0152	-	0,0046	-	0,0155
Mn	-	0,0159	-	-	0,0125	0,0208	-	-
Galic Acid	-	-	-0,0934	-0,0816	-	-0,0072	-	-
Epicatechin-3-O-gallate	-	-0,0621	-	-	-0,0291	-0,0438	-	-
Total sulphur dioxide	-	0,0355	-	-	-	-	-	-
Free sulphur dioxide	-	0,0500	-	-	0,0154	-	-	-
Absorbance 520nm	2,688	0,0278	-	-	-	-	-	-
Absorbance 620nm	0,593	-	0,0356	0,0265	-	-	0,0435	0,0343
Tannins	-	-0,0483	-	-	-	-	-	-
Guaiacylpyranopeonidin-3-O-glucoside	2,193	-	0,0184	0,029	-	-	-	-
Guaiacylpyranopetunidin-3-O-glucoside	-	-	-	-	-	-	0,0429	0,0500
Mean Degree of Polymerization	-	-	-	-	-	-	0,0573	0,0456

Table 4. Summary of the different PLS models explaining the kinetic coefficients of the five first kinetic stages in function of the wine chemical composition

- The model for the explosive stage suggests that this one depends critically and positively on its Cu/Fe ratio, its 520 nm absorbance, and on its content in guaiacylpyranopeonidin-3-O-glucoside. Conversely, the wine content in acetaldehyde contributes negatively to the explosive rate.
- The models for the preinitial stage suggest that kinetic coefficients are positively related to the wine free SO₂ and to its Mn content. On the contrary, wine contents in total acetaldehyde, epicatechine-3-O-gallate and tannins contribute negatively to OCRs in this preinitial stage.
- The model for the initial stage also suggests that total acetaldehyde and gallic acid contribute negatively to OCRs in this initial phase, while 620nm absorbance contributes positively.
- The model for the average stage suggests that total and free acetaldehyde, gallic acid and epicatechin-3-O-gallate contribute negatively to OCRs in this stage, while Mn contributes positively.
- The model for the prefinal stage suggests that total acetaldehyde contribute negatively to OCRs in this stage, while 620nm absorbance, the mean degree of polymerization and guaiacylpyranopetunidin-3-O-glucoside contribute positively to OCRs in this prefinal stage.

The most remarkable finding of the modeling work is the consistent role that all models attribute to total acetaldehyde. This has already been observed in the modelization of the initial OCR measured by the saturation in cycles procedure [135]. As was therein discussed, it is thought that the levels in wine of acetaldehyde are basically an indirect measurement of the wine content in Acetaldehyde Reactive Polyphenols (ARPs). This group of reactive polyphenols should play, attending to this undemonstrated hypothesis, a major role on the oxygen consumption of the wine.

Free acetaldehyde appears with a negative coefficient in the explosive and average stages. This should be attributed to its ability to interact with SO₂; the presence of higher amounts of free acetaldehyde, would displace the $\text{SO}_2 + \text{CH}_3\text{CHO} \leftrightarrow \text{CH}_3\text{CHOHSO}_3^-$ equilibrium to the right, removing free SO₂ from the medium. A smaller availability of this component would slow O₂ consumption likely because some quinones will endure longer.

A second observation in close agreement with previous results [124] is the positive role played by compounds responsible for the absorbance at 620 nm (blue colorants) in several of the kinetic segments [64]. Moreover, red pigments and some anthocyanins have shown positive role in explosive stage.

The third worth mentioning remark is the significant role played by Mn in the preinitial and average stages. As recently proposed by Danilewicz [78] this cation, which theoretically only has one stable redox state in acid media -Mn(II)-, would react with a Fe(III)-superoxo complex generating the strong oxidant Mn(III). Just little amounts of this oxidant would suffice to accelerate the oxidation of the different wine polyphenols. According to the model, levels of Mn would be critical in determining at least two OCRs. The enhancing effect of Mn in the consumption of O₂ by white wine has been demonstrated by Danilewicz and has also been previously suggested by PLS modeling [124].

Models also attribute an important role to gallic acid, in this case as negative contributor to OCRs. Such negative role has been also consistently found in previous works [124, 135]. Gallic acid and some of their esters can form different dimeric and polymeric complexes with copper at acid pH [136] and it is known to form quite strong complexes with iron [137, 138]. Similar complexes with Mn have not been studied in depth, but there is some evidence about the ability of gallic acid and gallate derivatives to coordinate to Mn(II) resulting in inhibition of some fucosyltransferases [139]. This

evidence would support the hypothesis that gallic acid and gallates would form complexes with metals which would negatively affect their ability to catalyze the oxidation of polyphenols, since chelation of metal ions can prevent free radical reactions [137].

It is noteworthy the fact that those models, leaving aside the explosive stage, do not seem to attribute to copper a role as important as it has been mentioned in other reports [1, 119, 123]. It should be mentioned, however, that copper can take part positively in all the models, albeit with smaller regression coefficients. This confirms that OCRs are positively related to copper content although in this particular work, other components seem to be more influential.

Finally, explosive stage model indicates that iron is also relevant in OCR, but most surprisingly, explosive OCR is negatively related to wine iron content. This may suggest that the kinetically most critical step is related to copper availability, in accordance with previous reports; and such availability would improve with increasing amounts of iron which would compete with copper for different ligands.

4. References

1. Ugliano, M., *Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(26): p. 6125-6136.
2. Waterhouse, A.L., G.L. Sacks, and D.W. Jeffery, *Understanding Wine Chemistry*. Understanding Wine Chemistry 2016. 1-443.
3. Oliveira, I. and V. Ferreira, *Modulating Fermentative, Varietal and Aging Aromas of Wine Using non-Saccharomyces Yeasts in a Sequential Inoculation Approach*. Microorganisms, 2019. **7**(6).
4. Tarko, T., et al., *The Impact of Oxygen at Various Stages of Vinification on the Chemical Composition and the Antioxidant and Sensory Properties of White and Red Wines*. International journal of food science, 2020. **2020**: p. 7902974-7902974.
5. Singleton, V.L. and T.E. Kramling, *BROWNING OF WHITE WINES AND AN ACCELERATED TEST FOR BROWNING CAPACITY*. American Journal of Enology and Viticulture, 1976. **27**(4): p. 157-160.
6. Ferreira, et al., *Key Changes in Wine Aroma Active Compounds during Bottle Storage of Spanish Red Wines under Different Oxygen Levels*. Journal of agricultural and food chemistry, 2014. **62**(41): p. 10015-27.
7. du Toit, W., et al., *Oxygen in Must and Wine: A review*. S. Afr. J. Enol. Vitic., 2006. **27**: p. 76-94.
8. Schneider, V., *Must hyperoxidation: A review*. American Journal of Enology and Viticulture, 1998. **49**(1): p. 65-73.
9. Boulton, R.B., et al., *Principles and practices of winemaking*. Beijing: China Light Industry Press., 2001(1): p. 15-27.
10. Cano-Lopez, M., et al., *Effect of micro-oxygenation on color and anthocyanin-related compounds of wines with different phenolic contents*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(14): p. 5932-5941.
11. Wirth, J., et al., *The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines*. Food Chemistry, 2010. **123**(1): p. 107-116.
12. Cejudo-Bastante, M.J., M.S. Pérez-Coello, and I. Hermosín-Gutiérrez, *Effect of wine micro-oxygenation treatment and storage period on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics*. LWT - Food Science and Technology, 2011. **44**(4): p. 866-874.
13. Heras, M.O., et al., *Changes in the volatile composition of red wines during aging in oak barrels due to microoxygenation treatment applied before malolactic fermentation*. European Food Research and Technology, 2008. **226**(6): p. 1485-1493.

14. Rosenfeld, E., et al., *Oxygen consumption by anaerobic Saccharomyces cerevisiae under enological conditions: Effect on fermentation kinetics*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(1): p. 113-121.
15. Gonzalez-Marco, A., N. Jimenez-Moreno, and C. Ancin-Azpilicueta, *Concentration of volatile compounds in Chardonnay wine fermented in stainless steel tanks and oak barrels*. Food Chemistry, 2008. **108**(1): p. 213-219.
16. Smith, P.A., J.M. McRae, and K.A. Bindon, *Impact of winemaking practices on the concentration and composition of tannins in red wine*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2015. **21**: p. 601-614.
17. Gambuti, A., et al., *Sulfur Dioxide and Glutathione Alter the Outcome of Microoxygenation*. American Journal of Enology and Viticulture, 2015. **66**.
18. Cano-Lopez, M., et al., *Oak barrel maturation vs. micro-oxygenation: Effect on the formation of anthocyanin-derived pigments and wine colour*. Food Chemistry, 2010. **119**(1): p. 191-195.
19. McRae, J.M., et al., *Effect of Wine pH and Bottle Closure on Tannins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(47): p. 11618-11627.
20. Danilewicz, J.C., *Reactions Involving Iron in Mediating Catechol Oxidation in Model Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2013.
21. Danilewicz, J.C., *Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper*. American Journal of Enology and Viticulture, 2003. **54**(2): p. 73-85.
22. 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): p. 319-328.
23. Waterhouse, A.L. and V.F. Laurie, *Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses*. American Journal of Enology and Viticulture, 2006. **57**(3): p. 306-313.
24. Kreitman, G.Y., et al., *Reaction Mechanisms of Metals with Hydrogen Sulfide and Thiols in Model Wine. Part 1: Copper-Catalyzed Oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(20): p. 4095-4104.
25. Elias, R.J., et al., *Identification of Free Radical Intermediates in Oxidized Wine Using Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(10): p. 4359-4365.
26. Danilewicz, J.C., *Fe(II):Fe(III) Ratio and Redox Status of White Wines*. American Journal of Enology and Viticulture, 2016. **67**(2): p. 146-152.
27. Kreitman, G., A. Cantu, and A. Waterhouse, *Effect of Metal Chelators on the Oxidative Stability of Model Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**.

-
28. Danilewicz, J.C., *Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper*. American Journal of Enology and Viticulture, 2007. **58**(1): p. 53-60.
 29. Danilewicz, J.C., *Chemistry of Manganese and Interaction with Iron and Copper in Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2016. **67**(4): p. 377-384.
 30. Danilewicz, J.C., *Role of Tartaric and Malic Acids in Wine Oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(22): p. 5149-5155.
 31. Melin, V., et al., *Reduction reactivity of catecholamines and their ability to promote a Fenton reaction*. Inorganica Chimica Acta, 2016. **453**: p. 1-7.
 32. Salgado, P., et al., *The Reactivity and Reaction Pathway of Fenton Reactions Driven by Substituted 1,2-Dihydroxybenzenes*. Environmental Science & Technology, 2017. **51**(7): p. 3687-3693.
 33. Elias, R.J. and A.L. Waterhouse, *Controlling the Fenton Reaction in Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(3): p. 1699-1707.
 34. Remucal, C. and D. Sedlak, *Ligand-Enhanced Reactive Oxidant Generation by Nanoparticulate Zero-Valent Iron and Oxygen*. Environmental Science & Technology, 2008. **42**: p. 6936-41.
 35. Sun, Y.F. and J.J. Pignatello, *CHEMICAL TREATMENT OF PESTICIDE WASTES - EVALUATION OF FE(III) CHELATES FOR CATALYTIC HYDROGEN-PEROXIDE OXIDATION OF 2,4-D AT CIRCUMNEUTRAL PH*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. **40**(2): p. 322-327.
 36. Rietjens, I., et al., *The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2002. **11**(3-4): p. 321-333.
 37. Mahmoud, M.A.A., et al., *Ascorbic acid modifies the free radical scavenging behaviour of catechin: An insight into the mechanism*. Food Research International, 2013. **51**(2): p. 907-913.
 38. Zoecklein, B.W.F., K. C.; Gump, B. H.; Nury, F. S., *Wine Analysis and Production*.
. 2013(3).
 39. Danilewicz, J.C. and P.J. Wallbridge, *Further Studies on the Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfite in Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2010. **61**(2): p. 166-175.
 40. Cheynier, V., *Oxygen in wine and its role in phenolic reactions during aging*. Uses of gases in winemaking, 2002. (eds Allen, M., Bell, S., Rowe, N., Wall, G.), Australian Society of Viticulture and Enology. Adelaide, SA, Australia,(5): p. 23–27.
 41. Bueno, M., et al., *Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation*. Frontiers in Chemistry, 2018. **6**.
-

42. Singleton, V.L., *OXYGEN WITH PHENOLS AND RELATED REACTIONS IN MUSTS, WINES, AND MODEL SYSTEMS - OBSERVATIONS AND PRACTICAL IMPLICATIONS*. American Journal of Enology and Viticulture, 1987. **38**(1): p. 69-77.
43. CHEYNIER, V., C. OWE, and J. RIGAUD, *Oxidation of Grape Juice Phenolic Compounds in Model Solutions*. Journal of Food Science, 1988. **53**(6): p. 1729-1732.
44. Kilmartin, P.A., H.L. Zou, and A.L. Waterhouse, *A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(4): p. 1957-1965.
45. Marquez, K., et al., *Production of hydroxyl radicals and their relationship with phenolic compounds in white wines*. Food Chemistry, 2019. **271**: p. 80-86.
46. McArdle, J.V. and M.R. Hoffmann, *KINETICS AND MECHANISM OF THE OXIDATION OF AQUATED SULFUR-DIOXIDE BY HYDROGEN-PEROXIDE AT LOW PH*. Journal of Physical Chemistry, 1983. **87**(26): p. 5425-5429.
47. Kaur, H. and B. Halliwell, *DETECTION OF HYDROXYL RADICALS BY AROMATIC HYDROXYLATION*, in *Oxygen Radicals in Biological Systems, Pt C*, L. Packer, Editor 1994. p. 67-82.
48. Masarwa, M., et al., *REACTIONS OF LOW-VALENT TRANSITION-METAL COMPLEXES WITH HYDROGEN-PEROXIDE - ARE THEY FENTON-LIKE OR NOT .1. THE CASE OF CU+AQ AND CR-2+AQ*. Journal of the American Chemical Society, 1988. **110**(13): p. 4293-4297.
49. Elias, R.J., et al., *Key Factors Affecting Radical Formation in Wine Studied by Spin Trapping and EPR Spectroscopy*. American Journal of Enology and Viticulture, 2009. **60**(4): p. 471-476.
50. Kreitman, G.Y., et al., *Reaction Mechanisms of Metals with Hydrogen Sulfide and Thiols in Model Wine. Part 2: Iron- and Copper-Catalyzed Oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(20): p. 4105-4113.
51. Laurie, V.F. and A.L. Waterhouse, *Oxidation of glycerol in the presence of hydrogen peroxide and iron in model solutions and wine. Potential effects on wine color*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(13): p. 4668-4673.
52. Es-Safi, N.E., et al., *New polyphenolic compounds with xanthylium skeletons formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(12): p. 5211-5217.
53. Escudero, A., et al., *Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 4268-4272.
54. Ferreira, A.C.S., T. Hogg, and P.G. de Pinho, *Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(5): p. 1377-1381.

-
55. Kreitman, G.Y., V.F. Laurie, and R.J. Elias, *Investigation of Ethyl Radical Quenching by Phenolics and Thiols in Model Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(3): p. 685-692.
 56. Gislason, N.E., B.L. Currie, and A.L. Waterhouse, *Novel Antioxidant Reactions of Cinnamates in Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(11): p. 6221-6226.
 57. Ribéreau-Gayon, P., et al., *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. New York ed. Vol. 2. 2006, Chichester: John Wiley & Sons.
 58. Danilewicz, J.C., J.T. Seccombe, and J. Whelan, *Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2008. **59**(2): p. 128-136.
 59. Monagas, M., C. Gomez-Cordoves, and B. Bartolome, *Evolution of polyphenols in red wines from Vitis vinifera L. during aging in the bottle - I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins*. European Food Research and Technology, 2005. **220**(5-6): p. 607-614.
 60. Petrozziello, M., et al., *Impact of Increasing Levels of Oxygen Consumption on the Evolution of Color, Phenolic, and Volatile Compounds of Nebbiolo Wines*. Frontiers in Chemistry, 2018. **6**.
 61. Arapitsas, P., et al., *The influence of storage on the "chemical age" of red wines*. Metabolomics, 2014. **10**(5): p. 816-832.
 62. Puertolas, E., et al., *Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle*. Food Chemistry, 2010. **119**(3): p. 1063-1070.
 63. Monagas, M., B. Bartolome, and C. Gomez-Cordoves, *Evolution of polyphenols in red wines from Vitis vinifera L. during aging in the bottle - II. Non-anthocyanin phenolic compounds*. European Food Research and Technology, 2005. **220**(3-4): p. 331-340.
 64. Timberlake, C.F. and P. Bridle, *INTERACTIONS BETWEEN ANTHOCYANINS, PHENOLIC COMPOUNDS, AND ACETALDEHYDE AND THEIR SIGNIFICANCE IN RED WINES*. American Journal of Enology and Viticulture, 1976. **27**(3): p. 97-105.
 65. Fulcrand, H., et al., *An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation*. Phytochemistry, 1997. **46**(2): p. 223-227.
 66. Bakker, J., et al., *Identification of an anthocyanin occurring in some red wines*. Phytochemistry, 1997. **44**(7): p. 1375-1382.
 67. Fulcrand, H., et al., *A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins*. Phytochemistry, 1998. **47**(7): p. 1401-1407.
 68. SarniManchado, P., et al., *Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments*. Journal of Food Science, 1996. **61**(5): p. 938-941.
-

69. Ma, L., et al., *Tracing oxidation reaction pathways in wine using ¹³C isotopolog patterns and a putative compound database*. *Analytica Chimica Acta*, 2018.
70. Mouls, L. and H. Fulcrand, *Identification of new oxidation markers of grape-condensed tannins by UPLC–MS analysis after chemical depolymerization*. *Tetrahedron*, 2015. **71**.
71. Li, H., A. Guo, and H. Wang, *Mechanisms of oxidative browning of wine*. *Food Chemistry*, 2008. **108**(1): p. 1-13.
72. Boulton, R.B., et al., *Principles and practices of winemaking*. New York ed2001, Chichester: John Wiley & Sons.
73. Oliveira, C.M., et al., *Oxidation mechanisms occurring in wines*. *Food Research International*, 2011. **44**(5): p. 1115-1126.
74. Ugliano, M., et al., *Evolution of 3-Mercaptohexanol, Hydrogen Sulfide, and Methyl Mercaptan during Bottle Storage of Sauvignon blanc Wines. Effect of Glutathione, Copper, Oxygen Exposure, and Closure-Derived Oxygen*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. **59**(6): p. 2564-2572.
75. Fracassetti, D., et al., *Light-induced reactions of methionine and riboflavin in model wine: Effects of hydrolysable tannins and sulfur dioxide*. *Food Chemistry*, 2019. **298**.
76. Martínez, J. and E.L.y.E. García-Escudero, *Efecto varietal sobre el contenido de glutatión en mostos y vinos blancos*. 37th World Congress of Vine and Wine and 12th General Assembly of the OIV (Part 2), 2014: p. 06003.
77. Bueno, M., V. Carrascón, and V. Ferreira, *Release and Formation of Oxidation-Related Aldehydes during Wine Oxidation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016. **64**(3): p. 608-617.
78. Danilewicz, J.C., *Reaction of Oxygen and Sulfite in Wine*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2016. **67**(1): p. 13-17.
79. Nikolantonaki, M. and A.L. Waterhouse, *A Method To Quantify Quinone Reaction Rates with Wine Relevant Nucleophiles: A Key to the Understanding of Oxidative Loss of Varietal Thiols*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. **60**(34): p. 8484-8491.
80. Bradshaw, M.P., P.D. Prenzler, and G.R. Scollary, *Ascorbic acid-induced browning of (+)-catechin in a model wine system*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(2): p. 934-939.
81. Fredericks, I.N., M. du Toit, and M. Krugel, *Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines*. *Food Microbiology*, 2011. **28**(3): p. 510-517.
82. Guerrero, R.F. and E. Cantos-Villar, *Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review*. *Trends in Food Science & Technology*, 2015. **42**(1): p. 27-43.

-
83. Roussis, I.G., M. Patrianakou, and A. Drossiadis, *Protection of Aroma Volatiles in a Red Wine with Low Sulphur Dioxide by a Mixture of Glutathione, Caffeic Acid and Gallic Acid*. South African Journal of Enology and Viticulture, 2013. **34**(2): p. 262-265.
84. Jackowetz, J.N. and R.M. de Orduna, *Survey of SO₂ binding carbonyls in 237 red and white table wines*. Food Control, 2013. **32**(2): p. 687-692.
85. Marrufo-Curtido, A., et al., *Evidencias de los diferentes equilibrios acetaldehído - material polifenólico de los vinos*. Libro de comunicaciones del XIV Congreso Nacional de Investigación Enológica 2018: p. 194-198, ISBN: 978-84-09-12074-1.
86. Loviso, C.L. and D. Libkind, *Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: fusel alcohols*. Revista Argentina De Microbiologia, 2019. **51**(4): p. 386-397.
87. Rapp, A. and G. Versini, *Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines*. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine, ed. J.M. Rantz1991. 156-164.
88. Strecker, A., *On a peculiar oxidation by alloxan*. Justus Liebigs Annalen der Chemie 1862. **123**: p. 363-367.
89. Pripis-Nicolau, L., et al., *Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 3761-3766.
90. Rizzi, G., *Formation of Strecker Aldehydes from Polyphenol-Derived Quinones and α -Amino Acids in a Nonenzymic Model System*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**: p. 1893-7.
91. Oliveira, C.M., et al., *Quinones as Strecker degradation reagents in wine oxidation processes*. Food Chemistry, 2017. **228**: p. 618-624.
92. Delgado, R., *Contribution of Phenolic Compounds to Food Flavors: Strecker-Type Degradation of Amines and Amino Acids Produced by o- and p-Diphenols*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **63**.
93. Hofmann, T. and P. Schieberle, *Formation of aroma-active Strecker-aldehydes by a direct oxidative degradation of Amadori compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 4301-4305.
94. Bakker, J. and C.F. Timberlake, *Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(1): p. 35-43.
95. Peterson, A.L. and A.L. Waterhouse, *H-1 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**(36): p. 6869-6878.
-

96. Guthrie, J. *Carbonyl Addition Reactions: Factors Affecting the Hydrate Hemiacetal and Hemiacetal Acetal Equilibrium Constants*. 1975.
97. Moyano, L., et al., *Analytical study of aromatic series in sherry wines subjected to biological aging*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(25): p. 7356-7361.
98. Camara, J.S., M.A. Alves, and J.C. Marques, *Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing*. Analytica Chimica Acta, 2006. **563**(1-2): p. 188-197.
99. Escudero, A., J. Cacho, and V. Ferreira, *Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study*. European Food Research and Technology, 2000. **211**(2): p. 105-110.
100. Nave, F., et al., *The fate of flavanol-anthocyanin adducts in wines: Study of their putative reaction patterns in the presence of acetaldehyde*. Food Chemistry, 2010. **121**(4): p. 1129-1138.
101. Fulcrand, H., et al., *Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography ion spray mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1996. **752**(1-2): p. 85-91.
102. Baranowski, E.S. and C.W. Nagel, *KINETICS OF MALVIDIN-3-GLUCOSIDE CONDENSATION IN WINE MODEL SYSTEMS*. Journal of Food Science, 1983. **48**(2): p. 419-&.
103. Sheridan, M.K. and R.J. Elias, *Reaction of Acetaldehyde with Wine Flavonoids in the Presence of Sulfur Dioxide*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(45): p. 8615-8624.
104. Rivasgonzalo, J.C., S. Bravo-haro, and C. Santosbuelga, *DETECTION OF COMPOUNDS FORMED THROUGH THE REACTION OF MALVIDIN 3-MONOGLUCOSIDE AND CATECHIN IN THE PRESENCE OF ACETALDEHYDE*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(6): p. 1444-1449.
105. Pissarra, J., et al., *Reaction Between Malvidin 3Glucoside and (+)Catechin in Model Solutions Containing Different Aldehydes*. Journal of Food Science - J FOOD SCI, 2003. **68**: p. 476-481.
106. Pissarra, J., et al., *Structural characterization of new malvidin 3-glucoside-catechin aryl/alkyl-linked pigments*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(17): p. 5519-5526.
107. Pissarra, J., et al., *Isolation and structural characterization of new anthocyanin-alkyl-catechin pigments*. Food Chemistry, 2005. **90**(1-2): p. 81-87.
108. Pissarra, J., et al., *Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl-flavanol pigments in model solutions*. Analytica Chimica Acta, 2004. **513**(1): p. 215-221.
109. Pissarra, J.I., et al., *Contribution and importance of wine spirit to the port wine final quality - initial approach*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. **85**(7): p. 1091-1097.

-
110. Escott, C., et al., *Study of the Interaction of Anthocyanins with Phenolic Aldehydes in a Model Wine Solution*. *Acs Omega*, 2018. **3**(11): p. 15575-15581.
 111. de Azevedo, L.C., et al., *Evaluation of the formation and stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(21): p. 8670-8680.
 112. Bueno, M., J. Zapata, and V. Ferreira, *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**: p. 33-42.
 113. Caille, S., et al., *Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre and post bottling*. *Analytica Chimica Acta*, 2010. **660**(1-2): p. 35-42.
 114. Gambuti, A., et al., *Evolution of Phenolic Compounds and Astringency during Aging of Red Wine: Effect of Oxygen Exposure before and after Bottling*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013. **61**(8): p. 1618-1627.
 115. Ugliano, M., et al., *Oxygen Consumption and Development of Volatile Sulfur Compounds during Bottle Aging of Two Shiraz Wines. Influence of Pre- and Postbottling Controlled Oxygen Exposure*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. **60**(35): p. 8561-8570.
 116. Wirth, J., et al., *Impact of post-bottling oxygen exposure on the sensory characteristics and phenolic composition of Grenache rose wines*. *Food Chemistry*, 2012. **132**(4): p. 1861-1871.
 117. Danilewicz, J.C., *Interaction of polyphenols, oxygen, and sulfite in wine*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2008. **59**(3): p. 346A-346A.
 118. Felipe Laurie, V., et al., *Reactivity of 3-sulfanyl-1-hexanol and catechol-containing phenolics in vitro*. *Food Chemistry*, 2012. **131**(4): p. 1510-1516.
 119. Singleton, V.L., *Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines and Model Systems - Observations and Practical Implications*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1987. **38**(1): p. 69-77.
 120. Vivas, N. and Y. Glories, *Les phénomènes d'oxydoreduction liés à l'levage en barrique des vins rouges: Aspect technologiques*. *Rev. Fr. Oenol.*, 1993(33): p. 33-38.
 121. Vivas, N., N. Vivas de Gaulejac, and M.F. Nonier, *Quelques aspects cinétiques de la consommation de l'oxygène et conséquences technologiques des oxydations dans les vins rouges*. *Rev. des Oenologues*, 2014(150): p. 27-31.
 122. Navarro, M., et al., *Oxygen consumption by oak chips in a model wine solution; Influence of the botanical origin, toast level and ellagitannin content*. *Food Chemistry*, 2016. **199**: p. 822-827.
 123. Vivas, N. and Y. Glories, *Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1996. **47**(1): p. 103-107.

124. Ferreira, et al., *Oxygen Consumption by Red Wines. Part I: Consumption Rates, Relationship with Chemical Composition, and Role of SO₂*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015. **63**(51): p. 10928-10937.
125. Carrascon, V., et al., *Oxygen and SO₂ Consumption Rates in White and Rose Wines: Relationship with and Effects on Wine Chemical Composition*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017. **65**(43): p. 9488-9495.
126. Nevares, I., et al., *On-line monitoring of oxygen as a method to qualify the oxygen consumption rate of wines*. *Food Chemistry*, 2017. **229**: p. 588-596.
127. OIV, *OIV-MA-AS323-04A Sulphur dioxide. Compendium of International Methods of Analysis*, 2009.
128. OIV, *Chromatic Characteristics. Compendium of International Methods of Analysis*, 2009.
129. Singleton, V.L., R. Orthofer, and R.M. Lamuela-Raventos, *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*, in *Oxidants and Antioxidants, Pt A*, L. Packer, Editor 1999. p. 152-178.
130. Gonzalez, A., et al., *Searching the most appropriate sample pretreatment for the elemental analysis of wines by inductively coupled plasma-based techniques*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. **56**(13): p. 4943-4954.
131. Hernandez-Orte, P., et al., *Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method*. *Chromatographia*, 2003. **58**(1-2): p. 29-35.
132. Vallverdu-Queralt, A., et al., *A comprehensive investigation of guaiacyl-pyranoanthocyanin synthesis by one-/two-dimensional NMR and UPLC-DAD-ESI-MSn*. *Food Chemistry*, 2016. **199**: p. 902-910.
133. Ducasse, M.A., et al., *Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines*. *Food Chemistry*, 2010. **118**(2): p. 369-376.
134. Michel, J., et al., *Variations in oxygen and ellagitannins, and organoleptic properties of red wine aged in French oak barrels classified by a near infrared system*. *Food Chemistry*, 2016. **204**: p. 381-390.
135. Carrascon, V., et al., *The kinetics of oxygen and SO₂ consumption by red wines. What do they tell about oxidation mechanisms and about changes in wine composition?* *Food Chemistry*, 2018. **241**: p. 206-214.
136. Pirker, K.F., et al., *Influence of pH on the speciation of copper(II) in reactions with the green tea polyphenols, epigallocatechin gallate and gallic acid*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012. **112**: p. 10-16.
137. Andjelkovic, M., et al., *Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups*. *Food Chemistry*, 2006. **98**(1): p. 23-31.

138. Seemungal, A., A. Petroczi, and D.P. Naughton, *Application of Thin-Layer Chromatography to Rank the Efficacies of Five Antioxidants in Red Wine*. Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc, 2011. **24**(4): p. 320-324.
139. Niu, X.D., et al., *Inhibition of fucosyltransferase VII by gallic acid and its derivatives*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004. **425**(1): p. 51-57.

CHAPTER II

**Formation and accumulation of acetaldehyde
and Strecker aldehydes during red wine
oxidation.**

CHAPTER II

Formation and accumulation of acetaldehyde and Strecker aldehydes during red wine oxidation

1. Introduction

Oxygen is a key factor to achieve wine optimum quality [1]. Some of the improvements linked to an optimized use of oxygen are color stabilization [2-5], the balance of astringency, bitterness and mouthfeel [6, 7] and the decrease of vegetal and green aromas [6, 8]. However, an excessive exposure to oxygen can lead to the development of yellow and brown colors [9] and to wine aroma deterioration [1, 10]. This is related to the development of oxidation-related aldehydes [11] with notes of rancid, honey, raisins, dried fruit or cooked potato [12-14].

The reactions that take place in wine when it is exposed to oxygen have been deeply studied [1, 2, 15-21]. The accepted mechanism of oxidation has been included in the general introduction.

The major oxidation-related aldehyde is acetaldehyde, which is the major oxidation by-product of the Fenton oxidation of wine [22]. From the sensory point of view, however, methional and phenylacetaldehyde play a major role [11]. These aldehydes, together with the other Strecker aldehydes (isobutyraldehyde, 2-methylbutanal, isovaleraldehyde, methional, phenylacetaldehyde) will be similarly formed from the corresponding precursor alcohols by peroxidation, as suggested by different authors [13, 23, 24], but they can be also formed via Strecker degradation of the corresponding precursor amino acid [25, 26] (more details in the general introduction).

Nevertheless, understanding the formation of aldehydes becomes further complicated by the numbers of reversible and irreversible chemical processes in which these compounds are involved. Aldehydes can reversibly bind to SO₂ forming α -hydroxyalkylsulfonates (**figure 10** in the general introduction) [25, 27, 28]. The α -hydroxyalkylsulfonates of acetaldehyde ($K_a = 485 \times 10^3$ [28]) and Strecker aldehydes (isobutyraldehyde $K_a = 2.8 \times 10^3$, isovaleraldehyde $K_a = 29 \times 10^3$, 2-methylbutanal $K_a = 2.6 \times 10^3$, methional $K_a = 50 \times 10^3$ and phenylacetaldehyde $K_a = 17 \times 10^3$ [27]) can be present in non-oxidized wines, acting as an odorless reservoir of oxidation-related aldehydes which will be released during wine oxidation, as SO₂ is depleted and equilibria shifts [29].

The electrophile character of aldehydes makes them reactive to other wine nucleophiles (**figure 10** in the general introduction). They can reversibly bind also to thiols such as glutathione or cysteine to give α -hydroxysulfides [30-32], which seem to play an important

role in beer flavor instability [33]. Similar reversible reactions between aldehydes and the amino group of the amino acids to form imines have been studied in synthetic medium, and do not seem to be relevant [30]. Aldehydes can also react with alcohols resulting in acetals [34-36].

Moreover, some of the most important reactions of aldehydes in wine are those with phenolic compounds (**figure 10** in the general introduction). The A ring of flavonoids is a phloroglucinol

moiety with different positions with nucleophilic strength that can react with carbonyls, especially with those that could have a stable -enol form, such as acetaldehyde, forming a wide range of products, such as pyranoanthocyanins [37-40] that are compounds formed from anthocyanidins with a new pyrano ring. For example vitisin B is the cycloaddition product of acetaldehyde and malvidin-3-*O*-glucoside. In this case the reaction takes place through the enol tautomer of acetaldehyde which attacks at the C-4 and C-5 positions of the anthocyanin and further dehydrates and oxidizes [38]. Another family of reaction products between aldehydes and flavanols or among aldehydes, flavanols and anthocyanins are dimers or longer polymers in which aldehydes act as bridges; for example in the case of acetaldehyde, there is a 8,8-methylmethine bridge, commonly named ethyl bridge [41-48] (**figure 10** in the general introduction). In this last case, the reaction is thought to take place via direct nucleophilic attack on the 8 position to introduce a 1-hydroxyethyl group, which further dehydrates and suffers the nucleophilic attack from a 8 (or 6) position of the second molecule [49].

This broad reactivity of aldehydes takes place concurrently with their formation when levels of free SO₂ are low, which implies that the study of the formation of aldehydes requires to ensure oxidation conditions in which wine SO₂ is completely depleted. These conditions were not reached in previous studies, in which the observed increases in free aldehydes were mostly caused by release from hydroxyalkylsulfonates [29]. In this chapter the main goals are to study the accumulation of acetaldehyde and Strecker aldehydes during the oxidation of wine and to assess the influence of the different compositional factors on such accumulation. For that, eight different red wines were extensively characterized and subsequently subjected to three different controlled O₂ exposure conditions during which the levels of total aldehydes were measured.

2. Material and methods

2.1. Wines

Eight commercial bottled Spanish red wines of different vintages (between 2009 and 2014) and made from four different grape varieties, Garnacha (Grenache), Tempranillo Merlot and Cabernet-Sauvignon, were used in the study. Details of the samples together with some compositional parameters are shown in **table 1**.

Wine Code	Region	Grape Variety ^a	Vintage	Oak aging (months)	Bottle aging (months) Approx.	Ethanol % (v/v)	Total SO ₂ (mg/L)	Free SO ₂ (mg/L)	pH	Abs420	Abs520	Abs620	CI ^b	TPI ^c	Folin-Ciocalteu (mg/L GAE) ^d
Aged wines															
SL	Rioja	T. M. G	2011	12	3,00	13,5	75,6	24,7	3,51	3,82	4,24	0,95	9,01	61,8	2435,1
TS	Toro	T	2012	14	1,84	14,5	76,8	33,7	3,60	3,79	4,27	0,99	9,05	63,1	2591,4
BL	Rioja	T	2010	20	3,34	13,5	40,0	13,3	3,61	4,11	4,40	1,15	9,65	58,2	2304,7
CH	Campo de Borja	G	2009	15	4,75	14,0	31,2	2,61	3,32	5,04	5,35	1,25	11,6	71,5	2654,8
Young wines															
MF	Rioja	T	2014	0	1,00	13,5	25,6	10,6	3,58	3,31	4,37	1,14	8,82	48,8	2067,2
TP	Campo de Borja	G	2013	5	1,59	15,0	28,0	9,83	3,26	4,09	5,73	1,33	11,1	50,8	2051,1
HV	Calatayud	G	2014	0	1,00	14,5	12,8	13,6	3,29	3,15	4,06	0,91	8,12	53,0	2384,4
BS	Campo de Borja	G. T. CS	2014	0	1,00	13,5	32,0	11,3	3,31	3,08	4,29	0,91	8,28	46,9	2094,1

^aGrape Variety – T: Tempranillo, M: Merlot, G: Garnacha, CS: Cabernet-Sauvignon. ^bColor Index, expressed as (A420 + A520+A620). ^cTotal Polyphenol Index, expressed in absorbance ×100. ^dGAE: Gallic Acid Equivalents. **Table 1.** Wines analyzed in the experiment including origin, varietal composition, age and some basic chemical data

2.2. Wine oxidation procedure

Wines were subjected to three different controlled oxygen exposure conditions (R1, R2 and R3) in duplicate following the procedure described in [50] (**figure 1**). In such procedure, perfectly controlled volumes of sterile filtered [51] wine are enclosed with perfectly controlled volumes of air in air-tight tubes (60 mL nominal internal volume from WIT-France, Bordeaux) containing PSt3 oxygen sensors (Nomacorc S.A., Thimister-Clermont, Belgium). The accurate internal volume and weight of each one of the tubes were previously determined by standard calibration practices.

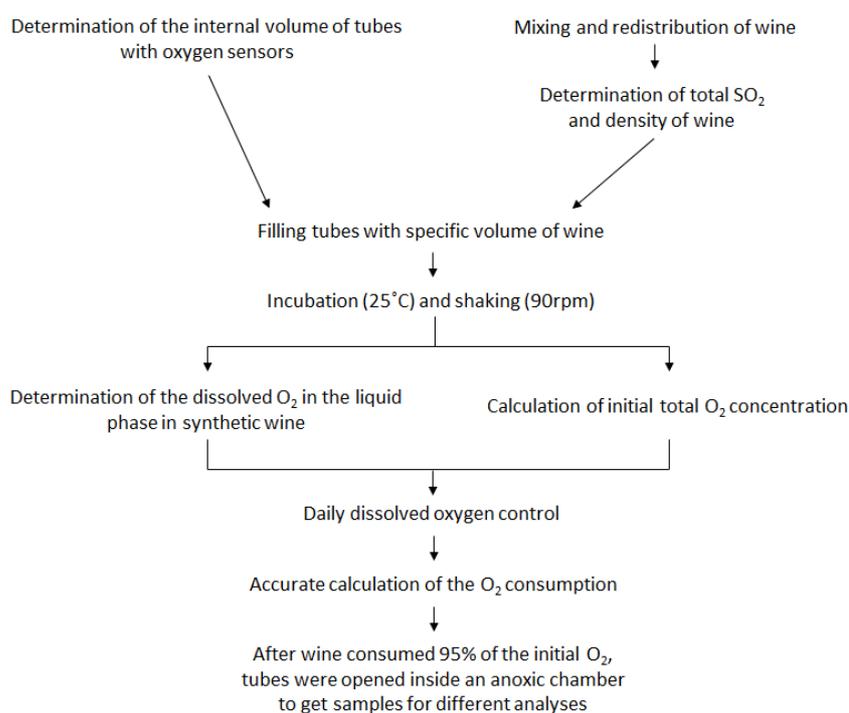


Figure 1. Wine oxidation experiment following the procedure described by Marrufo-Curtido et al [52]

In order to avoid bottle effects, 5 bottles of each one of the 8 wines used in the experiment were opened, mixed in a large beaker, filtered and redistributed back in the 5 bottles. The bottles were purged for 1 min with a 415 mL min⁻¹ flow of argon, were further resealed with a Nomacorc Select 300 CP closure and were stored in the fridge until the beginning of the experiment. One bottle was then used to measure wine density and total sulfur dioxide, parameters required in the procedure.

The experiment begins by opening a bottle, transferring a volume of wine to a graduated cylinder and carefully closing the bottle with a wine saver vacuvin closure (IIC Brands, The Netherlands). Then, a specific volume of wine was quickly transferred to the calibrated WIT

tube. The tube was immediately weighted and closed. The weight of the filled tube is used to determine the exact volume of wine contained in the tube (V_l). The exact volume of headspace (V_g) was estimated by subtracting V_l from V_{int} , the truly internal volume of the tube. The time elapsed between uncorking and closing the WIT tube with the wine was less than 2 minutes. The tubes were then left in a thermostatic bath Grant OLS23 with orbital shaking (90 rpm) at $25 \pm 0,1$ °C to ensure that liquid and gas phases were always in equilibrium. Oxygen was measured with an oxygen analyzer Fibox 3 LCD trace from NomaCorc SA. Oxygen level was monitored each 30 min during the first 3 hours, and then once per day. Each experiment was considered complete when the wine consumed 95% of the initial oxygen. At that time, the WIT tubes were opened inside a glove box without oxygen (oxygen $<0,002\%$) to get samples for analysis avoiding the wine to be further oxidized.

The total amount of oxygen contained initially in the tube was estimated from calibrated tubes filled with volumes of synthetic wine following exactly the same procedures used for the wines. In these cases, the dissolved oxygen in the liquid phase was measured after half an hour inside the incubator shaker to ensure a perfect equilibration. Those concentrations in the liquid phase of equilibrated synthetic wines were R1: $5,0 \pm 0,13$ mg L⁻¹, R2: $6,35 \pm 0,04$ mg L⁻¹ and R3: $6,75 \pm 0,02$ mg L⁻¹ (means of 4 replicates each). Then, knowing that the saturation concentration of O₂ in our wine models completely equilibrated with air (21% v/v in Oxygen) was $7,73 \pm 0,07$ mg L⁻¹ (n=4), the exact volume of headspace (V_g) and of liquid (V_l) within the tubes, and assuming that oxygen in gas and liquid phases are in equilibrium, it is possible to estimate the initial total amount of oxygen. In R1 experiments, the total amount of oxygen contained in the tube corresponded to 9-11 mg of oxygen per liter of wine; in R2 experiments, the total amount within the tubes ranged from 22 to 35 mg of oxygen per liter of wine. In this case, the amount delivered to each wine was 18 mg L⁻¹ plus the stoichiometrically required amount to oxidize all its total SO₂. Similarly, in R3 experiments, the oxygen given to each wine was 32 mg L⁻¹ plus the stoichiometrically required amount to oxidize all its total SO₂ so that total amounts of oxygen within the tubes ranged from 35 to 53 mg of oxygen per liter of wine.

2.3.Solvents and Chemicals

Sodium metabisulfite 99% (Na₂S₂O₅), tartaric acid (99%), glycerol (99,5%), 1,2-propanediol (99,5%), sodium hydroxide (98%), ortho phosphoric acid (85%), hydrogen peroxide 3 % stabilized w/v VINIKIT, indicator 4,4, mixed (methyl red-methylene blue) VINIKIT, sodium hydroxide 0,01 molL⁻¹ VINIKIT were from Panreac (Barcelona, Spain). Dichloromethane, ethanol and methanol for gas chromatography analyses were purchased

from Merck (Darmstadt, Germany). Methanol and acetonitrile of HPLC quality were obtained from Fluka Analytical (Buchs, Switzerland). Hydrochloric acid 37%, formic acid and ammonium formate high purity grade were purchased from VWR Prolabo (Fontenay sous Bois, France). Phloroglucinol ($\geq 99\%$), ascorbic acid ($\geq 99\%$), acetaldehyde ($\geq 99,5\%$), 2-chloroethanol ($\geq 99,0\%$), methyl 2-methylbutyrate ($\geq 99\%$), 2-butanol ($\geq 99\%$), glyoxal 40% in water, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate ($\geq 99\%$), gallic acid ($\geq 99\%$) and (+)-catechin ($\geq 99\%$) were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Standards and reagents for aroma compounds and amino acids determination were purchased from Sigma-Aldrich, Fluka, Panreac, Lancaster (Eastgate, UK), PolyScience (Niles, IL, USA), ChemService (West Chester, PA, USA) and Firmenich (Switzerland), and details of the chemicals have been already reported [27, 53-61]. Water was purified in a Milli-Q system from Millipore (Bedford, Germany).

2.4. Analytical Characterization

Initial wines (R0) were analyzed in duplicate for total acetaldehyde and total odor-active carbonyls, as well as for free and total SO_2 , pH, color parameters, total polyphenol index and Folin-Ciocalteu index, phenolic and tannin composition, major aroma compounds, metals, and amino acids.

Final samples after oxidation procedures were analyzed for total acetaldehyde, total odor-active carbonyls, as well as for free (only for the low exposure) and total SO_2 , color parameters, total polyphenol and major aroma compounds.

2.4.1. Sulfur dioxide determination

Free sulfur dioxide was determined by headspace gas chromatography with a mass spectrometer detector (HS-GC-MS) in a QP 2010 GC-MS from Shimadzu (Kyoto, Japan) following the procedure described in a previous work [53]. For the analysis, 4,5 mL of sample acidified with 500 μL of ortho-phosphoric acid (85%) were incubated at $40 \pm 0,1$ °C for 15 min. Then, 400 μL of the headspace were injected in a split/splitless injector. External calibration curve in model wine containing known amounts of sulfur dioxide, obtained by dissolving sodium metabisulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) was prepared to quantify this compound.

For total sulfur dioxide determination, the aspiration-oxidation method recommended by the OIV (International Organization of Vine and Wine) was used [57]. Attending to such procedure, 10 mL of sample acidified with 5 mL of 25% H_3PO_4 and heated to 100 °C were bubbled with air for 15 min (with a flow of 600 ± 12 mL min^{-1}). The SO_2 released was collected in pear shaped flask containing 3 mL of neutralized hydrogen peroxide (3%) with 2 drops of mixed indicator (methyl red – methylene blue) in which sulfur dioxide was

completely oxidized to sulfuric acid, turning the color of the solution from green to purple. The sulfuric acid formed was titrated with standardized 0,01 M NaOH.

2.4.2. Total acetaldehyde determination

Total acetaldehyde was determined by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) by injection of 1 μL of wine sample spiked with 2-butanol (100 mg L^{-1}) as internal standard. The method is based on breaking the adducts directly in the injector port. A GC 8000 series from Fisons Instrument (Ipswich, United Kingdom) with a DB-WAX (30 m x 0.53 mm of i.d. x 2 μm) capillary column from J&W Scientific (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) were used. The injector was kept at $250 \text{ }^\circ\text{C}$ and the split ratio was 1:4. Hydrogen was used as carried gas and the pressure was kept at 27,5 kPa. The temperature program was $50 \text{ }^\circ\text{C}$ for 5 min and then raised to $220 \text{ }^\circ\text{C}$ in 10 minutes. The FID temperature was $250 \text{ }^\circ\text{C}$.

The linearity of the method was obtained by the analysis of synthetic wines (5 g L^{-1} tartaric acid, 12% ethanol, 1,5% propane-1,2-diol, 10 g L^{-1} glycerin, pH 3,5) containing known amounts of acetaldehyde and plotting the corresponding peak areas (normalized by that of the internal standard methyl 2-butanol) versus the mass of acetaldehyde. The linear dynamic range spanned from the method detection limit to more than 120 mg L^{-1} with determination coefficient better than 0.998. Detection limit, defined as 3 times the SD of the noise of the base line close to the peak was estimated to be $0,22 \text{ mg L}^{-1}$. Method repeatability was determined by replicated analysis of a real wine containing $21,2 \text{ L}^{-1}$ acetaldehyde and was estimated to be 4,1% (n=8). Reproducibility was estimated by the replicate analysis of that wine in different days and was 5,3% (n=4). The ability of the method to break acetaldehyde- SO_2 adducts was experimentally verified by comparing the areas obtained in the analysis of synthetic wines with 100 mg L^{-1} acetaldehyde containing different amounts of SO_2 (from 0 to 200 mg L^{-1}) and previously incubated 12 hours. No significant differences were found. The overall accuracy of the method was studied in a standard recovery experiment in which 2 different red wines were spiked with 20 mg L^{-1} of acetaldehyde, left to stand 12 hours, and analyzed in triplicate. Determined amounts of acetaldehyde were $19,0 \pm 1,6 \text{ mg L}^{-1}$ and $19,6 \pm 1,3 \text{ mg L}^{-1}$ not significantly different from the added value.

2.4.3. Determination of total odor-active carbonyls

The determination by headspace-SPME-GC-MS of total (free plus bound) forms of different odor-active carbonyls such as isobutyraldehyde, 2-methylbutanal, isovaleraldehyde, methional, phenylacetaldehyde and diacetyl in wine is described in the method proposed by Bueno *et al.* [27]. The wines were opened inside an oxygen free chamber from Jacomex (Dagneux, France), 10 mL were transferred into a 20 mL headspace vial, and were then

spiked with methyl 2-methylbutyrate ($187 \mu\text{g L}^{-1}$) as internal standard and with 6 g L^{-1} of glyoxal for breaking complexes. Vials were then closed, taken out of the glove box and incubated in a laboratory oven at $50 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ for 6 h in order to break carbonyl-bisulfite complexes. Strict anoxia conditions are essential to prevent any oxidation. Then, carbonyls in the headspace were preconcentrated on a PDMS/DVB fiber (Supleco-Spain, Madrid, Spain) and were further analyzed on a GC-MS equipped with a quadrupole in SIM mode.

2.4.4. Spectrophotometric measurements

For color determination, absorbances at wavelengths 420, 520, and 620 nm of undiluted wine samples were measured using glass cells with optical paths of 1, 2 or 5 mm, taking the measurement which provided absorbance readings between 0,3 and 0,7, as recommended by the OIV [62]. Total Phenolic Index (TPI) was determined as OD 280 as described by Ribéreau-Gayon et al [59]. Folin-Ciocalteu assay was performed following the method described by Singleton *et al.* [60] using 1 cm quartz cuvettes. All the absorbance measurements were taken using an UV-vis spectrophotometer UV-17000 Pharma Spec from Shimadzu (Kyoto, Japan).

2.4.5. Metal analyses

A direct 5-fold aqueous dilution of wine was analyzed by inductively coupled plasma-mass spectrometry with collision/reaction cell (CCT-ICP-MS) as described by Grindlay *et al.* 2014 [54] using rhodium as internal standard. Metals quantified were iron, copper, zinc and manganese.

2.4.6. Amino acid analyses

Strecker amino acids (valine, isoleucine, leucine, phenylalanine and methionine) plus cysteine were determined by HPLC with fluorescence detector according to the method reported by Hernandez-Orte *et al.* [55]. The method involves derivatization with aminoquinolyl-N-hydrosysuccinimidyl carbamate (AQC). A quaternary HPLC system Waters 2695 from Waters (Milford, MA) with a fluorescence detector ProStar 363 from Varian (Walnut Creek, CA) were used.

2.4.7. Determination of major aroma compounds

Major aroma compounds such as isobutanol, isoamyl alcohol, methionol, β -phenylethanol and acetic acid were determined using a variation of the method published by Ortega *et al.* [58]. The strategy followed a liquid-liquid microextraction with dichloromethane and uses several internal standards to correct for matrix effects (recoveries above 95% in all cases). 2-Butanol was used as internal standard for isobutanol, 4-methyl-2-pentanol for isoamyl alcohol, and benzyl alcohol and 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone for methionol and β -

phenylethanol, all of them spiked at 1,5 mg L⁻¹ to the wine. Analyses were carried out using a GC-3800 from Varian (Walnut Creek, CA) equipped with a flame ionization detector (FID). The column used was a DB-WAX from J&W (Folsom, CA) 30 m × 0.32 mm × 0.5 mm film thickness, preceded by a silica precolumn from Agilent Technologies (Santa Clara, CA), 3 m × 0.32 mm i.d. The carrier gas was He at 2,2 mL min⁻¹. Two microliters were injected in split mode (1:20). Injector and detector were both kept at 250 °C. The temperature program: 40 °C for 5 min, then raised at 4 °C min⁻¹ up to 102 °C, 2 °C min⁻¹ up to 112 °C, 3 °C min⁻¹ up to 125 °C, this temperature was kept for 5 min, 3 °C min⁻¹ up to 160 °C, 6 °C min⁻¹ up to 200 °C, and this temperature was kept for 30 min.

2.4.8. Analyses of phenolics

Phenolic acids, flavanols and anthocyanins were determined by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) using mass spectrometry (MS) and a diode array detector (DAD). Wines were analyzed in triplicate in positive and negative mode following the procedure described by Vallverdu-Queralt *et al.* [61] in a Waters Acquity UPLC–DAD system (Waters, Milford, MA, USA) with a reverse phase Acquity BEH C18 column (150 mm length, 1 mm internal diameter, 1,7 µm particle size) from Waters (Milford, MA, USA). The spectrometer hyphenated to the UPLC–DAD system was a Bruker Daltonics Amazon (Bruker, Darmstadt, Germany) mass spectrometer.

Composition of condensed tannins was studied by phloroglucinolysis reaction (acid-catalyzed depolymerization in the presence of a nucleophilic agent) following the modifications of the procedure published by Kennedy and Jones [63] as described by Carrascón *et al.* [64]. The reaction was performed in triplicate and the depolymerized samples were analyzed by UPLC-DAD-MS at 280 nm. The molar ratio of total amount of depolymerized subunits to terminal subunits provides the mean degree of polymerization (mDP) [65]. Quantification was done in equivalents of catechin, epicatechin, epigallocatechin and epicatechin-3-O-gallate at 280 nm.

2.5. Data treatment and statistical analysis

Levels of carbonyls obtained in the different samples were analyzed by repeated measures ANOVA using SPSS v15. (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, IL, USA) for assessing the effects of oxygen level and wine sample. Correlation studies were directly carried out with Excel 2013 (Microsoft, Washington, USA). The uncertainty of each mean was calculated taking into account experimental uncertainty, measured via experimental replicates, and the analytical uncertainty, measured via analytical replicates.

Principal Component Analysis was performed using XLSTAT (Addinsoft, version 2015). Partial Least Square Regression analysis was carried out using The Unscrambler 9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway). PLS modeling was carried out using cross-validation criteria. In this strategy, the model is built in iterations leaving out one of the samples in each iteration. The predicted result for the sample left out is used to compute the model error. The process is repeated until every sample has been left out once; then all prediction residuals are combined to compute the validation residual variance and the RMSEP (Root mean square prediction error).

3. Results and discussion

Four samples of each wine were obtained in the experiment carried out in the present work: the initial control (samples R0) and three oxidized specimens (samples R1, R2 and R3). R1 samples were exposed to a level of O₂ roughly equivalent to two air-saturations, while R2 and R3 were exposed to levels of O₂ respectively equivalent to 18 or 32 mg L⁻¹ plus the stoichiometrically required amount to oxidize all the total SO₂ initially present in each particular wine.

Levels of carbonyls found in the different samples are summarized in **table 2**. In all cases data correspond to total carbonyls, since methods used for their determination involved a previous step to break reversible adducts, such as those formed with sulfur dioxide. Levels of carbonyls can be further related to the total amount of O₂ given to the wine or, more interestingly, to the amount of O₂ not invested in the oxidation of wine total SO₂ (*O₂ not SO₂*). This is calculated by subtracting from the total amount of O₂ taken by a sample, the amount of O₂ which would have been taken by the SO₂ consumed by that specific wine assuming a 2:1 molar ratio.

Wine and O ₂ dose	O ₂ not SO ₂ #	Total O ₂ *	Isobutyraldehyde	Isovaleraldehyde	2-methylbutanal	Methional	Phenylacetaldehyde	Acetaldehyde	Diacetyl
SL R0	0 ± 0	0 ± 0	37,8 ± 1,0 ^c	50,9 ± 1,9 ^b	12,5 ± 0,2 ^c	29,2 ± 0,4 ^d	59,4 ± 13,3 ^b	19,6 ± 0,5 ^d	4,20 ± 0,12 ^a
SL R1	2,9 ± 0,3	10,1 ± 0,3	38,9 ± 1,0 ^c	56,9 ± 0,7 ^b	12,6 ± 0,1 ^c	35,5 ± 1,2 ^c	67,9 ± 1,7 ^b	25,1 ± 0,7 ^c	4,29 ± 0,21 ^a
SL R2	14,8 ± 0,5	33,7 ± 0,5	48,1 ± 2,5 ^b	68,9 ± 2,3 ^a	20,1 ± 0,2 ^b	48,4 ± 0,9 ^b	80,7 ± 1,0 ^a	31,8 ± 0,5 ^a	3,90 ± 0,25 ^a
SL R3	29,8 ± 0,7	48,7 ± 0,7	57,4 ± 0,6 ^a	67,0 ± 1,1 ^a	22,5 ± 0,1 ^a	62,2 ± 0,8 ^a	90,3 ± 2,2 ^a	28,4 ± 0,9 ^b	3,75 ± 0,27 ^a
TSR0	0 ± 0	0 ± 0	25,3 ± 0,6 ^c	33,0 ± 2,0 ^b	12,3 ± 1,5 ^b	23,4 ± 0,0 ^b	34,5 ± 7,7 ^b	17,8 ± 0,7 ^c	5,58 ± 0,16 ^a
TSR1	2,8 ± 0,6	11,3 ± 0,6	24,9 ± 0,6 ^c	33,7 ± 0,6 ^b	11,4 ± 0,0 ^b	22,8 ± 1,6 ^b	28,8 ± 1,9 ^b	23,7 ± 1,2 ^b	5,03 ± 0,02 ^{ab}
TSR2	16,2 ± 0,6	35,4 ± 0,6	31,9 ± 0,0 ^b	40,7 ± 0,1 ^a	16,0 ± 0,6 ^a	35,1 ± 0,6 ^a	48,7 ± 0,2 ^a	26,8 ± 0,2 ^a	4,52 ± 0,20 ^{ab}
TSR3	33,8 ± 1,4	53,0 ± 1,4	37,4 ± 0,4 ^a	42,1 ± 0,8 ^a	17,9 ± 0,4 ^a	36,1 ± 1,1 ^a	52,8 ± 1,1 ^a	26,2 ± 0,1 ^a	3,73 ± 0,17 ^b
BL R0	0 ± 0	0 ± 0	29,9 ± 0,7 ^c	50,0 ± 1,6 ^d	10,2 ± 1,1 ^c	19,2 ± 0,5 ^d	34,3 ± 7,7 ^c	13,9 ± 0,1 ^d	2,34 ± 0,10 ^a
BL R1	5,3 ± 0,2	10,6 ± 0,2	33,4 ± 0,7 ^c	57,7 ± 4,1 ^c	12,1 ± 0,3 ^c	27,9 ± 2,8 ^c	46,2 ± 4,8 ^b	21,3 ± 0,6 ^c	2,43 ± 0,30 ^a
BL R2	18,9 ± 0,3	28,9 ± 0,3	40,9 ± 0,9 ^b	74,8 ± 4,7 ^b	18,0 ± 0,9 ^b	43,8 ± 4,0 ^b	74,7 ± 1,6 ^a	23,6 ± 1,6 ^b	2,30 ± 0,15 ^a
BL R3	32,4 ± 0,0	42,4 ± 0,0	51,5 ± 2,1 ^a	82,6 ± 0,2 ^a	23,4 ± 1,5 ^a	55,4 ± 3,8 ^a	86,7 ± 5,7 ^a	31,6 ± 0,6 ^a	2,29 ± 0,20 ^a
CH R0	0 ± 0	0 ± 0	50,0 ± 7,5 ^c	37,4 ± 6,7 ^d	19,7 ± 1,6 ^c	32,2 ± 2,2 ^d	62,3 ± 23,3 ^c	15,9 ± 0,1 ^c	0,43 ± 0,01 ^a
CH R1	7,0 ± 0,2	10,5 ± 0,2	50,2 ± 1,8 ^c	45,8 ± 4,3 ^c	20,9 ± 1,4 ^c	41,8 ± 1,2 ^c	85,1 ± 4,0 ^b	24,3 ± 0,9 ^b	0,41 ± 0,01 ^a
CH R2	18,9 ± 0,1	26,7 ± 0,1	71,7 ± 0,9 ^b	90,5 ± 0,3 ^b	36,9 ± 0,0 ^b	82,6 ± 2,4 ^b	145,6 ± 1,4 ^a	27,6 ± 0,7 ^a	0,50 ± 0,01 ^a
CH R3	34,2 ± 1,0	42,0 ± 1,0	91,0 ± 3,5 ^a	112,3 ± 4,4 ^a	45,3 ± 2,1 ^a	102,1 ± 1,0 ^a	154,8 ± 6,6 ^a	26,7 ± 0,2 ^a	0,62 ± 0,03 ^a
MF R0	0 ± 0	0 ± 0	17,4 ± 0,4 ^c	30,7 ± 0,2 ^{ab}	7,1 ± 0,2 ^c	22,1 ± 0,0 ^b	32,7 ± 1,2 ^c	11,3 ± 0,7 ^a	7,12 ± 0,24 ^a
MF R1	6,5 ± 0,1	10,1 ± 0,1	15,9 ± 0,4 ^c	29,6 ± 0,2 ^b	6,5 ± 0,1 ^c	18,6 ± 0,8 ^b	38,0 ± 1,0 ^c	14,3 ± 0,9 ^b	6,14 ± 0,23 ^a

MF R2	17,2 ± 0,0	23,6 ± 0,0	24,3 ± 0,8 ^b	30,6 ± 0,8 ^b	9,8 ± 0,4 ^b	29,9 ± 0,4 ^a	112,1 ± 2,4 ^b	17,5 ± 0,6 ^a	3,69 ± 0,56 ^b
MF R3	28,6 ± 0,2	35,0 ± 0,2	31,8 ± 0,1 ^a	36,7 ± 0,0 ^a	13,0 ± 0,1 ^a	33,0 ± 1,0 ^a	136,1 ± 14,0 ^a	17,1 ± 0,1 ^a	2,94 ± 0,05 ^b
TP R0	0 ± 0	0 ± 0	24,8 ± 0,4 ^{bc}	51,2 ± 0,2 ^a	7,9 ± 0,3 ^b	24,6 ± 0,0 ^b	90,6 ± 3,8 ^b	13,1 ± 0,4 ^a	14,12 ± 0,34 ^a
TP R1	4,8 ± 0,3	9,4 ± 0,3	21,3 ± 0,7 ^c	42,8 ± 0,3 ^b	7,3 ± 0,5 ^b	20,3 ± 1,6 ^b	72,9 ± 4,9 ^c	13,5 ± 0,1 ^b	13,82 ± 2,65 ^a
TP R2	17,2 ± 0,1	24,2 ± 0,1	28,6 ± 0,4 ^{ab}	42,2 ± 0,4 ^b	10,0 ± 0,0 ^a	32,8 ± 3,3 ^a	161,4 ± 8,4 ^a	13,5 ± 0,1 ^b	7,44 ± 0,89 ^b
TP R3	30,8 ± 0,9	37,8 ± 0,9	32,4 ± 0,5 ^a	42,0 ± 1,4 ^b	11,3 ± 0,4 ^a	35,2 ± 2,3 ^a	154,0 ± 34,7 ^a	13,3 ± 0,4 ^b	5,88 ± 0,14 ^b
HV R0	0 ± 0	0 ± 0	23,4 ± 1,0 ^b	27,8 ± 2,1 ^{ab}	6,3 ± 0,2 ^{bc}	25,9 ± 0,0 ^{bc}	41,3 ± 1,8 ^c	17,9 ± 0,9 ^a	4,60 ± 0,21 ^a
HV R1	9,7 ± 0,3	9,8 ± 0,3	17,8 ± 1,2 ^c	21,4 ± 0,5 ^b	5,0 ± 0,0 ^c	20,2 ± 1,1 ^c	37,5 ± 5,0 ^c	18,6 ± 0,4 ^{ab}	3,55 ± 0,01 ^{ab}
HV R2	19,3 ± 0,2	22,5 ± 0,2	25,2 ± 1,5 ^b	23,8 ± 1,8 ^b	7,2 ± 0,3 ^b	28,3 ± 0,2 ^{ab}	109,2 ± 6,4 ^b	15,7 ± 0,0 ^c	1,93 ± 0,22 ^b
HV R3	32,2 ± 0,3	35,4 ± 0,3	31,2 ± 1,4 ^a	30,9 ± 0,8 ^a	9,8 ± 0,2 ^a	33,7 ± 0,4 ^a	135,6 ± 12,1 ^a	17,0 ± 0,0 ^{bc}	1,82 ± 0,03 ^b
BS R0	0 ± 0	0 ± 0	17,4 ± 0,3 ^{bc}	32,6 ± 0,5 ^a	5,2 ± 0,2 ^{bc}	21,2 ± 0,0 ^{bc}	33,1 ± 0,7 ^b	17,0 ± 1,0 ^a	9,89 ± 0,22 ^a
BS R1	8,8 ± 0,2	10,8 ± 0,2	16,6 ± 0,4 ^c	32,3 ± 1,1 ^a	4,9 ± 0,0 ^c	17,5 ± 0,4 ^c	36,3 ± 1,9 ^b	16,7 ± 0,6 ^a	9,48 ± 0,27 ^a
BS R2	18,8 ± 0,3	26,8 ± 0,3	21,1 ± 1,0 ^b	28,9 ± 0,3 ^a	6,7 ± 0,1 ^{ab}	25,3 ± 1,7 ^{ab}	101,6 ± 0,5 ^a	14,8 ± 0,3 ^a	4,65 ± 0,69 ^b
BS R3	32,0 ± 1,3	40,0 ± 1,3	28,4 ± 0,5 ^a	33,0 ± 0,8 ^a	9,2 ± 0,1 ^a	31,8 ± 2,1 ^a	107,9 ± 5,4 ^a	16,4 ± 0,1 ^a	3,86 ± 0,17 ^b

#O₂ consumed not invested in the oxidation of wine SO₂. *Total oxygen consumed. ^{a,b,c,d} Different letters in a column indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between dose of oxygen for the same wine: R0: initial wine; R1: low; R2: medium; R3: high oxygen exposure

Table 2. Levels of total Strecker aldehydes ($\mu\text{g/L}$), acetaldehyde and diacetyl (mg/L) measured in the eight wines considered in the oxidation experiment.

3.1. Fate of acetaldehyde

The relationship between the total content in acetaldehyde found in the different samples of each wine and their levels of O_2 not SO_2 , is given in **figure 4a**. The figure splits wines attending to their age, Levels of acetaldehyde in samples derived from young wines (1-year-old bottled wines) were under 19 mg L^{-1} , regardless of the O_2 delivered to the sample. By contrast, levels in samples derived from aged wines increased with oxidation becoming in all cases above 25 mg L^{-1} in R3 samples. Within each category there are also some differences. In young wines, acetaldehyde levels slightly increased up to $5,8 \text{ mg L}^{-1}$ with oxygen exposure only in the wine MF. In aged wines, increases were most noticeable at low O_2 exposure (R1) and only in the wine BL there was a strong increase at the highest exposure (R3).

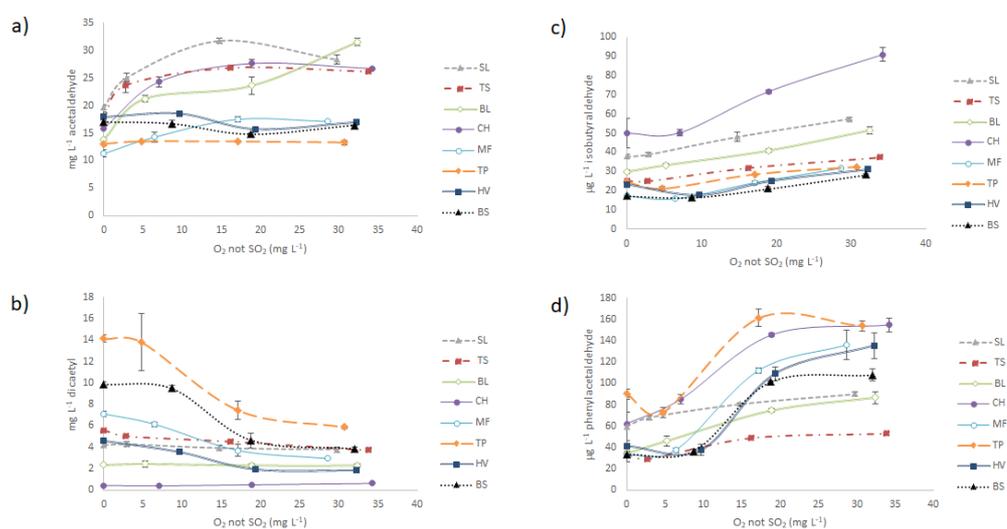


Figure 4. Evolution of the amounts of total aldehydes present in each wine exposed to different levels of oxygen. The X axis represents the amount of O_2 consumed not invested in the oxidation of wine SO_2 (O_2 not SO_2). (A) Acetaldehyde, (B) diacetyl, (C) isobutyraldehyde, and (D) phenylacetaldehyde.

Taking into account that once SO_2 has been depleted, H_2O_2 oxidizes mostly ethanol to yield acetaldehyde [66] (**figure 10** in the general introduction) it is possible to estimate the amount of acetaldehyde theoretically formed by wine in each sample. The comparison of this expected amount with the real amount of acetaldehyde accumulated in each case will provide an estimation of the fraction of acetaldehyde reacted with polyphenols or further oxidized to acetic acid. As an example, the wine BL consumed $32,4 \text{ mg L}^{-1}$ of O_2 not SO_2 in R3. This amount should have produced $32,4/32=1,01 \text{ mM}$ of H_2O_2 , which in turn will have oxidized $1,01 \text{ mM}$ of ethanol to produce the same molar amount of acetaldehyde: $44,6 \text{ mg L}^{-1}$. Since the measured increase of acetaldehyde is $17,7 \text{ mg L}^{-1}$ and the increment of acetic

acid was null, it can be inferred that 60,4% of the acetaldehyde formed reacted most likely by forming ethyl bridges with polyphenols and that 39,6% of acetaldehyde remained unreacted in the wine.

These calculations are summarized in **table 3**. As can be seen, differences between aged and young wines are very high, even taking into account that in some cases the small changes observed in levels of acetaldehyde and the large changes in total SO_2 cause a large imprecision. The unreacted fraction in old wines was in all cases above 80% in the low oxygen exposure experiment, while in three of the young wines the unreacted fraction was close to zero. A negative percentage means that more acetaldehyde is reacting than it is being formed. A second observation is that the unreacted fraction decreases with the extent of the O_2 exposure, so that, in the high O_2 exposure experiment, the unreacted fraction in aged wines was smaller than 25% in three of the wines.

The effect of the level of O_2 on the unreacted fraction of acetaldehyde becomes more evident by assuming that the oxidation process can be segmented into three 'virtual' steps (first 2,8-10 mg L^{-1} ; from 15 to 19 mg L^{-1} ; from 29 to 34 mg L^{-1} of O_2 not SO_2 , second column of **table 2**), neglecting the fact that the experiments were not consecutive but independent. For instance, the amount of acetaldehyde produced in the second virtual step was estimated by subtracting the levels of acetaldehyde found in R1 from those found in R2, while differences in O_2 not SO_2 between both experiments were used as estimators of the amount of O_2 not SO_2 consumed in such virtual second step. The unreacted fraction of acetaldehyde in those three steps is represented in **figure 5a** for aged wines, showing that the unreacted fraction decrease was progressive for SL, TS and CH (quite dramatic in the case of TS) while BL showed a unique increase in the unreacted fraction in the 3rd step, Regarding young wines, shown in **figure 5b**, the unreacted fraction of TP was close to 0 in all cases, while for HV and BS became negative in the second period, MF followed a completely different pattern, halfway to those of aged wines.

The previous patterns can be explained attending to three concepts:

1. the ability of acetaldehyde to form strong and stable unreactive complexes with SO_2
2. the evolution of SO_2 during oxidation
3. the reactivity of acetaldehyde to the specific profile of aldehyde-reactive polyphenols (ARPs) present in the wines

Attending to those concepts, the parameters which should determine the evolution of acetaldehyde in a specific wine are:

1. the wine content of SO_2 and of SO_2 binders

2. the wine content of ARPs
3. the relative rates at which H_2O_2 and SO_2 are formed and consumed, respectively

The higher accumulation of acetaldehyde in aged wines can be explained attending to the much lesser amounts of ARPs which these wines should contain, because of their potentially larger previous exposure to O_2 . Similarly, the higher accumulation of acetaldehyde in the 1st oxidation period observed in **figure 5a** can be explained attending to the presence of some remaining SO_2 in the media. As complexes SO_2 -acetaldehyde are the strongest amongst carbonyls [28], newly formed acetaldehyde could displace weak SO_2 -binders from their associations, becoming itself protected from reaction with the limited fraction of ARPs present in aged wines. In the second and third period, however, SO_2 is progressively depleted, so that newly formed acetaldehyde cannot be further protected from ARPs. The wine-specific patterns seen in **figure 5a** should be attributed to their differences in initial SO_2 and in SO_2 binders. For instance, the highest fraction of unreacted acetaldehyde of TS in 1st period corresponds to its highest content in total and free SO_2 (see **table 1**). Similarly, the highest fraction observed in the 2nd period for SL is in agreement with its highest content in total SO_2 and highest level in SO_2 binders (manifested in its low free SO_2). The unique behavior of BL wine may be attributed to a possible exhaustion of ARPs. In this context it may be noteworthy that this wine had the lowest TPI and Folin indexes amongst aged wines. In the case of young wines (**figure 5b**), the negative fraction of unreacted acetaldehyde of HV in the 2nd period may be related to its lowest level of SO_2 and may be also to its highest TPI and Folin amongst young wines.

O ₂ exposure	Aged wines				Young wines			
	SL	TS	BL	CH	MF	TP	HV	BS
Low	135,7 ± 21,6%	155,6 ± 44,0%	101,4 ± 16,8%	87,0 ± 15,0%	33,7 ± 8,8%	5,9 ± 4,7%	4,7 ± 6,1%	-2,6 ± 6,8%
Medium	60,0 ± 3,2%	40,6 ± 2,4%	37,4 ± 5,2%	45,1 ± 2,3%	26,4 ± 2,7%	1,6 ± 1,3%	-8,3 ± 2,5%	-8,6 ± 2,8%
High	21,4 ± 1,9%	18,0 ± 1,2%	39,6 ± 3,3%	23,0 ± 0,8%	14,8 ± 1,3%	0,5 ± 1,0%	-2,1 ± 1,5%	-1,3 ± 1,6%

Table 3. Fraction of unreacted acetaldehyde (in %) remaining in the wines during the oxidation

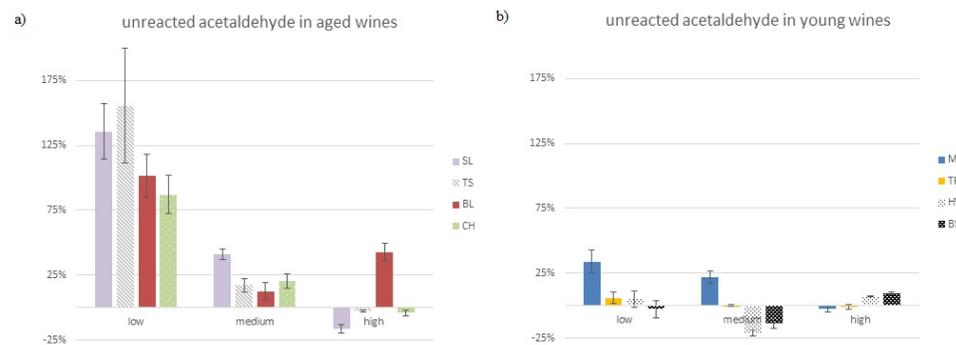


Figure 5. Evolution of the fraction of unreacted acetaldehyde produced by oxidation of ethanol in the three the “virtual” oxidation steps. (A) Aged wines and (B) young wines.

3.2. Clues about the nature of ARPs

A first insight about the nature of ARPs can be obtained by modeling the unreacted fraction of acetaldehyde measured in the different experiments versus the initial wine chemical composition. Models (summarized in **table 4**) were obtained for the different oxidation doses and were in most cases highly explicative, with explained variances by cross-correlation above 94%, except for the high oxygen dose.

	Low	Medium	Medium (virtual)	High
R ²	0,9642	0,9921	0,9976	0,9235
R ² cross-validation	0,9417	0,9513	0,9736	0,8729
RMSE	11,1317	2,1824	0,9394	3,7700
RMSE cross-validation	16,2314	6,1868	3,5543	5,5537
PCs	1	3	3	2
B0	65,1787	24,2764	9,7435	14,2498
Combined SO ₂	16,089	11,975	14,472	
Epigallocatechin	14,068			
Epicatechin-3- <i>O</i> -gallate		-5,956	-6,974	-7,006
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside	-15,809	-5,271	-7,167	-7,269
Malvidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> - coumaroyl)glucoside				-4,407
Catechin-ethyl-Malvidin	-18,560	-11,535		
Peonidin-3- <i>O</i> -glucoside-4- vinylguaiacol	-13,729			
mDP				6,330
% Galloilated tannins		-6,319	-11,857	

Table 4. PLS models relating the fraction of unreacted acetaldehyde to the wine initial chemical composition in the different real and virtual oxidation steps. In the low exposure case virtual and real are the same.

In general, models give a very large positive coefficient to combined SO₂ and negative coefficients for nearly all the other components, which suggests that the accumulation of acetaldehyde is the result of the balance between its ability to displace SO₂ from its adducts with weaker SO₂-binders and the rate at which it reacts with ARPs.

Attending to the first model, derived from R1 samples, ARPs are mainly anthocyanins: malvidin 3-*O*-glucoside, the vinylguaiacol derivative of peonidin and the catechin-ethyl-malvidin dimer. The positive coefficient for epigallocatechin may be related to recent evidences indicating that epigallocatechin is oxidized with a concomitant high SO₂ consumption [64] which would cause a shortage of free SO₂, a concomitant increase of H₂O₂ and a peak in acetaldehyde production which could not completely react with ARPs, and instead would displace other SO₂-binders to form 2-hydroxyethylsulfonate.

In the medium O_2 exposure level or in the virtual second step, which takes place under small levels of free SO_2 , malvidin 3-*O*-glucoside, galloylated tannins and epicatechin-3-*O*-gallate have negative coefficients in the model, suggesting that they are the main ARPs for the newly formed acetaldehyde in this stage of oxidation.

Modelling the high exposure level has been more complicated because of the unique behavior of sample BL. Additionally, the virtual step could not be modelled because the predictive ability of the initial chemical composition is limited since wines already have suffered a deep chemical change. Nevertheless, the model is consistent with previous observations, and suggests that under large O_2 exposure conditions, the weight of SO_2 is null and that the accumulation of acetaldehyde is basically the result of the balance between its formation and its reaction to form ethyl-bridged structures. In this oxidation step, tannins do not seem to be kinetically critical, and only mDP (medium Degree of Polymerization) has a positive coefficient with the unreacted fraction of acetaldehyde. This would suggest that large tannins are less efficient at forming ethyl bridged structures, and that kinetically, small tannins would be favored.

3.3. Dynamics of wine oxidation when free SO_2 levels are fading

The previous discussion suggests that when SO_2 levels become very low, as will inevitably happen in some moment of wine aging, the effects of oxidation will be the result of the relative rates of some key chemical processes, as illustrated in **figure 6**.

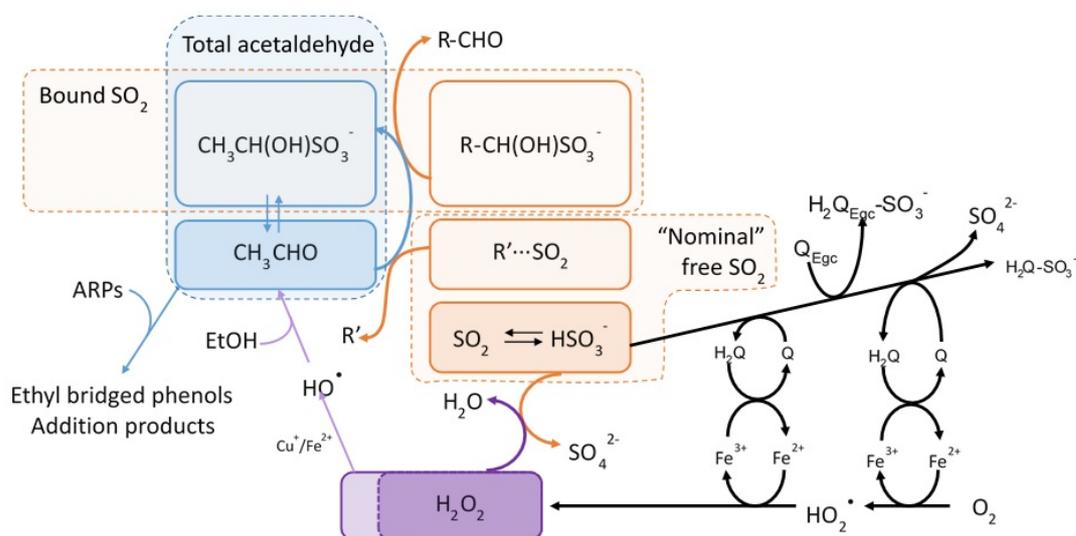


Figure 6. Scheme showing the main elements determining the outcome of wine oxidation when free SO_2 levels are low.

In the first place, the rate at which ethanol is oxidized to form acetaldehyde depends on the following balance

1. The rate of accumulation of H₂O₂, basically related to the rate at which wine takes O₂
2. The rate at which SO₂ eliminates H₂O₂, critically dependent on the level of truly free SO₂, which is in turn dependent on:
 - a. the SO₂:O₂ molar ratio associated to the oxidation of polyphenols
 - b. the amount and nature of SO₂ complexes

In the second place, the fate of the acetaldehyde formed will depend on:

1. The rates at which acetaldehyde react to wine ARPs, critically dependent on the nature and concentration of those ARPs
2. The rates at which acetaldehyde displaces weaker SO₂-binders from their combinations

The figure also highlights the relationships between aldehydes, ARPs and SO₂. The exhaustion of free SO₂ will have as consequence first the cleavage of the relatively weak associations between anthocyanins and SO₂, and these anthocyanins will further react with acetaldehyde. Once weak SO₂ binders have been consumed, the other SO₂ binders will be released from weakest to strongest. Some of the binders are Strecker aldehydes which once released will change wine aroma [29]. Some others, such as diacetyl, are reactive compounds which can then promote different chemical changes.

3.4. The case of diacetyl

The evolution of diacetyl with the progress of oxidation is presented in **figure 4b** and again, there is a neat difference between young and aged wines. Levels of diacetyl in aged wines were low, strictly inversely proportional to wine age, and quite stable. This result already suggests that diacetyl slowly but continuously reacts with different wine components during aging in processes more related to time than to the presence of oxygen. Among aged wines, only in TS there is a significant decrease ($p \leq 0,05$) during oxidation (**table 2**). In strong contrast, diacetyl in young wines followed a clear inverse sigmoid characterized by a flat initial period, a strong decrease in the medium O₂ exposure samples and a last flat step. The decrease was proportional to the initial level and in all cases final diacetyl contents of the wine seemed to stabilize at around 40% of its initial content.

Diacetyl is a quite reactive molecule which can react with a broad range of organic molecules. It has been reported that diacetyl can react with ARPs, although at a much slower rate than acetaldehyde [67]. It can also react to thiols, such as cysteine, producing a wide range of subproducts [68, 69]. Remarkably, one of the reactions suffered by diacetyl and other α -dicarbonyls is Maillard reaction with amino acids, one of whose possible outcomes is the Strecker degradation to form the corresponding Strecker aldehydes [70]. The possible

implication of diacetyl in the formation of these components will be discussed later. The flat initial period observed in **figure 4b** can be explained because in the low oxygen exposure conditions, diacetyl would be mostly complexed with SO_2 [29], and would be protected. At higher O_2 exposure levels, however, unprotected diacetyl would react with available nucleophiles. The last flat period may be attributed to the exhaustion of such nucleophiles.

3.5. Strecker aldehydes

The five Strecker aldehydes accumulate during wine oxidation in all wines, as can be seen in **table 2**. As previously observed, the accumulation takes place at relatively high consumptions of oxygen [29], and in most wines it was observed only when the wine was exposed at least to medium amounts of oxygen (R2). The relationship between levels of Strecker aldehydes in the different wines and levels of oxygen can be seen in the Principal Component plot shown in **figure 7**. The plot, which retains more than 95% of the original variance, shows that non-aromatic aldehydes (methional, isobutyraldehyde, 2-methylbutanal and isovaleraldehyde) follow a quite similar and correlated behavior, while phenylacetaldehyde follows a quite distinct pattern.

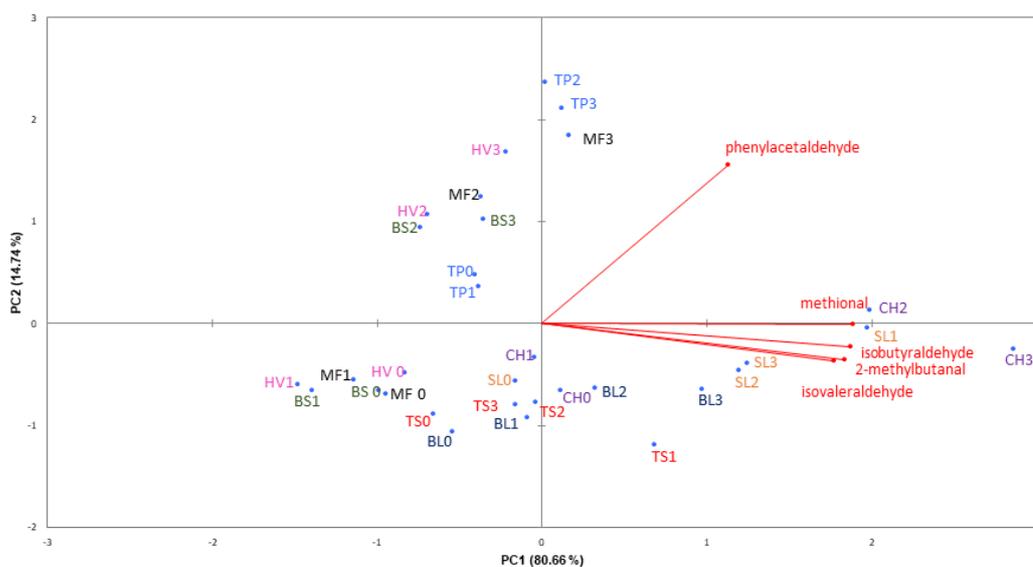


Figure 7. PCA plot with data from Strecker aldehydes normalized by the consumed oxygen not invested in the oxidation of sulfur dioxide.

Regarding samples, the PCA plot reveals that samples are largely segregated by its age: older wines are placed in the central and right south parts of the plot, while young wines are in the left and upper part of the plot. Older wines displace strongly to the right along the first component and just slightly up along the second when they oxidize, indicating that these compounds form comparatively more methional, isobutyraldehyde, 2-methylbutanal and isovaleraldehyde than phenylacetaldehyde. The plot also shows that the magnitude of the

change suffered by aged wines is related to the position of the original wine in the plot: the further right the original samples are, the further right are displaced the samples exposed to higher levels of oxygen. This implies that in these older wines the amount of aldehyde formed is proportional to the amount of aldehyde already present in the wine. This makes sense, since the history of previous exposure to oxygen of older wines is large, indicating that their initial content maybe strongly influenced by their specific ability to form aldehydes.

Quite differently, younger wines when oxidize displace north and slightly right, indicating that these wines tend to form higher levels of phenylacetaldehyde than of the other Strecker aldehydes. Moreover, the plot basically separates initial and low O₂ exposure samples (R0 and R1) from those of medium and high exposure (R2 and R3), indicating that phenylacetaldehyde formation takes part preferably at medium O₂ exposure. Additionally, the magnitude of the change in these cases does not seem to be related to the initial position of the wine in the plot, meaning that the aldehyde content of the initial wine seems to be a poor predictor of its ability to produce aldehydes upon oxidation.

The more specific differences in oxidation patterns between samples can be appreciated with the plots in **figure 4**, Isobutyraldehyde, in **figure 4c**, exemplifies the patterns followed by methional, 2-methylbutanal and isovaleraldehyde, and shows that levels of aldehyde in older samples steadily increases with oxygen exposure and that increases are proportional to the original content of the wine. By contrast, levels in young wines increase just slightly and only become significant at high O₂ exposure levels. It is worth mentioning that samples in the plot are nearly perfectly arranged by age. This, as was previously mentioned for diacetyl, could be a clue indicating that time, and not only oxygen, plays a role in the accumulation of these components. Phenylacetaldehyde, in **figure 4d**, follows a quite different pattern. The four young wines follow a clear sigmoidal pattern of accumulation, indicating that the formation of phenylacetaldehyde took specifically place when the wine was exposed to medium levels of oxygen. Higher or lower levels did not have any additional effect on the levels of this aldehyde. The resemblance with the plot seen for diacetyl in **figure 4b** is remarkable. Older wines, by contrast, follow a pattern quite similar to the one observed for isobutyraldehyde in **figure 4c**; levels increase steadily with level of oxygen, although, less evidently for SL, the formation was yet more intense when samples were exposed to medium levels of oxygen.

The segregation between aged and young wines shown in the PCA plot in **figure 7** is consistent with the assumption that Strecker aldehydes, except phenylacetaldehyde, are also subject to reaction with ARPs. Aged wines, which were found to contain less ARPs are

the ones with higher increases in aldehydes. The odd pattern followed by phenylacetaldehyde, which strongly accumulates in young wines, could be simply related to a reduced reactivity towards ARPs because of steric reasons. The reactivity of the different Strecker aldehydes towards ARPs is not known and should be the subject of further research.

3.6. Clues about the origin and fate of Strecker aldehydes

The accumulation of Strecker aldehydes in older wines is strongly and significantly correlated to the levels of precursor amino acids in wine: ($R=0,98$; $0,96$; $0,99$; $0,99$ and $0,96$ for the pairs valine-isobutyraldehyde, leucine-isovaleraldehyde, isoleucine-2-methylbutanal, methionine-methional and phenylalanine-phenylacetaldehyde). In younger wines, however, only the correlations between the pairs isoleucine-2-methylbutanal and phenylalanine-phenylacetaldehyde, are significant ($R=0,99$ in both cases). The lack of significance in the other cases may be attributed to the low variability of their corresponding amino acids (less than 4 mg L^{-1} , with RSD inferior to 16% in all cases) and to the low levels of aldehyde accumulated.

The amount of aldehyde accumulated by unit of amino acid originally present in wine is in all cases strongly linked to wine age, being the effect of age in phenylacetaldehyde opposite to that observed in the other aldehydes. Young wines accumulated $9,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ of phenylacetaldehyde per mg L^{-1} of phenylalanine present, while just $3,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ per mg L^{-1} were observed in aged wines. Conversely, for 2-methylbutanal, aged wines accumulated $1,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ of aldehyde, while young wines just $0,17 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ per mg L^{-1} of amino acid. If such difference was exclusively due to the effect of ARPs, that would mean that in young wines, more than 85% of aldehyde formed has been removed by reaction.

Levels of diacetyl are negatively and significantly ($P<0,05$ in all cases) correlated to the accumulation of non-aromatic Strecker aldehydes. This may suggest that diacetyl reacts with the amino acid precursor to form different species. i.e., although diacetyl can induce the Strecker degradation of amino acids [26], it can also form a wide range of heterocyclic products belonging to chemical classes such as oxazoles, pyrazines, pyrroles or pyridines [71, 72].

Further clues about the nature and relative importance of the chemicals involved in the accumulation of Strecker aldehydes can be extracted from the PLS models summarized in **table 5**. The eight models for non-aromatic aldehydes closely follow the same structure, and in all cases attribute a positive weight to the amino acid, higher at high levels of oxygen (**table 5a**), and negative roles to anthocyanins, which would act as ARPs. Some other

elements in the models are worth mentioning. First, in the case of isovaleraldehyde in **table 5a**, the negative role of diacetyl, which would compete for the amino acid, as previously suggested. Second, iron has positive coefficients in some cases, suggesting that it may play a role as catalyst. Third, in the medium oxygen exposure (**table 5b**), the negative coefficients for procyanidins and catechin in tannins suggest that they act also as ARPs.

Models for phenylacetaldehyde are completely different. First, because anthocyanins do not have any weight, and second, because it is the single aldehyde for which tannins have positive weight. This may suggest that quinones derived from prodelphinidins and catechin in tannins would be particularly reactive towards phenylalanine yielding phenylacetaldehyde. This is consistent with the observation that *o*-quinones at pH 7 with $K_3Fe(CN)_6$ favor Strecker production of phenylacetaldehyde over methional [26]. The higher levels of these quinones present in young wines, together with the negligible reactivity towards ARPs, would explain the higher formation of this aldehyde in young wines. A third specificity of phenylacetaldehyde is the large and positive coefficient taken by diacetyl in **table 5b**, suggesting that in this particular case, diacetyl is one of the α -dicarbonyls inducing the Strecker degradation of phenylalanine. The distinct pattern followed by phenylacetaldehyde has been already observed [25, 26].

a)

	Isobutyraldehyde	Isovaleraldehyde	2-Methylbutanal	Methional	Phenylacetaldehyde
R ²	0,968	0,995	0,9997	0,990	0,916
R ² cross-validation	0,924	0,982	0,9994	0,964	0,821
RMSE	1,558	1,592	0,108	1,863	8,793
RMSE cross-validation	2,737	3,402	0,178	3,946	14,685
PCs	2	4	3	3	2
B0	16,564	16,193	8,683	23,599	67,033
Diacetyl		-6,680			
Valine	5,304				
Leucine		15,509			
Isoleucine			4,314		
Methionine				7,684	
Phenylalanine					12,307
Prodelphinidins					6,587
Catechin in tannins					8,574
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside	-4,088	-5,178		-8,521	
Petunidin-3- <i>O</i> -glucoside			-2,208	-7,336	
Delfinidin-3- <i>O</i> -glucoside			-1,951		
Peonidin-3- <i>O</i> -glucoside-4-vinylguaiacol	-2,029		-1,700	-5,849	
Petunidin-3- <i>O</i> -glucoside-4-vinylguaiacol		-4,621			
Fe	2,506			5,489	18,349

b)

	Isobutyraldehyde	Isovaleraldehyde	2-Methylbutanal	Methional	Phenylacetaldehyde
R ²	0,849	0,985	0,929	0,957	0,957
R2 cross-validation	0,717	0,966	0,868	0,863	0,780
RMSE	2,481	2,288	1,285	2,902	4,414
RMSE cross-validation	3,885	3,929	2,003	5,917	11,391
PCs	2	3	2	2	3
B0	8,564	11,421	5,595	16,308	55,455
Diacetyl					13,972
Valine	0,389				
Leucine		7,878			
Isoleucine			1,729		
Methionine				2,604	
Phenylalanine					14,205
Procyanidins	-1,731			-5,817	
Catechin in tannins	-1,950				1,624
Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside	-1,761	-6,822	-1,560	-4,668	
Petunidin-3- <i>O</i> -glucoside				-3,388	
Malvidin-3- <i>O</i> -(6- <i>p</i> -coumaroyl)glucoside		-5,372	-1,210		
Peonidin-3- <i>O</i> -glucoside-4-vinylguaiacol	-2,870	-8,405	-1,676		
Petunidin-3- <i>O</i> -glucoside-4-vinylguaiacol			-1,188	-3,405	
Fe				2,455	9,938

Table 5. PLS models relating the increase in total Strecker aldehyde, normalized by the consumed O₂ not invested in the oxidation of SO₂ in each wine, to the initial composition of the wines: a) R3-R0 and b) R2-R0.

3.7. Fusel alcohols as precursors of Strecker aldehydes

Models in **table 5** suggest that fusel alcohols are less relevant than amino acids as precursors for Strecker aldehydes, in agreement with previous studies [10, 25, 29]. The potential relevance of fusel alcohols can be further assessed by estimating the proportion of alcohol oxidized, assuming that they will be oxidized at extents similar to those of ethyl alcohol. The molar fractions of ethanol oxidized were estimated from the expected levels of H₂O₂ produced and are given in **table 6**. As can be seen, ethanol oxidizes by percentages which range between 0,003 and 0,045%, depending on the alcoholic degree of the wine and on the oxygen exposure. If equivalent amounts of isobutanol, 2-methylbutanol, isoamyl alcohol, methionol and β -phenylethanol have been oxidized to form the corresponding aldehydes, data show that only in the cases of isobutyraldehyde, 2-methylbutanal and isovaleraldehyde, the direct oxidation of the precursor alcohol can be a significant source of those aldehydes. Taking into account, however, the large fraction of aldehyde removed by reaction with ARPs and the fact that levels of alcohols tend to be less variable than those of amino acids, the contribution of the alcohols to the specific ability of a sample to form these aldehydes should be quite limited. In the case of methionol, the oxidation of methionol may account just for a marginal amount of the aldehyde accumulated, in accordance with previous observations [29]. In the case of phenylacetaldehyde and taking into account its low reactivity towards ARPs, the oxidation of the alcohol as source of aldehyde should not be discarded, particularly in wines containing high amounts of this alcohol.

	H ₂ O ₂ produced (mMol)	EtOH (Mol)	Fraction of oxidized ethanol	Isobutanol (mg/L)	Formed isobutyraldehyde explained	Isoamyl alcohol (mg/L)	Isovaleraldehyde +2-methylbutanal explained	Methionol (mg/L)	Methional explained	β-Phenylethanol (mg/L)	Phenylacetaldehyde explained
SL R1	0,09	2,31	0,0040%	36,49	>100%	248,04	>100%	2,15	1%	38,74	18%
SL R2	0,46		0,0200%		69%		>100%		2%		36%
SL R3	0,93		0,0402%		73%		>100%		3%		50%
TS R1	0,09	2,48	0,0035%	23,15	>100%	183,89	>100%	0,97	>100%	20,60	>100%
TS R2	0,51		0,0204%		70%		>100%		2%		29%
TS R3	1,06		0,0425%		79%		>100%		3%		47%
BL R1	0,17	2,31	0,0072%	34,05	69%	236,81	>100%	1,91	2%	35,77	21%
BL R2	0,59		0,0256%		77%		>100%		2%		22%
BL R3	1,01		0,0438%		67%		>100%		2%		29%
CH R1	0,22	2,40	0,0092%	37,11	>100%	253,14	>100%	2,31	2%	34,13	13%
CH R2	0,59		0,0247%		41%		87%		1%		10%
CH R3	1,07		0,0446%		39%		>100%		1%		16%
MF R1	0,20	2,31	0,0088%	45,58	>100%	224,51	>100%	2,15	>100%	44,45	72%
MF R2	0,54		0,0232%		>100%		>100%		6%		13%

MF R3	0,89		0,0387%		>100%		>100%		8%		16%
TP R1	0,15	2,57	0,0058%	23,10	>100%	185,28	>100%	0,99	>100%	20,70	>100%
TP R2	0,54		0,0209%		>100%		>100%		2%		6%
TP R3	0,96		0,0374%		>100%		>100%		3%		12%
HV R1	0,30	2,48	0,0122%	32,82	>100%	216,65	>100%	1,86	>100%	33,52	>100%
HV R2	0,60		0,0243%		>100%		>100%		19%		12%
HV R3	1,01		0,0405%		>100%		>100%		10%		14%
BS R1	0,27	2,31	0,0118%	36,40	>100%	243,19	>100%	1,91	>100%	34,36	>100%
BS R2	0,59		0,0254%		>100%		>100%		12%		13%
BS R3	1,00		0,0433%		>100%		>100%		8%		20%

Table 6. Fraction of Strecker aldehyde formed in wine which could be attributed to the oxidation of the corresponding precursor alcohol, assuming that this one oxidizes in the same proportion than ethanol in the Fenton reaction.

3.8. Patterns of accumulation of aldehydes and potential sensory effects

Attending to the previous discussion, the patterns of accumulation of Strecker aldehydes (**figures 4c and 4d**) can be explained attending to the availability of reactive quinones able to induce the Strecker degradation of the amino acid precursors and to the presence of ARPs. In the first stage of the oxidation, quinones surely will be poorly available because they will be reacting fast with SO₂ or with other competing nucleophiles, so that Strecker degradation of amino acids will not be intense. In addition, the few molecules of aldehyde formed will react with ARPs, so that non-aromatic Strecker aldehydes do not accumulate, as seen in **table 2** and **figure 4c**. In contrast, in the case of phenylacetaldehyde (**figure 4d**), which is the least reactive to ARPs, clear increments of the aldehyde in older wines can be observed even in the low O₂ exposure conditions. The reasons why those increments are not observed in young wines may be related to the highest levels of ARPs of these wines, which would mean that reactivity of phenylacetaldehyde towards ARPs contained in young wines is not null. At medium O₂ exposure levels, in which SO₂ becomes poorly available, both plots suggest that there is an intense degradation of amino acids through the Strecker pathway. In the case of non-aromatic aldehydes increases are limited because of the presence of ARPs and because in these cases diacetyl, which is now released from its SO₂ adducts, would be competing for the amino acids. On the contrary, in the case of phenylacetaldehyde, the huge increases observed in young wines in this specific range of oxygen, should be attributed to the lower fraction consumed by ARPs, to the potential extra contribution of diacetyl as reactive α -dicarbonyl and to the possible specific Strecker degradation of phenylalanine by quinones derived from catechin in tannins. Finally, the flat part of the plot in **4d** may be due to the exhaustion of the amino acid precursors,

A quite important corollary of all the previous observations and hypotheses, is that regarding the temporal pattern of accumulation of aldehydes. Strecker aldehydes accumulate long before acetaldehyde does. This can be seen in **figure 8**, which compares the evolution during oxidation of acetaldehyde, methional and phenylacetaldehyde in a young (HV) and an aged wine (BL). The highest difference between acetaldehyde and Strecker aldehydes is found in the second oxidation stage and is particularly evident in the young wine (filled lines). It can be clearly appreciated that while acetaldehyde decreases, the levels of Strecker aldehydes peak up. In aged wines, even if in the low and high O₂ exposure levels the three aldehydes increase in parallel, increases of Strecker aldehydes in the medium exposure levels are much higher than those of acetaldehyde. What this implies in sensory terms can be best assessed by estimation of the corresponding Odor Activity

Values, as seen in **figure 9**. It can be seen that in methional and phenylacetaldehyde reach much higher OAVs than acetaldehyde, and more important, even at low oxygen exposure they reach OAVs above 20, when acetaldehyde is barely detectable.

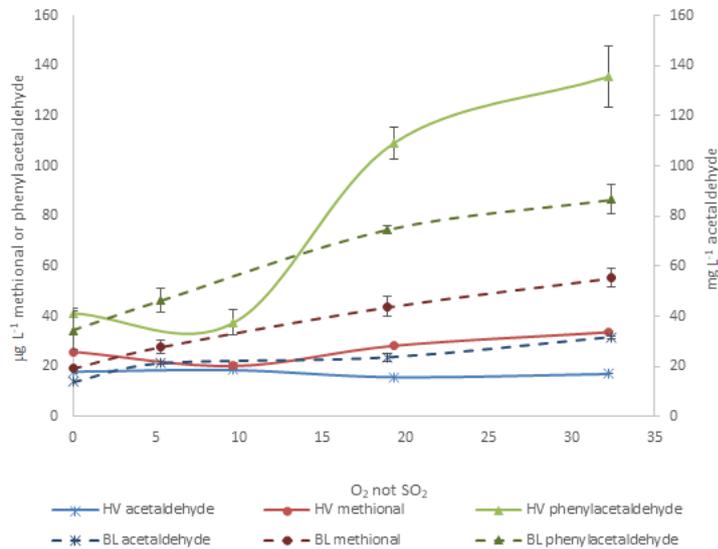


Figure 8. Comparison of the accumulation of acetaldehyde (x), methional (circles), and phenylacetaldehyde (triangles) in aged (dotted lines) and Young (filled lines) wines during oxidation.

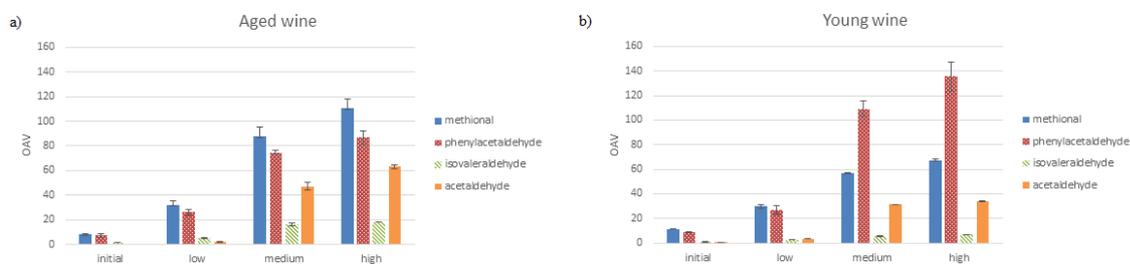


Figure 9. Evolution of the estimated Odor Activity Values (OAVs) of free acetaldehyde and free Strecker aldehydes for the wines (A) BL (example of aged wine) and (B) HV (example of young wine) during oxidation. Odor thresholds taken from [11, 12, 73]. In initial and low Oxygen exposure samples, the proportion of aldehyde under free form has been estimated from the corresponding SO_2 binding constants [27-29]; in R2 and R3, as there was no free SO_2 , all the aldehyde was considered free.

4. Conclusions

1. The pattern of accumulation of acetaldehyde in red wine during oxidation is related to the wine content in SO₂ and SO₂ binders, to the relative rates at which H₂O₂ and SO₂ are formed and consumed, respectively, and to the wine content in ARPs, which according to our models, should be mostly anthocyanins and small tannins. This explains why in young wines there is hardly any accumulation of acetaldehyde, regardless of the O₂ consumed by the wine, while in aged wines, acetaldehyde accumulates as long as there remains a little fraction of SO₂ able to protect it from the reaction with ARPs. Acetaldehyde will further accumulate only when these ARPs have been exhausted.
2. The accumulation of Strecker aldehydes follows a completely different pattern consistent with a major formation via Strecker degradation of amino acids. Nevertheless, non-aromatic Strecker aldehydes share with acetaldehyde a high affinity towards ARPs, which exert a relevant negative influence on their accumulation and explain the higher levels accumulated in aged wines. The Strecker degradation of non-aromatic amino acids would take place when SO₂ is poorly available through reactive quinones in reactions likely catalyzed by iron. Diacetyl would be a competitor for those amino acids as its presence is related to reduced formation of the corresponding aldehydes. Phenylacetaldehyde follows a quite distinct pattern likely derived from a much reduced reactivity towards ARPs, to the possibility that diacetyl in this case also induces Strecker degradation, and to the potential higher specificity for the quinones of catechin in tannins.
3. A final corollary of the differential patterns of accumulation is that Strecker aldehydes will accumulate before acetaldehyde, and in wines containing normal levels of Strecker amino acids will be potentially responsible for sensory changes long before acetaldehyde becomes evident.

5. References

1. Ugliano, M., *Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(26): p. 6125-6136.
2. Atanasova, V., et al., *Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making*. Analytica Chimica Acta, 2002. **458**(1): p. 15-27.
3. Cano-Lopez, M., et al., *Effect of micro-oxygenation on color and anthocyanin-related compounds of wines with different phenolic contents*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(14): p. 5932-5941.
4. Ribéreau-Gayon, P., P. Pontallier, and Y. Glories, *Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1983. **34**(5): p. 505-516.
5. Wirth, J., et al., *The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines*. Food Chemistry, 2010. **123**(1): p. 107-116.
6. Cejudo-Bastante, M.J., I. Hermosin-Gutierrez, and M.S. Perez-Coello, *Micro-oxygenation and oak chip treatments of red wines: Effects on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. Part I: Petit Verdot wines*. Food Chemistry, 2011. **124**(3): p. 727-737.
7. Chira, K., M. Jourdes, and P.L. Teissedre, *Cabernet sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage*. European Food Research and Technology, 2012. **234**(2): p. 253-261.
8. Ortega Heras, M., et al., *Changes in the volatile composition of red wines during aging in oak barrels due to microoxygenation treatment applied before malolactic fermentation*. European Food Research and Technology, 2008. **226**(6): p. 1485-1493.
9. Singleton, V.L. and T.E. Kramling, *BROWNING OF WHITE WINES AND AN ACCELERATED TEST FOR BROWNING CAPACITY*. American Journal of Enology and Viticulture, 1976. **27**(4): p. 157-160.
10. Ferreira, V., et al., *Key Changes in Wine Aroma Active Compounds during Bottle Storage of Spanish Red Wines under Different Oxygen Levels*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(41): p. 10015-10027.
11. Cullere, L., J. Cacho, and V. Ferreira, *An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(3): p. 876-881.
12. Escudero, A., J. Cacho, and V. Ferreira, *Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study*. European Food Research and Technology, 2000. **211**(2): p. 105-110.
13. Escudero, A., et al., *Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 4268-4272.
14. Ferreira, A.C.S., T. Hogg, and P.G. de Pinho, *Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(5): p. 1377-1381.

15. Danilewicz, J.C., *Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper*. American Journal of Enology and Viticulture, 2007. **58**(1): p. 53-60.
16. Danilewicz, J.C., J.T. Secombe, and J. Whelan, *Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2008. **59**(2): p. 128-136.
17. Dimkou, E., et al., *Impact of Headspace Oxygen and Closure on Sulfur Dioxide, Color, and Hydrogen Sulfide Levels in a Riesling Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2011. **62**(3): p. 261-269.
18. Laurie, V.F., et al., *Reactivity of 3-sulfanyl-1-hexanol and catechol-containing phenolics in vitro*. Food Chemistry, 2012. **131**(4): p. 1510-1516.
19. Oliveira, R., et al., *Reducing Antioxidant Capacity Evaluated by Means of Controlled Potential Electrolysis*. Electroanalysis, 2011. **23**(3): p. 692-700.
20. Singleton, V.L., *OXYGEN WITH PHENOLS AND RELATED REACTIONS IN MUSTS, WINES, AND MODEL SYSTEMS - OBSERVATIONS AND PRACTICAL IMPLICATIONS*. American Journal of Enology and Viticulture, 1987. **38**(1): p. 69-77.
21. Waterhouse, A.L. and V.F. Laurie, *Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses*. American Journal of Enology and Viticulture, 2006. **57**(3): p. 306-313.
22. Danilewicz, J.C., *Reactions Involving Iron in Mediating Catechol Oxidation in Model Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2013.
23. San Juan, F., et al., *Aroma Chemical Composition of Red Wines from Different Price Categories and Its Relationship to Quality*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(20): p. 5045-5056.
24. Wildenrad, H.L. and V.L. Singleton, *Production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging*. American Journal of Enology and Viticulture, 1974. **25**(2): p. 119-126.
25. Grant-Preece, P., et al., *Sensorially important aldehyde production from amino acids in model wine systems: Impact of ascorbic acid, erythorbic acid, glutathione and sulphur dioxide*. Food Chemistry, 2013. **141**(1): p. 304-312.
26. 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**(5): p. 1893-1897.
27. Bueno, M., J. Zapata, and V. Ferreira, *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**: p. 33-42.
28. de Azevedo, L.C., et al., *Evaluation of the formation and stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(21): p. 8670-8680.
29. Bueno, M., V. Carrascón, and V. Ferreira, *Release and Formation of Oxidation-Related Aldehydes during Wine Oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(3): p. 608-617.

30. Baert, J.J., et al., *Exploring the Binding Behavior of Beer Staling Aldehydes in Model Systems*. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2015. **73**(1): p. 100-108.
31. Lienhard, G.E. and W.P. Jencks, *Thiol addition to carbonyl group. Equilibria and kinetics*. Journal of the American Chemical Society, 1966. **88**(17): p. 3982-&.
32. Sonni, F., et al., *Impact of Glutathione on the Formation of Methylmethine- and Carboxymethine-Bridged (+)-Catechin Dimers in a Model Wine System*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(13): p. 7410-7418.
33. Baert, J.J., et al., *Further Elucidation of Beer Flavor Instability: The Potential Role of Cysteine-Bound Aldehydes*. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2015. **73**(3): p. 243-252.
34. Camara, J.S., et al., *Heterocyclic acetals in Madeira wines*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003. **375**(8): p. 1221-1224.
35. Ferreira, A.C.S., J.-C. Barbe, and A. Bertrand, *Heterocyclic acetals from glycerol and acetaldehyde in Port wines: evolution with aging*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(9): p. 2560-4.
36. Schneider, R., et al., *Volatile compounds involved in the aroma of sweet fortified wines (Vins Doux Naturels) from Grenache noir*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(8): p. 3230-3237.
37. Bakker, J. and C.F. Timberlake, *Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(1): p. 35-43.
38. de Freitas, V. and N. Mateus, *Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **401**(5): p. 1463-1473.
39. Marquez, A., M.P. Serratos, and J. Merida, *Pyranoanthocyanin Derived Pigments in Wine: Structure and Formation during Winemaking*. Journal of Chemistry, 2013.
40. Vivar-Quintana, A.M., et al., *Formation of anthocyanin-derived pigments in experimental red wines*. Food Science and Technology International, 1999. **5**(4): p. 347-352.
41. Atanasova, V., et al., *Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product*. Tetrahedron Letters, 2002. **43**(35): p. 6151-6153.
42. Duenas, M., et al., *UV-visible spectroscopic investigation of the 8,8-methylmethine catechin-malvidin 3-glucoside pigments in aqueous solution: Structural transformations and molecular complexation with chlorogenic acid*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(1): p. 189-196.
43. Escribano-Bailon, T., et al., *Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin 3-O-glucoside and (+)-catechin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(3): p. 1213-1217.
44. Es-Safi, N.E., V. Cheynier, and M. Moutounet, *Role of aldehydic derivatives in the condensation of phenolic compounds with emphasis on the sensorial properties of*

- fruit-derived foods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(20): p. 5571-5585.
45. Es-Safi, N.E., et al., *Studies on the acetaldehyde-induced condensation of (-)-epicatechin and malvidin 3-O-glucoside in a model solution system*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(5): p. 2096-2102.
46. Es-Safi, N.E., et al., *New phenolic compounds formed by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic solution and their implication in color changes of grape-derived foods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 4233-4240.
47. Fulcrand, H., et al., *An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation*. Phytochemistry, 1997. **46**(2): p. 223-227.
48. Fulcrand, H., et al., *Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography ion spray mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1996. **752**(1-2): p. 85-91.
49. Nave, F., et al., *The fate of flavanol-anthocyanin adducts in wines: Study of their putative reaction patterns in the presence of acetaldehyde*. Food Chemistry, 2010. **121**(4): p. 1129-1138.
50. Marrufo-Curtido, A., et al., *A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines and some observations about the influence of wine initial chemical composition*. Food Chemistry, 2018. **248**(Supplement C): p. 37-45.
51. OIV, *Sterilising filtration (01/2015)*, 2015, Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis.
52. Marrufo-Curtido, A., et al., *A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines and some observations about the influence of wine initial chemical composition*. Food Chemistry, 2018. **248**: p. 37-45.
53. Carrascón, V., et al., *Gas chromatography-mass spectrometry strategies for the accurate and sensitive speciation of sulfur dioxide in wine*. Journal of Chromatography A, 2017. **1504**: p. 27-34.
54. Grindlay, G., et al., *Evaluation of the multi-element capabilities of collision/reaction cell inductively coupled plasma-mass spectrometry in wine analysis*. Talanta, 2014. **128**: p. 379-385.
55. Hernandez-Orte, P., et al., *Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method*. Chromatographia, 2003. **58**(1-2): p. 29-35.
56. Herrero, P., et al., *Re-evaluación y nueva propuesta de calibración de un método para el análisis de volátiles mayoritarios del vino por micro-extracción líquido-líquido.*, in *Actualizaciones en investigación vitivinícola 2011*, Martínez Encuadernaciones A.G., S.L.: Jerez de la Frontera (Cádiz). p. 379-382.
57. OIV, *OIV-MA-AS323-04A Sulfur dioxide*, in *Sulfur dioxide (Resolution Oeno 377/2009)* 2009, Compendium of International Methods of Analysis.

58. Ortega, C., et al., *Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts*. Journal of Chromatography A, 2001. **923**(1-2): p. 205-214.
59. Ribéreau-Gayon, P., et al., *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of wine Stabilization and Treatments*. 2006, New York: Chichester: John Wiley & Sons.
60. Singleton, V.L., R. Orthofer, and R.M. Lamuela-Raventos, *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.*, in *Oxidants and antioxidants, Part A*, L. Packer, Editor 1999. p. 152-178.
61. Vallverdu-Queralt, A., et al., *A comprehensive investigation of guaiacyl-pyranoanthocyanin synthesis by one-/two-dimensional NMR and UPLC-DAD-ESI-MSn*. Food Chemistry, 2016. **199**: p. 902-910.
62. OIV, *Chromatic Characteristics*, 2009, Compendium of International Methods of Analysis.
63. Kennedy, J.A. and G.P. Jones, *Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(4): p. 1740-1746.
64. Carrascón, V., et al., *The kinetics of oxygen and SO₂ consumption by red wines. What do they tell about oxidation mechanisms and about changes in wine composition?* Food Chemistry, 2018. **241**(Supplement C): p. 206-214.
65. Ducasse, M.-A., et al., *Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines*. Food Chemistry, 2010. **118**(2): p. 369-376.
66. Danilewicz, J.C., *Reactions Involving Iron in Mediating Catechol Oxidation in Model Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2013. **64**(3): p. 316-324.
67. Blanco-Vega, D., et al., *HPLC-DAD-ESI-MS/MS Characterization of Pyranoanthocyanins Pigments Formed in Model Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(17): p. 9523-9531.
68. Marchand, S., J. Almy, and G. de Revel, *The Cysteine Reaction with Diacetyl under Wine-Like Conditions: Proposed Mechanisms for Mixed Origins of 2-Methylthiazole, 2-Methyl-3-thiazoline, 2-Methylthiazolidine, and 2,4,5-Trimethyloxazole*. Journal of Food Science, 2011. **76**(6): p. C861-C868.
69. Marchand, S., G. de Revel, and A. Bertrand, *Approaches to wine aroma: Release of aroma compounds from reactions between cysteine and carbonyl compounds in wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(10): p. 4890-4895.
70. Oliveira, C.M., et al., *Oxidation mechanisms occurring in wines*. Food Research International, 2011. **44**(5): p. 1115-1126.
71. Piloty, M. and W. Baltes, *Investigations on the reaction of amino-acids with alfa-dicarbonyl compounds. 2. Volatile products of the reaction of amino-acids with diacetyl (2,3-butanedione)*. Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung, 1979. **168**(5): p. 374-380.

72. Pripis-Nicolau, L., et al., *Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 3761-3766.
73. Guth, H., *Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(8): p. 3027-3032.

CAPÍTULO III

**Un índice acelerado para evaluar la capacidad
de los vinos para producir aldehídos de
Strecker. Comparativa de los procesos
oxidativos a 25 y 45°C.**

CAPÍTULO III

Un índice acelerado para evaluar la capacidad de los vinos para producir aldehídos de Strecker. Comparativa de los procesos oxidativos a 25 y 45°C

1. Introducción

En enología, el oxígeno es una de las herramientas clave para obtener vinos de calidad [1]. A lo largo de todo el proceso de vinificación y crianza influye en la estabilización del color [2], en las sensaciones en boca [3] y calidad aromática de los vinos [3]. Sin embargo, se hace imprescindible una gestión exhaustiva de las dosis de oxígeno aplicadas, porque una exposición excesiva puede desarrollar rápidamente pardeamiento de color [4] y un detrimento de la calidad aromática [5].

Los responsables de los aromas a oxidación son el acetaldehído y los aldehídos de Strecker, principalmente el metional y el fenilacetaldehído [6-8]. El acetaldehído se forma tanto en la fermentación alcohólica [9] como en procesos posteriores de oxidación. Como explicamos en la introducción general, en el mecanismo de oxidación el oxígeno va reduciéndose hasta formar primero el radical hidroperoxilo y luego agua oxigenada. Si hay sulfuroso disponible, éste reacciona con el agua oxigenada [10], reduciéndola a agua, pero en su ausencia, y en presencia de cationes de hierro, el agua oxigenada no eliminada por el sulfuroso puede seguir reduciéndose hasta el radical hidroxilo y con él comienza la reacción de Fenton. El radical hidroxilo es extremadamente reactivo, reaccionando con las especies oxidables que se encuentran en el medio de una manera indiscriminada, de manera que los productos de oxidación formados siguen una distribución paralela a la de las moléculas de que se originan. Como el etanol representa más del 85 % de la materia orgánica, se asume que el compuesto aromático mayoritario de la oxidación será el acetaldehído [10]. El producto directo de la reacción radical $\text{OH}\cdot$ -etanol es el radical 1-hidroxietilo, que evolucionará a acetaldehído salvo que pueda ser captado por algún captador de radicales, como son los hidroxicinamatos [11]. Aunque esta reacción ha sido descrita, existe el convencimiento de que es una reacción minoritaria y que la producción de acetaldehído es mayoritaria.

Por su parte, y como se documentó previamente, los aldehídos de Strecker: isobutiraldehído, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, metional y fenilacetaldehído se generan tanto en la fermentación como en la oxidación a partir del aminoácido precursor correspondiente, valina, leucina, isoleucina, metionina y fenilalanina, respectivamente. En la oxidación, la producción se produce vía la reacción aminoácido con α -dicarbonilos a

través de la reacción de Strecker [12]. Las quinonas formadas en la oxidación contienen unidades de alfa-dicarbonilos, por lo que el consumo de oxígeno influye también en la formación de aldehídos de Strecker.

Tanto el acetaldehído como los aldehídos de Strecker reaccionan con el dióxido de azufre formando unos aductos químicamente denominados hidroxialquilsulfonatos, que no son volátiles, y por lo tanto no se perciben sensorialmente [13]. Sin embargo, durante el proceso de oxidación, como el sulfuroso libre está envuelto en multitud de reacciones, se va consumiendo, lo que provoca que el equilibrio se desplace liberando las especies que estén unidas a él de forma reversible, entre las que están los aldehídos de Strecker [13]. El aumento de aldehídos libres (que son volátiles) puede llevar al detrimento de la calidad aromática de los vinos [14].

La reactividad del acetaldehído con los polifenoles se conoce desde antiguo [15]. Recientemente se han encontrado evidencias de que también los aldehídos de Strecker reaccionan con polifenoles, principalmente con antocianos y taninos pequeños, a éstos polifenoles les hemos denominado (ARPs: polifenoles que reaccionan con aldehídos) [16]. Al contrario de lo que ocurre con el sulfuroso, en la reacción de los aldehídos con los ARPs no se ha descrito que pueda revertirse liberando el aldehído original. Los productos de condensación formados siguen evolucionando hasta obtenerse productos irreversibles como “formas xantenes” y piroantocianos, entre otros [17, 18].

Con respecto a la influencia de la temperatura, se ha descrito que al aumentar la temperatura de 30 a 40 °C hay un aumento del 20% en la producción de agua oxigenada [19]. Esto no implicaría necesariamente ese aumento proporcional en la formación de aldehídos, porque a partir de 35-50 °C el agua oxigenada formada se descompone fácilmente en agua y oxígeno [20, 21]. Otros estudios sin embargo, describen la máxima formación de productos de oxidación a temperaturas más moderadas (30 °C), y resaltan la influencia de otros factores como el pH y el hierro [22]. La reactividad polifenol-aldehído también se ve influenciada por la temperatura. Para el caso del acetaldehído, la reacción a 42 grados está favorecida en un factor dos frente a 22 grados; y se necesitaron 150 días para que la concentración de polímeros mediados por puentes de etilo se igualaran a ambas temperaturas [23].

Es habitual evaluar la resistencia de un vino a la oxidación utilizando ensayos que miden sus propiedades antioxidantes: por ejemplo el ORACFL [24] o el estudio de captación del peróxido de hidrógeno [25]. Sin embargo, también es interesante cuantificar directamente las especies oxidativas involucradas en el proceso, en particular, el peróxido de hidrógeno,

H₂O₂ [19] o los productos que se forman durante la oxidación como son los aldehídos de Strecker y acetaldehído.

Hasta la fecha, varios métodos de oxidación acelerada han sido empleados en el estudio de vinos, siempre a temperaturas más altas de la ambiente. 45 °C es una temperatura muy recurrente en los métodos de envejecimiento acelerado de vinos descritos en bibliografía para el estudio de productos de oxidación del ácido tartárico [26-28], por ejemplo. Otros métodos desarrollados miden el pardeamiento oxidativo en ensayos acelerados a 55 grados; siendo algunos muy útiles, porque son capaces de predecir las consecuencias de la oxidación en un tiempo muy razonable [4, 29, 30] .

La capacidad que tiene un vino para consumir oxígeno es intrínseca al mismo, dependiente del contenido polifenólico y del nivel de antioxidantes y metales. Conocer con antelación la cinética de consumo del oxígeno de un vino, puede ayudar a la industria vitivinícola en la optimización de cada una de las etapas en las que entran en juego el oxígeno o los catalizadores de la oxidación. Así mismo, conocer la capacidad que tiene un vino para generar aldehídos puede ser imprescindible para tomar decisiones a lo largo de la vinificación y conservación. Por ello en este trabajo se plantea la validación de un test de oxidación acelerado (45 °C) que nos permita poder conocer en muy poco tiempo información sobre las cinéticas de consumo de oxígeno y acumulación de aldehídos.

Un segundo objetivo desarrollado en este capítulo ha sido el estudio de la incubación a 45 grados como estrategia para la eliminación de los aldehídos de Strecker formados durante los procesos de oxidación.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestras de vino y procedimiento de oxidación

En este estudio se han usado 8 vinos tintos españoles de diferentes añadas (entre 2009-2014) elaborados principalmente con garnacha y tempranillo.

Los vinos se oxidaron a dos temperaturas diferentes 25 y 45 °C siguiendo el mismo procedimiento experimental:

- a) Primero se determinó el sulfuroso libre y total para todos los vinos al inicio del experimento por Rankine, siguiendo las instrucciones de la OIV [31].
- b) Las muestras se pasaron con filtros amicróbicos de 73 mm de diámetro y 0,22 µm de tamaño de poro (MERK, REF: SCGP U02 RE), con el fin de evitar cualquier desarrollo microbiológico durante el proceso de oxidación.

- c) Una vez filtrados, se saturaron con aire y se introdujeron en Wine in Tube (WIT) con el espacio de cabeza determinado siguiendo el procedimiento descrito por Marrufo-Curtido y col. [32].
- d) La dosis de oxígeno aplicada fue la cantidad estequiométricamente necesaria para desulfitar la muestra más 35 mg/L de oxígeno. Sabiendo que 2 moles de sulfuroso reaccionan con 1 mol de oxígeno, se calcula la dosis de oxígeno específica para cada vino. El rango de oxígeno aplicado está entre 35 y 53 mg/L.
- e) El oxígeno disuelto se midió cada 30 minutos durante las tres primeras horas y después una vez al día. La medida se realizó usando los sensores PSt3 de Nomacorc SA (Thimister-Clermont, Belgium).
- f) Los tubos herméticamente cerrados con “*screw caps*” se incubaron a 25 y 45 grados en un baño termostático Grant OLS23 con agitación orbital de (90 rpm), para asegurar que las fases líquida y gaseosa estuvieran en equilibrio.
- g) El procedimiento de oxidación se consideró completo cuando el vino consumió el 95 % del oxígeno inicial. En este momento, los tubos WIT se abrieron en la cámara de anoxia Jacomex (Dagneux, France). Esta cámara asegura un nivel inferior a 1 mg/L de O₂ en su interior y es donde se prepararon todos los análisis para evitar la oxidación.

2.2. Cálculo de los parámetros cinéticos

Los datos de oxígeno disuelto se modelizaron siguiendo el procedimiento de Marrufo-Curtido y col, [32] y se obtuvieron segmentos cinéticos con una velocidad constante, expresados como $1 - e^{-k}$ (días⁻¹). El primer tramo a ambas temperaturas se determinó directamente teniendo en cuenta el consumo de oxígeno en los primeros 30 minutos. Las otras velocidades se calcularon asumiendo cinética de consumo de primer orden [32]. Toda la información con respecto a este procedimiento se puede encontrar en el **capítulo 1**.

2.3. Caracterización química inicial

2.3.1. Sulfuroso libre y total por Rankine

El sulfuroso libre y total se analizó siguiendo las instrucciones de la OIV [31]. Se acidificaron 10 mL de vino con 5 mL de H₃PO₄ al 25%. La muestra se borboteó con aire durante 15 minutos (con un flujo de 600 ± 12 mL min⁻¹). El SO₂ liberado se recogió en un matraz en forma de corazón que tenía 3 mL de peróxido de hidrógeno (3%) y dos gotas de indicador mezcla (rojo de metilo, azul de metileno). El dióxido de azufre se oxidó completamente a ácido sulfúrico en el matraz corazón, cambiando el color de verde a púrpura. El ácido

sulfúrico formado se tituló con NaOH 0,01 M estandarizado. Así se obtuvo en primer lugar el sulfuroso libre.

Para la determinación del total, se usaron los mismos 10 mL de vino usados anteriormente y se calentaron hasta ebullición (para romper los aductos que el sulfuroso combinado forma principalmente con grupos carbonilos y enlaces lábiles con antocianos). Se preparó un matraz corazón nuevo con agua oxigenada e indicador, y se siguió el mismo procedimiento que para el sulfuroso libre.

2.3.2. Acetaldehído total por CG-FID

El acetaldehído total se determinó por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID). Se inyectó 1 μ L de vino muestra al que se dopó con 2-butanol (100mg L⁻¹) como patrón interno. El método se basó en romper los aductos (SO₂ - acetaldehído) directamente en el puerto del inyector. El equipo cromatográfico fue de la marca FISOONS modelo GC 8000(Ipswich, Reino Unido). La columna capilar usada fue una DB-WAX (30m \times 0,53mm of i.d. \times 2 μ m) de la marca J&W Scientific (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El inyector se mantuvo a 250 °C y se usó el modo split 1:4. Como gas portador se usó hidrógeno a presión constante de 27,5 KPa. El programa cromatográfico mantuvo la temperatura de 50 °C durante 5 minutos y después se aumentó la temperatura hasta 220 °C en 10 minutos. La temperatura del detector FID se mantuvo en 250 °C.

La linealidad del método se obtuvo por análisis de una recta de calibrado de vino sintético (5 g/L de ácido tartárico, 12 % etanol, 1,5 % de propanodiol, 10 g/L de glicerina, pH 3,5) y concentraciones conocidas de acetaldehído y 100 mg/L de 2-butanol como estándar interno. El rango lineal fue de hasta 120 mg/L R²: 0,998 y el límite de detección 0,22 mg/L, estimado como 3 veces la desviación estándar de un blanco (vino sintético sin acetaldehído). La repetibilidad del método se determinó usando una muestra sintética dopada con una concentración media de acetaldehído encontrada en vinos tintos (21,2 mg/L), y fue de 4,1 % (n=8). La reproducibilidad obtenida fue de 5,3 % y se estimó analizando la misma muestra en días diferentes (n=4). Los ensayos de recuperación se realizaron dopando dos vinos tintos diferentes con 20 mg/L de acetaldehído, permitiendo que se formaran los aductos (12 horas) y analizando cada muestra por triplicado. Las concentraciones determinadas fueron 19,0 \pm 1,6 y 19,6 \pm 1,3mg L⁻¹, no se encontraron diferencias significativas con respecto a la cantidad dopada.

Para comprobar que se rompían los aductos (acetaldehído-SO₂) en el inyector se realizó una comparación entre muestras sintéticas que contenían 100 mg/L de acetaldehído y diferentes concentraciones de sulfuroso (0 a 200 mg/L) (se incubaron 12 horas en anoxia

para que se formaran los aductos). No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones medidas de acetaldehído en las diferentes muestras dopadas con 100 mg/L de acetaldehído y cantidades diferentes de sulfuroso.

2.3.3. Determinación de aldehídos de Strecker totales por SPME-CG-MS

Se han cuantificado los aldehídos isobutiraldehído, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, metional, fenilacetaldehído según el método propuesto por Bueno y col [33]. Las muestras se prepararon en la cámara de anoxia: 10 mL de vino dopado con 187 µg/L de 2-metilbutirato de metilo (estándar interno) y 6 g/L de glioxal (para romper los aductos con el sulfuroso); se llevaron a un vial de espacio de cabeza de 20 mL que se selló herméticamente. Entonces, las muestras se incubaron 6 horas a 50 °C, para romper los aductos con el sulfuroso. Después, los aldehídos se preconcentraron usando una fibra de SPME PDMS/DVB (Supleco-Spain, Madrid, Spain). La muestra se analizó en un CG-MS equipado con un cuadrupolo en modo SIM.

2.3.4. Medidas espectrofotométricas

Se midió color e IPT siguiendo las recomendaciones de la OIV [34] y según Ribéreau-Gayon y col. [35], respectivamente.

2.3.5. Metales

Los metales determinados fueron hierro, cobre, zinc y manganeso. Se usó rodio como estándar interno y la metodología usada fue espectrometría de masas de plasma inductivamente acoplada con célula de colisión / reacción (CCT-ICP-MS) según lo descrito por Grindlay y col. [36].

2.3.6. Determinación de aminoácidos y polifenoles

1. Los aminoácidos de Strecker: valina, isoleucina, leucina, fenilalanina y metionina; se analizaron por HPLC con detector de fluorescencia según la metodología explicada por Hernández-Orte y col. [37]. El método se basa en una derivatización con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC).
2. Se analizaron ácidos fenólicos, flavanoles y antocianos por UPLC usando espectrometría de masas (MS) y detector de diodo array (DAD). Las muestras fueron analizadas por triplicado en modo positivo y negativo en función a lo dispuesto en el método de Vallverdu-Queralt y col. [38]. Se utilizó una columna C18 de fase reversa Acquity BEH (150mm x 1 mm x 1,7 µm) de Waters (Milford, MA, USA).

Para la determinación de los taninos condensados se llevó a cabo una reacción de floroglucinólisis; para favorecer la despolimerización de los taninos. Se llevó la muestra a pH ácido y añadimos un agente nucleófilo. El método seguido fue el descrito por Kennedy y col. [39] y Carrascón y col. [40]. La reacción se realizó por triplicado y las muestras despolimerizadas fueron analizadas por UPLC-DAD-MS a 280 nm. La relación molar de la cantidad total de subunidades despolimerizadas a subunidades terminales proporcionó el grado medio de polimerización (mDP) [41]. La cuantificación se realizó en equivalentes de catequina, epicatequina, epigallocatequina y epicatequina-3-O-galato a 280 nm.

2.4. Caracterización química en el punto final de oxidación

Se determinó acetaldehído total y aldehídos de Strecker al finalizar la oxidación siguiendo los procedimientos descritos en los **apartados 2.3.2 y 2.3.3**.

2.5. Estudio de la reactividad de los aldehídos de Strecker

Para estudiar la reactividad de los aldehídos de Strecker se trabajó en anoxia y dopando los mismos 8 vinos aproximadamente (se compraron botellas nuevas) con aldehídos. Las cantidades añadidas de cada aldehído se fijaron tras el análisis a tiempo cero de los vinos de partida. Cada vino se dopó con la cantidad de aldehído requerida para llevar su concentración a la máxima acumulada en el set de vinos tras la oxidación a 25 grados con 35 mg/L de O₂ no SO₂ (resultados de acumulación de acetaldehído y aldehídos de Strecker del **capítulo 2**); de manera que todos los vinos contuvieran los mismos niveles de cada aldehído. Tras el dopaje los vinos contuvieron 91 µg/L de isobutiraldehído, 112,3 µg/L de 3-metilbutanal, 45,3 µg/L de 2-metilbutanal, 102 µg/L de metional y 154 µg/L de fenilacetaldehído. El acetaldehído total se normalizó en todos los vinos hasta 38 mg/L.

Simulando las condiciones de la oxidación, los vinos dopados se incubaron 5 días a 45 °C y 36 días a 25 °C, después del periodo de incubación se analizó el contenido de aldehídos de Strecker totales, siguiendo la metodología descrita en el **apartado 2.3.3**.

2.6. Tratamiento de datos y análisis estadístico

Los estudios de correlación y la prueba t de Student se llevaron a cabo con Excel 2013 (Microsoft, Washington, EE. UU.). El análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales se llevaron a cabo utilizando The Unscrambler 9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Noruega).

3. Resultados y discusión

3.1 Cinética de consumo de Oxígeno

3.1.1 Coeficientes cinéticos a 45 °C

En este estudio se han oxidado 8 vinos tintos con la misma dosis de oxígeno, 35 mg/L de oxígeno más el necesario para desulfitar la muestra, a dos temperaturas: 25 y 45 grados. Tal y como esperábamos, la temperatura influye en gran medida en la cinética de consumo de oxígeno, ya que según los valores medios obtenidos, a 25 °C son necesarios 36,7 días de incubación mientras reducimos este tiempo a tan sólo 4,5 días a 45 °C (**tabla 1**). Los datos de oxígeno disuelto se modelizaron siguiendo el procedimiento de Marrufo-Curtido y col. [32] y se obtuvieron tres segmentos cinéticos con una velocidad constante expresada como $1-e^{-k}$ (días⁻¹). El primero (45-1) se determinó directamente teniendo en cuenta el consumo de oxígeno en los primeros 30 minutos. Los otros dos tramos (45-2 y 45-3) se calcularon asumiendo cinética de consumo de primer orden [32]. El procedimiento de oxidación a 45 grados fue muy reproducible con valores máximos de RSD de 1,8 % (**tabla 1**).

Código vino	25 °C				Coeficientes cinéticos K expresados como $(1-e^{-k})$ (días ⁻¹)					
	Tiempo necesario (días)	Oxígeno consumido total (mg/L)	Tiempo necesario (días)	Oxígeno consumido total (mg/L)	45-1		45-2		45-3	
					Media de 2 WITs	%RSD	Media de 2 WITs	%RSD	Media de 2 WITs	%RSD
SL	52,7	48,7	6,6	50	3,89	0	0,930	0,22	0,977	0,28
TS	52,7	53	4,6	46,7	4,31	0,34	0,954	0,04	0,986	0,08
BL	27	42,4	3,1	39,7	4,65	0,08	0,985	0,59	0,99	0,31
CH	52,6	42	4,6	38,3	4,63	0,26	0,948	0,70	0,966	0,76
MF	19,5	35	3,6	38,9	5,46	0,13	0,984	0,84	1,000	0,01
TP	29,4	37,8	3,6	36,2	5,30	0,26	0,934	0,73	0,987	0,02
HV	29,4	35,4	6,6	38	4,50	0,13	0,902	0,08	0,996	0,01
BS	30,6	40	3,6	38,7	5,37	0,16	0,928	1,79	0,993	0,11
Media	36,7	41,8	4,5	43,8	4,76		0,946		0,987	

Tabla 1. Detalles básicos de la oxidación a 25 y 45 grados: días necesarios para consumir el 95% de la dosis aportada y oxígeno consumido total (mg/L). Coeficientes cinéticos para la oxidación a 45 °C expresados como $1-e^{-k}$ (días⁻¹). Valores medios para la duración de la oxidación (días), oxígeno consumido (mg/L) y coeficientes cinéticos (días⁻¹).

Los tres coeficientes obtenidos (expresados como $1-e^{-k}$ (días⁻¹)) representan la fracción de oxígeno disuelto que consume el vino en un día. Por ejemplo, la media obtenida para el tramo 45-1 fue de 4,76. Esto significa que, si continuase con esa misma velocidad durante 24 horas, y en condiciones *ad libitum*, consumiría 4,76 veces el oxígeno presente dentro del tubo al comienzo del experimento. Como vemos en la **tabla 1** y atendiendo a valores medios, en los primeros 30 minutos fue cuando más oxígeno se consumió (45-1). Después de esta etapa, la velocidad de consumo de oxígeno disminuyó y durante aproximadamente 1,7 días, consumió el oxígeno a una velocidad media de 0,946 días⁻¹. Es decir, que en un día se

consumió el 94,6 % del oxígeno presente en el tubo al comienzo de ese día. En el último tramo, más largo, que duró otros 2,1 días, se aceleró el consumo, pasando a consumir en un día el 98,7% del oxígeno presente al comienzo de ese día.

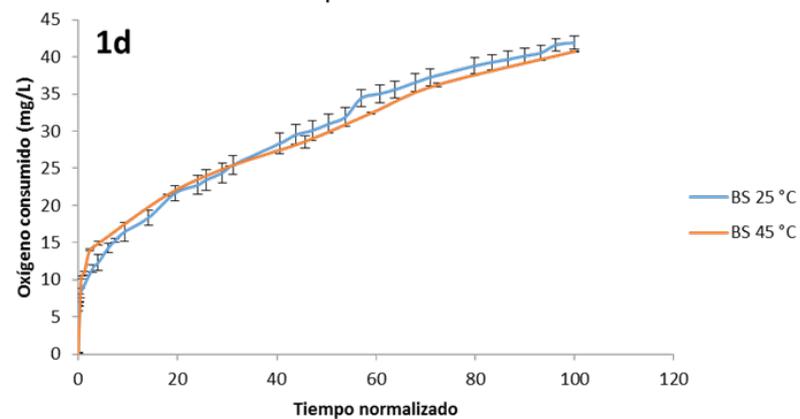
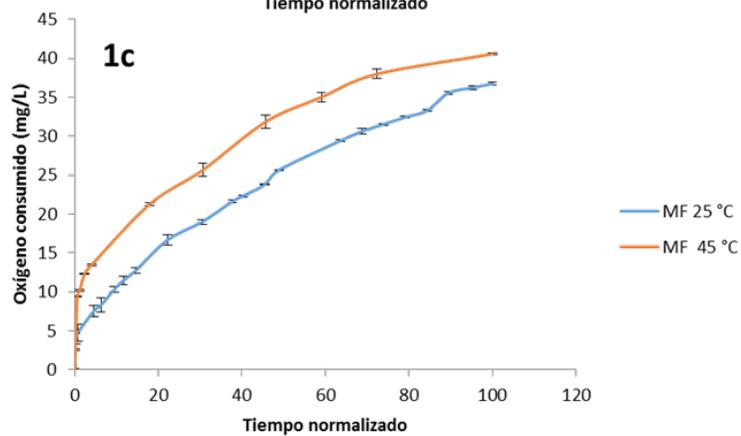
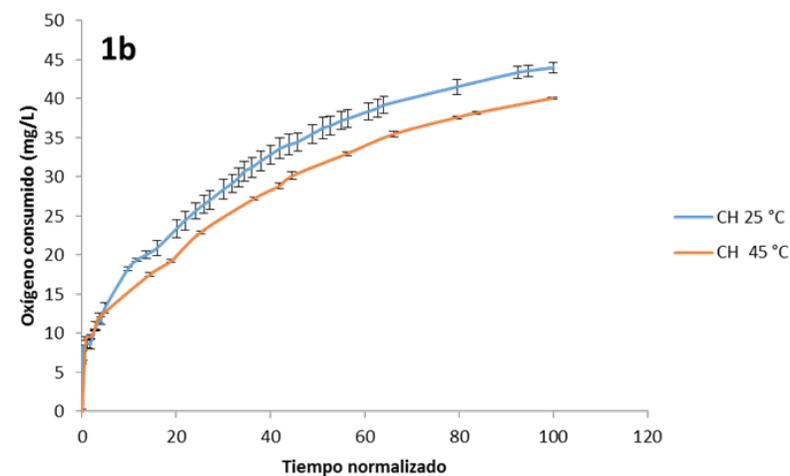
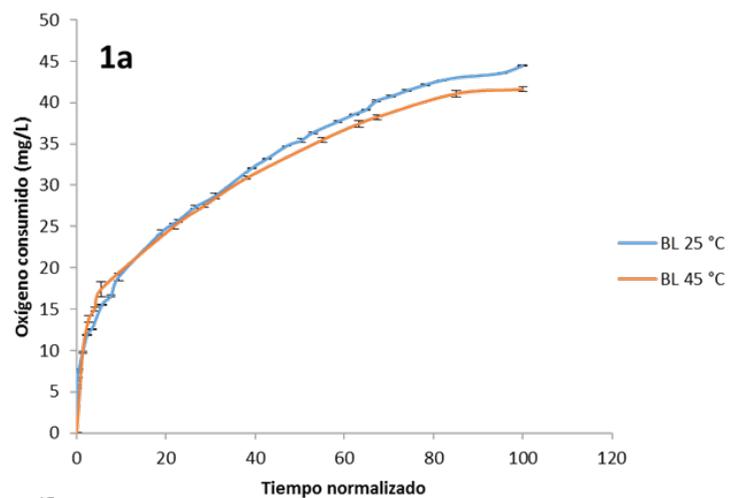
3.1.2 Comparación de la evolución del oxígeno consumido a 25 y 45 °C

Como acabamos de ver, la oxidación fue de media 8 veces más rápida a 45°C que a 25°C. Por ello, para poder comparar la cinética del consumo de oxígeno a ambas temperaturas; se representan los datos en función del tiempo normalizado. De manera general se diferencian hasta 4 tipos de comportamientos, que se muestran en las **figuras 1a, 1b, 1c y 1d**:

- a) Las curvas de consumo de oxígeno casi se superponen para ambas temperaturas. Es decir, sólo se diferencian en el tiempo de oxidación. Como ejemplo tenemos el vino BL. **Figura 1a**.
- b) La evolución a 45 grados va por debajo (menor pendiente) de la curva de 25 grados (vinos CH y TS). **Figura 1b**.
- c) La cinética de consumo obtenida a 45 grados va por encima y paralela a la de 25 °C. Se cumple para los vinos SL, MF y HV. En la **figura 1 c** se representa el vino MF y es de destacar que a 45 °C se consumió el doble de oxígeno que a temperatura ambiente, en los primeros momentos del proceso. La temperatura influyó sobre todo al principio, después, las dos curvas iban paralelas.
- d) Aunque no existen diferencias significativas entre ambas curvas, esta última categoría se caracteriza por presentar un corte hacia la mitad y tener una oxidación a 25 grados con medidas más imprecisas (**Figura 1d**). El comportamiento es muy parecido al primer tipo descrito. Los vinos BS y TP presentaron este perfil.

No encontramos ningún tipo de correlación de estos comportamientos con la añada o variedad de los vinos. Como era de esperar las cinéticas de consumo de oxígeno a 25 y 45 grados no son directamente comparables. Se buscaron también correlaciones entre los 3 coeficientes obtenidos a 45 grados y los 6 obtenidos en la oxidación a 25 °C (explosiva, pre-inicial, inicial, media, pre-final y final) para los mismos vinos [32]. Se encontró una correlación significativa ($R=0,94$; $p=0,0005$) entre la etapa 45-2 y la velocidad media. También se observó una tendencia entre el coeficiente 45-3 y la velocidad final ($R=0,67$; $p=0,0710$). Es decir, con los segmentos 45-1, 45-2, y 45-3 perdemos la información de 5 de las 6 etapas descritas en la oxidación a 25 grados. Sin embargo, podemos obtener en tan solo 5 días la velocidad media, que es uno de los tramos más estudiados y relacionados con la composición química inicial [42]. En condiciones normales la determinación de la

velocidad media puede implicar entre 2 y 16 días [32]. A 45 grados se reduciría este tiempo considerablemente.



Figuras 1a, 1b, 1c y 1d. Oxígeno consumido frente a tiempo normalizado para los 4 tipos principales de comportamiento encontrados al comparar 25 y 45 grados. Las barras de error representan el error $(s/\sqrt{(n)})$.

	Explosiva	Pre-Inicial	Inicial	Media	Pre-final	Pre-final	Final
Varianza Explicada(%)	0,947	0,998	0,983	0,778	0,990	0,998	0,996
Varianza Explicada(%) cross-validation	0,797	0,984	0,770	0,728	0,963	0,984	0,918
RMSE (días ⁻¹)	1,050	0,002	0,018	0,035	0,005	0,002	0,006
RMSE cross-validation (días ⁻¹)	2,357	0,007	0,076	0,046	0,012	0,007	0,033
PCs	4	3	6	1	3	3	5
B0	7,288	0,924	0,629	0,374	0,284	0,924	0,531
0,04 día	-6,931	0	-0,062	0	0,005	0	0,134
0,08 día	15,537	0,056	0,135	0	-0,032	0,056	0
0,17 día	0	0	0,109	0,0707	-0,010	0	0,291
0,67 día	-9,222	-0,040	-0,163	0	-0,016	-0,040	-0,124
0,88 día	-18,197	0	-0,207	0	-0,019	0	-0,256
1,17 día	0	-0,086	-0,327	0	-0,002	-0,086	0
1,69 día	0	0	0,102	0	0,005	0	0
1,94 día	0	0	0	0	0,003	0	0
2,06 día	16,408	0	0,193	0	0,006	0	0,301
2,60 día	0	0,020	0,083	0	0,001	0,020	0
3,06 día	0	0,062	0,027	0	0,001	0,062	-0,331
Muestras excluidas	-	HV		TS	BS	HV	-

Tabla 2. Modelos PLS de las velocidades de oxígeno consumido en vino tinto a 25°C en función de las concentraciones de oxígeno disuelto medidos en la oxidación a 45 °C. (Nombre de las variables: días en los que se midió el oxígeno disuelto).

Como acabamos de ver, las cinéticas obtenidas a 25 y 45 grados no fueron directamente comparables y los parámetros cinéticos que podríamos obtener por el método acelerado de oxidación (45 °C) fueron la velocidad media y la final. Por eso, con el objetivo de poder describir más etapas cinéticas a partir del método rápido, se realizaron modelos PLS usando como variables los datos de oxígeno disuelto a 45 grados. En la **tabla 2** se observa que a partir de los mismos podemos obtener información de las 6 etapas que definen la cinética de consumo de oxígeno de un vino tinto a temperatura ambiente. Los modelos para las etapas pre-inicial, pre-final y final explicaron un porcentaje de varianza superior al 90% en Cross Validation. Sin embargo, los modelos para el resto de las etapas explicaron menos varianza, incluso eliminando una muestra, como sucedió con la etapa media, con la menor varianza explicada en la validación, 73%. Para la velocidad pre-final aparecieron 2 modelos con buenas características, cada uno de ellos eliminando una muestra diferente. La etapa mejor explicada fue la velocidad final, ya que no fue necesario descartar ningún vino para obtener unas buenas características en el modelo.

Por todo esto, ya sea a partir de los datos de oxígeno disueltos a 45 grados o usando los parámetros (45-1, 45-2 y 45-3), los resultados sugieren que es posible reconstruir, al menos de manera parcial, la cinética de oxidación de los vinos tintos a temperatura ambiente, en menos de 5 días a 45 grados. Sería necesario realizar el trabajo con un número superior de vinos para poder construir modelos más consistentes.

3.2 Acumulación de aldehídos

3.2.1 Tasa de acumulación de aldehídos a ambas temperaturas

En la **tabla 3** se presentan los datos de acumulación de aldehídos de Strecker totales y acetaldehído total. Se presentan las concentraciones obtenidas a tiempo 0 y las obtenidas tras la oxidación a 25 y 45 °C.

Tal y como hemos indicado en la introducción de este capítulo, no está claro si la generación de agua oxigenada y por tanto de radicales hidroxilos se puede considerar la misma a ambas temperaturas. Y también se desconoce la influencia de la temperatura en la reactividad de los aldehídos de oxidación. A pesar de ello, parece razonable asumir que, en cualquier condición, la cantidad de aldehído medida en un momento determinado es el resultado de dos procesos contrapuestos: la formación de aldehído y las reacciones de reacción de los aldehídos, por ello si a los datos obtenidos experimentalmente, que son los de acumulación neta, les sumamos la cantidad de aldehído reaccionada se tendría:

$$\text{Formación de aldehídos} = \text{Acumulación de aldehídos} + \text{Reacción de aldehídos}$$

Ecuación 1. Cálculo de la formación de aldehídos.

En la **tabla 3** también se incluye el parámetro denominado oxígeno no sulfuroso (O_2 no SO_2), que es el oxígeno consumido por encima de la cantidad estequiométricamente necesaria para eliminar todo el SO_2 presente en el vino. En términos prácticos, al oxígeno consumido total se le resta la cantidad de oxígeno que teóricamente reaccionó con el sulfuroso total que había a tiempo inicial, siguiendo una estequiometría de $1(O_2): 2(SO_2)$. En este experimento asumiremos que el agua oxigenada generada en el primer paso de la oxidación oxidará al sulfuroso presente en la muestra hasta la obtención de sulfato. Una vez eliminado todo el sulfuroso, el agua oxigenada junto con los cationes de hierro darán la reacción de Fenton, formándose radicales hidroxilo que oxidarán mayoritariamente el etanol hasta acetaldehído [10]. Las quinonas formadas en el primer paso de la oxidación, al ser compuestos con función alfa dicarbonilo, podrán formar aldehídos a través de la degradación de Strecker [12]. También se pueden formar aldehídos de Strecker por la reacción del radical hidroxilo y los alcoholes superiores correspondientes [8], aunque esperamos que esta vía sea minoritaria [13].

Para estudiar el efecto de la temperatura calcularemos y compararemos las tasas de acumulación de aldehídos a 45 y 25 °C. Estas tasas las definiremos como la cantidad de aldehído acumulado por unidad de O_2 no SO_2 consumido, y se obtienen mediante la **ecuación 2**.

$$Tasa\ de\ Acumulación\ de\ aldehídos = \frac{[Aldehído]_{final} - [Aldehído]_{inicial}}{O_2\ no\ SO_2}$$

Ecuación 2. Cálculo de la tasa de acumulación de aldehídos.

Las tasas así calculadas, se comparan en un diagrama X Y, representando la tasa de acumulación de aldehído a 25°C en el eje Y frente a la tasa equivalente a 45 °C en el eje X, y se construye el modelo de regresión:

$$T_{25} = b + a T_{45}$$

Siendo a la pendiente y b la ordenada en el origen. Estos datos se encuentran en la **Tabla 4**.

Vino y temperatura	O ₂ not SO ₂ [#]	Isobutiraldehído		3-methylbutanal		2-methylbutanal		Metional		Fenilacetaldhído		Acetaldehído	
SL	0 ± 0	37,8	± 1,0	50,9	± 1,9	12,5	± 0,2	29,2	± 0,4	59,4	± 13	19,6	± 0,5
SL 25	30 ± 1	57,4	± 0,6	67,0	± 1,1	22,5	± 0,1	62,2	± 0,8	90,3	± 2,2	28,4	± 0,9
SL 45	31 ± 0	68,2	± 0,9	91,2	± 0,7	28,6	± 0,2	57,9	± 0,8	111	± 4,2	27,4	± 0,8
TS	0 ± 0	25,3	± 0,6	33,0	± 2,0	12,3	± 1,5	23,4	± 0,0	34,5	± 7,7	17,8	± 0,7
TS 25	34 ± 1	37,4	± 0,4	42,1	± 0,8	17,9	± 0,4	36,1	± 1,1	52,8	± 1,1	26,2	± 0,1
TS 45	27 ± 0	37,4	± 1,6	48,0	± 3,2	18,6	± 0,4	37,5	± 0,6	55,2	± 2,8	22,4	± 0,6
BL	0 ± 0	29,9	± 0,7	50,0	± 1,6	10,2	± 1,1	19,2	± 0,5	34,3	± 7,7	13,9	± 0,1
BL 25	32 ± 0	51,5	± 2,1	82,6	± 0,2	23,4	± 1,5	55,4	± 3,8	86,7	± 5,7	31,6	± 0,6
BL 45	30 ± 0	54,9	± 1,5	99,4	± 2,1	25,9	± 0,1	56,5	± 1,5	114	± 2,2	23,3	± 0,1
CH	0 ± 0	50,0	± 7,5	37,4	± 6,7	19,7	± 1,6	32,2	± 2,2	62,3	± 23	15,9	± 0,1
CH 25	34 ± 1	91,0	± 3,5	112	± 4,4	45,3	± 2,1	102	± 1,0	155	± 6,6	26,7	± 0,2
CH 45	31 ± 0	84,1	± 7,1	116	± 5,1	45,8	± 0,2	99,7	± 1,6	206	± 12	23,7	± 0,5
MF	0 ± 0	17,4	± 0,4	30,7	± 0,2	7,10	± 0,2	22,1	± 0,0	32,7	± 1,2	11,3	± 0,7
MF 25	29 ± 0	31,8	± 0,1	36,7	± 0,1	13,0	± 0,1	33,0	± 1,0	136	± 14	17,1	± 0,1
MF 45	33 ± 0	41,6	± 2,1	55,0	± 3,3	14,9	± 0,3	36,1	± 1,2	78,0	± 0,2	19,1	± 0,7
TP	0 ± 0	24,8	± 0,4	51,2	± 0,2	7,90	± 0,3	24,6	± 0,0	90,6	± 3,8	13,1	± 0,4
TP 25	31 ± 1	32,4	± 0,5	42,0	± 1,4	11,3	± 0,4	35,2	± 2,3	154	± 35	13,3	± 0,4
TP 45	29 ± 0	38,6	± 0,5	65,1	± 0,5	12,4	± 0,4	38,2	± 0,2	100	± 1,6	18,3	± 0,3
HV	0 ± 0	23,4	± 1,0	27,8	± 2,1	6,30	± 0,2	25,9	± 0,0	41,3	± 1,8	17,9	± 0,9
HV 25	32 ± 0	31,2	± 1,4	30,9	± 0,8	9,80	± 0,2	33,7	± 0,4	136	± 12	17,0	± 0,0
HV 45	35 ± 0	45,6	± 3,2	43,9	± 2,2	12,7	± 0,6	34,1	± 3,3	72,9	± 4,2	20,5	± 0,3
BS	0 ± 0	17,4	± 0,3	32,6	± 0,5	5,20	± 0,2	21,2	± 0,0	33,1	± 0,7	17,0	± 1,0
BS 25	32 ± 1	28,4	± 0,5	33,0	± 0,8	9,20	± 0,1	31,8	± 2,1	108	± 5,4	16,4	± 0,1
BS 45	31 ± 0	34,4	± 0,2	50,1	± 1,0	10,3	± 0,1	33,5	± 0,2	72,4	± 0,9	19,4	± 1,0

Tabla 3. Aldehídos de Strecker totales ($\mu\text{g/L}$) y acetaldehído total (mg/L) acumulados en los experimentos de 25 y 45 °C. #O₂ consumido (mg/L) no invertido en la eliminación de sulfuroso total. Vinos envejecidos (SL, TS, BL y CH); vinos jóvenes (MF, TP, HV y BS). Más detalles de los vinos en la **Tabla 1 del capítulo 2**.

	Todos los vinos				Vinos envejecidos				Vinos jóvenes			
	a	b	R	p	a	b	R	p	a	b	R	p
Acetaldehído	2,063	-206,8	0,897	0,003	1,924	-125,7	0,875	0,125	0,290	-45,20	0,972	0,151
Metional	0,949	-0,020	0,985	0,000	0,917	0,037	0,973	0,027	0,534	0,119	0,923	0,077
Isobutiraldehído	1,181	-0,327	0,900	0,002	1,053	-0,169	0,878	0,122	0,771	-0,131	0,738	0,262
2-metilbutanal	0,864	-0,034	0,985	0,000	0,944	-0,089	0,982	0,018	1,103	-0,066	0,917	0,083
3-metilbutanal	0,952	-0,449	0,981	0,000	0,966	-0,469	0,966	0,034	0,796	-0,375	0,942	0,058
Fenilacetaldéhid	0,121	1,899	0,166	0,694	0,550	0,123	1,000	0,000	0,957	1,801	0,672	0,328

Tabla 4. Parámetros de regresión (a: pendiente; b: ordenada origen; p ($\alpha=0.05$)) al representar la tasa de acumulación de aldehídos a 25 °C (Y) frente a la de 45 °C (X).

La **tabla 4** muestra tres estudios de regresión, realizados sobre:

- a) El conjunto de los 8 vinos
- b) Los 4 vinos más envejecidos (SL, TS, BL y CH) por separado
- c) Los 4 vinos más jóvenes (MF, TP, HV, BS) por separado

Esta diferenciación entre vinos queda justificada ya que en el ensayo de oxidación presentado en el **capítulo 2** con estos mismos vinos y con varias dosis de oxígeno a 25 grados, se encontró que la evolución de los aldehídos de Strecker y acetaldehído diferenciaba claramente las muestras en dos grupos: los vinos jóvenes y los envejecidos [16].

Las correspondientes representaciones gráficas pueden verse en las **figuras 1, 2 y 3** del **anexo 1**. Para cada aldehído se representan los 8 vinos, los 4 jóvenes y los 4 envejecidos por separado.

Acetaldehído

A pesar de que la regresión sobre los 8 vinos es significativa ($p=0,003$) con $R=0,897$ (**tabla 4**) y de que la pendiente de 2,063 parece sugerir que, globalmente, la cantidad de acetaldehído acumulada durante el proceso de oxidación a 25°C es alrededor del doble que la acumulada a 45°C, es preciso matizar este resultado, porque como vamos a ver, eso sólo se cumple en los vinos envejecidos. El aparente engaño deriva de una trampa de la estadística, ya que el elevado valor de la ordenada en el origen de la recta de regresión oculta las marcadas diferencias entre vinos jóvenes y envejecidos. Tal y como se muestra en la **tabla 3** y en la representación de la **figura 1 del anexo 1**, los vinos jóvenes no sólo acumulan mucho menos acetaldehído que los envejecidos, sino que a 25 °C no acumulan prácticamente nada. Tan sólo uno de ellos acumuló 5,8 mg/L, mientras que los otros mostraron niveles finales de acetaldehído no significativamente diferentes o incluso inferiores a los medidos en los vinos iniciales. A 45 °C, sin embargo, todos ellos acumularon niveles modestos, pero claramente mensurables de acetaldehído (entre 2,4 y 7,8 mg/L). Esto es, los vinos jóvenes sólo acumulan acetaldehído a 45 °C. Por otra parte, si nos fijamos en las representaciones tasa a 25°C vs tasa a 45°C de los vinos más envejecidos (**figura 1 del anexo 1** y los parámetros de las regresiones lineales en la **tabla 4**), puede observarse que, a pesar de que por el bajo número de datos se pierde la significatividad, la pendiente es muy similar a la observada en el set global de vinos. En este subgrupo de vinos a 25 grados se acumula en todos los casos aproximadamente el doble de acetaldehído que a 45°C. La

acumulación máxima a 25°C fue 17,7mg/L y se observó en la muestra BL (tercera en la tabla 3). El máximo a 45°C se observó en la misma muestra y fue de tan solo 9,5 mg/L (**tabla 3**).

Como hicimos en el tema anterior y de manera provisional, estos resultados parecen sugerir que los vinos tintos jóvenes tienen una muy elevada capacidad de consumir acetaldehído, lo que se puede atribuir a la existencia de material fenólico que puede interactuar con el acetaldehído en mayor medida en estos vinos [16]. La razón por la que a 45°C se observa una pequeña acumulación, que no es observada a 25°C, no está clara. Aunque se ha descrito que a 45°C el material fenólico precipita más fácilmente [23], lo que podría causar una pérdida de la capacidad de consumo de acetaldehído, lo cierto es que ni la inspección visual ni los datos de IPT (índice de polifenoles totales) **Tabla 2 del Anexo 1**, sugieren que dicha precipitación tuviera lugar. Podría pensarse, por tanto, que la pequeña acumulación se debe al corto tiempo de que ha dispuesto el acetaldehído generado para consumirse. Esto es, que la cinética de consumo de O₂ y la asociada de generación de H₂O₂, crece de 25 a 45°C a mayor velocidad de lo que lo hace la cinética de reacción del acetaldehído con los polifenoles. Esto no parece extraño si tenemos en cuenta que la velocidad de consumo de O₂ se ha multiplicado por 8, mientras que la velocidad de condensación por formación de puentes de etilo se ha sugerido que se multiplica por 2 al pasar de 22 a 42°C [23].

Pero claro, esta misma explicación, naufraga totalmente para explicar el caso de los vinos envejecidos, en los que la mayor acumulación se produce a 25°C. Hemos de aceptar que quedan algunos aspectos relacionados con la producción y consumo de acetaldehído que no comprendemos y que no parecen encajar claramente con el modelo actualmente aceptado de consumo de O₂ y producción de acetaldehído.

Aldehídos de Strecker no aromáticos

Las tasas de acumulación de isobutiraldehído, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal y metional encontradas a 45°C están globalmente bien correlacionadas con las encontradas a 25°C ($p \leq 0,002$); siendo los coeficientes de correlación para los 8 vinos 0,900, 0,985, 0,981 y 0,985, respectivamente. Exceptuando el 2-metilbutanal, la pendiente no difiere significativamente de 1. Para aquel, la pendiente es ligera pero significativamente menor de la unidad (se acumula alrededor de un 15% más aldehído a 45°C).

Al comparar por separado los vinos envejecidos y los jóvenes, puede apreciarse que en los envejecidos las pendientes son muy cercanas a la unidad, no difiriendo significativamente de este valor en ningún caso. Por el contrario, en el caso de los jóvenes, la regresión empeora de manera relevante, lo que es totalmente esperado ya que las cantidades de aldehídos

formados en estos vinos son mucho más bajas y la variabilidad entre vinos es muy pequeña. Observando las correlaciones globales, puede sin embargo concluirse que, en todos los casos, con algo peor precisión en el caso del isobutiraldehído, es perfectamente factible predecir los niveles de aldehído formados a 25°C midiendo la formación a 45°C.

Fenilacetaldehído

Los patrones de acumulación del fenilacetaldehído difieren en gran medida de los observados en los casos anteriores, fundamentalmente porque los vinos jóvenes y criados se comportan de una manera totalmente diferente. Como puede verse en la **figura 3 del anexo 1**, la representación tasa a 25°C vs tasa a 45°C de los 8 vinos muestra, en clara diferencia con todos los casos anteriores, los vinos jóvenes no se encuentran en el extremo inferior izquierdo de la regresión, sino que se encuentran a la izquierda y arriba. Esto es debido a dos peculiaridades de este compuesto, ya que es el único aldehído que en los vinos jóvenes a 25°C se acumula con gran intensidad, mucho más que a 45°C y más también que en los vinos criados. La segunda peculiaridad de este aldehído es que en los vinos criados es el único que se acumula con más intensidad a 45°C de lo que lo hace a 25°C. Esto puede verse en la **figura 3 del anexo 1**, donde se representa la tasa a 25 vs tasa a 45°C para este subgrupo de vinos, que muestra una correlación perfecta (R de 1,000) con una pendiente de 0,550 (**tabla 4**).

Podría pensarse que la mayor acumulación a 25°C en los vinos jóvenes, en comparación con la observada en vinos envejecidos, es debida a que el fenilacetaldehído es menos reactivo hacia los polifenoles que el resto de aldehídos. Aunque en muestras sintéticas se ha comprobado que la malvidina y el fenilacetaldehído forman pigmentos poliméricos [43], la reacción a 25°C sería muy lenta. Esto también podría explicar la mayor acumulación a 45°C observada en los vinos criados; el aumento de la velocidad de la reacción de formación de puentes y aductos con los distintos polifenoles no sería suficiente para compensar el aumento de la velocidad de formación asociada al aumento de temperatura. La razón por la que a 45°C los vinos jóvenes acumulan mucho menos fenilacetaldehído es menos clara. Podríamos hipotetizar que las quinonas que catalizan la descomposición de Strecker de la fenilalanina vienen fuertemente afectadas por cualquier precipitación inducida por la rápida acumulación de acetaldehído.

Con lo que respecta a la capacidad de la oxidación acelerada a 45°C para estimar la capacidad de los vinos de acumular aldehídos, nuestros resultados muestran que, dejando de lado el fenilacetaldehído, es posible obtener estimaciones aceptables, más si tenemos en cuenta que el método funciona bastante bien en todos los casos para detectar aquellas

muestras con altas tasas de acumulación potencial de aldehído. El método tiene más limitaciones para diferenciar la capacidad de acumulación cuando ésta es baja, pero desde el punto de vista de un ensayo de interés en bodega, esta parece ser una limitación menor. Las predicciones son particularmente buenas para 3-metilbutanal, 2-metilbutanal y metional, y algo más pobres para acetaldehído e isobutiraldehído. En el caso del fenilacetaldéhído, la capacidad del ensayo para vinos envejecidos parece fuera de toda duda, mientras que para vinos jóvenes, sería preciso ampliar el estudio a más muestras.

3.2.2 Análisis de los datos por Análisis de Componentes Principales (PCA).

Para observar las diferencias generales en la acumulación de aldehídos a ambas temperaturas se realizó un análisis de componentes principales. En la **Figura 2**, se presenta el PCA realizado con las 8 muestras en sus tres puntos de muestreo (punto 0, tras la oxidación a 25 grados y tras la oxidación a 45 grados). La representación acumula más de un 92% de la varianza total del sistema, por lo que es muy explicativa.

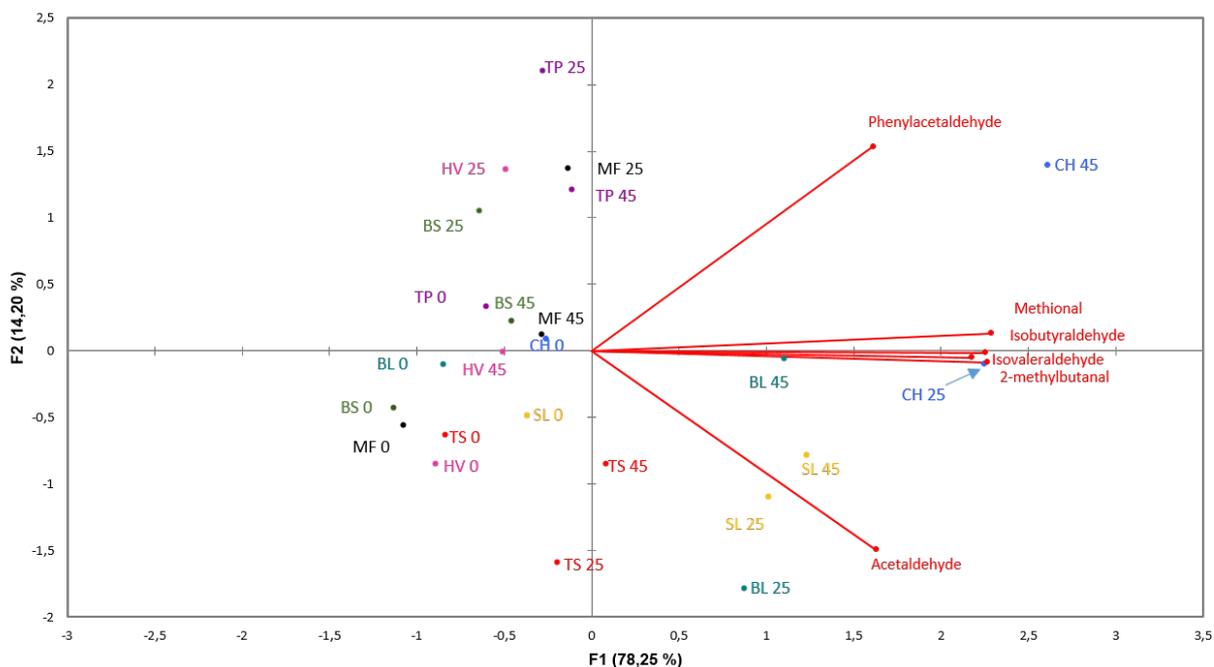


Figura 2. PCA realizado con las tasas de acumulación de aldehídos de Strecker y acetaldehído, para las dos temperaturas ensayadas en los 8 vinos tintos.

Con respecto a las variables, la representación confirma que los aldehídos siguen esencialmente tres patrones diferentes. Los dos más extremos vienen representados por el fenilacetaldéhído (correlacionado positivamente con la 2ª componente) y el acetaldehído (correlacionado negativamente), mientras que los 4 aldehídos de Strecker no aromáticos siguen un patrón intermedio entre los dos anteriores (correlación nula con la 2ª

componente). Con esta distribución de variables, el nivel general de aldehídos está claramente relacionado con la posición en la primera componente, mientras que la relación fenilacetaldehído/acetaldéhidó está relacionada con la posición en la segunda. Cuanto más arriba, mayor proporción de fenilacetaldehído, cuanto más abajo, mayor proporción de acetaldéhidó.

Con respecto a las muestras, éstas están agrupadas básicamente en 3 grupos:

1. Un primer grupo en el centro del diagrama con niveles ligeramente negativos de la primera componente que incluye los vinos sin oxidar tanto jóvenes como envejecidos y, además, tres de los vinos jóvenes oxidados a 45°C. El grupo se puede subdividir en los tres subgrupos mencionados: jóvenes no oxidados (izquierda), envejecidos no oxidados (derecha), 3 jóvenes oxidados a 45 (centro superior).
2. Un segundo grupo con valores ligeramente negativos de la primera componente y claramente positivos de la segunda, que incluye a todos los vinos jóvenes oxidados a 25°C y a uno de los oxidados a 45°C (TP45).
3. Un tercer grupo incluyendo los vinos envejecidos oxidados. Éste último se puede subdividir en 2 grupos según la temperatura a la que fueron oxidados. Los oxidados a 45°C están más arriba y los de 25°C ocupan el espacio inferior.

La representación deja claro que el mayor cambio composicional corresponde a la oxidación de vinos envejecidos, que conlleva importantes incrementos en la primera componente, y por tanto importantes incrementos de todos los aldehídos a ambas temperaturas. Las diferencias entre vino son notables, desde el TS cuya componente 1 incrementa menos de 1 unidad, hasta el CH, que lo hace entre 2,5 y 3 unidades. El efecto de la temperatura es notable en las cuatro muestras y se manifiesta fundamentalmente en la relación Fenilacetaldehído/Acetaldehído, que aumenta de manera notable para los vinos envejecidos. El aumento depende del vino, es pequeño para el SL y máximo para el CH y BL.

En claro contraste, la representación muestra que los cambios introducidos en la oxidación de vinos jóvenes son muy inferiores y de sentido notablemente opuesto al observado en vinos envejecidos. Los incrementos en la primera componente son en todos los casos muy pequeños (en torno a 0,5), lo que responde a la muy pequeña acumulación de aldehídos en todos los casos, y el efecto de la temperatura es el opuesto al observado a 45°C. En todos los casos el cociente fenilacetaldehído/acetaldéhidó disminuye con la temperatura, reflejando el hecho observado de que en los vinos jóvenes el fenilacetaldehído se acumuló fundamentalmente a 25°C.

3.2.3 Modelización PLS de las tasas de acumulación de aldehídos con respecto a la composición química inicial

Las tasas de acumulación de cada aldehído a ambas temperaturas fueron modelizadas a partir de la composición inicial de los vinos empleando modelización por Partial Least Square regression (PLS). Es importante recalcar que los modelos no son totalmente aleatorios, ya que dentro de las variables de entrada se introdujeron los precursores conocidos (aminoácidos y alcoholes), catalizadores (cationes metálicos y diacetilo), además de diversos compuestos fenólicos. Los modelos se obtuvieron por *cross-correlation* con el fin de obtener una evaluación más realista de su potencialidad, intentándose también reducir al máximo el número de variables intervinientes con el fin de reducir el riesgo de “overfitting”. Los modelos obtenidos para las tasas de acumulación a 25°C, mostrados en la **tabla 5a**, explicaron entre el 92,4 y el 99,9 % de varianza, menos para el fenilacetaldehído (82,1 %) y ya fueron discutidos en el capítulo anterior [16]. A 45°C (**tabla 5 b**) los modelos tuvieron capacidad de explicación algo menores para metional (81% de varianza explicada), explicaron entre el 87 y el 93% para acetaldehído, isobutiraldehído y 2-metilbutanal y se acercaron al 98% para fenilacetaldehído.

El primer punto común de los modelos obtenidos a ambas temperaturas es que los aminoácidos de Strecker en todos los casos toman parte con coeficientes positivos en los modelos de los correspondientes aldehídos, confirmando que los aminoácidos son para los 5 aldehídos de Strecker la principal fuente de formación durante la oxidación a ambas temperaturas. En segundo lugar, puede observarse que, en general, los modelos obtenidos a ambas temperaturas para los aldehídos de Strecker (**tablas 5a y b**) presentan un coeficiente positivo para el hierro. Dicho coeficiente no se debería a su conocido papel como catalizador de la oxidación [44], ya que se trata de tasas normalizadas por cantidad de O₂ no SO₂, sino a su posible papel como catalizador de la degradación de Strecker [45]. Esto vendría corroborado por el hecho de que este componente solo toma parte activa en los modelos de aldehídos de Strecker pero no en los de acetaldehído. Una tercera coincidencia entre los modelos de las dos tablas es que los antocianos, cuando entran en los modelos sólo lo hacen con coeficientes negativos, confirmando que son principales sustratos de la reacción de todos los aldehídos.

a)

	Isobutiraldehído	3-Metilbutanal	2-Metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	Acetaldehído
R ²	0,968	0,995	0,999	0,990	0,916	0,951
R ² cross-validation	0,924	0,982	0,999	0,964	0,821	0,914
RMSE	1,558	1,592	0,108	1,863	8,793	1,353
RMSE cross-validation	2,737	3,402	0,178	3,946	14,685	2,048
PCs	2	4	3	3	2	2
B0	16,564	16,193	8,683	23,599	67,033	6,275
Diacetilo		-6.680				
Valina	5,304					
Leucina		15,509				
Isoleucina			4,314			
Metionina				7,684		
Fenilalanina					12,307	
Prodelfinidinas					6,587	
Catequina en taninos					8,574	
Epicatequina-3-O-galato						-2,369
(Epi)cat-vyn						-2,174
Malvidina-3-O-glucósido	-4,088	-5,178		-8,521		
Petunidina-3- O -glucósido			-2,208	-7,336		-2,424
Delfinidina-3- O -glucósido			-1,951			-2,270
Peonidina-3-O-glucósido-4-vinilguaiacol	-2,029		-1,700	-5,849		
Epigalocatequina						2,180
mDP						0,914
Petunidina-3-O-glucósido-4-vinilguaiacol		-4,621				
Fe	2,506			5,489	18,349	

mDP: grado medio de polimerización

b)

	Isobutiraldehído	3-Metilbutanal	2-Metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	Acetaldehído
R ²	0,978	0,991	0,9807	0,960	0,996	0,963
R ² cross-validation	0,928	0,872	0,882	0,806	0,975	0,926
RMSE	0,888	0,654	0,231	0,484	2,612	0,473
RMSE cross-validation	1,864	2,827	0,654	1,220	7,358	0,763
PCs	3	3	3	3	3	1
B0	4,855	15,285	2,182	0,523	-12,313	5,950
Diacetilo		3,198				
Valina	0,179					
Leucina		0,326				
Isoleucina			0,134			
Metionina				0,115		
Fenilalanina					4,365	
Isovaleraldehído inicial		4,618				
Metionol				-0,888		
Prodelfinidina (egc-egc)				-0,143		
Procianidina (cat-cat)						-0,812
Catequina en taninos					5,821	
Epicatequina-3-O-galato	-1,522					
Prodelfinidina B3	2,206		0,353	-0,200		
Cat-cat-egc	1,726				-16,189	-0,680
(Epi)cat-vyn	0,934		1,145			
Pirano-malv-vinilguaiacol			-0,237			
Petunidina-3- O -glucósido					-14,709	
Delfinidina-3- O - glucósido					-14,125	

Peonidina-3-O- glucósido - 4-vinilguaiacol					-7,970	
Unidades terminales (sin etilos) en taninos						-0,702
Extensiones totales en taninos						-0,855
%egc en taninos	2,565	3,860	1,367			
Metionina-sulfóxido					-0,666	
Ácido gálico					-0,651	
SO ₂ combinado					-1,437	
Mn						1,914
Cu					0,398	
Fe	0,753	1,245	0,011		0,057	

mDP: grado de medio de polimerización

Tabla 5 a y b. Modelos PLS relacionando la tasa de acumulación de aldehídos totales con respecto a la composición inicial de los vinos a) 25°C b) 45°C

Otra coincidencia entre los modelos obtenidos a ambas temperaturas es la observación de que cuantas más unidades de catequina en taninos hay inicialmente en el vino, más acumulación existe de fenilacetaldehído. Esto podría sugerir que las quinonas derivadas de estas unidades podrían ser particularmente reactivas hacia la fenilalanina produciendo fenilacetaldehído por la degradación de Strecker a 25 y 45 grados, tal y como observó Rize y col [45]. Recientemente se ha comprobado que los polifenoles con los sustituyentes hidroxilo dispuestos en *orto* (como es el caso de la catequina) y *para* favorecen la formación de fenilacetaldehído, mientras que cuando se encuentran en *meta* la formación está impedida [46]. Además en otro estudio de formación de aldehídos, se concluyó que la quinona de la catequina era buen precursor en la formación del fenilacetaldehído [47].

3.2.3.1 Modelos PLS a 25 grados

Estos modelos se han discutido en el **capítulo 2**.

3.2.3.2 Modelos PLS a 45 grados

El papel central jugado por los antocianos a 25°C, sólo se observa a 45°C para el fenilacetaldehído (**tabla 5b**), que justo es el que no lo mostró anteriormente (**tabla 5a**). Como argumentamos anteriormente, no hay evidencias de que a 45°C se esté produciendo una precipitación prematura de polímeros (mediados por aldehídos o condensaciones directas), que explicaría la menor reacción de acetaldehído y los aldehídos de Strecker no aromáticos [23, 48] y su consiguiente mayor acumulación, por lo que hay que buscar otra explicación. Esta diferencia tan radical en las estructuras de los modelos de los aldehídos de Strecker no aromáticos entre las dos temperaturas es sorprendente, más teniendo en cuenta que como vimos anteriormente, las tasas de acumulación a 45°C están muy bien correlacionadas con las medidas a 25°C. Si comparamos las estructuras de los modelos a ambas temperaturas para los 3 aldehídos alifáticos, podremos constatar que a 25°C el acento está en la acción negativa de los antocianos sobre las tasas de acumulación. La malvidina siendo el antociano mayoritario en vinos, no sería un buen precursor de aldehídos porque presenta los grupos hidroxilos en *meta* [46] además desde el punto de vista cinético, es el compuesto que reacciona con el acetaldehído más rápido [15]; confirmándose así el papel consumidor de los antocianos en vinos tintos.

A 45°C los antocianos pierden su papel y el acento pasa a estar localizado en la acción positiva sobre las tasas de formación de una serie de taninos o de parámetros composicionales relacionados con los taninos, como son la prodelfinidina B3 o el % de epigallocatequina en taninos. Estos componentes podrían ser claves en el desarrollo de la degradación de Strecker, tal vez actuando como generadoras de las quinonas que

promueven la misma, ya que ambos compuestos tienen los grupos hidroxilos dispuestos en orto [46]. El cambio en la estructura del modelo podría deberse a que a 25°C estos procesos de formación de quinonas son relativamente más lentos que las reacciones con los antocianos (formación más lento que consumo) de manera que estos lideran el modelo, mientras que a 45°C la reactividad o el número de quinonas reactivas podrían verse aumentadas en proporción superior a las reacciones de los antocianos (ya que 45 grados el consumo de oxígeno se aceleró 8 veces y según la bibliografía el consumo de acetaldehído es el doble a 42°C frente a 22 °C [23]).

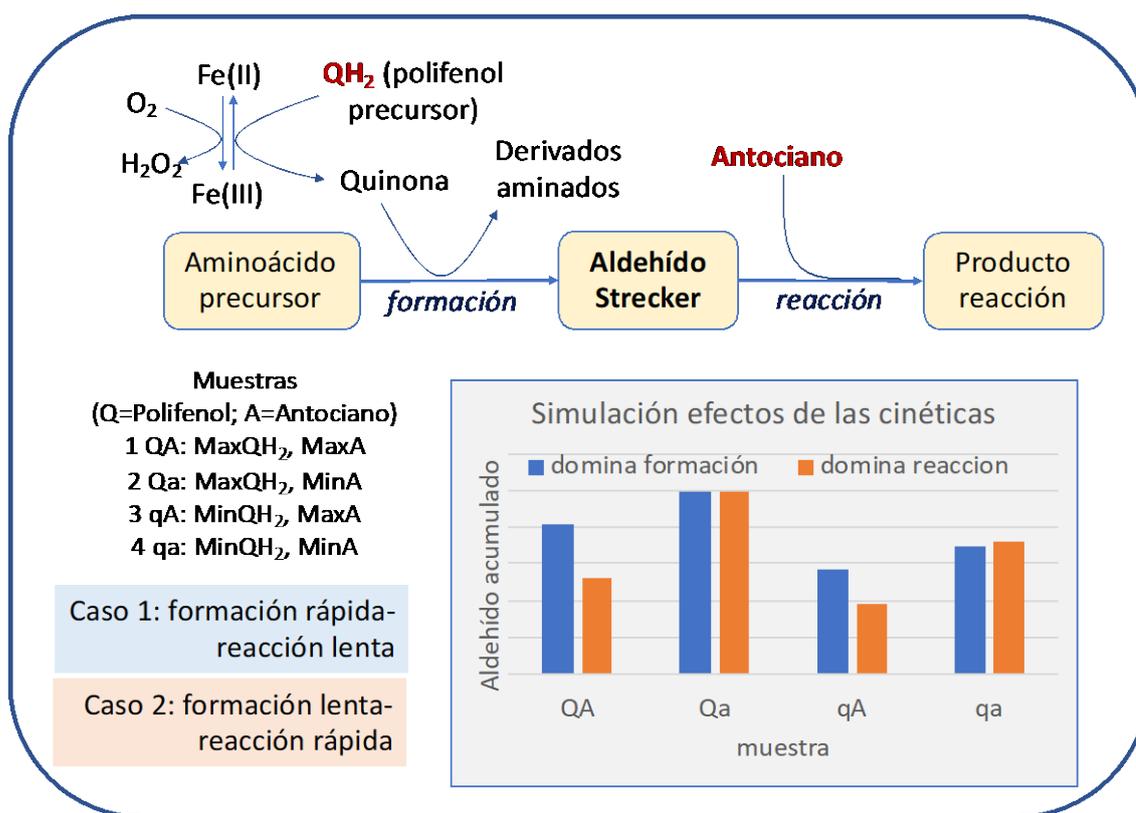


Figura 3. Esquema de las reacciones principales de formación y consumo de aldehídos de Strecker. Diagrama simulando la prevalencia de la formación o reacción de los aldehídos de Strecker según la temperatura. Caso 1 se corresponde con 45 °C y el caso 2 con 25 °C.

Esta discusión se puede entender mejor con la ayuda del esquema mostrado en la **figura 3**.

En la parte superior están esquematizadas las reacciones implicadas, mientras que en la parte inferior se muestra una simulación de perfil de aldehído acumulado para dos situaciones, una en la que la cinética del proceso viniera dominada por la disponibilidad de quinona (reacción de formación) y una segunda en la que la reacción de los aldehídos con los antocianos es lo suficientemente rápida como para llegar a hacerse dominante. Puede verse que, en el primer caso, las mayores concentraciones las tienen las muestras conteniendo máxima concentración de polifenol precursor de la quinona (QA y Qa), mientras que en el segundo de los casos

las dos muestras con mayor concentración de aldehído acumulado son las que tienen la concentración más pequeña de antociano.

El modelo a 45°C del metional, cuyo modelo a 25°C era similar a los de los tres aldehídos alifáticos, muestra alguna diferencia reseñable. La primera de ellas es que no hay ningún tanino con coeficiente positivo, sugiriendo que su acumulación no viene limitada por la existencia de quinonas. Al contrario, en el modelo aparecen algunos taninos y el propio ácido gálico con coeficientes negativos. Quizás las quinonas de estos componentes sean no reactivas con la metionina, pero ya se demostró en vinos modelos que a partir de ácido gálico se producía metional, aunque partiendo de una relación 4:1 (metionina: polifenol) [47]. Otro detalle de interés es la contribución negativa del sulfóxido de la metionina. Este componente es un producto alternativo de la oxidación de la metionina. Dado que los modelos se refieren a concentración en las muestras de partida, podría pensarse que las muestras que ya tienen más sulfóxido son las que tienen mayor tendencia a formarlo en la oxidación, o sea que no es descartable que se trate de una reacción alternativa. Esta reacción podría tener un interés adicional, ya que probablemente se dé por acción directa del agua oxigenada sobre la metionina [45], lo que podría explicar una pequeña parte de los descuadres de balance entre el O₂ consumido y el acetaldehído acumulado. La tercera peculiaridad del metional es el fuerte coeficiente negativo del SO₂ combinado. La cuarta y última es el coeficiente positivo del cobre. Son todos ellos elementos que merecen la pena ser tenidos en consideración en futuras investigaciones sobre la acumulación del metional.

Como pasó a 25°C, el modelo del fenilacetaldehído a 45°C es el más diferente de los de los otros aldehídos, aunque en esta ocasión tiene una estructura similar a la que tuvieron los otros aldehídos a 25°C. Podría sugerirse que en el caso del fenilacetaldehído, la degradación del aminoácido es más problemática que en los otros casos, lo que justificaría que la estructura a 25°C del modelo. A 45°C puede que aumente la reactividad hacia los antocianos [23], hasta hacerse patentes en los modelos, como se explicó con ayuda de la **figura 3**. Dos aspectos reseñables del modelo son el elevado coeficiente negativo del trímero Cat-cat-egc y el coeficiente jugado por el Mn.

3.3 Estudio de la reactividad (aldehídos de Strecker-material polifenólico)

El ensayo que ahora nos ocupa tiene como objetivo complementar el estudio de oxidación anterior con datos de reactividad de los aldehídos medidos en condiciones de anoxia en los mismos vinos y a las mismas dos temperaturas y durante los mismos tiempos. Con estos datos intentaremos soportar o rechazar alguna de las hipótesis introducidas en la discusión de los resultados. Un objetivo adicional es realizar una evaluación preliminar de la

capacidad diferencial de los vinos para eliminar los aldehídos presentes en el vino por reacciones con sus polifenoles reactivos (ARPs).

El experimento ha consistido, básicamente, en la adición a los mismos 8 vinos (distintas botellas pertenecientes a distintos lotes) de cantidades conocidas aldehídos de Strecker. Lo primero ha sido la determinación de aldehídos de Strecker a las botellas nuevas. Para intentar cambiar lo mínimo la composición de los vinos, lo que se ha hecho es llevar la concentración de cada aldehído de Strecker al nivel de máxima acumulación de aldehído tras oxidar con 35 mg/L de O_2noSO_2 (máxima acumulación de aldehídos de Strecker del **capítulo 2**) y no tocar la composición de SO_2 . Se pretendía seguir el mismo criterio para el acetaldehído, pero en la cuantificación de acetaldehído inicial el vino CH (37,7 mg/L) superaba al máximo de acumulación (31,2 mg/L); por lo que se llevaron todos los vinos hasta 38 mg/L de acetaldehído. Los vinos se incubaron en anoxia el mismo tiempo que tardó la oxidación con 35 mg/L de O_2noSO_2 : 36 días a 25 grados y 5 días a 45 °C. La cuantificación inicial de sulfuroso libre, acetaldehído total y aldehídos de Strecker totales se adjuntan en la **tabla 6**. Los niveles de aldehídos de Strecker finales se adjuntan en la **tabla 1 del anexo 1**.

	SO_2 libre mg/L	Acetaldehído mg/L	Isobutiraldehído μ g/L	2-metilbutanal μ g/L	3-metilbutanal μ g/L	Metional μ g/L	Fenilacetaldehído μ g/L
SL	9,60	29,4 ± 0,7	38,7	9,20	33,9	6,26	49,7
TS	7,20	19,6 ± 0,3	26,2	7,40	15,9	1,96	13,3
BL	8,80	19,9 ± 0,3	34,5	7,80	31,5	3,25	26,3
CH	22,4	37,7 ± 0,4	51,4	13,4	39,9	5,35	47,6
MF	2,40	6,80 ± 0,2	25,7	7,91	14,5	0,59	9,31
TP	7,20	11,1 ± 0,3	41,9	10,5	13,6	2,51	16,5
HV	17,6	8,22 ± 0,4	21,2	4,33	7,30	0,87	7,21
BS	24,0	10,2 ± 0,3	16,0	3,92	12,9	0,55	4,94

Tabla 6. Determinaciones a tiempo cero del ensayo de reactividad: sulfuroso libre y acetaldehído total (mg/L). Aldehídos de Strecker totales en (μ g/L).

Los resultados de la reactividad de acetaldehído se discutirán en el **capítulo 5**, sin embargo -tal y como veremos a lo largo de este apartado- hay que tener en cuenta los datos referentes al acetaldehído nativo, añadido y libre en exceso y que se adjuntan en la siguiente **tabla 7**, para comprender la reactividad de los aldehídos de Strecker.

	SO ₂ libre mg/L	Acetaldehído Inicial (mg/L)			Acetaldehído (mg/L) Tras 36 días a 25°C		Acetaldehído (mg/L) Tras 5 días a 45°C	
		Nativo	Añadido	Libre en exceso	Hallado	Consumido	Hallado	Consumido
SL	9,60	29,4	8,60	2,00	22,2	15,8±0,8	36,7	1,30±1,0
TS	7,20	19,6	18,4	13,5	22,6	15,4±0,4	38,6	-0,60±0,4
BL	8,80	19,9	18,1	12,1	21,6	16,4±0,4	43,4	-5,40±0,8
CH	22,4	37,7	0,30	0,00	29,8	8,20±0,6	38,4	-0,40±0,6
MF	2,40	6,80	31,2	29,6	9,60	28,4±1,6	33,7	4,30±0,5
TP	7,20	11,1	26,9	22,0	22,7	15,3±1,1	39,0	-1,00±1,7
HV	17,6	8,22	29,8	17,7	23,5	14,5±0,7	34,1	3,90±0,4
BS	24,0	10,2	27,8	11,3	26,1	11,9±0,3	36,5	1,50±0,4

Tabla 7. Sulfuroso libre inicial (mg/L). Condiciones iniciales: Acetaldehído nativo (mg/L), añadido (mg/L) y libre en exceso (mg/L) calculado con la constante de disociación de Azevedo [49]. Datos tras las respectivas incubaciones: Acetaldehído hallado (mg/L) y el consumido (mg/L) respecto a los 38 mg/L iniciales.

La **tabla 8** da el porcentaje de consumo de los aldehídos de Strecker observado en el experimento de incubación en anoxia.

	Isobutiraldehído	2- metilbutanal	3- metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhído
SL 25	71,0	77,3	41,7	21,6	50,5
TS 25	75,3	77,9	49,5	31,5	65,2
BL 25	73,9	76,9	47,2	35,2	65,0
CH 25	72,7	76,1	42,2	24,9	54,0
MF 25	77,4	83,2	44,1	63,5	67,0
TP 25	73,1	76,3	62,7	42,7	72,2
HV 25	75,2	78,6	56,8	34,7	66,3
BS 25	72,1	75,5	44,1	25,6	54,3
Promedio	73,8	77,7	48,5	35,0	61,8
<i>s</i>	2,1	2,4	7,5	13,4	7,8
<i>R1</i>	0,770*	0,677	0,502	0,909*	0,823*
SL 45	29,6	51,0	33,3	16,9	29,8
TS 45	42,7	53,3	42,6	24,5	44,9
BL 45	40,0	51,3	30,0	26,2	41,7
CH 45	26,1	44,5	24,8	16,4	24,4
MF 45	37,5	48,8	25,9	26,6	48,6
TP 45	31,8	49,4	45,2	31,7	49,7
HV 45	40,1	54,5	30,0	27,3	45,8
BS 45	45,0	54,8	37,0	24,3	43,2
Promedio	36,6	51,0	33,6	24,2	41,0
<i>s</i>	6,7	3,4	7,5	5,2	9,1
<i>R1</i>	0,408	0,191	0,155	0,845*	0,905*
<i>R2</i>	0,392	-0,076	0,571	0,615	0,823*

Tabla 8. % de consumo de cada aldehído encontrado en las muestras incubadas durante 36 días a 25 °C y 5 días a 45 °C. R1 es el coeficiente de correlación entre los consumos porcentuales de aldehídos de Strecker y la concentración de acetaldehído libre disponible al comienzo del ensayo. R2 son los coeficientes de correlación entre los consumos porcentuales a ambas temperaturas. * implica significativo $P < 0,05$.

Lo más llamativo de este experimento, es que en todos los casos los consumos son muy altos, muy superiores a los observados para el caso del acetaldehído (a 25 °C todos los vinos consumieron entre 8 y 28 mg/L de acetaldehído datos en el **Capítulo 5**). Los consumos son en todos los casos más altos a 25 °C, pero los observados a 45 °C fueron relevantes, siendo entre el 66 y el 69% de los observados a 25 °C, excepto para el isobutiraldehído, que fue solo del 50%. A 25 °C, el aldehído menos consumido es el metional (35% en promedio), seguido del 3-metilbutanal (48,5%), fenilacetaldéhído (61,8%), isobutiraldehído (73,8%) y 2-metilbutanal (77,7%). Los consumos promedio a ambas temperaturas están correlacionados casi al nivel de significatividad ($R=0,871$, $P=0,054$), que no es alcanzado por la mayor bajada del isobutiraldehído.

El segundo resultado más destacable, es la baja variabilidad observada entre vinos: los vinos consumen cantidades de aldehído muy parecidas e independientes esencialmente de la composición química del vino. Esto es particularmente cierto para isobutiraldehído y 2-metilbutanal a 25 °C. Su variabilidad no difiere si quiera de la variabilidad analítica. Sólo el metional a 25 °C y el fenilacetaldéhído a 45 °C mostraron algo más de variabilidad. En estos dos casos, puede además verse que dicha variabilidad está básicamente relacionada con el % de aldehído libre disponible, ya que está relacionada con la cantidad de acetaldehído libre disponible en exceso al comienzo del almacenamiento, tal y como se muestra en las dos figuras siguientes (**figuras 4 y 5**) y en los coeficientes de correlación (denominados R1) mostrados en la **tabla 7**.

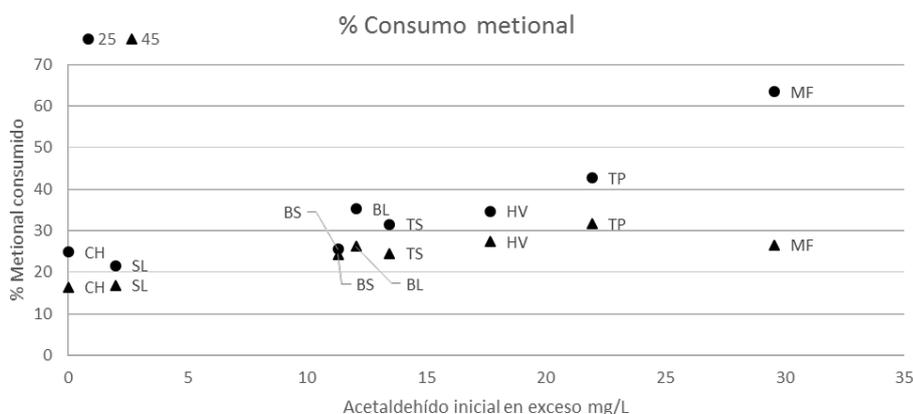


Figura 4. Relación entre el % del metional consumido y el acetaldehído inicial en exceso (mg/L) para las dos temperaturas ensayadas.

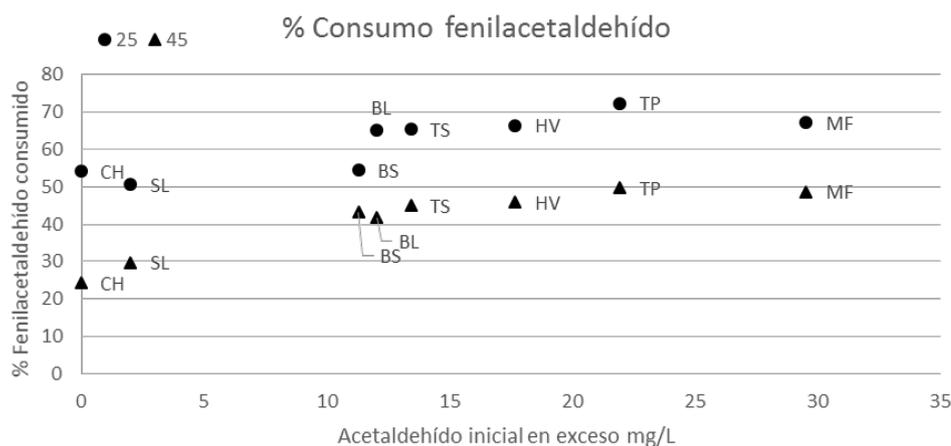


Figura 5. Relación entre el % del fenilacetaldéhidó consumido y el acetaldehído inicial en exceso (mg/L) para las dos temperaturas ensayadas.

Que sea el metional el componente que muestre una mayor variabilidad con este parámetro, no debe sorprender, ya que de los 5 aldehídos de Strecker es el que muestra mayores constantes de asociación en su equilibrio con el SO₂ ($5 \cdot 10^4$) [13], de manera que lo que estas correlaciones parecen estar indicando es que, en las muestras con menor acetaldehído libre inicial en exceso, parte del aldehído está combinado con el SO₂, lo que previene la reacción. El segundo y tercer componentes con más variabilidad son el 3-metilbutanal y fenilacetaldéhidó, que son los que mostraron las segundas constantes más fuertes ($2,9 \cdot 10^4$ y $1,7 \cdot 10^4$ respectivamente) [13]. Puede verse también que en algunos puntos (metional 45 °C, fenilacetaldéhidó más claro a 25 °C), el valor de consumo para el vino con mayor nivel de acetaldehído libre inicial (MF) (**tabla 7**), está por debajo de lo esperado. En el caso del metional, por ejemplo, si elimináramos esa muestra, la correlación entre los consumos a ambas temperaturas se haría significativa ($R^2=0,917$, $P=0,0037$), además de mejorar mucho la R1 ($R1=0,984$, $P<0,001$).

En cualquier caso, esta dependencia con los niveles de acetaldehído libre (y por tanto con el SO₂ libre), parece explicar perfectamente los porcentajes de reactividad de los distintos aldehídos. De hecho, puede verse que el porcentaje de reacción superior en el caso del metional, observado en el vino con mayor contenido de acetaldehído, y por tanto en el que los aldehídos están menos protegidos por el SO₂, se acerca al 65% (MF a 25 °C, **figura 4**). De hecho, los porcentajes promedio de reacción, excluyendo el del acetaldehído, siguen el orden de las constantes de formación de los complejos aldehído/SO₂ a 25 °C, no es así en 45 °C (**figura 6**). Las constantes de formación de los aductos aldehído de Strecker/SO₂ están correlacionados negativa y significativamente con los porcentajes promedio de consumo de estos aldehídos a 25 grados ($R= -0,99$ y $P= 0,001$) y a 45 grados con menor significatividad ($R= -0,85$ y $P= 0,071$).

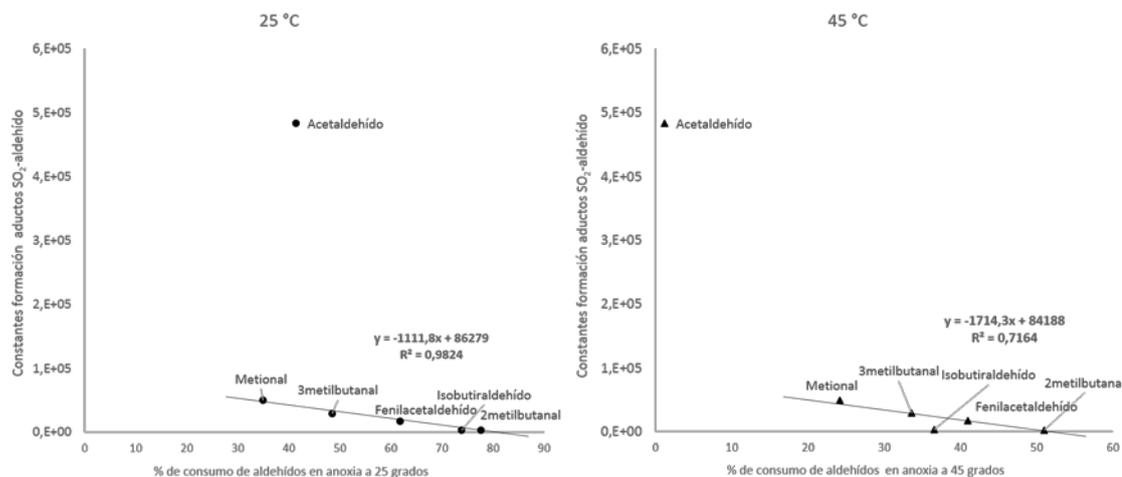


Figura 6. Representación de las constantes de formación de aductos aldehídos-sulfuroso frente al % de consumo en anoxia para 25 y 45 grados. La recta de regresión es teniendo en cuenta los aldehídos de Strecker.

Para finalizar, todos estos resultados sugieren que la reactividad de los aldehídos de Strecker con el material fenólico, al igual que pasa con el acetaldehído (**Capítulo 5**), no depende de la composición polifenólica del vino, sino que parece depender tan solo de la eventual protección del aldehído por parte del SO₂. Dado que estos aldehídos tienen constantes de formación inferiores (metional=5.10⁴, 3-metilbutanal=2,9.10⁴; fenilacetaldehído=1,7.10⁴, isobutiraldehído=2,8. 10⁴ y 2-metilbutanal=2,6. 10⁴) a las del acetaldehído (485.10³), parece factible llegar a condiciones en el vino en las que seamos capaces de eliminar -a lo largo de 1 mes a temperatura ambiente y con más dificultad en el caso del metional-, cantidades significativas de los mismos. Como comentaremos en el caso del acetaldehído (**Capítulo 5**), la prácticamente nula dependencia de la reactividad con la composición específica del vino, nos debe llevar a poner en duda la existencia de material fenólico especialmente reactivo con los aldehídos (ARPs). El importante papel con coeficientes negativos jugado por los antocianos en los modelos, tiene que atribuirse a otra razón, probablemente relacionada con un papel más importante de los mismos del que se ha atribuido hasta el momento actual en el consumo de O₂ y cuyo estudio está fuera del alcance de este trabajo.

4. Conclusiones

1. En la oxidación de un vino tinto a temperatura ambiente se pueden encontrar hasta seis etapas cinéticas en el consumo de oxígeno y el proceso puede extenderse hasta 35 días de media [32]. A 45 grados las cinéticas son diferentes, pero por modelización parece ser posible reconstruir de manera parcial las cinéticas observadas a temperatura ambiente.
2. Los procesos de oxidación causan muchos más cambios en el contenido de aldehídos en el caso de los vinos envejecidos, que en el caso de los vinos jóvenes. El efecto de la temperatura se manifiesta en la alteración de la relación fenilacetaldehído/acetaldéhidó, que aumenta con la temperatura en el caso de los vinos envejecidos y disminuye en el caso de los jóvenes. Este cambio dificulta la predicción a 45 °C de la cantidad de fenilacetaldehído que produciría un vino en su oxidación a T^a ambiente, aunque podría ser posible la predicción limitando el ensayo a vinos jóvenes o envejecidos. Para acetaldéhidó y los otros aldehídos de Strecker, es posible predecir con precisión -más limitada en los casos de acetaldéhidó e isobutiraldehído- la tendencia del vino a acumularlos, mediante el test acelerado.
3. Los modelos PLS de las tasas de acumulación de aldehídos en función de la composición química inicial son similares a 25 y 45 grados en cuanto al peso positivo atribuido al aminoácido precursor y al Fe, pero tienen una estructura completamente diferente con respecto a los polifenoles. Los antocianos aparecen con coeficientes negativos para todos los aldehídos menos fenilacetaldehído, y a 45 grados tan sólo lo hacen para este componente. Esto nos llevó a pensar que la reactividad aldehído-antociano es crítica para la cinética de acumulación de los aldehídos y muy dependiente de la temperatura.
4. La reactividad de los aldehídos de Strecker con el material fenólico del vino parece venir simplemente determinada por la fortaleza de sus aductos con el SO₂, ya que la proporción de aldehído consumido sigue el orden inverso exacto de constantes de formación a 25 grados, desde el 35% para el metional hasta el 78% para el 2-metilbutanal. Para metional y fenilacetaldehído, que tienen la mayor y la tercera constante de formación para sus hidroxialquilsulfonatos respectivamente, las cantidades consumidas por cada vino dependen esencialmente del acetaldéhidó libre en exceso inicial. Dicha reactividad no mejora en la proporción esperada a 45 °C, temperatura a la que se consume -en el tiempo necesario equivalente para el mismo consumo de O₂- entre el 66 y 69% (50% en el caso del isobutiraldehído) de lo observado a 25 °C. La sustitución del sulfuroso por otro antioxidante (menos afín a los aldehídos) podría favorecer la eliminación de aldehídos de Strecker, evitando un detrimento prematuro de la calidad del vino [14].

5. Referencias

1. Ugliano, M., *Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(26): p. 6125-6136.
2. Atanasova, V., et al., *Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making*. Analytica Chimica Acta, 2002. **458**(1): p. 15-27.
3. Cejudo-Bastante, M.J., M.S. Pérez-Coello, and I. Hermosín-Gutiérrez, *Effect of wine micro-oxygenation treatment and storage period on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics*. LWT - Food Science and Technology, 2011. **44**(4): p. 866-874.
4. Singleton, V.L. and T.E. Kramling, *BROWNING OF WHITE WINES AND AN ACCELERATED TEST FOR BROWNING CAPACITY*. American Journal of Enology and Viticulture, 1976. **27**(4): p. 157-160.
5. Ferreira, et al., *Key Changes in Wine Aroma Active Compounds during Bottle Storage of Spanish Red Wines under Different Oxygen Levels*. Journal of agricultural and food chemistry, 2014. **62**(41): p. 10015-27.
6. Cullere, L., J. Cacho, and V. Ferreira, *An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(3): p. 876-881.
7. Escudero, A., J. Cacho, and V. Ferreira, *Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study*. European Food Research and Technology, 2000. **211**(2): p. 105-110.
8. Escudero, A., et al., *Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 4268-4272.
9. Marrufo-Curtido, A., et al., *Evidencias de los diferentes equilibrios acetaldehído - material polifenólico de los vinos*. Libro de comunicaciones del XIV Congreso Nacional de Investigación Enológica 2018: p. 194-198, ISBN: 978-84-09-12074-1.
10. Danilewicz, J.C., *Reactions Involving Iron in Mediating Catechol Oxidation in Model Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2013. **64**(3): p. 316-324.
11. Gislason, N.E., B.L. Currie, and A.L. Waterhouse, *Novel Antioxidant Reactions of Cinnamates in Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(11): p. 6221-6226.
12. Strecker, A., *On a peculiar oxidation by alloxan*. Justus Liebigs Annalen der Chemie 1862. **123**: p. 363-367.
13. Bueno, M., V. Carrascón, and V. Ferreira, *Release and Formation of Oxidation-Related Aldehydes during Wine Oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(3): p. 608-617.
14. Marrufo-Curtido, A., et al. *Bound forms of aldehydes determine the "oxidative stability" of wine*. in *Book of abstract IVAS 2017 ISBN 978-84-697-4579-3*. 2017. Salamanca (España).

15. Timberlake, C.F. and P. Bridle, *INTERACTIONS BETWEEN ANTHOCYANINS, PHENOLIC COMPOUNDS, AND ACETALDEHYDE AND THEIR SIGNIFICANCE IN RED WINES*. American Journal of Enology and Viticulture, 1976. **27**(3): p. 97-105.
16. Bueno, M., et al., *Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation*. Frontiers in Chemistry, 2018. **6**.
17. Peterson, A.L. and A.L. Waterhouse, *H-1 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**(36): p. 6869-6878.
18. Drinkine, J., et al., *Analysis of ethylidene-bridged flavan-3-ols in wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(4): p. 1109-1116.
19. Heritier, J., et al., *Quantification of the production of hydrogen peroxide H₂O₂ during accelerated wine oxidation*. Food Chemistry, 2016. **211**: p. 957-962.
20. Wu, H.F. and S.H. Wang, *Impacts of operating parameters on oxidation-reduction potential and pretreatment efficacy in the pretreatment of printing and dyeing wastewater by Fenton process*. Journal of Hazardous Materials, 2012. **243**: p. 86-94.
21. Rodrigues, C.S.D., R.A.R. Boaventura, and L.M. Madeira, *Technical and economic feasibility of polyester dyeing wastewater treatment by coagulation/flocculation and Fenton's oxidation*. Environmental Technology, 2014. **35**(10): p. 1307-1319.
22. Grant-Preece, P., et al., *Photoproduction of glyoxylic acid in model wine: Impact of sulfur dioxide, caffeic acid, pH and temperature*. Food Chemistry, 2017. **215**: p. 292-300.
23. Baranowski, E.S. and C.W. Nagel, *KINETICS OF MALVIDIN-3-GLUCOSIDE CONDENSATION IN WINE MODEL SYSTEMS*. Journal of Food Science, 1983. **48**(2): p. 419-&.
24. Ou, B.X., M. Hampsch-Woodill, and R.L. Prior, *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(10): p. 4619-4626.
25. Pazdziuch-Czochra, M. and A. Widenska, *Spectrofluorimetric determination of hydrogen peroxide scavenging activity*. Analytica Chimica Acta, 2002. **452**(2): p. 177-184.
26. Clark, A.C., et al., *Iron(III) Tartrate as a Potential Precursor of Light-Induced Oxidative Degradation of White Wine: Studies in a Model Wine System*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(8): p. 3575-3581.
27. Clark, A.C., P.D. Prenzler, and G.R. Scollary, *Impact of the condition of storage of tartaric acid solutions on the production and stability of glyoxylic acid*. Food Chemistry, 2007. **102**(3): p. 905-916.
28. Clark, A.C. and G.R. Scollary, *Influence of light exposure, ethanol and copper(II) on the formation of a precursor for xanthylum cations from tartaric acid*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2003. **9**(1): p. 64-71.

-
29. Fernandez-Zurbano, P., et al., *Prediction of Oxidative Browning in White Wines as a Function of their Chemical-Composition*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(11): p. 2813-2817.
 30. Fernandez-Zurbano, P., et al., *Role of hydroxycinnamic acids and flavanols in the oxidation and browning of white wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(12): p. 4937-4944.
 31. OIV, *OIV-MA-AS323-04A Sulphur dioxide. Compendium of International Methods of Analysis*, 2009.
 32. Marrufo-Curtido, A., et al., *A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines and some observations about the influence of wine initial chemical composition*. Food Chemistry, 2018. **248**: p. 37-45.
 33. Bueno, M., J. Zapata, and V. Ferreira, *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**: p. 33-42.
 34. OIV, *Chromatic Characteristics. Compendium of International Methods of Analysis*, 2009.
 35. Ribéreau-Gayon, P., et al., *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. New York ed. Vol. 2. 2006, Chichester: John Wiley & Sons.
 36. Grindlay, G., et al., *Evaluation of the multi-element capabilities of collision/reaction cell inductively coupled plasma-mass spectrometry in wine analysis*. Talanta, 2014. **128**: p. 379-385.
 37. Hernandez-Orte, P., et al., *Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method*. Chromatographia, 2003. **58**(1-2): p. 29-35.
 38. Vallverdu-Queralt, A., et al., *A comprehensive investigation of guaiacyl-pyranoanthocyanin synthesis by one-/two-dimensional NMR and UPLC-DAD-ESI-MSn*. Food Chemistry, 2016. **199**: p. 902-910.
 39. Kennedy, J.A. and G.P. Jones, *Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(4): p. 1740-1746.
 40. Carrascon, V., et al., *The kinetics of oxygen and SO₂ consumption by red wines. What do they tell about oxidation mechanisms and about changes in wine composition?* Food Chemistry, 2018. **241**: p. 206-214.
 41. Ducasse, M.A., et al., *Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines*. Food Chemistry, 2010. **118**(2): p. 369-376.
 42. Ferreira, et al., *Oxygen Consumption by Red Wines. Part I: Consumption Rates, Relationship with Chemical Composition, and Role of SO₂*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(51): p. 10928-10937.

43. Escott, C., et al., *Study of the Interaction of Anthocyanins with Phenolic Aldehydes in a Model Wine Solution*. *Acs Omega*, 2018. **3**(11): p. 15575-15581.
44. Danilewicz, J.C., *Role of Tartaric and Malic Acids in Wine Oxidation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014. **62**(22): p. 5149-5155.
45. Rizzi, G.P., *The strecker degradation of amino acids: Newer avenues for flavor formation*. *Food Reviews International*, 2008. **24**(4): p. 416-435.
46. Delgado, R., *Contribution of Phenolic Compounds to Food Flavors: Strecker-Type Degradation of Amines and Amino Acids Produced by o- and p-Diphenols*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014. **63**.
47. Oliveira, C.M., et al., *Quinones as Strecker degradation reagents in wine oxidation processes*. *Food Chemistry*, 2017. **228**: p. 618-624.
48. Rivasgonzalo, J.C., S. Bravoharo, and C. Santosbuelga, *DETECTION OF COMPOUNDS FORMED THROUGH THE REACTION OF MALVIDIN 3-MONOGLUCOSIDE AND CATECHIN IN THE PRESENCE OF ACETALDEHYDE*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995. **43**(6): p. 1444-1449.
49. de Azevedo, L.C., et al., *Evaluation of the formation and stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(21): p. 8670-8680.

CAPITULO IV

Evaluación de algunas hipótesis acerca de la formación de aldehídos de Strecker

CAPITULO IV

Evaluación de algunas hipótesis acerca de la formación de aldehídos de Strecker

1. Introducción

La formación postfermentativa de los aldehídos de Strecker en los vinos puede tener dos orígenes. La vía de generación principal es la degradación de Strecker [1], que es una reacción en la que tiene lugar la desaminación oxidativa y descarboxilación de un α -aminoácido en presencia de un compuesto α -dicarbonílico. El resultado es la formación de un aldehído que tiene un carbono menos que el aminoácido original. Los aldehídos de Strecker son isobutiraldehído (que proviene del aminoácido valina), 3-metilbutanal o isovaleraldehído cuyo precursor es la leucina, 2-metilbutanal (isoleucina), fenilacetaldehído (fenilalanina) y metional (formada a partir de la metionina). En principio cualquier compuesto α -dicarbonílico puede llevar a cabo la reacción de formación de aldehídos de Strecker [2]. Esto incluye las orto-quinonas formadas en la oxidación de los orto-difenoles (reacción confirmada en hojas de té [3]). Se ha demostrado que el 4-metilcatecol al tener los grupos hidroxilo en posición *orto* favorece la formación de aldehídos de Strecker frente a polifenoles con los dos sustituyentes en *meta* [4]. Los avances más recientes han hipotetizado sobre la posibilidad de que el diacetilo sea precursor específico del fenilacetaldehído [5]. La segunda ruta de formación es la oxidación directa de alcoholes. Aunque su importancia cuantitativa es secundaria [5, 6], se ha demostrado que al añadir alcoholes superiores al vino o cerveza, la concentración de aldehídos de Strecker aumenta [7-9].

Con respecto a su reactividad, los aldehídos son especies electrófilas que pueden verse involucrados en numerosas reacciones y procesos químicos de forma reversible e irreversible. Los aldehídos son muy reactivos con componentes mayoritarios nucleófilos del vino como el sulfuroso y los polifenoles [10, 11]. Con el sulfuroso se forman los hidroxialquilsulfonatos [12], que al ser especies no volátiles no se perciben, y por tanto no tendrían relevancia sensorial. La reacción es reversible y tras oxidación del vino, el equilibrio de los aductos aldehído - SO₂ se puede desplazar, liberando aldehídos al medio que sí se perciben y pueden llegar a cambiar el perfil aromático de los vinos [6]. Los aldehídos de Strecker también reaccionan con unidades de antocianos y taninos para formar estructuras más estables [13, 14] siguiendo el mismo mecanismo que propuso Timberlake [15] para las reacciones acetaldehído-antociano y acetaldehído-tanino. Se ha

caracterizado el producto de reacción entre el isobutiraldehído, 3-metilbutanal y 2-metilbutanal con catequina y malvidina tanto en muestras sintéticas como en vinos fortificados de Portugal [16-20]; así como el producto de reacción entre el fenilacetaldehído y la malvidina en vino sintético [13]. También se pueden formar acetales (por reacción con el etanol y glicerol), tioacetales (tras reaccionar con tioles), iminas (cuando se encuentra con aminoácidos) y aductos con el glutatión [11]. Todo este conjunto de interacciones dificulta la comprensión de los procesos de acumulación y el estudio de la reactividad de los aldehídos, tal y como se vio en el capítulo anterior.

En este capítulo se presentan los resultados de 3 experimentos, todos ellos realizados con el fin de corroborar o descartar algunas de las hipótesis principales derivadas del experimento presentado en el capítulo 2 de esta tesis. El primer experimento busca confirmar si el diacetilo es un α -dicarbonilo capaz de llevar de manera específica la degradación de Strecker de la fenilalanina, como mostraba su modelo. El segundo busca determinar si hay diferencias en la reactividad hacia la quinona del 4-metilcatecol entre los diferentes aminoácidos que puedan explicar las diferentes estructuras de los modelos del fenilacetaldehído. Finalmente, el tercer experimento, busca medir la variabilidad introducida en la acumulación de aldehídos de Strecker por factores composicionales diferentes al contenido de aminoácidos precursores y el hierro. Ya que estos elementos aparecían como componentes esenciales de todos los modelos, su igualación en un set de vinos, nos permitirá evaluar la influencia de los otros parámetros.

2. Materiales y métodos

2.1. Determinación de aldehídos de Strecker por CG-MS previa derivatización con *o*- (2, 3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina PFBHA

El método comienza con una etapa de derivatización que transforma los carbonilos en compuestos con pesos moleculares superiores y menos polares. En la derivatización se pierde la función carbonilo, que es la que otorga la elevada polaridad a los aldehídos (**Reacción 1**). El derivatizante usado es *o*- (2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina (PFBHA) y es muy común su uso en cromatografía gas [21]. Las etapas del método son las siguientes:

a) Preparación de las disoluciones:

- i. Disolución de derivatizante: 10 g/L de PFBHA en agua destilada
- ii. Disolución de lavado: disolución agua/metanol al 60 (v/v) en metanol y 1 %(m/m) en hidrogenocarbonato de sodio
- iii. Disolución de estándares internos (IS): una única disolución de 20 mg/L de fenilacetaldérido deuterado, metional deuterado, 2-metilpentanal y 3-metilpentanal en etanol.
- iv. Disolución de dopado para la calibración por adición estándar: que contiene los cinco aldehídos de Strecker en concentración conocida (una única disolución en etanol de 20 mg/L para todos los aldehídos excepto el metional, que tiene una concentración de 10 mg/L).

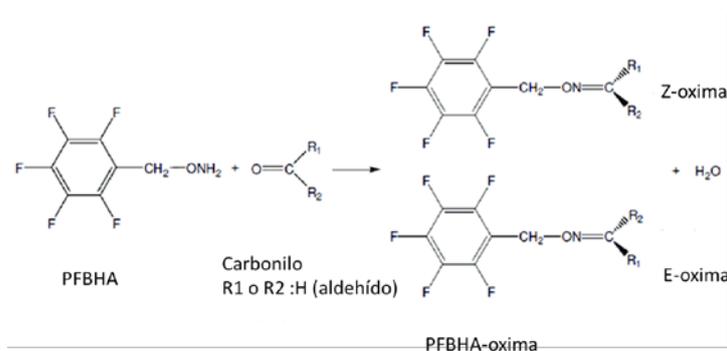
b) Preparación de las muestras:

- i. Muestras: en anoxia se toman 12 mL de vino y se añaden 30 μ L de la disolución de estándares internos (quedando una concentración de 50 μ g/L).
- ii. La cuantificación se realiza por adición estándar, para preparar el factor de respuesta se toman 12 mL del vino y se dopa con 30 μ L de la disolución de estándares internos y 120 μ L de la disolución de dopado. Este método tiene efecto matriz muy influenciado por la concentración de sulfuroso total inicial. Por ello, para cuantificar tintos se prepara un factor de respuesta con un vino tinto joven y para los blancos y rosados (vinos con mayor concentración de sulfuroso) se prepara un factor de respuesta con un blanco o un rosado que sirve para cuantificar ambas

matrices. Para cuantificar en vino sintético el factor de respuesta se prepara con esta misma matriz.

Se cierran en anoxia con tapón de septum y se incuban a 50 °C durante 6 horas. Esta incubación tiene como objetivo el equilibrado de las muestras, es decir, permitir que se formen todos los aductos (sulfuroso – aldehído) y (polifenol – aldehído), de forma que los aldehídos recién añadidos (tanto estándares internos como los propios para el factor de respuesta) y los aldehídos “nativos” de la muestra se comporten de la misma forma.

- c) **Reacción de derivatización con PFBHA:** Se añaden 360 µL del derivatizante, perforando el septum para no perder la anoxia y se incuba 12 horas a 35 °C en estufa. En esta etapa se forman las oximas según la **reacción 1**.



Reacción 1. Derivatización y formación de 2 oximas isómeros, adaptación de Bao y col., [22].

Se obtienen el isómero Z y E, que a veces somos capaces de diferenciar en la cromatografía, tal y como vemos en la **figura 1**.

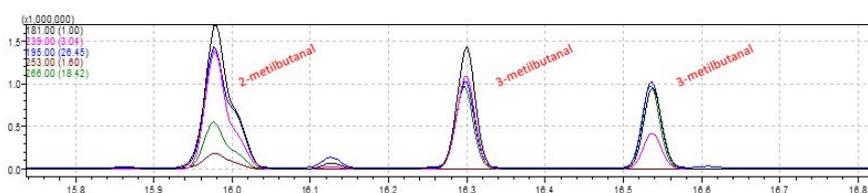
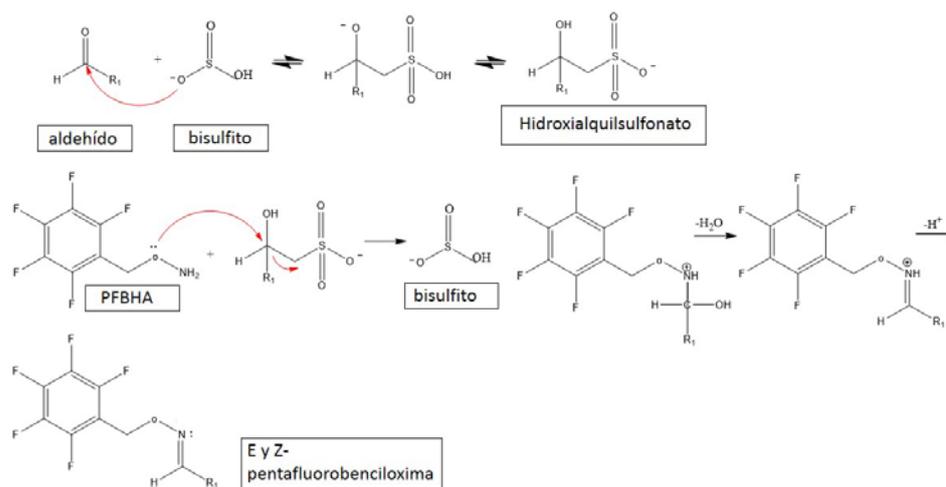


Figura 1. Ejemplo de cromatograma de muestra real: los dos isómeros juntos del 2-metilbutanal y los isómeros 1 y 2 del 3-metilbutanal bien resueltos.



Reacción 2. Reacción de aldehído con bisulfito para formar el aducto hidroxialquilsulfonato. Ruptura del aducto por derivatización con PFBHA y formación de las oximas.

Tal y como vemos en la **reacción 2**, con la reacción de derivatización conseguimos romper los aductos aldehído-sulfuroso, de forma que la concentración de aldehído determinada en el método corresponde a la fracción libre más la fracción que forma parte en las combinaciones bisulfíticas, es decir, se está determinando la concentración total de aldehídos.

d) Extracción SPE: Una vez transcurridas las 12h, se sacaron los viales del horno. Por cada vial de muestra se preparó un cartucho de 1mL de capacidad provisto de un disco fritado, en el que se pesaron 30 mg de resina LiChrolut® y se introdujo otro disco fritado encima. Todos los cartuchos se dispusieron conectados por su extremo inferior a un sistema de vacío (Mainfold) provisto de vasos colectores. Por el extremo superior se acoplaron mediante un adaptador a un reservorio de plástico. La extracción constó de varias etapas:

- i. Etapas de acondicionamiento: Se activa la resina, que posteriormente reaccionará con las oximas formadas. La activación se consigue haciendo pasar cierto volumen de uno o más disolventes. En este punto es necesario tener en cuenta que antes de pasar la muestra, se haya percolado a través de la resina una disolución lo más parecida posible a la matriz de las muestras (en nuestro caso, una matriz vínica sintética). Por tanto, los disolventes pasan de menor a mayor polaridad: se adiciona primero 1 mL de diclorometano, sobre todo actúa

eliminando restos de la polimerización del sorbente y tiene una alta capacidad de extracción; después 1 mL de metanol, y por último, 1 mL de vino sintético (matriz similar a las muestras).

- ii. **Etapa de carga de muestra:** Se adicionaron 10 mL de muestra preparada al cartucho. Los analitos quedan retenidos en el adsorbente así como otros compuestos ya que estas resinas se caracterizan por tener alta capacidad de retención. El eluato y compuestos no afines a la resina salen del cartucho y son recogidos en los vasos colectores. Es importante controlar la velocidad de paso de muestra de cada cartucho, que fue aproximadamente de 2 gotas/s, así como el vacío, que no puede superar los 20 psi.
 - iii. **Etapa de lavado:** Se eliminan los compuestos que por similitud en polaridad a los analitos, también han quedado retenidos en la resina. Esto se consigue haciendo pasar un disolvente de cierta polaridad a través del cartucho. Este volumen de lavado se determina experimentalmente con el objetivo de lavar lo máximo posible sin perder analitos. De esta manera, se adicionaron 10mL de disolución de lavado.
 - iv. **Etapa de secado:** Se eliminan los restos de disolventes por secado a vacío durante, al menos, 15 minutos. Cuando la resina experimenta un cambio de color al quedar seca y se observa como las partículas que la forman están sueltas, se apaga el vacío, se desmontan los reservorios y adaptadores y se retiran los cartuchos.
- e) **Elución:** Con una bureta se adicionaron 1,2 mL de hexano en los cartuchos ya secos. Cada cartucho estaba colocado encima de un vial de 2mL de capacidad. Como el volumen de elución es significativamente más pequeño que el volumen inicial de muestra (1,2 mL frente a los 10 mL iniciales), se consigue una preconcentración de las muestras antes del análisis.
- f) **Análisis CG-MS:** Las muestras se llevaron al cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) donde se inyectaron. El equipo utilizado para el análisis de las muestras fue un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas con un detector cuadrupolo (*Gas Chromatograph Mass Spectrometer, GCMS-QP-2010, Shimadzu*). Se trabaja con ventanas en modo SIM según la **tabla 1**. La columna utilizada fue una DB-

WAXetr de dimensiones 30m, 0,25mm x 0,5µm. La presión fue de 68,8 kPa. El gas portador fue helio. El horno se programó de manera que la temperatura fue de 40 °C durante 4 min y después se utilizó una rampa de 10 °C/min hasta 250 °C. Se utilizó un inyector automático (SPL1 Split/Splitless Shimadzu AOC-5000), que trabajó en modo Splitless.

La temperatura del inyector fue de 250 °C y se inyectaron 3µL.

Ventana	Comienzo (min)	Final (min)	m/z iones detectados
1	14,6	15,2	181,195,239,253,250
2	15,6	19,2	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 1. Ventanas del detector.

En la **tabla 2** aparecen los tiempos de retención, los estándares internos correspondientes a cada analito y las relaciones m/z de los iones de cuantificación y de los iones de confirmación. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) se pueden ver en la **tabla 3**, están calculados teniendo en cuenta las **ecuaciones 1 y 2**. La muestra “blanco” se refiere a que un vino sintético dopado con los estándares internos, que se analiza y pasa por todas las etapas del proceso.

$$LD = \frac{3 \times (\text{desviación del área de los blancos})}{\text{pendiente recta de calibrado}}$$

Ecuación 1. Cálculo del límite de detección.

$$LQ = \frac{10 \times (\text{desviación del área de los blancos})}{\text{pendiente recta de calibrado}}$$

Ecuación 2. Cálculo del límite de cuantificación.

Ventana	Compuestos	Estándar 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-metil pentanal (IS)		17,04	253	266,195
	3-metil pentanal (Isómero 1) (IS)		17,74	239	266,181
	3-metil pentanal (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	Fenilacetaldehído deuterado (IS)		24,24	301	96,181
	Fenilacetaldehído (suma de isómeros)	Fenilacetaldehído deuterado	24,31	297	91,181

Tabla 2. 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 (µg/L)	Límite de cuantificación (µg/L)
Isobutiraldehído	0,004	0,014
2-metilbutanal	0,027	0,091
3-metilbutanal	0,026	0,086
Metional	0,292	0,972
Fenilacetaldehído	0,154	0,513

Tabla 3. Límite de detección y cuantificación µg/L para cada analito a cuantificar

2.2. Estudio del origen de los aldehídos de Strecker- Experimentos 1 y 2

Se realizaron dos experimentos para estudiar la formación de los aldehídos de Strecker a partir de diacetilo (Experimento 1) y de 4-metilcatecol (Experimento 2).

Para la realización de los experimentos se usaron aminoácidos de Strecker: L-Fenilalanina (Phe), L-Metionina (Met), L-Valina (Val), L-Leucina (Leu), L-Isoleucina (Ile).

Los experimentos se llevaron a cabo en matrices sintéticas: 5g/L de glicerina, 5g/L de ácido tartárico, 12 % etanol. Se ajustó el pH a 3,5.

Experimento 1

Se prepararon muestras sintéticas con una relación equimolar (1mM) de aminoácido y diacetilo. Para cada sistema se preparó un control en vino sintético que contenía sólo el aminoácido correspondiente (sistemas 2, 4, 6, 8 y 10) y una referencia común de vino sintético con diacetilo (sistema 11). Detalles en la **tabla 4**.

Sistema	Composición
1	1mM Phe + 1mM Diacetilo
2	1mM Phe
3	1mM Met + 1mM Diacetilo
4	1mM Met
5	1mM Val + 1 mM Diacetilo
6	1mM Val
7	1mM Leu + 1mM Diacetilo
8	1mM Leu
9	1mM Ile + 1mM Diacetilo
10	1mM Ile
11	1mM Diacetilo

Tabla 4. Muestras preparadas para el experimento 1

Cada sistema se preparó por duplicado. Se usaron 22 viales de 13 mL llenos hasta arriba para que la muestra no contuviera espacio de cabeza. Previamente al cierre de los viales, se desplazó el oxígeno de las disoluciones borboteando nitrógeno. Se sellaron y se incubaron durante 32 días a temperatura ambiente. Se determinó la concentración total de aldehídos de Strecker siguiendo la metodología descrita en el **apartado 2.1**.

Experimento 2

En este experimento el α -dicarbonilo se formará insitu por oxidación del 4-metilcatecol. Por ello, al vino sintético base descrito en el apartado 2.2, se le añadió Fe^{2+} en forma de cloruro de hierro (II) y Cu^{2+} en forma de cloruro de cobre (II), hasta conseguir una concentración de 5 y 0,2 mg/L de Fe(II) y Cu(II) respectivamente.

Se prepararon muestras sintéticas con una relación equimolar (1mM) de aminoácido y 4-metilcatecol. Para cada sistema se preparó un control en vino sintético que contenía sólo el aminoácido correspondiente (sistemas 2, 4, 6, 8 y 10) y una referencia común de vino sintético con 4-metilcatecol (sistema 11). Detalles en la **tabla 5**.

Sistema	Composición
1	1mM Phe + 1mM 4-metilcatecol
2	1mM Phe
3	1mM Met + 1mM 4-metilcatecol
4	1mM Met
5	1mM Val + 1 mM 4-metilcatecol
6	1mM Val
7	1mM Leu + 1mM 4-metilcatecol
8	1mM Leu
9	1mM Ile + 1mM 4-metilcatecol
10	1mM Ile
11	1mM 4-metilcatecol

Tabla 5. Muestras preparadas para el experimento 2

Cada sistema se preparó por duplicado. Se caracterizaron los viales de 13 mL a usar, se dejó el espacio de cabeza suficiente para oxidar las muestras con 35 mg/L de oxígeno, siguiendo la metodología de Marrufo-Curtido, y col [23]. Se sellaron y se incubaron durante 50 días a 35 grados con agitación orbital (90 rpm) para asegurar que el sistema estuviera en equilibrio. Se controló el consumo de oxígeno una vez al día y al final de la incubación se cuantificó la concentración de aldehídos totales de Strecker formados siguiendo el protocolo propuesto en el **apartado 2.1**.

2.3. Acumulación de aldehídos de Strecker en vinos tintos, rosados y blancos tras procesos de oxidación y cálculo de las tasas de acumulación, reacción y formación de aldehídos de Strecker en vinos tintos y - Experimento 3

2.3.1. Vinos del estudio

Los vinos usados en el experimento 3 fueron los detallados en la **tabla 6**.

Código de vino	Nombre del vino	Denominación de Origen	Variedad	Añada	Tipo	Meses madera	Descripción
CV	Castillo Viñaral	Cariñena	60% Garnacha, 20% Tempranillo, 20% Cariñena	2008	Tinto	36	Reserva
DM	Dama de Oro	Zamora	Tempranillo	2012	Tinto	18	Reserva
CL	Castillo San Lorenzo	Rioja	Tempranillo	2013	Tinto	18	Reserva
VF	Valdeflor	Campo de Borja	Garnacha	2015	Tinto	12	Reserva
MT	Matsu "El Pícaro"	Toro	Tempranillo	2018	Tinto	3	Joven
FP	Federico Paternina	Rioja	Tempranillo	2018	Tinto	6	Joven
BG	Baltasar Gracián El político	Calatayud	Garnacha	2018	Tinto	3	Joven
RB	Ruberte Garnacha	Campo de Borja	Garnacha	2018	Tinto	3	Joven
VMG	Viñas Miedes Garnacha	Catalayud	Garnacha	2018	Rosado	-	Joven
GF	Gran Feudo	Navarra	Garnacha, Tempranillo, Merlot, Carbenet y Syrah	2018	Rosado	-	Joven
VT	Viña Temprana	Campo de Borja	Viura	2018	Blanco	-	Joven
VM	Viña Miedes	Calatayud	Viura	2018	Blanco	-	Joven

Tabla 6. Detalles de los vinos usados en el experimento 3

2.3.2. Análisis a tiempo inicial

Se determinó SO₂ total y libre por Rankine siguiendo las recomendaciones de la OIV [24] y el índice de polifenoles totales (IPT) por medida espectrofotométrica a 280 nm según lo descrito por Ribéreau-Gayon y col [25]. También se les analizó los aminoácidos: fenilalanina, isoleucina, leucina, metionina y valina por HPLC con detector de fluorescencia con el método publicado por Hernández-Orte y col. [26] y el hierro usando espectrometría masas por plasma acoplado inductivamente (ICPMS) siguiendo la metodología de Grindlay

y col [27]. Se cuantificaron los aldehídos de Strecker siguiendo la metodología descrita en el **apartado 2.1**

Después, cada vino se introdujo en la cámara de anoxia donde se corrigieron exactamente al valor máximo de aminoácidos y hierro encontrados en el set de muestras. Se sacaron uno a uno y se pasaron por filtros amicróbicos de 73 mm de diámetro y 0,22 μm de tamaño de poro (MERK, REF: SCGP U02 RE). Una vez filtrados, se saturaron con aire y se introdujeron en Wine in Tube (WIT) con el espacio de cabeza determinado siguiendo el procedimiento descrito por Marrufo-Curtido y col [23]. Es decir, se le aplicó a cada vino la cantidad estequiométrica necesaria de oxígeno para desulfitar la muestra por completo más 35 mg/L de O₂noSO₂.

El oxígeno necesario para desulfitar la muestra se calcula teniendo en cuenta la siguiente **ecuación 3**:

$$\frac{\text{Sulfuroso total mg/L}}{PM SO_2 (64)} \times \frac{1 \text{ mol oxígeno}}{2 \text{ moles } SO_2} \times PM \text{ oxígeno (32)}$$

Ecuación 3. *Cálculo del oxígeno necesario para desulfitar la muestra por completo.*

Para cada vino se prepararon dos WITs independientes con sensores SPT3 (Nomacorc) y se incubaron a 25 °C en un baño orbital con agitación de 90 rpm. Los niveles de oxígeno disuelto se midieron 2 veces al día durante la primera semana y después una vez al día, hasta fin de la oxidación (momento en el que cada tubo ha consumido el 95 % de oxígeno disponible o 54 días como máximo).

2.3.3. Análisis de los vinos oxidados

Una vez finalizada la oxidación, se analizaron para cada WIT los aldehídos totales de Strecker siguiendo la metodología contemplada en el **apartado 2.1** y el SO₂ total por Rankine [24].

2.3.4. Obtención de las tasas de consumo de aldehídos de Strecker en vinos tintos

Para estudiar la reactividad de los aldehídos se trabajó en anoxia y dopando con aldehídos los 8 vinos tintos utilizados en los **capítulos 1, 2 y 3**. A tiempo cero se determinó la concentración inicial total de acetaldehído, aldehídos de Strecker, además del sulfuroso libre por Rankine. La dosis a dopar elegida para cada aldehído fue la máxima determinada en el set de vinos cuando se oxidaron a 25°C con 32mg/L de O₂noSO₂ (**tabla 2, capítulo 2**),

de forma que todos los vinos contenían los mismos niveles de cada aldehído desde el principio. Se doparon hasta tener las siguientes concentraciones: 38 mg/L de acetaldehído, 91 µg/L de isobutiraldehído, 45,3 µg/L de 2-metilbutanal, 112,3 µg/L de 3-metilbutanal, 102 µg/L de metional y 154 µg/L de fenilacetaldehído. Simulando las condiciones de la oxidación, los vinos dopados se incubaron 36 días a 25 °C, después del periodo de incubación se analizaron acetaldehído total y aldehídos de Strecker totales por CG-MS tras derivatización con PFBHA, siguiendo la metodología descrita en el **apartado 2.1**.

3. Resultados y discusión

3.1. El diacetilo como α -dicarbonilo en la degradación de Strecker

Experimento 1

En este experimento se ha llevado a cabo la degradación de Strecker poniendo en contacto 1 mM de aminoácido con 1mM de diacetilo, ya que la estequiometría de la reacción es 1:1 con respecto a la formación del correspondiente aldehído de Strecker. Los vinos modelo se incubaron 32 días a temperatura ambiente. Tal y como se observa en la **tabla 7**, se han formado en pequeñas cantidades todos los aldehídos de Strecker a partir de sus aminoácidos precursores en presencia de diacetilo. En la **tabla 1 del anexo 2** se presentan los datos de todos los aldehídos (en microgramos/L) para cada sistema estudiado por duplicado.

	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Val	$6,93 \cdot 10^{-5} \pm 1,50 \cdot 10^{-7}$ <u>C</u>				
Ile		$1,51 \cdot 10^{-4} \pm 2,30 \cdot 10^{-5}$ <u>BC</u>			
Leu			$2,32 \cdot 10^{-4} \pm 1,15 \cdot 10^{-5}$ <u>B</u>		
Met				$6,82 \cdot 10^{-4} \pm 4,35 \cdot 10^{-5}$ <u>A</u>	
Phe					$1,25 \cdot 10^{-4} \pm 8,50 \cdot 10^{-6}$ <u>C</u>

Tabla 7. Resumen de las concentraciones medias de aldehídos de Strecker (mM) en el experimento 1. Intervalo de confianza (IC) = s/\sqrt{n} , siendo s la desviación estándar y $n=2$. Los resultados del análisis de la varianza ANOVA ($\alpha=0,05$) se muestran en letras mayúsculas y subrayadas. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Los resultados muestran la especificidad de la reacción: cada uno de los aldehídos de Strecker prácticamente solo aparece cuando se introduce en el sistema el aminoácido precursor correspondiente junto con el diacetilo (fenilalanina-fenilacetaldehído; metionina-metional; valina-isobutiraldehído; leucina-3-metilbutanal; isoleucina-2-metilbutanal). Sin embargo, se ha encontrado alguna contaminación (**tabla 1 del anexo 2**) en el sistema 3 (1mM Met + 1mM diacetilo) en la que aparecen también 2-metilbutanal y 3-metilbutanal, pero en una concentración 6 veces menor al metional cuantificado. Esto se puede deber a que los aldehídos de Strecker son contaminantes presentes en muchas composiciones que usamos habitualmente como perfumes o detergentes [28].

Las concentraciones de los aldehídos de Strecker obtenidos en estos sistemas van entre $6,9 \cdot 10^{-5}$ mM (en el caso del isobutiraldehído) y $6,8 \cdot 10^{-4}$ mM (para metional) con rendimientos de la reacción que van entre 0,007% y 0,07 % respectivamente. El estudio estadístico de la varianza (ANOVA) diferencia significativamente a las muestras en 3 grupos ($\alpha=0,05$) (**tabla 7**). El metional es el aldehído más formado y el fenilacetaldehído es el que menor rendimiento de formación tiene. Atendiendo a la formación de fenilacetaldehído ($1,25 \cdot 10^{-4}$ mM), se puede concluir que el diacetilo no es precursor específico de este aldehído en la

degradación de Strecker. Queda por lo tanto invalidada la hipótesis formulada en el capítulo 2 [5].

Experimento 2

En este caso el α -dicarbonilo necesario en la degradación de Strecker se ha formado in situ por oxidación del 4-metilcatecol. El proceso ha durado 57 días a 35 grados. En la **tabla 8** se muestra el resumen de la formación de los aldehídos de Strecker. Los resultados de todos los aldehídos correspondientes a cada muestra, expresados en microgramos/L, se pueden consultar en la **tabla 2 del Anexo 2**.

	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetalddehído
Val	0,13 \pm 0,01 BC				
Ile		0,09 \pm 0,01 D			
Leu			0,10* CD		
Met				0,40 \pm 1,95 10^{-3} A	
Phe					0,15* B

Tabla 8. Resumen de las concentraciones medias de aldehídos de Strecker (mM) en el experimento 2. Intervalo de confianza (IC)= $s/\sqrt{(n)}$, siendo s la desviación estándar y $n=2$. *Sólo una réplica considerada. Los resultados del análisis de la varianza ANOVA ($\alpha=0,05$) se muestran en letras mayúsculas y subrayadas. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tal y como sucedió en el experimento 1, se ha encontrado alta especificidad entre el aminoácido precursor y aldehído de Strecker correspondiente. Se han cuantificado algunas trazas contaminantes de aldehídos en los sistemas 9 y 10 confirmando que es difícil obtener blancos del método limpios porque los aldehídos están presentes en muchos constituyentes.

Los resultados del ANOVA (**tabla 8**) muestran que el aldehído menos formado significativamente ha sido el 2-metilbutanal. El metional (aldehído más formado) está presente hasta 4 veces más (0,40mM) que el menos formado, seguido del fenilacetalddehído (0,15 mM). Los rendimientos de la reacción van desde el 9% (2-metilbutanal) al 40% (metional). Son ratios de formación del mismo orden a los encontrados por Oliveira y col, que oxidando durante 10 días con 2, 4, 6 y 8 mg/L de oxígeno; ácido cafeico, ácido gálico y catequina alcanzó rendimientos en la degradación de Strecker de hasta el 23% para el metional. En nuestro caso, oxidamos con 35 mg/L de oxígeno durante 57 días, por lo que los resultados son concordantes con los encontrados en bibliografía y confirman que el metional y fenilacetalddehído se va formando de forma paulatina conforme avanza la oxidación. Estos autores al igual que en nuestro caso, encontraron el doble de formación de metional con respecto al fenilacetalddehído [29].

Comparando los experimentos 1 y 2, aunque las condiciones de tiempo y temperatura han sido diferentes, se puede apreciar que, desde el punto de vista cuantitativo, la 4-

metilquinona es más reactiva interviniendo en la degradación de Strecker que el diacetilo, al menos en las condiciones de reacción ensayadas en las que sólo se incluyó Fe en el segundo experimento. En dicho experimento el Fe es necesario para catalizar la oxidación, pero cabe preguntarse si tiene además un papel específico como catalizador en la degradación de Strecker. En cualquier caso, bajo las condiciones concretas ensayadas se forman hasta 1200 veces más de fenilacetaldehído vía 4-metilcatecol que vía diacetilo, lo que junto con el orden de formación de los diferentes aldehídos parece confirmar que el diacetilo no es especialmente activo en la degradación de la fenilalanina.

3.2. Acumulación de aldehídos de Strecker en vinos tintos, rosados y blancos con niveles de Fe y aminoácidos igualados

En este experimento se oxidaron las muestras con 35 mg/L de oxígeno más el necesario estequiométricamente para desulfitar por completo la muestra (**ecuación 3**). El contenido en hierro y aminoácidos de Strecker se igualó en todos los casos al vino que mayor concentración presentaba de estos analitos, a fin de cancelar estos factores y centrar el estudio en la influencia de los otros factores composicionales (polifenoles, sulfuroso, glicerol, glutatión [11] y otros). El objetivo no es tanto determinar la influencia de factores específicos, cuanto evaluar el peso en la variabilidad de la acumulación.

Código de vino	pH	IPT	mg/L					
			Fe	Valina	Isoleucina	Leucina	Metionina	Fenilalanina
CV	3,49	53,0	1,3	44,6	33,9	95,3	16,8	58,9
DM	3,82	55,6	1,2	38,7	31,4	41,2	10,2	34,1
CL	3,66	46,3	1,9	68,9	48,4	105	21,5	69,0
VF	3,48	54,7	1,2	48,5	36,0	68,8	19,8	59,9
MT	3,80	61,8	0,9	30,3	22,8	33,1	11,0	33,3
FP	3,60	46,7	1,8	42,2	29,5	52,0	15,7	46,7
BG	3,46	50,6	2,2	52,4	33,7	71,0	20,8	63,1
RB	3,43	44,1	1,3	41,7	29,7	59,3	18,0	60,9
VMG	3,26	11,8	0,4	60,7	51,2	108	26,4	70,4
GF	3,15	13,3	2,1	30,7	25,1	64,1	16,3	47,4
VT	3,23	10,7	0,6	52,7	33,1	87,2	21,4	64,9
VM	3,33	7,41	0,2	41,3	28,1	65,1	16,7	41,6

Tabla 9. Caracterización de los vinos a tiempo inicial (en orden los 4 primeros son tintos con envejecimiento, los siguientes tintos jóvenes, dos vinos rosados y por último los dos vinos blancos): IPT, pH, Fe (mg/L) y aminoácidos de Strecker (mg/L). Resaltados en negrita los valores máximos usados para normalizar todos los vinos en el contenido en hierro y aminoácidos de Strecker.

Código de vino	SO ₂ total inicial (mg/L)	SO ₂ libre inicial (mg/L)	SO ₂ total final (mg/L)	Oxígeno consumido total (mg/L)	O ₂ no SO ₂ (mg/L)
CV	62,8	4,80	19,2	38,5	27,6
DM	20,0	3,20	11,2	36,7	34,5
CL	81,0	11,2	37,6	49,3	38,5
VF	124	11,0	15,2	49,8	22,6
MT	57,0	8,80	19,4	43,1	33,7
FP	52,0	12,8	25,6	43,1	36,5
BG	37,0	11,2	21,6	40,0	36,1
RB	96,0	3,20	26,9	43,5	26,3
VMG	86,0	3,80	40,0	35,2	23,7
GF	78,0	5,60	31,5	33,1	21,5
VT	115	14,0	60,8	27,2	13,7
VM	97,0	10,4	33,1	32,9	16,9

Tabla 10. Sulfuroso total y libre (mg/L) inicial. Sulfuroso total (mg/L) después de la oxidación. Oxígeno consumido total (mg/L) y Oxígeno no SO₂ (mg/L).

Se corrigieron todos los vinos al nivel máximo de hierro y aminoácidos de Strecker encontrados en los vinos (**tabla 9**). Los valores máximos fueron 2,16 mg/L de Fe, 68,9 mg/L de valina, 51,2 mg/L de isoleucina, 108,4 mg/L de leucina, 26,4 mg/L de metionina y 70,4 mg/L de fenilalanina.

La oxidación no consiguió desulfitar los vinos y por tanto se ha calculado el oxígeno no SO₂ que se habrá invertido en producir aldehídos de Strecker (**tabla 10**).

En la **tabla 11** se adjuntan los datos de aldehídos de Strecker totales antes y después de la oxidación y en la **tabla 12** están calculadas las tasas de acumulación de aldehídos de Strecker para los 12 vinos. Estas tasas se han calculado normalizando la acumulación de aldehídos por el tiempo de oxidación.

Cabe destacar que los vinos más acumuladores son también los que tienen el pH más alto (3,8) (**tabla 9**) y se corresponden con los tintos DM-2012 y MT-2018 (**tabla 12**). Los niveles de 3-metilbutanal acumulados en la muestra DM-2012 son más de 3 veces superiores a los de la siguiente, y más de un orden de magnitud superior a la media de los otros 6 tintos. En el caso del fenilacetaldehído, los niveles acumulados en DM-2012 son 3 veces superiores a los de la media de los otros 6 tintos. Por ello, al ser estas muestras claramente especiales, su peso en el tratamiento de datos será especialmente tenido en cuenta.

En todo caso, el aldehído más acumulado es el fenilacetaldehído que lo hace a 1,02 µg/L día en el caso de los tintos (sin tener en cuenta las muestras DM-2012 y MT-2018) y de 0,44 en el de blancos y rosados. A continuación, van metional y 3-metilbutanal que no se diferencian significativamente (**tabla 12**). El primero se acumula a 0,55 µg/L/día en tintos (sin las dos muestras de mayor pH) y a 0,18 en blancos y rosados, y el segundo a 0,54 (sin las dos muestras de mayor pH) y 0,12, respectivamente (**tabla 12**). Sin embargo, hay importantes diferencias entre estos dos aldehídos, ya que el metional se acumuló netamente en todos los

vinos, mientras que el 3-metilbutanal no lo hizo en 2 tintos y en un blanco. El isobutiraldehído y 2-metilbutanal son los que menos se acumulan. El isobutiraldehído sólo lo hace y en pequeña proporción (0,16 µg/L/día) en dos vinos jóvenes (FP y BG), y en los blancos y rosados su acumulación promedio es significativamente negativa. El 2-metilbutanal no se acumula en blancos y rosados, y en los tintos, lo hace en pequeña proporción (0,07-0,30 µg/L/día). Es además de destacar que una de las muestras tintas (RB-2018) muestra importantes acumulaciones negativas de isobutiraldehído, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal.

Las menores tasas de acumulación encontradas en los vinos blancos y rosados no eran esperadas de acuerdo a las hipótesis formuladas en el **capítulo 2** de la presente tesis, ya que blancos y rosados tienen menor carga de polifenoles que los vinos tintos [30], y sobre todo tienen cantidades nulas o muy inferiores de antocianos, que son las moléculas que los modelos sugerían que serían los principales consumidores de aldehídos (ARPs). También es cierto, sin embargo, que tienen menores pHs (**tabla 9**), lo que podría contribuir a una mayor reactividad de los aldehídos con los polifenoles. Los efectos del pH podrían ser a dos o más niveles. Por una parte, sería más fácil formar los carbocationes a través de los que transcurren las reacciones aldehído-polifenol [15, 31]; en segundo lugar, los aldehídos están menos protegidos por el SO₂ a pHs ácidos; y en tercer lugar, a pHs ácidos los taninos se depolimerizan más fácilmente, lo que podría explicar una mayor reactividad aldehído-polifenol [32].

Es de destacar, que, si consideramos solo tintos y eliminamos DM y MT, la variabilidad entre vinos se reduce a niveles mínimos (RSD metional, 40 % y 69 % para el fenilacetaldehído). Esto podría indicar que el pH es una de las causas de la diferenciación obtenida en los vinos, en cualquier caso muy por encima de la composición polifenólica, al contrario de lo que sugerían los modelos del **capítulo 2**.

	Código	O ₂ no SO ₂ mg/L	s	Días de oxidación	Isobutiraldehído	s	2-metilbutanal	s	3-metilbutanal	s	metional	s	fenilacetaldéhidó	s
1	CV R0	0	0		37,6	1,8	8,32	0,4	27,1	1,0	3,06	0,0	19,4	0,6
	CV R3	27,6	0,8	45,8	37,5	0,6	15,4	0,0	52,3	1,1	31,2	0,6	59,4	1,6
2	DM R0	0	0		29,5	1,2	7,05	0,2	15,7	1,1	1,85	0,3	12,6	1,1
	DM R3	34,5	0,2	23,8	41,8	1,0	17,9	0,2	178	1,0	71,3	0,2	188	0,9
3	CL R0	0	0		31,7	0,3	5,08	0,1	69,1	0,9	2,70	0,0	30,7	0,2
	CL R3	38,5	0,4	45,8	29,3	0,4	9,93	0,3	55,0	8,3	28,1	0,4	63,1	0,2
4	VF R0	0	0		29,0	14	6,79	3,3	43,7	21	4,85	2,2	43,6	20
	VF R3	22,6	0,8	51,8	31,4	0,7	10,6	0,0	79,3	1,0	21,8	0,3	67,0	0,6
5	MT R0	0	0		18,3	1,7	4,39	0,7	26,9	4,7	1,42	0,4	12,9	1,1
	MT R3	33,7	0,4	30,8	31,1	1,2	19,1	0,4	93,8	3,3	47,7	0,2	155	0,8
6	FP R0	0	0		28,1	1,2	5,24	0,2	38,8	1,2	2,40	0,0	22,3	0,5
	FP R3	36,5	0,6	38,3	36,2	2,5	16,8	1,1	124	10	36,5	1,1	112	4,3
7	BG R0	0	0		21,3	0,3	4,13	0,1	10,3	0,2	1,40	0,0	11,0	0,0
	BG R3	36,1	0,4	38,8	29,4	1,0	14,8	0,4	69,9	0,5	24,5	0,6	59,7	0,6
8	RB R0	0	0		44,5	4,6	19,9	2,2	129,	15	2,95	0,0	17,6	0,3
	RB R3	26,3	0,1	51,8	20,2	0,0	9,01	0,1	53,1	1,8	18,1	0,2	43,6	0,9
9	VMG R0	0	0		21,7	0,4	6,56	0,0	21,4	0,0	1,36	0,0	8,66	0,3
	VMG R3	23,7	0,8	51,8	15,6	0,9	5,45	0,2	40,2	0,6	8,39	0,0	28,0	0,4
10	GF R0	0	0		24,8	0,5	4,18	0,3	22,8	0,1	1,70	0,0	7,77	0,3
	GF R3	21,5	0,8	53,8	16,4	0,5	5,97	0,2	47,2	3,5	14,7	0,4	45,7	1,2
11	VT R0	0	0		20,5	1,1	4,79	0,1	44,6	3,4	10,9	0,0	18,3	0,3
	VT R3	13,7	2,5	53,8	13,1	0,4	4,93	0,1	55,3	1,5	19,5	0,1	29,6	0,3
12	VM R0	0	0		27,1	3,7	9,53	1,3	70,5	5,4	2,09	0,0	6,92	0,2
	VM R3	16,9	1,3	53,8	14,1	0,5	4,97	0,2	41,8	1,9	12,6	0,3	32,4	0,4

Tabla 11. Oxígeno no SO₂ (mg/L) y días de la oxidación. Concentración inicial (R0) y final (R3) de los aldehídos de Strecker (µg/L).

Código de vino	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhid
CV-2008	-2,18E-03	0,15	0,55	0,61	0,87
DM-2012	0,52	0,46	6,82	2,92	7,37
CL-2013	-0,05	0,11	-0,31	0,55	0,71
VF-2015	0,05	0,07	0,69	0,33	0,45
MT-2018	0,42	0,48	2,17	1,50	4,61
FP-2018	0,21	0,30	2,22	0,89	2,34
BG-2018	0,21	0,28	1,54	0,60	1,26
RB-2018	-0,47	-0,21	-1,47	0,29	0,50
VMG-2018	-0,12	-0,02	0,36	0,14	0,37
GF-2018	-0,16	0,03	0,45	0,24	0,71
VT-2018	-0,14	0,00	0,20	0,16	0,21
VM-2018	-0,24	-0,08	-0,53	0,20	0,47
Media total	0,02 <u>C</u>	0,13 <u>C</u>	1,06 <u>AB</u>	0,70 <u>AB</u>	1,66 <u>A</u>
s total	0,28	0,21	2,11	0,80	2,18
RSD (%)	>100	>100	>100	>100	>100
Media tintos	0,11 <u>C</u>	0,20 <u>C</u>	1,53 <u>AB</u>	0,96 <u>BC</u>	2,26 <u>A</u>
s	0,31	0,22	2,48	0,88	2,49
RSD (%)	>100	>100	>100	91	>100
Media tintos (sin DM y MT)	0,11 <u>C</u>	0,12 <u>C</u>	0,54 <u>AB</u>	0,55 <u>AB</u>	1,02 <u>A</u>
s	0,25	0,18	1,31	0,22	0,71
RSD (%)	>100	>100	>100	40	69
Media BYR	-0,16 <u>D</u>	-0,02 <u>CD</u>	0,12 <u>BC</u>	0,18 <u>AB</u>	0,44 <u>A</u>
s	0,05	0,05	0,45	0,05	0,21
RSD (%)	34	>100	>100	25	47

Tabla 12. Tasas de acumulación ($\mu\text{g/L/día}$) de los aldehídos de Strecker en los 12 vinos en oxidación, considerando los días de oxidación (23,9 – 51,8 días). Media, desviación y RSD(%) de todo el conjunto y de tintos, tintos sin los vinos que tienen (pH 3,8) y ByR: blancos y rosados. Los resultados del análisis de la varianza ANOVA ($\alpha=0,05$) se muestran en letras mayúsculas y subrayadas. Letras diferentes indican diferencias significativas.

3.2.1. Factores que afectan a la acumulación de los aldehídos de Strecker.

Discusión de las principales correlaciones encontradas.

Se han estudiado las correlaciones entre la acumulación de aldehídos expresada bien como tal o bien normalizada por el tiempo de oxidación o por el O_2 no SO_2 , y diversos parámetros composicionales del experimento. Se ha trabajado por una parte los 12 vinos y por otra sólo los tintos (**tablas 13 y 14 respectivamente**).

En cualquiera de las formas que se expresen las tasas de formación, las correlaciones más relevantes son las siguientes:

1. Una correlación positiva con el pH para todos los aminoácidos, más evidente para fenilacetaldéhid y metional y más notable para los vinos tintos, que muestran más diversidad de pHs. La correlación hay que tomarla, no obstante, con precaución ya

que viene motivada esencialmente por los dos vinos de pHs más altos (**tablas 13 y 14**) tal y como se ve en la **figura 2**. La curva a la que se ha ajustado es una cuadrática.

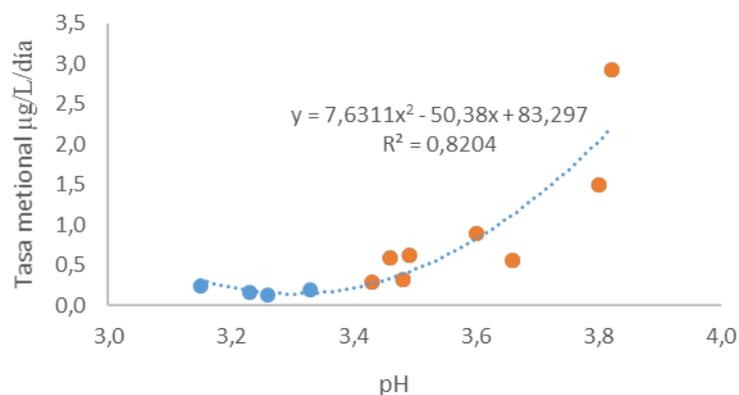


Figura 2. Correlación entre la tasa de acumulación ($\mu\text{g/L/día}$) de metional y el pH. Los puntos azules se corresponden a vinos blancos y rosados. En naranja se representan los 8 tintos.

No obstante, hay numerosas causas que pueden explicar esta correlación positiva. Por una parte a pHs más básicos la reacción de los aldehídos con los polifenoles está limitada ya que transcurre a través del carbocatión, por lo que los aldehídos serán más estables. Por otra parte, a pHs más alcalinos los aldehídos están más protegidos como aductos del SO_2 . Finalmente, desde el punto de vista de la reactividad de la reacción de Strecker se ha comprobado que mayores pH implican mayor formación. Esta tendencia se ha atribuido a la mayor abundancia de aminoácidos y fenoles en forma desprotonada -y que por consiguiente pueden reaccionar más eficientemente- en medios más básicos [33].

- Una correlación negativa muy intensa con el tiempo de oxidación (**figura 3**). La correlación sigue existiendo incluso aun cuando se representa la cantidad total acumulada como se muestra para el caso del metional, además de para cualquier normalización que se aplique sobre la tasa, como se ve en las **tablas 13 y 14**. Este efecto es complicado de asignar a una única causa, o incluso es complicado de establecer si se trata de un efecto directo o indirecto. . Un factor que podría explicar un efecto directo del tiempo es el mayor tiempo para reaccionar con los polifenoles. Debe hacerse constar, sin embargo, que incluso el producto aldehído x tiempo de reacción, que debería descontar dicho efecto, sigue mostrando una correlación negativa y muy significativa con el tiempo, lo que hace pensar que hay algo más que el tiempo de reacción. En cuanto a efectos indirectos, podría haber una interacción entre la composición fenólica y la velocidad de consumo de O_2 , de manera que mayores velocidades de consumo de O_2 , que parecen estar relacionadas con la presencia de taninos ricos en delfinidina [34], podrían estar asociadas a quinonas

más proclives a dar la reacción de Strecker. Delgado y col demostraron que los polifenoles con grupos hidroxilo en posición *orto* (como es el caso de la delfinidina) favorecían la formación de aldehídos de Strecker [4] También podría tratarse de un efecto indirectamente asociado al pH, ya que hay una correlación positiva clara entre la velocidad de consumo de O₂ y el pH, tal y como se ve en la **figura 4** . Puede observarse en la figura, sin embargo, que dicha correlación no es tan intensa como la existente entre el contenido en aldehído y el tiempo. Hay que tener en cuenta que los vinos más rápidos DM (23,8 días) y MT (30,8) son precisamente los que tienen los valores de pH más elevados (**tablas 9 y 11**) y que cuánto más alcalino sea el medio más favorecida estará la oxidación ya que la transferencia de electrones tiene lugar desde los aniones fenolato [33, 35].

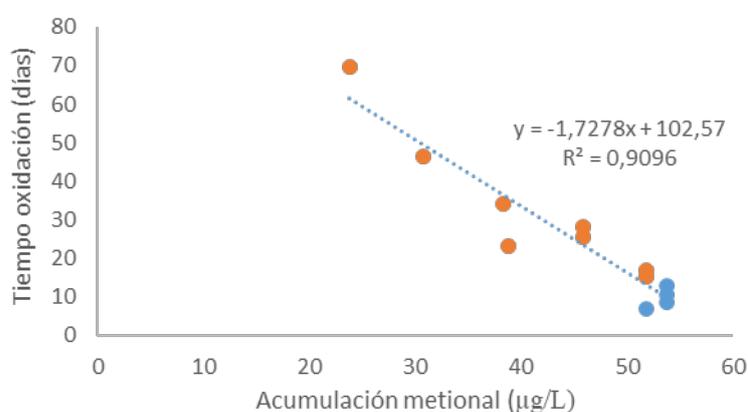


Figura 3. Correlación entre la tasa de acumulación ($\mu\text{g/L/día}$) de metional y el tiempo. Los puntos azules se corresponden a vinos blancos y rosados. En naranja se representan los 8 tintos.

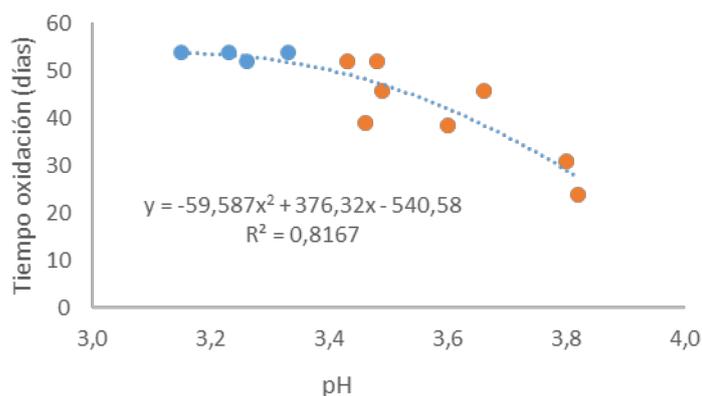


Figura 4. Correlación entre el tiempo de oxidación y el pH. Los puntos azules se corresponden a vinos blancos y rosados. En naranja se representan los 8 tintos.

3.- Se han encontrado correlaciones negativas y significativas entre las tasas de acumulación de isobutiraldehído ($R=-0,85$ $p=4.10^{-4}$), 3-metilbutanal ($R=-0,83$ $p=7,71.10^{-4}$) (también normalizada al O₂noSO₂) ($R=-0,84$ $p=6,03.10^{-4}$) y 2-metilbutanal

($R=-0,87$ $p=2,23 \cdot 10^{-4}$) con respecto a los niveles iniciales de isobutiraldehído, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal. La correlación afecta tanto a los tintos como a blancos y rosados, pero considerados por separado, tal y como se ve en la **figura 5**.

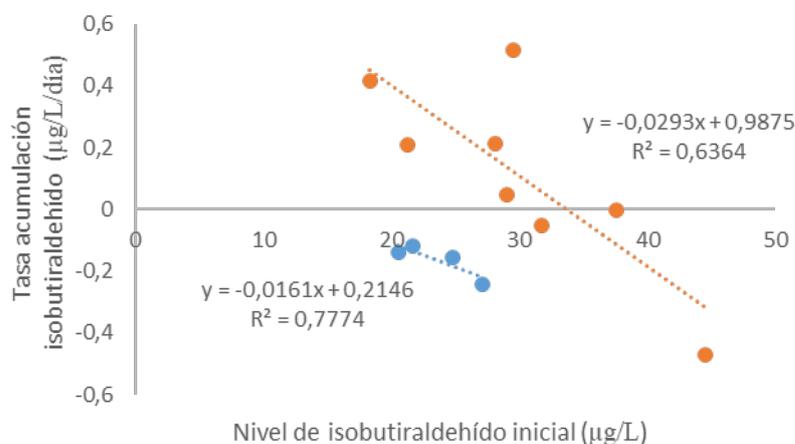


Figura 5. Correlación entre el tasa de acumulación de isobutiraldehído ($\mu\text{g/L/día}$ de oxidación) y su concentración inicial ($\mu\text{g/L}$). Los puntos azules se corresponden a vinos blancos y rosados. En naranja se representan los 8 tintos.

La verdad es que se trata de una correlación de explicación desafiante porque podríamos pensar que niveles iniciales altos de aldehído podrían estar asociados a composiciones polifenólicas poco reactivas –con respecto a la reacción aldehído-polifenol-, pero esto explicaría una correlación positiva. Con lo que conocemos del acetaldehído, podría pensarse que hay una cierta concentración a partir de la cual el isobutiraldehído se hace muy reactivo. Esto explicaría que los 3 vinos tintos con mayores niveles de isobutiraldehído, tengan de facto coeficientes de acumulación negativos, porque estarían en un momento en el que la reactividad del aldehído con el material polifenólico estaría “desatada” y acelerada por la desaparición del SO_2 protector (es el que antes se desproteje). También es llamativa la correlación positiva entre las tasas de acumulación de metional y fenilacetaldehído y los niveles añadidos de metionina y fenilalanina, y la acumulación de metional y fenilacetaldehído ($R=0,84$ $p=5,56 \cdot 10^{-4}$) y ($R=0,86$ $p=3,01 \cdot 10^{-4}$), tal y como se ve en la **figura 6**.

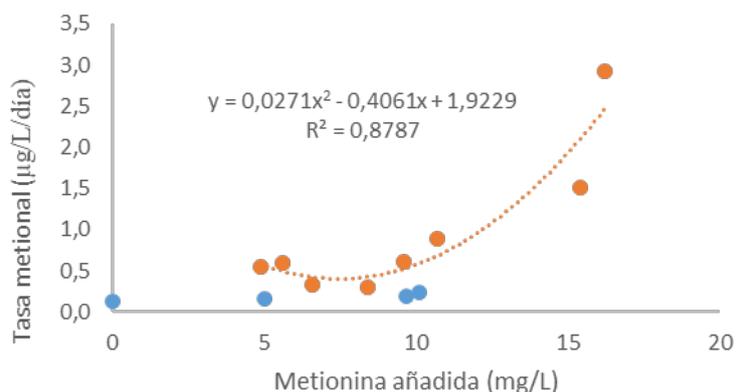


Figura 6. Correlación entre el tasa de acumulación de metional ($\mu\text{g/L/día}$ de oxidación) y la concentración metionina añadida (mg/L). Los puntos azules se corresponden a vinos blancos y rosados. En naranja se representan los 8 tintos.

Considerando solo los 8 vinos tintos la tasa de acumulación de metional y fenilacetaldehído por unidad de O_2/NO_2 la correlación mejora hasta ($R=0,90$ $p=6,18 \cdot 10^{-5}$) y ($R=0,96$ $p=5,66 \cdot 10^{-7}$) respectivamente. Esto podría sugerir que el aminoácido añadido es más reactivo que el presente o nativo en las muestras, lo que implicaría que los aminoácidos nativos se encuentran formando algún tipo de interacciones reversibles y lentas con otros componentes del vino, lo que explicaría la menor reactividad frente a los aminoácidos añadidos. Componentes con los que los aminoácidos podrían establecer interacciones, son precisamente los aldehídos nativos. Esta posible causalidad habría de investigarse, no obstante, ya que no hay antecedentes claros de que los aminoácidos se encuentren formando interacciones fuertes y porque, tal y como se ve en la representación, la correlación está muy mediatizada por los dos vinos con mayores tasas de formación, que son también los que mayor pH tuvieron. Si estos dos vinos se excluyen, la correlación desaparece de forma completa.

			Acumulación = final - inicial (µg/L)					Acumulación/ tiempo (µg/L / días)					Acumulación/ O ₂ no SO ₂ ((µg/L) / mg/L)				
			Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Fe inicial	R		0,26	0,38	0,20	0,20	0,10	0,20	0,28	0,12	0,09	0,04	0,37	0,40	0,22	0,05	0,01
	p(t)		4,08E-01	2,23E-01	5,32E-01	5,39E-01	7,51E-01	5,37E-01	3,83E-01	7,08E-01	7,76E-01	9,07E-01	2,43E-01	1,93E-01	4,88E-01	8,73E-01	9,66E-01
Fe añadido	R		-0,26	-0,38	-0,20	-0,20	-0,10	-0,20	-0,28	-0,12	-0,09	-0,04	-0,37	-0,40	-0,22	-0,05	-0,01
	p(t)		4,08E-01	2,23E-01	5,32E-01	5,39E-01	7,51E-01	5,37E-01	3,83E-01	7,08E-01	7,76E-01	9,07E-01	2,43E-01	1,93E-01	4,88E-01	8,73E-01	9,66E-01
IPT	R		0,61	0,61	0,42	0,69	0,57	0,61	0,64	0,44	0,57	0,52	0,70	0,60	0,39	0,60	0,46
	p(t)		3,65E-02	3,37E-02	1,69E-01	1,26E-02	5,51E-02	3,47E-02	2,42E-02	1,57E-01	5,28E-02	8,37E-02	1,05E-02	3,71E-02	2,11E-01	3,90E-02	1,31E-01
pH	R		0,67	0,66	0,55	0,88	0,80	0,74	0,76	0,63	0,80	0,77	0,70	0,59	0,46	0,78	0,71
	p(t)		1,64E-02	2,04E-02	6,64E-02	1,70E-04	1,98E-03	5,89E-03	3,89E-03	2,96E-02	1,79E-03	3,43E-03	1,06E-02	4,39E-02	1,31E-01	2,55E-02	9,91E-03
Días de oxidación	R		-0,81	-0,79	-0,81	-0,95	-0,94	-0,90	-0,92	-0,87	-0,93	-0,93	-0,79	-0,72	-0,72	-0,87	-0,88
	p(t)		1,41E-03	2,17E-03	1,32E-03	1,47E-06	3,91E-06	5,28E-05	2,15E-05	2,56E-04	1,43E-05	1,47E-05	2,37E-03	8,40E-03	7,98E-03	2,31E-04	1,66E-04
O ₂ consumido total	R		0,24	0,24	-0,02	0,23	0,11	0,18	0,19	-0,04	0,10	0,05	0,40	0,24	-0,03	0,08	0,00
	p(t)		4,45E-01	4,52E-01	9,41E-01	4,70E-01	7,26E-01	5,73E-01	5,46E-01	8,96E-01	7,63E-01	8,74E-01	1,96E-01	4,53E-01	9,26E-01	7,97E-01	9,97E-01
O ₂ no SO ₂	R		0,61	0,66	0,46	0,66	0,58	0,61	0,67	0,45	0,55	0,51	0,70	0,60	0,39	0,44	0,43
	p(t)		3,41E-02	1,98E-02	1,36E-01	1,93E-02	4,99E-02	3,54E-02	1,71E-02	1,37E-01	6,44E-02	9,00E-02	1,09E-02	4,12E-02	2,12E-01	1,53E-01	1,62E-01
SO ₂ libre inicial	R		0,22	0,24	-0,02	-0,22	-0,21	0,09	0,09	-0,17	-0,28	-0,27	0,13	0,21	0,01	-0,23	-0,25
	p(t)		4,82E-01	4,48E-01	9,60E-01	4,96E-01	5,04E-01	7,72E-01	7,74E-01	5,88E-01	3,75E-01	3,97E-01	6,92E-01	5,07E-01	9,71E-01	4,77E-01	4,38E-01
SO ₂ total inicial	R		-0,65	-0,69	-0,72	-0,78	-0,77	-0,73	-0,77	-0,74	-0,75	-0,74	-0,65	-0,61	-0,61	-0,65	-0,70
	p(t)		2,08E-02	1,29E-02	8,88E-03	2,98E-03	3,62E-03	7,61E-03	3,19E-03	5,54E-03	5,16E-03	6,30E-03	2,33E-02	3,38E-02	3,34E-02	2,11E-02	1,09E-02
SO ₂ total final	R		-0,50	-0,46	-0,48	-0,64	-0,58	-0,54	-0,53	-0,51	-0,58	-0,55	-0,44	-0,44	-0,40	-0,60	-0,56
	p(t)		9,93E-02	1,31E-01	1,14E-01	2,53E-02	4,57E-02	6,85E-02	7,57E-02	8,78E-02	5,02E-02	6,30E-02	4,93E-02	1,53E-01	1,95E-01	3,95E-02	5,87E-02
Nivel de aldehído inicial	Isobutiraldehído	R	-0,47	-0,44	-0,40	0,02	-0,16	-0,43	-0,39	-0,25	-0,04	-0,14	-0,35	-0,43	-0,45	0,02	-0,19
		p(t)	1,20E-01	1,52E-01	1,96E-01	9,58E-01	6,13E-01	1,64E-01	2,06E-01	4,42E-01	9,05E-01	6,66E-01	2,69E-01	1,65E-01	1,41E-01	9,60E-01	5,52E-01
	2-metilbutanal	R	-0,69	-0,71	-0,57	-0,17	-0,22	-0,59	-0,58	-0,37	-0,15	-0,18	-0,63	-0,74	-0,66	-0,14	-0,20
		p(t)	1,22E-02	9,35E-03	5,07E-02	5,93E-01	5,00E-01	4,37E-02	4,87E-02	2,37E-01	6,37E-01	5,80E-01	2,87E-02	6,09E-03	2,03E-02	6,67E-01	5,28E-01
	3-metilbutanal	R	-0,76	-0,74	-0,77	-0,33	-0,38	-0,70	-0,66	-0,60	-0,35	-0,37	-0,71	-0,77	-0,83	-0,33	-0,38
		p(t)	4,43E-03	6,44E-03	3,50E-03	2,88E-01	2,23E-01	1,12E-02	1,87E-02	3,98E-02	2,65E-01	2,38E-01	9,78E-03	3,16E-03	9,24E-04	2,98E-01	2,22E-01
	Metional	R	-0,21	-0,23	-0,19	-0,32	-0,37	-0,25	-0,28	-0,22	-0,28	-0,31	-0,29	-0,16	-0,08	-0,17	-0,34
		p(t)	5,07E-01	4,71E-01	5,62E-01	3,06E-01	2,32E-01	4,36E-01	3,72E-01	5,01E-01	3,70E-01	3,26E-01	3,57E-01	6,29E-01	7,94E-01	6,01E-01	2,75E-01
	Fenilacetaldehído	R	0,13	0,09	-0,06	-0,02	-0,19	0,02	-0,03	-0,13	-0,11	-0,19	0,23	0,16	0,02	-0,03	-0,26
		p(t)	6,94E-01	7,91E-01	8,48E-01	9,52E-01	5,53E-01	9,50E-01	9,36E-01	6,92E-01	7,30E-01	5,49E-01	4,66E-01	6,12E-01	9,47E-01	9,29E-01	4,11E-01
Nivel de aminoácidos inicial	Valina	R	-0,12	-0,17	-0,27	-0,35	-0,50	-0,23	-0,28	-0,31	-0,35	-0,44	-0,05	-0,14	-0,21	-0,47	-0,61
		p(t)	7,13E-01	6,07E-01	3,97E-01	2,62E-01	9,72E-02	4,76E-01	3,75E-01	3,33E-01	2,64E-01	1,52E-01	8,66E-01	6,60E-01	5,19E-01	1,25E-01	3,65E-02
	Isoleucina	R	-0,09	-0,16	-0,17	-0,27	-0,40	-0,18	-0,25	-0,20	-0,25	-0,33	0,01	-0,12	-0,10	-0,39	-0,49
		p(t)	7,74E-01	6,14E-01	5,97E-01	3,88E-01	2,00E-01	5,79E-01	4,34E-01	5,39E-01	4,30E-01	2,95E-01	9,82E-01	7,16E-01	7,62E-01	2,06E-01	1,07E-01
	Leucina	R	-0,35	-0,34	-0,45	-0,60	-0,73	-0,49	-0,51	-0,52	-0,60	-0,68	-0,28	-0,26	-0,34	-0,63	-0,77
		p(t)	2,59E-01	2,77E-01	1,44E-01	3,98E-02	7,28E-03	1,10E-01	9,25E-02	8,00E-02	4,04E-02	1,56E-02	3,73E-01	4,07E-01	2,81E-01	2,69E-02	3,56E-03
	Metionina	R	-0,42	-0,46	-0,51	-0,78	-0,82	-0,56	-0,61	-0,61	-0,75	-0,78	-0,36	-0,40	-0,41	-0,84	-0,87
		p(t)	1,72E-01	1,35E-01	8,76E-02	2,83E-03	1,11E-03	5,98E-02	3,44E-02	3,36E-02	5,09E-03	2,73E-03	2,47E-01	2,02E-01	1,82E-01	5,56E-04	2,42E-04
	Fenilalanina	R	-0,41	-0,41	-0,52	-0,66	-0,78	-0,54	-0,56	-0,60	-0,67	-0,74	-0,30	-0,33	-0,41	-0,73	-0,86
		p(t)	1,89E-01	1,89E-01	7,98E-02	2,03E-02	2,64E-03	7,00E-02	5,58E-02	3,93E-02	1,80E-02	5,80E-03	3,38E-01	3,02E-01	1,81E-01	7,05E-03	3,01E-04
Incremento de aminoácidos	Valina	R	0,12	0,17	0,27	0,35	0,50	0,23	0,28	0,31	0,35	0,44	0,05	0,14	0,21	0,47	0,61
		p(t)	7,13E-01	6,07E-01	3,97E-01	2,62E-01	9,72E-02	4,76E-01	3,75E-01	3,33E-01	2,64E-01	1,52E-01	8,66E-01	6,60E-01	5,19E-01	1,25E-01	3,65E-02
	Isoleucina	R	0,09	0,16	0,17	0,27	0,40	0,18	0,25	0,20	0,25	0,33	-0,01	0,12	0,10	0,39	0,49
		p(t)	7,74E-01	6,14E-01	5,97E-01	3,88E-01	2,00E-01	5,79E-01	4,34E-01	5,39E-01	4,30E-01	2,95E-01	9,82E-01	7,16E-01	7,62E-01	2,06E-01	1,07E-01
	Leucina	R	0,35	0,34	0,45	0,60	0,73	0,49	0,51	0,52	0,60	0,68	0,28	0,26	0,34	0,63	0,77
		p(t)	2,59E-01	2,77E-01	1,44E-01	3,98E-02	7,28E-03	1,10E-01	9,25E-02	8,00E-02	4,04E-02	1,56E-02	3,73E-01	4,07E-01	2,81E-01	2,69E-02	3,56E-03
Metionina	R	0,42	0,46	0,51	0,78	0,82	0,56	0,61	0,61	0,75	0,78	0,36	0,40	0,41	0,84	0,87	
	p(t)	1,72E-01	1,35E-01	8,76E-02	2,83E-03	1,11E-03	5,98E-02	3,44E-02	3,36E-02	5,09E-03	2,73E-03	2,47E-01	2,02E-01	1,82E-01	5,56E-04	2,42E-04	
Fenilalanina	R	0,41	0,41	0,52	0,66	0,78	0,54	0,56	0,60	0,67	0,74	0,30	0,33	0,41	0,73	0,86	
	p(t)	1,89E-01	1,89E-01	7,98E-02	2,03E-02	2,64E-03	7,00E-02	5,58E-02	3,93E-02	1,80E-02	5,80E-03	3,38E-01	3,02E-01	1,81E-01	7,05E-03	3,01E-04	

Tabla 13. Correlaciones entre todas las variables y las diferentes formas de expresar la acumulación para todos los vinos. Resaltados en negrita los valores significativos con $p(t) \leq 0,05$ y comprobados gráficamente

		Acumulación = final - inicial (µg/L)					Acumulación / tiempo (µg/L) / días					Acumulación / O ₂ no SO ₂ ((µg/L) / mg/L)					
		Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	
Fe inicial	R	0,04	0,10	-0,06	-0,32	-0,37	-0,09	-0,07	-0,16	-0,33	-0,38	0,05	0,05	-0,07	-0,49	-0,46	
	p(t)	9,00E-01	7,61E-01	8,56E-01	3,16E-01	2,35E-01	7,79E-01	8,17E-01	6,15E-01	3,00E-01	2,23E-01	8,68E-01	8,79E-01	8,20E-01	1,07E-01	1,30E-01	
IPT	R	0,68	0,63	0,57	0,55	0,60	0,72	0,70	0,52	0,58	0,67	0,67	0,62	0,62	0,65		
	p(t)	1,58E-02	2,87E-02	5,41E-02	6,54E-02	4,00E-02	8,89E-03	1,15E-02	8,48E-02	8,13E-02	4,94E-02	1,67E-02	1,65E-02	3,27E-02	2,52E-02	2,22E-02	
pH	R	0,61	0,60	0,64	0,88	0,87	0,74	0,77	0,71	0,84	0,86	0,59	0,56	0,61	0,81	0,85	
	p(t)	3,43E-02	3,82E-02	2,63E-02	1,65E-04	2,20E-04	5,91E-03	3,53E-03	9,50E-03	6,73E-04	3,57E-04	4,42E-02	6,04E-02	3,40E-02	1,40E-03	4,20E-04	
Días de oxidación	R	-0,75	-0,73	-0,85	-0,94	-0,96	-0,88	-0,90	-0,90	-0,92	-0,94	-0,69	-0,66	-0,79	-0,86	-0,93	
	p(t)	5,10E-03	7,09E-03	4,73E-04	6,82E-06	1,33E-06	1,35E-04	5,35E-05	7,91E-05	2,81E-05	5,77E-06	1,27E-02	1,96E-02	2,15E-03	3,30E-04	1,24E-05	
O ₂ consumido total	R	-0,28	-0,30	-0,51	-0,58	-0,54	-0,40	-0,44	-0,58	-0,58	-0,56	-0,22	-0,26	-0,43	-0,59	-0,55	
	p(t)	3,79E-01	3,41E-01	8,99E-02	4,82E-02	6,96E-02	1,93E-01	1,52E-01	4,63E-02	4,71E-02	6,00E-02	4,99E-01	4,17E-01	1,60E-01	4,44E-02	6,67E-02	
O ₂ no SO ₂	R	0,46	0,55	0,37	0,42	0,41	0,47	0,55	0,35	0,36	0,44	0,45	0,32	0,20	0,32		
	p(t)	1,29E-01	6,27E-02	2,30E-01	1,74E-01	1,80E-01	1,26E-01	6,27E-02	2,63E-01	2,53E-01	2,50E-01	1,55E-01	1,46E-01	3,13E-01	5,41E-01	3,16E-01	
SO ₂ libre inicial	R	0,38	0,41	0,07	-0,33	-0,24	0,18	0,18	-0,18	-0,39	-0,34	0,42	0,41	0,12	-0,44	-0,30	
	p(t)	2,17E-01	1,82E-01	8,40E-01	3,02E-01	4,55E-01	5,78E-01	5,79E-01	5,71E-01	2,12E-01	2,84E-01	1,74E-01	1,87E-01	7,09E-01	1,51E-01	3,45E-01	
SO ₂ total inicial	R	-0,59	-0,63	-0,71	-0,74	-0,72	-0,69	-0,74	-0,73	-0,71	-0,70	-0,53	-0,55	-0,63	-0,63	-0,67	
	p(t)	4,19E-02	2,69E-02	1,01E-02	6,04E-03	8,92E-03	1,37E-02	5,81E-03	6,69E-03	9,75E-03	1,16E-02	7,37E-02	6,46E-02	2,87E-02	2,94E-02	1,79E-02	
SO ₂ total final	R	-0,46	-0,33	-0,65	-0,50	-0,50	-0,55	-0,45	-0,65	-0,54	-0,55	-0,44	-0,38	-0,66	-0,64	-0,57	
	p(t)	1,30E-01	2,98E-01	2,32E-02	1,01E-01	9,53E-02	6,48E-02	1,45E-01	2,19E-02	6,75E-02	6,42E-02	1,54E-01	2,24E-01	1,95E-02	2,35E-02	5,32E-02	
Nivel de aldehído inicial	Isobutiraldehído	R	-0,85	-0,84	-0,61	-0,36	-0,48	-0,80	-0,80	-0,45	-0,32	-0,40	-0,84	-0,81	-0,63	-0,28	-0,45
		p(t)	4,04E-04	5,70E-04	3,50E-02	2,47E-01	1,15E-01	1,91E-03	1,74E-03	1,45E-01	3,14E-01	1,99E-01	6,03E-04	1,25E-03	2,68E-02	3,84E-01	1,46E-01
	2-metilbutanal	R	-0,90	-0,91	-0,64	-0,35	-0,34	-0,77	-0,77	-0,44	-0,27	-0,28	-0,93	-0,92	-0,70	-0,26	-0,29
		p(t)	7,07E-05	3,29E-05	2,43E-02	2,69E-01	2,85E-01	3,16E-03	3,17E-03	1,53E-01	4,01E-01	3,85E-01	1,48E-05	1,67E-05	1,09E-02	4,15E-01	3,56E-01
	3-metilbutanal	R	-0,93	-0,91	-0,83	-0,53	-0,50	-0,87	-0,85	-0,67	-0,48	-0,47	-0,94	-0,94	-0,87	-0,51	-0,49
		p(t)	9,19E-06	3,12E-05	7,71E-04	7,92E-02	9,99E-02	2,16E-04	4,78E-04	1,66E-02	1,17E-01	1,23E-01	7,39E-06	6,77E-06	2,23E-04	8,86E-02	1,10E-01
	Metional	R	-0,39	-0,48	-0,38	-0,53	-0,60	-0,49	-0,60	-0,42	-0,50	-0,55	-0,32	-0,36	-0,28	-0,38	-0,55
		p(t)	2,10E-01	1,16E-01	2,25E-01	7,39E-02	3,78E-02	1,07E-01	3,96E-02	1,71E-01	9,70E-02	6,52E-02	3,13E-01	2,56E-01	3,72E-01	2,24E-01	6,61E-02
	Fenilacetaldehído	R	-0,18	-0,26	-0,29	-0,49	-0,55	-0,32	-0,42	-0,39	-0,48	-0,52	-0,10	-0,15	-0,18	-0,41	-0,52
		p(t)	5,75E-01	4,22E-01	3,56E-01	1,06E-01	6,59E-02	3,10E-01	1,72E-01	2,16E-01	1,13E-01	8,54E-02	7,65E-01	6,35E-01	5,68E-01	1,82E-01	8,03E-02
Nivel de aminoácidos inicial	Valina	R	-0,22	-0,20	-0,37	-0,47	-0,62	-0,36	-0,38	-0,41	-0,46	-0,56	-0,15	-0,18	-0,32	-0,57	-0,67
		p(t)	4,87E-01	5,35E-01	2,33E-01	1,22E-01	3,21E-02	2,53E-01	2,22E-01	1,84E-01	1,30E-01	5,73E-02	6,33E-01	5,83E-01	3,09E-01	5,50E-02	1,66E-02
	Isoleucina	R	-0,20	-0,20	-0,30	-0,34	-0,53	-0,31	-0,35	-0,31	-0,33	-0,45	-0,13	-0,16	-0,24	-0,40	-0,57
		p(t)	5,25E-01	5,29E-01	3,38E-01	2,78E-01	7,40E-02	3,22E-01	2,60E-01	3,30E-01	2,95E-01	1,40E-01	6,96E-01	6,26E-01	4,53E-01	1,97E-01	5,20E-02
	Leucina	R	-0,34	-0,27	-0,51	-0,57	-0,75	-0,51	-0,49	-0,57	-0,59	-0,70	-0,26	-0,20	-0,44	-0,58	-0,76
		p(t)	2,72E-01	3,97E-01	9,27E-02	5,38E-02	5,11E-03	9,37E-02	1,04E-01	5,47E-02	4,24E-02	1,07E-02	4,06E-01	5,30E-01	1,57E-01	5,00E-02	3,76E-03
Metionina	R	-0,46	-0,43	-0,64	-0,87	-0,92	-0,64	-0,66	-0,73	-0,84	-0,89	-0,40	-0,40	-0,58	-0,90	-0,95	
	p(t)	1,35E-01	1,58E-01	2,54E-02	2,60E-04	2,33E-05	2,60E-02	1,86E-02	6,63E-03	5,87E-04	9,03E-05	2,01E-01	2,01E-01	4,61E-02	6,18E-05	3,00E-06	
Fenilalanina	R	-0,59	-0,55	-0,72	-0,86	-0,95	-0,74	-0,76	-0,77	-0,83	-0,90	-0,53	-0,51	-0,68	-0,87	-0,96	
	p(t)	4,40E-02	6,30E-02	7,80E-03	3,93E-04	3,55E-06	5,70E-03	4,43E-03	3,24E-03	8,82E-04	6,53E-05	7,77E-02	9,21E-02	1,59E-02	2,57E-04	5,66E-07	
Incremento de aminoácidos	Valina	R	0,22	0,20	0,37	0,47	0,62	0,36	0,38	0,41	0,46	0,56	0,18	0,32	0,57	0,67	
		p(t)	4,87E-01	5,35E-01	2,33E-01	1,22E-01	3,21E-02	2,53E-01	2,22E-01	1,84E-01	1,30E-01	5,73E-02	6,33E-01	5,83E-01	3,09E-01	5,50E-02	1,66E-02
	Isoleucina	R	0,20	0,20	0,30	0,34	0,53	0,31	0,35	0,31	0,33	0,45	0,13	0,16	0,24	0,40	0,57
		p(t)	5,25E-01	5,29E-01	3,38E-01	2,78E-01	7,40E-02	3,22E-01	2,60E-01	3,30E-01	2,95E-01	1,40E-01	6,96E-01	6,26E-01	4,53E-01	1,97E-01	5,20E-02
	Leucina	R	0,34	0,27	0,51	0,57	0,75	0,51	0,49	0,57	0,59	0,70	0,26	0,20	0,44	0,58	0,76
		p(t)	2,72E-01	3,97E-01	9,27E-02	5,38E-02	5,11E-03	9,37E-02	1,04E-01	5,47E-02	4,24E-02	1,07E-02	4,06E-01	5,30E-01	1,57E-01	5,00E-02	3,76E-03
Metionina	R	0,46	0,43	0,64	0,87	0,92	0,64	0,66	0,73	0,84	0,89	0,40	0,40	0,58	0,90	0,95	
	p(t)	1,35E-01	1,58E-01	2,54E-02	2,60E-04	2,33E-05	2,60E-02	1,86E-02	6,63E-03	5,87E-04	9,03E-05	2,01E-01	2,01E-01	4,61E-02	6,18E-05	3,00E-06	
Fenilalanina	R	0,59	0,55	0,72	0,86	0,95	0,74	0,76	0,77	0,83	0,90	0,53	0,51	0,68	0,87	0,96	
	p(t)	4,40E-02	6,30E-02	7,80E-03	3,93E-04	3,55E-06	5,70E-03	4,43E-03	3,24E-03	8,82E-04	6,53E-05	7,77E-02	9,21E-02	1,59E-02	2,57E-04	5,66E-07	

Tabla 14. Correlaciones entre todas las variables y las diferentes formas de expresar la acumulación para los 8 vinos tintos. Resaltados en negrita los valores significativos con $p(t) \leq 0,05$ y comprobados gráficamente.

4. Conclusiones

1. Se ha comprobado que el diacetilo no es un α -dicarbonilo particularmente activo en la degradación de Strecker de la fenilalanina, ni de ninguno de los otros aminoácidos, al menos en ausencia de Fe. Por comparación, es varios órdenes de magnitud menos activo que las quinonas derivadas del 4-metil catecol. En los dos sistemas modelo estudiados, la metionina ha sido el aminoácido que más aldehído ha formado.
2. La acumulación de aldehídos de Strecker en vinos tintos, a igualdad de aminoácidos y Fe, parece ser dependiente fundamentalmente del pH y del tiempo de reacción. Los datos, (que deberían ser confirmados con disoluciones modelo a pH de vino), sugieren que la degradación de Strecker es más activa a pHs menos ácidos, a los que los aldehídos también reaccionan más lentamente con el material polifenólico y son más estabilizados por el SO₂. En cualquier caso, estos datos muestran que la influencia de cualquier otro parámetro composicional no puede ser dominante, sino que será secundaria.

5. Referencias

1. Strecker, A., *On a peculiar oxidation by alloxan*. Justus Liebigs Annalen der Chemie 1862. **123**: p. 363-367.
2. Rizzi, G.P., *The strecker degradation of amino acids: Newer avenues for flavor formation*. Food Reviews International, 2008. **24**(4): p. 416-435.
3. Saijō, R. and T. Takeo, *The Formation of Aldehydes from Amino Acids by Tea Leaves Extracts*. Agricultural and Biological Chemistry, 1970. **34**(2): p. 227-233.
4. Delgado, R., *Contribution of Phenolic Compounds to Food Flavors: Strecker-Type Degradation of Amines and Amino Acids Produced by o- and p-Diphenols*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **63**.
5. Bueno, M., et al., *Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation*. Frontiers in Chemistry, 2018. **6**.
6. Bueno, M., V. Carrascón, and V. Ferreira, *Release and Formation of Oxidation-Related Aldehydes during Wine Oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(3): p. 608-617.
7. Wildenra.HI and Singleto.VI, *PRODUCTION OF ALDEHYDES AS A RESULT OF OXIDATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS AND ITS RELATION TO WINE AGING*. American Journal of Enology and Viticulture, 1974. **25**(2): p. 119-126.
8. Hashimoto, N., *OXIDATION OF HIGHER ALCOHOLS BY MELANOIDS IN BEER*. Journal of the Institute of Brewing, 1972. **78**(1): p. 43-+.
9. Escudero, A., et al., *Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 4268-4272.
10. Grant-Preece, P., et al., *Sensorially important aldehyde production from amino acids in model wine systems: Impact of ascorbic acid, erythorbic acid, glutathione and sulphur dioxide*. Food Chemistry, 2013. **141**(1): p. 304-312.
11. Peterson, A.L. and A.L. Waterhouse, *H-1 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**(36): p. 6869-6878.
12. Bueno, M., J. Zapata, and V. Ferreira, *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**: p. 33-42.
13. Escott, C., et al., *Study of the Interaction of Anthocyanins with Phenolic Aldehydes in a Model Wine Solution*. Acs Omega, 2018. **3**(11): p. 15575-15581.
14. Pissarra, J., et al., *Reaction Between Malvidin 3Glucoside and (+)Catechin in Model Solutions Containing Different Aldehydes*. Journal of Food Science - J FOOD SCI, 2003. **68**: p. 476-481.

15. Timberlake, C.F. and P. Bridle, *INTERACTIONS BETWEEN ANTHOCYANINS, PHENOLIC COMPOUNDS, AND ACETALDEHYDE AND THEIR SIGNIFICANCE IN RED WINES*. American Journal of Enology and Viticulture, 1976. **27**(3): p. 97-105.
16. Pissarra, J.I., et al., *Contribution and importance of wine spirit to the port wine final quality - initial approach*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. **85**(7): p. 1091-1097.
17. Pissarra, J., et al., *Reaction Between Malvidin 3-Glucoside and (+)-Catechin in Model Solutions Containing Different Aldehydes*. Journal of Food Science, 2003. **68**(2): p. 476-481.
18. Pissarra, J., et al., *Isolation and structural characterization of new anthocyanin-alkyl-catechin pigments*. Food Chemistry, 2005. **90**(1-2): p. 81-87.
19. Pissarra, J., et al., *Structural characterization of new malvidin 3-glucoside-catechin aryl/alkyl-linked pigments*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(17): p. 5519-5526.
20. Pissarra, J., et al., *Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl-flavanol pigments in model solutions*. Analytica Chimica Acta, 2004. **513**(1): p. 215-221.
21. Cullere, L., J. Cacho, and V. Ferreira, *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**(1-2): p. 201-206.
22. Mingliang Bao, P.J.J., Andrew Masters, and William S. Rickert, *Analysis of Selected Carbonyl Compounds in Tobacco Samples by Using Pentafluorobenzylhydroxylamine Derivatization and Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Beiträge zur Tabakforschung International/ Contributions to Tobacco Research 2014. **26**.
23. Marrufo-Curtido, A., et al., *A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines and some observations about the influence of wine initial chemical composition*. Food Chemistry, 2018. **248**: p. 37-45.
24. OIV, *OIV-MA-AS323-04A Sulphur dioxide. Compendium of International Methods of Analysis*, 2009.
25. Ribéreau-Gayon, P., et al., *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. New York ed. Vol. 2. 2006, Chichester: John Wiley & Sons.
26. Hernandez-Orte, P., et al., *Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method*. Chromatographia, 2003. **58**(1-2): p. 29-35.
27. Grindlay, G., et al., *Evaluation of the multi-element capabilities of collision/reaction cell inductively coupled plasma-mass spectrometry in wine analysis*. Talanta, 2014. **128**: p. 379-385.

28. Dunkel, A., et al., *Nature's Chemical Signatures in Human Olfaction: A Foodborne Perspective for Future Biotechnology*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2014. **53**(28): p. 7124-7143.
29. Oliveira, C.M., et al., *Quinones as Strecker degradation reagents in wine oxidation processes*. *Food Chemistry*, 2017. **228**: p. 618-624.
30. Waterhouse, A.L., G.L. Sacks, and D.W. Jeffery, *Understanding Wine Chemistry*. *Understanding Wine Chemistry 2016*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 1-443.
31. Es-Safi, N.E., et al., *Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerization of flavanols*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. **47**(5): p. 2088-2095.
32. McRae, J.M., et al., *Effect of Wine pH and Bottle Closure on Tannins*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013. **61**(47): p. 11618-11627.
33. Monforte, A.R., S. Martins, and A.C.S. Ferreira, *Strecker Aldehyde Formation in Wine: New Insights into the Role of Gallic Acid, Glucose, and Metals in Phenylacetaldehyde Formation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018. **66**(10): p. 2459-2466.
34. Ferreira, et al., *Oxygen Consumption by Red Wines. Part I: Consumption Rates, Relationship with Chemical Composition, and Role of SO₂*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015. **63**(51): p. 10928-10937.
35. Danilewicz, J.C., *Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2003. **54**(2): p. 73-85.

CAPÍTULO V

**Desarrollo y evaluación de un índice para la
medición de los polifenoles reactivos con el
acetaldehído (ARPs)**

CAPÍTULO V

Desarrollo y evaluación de un índice para la medición de los polifenoles reactivos con el acetaldehído (ARPs)

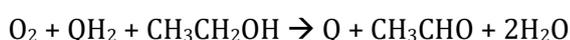
1. Introducción

Dos observaciones realizadas en nuestro laboratorio nos llevan a postular la importancia de los denominados ARPs, que serían una categoría de polifenoles particularmente reactivos con los aldehídos (ARPs). Por ello en este capítulo abordamos estudios para el desarrollo de un índice cuantitativo para estos componentes. La primera observación se basa en los modelos de regresión de mínimos cuadrados parciales (*Partial least squares Regression*, PLS) que se obtuvieron tras oxidar 8 vinos tintos a 25 grados [1] con cantidades de oxígeno muy por encima de la necesaria para oxidar completamente sus contenidos de SO₂ total (hasta 35 mg/L en exceso). Recordemos las asunciones esenciales realizadas en la obtención de esos modelos.

1. De acuerdo con el esquema de oxidación comúnmente aceptado y revisado por Danilewicz [2], se asume que mientras el vino contiene SO₂ libre disponible, el balance neto de la oxidación es básicamente el de oxidación del SO₂ (HSO₃⁻ a pH de vino) a SO₄²⁻, ya que la quinona formada en la primera reducción del O₂ es o bien reducida por el SO₂ (HSO₃⁻), o bien reacciona con éste (en competencia con otros nucleófilos del vino por adición nucleofílica), y el H₂O₂ reacciona de manera mayoritaria con el SO₂ (HSO₃⁻). Entonces asumimos que el SO₂ total presente en el vino es capaz de “explicar” el consumo de una cantidad molarmente equivalente de O₂:



2. Una vez que no hay SO₂ libre disponible, se puede seguir reduciendo el oxígeno e iniciarse la reacción de Fenton. El agua oxigenada acepta otro electrón formando radicales hidroxilo que son extremadamente reactivos y oxidan componentes mayoritarios del vino, dado que el alcohol está presente al 85%, se asume que uno de los subproducto mayoritarios de la oxidación es el acetaldehído y las quinonas [2, 3]. Por tanto, este oxígeno que no reacciona con el SO₂, y al que llamamos O₂ no SO₂ [4] reacciona esencialmente según el siguiente esquema:



Donde QH₂ representa un orto-difenol y Q su quinona. Tal y como se ve al aplicar los correspondientes cálculos estequiométricos (ecuación 1):

$$\frac{O_2 \text{ no SO}_2 \text{ consumido}}{32} \times 44 = \frac{mg}{L} \text{ de Acetaldehído Teórico Formado}$$

Ecuación 1. Cálculo del acetaldehído teórico formado

Debemos esperar la formación de 44 mg por cada 32 mg de O₂ no SO₂ consumido por un vino.

3. Comparando entonces la cantidad de acetaldehído encontrada en las muestras tras la oxidación con la “teóricamente” formada se obtiene el % de acetaldehído sin reaccionar (**ecuación 2a**) [1], de donde se estima el porcentaje de acetaldehído consumido en cada vino (**ecuación 2b**).

$$\frac{\text{Acetaldehído determinado tras oxidación (medido en mg/L)}}{\text{Acetaldehído teórico formado } \left(\frac{mg}{L}\right)} \times 100 = \% \text{Acetaldehído sin reaccionar}$$

Ecuación 2a. Cálculo del % de acetaldehído sin reaccionar

$$\% \text{ Acetaldehído reaccionado} = 100 - \% \text{ Acetaldehído sin reaccionar}$$

Ecuación 2b. Cálculo del % de acetaldehído reaccionado (consumido por los polifenoles en la oxidación)

De acuerdo con estas premisas y dados los bajos niveles de acetaldehído acumulado, se deduce que los vinos jóvenes debieron consumir entre el 85 y 100 % del acetaldehído que se formó en el mes que duró la oxidación, mientras que los vinos envejecidos debieron consumir entre el 60,4 y 82 % del total formado. Esto es, los vinos jóvenes habrían consumido hasta 42,3 mg/L de acetaldehído en un mes, mientras que los envejecidos podrían llegar a consumir algo menos, hasta 36,6 mg/L de acetaldehído en 53 días.

Es este % de aldehído reaccionado (**ecuación 2b**) el que se modelizó por PLS, obteniendo modelos muy estables y con un gran porcentaje de varianza inicial explicada (por cross-validation).

$$\% \text{ Acetaldehído sin reaccionar}_{\text{ bajo nivel O}_2} = K_1 * \text{SO}_2 \text{ combinado} + K_2 * \text{epigallocatechin} - K_3 * \text{malvidin-3-O-g} - K_4 * \text{catechin-ethyl-malvidin} - K_5 * \text{Peonidin-3-O-g-4VG}$$

Ecuación 3. Modelo PLS relacionando el % de acetaldehído sin reaccionar en el nivel bajo de oxidación con la composición inicial [1]. K₁=16,089; K₂=14,068; K₃= 15,809; K₄= 18,560 y K₅ = 13,729. Varianza explicada = 94%.

Estos modelos aparecieron en los tres niveles de oxidación estudiados y explicaron entre el 87-97 % de la varianza. Se encontraron modelos similares para los aldehídos de Strecker, lo que parece confirmar adicionalmente la validez de los mismos.

La interpretación que hicimos de los modelos, en principio consistente con la literatura científica, es que los polifenoles que en los mismos aparecían con coeficientes negativos eran polifenoles especialmente reactivos hacia los aldehídos, y que eran por tanto, los principales responsables de la desaparición de cantidades muy altas de acetaldehído y de las diferencias de comportamiento observadas entre vinos. A estos polifenoles los denominamos ARPs. De acuerdo con los modelos, los ARPs eran principalmente antocianos, taninos y aductos de ambos mediados por puentes de etilo.

La reactividad entre el acetaldehído y los polifenoles fue descrita en 1976 [5]; y más tarde se confirmó mediante análisis de Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (LC-ICP-MS) [6]. La formación de los aductos mediados por puente de etilo ha sido objeto de estudio en muchos trabajos; donde se ha evaluado como afecta la formación de estos polímeros a la calidad de los vinos en cuanto a color y astringencia principalmente [7-9].

La segunda observación deriva de un experimento [10] en el que los mismos 8 vinos del experimento anterior se oxidaron siguiendo un protocolo de oxidación forzada con 5 saturaciones consecutivas con aire. Remarcablemente, se obtuvo una correlación negativa y muy significativa entre la velocidad de consumo de oxígeno y el nivel inicial de acetaldehído del vino. En consonancia con la interpretación anterior, se lanzó la hipótesis de que dicha correlación era causal y que indicaba que los vinos con mayores niveles de ARPs, que naturalmente debían ser los que tenían menores niveles de acetaldehído, consumían más rápido el oxígeno. Es decir, la hipótesis, consistente con las observaciones y el modelo anterior, es que hay relación entre la cinética de consumo de oxígeno y los niveles de ARPs de los vinos, y por tanto, con su nivel de acetaldehído. De acuerdo con estas hipótesis y asunciones, los niveles de ARPs de los vinos parecerían ser una clave fundamental para entender tanto el consumo de oxígeno por el vino como su longevidad potencial.

Por lo tanto, el objetivo principal de las actividades presentadas en este capítulo fue el de obtener un índice analítico para evaluar el nivel de ARPs de los vinos. Debía ser un método rápido, reproducible y sencillo que nos permitiera categorizar a los vinos en función de su capacidad de consumir acetaldehído en condiciones controladas.

2. Materiales y métodos

2.1. Determinación de acetaldehído total

2.1.1. Determinación de acetaldehído total por FID

La determinación del acetaldehído total por GC-FID se realizó siguiendo el método descrito por la referencia [1].

2.1.2. Determinación de acetaldehído total por HPLC

La determinación del acetaldehído total por HPLC con derivatización previa con DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) se realizó siguiendo el método descrito en el artículo [11]. En este método la muestra se acidifica con ácido sulfúrico al 25% con el fin de favorecer que la forma mayoritaria del sulfuroso sea el molecular. Bajo esta forma (SO₂ molecular) el sulfuroso no forma aductos con los compuestos carbonílicos. Además, se añade metabisulfito al vial para prevenir la formación de aldehídos durante el proceso de derivatización a 65 °C.

El acetaldehído a pH bajos se protona fácilmente y se producirá el ataque nucleófilo del DNPH en las formas libres y acomplejadas del acetaldehído, cuantificándose por tanto la suma de ambas y obteniendo como resultado el acetaldehído total.

2.2. Desarrollo de un índice para medir ARPs: Búsqueda de las condiciones óptimas de concentración de acetaldehído añadido y temperatura de incubación para el desarrollo de un índice de ARPs en vinos

Los vinos usados en estos ensayos fueron todos comerciales y españoles: doce vinos tintos (de diferentes añadas 2010-2016 y de cuatro variedades de uva distintas Garnacha, Tempranillo, Merlot y Cabernet-Sauvignon) y dos vinos blancos (Viura 2016). En la primera tabla del apartado resultados y discusión, se pueden encontrar las muestras correspondientes a cada ensayo.

En todos estos ensayos el procedimiento de análisis se basó en dopar vinos comerciales con acetaldehído en anoxia estricta y analizarlo después de un tiempo. Para ello los vinos se abrieron en una cámara de anoxia de Jacomex (Dagneux, France), donde se doparon con 30 y/o 300 mg/L de acetaldehído. Para cada ensayo se prepararon 2 viales independientes llenos hasta arriba. Una vez cerrados, los viales se sacaron de la cámara de anoxia y se sellaron con silicona. Los viales se incubaron a 25, 45 y 70 °C. Se analizó el acetaldehído total (de cada una de las réplicas) por GC-FID para los ensayos 1-3 y por HPLC para el ensayo 4.

En todas las muestras se determinó la concentración de acetaldehído total justo después de la adición inicial de acetaldehído (punto cero) y transcurrido el tiempo de muestreo correspondiente. Los tiempos de muestreo fueron los siguientes: 1 y 2 días para el ensayo 1; 1, 4, 5 y 7 días para el ensayo 2; 1 día para el ensayo 3 y 1, 2, 4, 7 y 14 días para el ensayo 4.

En el ensayo 4 se estudió la reproducibilidad trabajando con dos tandas independientes (datos marcados con ^a y ^b en la primera tabla de resultados y discusión) a 45°C, tras 7 días y dopando con 300 mg/L de acetaldehído. Se buscaba obtener las condiciones en las que las diferencias de consumo entre muestras, normalizadas por la incertidumbre, fueran máximas.

2.2.2. Desarrollo de un índice ARP a pHs ácidos

Los vinos usados en este experimento fueron todos comerciales: un vino blanco de la variedad Viura (2016) y 4 tintos (añadas 2013-2018) de diferentes variedades (Tempranillo y Garnacha).

Se probaron dos niveles de pH: 1 y 2. Lo primero fue llevar todos los vinos a estos valores de pH. Inmediatamente después se llevaron a la cámara de anoxia (Jacomex) y se doparon 2 viales independientes (para cada pH y vino) con 35 mg/L de acetaldehído. Se incubaron a 25 grados y se analizó el acetaldehído total por HPLC a tiempo 0, 1, 2, 3, 4 y 7 días, buscando la máxima diferenciación entre muestras.

Se repitió el ensayo a ambos pHs para evaluar la reproducibilidad del procedimiento, esta vez muestreando sólo a los tiempos que ofrecieron más diferenciación entre las muestras (3 días para pH 1 y 7 días para pH 2).

2.2.3. Evaluación del índice de ARPs

En este estudio se oxidó un set de 12 vinos comerciales cuya capacidad ARP fue previamente evaluada mediante el índice anterior y se midió la cantidad de acetaldehído acumulado por cada vino con el fin estudiar su relación con el índice.

Los vinos usados en este experimento fueron todos comerciales. 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.

2.2.3.1. Caracterización de los vinos y descripción del ensayo

Se determinó el pH por potenciometría, el SO₂ total por el método Rankine siguiendo las recomendaciones de la OIV [12] y el índice de polifenoles totales (IPT) por medida espectrofotométrica a 280 nm según lo descrito por Ribéreau-Gayon y col [13]. También se determinaron los aminoácidos fenilalanina, isoleucina, leucina, metionina y valina por HPLC con detector de fluorescencia tras derivatización con AQC [14] y el hierro por ICP-MS siguiendo el procedimiento descrito en la referencia [15]. El índice ARPs se determinó por duplicado para todos vinos (a pH 2, dopar con 35 mg/L de acetaldehído en anoxia estricta y analizar el consumo de acetaldehído tras 7 días de incubación a 25 °C).

Después, cada vino se introdujo en la cámara de anoxia donde se corrigieron sus niveles de aminoácidos y de hierro, adicionando la cantidad necesaria para llevarlos en todos los casos al nivel máximo encontrado en el set de muestras. Se sacaron uno a uno y se filtraron por filtros amicróbicos de 73 mm de diámetro y 0,22 µm de tamaño de poro (MERCK, REF: SCGP U02 RE). Una vez filtrados, se saturaron con aire y se introdujeron en tubos "Wine in Tube" (WITs) con el espacio de cabeza ajustado al volumen estrictamente necesario para que contuviera el nivel de O₂ requerido para oxidar todo el SO₂ contenido en ese vino más 35 mg/L, tal y como se describe en Marrufo-Curtido y col [16]. Para cada vino se prepararon dos WITs independientes con sensores SPT3 (Nomacor) y se incubaron a 25 °C en un baño de agua con agitación orbital de 90 rpm. Los niveles de oxígeno disuelto se midieron 2 veces al día durante la primera semana y después una vez al día, hasta fin de la oxidación (momento en el que cada tubo había consumido el 95 % de oxígeno disponible o tras 54 días de oxidación como máximo). Una vez finalizada la oxidación, se analizó para cada WIT el acetaldehído total por HPLC y el SO₂ total por Rankine [12].

2.2.3.2. Tratamiento de datos

Ya que el ensayo ARP desarrollado emplea un pH distinto al del vino, sus valores fueron corregidos en cada caso. La corrección hace uso de ecuaciones básicas de velocidad de primer orden, mediante las que los índices ARPs fueron definidos como constantes de reacción siguiendo el **modelo 1** [16]. Las constantes se obtuvieron gráficamente representando el logaritmo neperiano del cociente $\frac{[\text{Acetaldehído}]_t}{[\text{Acetaldehído}]_0}$ frente al tiempo (se representa el punto inicial suponiendo que en el momento de dopado $[\text{Acetaldehído}]_t = [\text{Acetaldehído}]_0 = 35 \text{ mg/L}$ y la disminución de acetaldehído encontrada a los 7 días). Las constantes se corrigieron por el pH del vino, asumiendo que la especie reactiva es la forma protonada CH₃CHOH⁺ [17], cuya concentración se divide por 10 cada incremento unitario de pH. Esto es, la constante obtenida del ensayo se dividió por 10^{pHvino-2}.

Asumiendo cinética de primer orden

$$\frac{d[\text{Acetaldehído}]}{dt} = -k[\text{Acetaldehído}]_0 \implies \frac{d[\text{Acetaldehído}]}{[\text{Acetaldehído}]_0} = -k dt$$

Integrando

$$\int_{[\text{Acetaldehído}]_0}^{[\text{Acetaldehído}]_t} \frac{d[\text{Acetaldehído}]}{[\text{Acetaldehído}]} = -k \int_0^t dt \implies \ln[\text{Acetaldehído}]_t - \ln[\text{Acetaldehído}]_0 = -kt$$

$$\ln \frac{[\text{Acetaldehído}]_t}{[\text{Acetaldehído}]_0} = -kt \implies \log \frac{[\text{Acetaldehído}]_t}{[\text{Acetaldehído}]_0} = -0.43 kt$$

Atendiendo al modelo, por cada unidad de tiempo (en este caso expresado en días), tendríamos que:

$$\frac{[\text{Acetaldehído}]_t}{[\text{Acetaldehído}]_0} = e^{-k}$$

Es decir, e^{-k} representa la fracción de acetaldehído disuelto y que no se ha consumido en un día, por lo tanto $1-e^{-k}$ representa la fracción de acetaldehído consumida por el vino en un día. El índice de ARPs se expresará como $1-e^{-k}$.

Modelo 1. Linearización de la cinética de primer orden

Mediante Excel 2013 (Microsoft, Washington, USA) se estudiaron las correlaciones entre el índice de ARPs (corregido o no por el pH) y a) el contenido inicial de acetaldehído; b) la acumulación de acetaldehído tras la oxidación y; c) la acumulación de acetaldehído normalizado al consumo de oxígeno no consumido por el SO₂.

3. Resultados y discusión

3.1. Estudio del consumo acelerado de acetaldehído en diversas condiciones para el desarrollo de un índice de polifenoles reactivos con aldehídos (ARPs) en vinos

3.1.1 Temperatura de 70 °C

Se comenzó a buscar las condiciones óptimas para el desarrollo del índice ARPs dopando 2 vinos previsiblemente diferentes en este aspecto, con 30 y 300 mg/L de acetaldehído. Los resultados del descenso de acetaldehído tras 1 y 2 días de incubación a 70 grados (ensayo 1) aparecen en la **tabla 1**. Las cantidades consumidas al nivel mínimo de dopaje fueron muy bajas y poco precisas. Tras dos días de incubación sólo se llegaron a consumir 3,6 mg/L en el vino más consumidor, por lo que fue necesario emplear niveles más altos de adición. La dosis de 300 mg/L llevó a consumos muy superiores y más precisos, tal y como se ve en la

tabla 1. Además, esta dosis nos permitió obviar la reacción de acetaldehído con el sulfuroso libre presente en los vinos tintos, siendo esta cantidad no significativa frente al acetaldehído dopado.

El siguiente ensayo (ensayo 2) se realizó con 5 vinos diferentes y se ampliaron los tiempos de incubación estudiados (1, 4, 5 y 7 días). Se evaluó la capacidad del ensayo de proporcionar diferencias entre las muestras mediante el cociente denominado de discriminación (**ecuación 4**):

$$\text{Coef. Discriminación} = \frac{\text{Desviación estándar entre las medias de vinos}}{\text{Desviación estándar promedio entre réplicas}}$$

Ecuación 4. Criterio usado para conocer la diferenciación de las muestras.

El mejor valor de este coeficiente obtenido en el ensayo 2 fue de 2,0 para los 5 tintos incubados durante 4 días (datos de % de eliminación que se adjuntan en la **tabla 1**). El resto de los resultados del ensayo 2 se presentan en la **tabla 1 del anexo 3**.

Desafortunadamente, los descensos del acetaldehído obtenidos en las condiciones más discriminantes (70 °C y 4 días de incubación), se correlacionaron perfectamente con el IPT ($R= 0,9909$ $P = 0,0004$), lo que nos lleva a concluir que a esta temperatura la reactividad del acetaldehído es indiscriminada. Puesto que nuestro objetivo es la medición de los polifenoles reactivos con los aldehídos, se decidió trabajar a temperaturas inferiores.

3.1.2 Estudios a 25 y 45°C

Se pasó a trabajar a 25 grados y en ensayos preliminares se midieron en un solo día consumos máximos de tan solo 12 mg/L de acetaldehído en un vino tinto dopado con 300mg/L (ensayo 3), por lo que se intentaron temperaturas y tiempos de incubación más altos, comparándose las cinéticas de consumo a 25 y 45°C en el ensayo (ensayo 4) tal y como se ve en las **figuras 1a y 1b**. En general, y como puede verse en las figuras, a ambas temperaturas los consumos fueron bastante erráticos. Los coeficientes de discriminación a 25 °C (**figura 1a**) alcanzaron un mejor valor de 8,12 (a los dos días) considerando todos los vinos y de 5,47 limitando la comparación a los tintos. A 45 grados (**figura 1b**) se obtuvieron coeficientes de discriminación mucho peores. Los mejores se obtuvieron (tras dos días de incubación) y fueron de tan solo 2,41 para todos los vinos y de 1,73 si nos limitamos a los tintos. Aunque a 45 °C la cantidad de acetaldehído consumido ya no estaba correlacionada con el IPT ($R= 0,4018$ $P=0,3661$), el índice no es discriminativo y además, no estaba correlacionado con el consumo a 25 °C, invalidando 45°C como temperatura del test.

	Código muestra	Concentración de acetaldehído dopado (mg/L)	Tª °C	Duración (días)	% Acetaldehído consumido Tiempo 1	Incertidumbre %	% Acetaldehído consumido Tiempo 2	Incertidumbre %
Ensayo 1	Tinto-2016	30	70	(1-2)	1,00	6,8	2,00	7,8
		300		(1-2)	29,0	4,5	36,0	5,7
	Tinto-2011	30	70	(1-2)	4,82	11	12,0	13
		300		(1-2)	11,8	2,0	12,7	3,1
Ensayo 2	Tinto-2016	300	70	4	27,4	3,5		
	Tinto-2015		70	4	31,9	5,4		
	Tinto-2014		70	4	40,1	4,6		
	Tinto-2013		70	4	33,0	5,0		
	Tinto-2010		70	4	29,4	4,3		
Ensayo 3	Vino blanco-2016	30	25	1	0,60	1,9		
		300		1	-1,30	2,9		
	Tinto-2014	30	25	1	-2,70	2,9		
		300		1	4,00	1,5		
	Tinto-2010	30	25	1	-5,40	1,2		
		300		1	3,40	0,8		
Ensayo 4	Vino blanco-2016	300	25	(7-14)	6,96	2,1	4,75	1,2
			45	(7 ^a -7 ^b -14)	7,2 ^a -5,9 ^b	2,5 ^a -2,7 ^b	11,7	1,5
	Tinto-2016		25	(7-14)	20,1	3,8	26,2	7,6
			45	(7 ^a -7 ^b -14)	21,6 ^a -12,9 ^b	4,1 ^a -3,5 ^b	34,0	6,5
	Tinto-2014		25	(7-14)	16,1	1,4	24,4	3,3
			45	(7 ^a -7 ^b -14)	16,6 ^a -16,8 ^b	1,2 ^a -2,6 ^b	34,8	5,7
	Tinto-2012		25	(7-14)	12,6	1,0	18,9	3,2
			45	(7 ^a -7 ^b -14)	12,9 ^a -9,9 ^b	1,1 ^a -5,3 ^b	31,8	4,7

Ensayo 4: a y b indican ensayos independientes

Tabla 1. Resultados correspondientes a los ensayos 1-4. % de acetaldehído consumido en vinos dopados en diferentes condiciones. Incertidumbre (desviación estándar expresada en %).

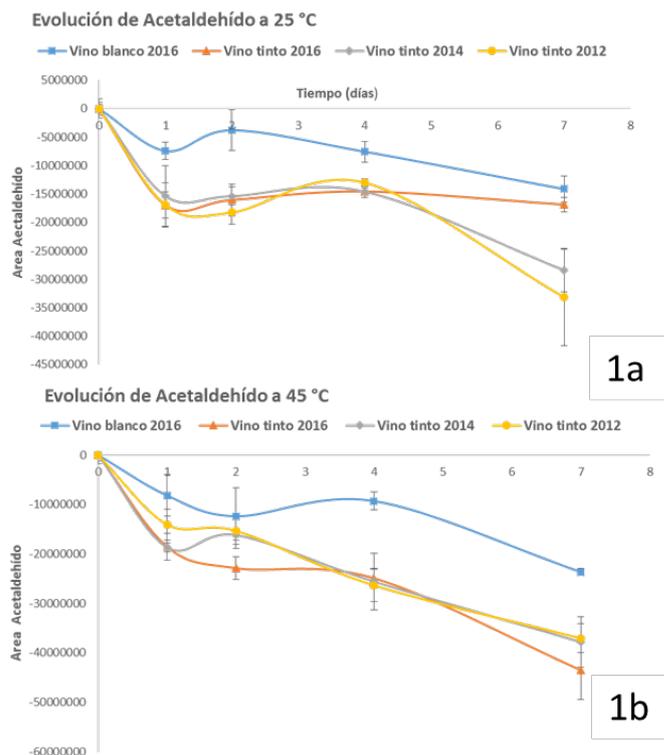


Figura 1a y 1b- Consumo de acetaldehído a 25 °C (a) y 45 °C (b). Las barras de error representan s/\sqrt{n} . Muestras realizadas por duplicado $n=2$. Ensayo 4 dopando con 300mg/L de acetaldehído.

Por tanto, nuestra conclusión es que, mediante tan solo el aumento de la temperatura y de la dosis de acetaldehído, no es posible encontrar unas condiciones en las que sea posible medir en un tiempo razonable para un ensayo la capacidad diferencial de los vinos para consumir acetaldehído. Probablemente este hecho se deba a que a mayores temperaturas los polímeros se forman más rápidamente, pero también comienzan a precipitar antes, haciendo que el consumo de acetaldehído se ralentice en ese momento, lo que podría explicar lo errático de las curvas y sobre todo la mayor imprecisión que conduce a una pésima discriminabilidad a 45°C. Por otra parte, a temperatura ambiente se necesitan tiempos muy largos [18]. En los experimentos mostrados en las **figuras 1a y 1b** no se detectaron precipitados al final de la incubación, en la bibliografía sí se documentan precipitados poniendo en contacto el acetaldehído y el material polifenólico en relación equimolar e incubando a 42 °C durante 80 días [18].

Dado que según los estudios disponibles, la condensación de polifenoles mediada por puentes de etilo es una reacción que se produce mecanísticamente a través del catión CH_3CHOH^+ [17] -que parece ser la especie electrofílica- que sufre el ataque por parte de los centros nucleófilos de los polifenoles [6, 19], la reacción está favorecida a pHs ácidos. Por esta razón, para el desarrollo del índice ARPs se decidió considerar pHs más bajos.

3.1.3 Índice de ARPs a pHs ácidos

Como ha quedado claro, la reacción entre los polifenoles (principalmente antocianos y flavanoles –como potenciales ARPs) y el acetaldehído es lenta a pH del vino [5, 20], por lo que se propone trabajar a pH más bajos (pH 1 y 2). En la bibliografía científica podemos encontrar trabajos donde han seguido esta estrategia y aceleran las reacciones de condensación del acetaldehído con los polifenoles en matrices sintéticas a pH 2 [19, 20], pero hasta la fecha no hay informes donde se trabaje modificando el pH a vinos reales. Una ventaja adicional de llevar la reacción a pH ácido es que el SO₂ pasa a estar protonado en una proporción mucho mayor, por lo que el equilibrio de formación del 1-hidroxietilsulfonato se desplaza hacia las formas libres de SO₂ y acetaldehído. A los pHs del vino, el equilibrio está desplazado hacia la forma condensada tanto más cuanto más alto sea el pH, dado que la constante de disociación es muy pequeña [21]. El efecto enlentecedor del SO₂ en la cinética de la reacción acetaldehído libre con la catequina ha sido documentado [20]. El trabajar a pH ácido por tanto, permite que la determinación del nivel de sulfuroso de las muestras no sea crítico.

Con estas consideraciones y la experiencia anterior, se estudió la cinética de consumo durante una semana de almacenamiento anóxico a 25 °C tras la adición de 35 mg/L de acetaldehído. Los resultados se muestran en las **figuras 2a (pH 2) y 2b (pH 1)**. Como era de esperar se obtienen velocidades de consumo muy superiores a pH 1. A este pH las cantidades de acetaldehído consumido en una semana superaron en todos los vinos tintos el 50%, mientras que a pH 2, sólo en un caso fue superior al 25% (para el segundo vino tinto 2018 ver **tabla 2**). Los valores recuadrados en las figuras son los coeficientes de discriminación (**ecuación 4**) entre los 5 vinos que proporciona el índice en cada uno de los puntos de análisis. Puede observarse que en ambos casos este coeficiente crece de manera continua con el tiempo. Sin embargo, puede verse también que a pH 1, alcanza ya valores muy altos tras 3 días de muestreo. Por ello, a este pH se consideró este tiempo como una buena solución de compromiso, mientras que a pH 2 se decidió mantener 7 días de incubación.

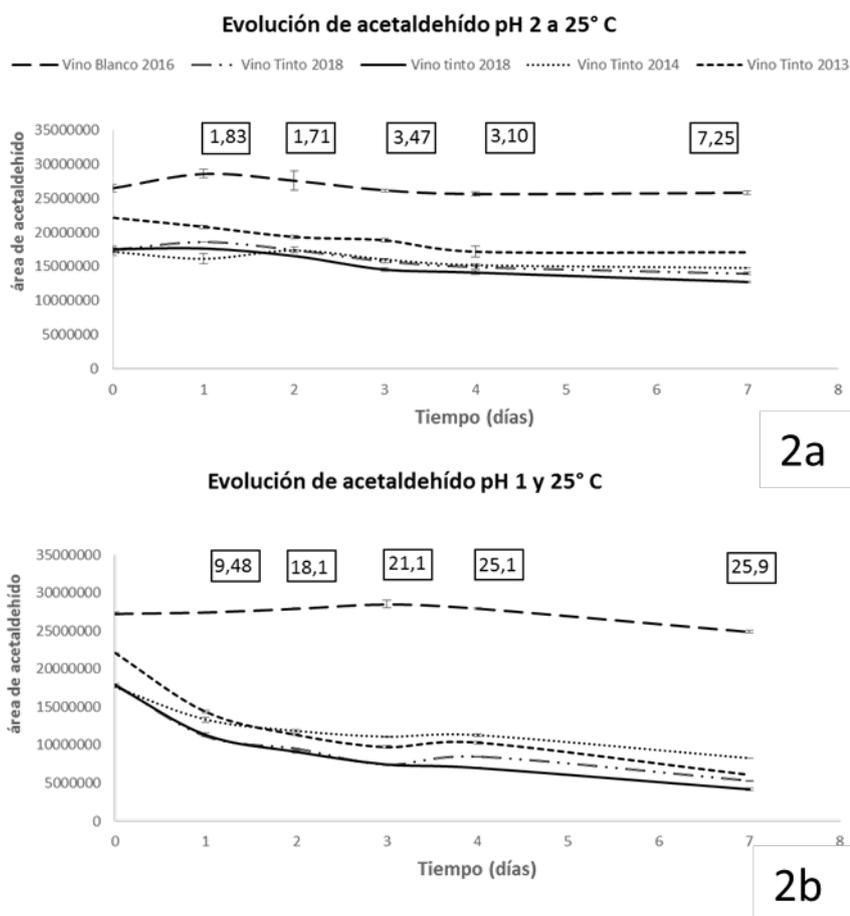


Figura 2a y 2b. Evolución del acetaldehído a pH 2 (2a) y pH 1 (2b). Las barras de error en cada punto representan el error como s/\sqrt{n} . Los valores recuadrados son los que toma el coeficiente de discriminación en cada momento de muestreo.

A continuación, se volvieron a comparar los resultados a los dos pHs en un ensayo de reproducibilidad en el que el tiempo de incubación se dejó en 3 días para pH 1 y en 7 para pH 2. Los resultados del ensayo ARPs para los 5 vinos, expresados como % de eliminación, se resumen en la **tabla 2**. Es muy destacable que aunque a pH 1 se había obtenido una discriminabilidad muy superior en el ensayo previo, los resultados de este ensayo fueron muy imprecisos tanda a tanda, tal y como se observa en la **tabla 2**. Como puede verse, las imprecisiones entre tandas a pH 1 llegaron a un 25,2 % de RSD para el vino tinto 2014. A pH 2, también los resultados de este vino fueron los más imprecisos, pero los resultados a pH 2 son, en general, mucho más consistentes. Puede verse también que a pH 1 todos los vinos se comportaron de manera irreproducible, mientras que a pH 2, sólo lo hizo el vino de 2014. Los datos sugieren que la irreproducibilidad está ligada al vino, por lo que podríamos pensar que viene asociada a la formación y/o destrucción de estructuras coloidales, aunque no se observaron turbidez ni precipitación en este ensayo.

Por estas razones, se adoptó la incubación en anoxia a 25 °C durante 7 días del vino a pH 2 previamente dopado con 35 mg/L de acetaldehído como mejores condiciones del ensayo. Se pudo comprobar que este índice ARP para tintos no está correlacionado con el IPT ($R=0,24$ $p(t)=0,75$).

	índice de ARPs (% eliminación) pH 2 incubado 7 días						índice de ARPs (% eliminación) pH 1 incubado 7 días					
	1ª tanda		2ª tanda		Reproducibilidad		1ª tanda		2ª tanda		Reproducibilidad	
	media	s	media	s	media	%RSD	media	s	media	s	media	%RSD
Vino Blanco-2016	2,60	1,38	0,0	1,54	1,30	99,8	-2,71	2,23	3,5	0,770	0,40	1100
Vino Tinto - 2018	19,8	1,74	19,1	1,94	19,5	1,72	58,1	0,520	45,6	1,44	51,8	17,1
Vino Tinto - 2018	27,2	1,07	27,8	2,78E-01	27,5	1,14	58,3	0,970	48,9	3,50E-01	53,6	12,5
Vino Tinto - 2014	13,8	6,81E-02	10,5	2,04E-02	12,1	13,7	37,0	3,90E-01	25,8	8,90E-01	31,4	25,2
Vino Tinto - 2013	22,5	1,52	17,9	17,8	20,2	11,5	54,9	0,545	44,7	2,00E-02	49,8	14,5
Coficiente todos	7,25		7,24				21,1		24,8			
Coficiente tintos	4,88		5,61				15,8		12,1			

Tabla 2. Índices de ARPs expresados como % de eliminación de acetaldehído obtenidos bajo diferentes pH y tiempos de incubación. %RSD para el estudio de reproducibilidad con 2 tandas independientes; coeficientes de diferenciación con los 5 vinos y teniendo en cuenta sólo los vinos tintos.

3.2. Evaluación del índice de ARPs

La estrategia seguida para evaluar el índice de los ARPs consistió en ver si con los datos proporcionados por el índice, éramos capaces de explicar las diferencias en las cantidades de acetaldehído acumuladas por una serie diversa de vinos en un experimento de oxidación controlado. Dada la importancia esencial que los modelos parecen atribuir a los ARPs, lo esperado es que aquellos vinos con mayor capacidad de consumir, mayor índice de ARPs, sean los que menos acetaldehído acumulen, mientras que los que muestren, de acuerdo con el índice, una menor capacidad de reacción, acumularán mucho más.

3.2.1. Oxidación controlada de los 12 vinos

Para ello, se escogieron 12 vinos de características diferentes -blancos, rosados, tintos jóvenes y tintos envejecidos- y, por una parte, se les aplicó el procedimiento para medir su índice ARP y por otra, se les sometió a un experimento de oxidación controlada tras ajustar sus niveles iniciales de aminoácidos precursores de aldehídos de Strecker y de hierro. Los vinos ajustados fueron incubados a 25°C con la cantidad de aire teóricamente necesaria para oxidar completamente todo su SO₂, y además para que hubiera 35 mg/L adicionales de O₂. La incubación se mantuvo el tiempo necesario para que el vino consumiera al menos el 95% del O₂ suministrado o 54 días, que fue el tiempo máximo de incubación. Los resultados del ensayo de oxidación se muestran en la **tabla 3**.

Uno de los aspectos que más llaman la atención de este set de resultados, es que, a pesar del claro exceso de oxígeno, los vinos no llegan a perder todo su SO₂. Por poner las cosas en perspectiva, en los primeros experimentos de oxidación que se realizaron en nuestro laboratorio [4, 22], la cantidad máxima de O₂ comunicada no fue superior a 35 mg/L (correspondiente a 5 saturaciones consecutivas). En esta tesis es la primera vez en la que

hemos asegurado que en la oxidación hay hasta 35 mg/L de O₂ por encima del necesario para consumir todo el SO₂ y, de hecho, en el primer experimento de oxidación de la tesis **capítulo 2**, dimos por hecho que éste había sido totalmente consumido. Los datos de esta experiencia de 12 vinos, sin embargo, muestran que esto no es así. Los porcentajes de desulfitación obtenidos están entre 47-65,8 % para vinos blancos, 53,5-59,6 % para rosados y 41,6-87,7 % para tintos. En estudios previos de nuestro grupo, se habían observado bajas eficiencias en el uso de SO₂ libre [10, 22] que observó que la relación molar entre el SO₂ libre disponible y el O₂ consumidos en la oxidación de vinos reales es muy inferior a la teórica 2:1, que se observa en disoluciones modelo. En el presente experimento el problema es distinto, porque se trata de sulfuroso total que en buena parte está combinado (por encima del 83% menos en dos vinos). Lo cierto es que no esperábamos este resultado, que pensamos que está relacionado con el hecho de que el equilibrio de ruptura de los hidroxisulfonatos que el SO₂ forma con los aldehídos, es mucho más lento de lo que se ha estimado previamente. Por ejemplo, en nuestro laboratorio hemos tenido que revisar muy al alza el tiempo necesario para que a temperatura ambiente se equilibren las formas libres con los hidroxisulfonatos en las adiciones de aldehídos al vino [23]. Si en trabajos anteriores [24] habíamos encontrado que el equilibrio requería 12 horas, en estudios más recientes realizados con más precisión hemos podido constatar que se necesitan al menos 48 horas. Esta lentitud en la reversión del equilibrio explicaría que la concentración de SO₂ libre, una vez que se haya consumido el primer exceso, sea muy baja -inferior a lo que corresponde por el equilibrio-, lo que daría tiempo a que otras reacciones compitieran con éxito. Ejemplos de estas otras reacciones serían los otros nucleófilos del vino (tioles, glutatión, la cisteína, aminas, etc [25]) que competirían en la reacción con las quinonas [2, 26, 27] y tal vez otros componentes. Se ha propuesto, por ejemplo, que los taninos ricos en unidades de epigallocatequina podrían competir con el sulfuroso, justificándose así consumos de oxígeno en muestras donde queda SO₂ libre remanente [22].

Una prueba experimental de la implicación del tiempo en el consumo de SO₂ es que la cantidad de SO₂ eliminada es significativamente proporcional al tiempo ($R^2=0,496$, $P=0,011$), esto es, a mayor tiempo de incubación-oxidación, mayor cantidad de SO₂ eliminada. Es decir, el sulfuroso se consume a lo largo de la oxidación, tal y como describieron Ferreira y col [22].

Hay una relación bastante curiosa y que merece la pena mencionar entre la velocidad de consumo de O₂ (calculada como el oxígeno consumido frente el número de días, mg/L/días) o entre el tiempo de incubación (que es tiempo necesario para la oxidación) y la cantidad de SO₂ total inicial:

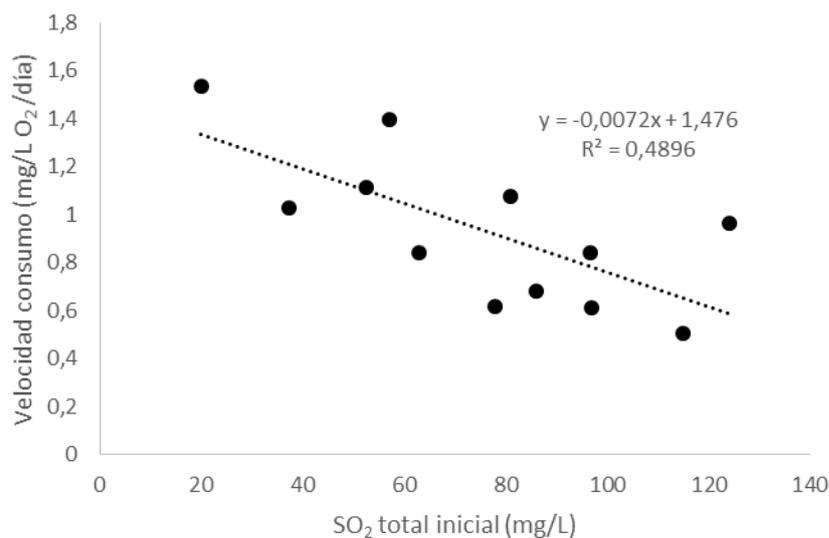


Figura 3. Velocidad de consumo de oxígeno (mg/L/día) frente al sulfuroso total inicial (mg/L).

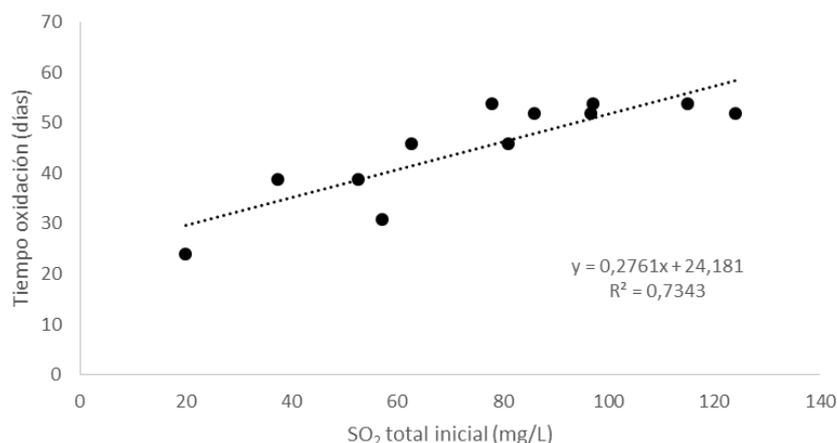


Figura 4. Tiempo de oxidación (días) frente al sulfuroso total inicial (mg/L).

Y es que, como se ve en la **figura 3**, a mayor contenido inicial de SO₂ total, más lenta la velocidad de consumo de oxígeno y más tiempo (**figura 4**) requerido para la oxidación. Ambas correlaciones son significativas, la primera con $P=0,011$ y la segunda con $P=0,00037$. No podemos saber si las correlaciones son causales o casuales. Como ya hemos indicado en la introducción general, el sulfuroso posee dos funciones principales en el mecanismo de oxidación. La primera es retirar el agua oxigenada y evitar que comience la reacción de Fenton. Se podría pensar que al reaccionar con uno de los productos intermedios de la reducción del oxígeno (H₂O₂), el SO₂ podría desplazar el equilibrio hacia la derecha, favoreciendo la cinética de consumo de oxígeno; pero tal y como se ha detallado en la **figura 3**, experimentalmente se ha obtenido la tendencia contraria. Por otro lado está la capacidad que tiene el sulfuroso como nucleófilo para reaccionar con compuestos electrófilos (como las quinonas); el producto de esta reacción puede ser la adición nucleofílica directa a la quinona ó la reducción de la quinona hasta el o-difenol (se ha propuesto que este polifenol

recuperados, es más reductores que el catecol de partida [28]). Si estamos suponiendo que la reacción de liberación de hidroxietilsulfonatos es muy lenta, y que presumiblemente otros nucleófilos reaccionarán con las quinonas, esto puede suponer un ralentizamiento del consumo de oxígeno.

Y es que además, el acetaldehído inicial de cada vino está fuertemente correlacionado con los niveles de SO₂ total, como por otra parte era de esperar [29, 30].

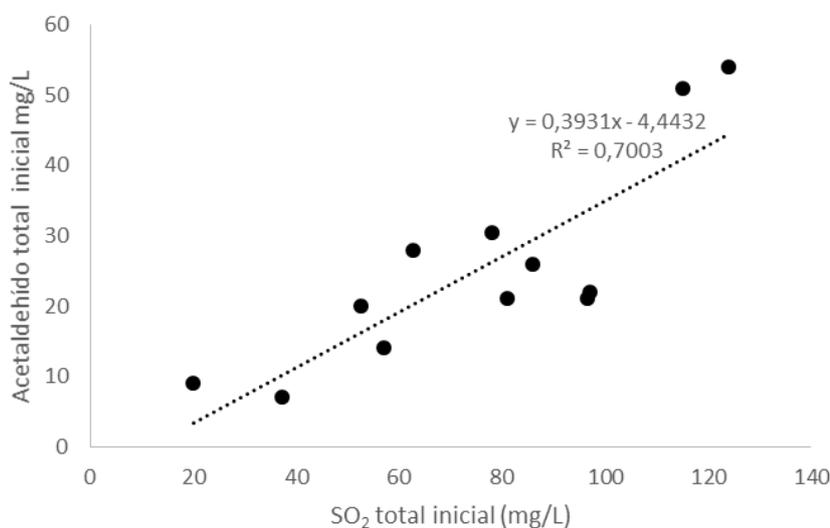


Figura 5. Correlación entre el acetaldehído total inicial (mg/L) y el sulfuroso total inicial (mg/L).

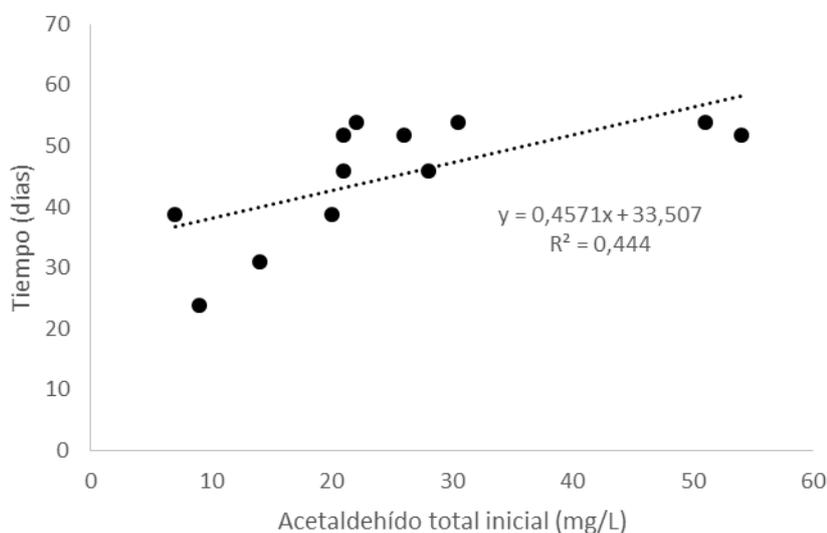


Figura 6. Tiempo de la oxidación (días) frente al acetaldehído total inicial (mg/L).

Como se muestra en el **figura 5**, la correlación entre ambas variables explica más del 70% de la varianza (significativo con $P < 0,001$). Aplicando la ecuación obtenida ($y = 0,3931x - 4,4432$) si hay 100 unidades de SO₂, el acetaldehído total inicial sería 34,87 unidades, y asumiendo que el 1 % de esa cantidad estará en forma libre [21, 29], tenemos que algo menos del 34,87% del SO₂ total está formando aducto con el acetaldehído y el 65 % del sulfuroso estaría ligado a compuestos que forman enlaces más débiles. Esta estimación del

% de SO₂ total que está combinado con acetaldehído está en el mismo orden que los datos calculados por Jackowetz y col, quienes calcularon que sería del 55 % en tintos y el 71 % para blancos [30] y el resto del sulfuroso estará combinado con otros carbonilos (ácidos $K_d=1,4 \cdot 10^{-4} - 1,6 \cdot 10^{-2}$) y azúcares $K_d= 2,2 \cdot 10^{-1}$) y antocianos ($K_d=1 \cdot 10^{-5}$) que forman uniones más lábiles que la referida al acetaldehído ($k_d= 2 \cdot 10^{-6}$) [29].

Además, puesto que, como ya hemos comentado, existe una correlación entre el SO₂ total y el tiempo de oxidación, también existe entre el tiempo y el acetaldehído inicial como se puede ver en la **figura 6**). La correlación es significativa con $P=0,018$ e indica que cuanto más acetaldehído tiene el vino, más dura la oxidación. De nuevo, esto lleva a una correlación que ya habíamos observado anteriormente entre la velocidad de consumo de O₂ y el nivel de acetaldehído (**figura 7**):

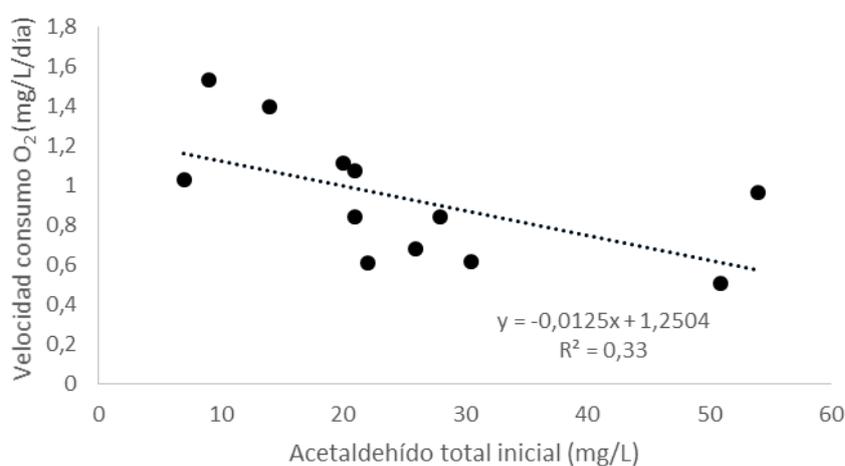


Figura 7. Velocidad de consumo de oxígeno (mg/L O₂/día) frente al acetaldehído total inicial (mg/L).

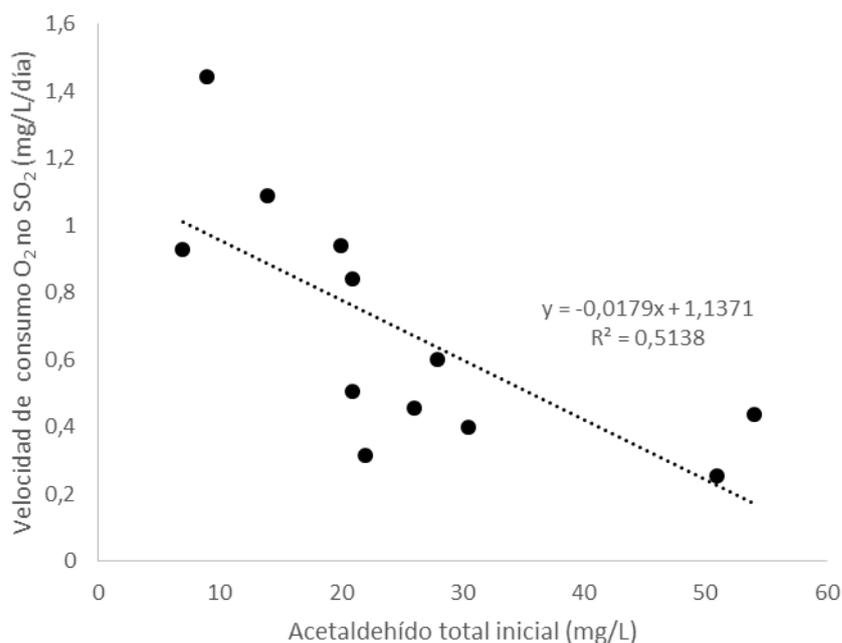


Figura 8. Velocidad de consumo de oxígeno no SO₂ (mg/L O₂/día) frente al acetaldehído total inicial (mg/L).

La correlación de la **figura 6** se queda al límite de significatividad ($P=0,0507$), pero es particularmente relevante porque es justamente una de las correlaciones que nos llevaron a sospechar la existencia e importancia de los ARPs.

Además, si en lugar de representar la velocidad de consumo de oxígeno, representamos la velocidad de consumo de O₂noSO₂ (**figura 8**), la correlación alcanza un alto grado de significatividad ($P=0,0087$). Estas correlaciones establecen que la velocidad a la que el O₂ se consume es inversamente proporcional a la cantidad de acetaldehído del vino, lo que pensamos que estaba a su vez causado por la mayor presencia de ARPs en las muestras con menores niveles de acetaldehído, y que dichos ARPs serían particularmente activos hacia el O₂ y, podríamos añadir a la vista de los resultados, con independencia del SO₂.

Otra forma de interpretar estos resultados es desde el punto de vista del mecanismo de oxidación. En el ciclo, los nucleófilos pueden entenderse como “promotores de la oxidación” porque al reaccionar con las quinonas formadas favorecen la oxidación del orto-difenol que termodinámicamente no está favorecida (E quinona-difenol pH 3,5 = 0,6 V) y haciendo por tanto que avance la oxidación [2, 26, 27, 29]. El hecho de que a mayor presencia de acetaldehído inicial menor velocidad de consumo de oxígeno se puede entender en este mismo contexto. Es decir, el acetaldehído formado o nativo estará en equilibrio con el sulfuroso ($K_f= 485.10^3$) [21], como hemos visto en la **figura 5** es un equilibrio muy estable, donde parece difícil romper el hidroxietilsulfonato). Esto puede suponer “estancamiento” de reacciones de adición nucleofílica del sulfuroso por las quinonas, conllevando en última instancia una disminución de la velocidad de oxidación.

Con respecto a la acumulación de acetaldehído, los datos se muestran en la última columna de la **tabla 3**. Puede verse en la **tabla 3** que dicha acumulación es muy pequeña. Cuatro de los vinos, marcados con un asterisco, acumularon cantidades no significativamente distintos de cero (test t de Student donde se compararon las medias de acetaldehído al inicio y al final de la oxidación), y otros dos (el tinto VF-2015 y el rosado GF-2018) tuvieron acumulaciones significativamente negativas, esto es, dos de los vinos consumieron acetaldehído durante la oxidación en lugar de producirlo. Tan solo 3 tintos -1 reserva y 3 tintos jóvenes- acumularon significativamente pequeñas cantidades de acetaldehído (entre 3 y 7 mg/L). Los vinos reserva no acumularon más acetaldehído que los jóvenes, al contrario de lo que se observó en un **capítulo 2**. Ningún vino rosado o blanco llegaron a acumular significativamente acetaldehído. De acuerdo con el concepto de ARPs, hubiéramos esperado tanto que los vinos reservas como blancos y rosados, acumularan más acetaldehído.

Tipo de Vino/Varietal*	Código	Tiempo oxidación (días)	O ₂ consumido total (mg/L)	SO ₂ total inicio (mg/L)	SO ₂ total final oxidación (mg/L)	SO ₂ eliminado en la oxidación (mg/L)	% de SO ₂ eliminado	O ₂ not SO ₂ (mg/L)	Acetaldehído inicio (mg/L)	Acetaldehído final (mg/L)	Acetaldehído acumulado (mg/L)
Tinto Reserva-G+T+Cn	CV-2008	45,8	38,5 ± 0,8	62,8	19,2	43,6	69,4%	27,6	28 ± 0,9	31 ± 8E-02	3 ± 0,9
Tinto Reserva-T	DM-2012	23,9	36,7 ± 0,2	20	11,2	8,8	44,0%	34,5	9,0 ± 0,5	14 ± 0,1	5 ± 0,5
Tinto Reserva-T	CL-2013	45,8	49,3 ± 0,4	81	37,6	43,4	53,6%	38,5	21 ± 2,1	28 ± 0,6	7 ± 2,1
Tinto Reserva-G	VF-2015	51,8	49,8 ± 0,8	124	15,2	108	87,1%	22,6	54 ± 0,5	44 ± 0,1	-10 ± 0,5
Tinto Joven-T	MT-2018	30,9	43,1 ± 0,4	57,1	19,4	37,7	66,0%	33,7	14 ± 3,2E-02	19 ± 0,1	5 ± 0,1
Tinto Joven-T	FP-2018	38,8	43,1 ± 0,6	52,6	25,6	27	51,3%	36,5	20 ± 0,5	23 ± 0,3	3 ± 0,6
Tinto Joven-G	BG-2018	38,8	39,9 ± 0,4	37,4	21,6	15,8	42,2%	36,1	7,0 ± 0,3	12 ± 0,6	5 ± 0,7
Tinto Joven-G	RB-2018	51,8	43,5 ± 0,1	96,7	26,9	69,8	72,2%	26,3	21 ± 1,2	18 ± 0,4	-3 [#] ± 1,3
Rosado- G	VMG-2018	51,8	35,2 ± 0,7	86	40	46	53,5%	23,7	26 ± 1,1	27 ± 0,5	1 [#] ± 1,2
Rosado-G+T+M+Cb+Sy	GF-2018	53,8	33,1 ± 0,8	78	31,5	46,5	59,6%	21,5	30,5 ± 0,3	26 ± 0,1	-4,5 ± 0,3
Blanco - V	VT-2018	53,8	27,2 ± 2,5	115	60,8	54,2	47,1%	13,7	51 ± 1,9	57 ± 1,1	5,7 [#] ± 2,2
Blanco - V	VM-2018	53,8	32,9 ± 1,3	97	33,1	63,9	65,9%	16,9	22 ± 1,2E-02	26 ± 0,7	3,8 [#] ± 0,6

Tabla 3. Características de los vinos (tipo, variedad y código de la muestra). Parámetros iniciales (sulfuroso total (mg/L), acetaldehído total (mg/L)). Parámetros relativos a la oxidación: tiempo de oxidación, oxígeno consumido total (mg/L), oxígeno no SO₂ (mg/L), sulfuroso total eliminado en la oxidación (mg/L). Parámetros tras la oxidación: sulfuroso total (mg/L), acetaldehído total (mg/L). Acetaldehído acumulado (mg/L) calculado como acetaldehído final- acetaldehído inicial. Las acumulaciones no significativas (test t Student $\alpha=0,05$ de comparación de medias al inicio y al final de la oxidación) están representadas con #.

El estudio de los datos muestra que la acumulación de acetaldehído sigue patrones totalmente diferentes en vinos tintos y en blancos y rosados, con las debidas cautelas asociadas al bajo número de estas últimas muestras. En el caso de los vinos tintos, la acumulación de acetaldehído es pequeña y bastante homogénea entre 6 de las muestras y sólo hay 2 en las que se observan acumulaciones negativas, esto es, consumo de acetaldehído en lugar de acumulación. Justamente, estas dos muestras son las que tienen al inicio niveles mayores de SO₂ (y combinado), y son las que más tiempo requirieron para completar la oxidación. En el primer caso, la correlación entre el acetaldehído acumulado y el sulfuroso total inicial llega a ser significativa (R²=0,63, P=0,019) para los vinos tintos (**figura 9** representada con círculos) y en el segundo no (correlación entre acetaldehído acumulado y tiempo de oxidación para los tintos) (ver **figura 10**). Las mismas relaciones para vinos blancos y rosados, tienen exactamente la tendencia opuesta si bien no se alcanza la significatividad en ningún caso, tal y como se ve en las **figuras 9 y 10** (triángulos).

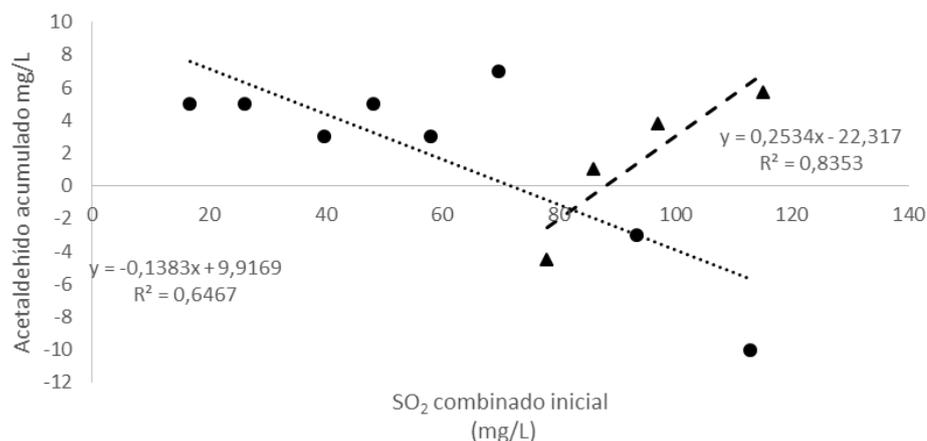


Figura 9. Acetaldehído acumulado oxidación (mg/L) frente al Sulfuroso combinado inicial (mg/L). Tintos representados como círculos, los blancos y rosados son los triángulos.

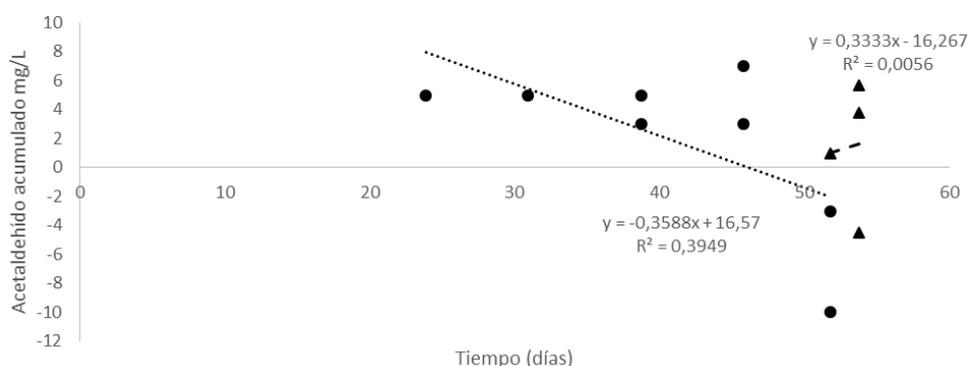


Figura 10. Acetaldehído acumulado oxidación (mg/L) frente tiempo de oxidación. Tintos representados como círculos, los blancos y rosados son los triángulos.

.El comportamiento de los tintos parece más fácil de explicar, ya que lo que se observa es que a más SO₂, menor cantidad de acetaldehído producido, que es uno de los corolarios derivados del modelo de oxidación [2]. Una derivada de esta correlación, es que el acetaldehído acumulado es proporcional al O₂ no SO₂ en el caso de los tintos, que es exactamente lo esperado de acuerdo con el modelo. En blancos y rosados se obtiene, sorprendentemente, lo contrario, tal y como se puede ver en la **figura 11**.

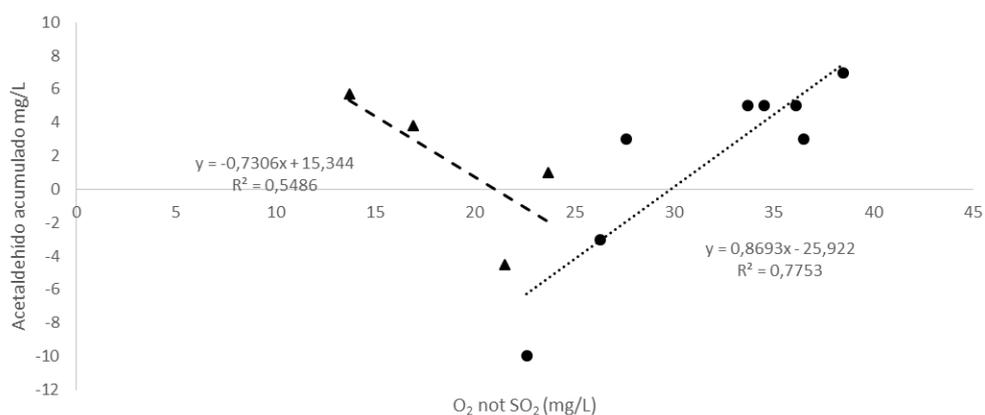


Figura 11. Acetaldehído acumulado oxidación (mg/L) frente oxígeno no sulfuroso (mg/L). Tintos representados como círculos, los blancos y rosados son los triángulos.

La correlación para los tintos es significativa con $P=0,0039$, y para los blancos y rosados no hay significatividad alguna.

Por último, la influencia del tiempo puede verse en la **figura 12**, al correlacionar la cantidad de acetaldehído acumulado con la cantidad de tiempo de oxidación normalizada a la cantidad de O₂noSO₂.

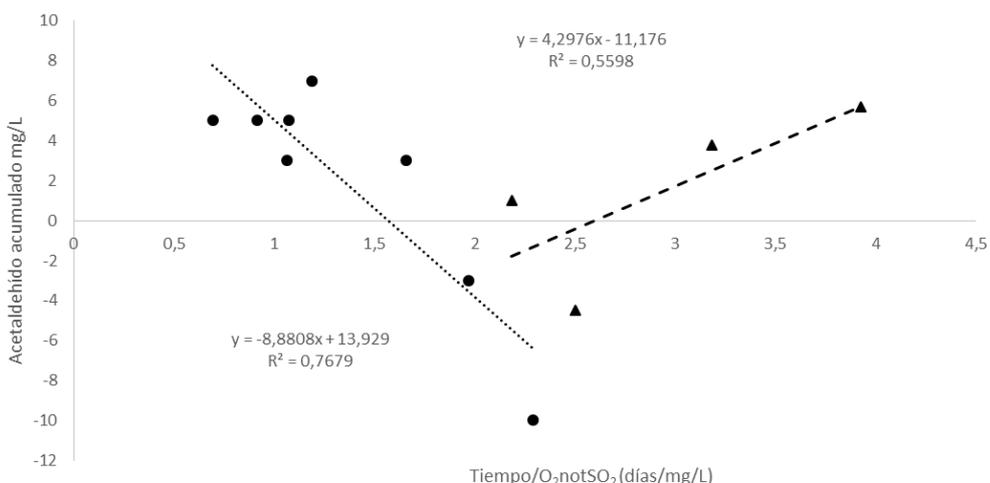


Figura 12. Acetaldehído acumulado oxidación (mg/L) frente a Tiempo/ oxígeno no sulfuroso (días/mg/L). Tintos representados como círculos, los blancos y rosados son los triángulos.

Como antes, la correlación para el caso de los tintos es significativa con $P=0,004$ y también como antes, blancos y rosados muestran un comportamiento frente a este parámetro

totalmente diferente. Los niveles de acetaldehído acumulado son esencialmente independientes tanto del tiempo, como de la cantidad de O₂ no SO₂ consumido, para los blancos y rosados.

El acetaldehído acumulado está regularmente correlacionado con el acetaldehído inicial, tal y como se ve a continuación en la **figura 13**:

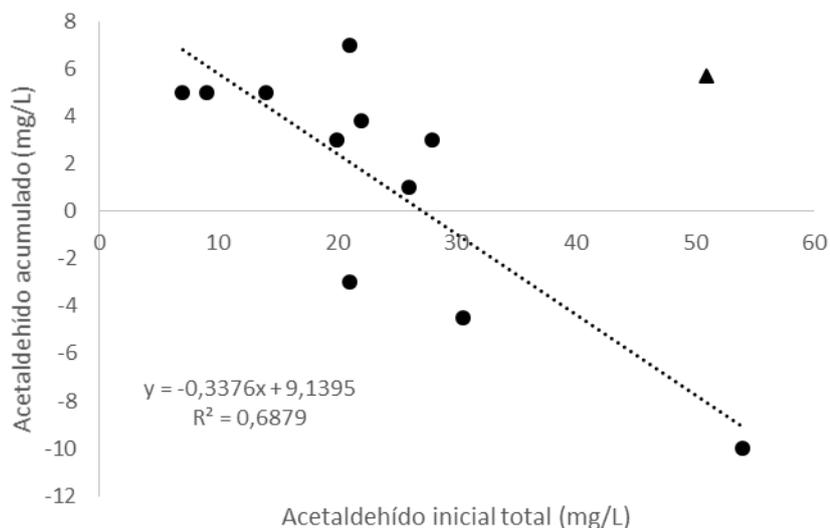


Figura 13. Acetaldehído acumulado en la oxidación (mg/L) frente a acetaldehído inicial total (mg/L).

Es preciso excluir la muestra de vino blanco VT-18 (representada con un triángulo en la **figura 13**) para que se vea la correlación negativa, que es significativa con $P=0,0016$, pero que va totalmente en contra de lo esperado. Atendiendo a los modelos de acumulación de acetaldehído del capítulo 2 esperaríamos que los vinos con menos acetaldehído inicial (por tanto menos sulfuroso total) debían ser los que tuvieran también menor capacidad de acumular acetaldehído, pero como puede verse, no es así.

Por último, resulta interesante comparar la cantidad de acetaldehído acumulado con la cantidad de acetaldehído esperada, como hicimos en el tema del que partió la hipótesis. Para ello aplicaremos la hipótesis de que la reacción Fenton está canalizando el 100% de las moléculas de H₂O₂ formadas hacia la formación del radical HO• y que se ha comprobado que éste radical oxida de manera indiscriminada y proporcional a la concentración presente, a toda la materia orgánica con H fácilmente abstraibles. Elías y col midieron en 2009 [31], que al oxidarse el etanol se forma en un primer paso el radical 1-hidroxietilo precursor del acetaldehído con un 85 % de rendimiento, de forma que esperaremos que al menos el 85% de OH• vayan a la oxidación de etanol y, por tanto, a la producción de acetaldehído. Con esos cálculos esperamos $O_2noSO_2/32 \times 44 \times 0,85$ mg/L de acetaldehído formados. Asumiendo que lo acumulado es lo formado (esperado) menos lo reaccionado, podemos obtener el

acetaldehído reaccionado en mg/L y en %, tal y como se ve en la **tabla 4**. Los porcentajes de acetaldehído reaccionado se puede ver que son muy altos si se comparan con los obtenidos en este mismo capítulo dopando vinos en diferentes condiciones (**tabla 1**).

Código	O ₂ noSO ₂ (mg/L)	Acetaldehído esperado	Acetaldehído reaccionado mg/L	Acetaldehído reaccionado (%)	Acetaldehído acumulado mg/L
CV-2008	27,6	32,3	29,3	91%	3
DM-2012	34,5	40,3	35,3	88%	5
CL-2013	38,5	45,0	38,0	84%	7
VF-2015	22,6	26,4	36,4	138%	-10
MT-2018	33,7	39,4	34,4	87%	5
FP-2018	36,5	42,7	39,7	93%	3
BG-2018	36,1	42,2	37,2	88%	5
RB-2018	26,3	30,7	33,7	110%	-3
VMG-2018	23,7	27,7	26,7	96%	1
GF-2018	21,5	25,1	29,6	118%	-4,5
VT-2018	13,7	16,0	10,3	64%	5,7
VM-2018	16,9	19,8	16,0	81%	3,8

Tabla 4. Datos referentes a la oxidación de vinos: oxígeno no sulfuroso (mg/L) y acetaldehído acumulado (mg/L) en la oxidación. Acetaldehído esperado= $O_2noSO_2/32 \times 44 \times 0,85$ (mg/L) y Acetaldehído reaccionado = Formación-Acumulación (mg/L).

Es obvio que la cantidad de acetaldehído esperado está correlacionado con la de acumulado, ya que se obtiene a partir del O₂noSO₂ que está correlacionado en el caso de los vinos tintos, como vimos antes:

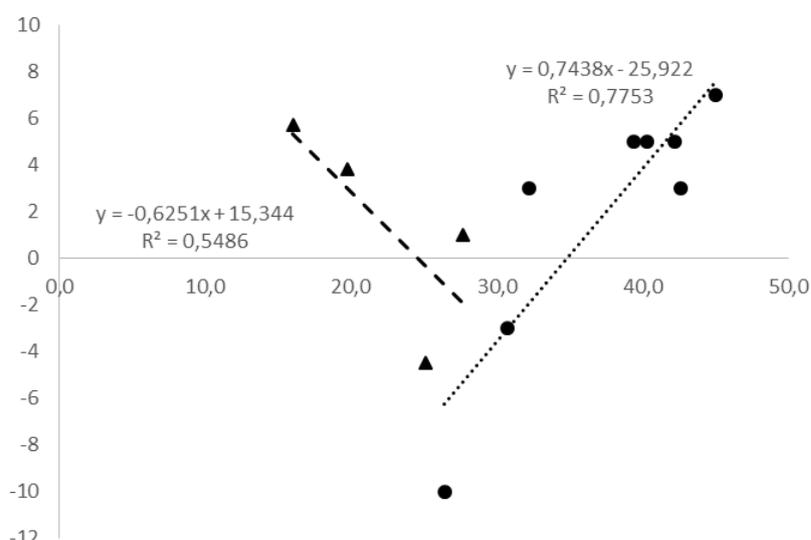


Figura 14. Acetaldehído acumulado oxidación (mg/L) frente a acetaldehído esperado (O_2 no $SO_2/32 \times 44 \times 0,85$) (mg/L). Vinos tintos representados como círculos, vinos blancos y rosados como triángulos.

La correlación es simplemente otra forma de expresar la anterior. En el caso de los tintos es significativa con $P=0,0039$. El % de acetaldehído reaccionado no depende significativamente del tiempo. Es también remarcable, que las cantidades de acetaldehído reaccionado estimadas son superiores a 29 mg/L para todos los vinos tintos, que en los rosados están por encima de 25 mg/L y que en los dos blancos están entre 10 y 16 mg/L.

En resumen, el experimento nos ha proporcionado una serie de vinos cuyos niveles iniciales de acetaldehído están fuertemente relacionados con sus niveles de SO_2 , como era de esperar, pero que han vuelto a estar también correlacionados con las velocidades a las que los vinos consumieron el O_2 , sobre todo el O_2 no SO_2 . Esto nos ha de permitir confirmar una de las hipótesis acerca de la existencia y papel de los ARPs, de acuerdo con la que su presencia estaría relacionada negativamente con los niveles de acetaldehído del vino y positivamente con las velocidades de consumo de O_2 . Los vinos, además, han acumulado cantidades relativamente pequeñas de acetaldehído, con marcadas diferencias entre algunos de los tintos, que han llegado a consumir en lugar de acumular. En el caso de los vinos tintos, la acumulación de acetaldehído parece estar relacionada positivamente con la cantidad de O_2 no SO_2 consumida por el vino y negativamente por el tiempo de incubación. La varianza que queda sin explicar por estos dos parámetros, debería ser atribuible, al menos en gran parte a la reactividad de los ARPs de cada uno de los vinos. En el caso de los blancos y rosados, la acumulación de acetaldehído no está correlacionada claramente con O_2 no SO_2 y podría estar extrañamente correlacionada con los niveles iniciales de SO_2 . Veremos a continuación, si la reactividad de los ARPs puede explicar estos comportamientos anómalos, y si puede explicar también la magnitud de acetaldehído reaccionado de acuerdo con la hipótesis.

3.2.2. Índice de ARPs de los 12 vinos

Los resultados del índice ARP a pH 2 para los 12 vinos se pueden ver en la **tabla 5**. Puede apreciarse que en la semana que dura el ensayo, las cantidades de acetaldehído que se consumieron por reacción variaron desde cantidades negativas para los dos rosados, hasta los poco casi 18 mg/L que desaparecieron en el vino VF. Las cantidades consumidas son relativamente homogéneas entre grupos. Los rosados, no consumieron nada, en uno de hecho se midió un aumento; los blancos consumieron entre 4 y 8 mg/L; los tintos jóvenes, entre 9,8 y 14,5 mg/L y los envejecidos entre 11,2 y 17,7 mg/L. La comparación entre las cantidades consumidas tras 1 semana a pH 2, con las esperadas reaccionadas en el ensayo de oxidación son difíciles de reconciliar, particularmente en el caso de los rosados. Deberíamos esperar que al pH del vino, y con la mucha menor concentración de acetaldehído libre generada en el proceso, las velocidades de reacción del acetaldehído

fueran más de un orden de magnitud inferior, por lo que aunque el ensayo se prolongó durante más de 6 semanas, las cantidades de acetaldehído que pudieran consumir los vinos de acuerdo con su capacidad de consumir acetaldehído indicada por el ensayo, serían muy inferiores. En el apartado correlaciones, las cantidades consumidas no están correlacionadas con el IPT en ningún caso. Para los vinos tintos, el índice, dado como % de eliminación no está correlacionado con el IPT ($R=0,16$ $P=0,70$), pero esto era esperado. Tampoco hay correlaciones claras con la cantidad de acetaldehído acumulado, corregido o no por el O_2 no SO_2 .

Código	pH	IPT	ARPs (% eliminación)	$ARPs \left(\frac{(1-e)^{-k}}{10^{pH\ vino-2}} \right)$	índice ARP x 1000	Acetaldehído total inicial= 35 mg/L + el que contiene la muestra (mg/L)	Acetaldehído total final tras anoxia 7 días pH2 (mg/L)	Acetaldehído reaccionado pH 2, mg/L
CV-2008	3,49	53	20,5	1,00E-03	1,00	58,4 ± 3,6	46,5 ± 1,4	11,9 ± 3,9
DM-2012	3,82	55,6	26,9	6,70E-04	0,67	41,8 ± 0,3	30,6 ± 0,3	11,2 ± 0,4
CL-2013	3,66	46,3	22,1	7,70E-04	0,77	61,3 ± 0,9	47,8 ± 0,8	13,5 ± 1,2
VF-2015	3,48	54,7	22,0	1,20E-03	1,20	80,4 ± 2,9	62,7 ± 4,2	17,7 ± 5,1
MT-2018	3,80	61,8	25,7	6,80E-04	0,68	47,4 ± 1,9	35,2 ± 1,4	12,2 ± 2,4
FP-2018	3,6	46,7	27,8	1,20E-03	1,20	52,1 ± 1,2	37,6 ± 0,3	14,5 ± 1,2
BG-2018	3,46	50,6	37,8	2,30E-03	2,30	37,9 ± 0,7	23,6 ± 0,4	14,3 ± 0,8
RB-2018	3,43	44,1	18,3	1,10E-03	1,10	53,5 ± 2	43,7 ± 1,5	9,8 ± 2,5
VMG-2018	3,26	11,8	-0,52	-3,90E-05	-0,04	60,1 ± 0,2	60,4 ± 0,9	-0,3 ± 0,9
GF-2018	3,15	13,3	-7,86	-7,80E-04	-0,78	56,3 ± 0,1	60,8 ± 1	-4,5 ± 1,0
VT-2018	3,23	10,7	8,86	8,00E-04	0,80	93,8 ± 2,7	85,5 ± 0,1	8,3 ± 2,7
VM-2018	3,33	7,41	7,92	5,60E-04	0,56	59,3 ± 0,7	54,6 ± 1,1	4,7 ± 1,3

Tabla 5. Datos de IPT y pH en los vinos. Datos relativos al índice ARPs: expresados como % de eliminación de acetaldehído; corregidos por el pH del vino y corregidos por el pH x 1000. Acetaldehído al inicio (mg/L) de la determinación del índice de ARPs = valor de acetaldehído inicial + 35 mg/L de acetaldehído dopado. Acetaldehído total final (mg/L) tras permanecer en anoxia 7 días a pH 2. Acetaldehído reaccionado (mg/L) = Acetaldehído al inicio – acetaldehído total final.

Los mismos resultados se obtienen incluso si introducimos la corrección del pH en las constantes cinéticas, tal y como se indicó en la parte de material y métodos. El índice de ARPs $\left(\frac{(1-e)^{-k}}{10^{pH\ vino-2}} \right)$ no está correlacionado con las concentraciones iniciales de acetaldehído ($R= -0,20$ $P= 0,53$) ni con la acumulación de acetaldehído normalizado al oxígeno no SO_2 consumido tras la oxidación ($R= 0,16$ $P= 0,62$) o sin tenerlo en cuenta ($R= 0,22$ $P=0,49$).

Si desglosamos por tipos de vinos, nos encontramos con la situación descrita en la **figura 15**.

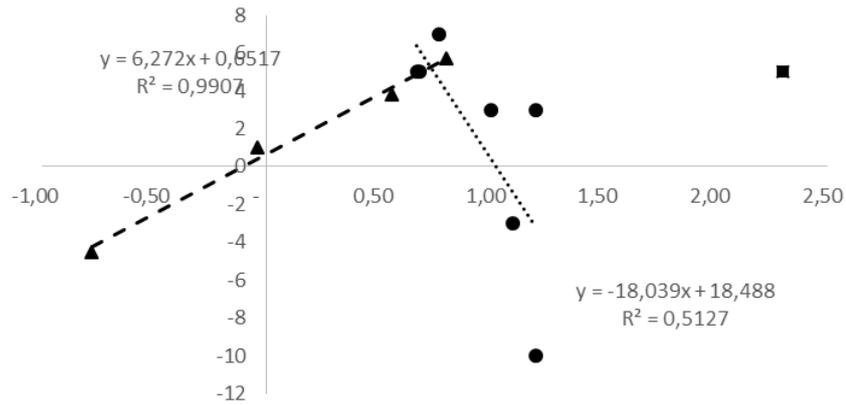


Figura 15. Acetaldehído acumulado oxidación (mg/L) frente al índice de ARPs corregido por el pH del vino. Vinos tintos representados como círculos, vinos blancos y rosados como triángulos.

En ella se aprecia una correlación significativa ($P=0,0047$) en el caso de los vinos blancos y rosados, pero en el sentido opuesto al esperado. Hubiéramos esperado que a mayor índice ARP, menor acetaldehído acumulado. En el caso de los tintos, es preciso eliminar una de las muestras (tinto BG-2018) para ver alguna tendencia, pero muy lejos de llegar a la significatividad.

4. Resumen y conclusiones

En el presente capítulo hemos estudiado la cinética de consumo del acetaldehído buscando unas condiciones en las que pudiéramos evaluar de manera rápida la capacidad diferencial de los vinos para consumirlo. Los ensayos realizados a una temperatura alta mostraron una buena reproducibilidad empleando concentraciones altas de acetaldehído (300 mg/L), pero el consumo de acetaldehído a esa temperatura no es más que una medida alternativa del IPT. A temperaturas intermedias de 45 °C, se observaron cinéticas de consumo bastante erráticas y pobremente correlacionadas con las observadas a temperatura ambiente. A pHs ácidos se obtuvieron mejores resultados, pudiéndose medir de forma más precisa la capacidad diferencial de los vinos para consumir acetaldehído, empleando cantidades muy inferiores (35 mg/L). Aunque los resultados más rápidos y potencialmente más discriminativos se observaron a pH 1, la falta de reproducibilidad lote a lote nos llevó a desarrollar el índice a pH2, si bien eso requirió una semana de duración.

Para evaluar la capacidad de los datos suministrados por dicho índice para explicar la pobre acumulación de acetaldehído observada en los experimentos de oxidación, se realizó un nuevo experimento con 12 vinos, en el que se confirmaron algunas observaciones previas, como son la pobre acumulación de acetaldehído, la existencia de una correlación negativa entre la velocidad de consumo de O₂ y el nivel de acetaldehído previo de las muestras o la correlación positiva entre el acetaldehído acumulado y el O₂noSO₂ consumido por los vinos tintos.

Los resultados del índice mostraron que los vinos rosados no parecen tener capacidad alguna para consumir acetaldehído y que los vinos blancos no consumen más de 8,5 mg/L en una semana a pH 2. Los vinos tintos llegan a consumir entre 10 y 18 mg/L en una semana. Estos datos, teniendo en cuenta la esperada dependencia de la reactividad del acetaldehído con el pH, no pueden justificar que los bajos niveles de acetaldehído acumulados en procesos de oxidación sean debidos a la reacción del acetaldehído con el material fenólico del vino. De hecho, no se encontraron correlaciones significativas entre el acetaldehído acumulado y la capacidad de los vinos de consumir acetaldehído medida con el índice.

Este capítulo permite por tanto concluir que los bajos niveles de acetaldehído acumulados en los procesos de oxidación no se pueden explicar por la reactividad del acetaldehído con el material fenólico del vino.

5. Referencias

1. Bueno, M., et al., *Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation*. *Frontiers in Chemistry*, 2018. **6**.
2. Danilewicz, J.C., *Reactions Involving Iron in Mediating Catechol Oxidation in Model Wine*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2013.
3. Marquez, K., et al., *Production of hydroxyl radicals and their relationship with phenolic compounds in white wines*. *Food Chemistry*, 2019. **271**: p. 80-86.
4. Carrascon, V., et al., *Oxygen Consumption by Red Wines. Part II: Differential Effects on Color and Chemical Composition Caused by Oxygen Taken in Different Sulfur Dioxide-Related Oxidation Contexts*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015. **63**(51): p. 10938-10947.
5. Timberlake, C.F. and P. Bridle, *INTERACTIONS BETWEEN ANTHOCYANINS, PHENOLIC COMPOUNDS, AND ACETALDEHYDE AND THEIR SIGNIFICANCE IN RED WINES*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1976. **27**(3): p. 97-105.
6. Fulcrand, H., et al., *Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography ion spray mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1996. **752**(1-2): p. 85-91.
7. Atanasova, V., et al., *Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making*. *Analytica Chimica Acta*, 2002. **458**(1): p. 15-27.
8. Cano-Lopez, M., et al., *Effect of micro-oxygenation on color and anthocyanin-related compounds of wines with different phenolic contents*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. **56**(14): p. 5932-5941.
9. Castellari, M., et al., *Evolution of phenolic compounds in red winemaking as affected by must oxygenation*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1998. **49**(1): p. 91-94.
10. Carrascon, V., et al., *The kinetics of oxygen and SO₂ consumption by red wines. What do they tell about oxidation mechanisms and about changes in wine composition?* *Food Chemistry*, 2018. **241**: p. 206-214.
11. Han, G.M., et al., *A rapid, one step preparation for measuring selected free plus SO₂-bound wine carbonyls by HPLC-DAD/MS*. *Talanta*, 2015. **134**: p. 596-602.
12. OIV, *OIV-MA-AS323-04A Sulphur dioxide. Compendium of International Methods of Analysis*, 2009.
13. Ribéreau-Gayon, P., et al., *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. New York ed. Vol. 2. 2006, Chichester: John Wiley & Sons.
14. Hernandez-Orte, P., et al., *Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method*. *Chromatographia*, 2003. **58**(1-2): p. 29-35.

15. Grindlay, G., et al., *Evaluation of the multi-element capabilities of collision/reaction cell inductively coupled plasma-mass spectrometry in wine analysis*. *Talanta*, 2014. **128**: p. 379-385.
16. Marrufo-Curtido, A., et al., *A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines and some observations about the influence of wine initial chemical composition*. *Food Chemistry*, 2018. **248**: p. 37-45.
17. Nave, F., et al., *The fate of flavanol-anthocyanin adducts in wines: Study of their putative reaction patterns in the presence of acetaldehyde*. *Food Chemistry*, 2010. **121**(4): p. 1129-1138.
18. Baranowski, E.S. and C.W. Nagel, *KINETICS OF MALVIDIN-3-GLUCOSIDE CONDENSATION IN WINE MODEL SYSTEMS*. *Journal of Food Science*, 1983. **48**(2): p. 419-&.
19. Es-Safi, N.E., et al., *Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerization of flavanols*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. **47**(5): p. 2088-2095.
20. Sheridan, M.K. and R.J. Elias, *Reaction of Acetaldehyde with Wine Flavonoids in the Presence of Sulfur Dioxide*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016. **64**(45): p. 8615-8624.
21. de Azevedo, L.C., et al., *Evaluation of the formation and stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(21): p. 8670-8680.
22. Ferreira, et al., *Oxygen Consumption by Red Wines. Part I: Consumption Rates, Relationship with Chemical Composition, and Role of SO₂*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015. **63**(51): p. 10928-10937.
23. Castejón, O., *Desarrollo, validación e implementación de un procedimiento normalizado para análisis de aldehídos en vino mediante GC-MS*. TFM Universidad de Zaragoza, 2019: p. 1423-1428.
24. Bueno, M., J. Zapata, and V. Ferreira, *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**: p. 33-42.
25. Oliveira, C.M., et al., *Oxidation mechanisms occurring in wines*. *Food Research International*, 2011. **44**(5): p. 1115-1126.
26. 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): p. 319-328.
27. Danilewicz, J.C. and P.J. Wallbridge, *Further Studies on the Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfite in Wine*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2010. **61**(2): p. 166-175.
28. Danilewicz, J.C., *Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2003. **54**(2): p. 73-85.

29. Waterhouse, A.L., G.L. Sacks, and D.W. Jeffery, *Understanding Wine Chemistry*. Understanding Wine Chemistry 2016, Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 1-443.
30. Jackowetz, J.N. and R.M. de Orduna, *Survey of SO₂ binding carbonyls in 237 red and white table wines*. Food Control, 2013. **32**(2): p. 687-692.
31. Elias, R.J., et al., *Identification of Free Radical Intermediates in Oxidized Wine Using Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(10): p. 4359-4365.

CAPÍTULO VI

Estudios acerca de la cinética del consumo de acetaldehído por vinos y fracciones fenólicas extraídas de mistelas almacenadas en anoxia (FFAs)

CAPÍTULO VI

Estudios acerca de la cinética del consumo de acetaldehído por vinos y fracciones fenólicas extraídas de mistelas almacenadas en anoxia (FFAs)

1. Introducción

Como se ha detallado en el capítulo anterior, los resultados ni respaldan la existencia de una categoría bien definida de polifenoles reactivos con aldehídos (ARPs), ni hemos encontrado que los vinos tengan capacidades de consumo de acetaldehído consistentes con las asunciones previamente presentadas por los modelos incluidos en el **capítulo 2**.

Así el objetivo del presente trabajo es caracterizar la cinética de consumo de acetaldehído en los vinos, para ello nos serviremos de fracciones fenólicas extraídas directamente de las uvas (FFAs), éstas al estar exentas de los principales nucleófilos de los vinos (sulfuroso y tioles principalmente) y no haber tenido contacto anterior con el acetaldehído nos facilitarán el estudio de la reactividad del acetaldehído.

2. Materiales y métodos

2.1. Consumo de acetaldehído en anoxia por fracciones fenólicas extraídas de mistelas (FFAs)

Las fracciones etanólicas de FFAs (fracciones fenólicas y aromáticas extraídas de uva) fueron obtenidas en nuestro laboratorio en cartuchos C18 siguiendo la metodología descrita por [1]. Estas FFAs están exentas de sulfuroso y acetaldehído.

La preparación de las muestras se basó en reconstituir matrices sintéticas que contuvieran: 5 g/L de ácido tartárico, 5 g/L de glicerina y ajustados a pH 3,5. El contenido de alcohol lo proporcionó la misma FFA y ésta se añadió al 13.3%. Después se hicieron dos ensayos con FFAs: en el primero se usó la FFA pT2 que se dopó con 25 y 60 mg/L de acetaldehído; en el segundo ensayo se usaron 3 FFAs (pT1, pT2 y vG3) que se doparon cada una con diferentes concentraciones de acetaldehído 15, 25, 35, 50, 75, 90 y 120 mg/L.

Los ensayos se prepararon dentro de la cámara de anoxia de la marca Jacomex (Francia) y por duplicado (dos viales independientes para cada concentración de dopaje de acetaldehído elegida). Una vez cerrados se sacaron de la cámara de anoxia y se sellaron con silicona caliente. La temperatura de incubación fue 35 °C en anoxia estricta. Se analizó el acetaldehído total de cada vial por HPLC siguiendo la metodología de Han y col, [2] en el

momento inicial (FFA sin dopar) en los dos experimentos y después cada ensayo tuvo un seguimiento diferente:

- a) Ensayo uno: 0, 3, 6, 10, 13, 18, 21, 28, 49,68 y 81 días
- b) Ensayo dos: cada 10 días durante un mes.

En estos experimentos se usaron un total 3 FFAs y la codificación de las mismas consta de tres caracteres. La primera letra se refiere a la fecha de toma de muestra: pre vendimia (p) momento en el cual las uvas están inmaduras y éstas se cortaron una semana antes a la fecha de vendimia y vendimia (v) donde las uvas están en su momento óptimo de maduración. La segunda letra está referida a la variedad de uva y puede ser T: Tempranillo o G: Garnacha. Por último, se coloca un número que indica la procedencia de las uvas y puede ser: 1- Bodega Dominio de Pingus de la DO Ribera del Duero; 2- Bodegas Ramón Bilbao de la Denominación de Origen (DO) Somontano; y 3- Bodegas Ilurce de la DO Rioja. Las FFAs usadas en el presente estudio son pT1, pT2 y vG3.

2.2. Consumo de acetaldehído en anoxia por vinos dopados

A un set de 8 vinos tintos españoles se les analizó el contenido de sulfuroso libre por Rankine [3] y acetaldehído total por HPLC [2] y se identificó el vino con mayor concentración de acetaldehído inicial (38 mg/L). El resto de los vinos se ajustaron hasta esta concentración dopándolos con acetaldehído en anoxia. Se incuban en condiciones diferentes y en anoxia: a) 36 días a 25 grados y b) 5 días a 45 grados*. Al finalizar cada incubación se determinó la concentración de acetaldehído total por HPLC [2].

*Las condiciones de incubación reproducen la temperatura y el tiempo necesario para consumir 35 mg/L de oxígeno no SO₂ [4] para el mismo set de vinos equivalente comprados en el año 2015.

2.3. Consumo de acetaldehído en vinos en situación de equilibrio

Los vinos usados en este experimento fueron todos comerciales. 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.

Se abren las botellas y se determina pH por potenciometría y acetaldehído total por HPLC [2]. Después las 12 botellas se conservaron a 21 °C, bajo atmósfera inerte de argón y con un corcho de Nomacorc Select 300 CP (de permeabilidad controlada -1,6 mg de O₂ por botella

después de 3 meses-). Este procedimiento de conservación ha sido empleado anteriormente en el laboratorio y se ha descrito que la entrada de oxígeno es no significativa [4]. Tras 112 días se analizó el acetaldehído total por HPLC [2] y el sulfuroso total por Rankine [3].

3. Resultados y discusión

3.1. Consumo de acetaldehído en anoxia por fracciones fenólicas extraídas de mistelas (FFAs)

Las FFAs son extractos de material fenólico extraídos directamente de las uvas [1] cuyo interés es que ni han tenido contacto previo con acetaldehído ni contienen SO₂. Esto se debe al proceso de obtención de las mismas, que se basa en macerar uvas en etanol evitando el contacto con el oxígeno. No tienen lugar por tanto ni los procesos fermentativos donde sabemos que se forma acetaldehído como compuesto previo a la formación del etanol [5-7], ni procesos oxidativos en los que se pueda oxidar etanol, aparte de los que hayan podido producirse de manera marginal durante el almacenamiento de las mismas. Por ello pensamos que son un medio de gran interés para estudiar la reactividad del acetaldehído con los polifenoles. Las FFAs, están además exentas de cationes de metales de transición, de aminoácidos y tampoco contienen tioles, sulfhídrico o glutatión, que son especies que podrían interactuar en mayor o menor medida con el acetaldehído. El acetaldehído también puede interactuar con la glicerina que tiene la muestra añadida (5 g/L), pero la constante de equilibrio es de tres órdenes de magnitud menor que si consideramos la formación de puentes de etilo [8]. Por tanto, parece razonable pensar que es un medio en el que el acetaldehído va a estar principalmente a disposición de los polifenoles y que, puesto que estos no han tenido contacto previo con aquél, marcarán un máximo en términos de reactividad con el acetaldehído, de manera que esperamos que las velocidades de reacción registradas sean claramente superiores a las de los vinos.

Los resultados del primer ensayo se representan en la **figura 1** que se muestra a continuación.

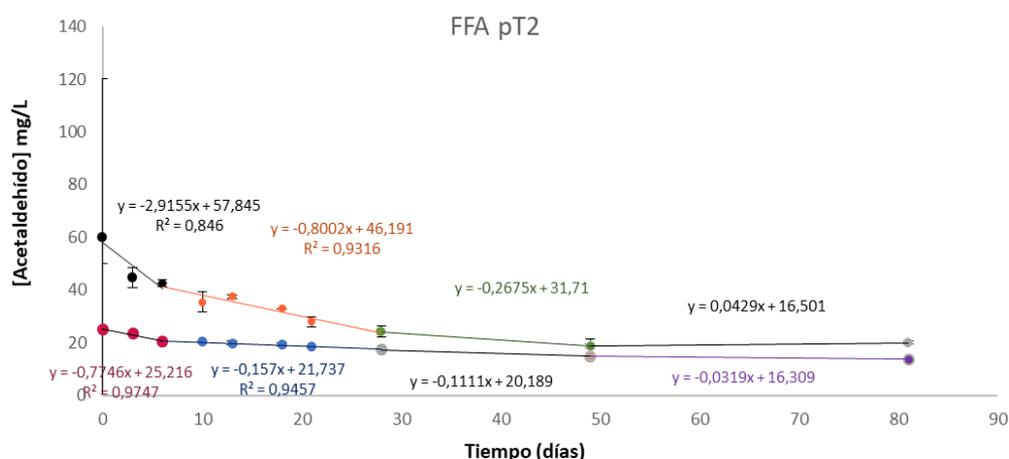


Figura 1. Evolución de acetaldehído a 35 °C, cuando se dopa con 25 y 60 mg/L de acetaldehído la FFA pT2. Las barras de error en cada punto representan el error como s/\sqrt{n} .

Como puede apreciarse en la **figura 1** el orden aparente de la reacción es mayor de la unidad. Sólo así se puede explicar cómo al pasar de 25 a 60 mg/L (factor 2,4) la velocidad de reacción en el primer tramo se multiplica casi por un factor 4 y en el segundo tramo lo hace por un factor 6 a pesar de que las diferencias de concentración al comienzo del tramo son tan solo de un factor 2. En el tramo 3 las diferencias de concentración son inferiores a un factor 1,4 y las velocidades difieren por un factor 2, y finalmente, en el último tramo las diferencias de concentración se mantienen en un 20-25% pero mientras en el reconstituido dopado inicialmente con 60 mg/L ya no hay más consumo, en el dopado inicialmente con 25 se mantiene un consumo muy pequeño.

Comparando entre tramos, y teniendo en cuenta que se trata de la misma FFA, puede observarse que las velocidades de reacción parecen depender fuertemente de la historia previa del extracto polifenólico. Esto se puede ver claramente al comparar el primer tramo de oxidación cuando la FFA se dopó con 25 mg/L, con el tercer tramo del dopaje inicial a 60 mg/L. La concentración de acetaldehído al comienzo del tramo en ambos casos es aproximadamente la misma, pero en el primero (primer contacto con acetaldehído) la velocidad de consumo es de 0,77 mg/L por día, sin embargo, en el segundo, el mismo extracto con la misma concentración reduce su velocidad de consumo hasta 0,27 mg/L por día cuando ha consumido previamente 35 mg/L de acetaldehído. Lo mismo cabe observar comparando el último tramo del dopado a 60 con el segundo tramo del dopado a 25. A los 81 días de incubación las dos curvas parecen converger casi igualando su concentración de acetaldehído, en lo que parece ser un nivel basal.

En el segundo ensayo de FFAs se midió la cinética de consumo de acetaldehído en tres FFAs reconstituidas pT1, pT2 y vG3. Al igual que en el caso anterior se representa en la **figura 2** la concentración de acetaldehído de la muestra con respecto al tiempo.

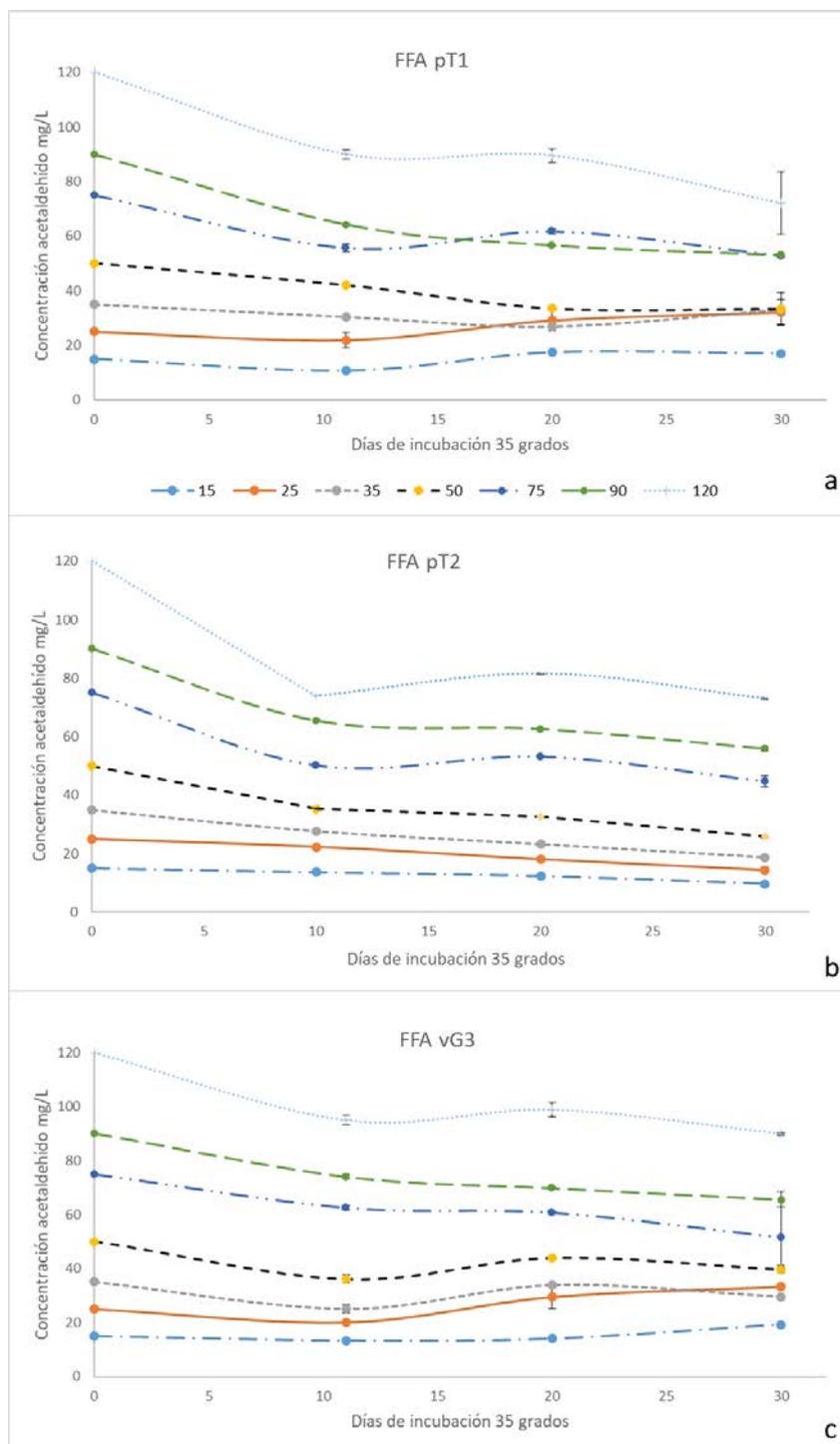


Figura 2. Evolución de acetaldehído a 35 °C, cuando se dopa con 7 niveles de acetaldehído 3 FFAs: 2a (FFA pT1), 2b (pT2) y 2c (vG3). Las barras de error en cada punto representan el error como s/\sqrt{n} .

Los resultados muestran que en algunas de las FFAs la reacción parece ser bastante imprecisa, de manera que llegan a cruzarse las líneas representando concentración frente a tiempo (**figura 2**) de distintos niveles de adición inicial. Puede apreciarse en las **figuras 2a, 2b y 2c**, que la cinética en algunos casos se vuelve un tanto compleja con el tiempo. Esto se ve particularmente claro en el caso de la FFApT1 (**figura 2a**) en la que sólo en el punto inicial y en el de los 10 días los puntos mantienen el orden de concentración inicial. En el día 20 y en el 30, sin embargo, ya no mantienen el orden porque en tres de las series (dopados con 15, 25 y 75 mg/L) los niveles de acetaldehído encontrados tras 20 días de incubación son superiores (aunque de manera significativa sólo en el dopado con 15 mg/L $p(t) = 0,004$ y el dopado con 75 mg/L $p(t) = 0,039$) a los medidos a 10 días. No parece ser una cuestión de simple imprecisión, ya que la tendencia se confirma en el punto de 30 días -y eso que se trataba en todos los casos de viales independientes-, en el que los contenidos de acetaldehído de los reconstituidos conteniendo inicialmente 25, 35 y 50 mg/L de acetaldehído se igualaron, al igual que hicieron los que contuvieron 75 y 90 mg/L. Este patrón parece ser dependiente de la FFA, en la **figura 2b** no se observa, mientras que en la mostrada en la **figura 2c** solo se observa en el último punto para los reconstituidos conteniendo inicialmente 25 y 35 mg/L de acetaldehído, que intercambian posiciones, en ésta última se igualan a los 30 días las curvas para 50, 75 y 90 mg/L de acetaldehído.

Estudiando el consumo de acetaldehído en el primer tramo de 10 días (**Tabla 1**), vemos que el consumo de acetaldehído es discreto en los niveles más bajos de dopaje y es necesario añadir entre 35 y 50 mg/L de acetaldehído para que se consuman unos 10 mg/L en 10 días. Aunque en algunos niveles se obtienen diferencias significativas entre las FFAs (p valores en la **tabla 1**) nunca se consiguen 3 grupos independientes (letras en superíndice Test Duncan $p = 0,05$).

Acetaldehído dopado mg/L	FFA pT1		FFA pT2		FFA vG3		p
	Acetaldehído consumido mg/L 10 días	s	Acetaldehído consumido mg/L 10 días	s	Acetaldehído consumido mg/L 10 días	s	
15	4,35 ^a	0,74	1,39 ^b	0,13	1,62 ^b	0,33	0,01
25	3,07 ^a	3,94	2,67 ^a	0,46	4,86 ^a	0,72	0,64
35	4,67 ^a	0,75	7,28 ^a	0,39	9,99 ^a	2,29	0,07
50	8,03 ^b	0,89	14,6 ^a	0,67	13,9 ^a	2,22	0,02
75	19,3 ^a	2,33	24,8 ^a	1,10	12,5 ^b	1,56	0,01
90	25,8 ^a	1,14	24,6 ^a	1,81	16,0 ^b	1,40	0,00
120	30,0 ^b	4,57	46,1 ^a	2,82	25,1 ^b	4,58	0,00

Tabla 1. Acetaldehído consumido en los primeros 10 días para las 3 muestras del experimento. P valor resultado del test Anova ($\alpha=0.05$). Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre FFAs para un mismo nivel de dopado (Test Duncan $p = 0,05$).

De manera general la FFA vG3 es la menos consumidora en todos los niveles exceptuando el dopaje con 50 mg/L donde dicho consumo se iguala al mostrado por la FFA pT2. No se puede concluir que esa tendencia en el consumo sea debida a la variedad (garnacha) o al

tiempo de muestreo (*v*: vendimia) debido al limitado número de muestras, siendo necesario ampliar el estudio a más FFAs si se quiere indagar en este punto.

En este experimento se han determinado las constantes y órdenes de reacción en cada tramo de 10 días, ajustando los datos a modelos potenciales representando la velocidad de consumo de oxígeno (mg/L/día) frente a la concentración de dopaje. En la **figura 3** se muestra dicho ajuste en el primer tramo. Para poder comparar entre muestras se han obtenido gráficamente las incertidumbres de las constantes y exponentes, representando log de velocidad frente al logaritmo de concentración (datos expuestos en la **tabla 2 y 3**).

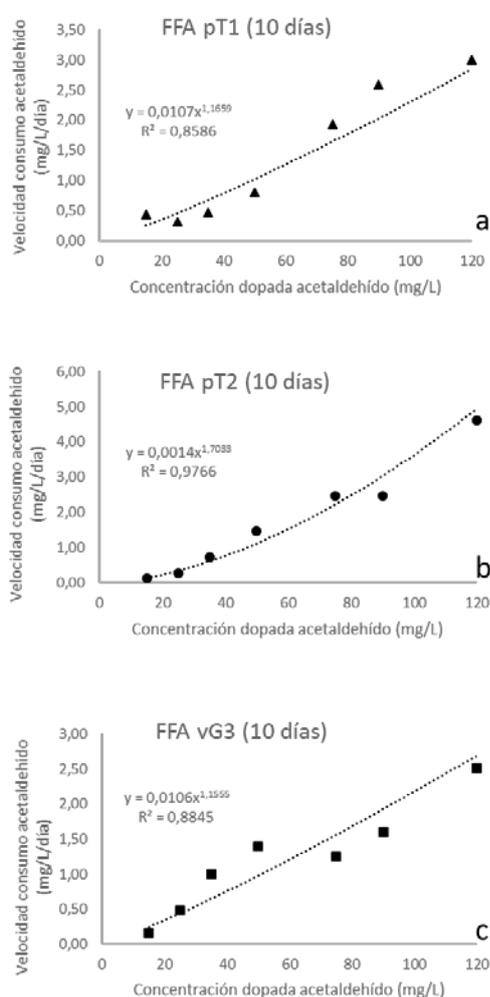


Figura 3. Velocidad de consumo de acetaldehído en los primeros 10 días frente la concentración de dopado (3a FFA pT1, 3b FFA pT2 y 3c FFA vG3).

	10 días					20 días					30 días				
	K	s	n	s	R ²	K	s	n	s	R ²	K	s	n	s	R ²
pT1	0.011	0.212	1.166	0.360	0.859	0.044	0.345	0.853	0.635	0.817	0.001	0.581	1.886	1.069	0.854
pT2	0.001	0.118	1.703	0.201	0.976	0.007	0.101	1.205	0.172	0.966	0.014	0.068	1.004	0.116	0.978
vG3	0.011	0.187	1.156	0.318	0.854	0.000	0.323	1.782	0.564	0.884	0.010	0.198	1.106	0.365	0.895
Varianza dentro de grupos	0.064		0.184			0.154		0.482			0.156		0.527		
Varianza entre grupos	0.000		0.098			0.001		0.220			0.000		0.233		
F _{exp}	0.000		0.532			0.004		0.457			0.000		0.441		
F _{crítica}	3.682		3.682			3.682		3.682			3.682		3.682		

Tabla 2. Constantes de reacción (K) y orden de reacción (n) obtenidas gráficamente ajustando los datos a modelos potenciales, incertidumbres calculadas gráficamente representando logaritmo de velocidad frente al logaritmo de la concentración. Parámetros estadísticos Varianza dentro de grupos (dg)= 1/3 x (Sn₁² + Sn₂² + Sn₃²). Varianza entre grupos (eg) = Varianza (n₁; n₂; n₃). F_{exp} = Varianza eg/ Varianza dg.

	pT1				pT2				vG3			
	K	s	n	s	K	s	n	s	K	s	n	s
10 días	0.011	0.212	1.166	0.360	0.001	0.118	1.703	0.201	0.011	0.187	1.156	0.318
20 días	0.044	0.345	0.853	0.635	0.007	0.101	1.205	0.172	0.000	0.323	1.782	0.564
30 días	0.001	0.581	1.886	1.069	0.014	0.068	1.004	0.116	0.010	0.198	1.106	0.365
Varianza dentro de grupos	0.472		1.589		0.019		0.056		0.155		0.484	
Varianza entre grupos	0.001		0.281		0.000		0.130		0.000		0.142	
F _{exp}	0.001		0.177		0.002		2.294		0.000		0.293	
F _{crítica}	3.682		3.682		3.682		3.682		3.682		3.682	

Tabla 3. Comparación dentro de FFAs. Constantes de reacción (K) y orden de reacción (n) obtenidas gráficamente ajustando los datos a modelos potenciales, incertidumbres calculadas gráficamente representando logaritmo de velocidad frente al logaritmo de la concentración. Parámetros estadísticos Varianza dentro de grupos (dg)= 1/3 x (Sn₁² + Sn₂² + Sn₃²). Varianza entre grupos (eg) = Varianza (n₁; n₂; n₃). F_{exp} = Varianza eg/ Varianza dg.

Tal y como vemos en la **figura 3** y en la **tabla 2**, la muestra que mejor se ajusta al modelo potencial es la FFA pT2 (R^2 entre 0.966-0.978). Este resultado era previsible porque para las otras dos muestras se encontró una parada de consumo después de los primeros 10 días.

No se han obtenido diferencias significativas en cuanto a la constante u orden de reacción entre las FFAs (**tabla 2**). Tampoco se obtienen al comparar los mismos datos en cada uno de los tramos, dentro de cada FFA (**tabla 3**). Estos resultados confirman que el consumo de acetaldehído no depende de la composición química de la muestra, y tampoco responde exclusivamente a la concentración de acetaldehído presente (ya que sólo para la muestra pT2 el orden de reacción va disminuyendo en el tiempo-sin llegar a ser significativo- ver la **tabla 3**).

Tomados en conjunto los dos ensayos con FFAs, parece que en todos los casos se llega a una concentración de equilibrio de acetaldehído en la que parece no consumirse más. Y no es que se haya agotado la capacidad de consumo de los polifenoles, ya que, si se aumenta la concentración de acetaldehído, vuelve a producirse consumo, inferior al observado anteriormente para concentración equivalente, pero no nulo. Esta concentración de equilibrio parece depender de muchas cosas como para ser predecible. Depende de la FFA de partida, como se puede apreciar en la **figura 2**, y depende de la historia de consumo de acetaldehído de la FFA, como hemos visto en la **figura 1**. Las razones por las que aparece esta concentración de equilibrio no están en absoluto claras, máxime teniendo en cuenta que en nuestro caso no hay SO_2 que pueda justificar la estabilización del acetaldehído por formación de hidroxietilsulfonato. Podría pensarse que se debe a la estabilización por otro tipo de acomplejantes, que forman asociaciones menos fuertes, pero que estén presentes en concentraciones mayores que el sulfuroso [9], un buen ejemplo sería la formación de enlaces lábiles con polifenoles (que están presentes en 2-3 g/L).

Estas observaciones podrían ser consistentes con las encontrados por Peterson y col., que tras oxidar muestras de vino sintético con catequina, glutatión y glicerol, observaron una fracción significativa remanente de acetaldehído sin reaccionar en los tres casos. Estos autores concluyen que el acetaldehído formado en procesos de oxidación no es consumido completamente por ningún nucleófilo presente en el vino (a excepción del sulfuroso libre) [8].

En un estudio muy reciente, Han y col, observa que, tras un año entero de envejecimiento, los niveles de acetaldehído sólo descienden un 40%, independientemente de la concentración de partida, y atribuye de manera tentativa dicho sorprendentemente bajo descenso a la formación de complejos con alcoholes, flavonoides y tioles. Dichos complejos

serían lo suficientemente débiles como para ser destruidos por la reacción de la hidracina - al igual que lo son los del SO₂ [9], de manera que el acetaldehído incluido en ellos formaría parte del acetaldehído total, y lo suficientemente fuertes como para que la concentración efectiva de acetaldehído libre capaz de reaccionar con los polifenoles sea muy pequeña. De acuerdo con los citados autores, esta baja concentración de acetaldehído libre, unida al “agotamiento de antocianos” tras un año de envejecimiento, explicaría el bajo consumo.

Al estar trabajando con FFAs conocemos perfectamente la composición química de las muestras. Las 3 FFAs presentan la misma concentración de etanol y glicerina, por lo que la formación de hemiacetales y dioxanos [8] sería previsiblemente similar. Al no tener presente ningún otro nucleófilo reactivo con el acetaldehído (principales son el sulfuroso y tioles), nuestros resultados sugieren que el acetaldehído tiene que estar formando estos complejos lábiles con el material polifenólico. Actualmente se desconoce la estabilidad o la cinética con la que se forman esas estructuras, cobrando especial importancia la determinación de acetaldehído libre para evaluar si la pérdida de reactividad del acetaldehído se debe a la formación de estos complejos.

Es de resaltar, que aunque hemos conseguido encontrar diferente reactividad, la FFA más activa pT2 alcanza un consumo de tan solo 0,9 mg/L por día (18mg/L en 20 días), y eso cuando está dopada con una concentración inicial de acetaldehído de 35 mg/L y a 35 °C. Con estos datos cinéticos es difícil pensar que los vinos, que tendrán un material polifenólico mucho menos reactivo con el acetaldehído que las FFAs de las uvas, puedan llegar a consumir 45 mg/L de acetaldehído en un mes, con niveles de acetaldehído total inferiores en cualquier caso a 20 mg/L [10].

3.2. Consumo de acetaldehído en vinos dopados

En este experimento se parte de un set de 8 vinos tintos que se han corregido hasta un mismo nivel de acetaldehído total (38 mg/L) al inicio. Los datos de acetaldehído nativo, añadido, hallado y consumido en el experimento se dan en la **tabla 4**.

	SO ₂ libre mg/L	Acetaldehído Inicial (mg/L)			Acetaldehído (mg/L) Tras 36 días a 25°C		Acetaldehído (mg/L) Tras 5 días a 45°C	
		Nativo	Añadido	Libre en exceso	Hallado	Consumido	Hallado	Consumido
SL	9,60	29,4	8,60	2,00	22,2	15,8±0,8	36,7	1,30±1,0
TS	7,20	19,6	18,4	13,5	22,6	15,4±0,4	38,6	-0,60±0,4
BL	8,80	19,9	18,1	12,1	21,6	16,4±0,4	43,4	-5,40±0,8
CH	22,4	37,7	0,30	0,00	29,8	8,20±0,6	38,4	-0,40±0,6
MF	2,40	6,80	31,2	29,6	9,60	28,4±1,6	33,7	4,30±0,5
TP	7,20	11,1	26,9	22,0	22,7	15,3±1,1	39,0	-1,00±1,7
HV	17,6	8,22	29,8	17,7	23,5	14,5±0,7	34,1	3,90±0,4
BS	24,0	10,2	27,8	11,3	26,1	11,9±0,3	36,5	1,50±0,4

Tabla 4. Sulfuroso libre inicial (mg/L). Condiciones iniciales: Acetaldehído nativo (mg/L), añadido

(mg/L) y libre en exceso (mg/L) calculado con la constante de disociación de Azevedo [11]. Datos tras las respectivas incubaciones: Acetaldehído hallado (mg/L) y el consumido (mg/L) respecto a los 38 mg/L iniciales.

Puede apreciarse que a 45 °C consumieron cantidades prácticamente nulas de acetaldehído. De hecho, sólo en dos de los vinos el consumo fue superior a 1,5 mg/L (MF y HV). No se observó precipitación en ninguno de los vinos a 45 grados en anoxia que pudiera justificar esta falta de reacción. Aunque la muestra que más acetaldehído consumió es la que tenía mayores niveles de acetaldehído libre, no es posible establecer ninguna correlación inteligible entre ninguno de los parámetros de la tabla y la cantidad de acetaldehído consumido a 45 °C, dados los bajos niveles de consumo.

Por el contrario, a 25 °C todos los vinos consumieron entre 8 y 28 mg/L de acetaldehído. Lo sorprendente del experimento es la increíble homogeneidad en los niveles finales de acetaldehído tras la incubación y su relación con los niveles de SO₂ libre inicial de las muestras, tal y como se muestra en la **figura 4**. Puesto que todos los vinos contuvieron el mismo nivel inicial de acetaldehído, exactamente la misma relación, pero al revés, existe entre el acetaldehído consumido y el SO₂ libre inicial.

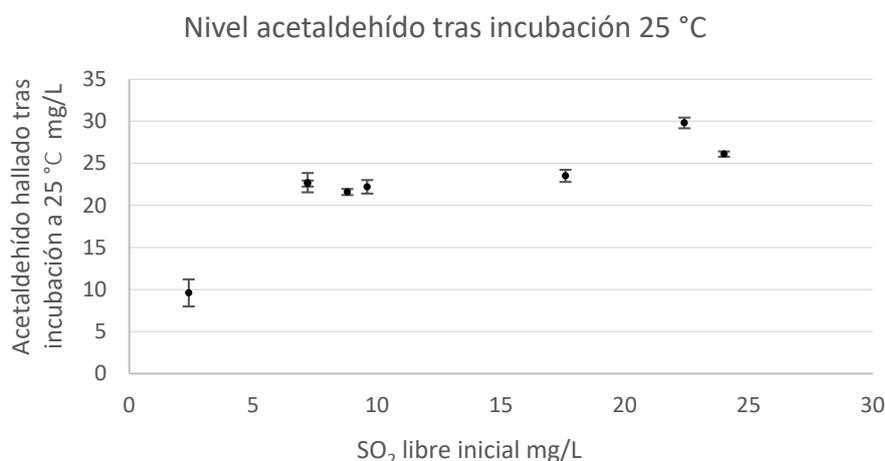


Figura 4. Acetaldehído hallado en la incubación (mg/L) a 25 °C frente el sulfuroso libre inicial (mg/L).

Como puede apreciarse en la **figura 4**, 5 de los vinos (hay dos puntos superpuestos a 7,2 mg/L de SO₂), se quedaron en niveles de acetaldehído de $22,5 \pm 1,4$ mg/L ($1,4=2 \times 0,7$; donde 0,7 es la desviación estándar de las 5 medidas). Todos ellos contuvieron cantidades de SO₂ libre inicial entre 7 y 17,6 mg/L. Sólo los dos vinos con cantidades iniciales de SO₂ libre superiores a 20 mg/L se quedaron con niveles de acetaldehído superiores a 25 mg/L, y sólo la muestra que prácticamente no contenía SO₂ libre inicial, se quedó con un nivel de acetaldehído inferior a 10 mg/L. Es igualmente llamativa la relación entre el consumo de

acetaldehído entre vinos y el nivel de acetaldehído libre en exceso, tal y como se aprecia en la **figura 5**.

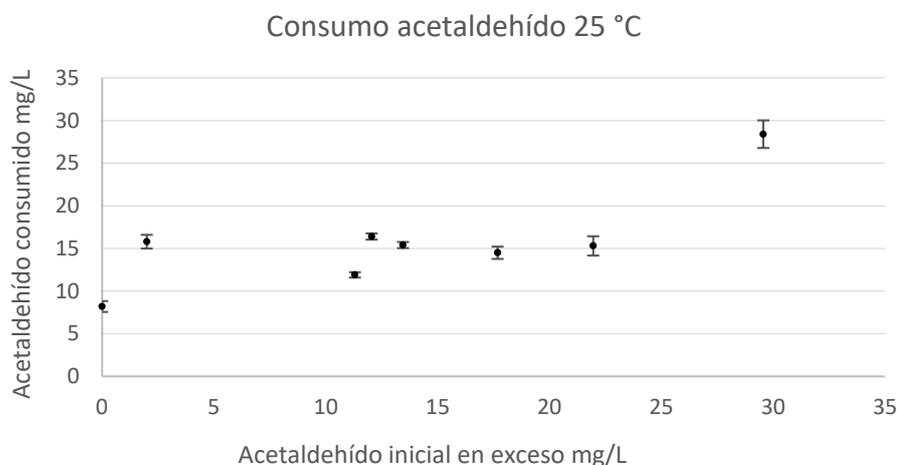


Figura 5. Acetaldehído consumido en la incubación a 25 °C (mg/L) frente Acetaldehído inicial en exceso (mg/L).

La **figura 5** muestra que el consumo de acetaldehído durante los 36 días ha sido prácticamente constante para todos los vinos, e independiente del nivel de acetaldehído libre que contara el vino, con la excepción de los que contenían niveles extremos de acetaldehído libre en exceso, por arriba o por abajo. El único punto que se aparta de la tendencia general, corresponde al vino BS que con 11,3 mg/L de acetaldehído en exceso, contenía la máxima cantidad de SO₂ libre (24 mg/L), lo que justifica un consumo algo inferior. Dejando de lado esta muestra, y las dos de los extremos, el consumo promedio de acetaldehído durante 36 días fue de $15,5 \pm 1,4$ mg/L.

Es particularmente remarcable que, incluso la muestra que no dispuso de acetaldehído en exceso (CH), consumió una cantidad menor pero relevante de acetaldehído (8,2 mg/L). En esta muestra la concentración de acetaldehído libre es exclusivamente la correspondiente al equilibrio, que con un contenido de 22,4 mg/L de SO₂ libre estará por debajo de 100 μM. La muestra con el segundo menor contenido de acetaldehído en exceso (SL, con 2 mg/L), tuvo una concentración de acetaldehído libre inicial 49 μM y ya consume 15,8 mg/L. Por tanto, los datos de este experimento sugieren que los vinos tintos consumen una cantidad “fija” de 13,2 mg/L de acetaldehído al mes (de 30 días) (**0,44 mg/L/día**), salvo que:

1. La concentración de SO₂ libre supere los 20 mg/L, en cuyo caso consumirá algo menos.

2. No haya más acetaldehído libre que el que se vaya liberando de los aductos con el sulfuroso en equilibrio ($K_a = 485 \cdot 10^3$) [11] u otras reservas*, en cuyo caso consumirá la mitad. **(0,22 mg/L/día)**.

*Recientemente se ha determinado por análisis de RMN que sólo una porción del acetaldehído total presente está en su estado libre y activo en el vino. El acetaldehído hidratado ($K_{eq} = 1,15 \pm 0,04$) y el etil hemiacetal ($K_{eq} = 0,412 \pm 0,009$) actúan como reservas de acetaldehído y alimentan inmediatamente la forma libre conforme ésta se consume por otras reacciones [8].

3. El contenido de acetaldehído libre en exceso supere los 25 mg/L, en cuyo caso consumirá más. En nuestro caso, para un nivel en exceso de 29,6 mg/L se alcanza un consumo de 28,4 mg/L que hacen un consumo de **0,79 mg/L/día**, dato que es consistente con el consumo máximo encontrado en FFAs incubadas bajo las mismas condiciones.

Estos resultados sugieren de nuevo la existencia de una especie de “concentración de equilibrio” de acetaldehído, levemente perturbada por niveles máximos o mínimos de SO_2 libre, o de una tendencia a consumir a la misma velocidad el acetaldehído, independientemente de la cantidad del mismo presente, y por tanto todo ello independiente de la composición polifenólica y estructura del vino. El acetaldehído y el material fenólico van reaccionando de manera lenta, constante e independiente de la composición fenólica del vino, siguiendo una cinética que se puede ver muy alterada y tornar errática a concentraciones altas de acetaldehído o a altas temperaturas. La falta de consumo a 45 °C observada en este experimento es un ejemplo de esto. Es muy llamativo que la muestra que más consume (MF), que disponía inicialmente de casi 30 mg/L de acetaldehído libre sólo consuma 4,3 mg/L de acetaldehído en el mismo periodo en el que el vino consumió más de 30 mg/L de O_2 (datos en **capítulo 2**). Dado que como vimos en el **capítulo 2**, dicho vino no acumuló prácticamente nada de acetaldehído a ninguna de las temperaturas, es obvio que los datos sugieren que hay un problema mayor con el balance de la oxidación. Este aspecto será vuelto a tratar en el capítulo siguiente.

3.3. Consumo de acetaldehído en vinos en situación de equilibrio

3.3.1. Consumo y relaciones básicas

Se trata de los mismos 12 vinos del experimento del **capítulo 3**. Muestras de los vinos originales, sin adición de acetaldehído ni de ningún otro producto, fueron conservados durante 112 días en botellas cerradas con cierres totalmente herméticos y bajo atmósfera de argón. Se trata por tanto de vinos “normales” en los cuales hay ya un equilibrio previo acetaldehído-sulfuroso, de manera que la concentración de acetaldehído libre tiene que ser

muy pequeña y corresponder con la derivada de la ecuación del equilibrio acetaldehído-sulfuroso. Puede por tanto asumirse que la mayor parte del acetaldehído presente en el vino está formando hidroxietilsulfonatos. En el experimento, simplemente se midieron el acetaldehído y el SO₂ antes y después del envejecimiento. Los resultados se muestran en la **tabla 5**.

		SO ₂ total inicial (mg/L)	SO ₂ total tras 112 días (mg/L)	pH	CH ₃ CHO inicial (mg/L)	s	CH ₃ CHO final (mg/L)	s	CH ₃ CHO consumido (mg/L)	CH ₃ CHO consumido (%)	Velocidad consumo (mg/L/día)	s
Vinos Tintos Envejecidos	CV-2008	64,8	62,8	3,5	27,9	0,9	18,8	2,0	9,10	32,6%	0,08	2,00E-02
	DM-2012	20,0	19,2	3,8	8,76	0,4	5,64	0,1	3,10	35,6%	0,03	4,00E-03
	CL-2013	81,0	87,2	3,7	20,6	2,1	13,2	0,0	7,40	35,9%	0,07	1,90E-02
	VF-2015	124	117	3,5	53,8	0,5	31,2	4,3	22,6	42,0%	0,20	3,80E-02
Vinos tintos jóvenes	MT-2018	57,0	49,6	3,8	13,7	0,0	7,19	1,7	6,51	47,5%	0,06	1,50E-02
	FP-2018	52,0	51,6	3,6	20,1	0,5	9,55	0,9	10,5	52,5%	0,09	9,20E-03
	BG-2018	37,0	32,8	3,5	7,32	0,3	2,99	0,5	4,33	59,2%	0,04	5,10E-03
	RB-2018	96,0	74,0	3,4	20,7	1,2	6,70	0,2	14,0	67,6%	0,12	1,10E-02
Vinos Rosados	VMG-2018	86,0	81,6	3,3	26,0	1,1	9,11	1,7	16,9	65,0%	0,15	1,80E-02
	GF-2018	78,0	63,2	3,2	30,5	0,3	10,6	1,7	19,9	65,2%	0,18	1,50E-02
Vinos Blancos	VT-2018	115	103	3,2	51,3	1,9	19,4	4,5	31,9	62,2%	0,28	4,40E-02
	VM-2018	97,0	61,3	3,3	22,2	0,0	10,1	0,1	12,1	54,5%	0,11	8,60E-04

Tabla 5. Caracterización de las muestras al inicio y final (tras 112 días): sulfuroso total inicio y final (mg/L). Acetaldehído total inicio y final (mg/L). Acetaldehído total consumido (mg/L). % Acetaldehído total consumido. Velocidad de consumo de acetaldehído en 112 días (mg/L/día).

Como puede verse, la concentración de sulfuroso apenas varió salvo en tres casos (RB-2018, VM-2018 y GF-2018) en que lo hizo en pequeña cantidad, lo que confirma que los vinos estuvieron al abrigo del aire y que las variaciones en las concentraciones de acetaldehído podemos atribuir las enteramente a las reacciones con los polifenoles presentes. En lo que respecta a los datos de los vinos iniciales, es importante resaltar la existencia de dos correlaciones significativas. Una es entre el acetaldehído total y el SO₂ total del vino, como se puede ver en la **figura 6**.

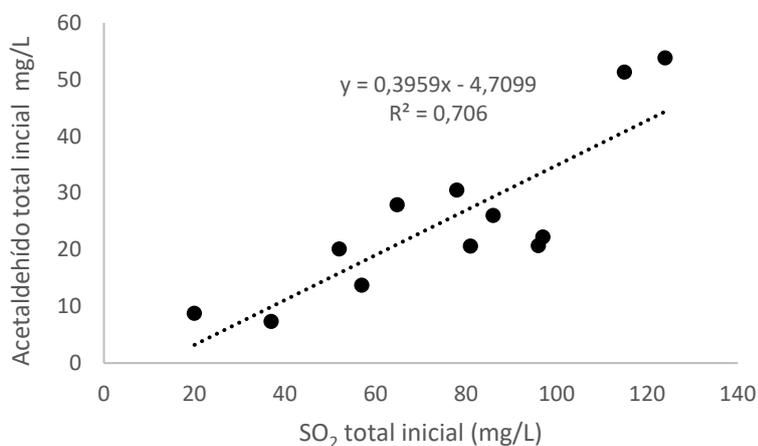


Figura 5. Acetaldehído total inicial C (mg/L) frente sulfuroso total inicial (mg/L).

La correlación es significativa con $P < 0,001$ y es una correlación esperada, indicando que, esencialmente, casi todo el acetaldehído se encuentra formando hidroxietilsulfonatos con el SO_2 , dado que el SO_2 está en exceso molar en un factor entre 1,5 y 3. Puede estimarse que el acetaldehído constituye entre el 24 y el 68% del sulfuroso combinado, con una media de 44,5% [12]. La otra correlación, menos intensa, es la que existe entre el SO_2 total y el pH ($R=0,615$, significativa con $P=0,033$). Se trata de una correlación negativa que indica que a más pH menor cantidad de SO_2 total. No tiene mayor importancia, pero su existencia ha de ser tenida luego en cuenta al interpretar la desaparición de acetaldehído.

La concentración de acetaldehído disminuyó de manera significativa y relevante en todos los vinos (se ha realizado un test de comparación de medias (t de Student), obteniéndose p valores entre $3,22 \cdot 10^{-5}$ y 0,04) a velocidades que van desde 0,03 a 0,28 mg/L/día.

La velocidad de consumo de acetaldehído de este set de vinos está significativamente correlacionada con los siguientes factores composicionales:

1. La edad del vino (negativamente)
2. El pH (negativamente)
3. La concentración inicial de SO_2 (positivamente)
4. La concentración inicial de acetaldehído (positivamente)

Discutiremos muy brevemente cada uno de estos aspectos:

1. En el caso de la edad, no podemos hablar con propiedad de correlación, sino de dependencia, ya que nuestras muestras no tienen una distribución suficientemente diversa. Tenemos 4 vinos con 3 o más años y 8 vinos de un año (4 tintos, 2 blancos y 2 rosados). Un ANOVA de un factor nos muestra que, si los agrupamos en 3 categorías, el factor edad-tipo ejerce un efecto significativo ($F=18,3$, $P < 0,001$), y las medias de velocidad de consumo crecen según:

Vinos envejecidos (36,5% de consumo) \ll tintos jóvenes (56,7%) $<$ blancos y rosados (61,7%)

A pesar de ello, limitándonos exclusivamente a los 4 vinos envejecidos, y añadiendo como quinto punto el promedio de los vinos jóvenes, tenemos una clara dependencia lineal entre el % de acetaldehído consumido y el logaritmo de la edad del vino. La correlación es significativa ($P=0,0027$) y se puede ver en la **figura 6**.

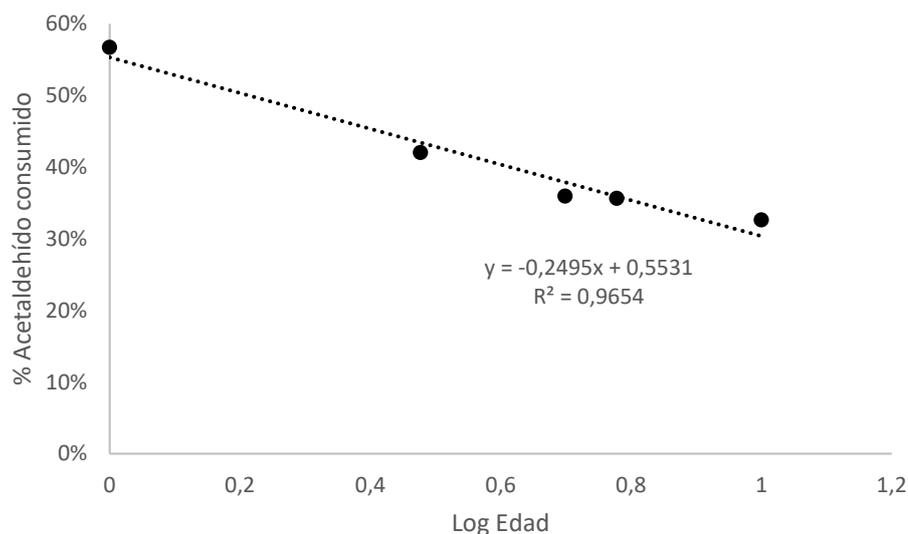


Figura 6. Acetaldehído consumido en la incubación a 25 °C (mg/L) frente Acetaldehído inicial en exceso (mg/L).

- La velocidad de consumo de acetaldehído de cada vino está correlacionada negativa y significativamente con su pH ($R = -0,74$ $P = 0,006$) (**figura 7**). Se trata en este caso de una correlación causal con al menos dos causas documentadas. Por una parte, a menor pH, la formación del carbocación está favorecida y por tanto lo está la combinación con los polifenoles. Por otra parte, a menor pH, menor es la concentración de HSO_3^- , que pasa a estar predominantemente protonado, por lo que la concentración de acetaldehído libre en la ecuación [3] crece.

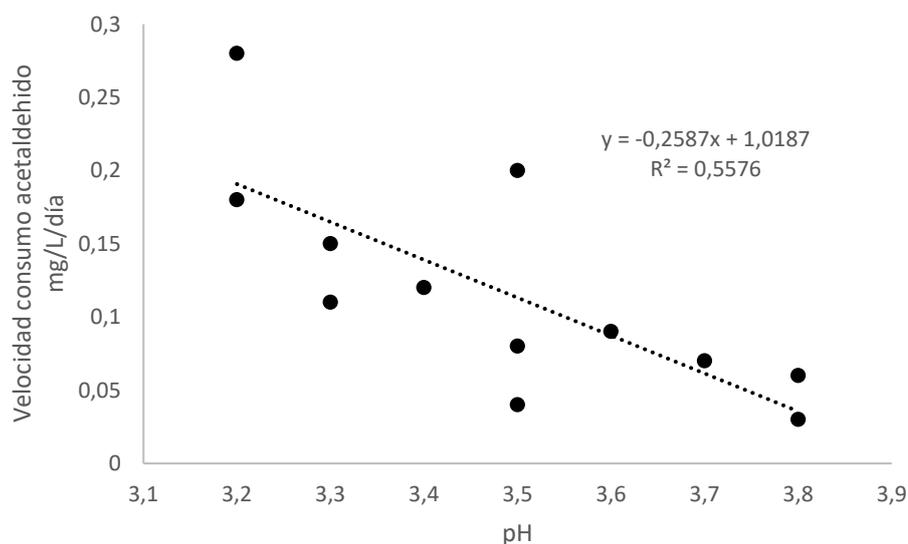


Figura 7. Correlación entre la velocidad de consumo de acetaldehído y el pH de las muestras.

3. La velocidad de consumo de acetaldehído estuvo también correlacionada positivamente con el contenido inicial de SO_2 ($R= 0,82$ $P= 0,0011$) (**figura 8**). En este caso se trata de una correlación evidentemente no causal, ya que sabemos que mayores niveles de SO_2 causan una disminución sustancial en la cinética de consumo de acetaldehído [13]. Esta correlación es, más probablemente, la consecuencia de tanto la correlación anteriormente observada entre el pH y el SO_2 , como de, sobre todo, de la fuerte correlación entre acetaldehído total y SO_2 .

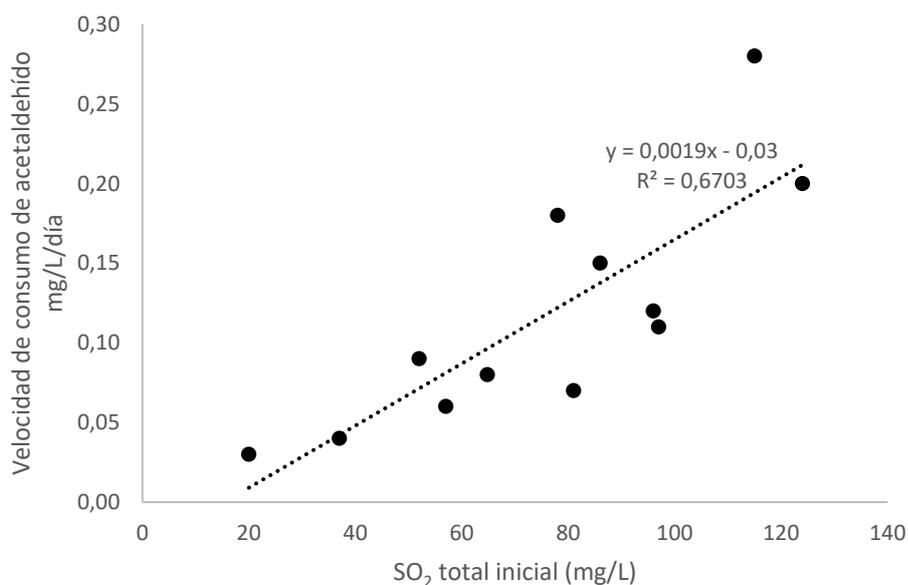


Figura 8. Correlación entre la velocidad de consumo de acetaldehído y el sulfuroso total de las muestras

4. De hecho, la velocidad de consumo de acetaldehído está mayoritaria y primariamente correlacionada con la cantidad de acetaldehído inicial del vino, tal y como se muestra en la **figura 9** que se muestra a continuación:

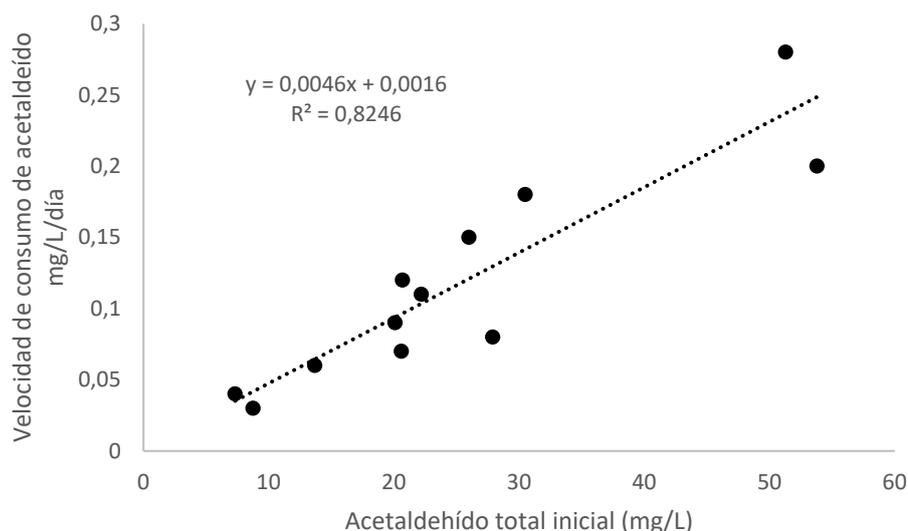
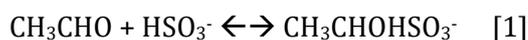


Figura 9. Correlación entre la velocidad de consumo de acetaldehído y el acetaldehído total inicial.

La correlación es significativa con $P < 0,0001$. Se trata pensamos de una correlación causal que nos está indicando que la velocidad de consumo de acetaldehído depende en primer lugar de la concentración de acetaldehído libre, que, de acuerdo con las ecuaciones de equilibrio, depende primariamente de la concentración de acetaldehído total.

3.3.2. Modelo basado en cinética de primer orden con respecto al acetaldehído

Para el equilibrio:



Cuya constante de formación es:

$$K_f = \frac{[\text{CH}_3\text{CHOHSO}_3^-]}{[\text{CH}_3\text{CHO}] \cdot [\text{HSO}_3^-]} \quad [2]$$

Se ha de cumplir:

$$[\text{CH}_3\text{CHO}] = \frac{1}{1 + K_f[\text{HSO}_3^-]} \cdot C_{\text{acetaldehído}} \quad [3]$$

Donde $[\text{CH}_3\text{CHO}]$ se refiere a la concentración de acetaldehído libre en el equilibrio, $[\text{HSO}_3^-]$ es la concentración de sulfito en forma libre y $C_{\text{acetaldehído}}$ es la concentración total de esta molécula. Puesto que parece razonable asumir que la velocidad de consumo de acetaldehído será proporcional a la concentración de acetaldehído libre, la ecuación anterior indica que lo tendrá que ser también a la concentración total de acetaldehído, que es lo que expresa la correlación. En contraste con lo que observamos cuando adicionábamos cantidades

crecientes de acetaldehído al vino, esta correlación está también sugiriendo que se trata de un proceso de primer orden, ya que no se aprecia ninguna curvatura (**figura 9**).

Tratándose de una cinética de primer orden, puede asumirse que cada día, o cada periodo de tiempo hay una reducción fija de un porcentaje o fracción de acetaldehído que tomará el valor e^{-kt} , donde t es el tiempo y k es la constante cinética del proceso:



La ecuación cinética será de primer orden con respecto al acetaldehído. Supongamos, de momento, que es independiente de la concentración de polifenoles, o bien que podemos trabajar el proceso como si se tratara de una ecuación de pseudo primer orden:

$$-\frac{d[\text{CH}_3\text{CHO}]}{dt} = k \cdot [\text{CH}_3\text{CHO}] \quad [5]$$

En forma integrada,

$$[\text{CH}_3\text{CHO}] = [\text{CH}_3\text{CHO}]_o e^{-kt} \quad [6]$$

Y teniendo en cuenta la relación existente entre $[\text{CH}_3\text{CHO}]$ y $C_{\text{acetaldehído}}$, como vimos antes, puede establecerse que:

$$C_{\text{acetaldehído}}^t = C_{\text{acetaldehído}} e^{-k_o t} \quad [7]$$

O bien,

$$\frac{C_{\text{acetaldehído}}^t}{C_{\text{acetaldehído}}} = e^{-k_o t} \quad [8]$$

Donde $C_{\text{acetaldehído}}^t$ es la concentración de acetaldehído en el tiempo t , $C_{\text{acetaldehído}}$ se refiere a la concentración inicial y la constante k_o ahora integra la constante de equilibrio y la concentración de HSO_3^- libre, que supondremos constante en el proceso.

Puede observarse que la ecuación 8 establece que k_o equivale al % de acetaldehído consumido en un día, como en todas las ecuaciones de primer orden.

A partir del dato experimental tomado a los 112 días ($t=112$), es posible determinar k_o , como:

$$k_o = -\frac{1}{112} \ln \frac{C_{\text{acetaldehído}}^{t=112}}{C_{\text{acetaldehído}}} \quad [9]$$

Y determinada k_0 , es factible estimar la fracción de acetaldehído que desaparece en cada unidad de tiempo. Estos cálculos están resumidos en la tabla siguiente para todos los vinos y para los 8 vinos tintos del experimento.

		k_0	%1 día	%112 días	%6 meses	1 año
TODOS VINOS	promedio	0,0068	0,67%	51,60%	67,9%	88,4%
	min	0,0035	0,35%	32,60%	47,0%	72,4%
	max	0,0101	1,00%	67,60%	83,7%	97,5%
	desv	0,0024	0,23%	12,70%	13,3%	9,10%
VINOS TINTOS	promedio	0,0058	0,58%	46,60%	62,7%	84,9%
	min	0,0035	0,35%	32,60%	47,0%	72,4%
	max	0,0101	1,00%	67,60%	83,7%	97,5%
	desv	0,0023	0,23%	12,50%	13,2%	9,30%

Tabla 6. K_0 determinada según la ecuación 9 para el conjunto de vinos y sólo los tintos. Estimación de la fracción de acetaldehído consumido en 1 día, 112 días, 6 meses y 1 año.

Como puede verse, hay una diferencia de un factor 3 entre la mayor y la menor constante. El vino promedio, consume un 0,67% de su acetaldehído en un día, el que más consume llega a consumir un 1%, mientras que el que menos, un 0,35%. Sorprendentemente, los vinos tintos tienen velocidades de consumo más bajas que los blancos y rosados. Si llevamos estas constantes a 6 meses, nos encontramos con un promedio de consumo del 63% para los vinos tintos (68% para el conjunto global) y a un año nos vamos al 85%, prácticamente el doble de lo observado recientemente por Han y col., que describieron una pérdida del 40% de su contenido inicial en 12 meses para un grupo de vinos tintos [9], pero en su experimento, se trataba de vinos recién embotellados conteniendo 20 mg/L de SO_2 libre, prácticamente el doble de lo que contenía nuestra muestra con mayor nivel.

3.3.3. Modelización de la constante cinética

Aunque la velocidad de consumo de acetaldehído depende primariamente de la concentración de acetaldehído inicial, en consistencia con una cinética de primer orden, también depende como hemos visto de los factores pH (a mayor pH, menor velocidad) y edad del vino; a mayor edad menor velocidad. Nuestro objetivo aquí, con la limitación del set de datos disponible, es verificar si podemos combinar en un modelo simple los tres factores, de manera que podamos predecir la velocidad de consumo de acetaldehído de un vino a partir de estos tres factores. Este modelo tendría no sólo el obvio interés predictivo, sino que, caso de lograrse, sería una demostración adicional de que la velocidad de consumo de acetaldehído no depende de la composición polifenólica del vino, al contrario de lo que parecía derivarse de los modelos del **capítulo 2**.

Para construir el modelo, consideraremos simplemente que hay una proporcionalidad directa con la $C_{\text{acetaldehído}}$, y una inversa con el pH, de manera que el modelo lo construiremos

representando la velocidad de consumo frente al cociente $C_{\text{acetaldehído}} / \text{pH}$. Para la edad, dado que no tenemos vinos suficientes para realizar un modelo preciso, introduciremos un factor de corrección ($F_{\text{edad}} = 1$ para vinos jóvenes, 1,5 para envejecidos) por el que dividiremos el cociente anterior. Esto es, vamos a representar la velocidad de consumo de acetaldehído frente a:

$$\frac{C_{\text{acetaldehído}}}{\text{pH} \cdot F_{\text{edad}}}$$

La representación que se obtiene muestra que este cociente permite predecir con bastante precisión la velocidad de consumo de acetaldehído, tal y como se ve en la **figura 10** que se muestra a continuación.

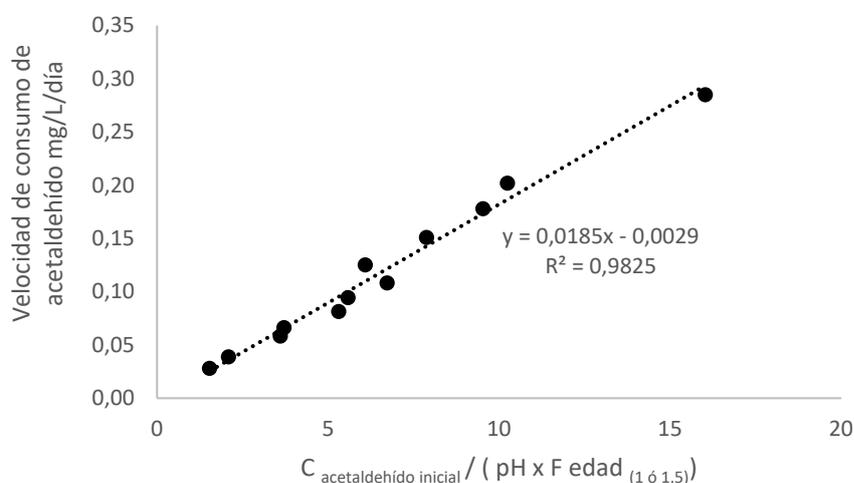


Figura 10. Correlación entre la velocidad de consumo de acetaldehído y las variables correlacionadas con ésta (Concentración de acetaldehído inicial / (pH x F edad))

Los parámetros de la regresión son:

- Ordenada: $-0,0029 \pm 0,0059$ (no significativamente diferente de cero)
- Pendiente: $0,018503 \pm 0,00078$

	Velocidad consumo (mg/L/día)	Estimados	Residuos	Residuos %
CV-2008	0,081	0,095	0,0141	17%
DM-2012	0,028	0,025	-0,0024	-9%
CL-2013	0,066	0,066	-0,0003	-1%
VF-2015	0,202	0,187	-0,0151	-7%
MT-2018	0,058	0,064	0,0056	10%
FP-2018	0,094	0,100	0,0062	7%
BG-2018	0,039	0,036	-0,0029	-8%
RB-2018	0,125	0,110	-0,0153	-12%
VMG-2018	0,151	0,143	-0,0080	-5%
GF-2018	0,178	0,173	-0,0043	-2%
VT-2018	0,285	0,294	0,0089	3%
VM-2018	0,108	0,122	0,0135	12%

Tabla 7. Estudio de residuales del modelo propuesto para la predicción del acetaldehído consumido.

Ahora nos queda aprovechar esta sencilla forma de predecir la velocidad de consumo para predecir la constante cinética. Para ello vamos a igualar la expresión de la velocidad a 112 días, al modelo de regresión:

$$U_{112} = \frac{C_{\text{acetaldehído}} - C_{\text{acetaldehído}}^{t=112}}{112} = 0,018503 \cdot \frac{C_{\text{acetaldehído}}}{pH \cdot F_{\text{edad}}} - 0,0029 + \varepsilon(\text{error})$$

Si despreciamos el error, U_{112} pasa a ser la estimación de U_{112} por el modelo y $C_{\text{acetaldehído}}^{t=112}$ la concentración estimada:

$$C_{\text{acetaldehído}}^{t=112(\text{est})} = C_{\text{acetaldehído}} - 112 \cdot (0,018503 \cdot \frac{C_{\text{acetaldehído}}}{pH \cdot F_{\text{edad}}} - 0,0029)$$

$$C_{\text{acetaldehído}}^{t=112(\text{est})} = C_{\text{acetaldehído}} - 2,07233 \cdot \frac{C_{\text{acetaldehído}}}{pH \cdot F_{\text{edad}}} + 0,3302$$

$$C_{\text{acetaldehído}}^{t=112(\text{est})} = C_{\text{acetaldehído}} \cdot (1 - \frac{2,07233}{pH \cdot F_{\text{edad}}}) + 0,3302$$

La estimación es bastante razonable, como se ve en el gráfico experimental frente a estimados (**figura 11**):

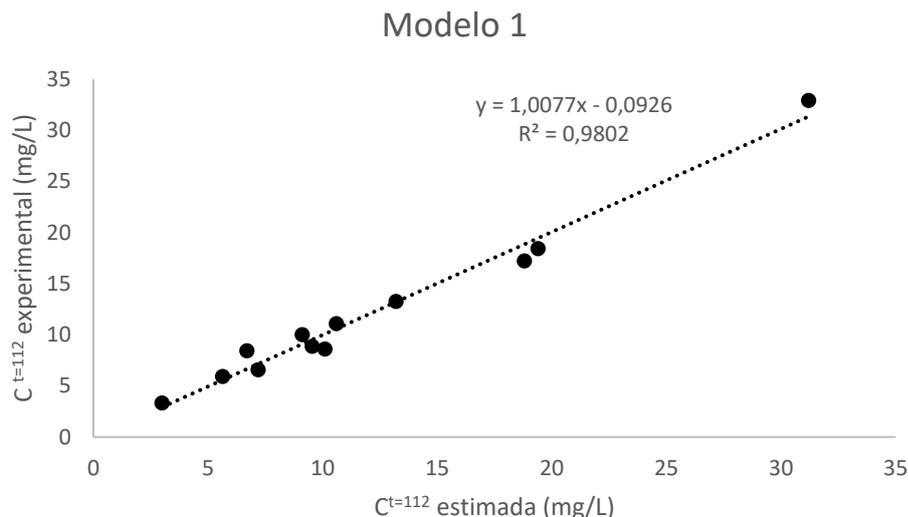


Figura 11. Comprobación de la robustez del modelo 1 al correlacionar la concentración de acetaldehído medida experimentalmente tras 112 días y la concentración de acetaldehído estimada.

Pero, cuando empleamos este valor estimado para estimar el valor de k_0 (definida en la ecuación 9):

$$k_0^{est} = -\frac{1}{112} \ln \frac{C_{acetaldehído}^{t=112(est)}}{C_{acetaldehído}} \quad [10]$$

Nos encontramos con una capacidad de predicción más limitada, tal y como vemos en la figura 12.

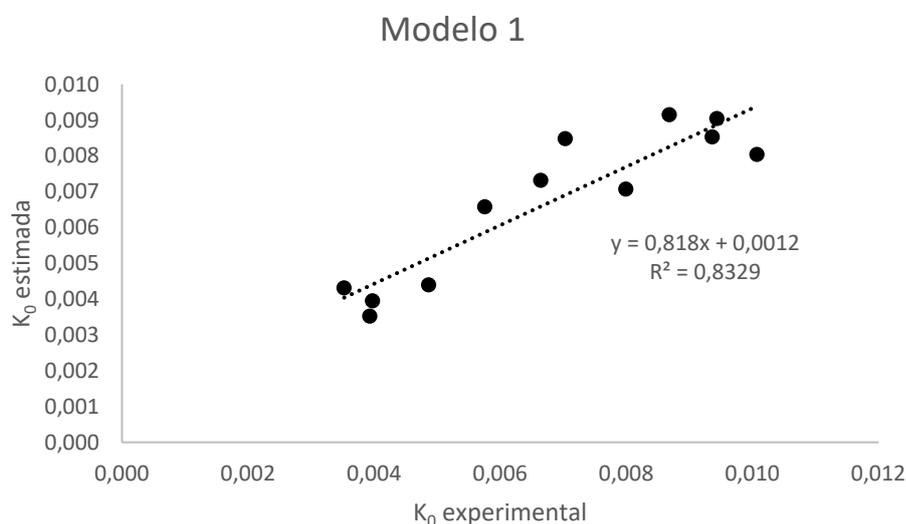


Figura 12. Comprobación de predicción de K_0 para el modelo 1 propuesto.

Puede verse que el modelo anterior tiene varios problemas, uno de ellos es que en la parte baja de k_0 el modelo es incapaz de asignar correctamente si quiera el orden de k_0 , un segundo problema es que la muestra con $k_0=0,008$ se aparta claramente, y el tercer problema es que el modelo falla a la hora de predecir las k_0 en la zona superior. Si hacemos

un estudio de los residuales, podemos ver dónde está el problema para intentar afinar algo más el modelo (**tabla 8**):

	K₀ experimental	K₀ estimada	Residual	Residual (%)
CV-2008	0,0035	0,0043	0,0008	22%
DM-2012	0,0039	0,0035	-0,0004	-10%
CL-2013	0,0040	0,0039	0,0000	-1%
VF-2015	0,0049	0,0044	-0,0005	-10%
MT-2018	0,0058	0,0066	0,0008	14%
FP-2018	0,0066	0,0073	0,0007	10%
BG-2018	0,0080	0,0071	-0,0009	-12%
RB-2018	0,0101	0,0080	-0,002	-20%
VMG-2018	0,0094	0,0085	-0,0008	-9%
GF-2018	0,0094	0,0090	-0,0004	-4%
VT-2018	0,0087	0,0092	0,0005	5%
VM-2018	0,0070	0,0085	0,0014	21%

Tabla 8. Estudio de residuales del modelo 1 propuesto para la predicción de K_0 .

Los 3 problemas mayores son los ajustes de CV-2008, que es la muestra más envejecida y RB-2018 y VM-2018 (valores resaltados en la **tabla 8**) que son las muestras que tienen la menor ratio Acetaldehído/SO₂ (ambos totales), pero una el modelo da un valor muy por debajo y a la otra muy por encima, por lo que no parece que sea esa la razón.

El ajuste de la muestra de 2008 sí que se puede mejorar, haciendo el factor de la edad variar de forma proporcional con esta.

Para ello, definimos el Factor de edad como:

$$F_{edad} = \frac{\text{Log}(edad)}{1,3} + 1 \quad [11]$$

De esta manera, los F edad salen de la misma magnitud, pero proporcionales (1,77 para la muestra de 10 años, 1,6 para la de 6, 1,54 para la de 5 y 1,37 para la de 3). El modelo mejora sensiblemente (**figura 13**):

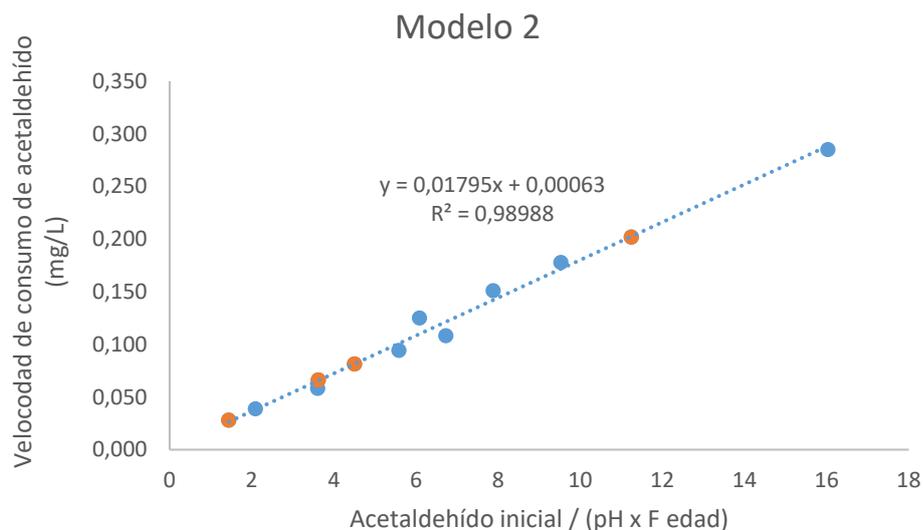


Figura 13. Correlación entre la velocidad de consumo de acetaldehído frente al modelo con la variable de edad corregida.

Y la nueva pendiente y ordenada en el origen son:

- Ordenada: $-0,00063 \pm 0,0044$ (no significativamente diferente de cero)
- Pendiente: $0,01795 \pm 0,00057$

Y la concentración de acetaldehído estimada a los 112 días ahora se calcula con la expresión:

$$C_{\text{acetaldehído}}^{t=112(\text{est})} = C_{\text{acetaldehído}} \cdot \left(1 - \frac{2,01092}{\text{pH} \cdot F_{\text{edad}}}\right) + 0,0704$$

Que, como se ve en el **gráfico 14**, proporciona una estimación muy razonable, con residuos todavía inferiores a los de la estimación previa.

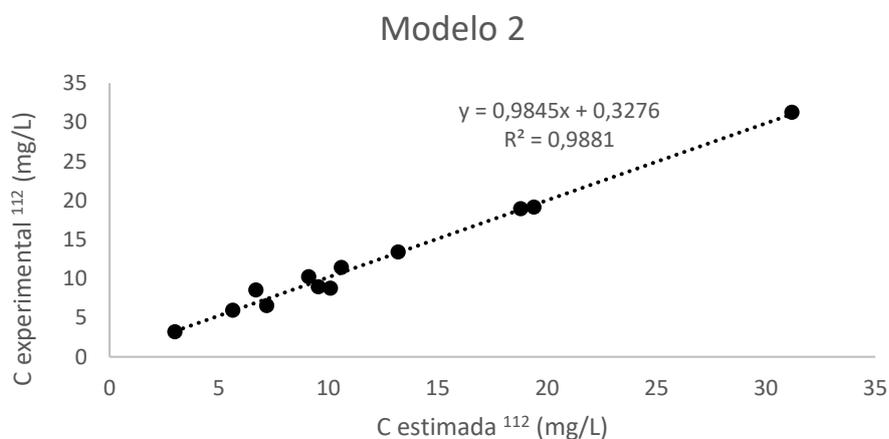


Figura 14. Comprobación de la robustez del modelo 2 al correlacionar la concentración de acetaldehído medida experimentalmente tras 112 días y la concentración de acetaldehído estimada.

Al aplicar estas estimaciones para las k_0 , siguiendo la expresión 10, se puede observar que hay algo de mejora en las k_0 , pero, como que era de esperar, los problemas con las k de mayores valores no se han solucionado, tal y como se observa en la **figura 15**.

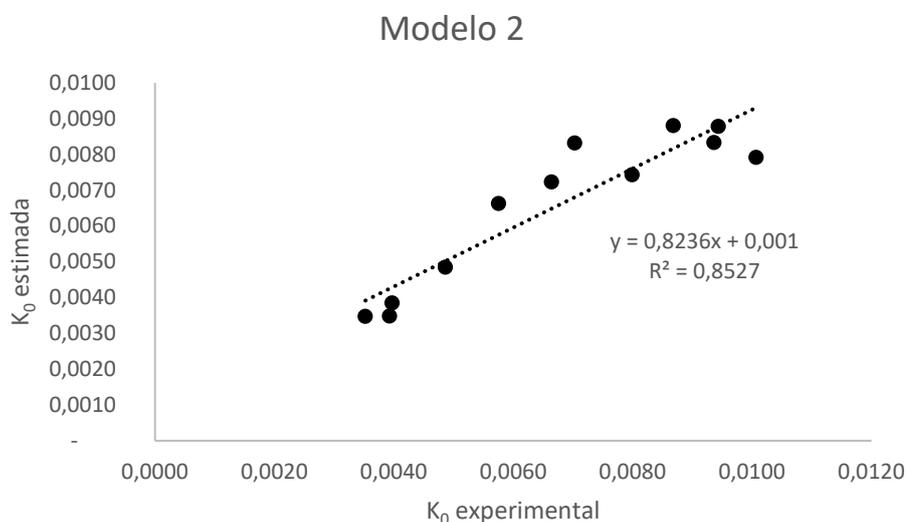


Figura 15. Comprobación de predicción de K_0 para el modelo 2 propuesto.

Puede apreciarse que hay una clara curvatura y que la curva tiende a tumbarse a valores altos de k_0 ; esto es, el modelo permite predecir satisfactoriamente las k_0 pequeñas, pero funciona bastante peor cuando éstas son grandes (ver **tabla 9**).

	K_0 experimental	K_0 estimada	Residual	Residual (%)
CV-2008	0,0035	0,0035	-0,0001	-2%
DM-2012	0,0039	0,0035	-0,0004	-11%
CL-2013	0,0040	0,0038	-0,0001	-3%
VF-2015	0,0049	0,0048	0,00000	0%
MT-2018	0,0058	0,0066	0,0009	15%
FP-2018	0,0066	0,0072	0,0006	9%
BG-2018	0,0080	0,0074	-0,0006	-7%
RB-2018	0,0101	0,0079	-0,0022	-21%
VMG-2018	0,0094	0,0083	-0,0010	-11%
GF-2018	0,0094	0,0088	-0,0007	-7%
VT-2018	0,0087	0,0088	0,0001	1%
VM-2018	0,0070	0,0083	0,0013	18%

Tabla 9. Estudio de residuales del modelo 2 propuesto para la predicción de K_0 .

Si nos vamos a los valores de k_0 de los vinos puede verse que el modelo se ajusta relativamente bien a los vinos tintos envejecidos y a dos tintos jóvenes con k_0 menores de

80 y al blanco con k_0 de 70, pero no puede ajustar las muestras con k_0 mayores de 70 (resaltadas en la **tabla 9** y en rojo en la **figura 16**).

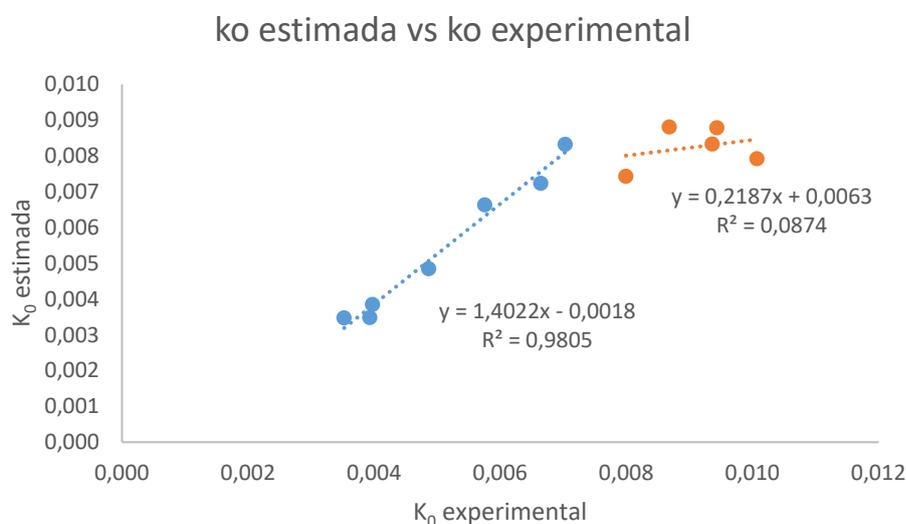


Figura 16. Comprobación de predicción de K_0 para el modelo 2 propuesto, falta de ajuste del modelo 2 para los vinos con K_0 altas.

Ya que k_0 se corresponde con el porcentaje de acetaldehído consumido en un día (**ecuación 8**), parece que hemos conseguido interpretar el consumo de acetaldehído de aquellos vinos que consumen menos del 0,75% por día, pero no los que consumen más. No parece claro porqué es así, podría ser una simple consecuencia de que desde el principio el modelo ha podido ir más dominado por el vino mostrando la máxima velocidad de consumo de acetaldehído (VT-2018, que llegó a consumir 0,285 mg/L/día, 0,87% diario) y que simplemente los vinos con mayores residuos han sido estos, o podría ser que a partir de esas velocidades de consumo hay otros parámetros composicionales que no se han tenido en cuenta por lo que el modelo de primer orden ya no es adecuado. Desafortunadamente, el número de muestras no es suficientemente grande como para ir más lejos.

3.3.4. Estimación de los consumos de acetaldehído de los vinos tintos

Si no hay oxidación y el acetaldehído es el nativo del vino, los consumos de acetaldehído se pueden predecir con los datos de los modelos anteriores. Asumiendo la validez del modelo de primer orden, lo que ya hemos visto que probablemente no es lo más adecuado para los vinos que más consumen, podemos calcular las cantidades que consumirían los vinos por día, mes o periodo superior. Los resultados para los vinos anteriores, expresados en mg/L se muestran a continuación en la **tabla 10** para diversos periodos de tiempo relevantes.

	CH ₃ CHO inicial (mg/L)	k ₀	1 día	1 semana	1 mes	3 meses	6 meses
CV-2008	27,9	0,00352	0,10	0,68	2,80	7,58	13,1
DM-2012	8,76	0,00393	0,03	0,24	0,97	2,61	4,44
CL-2013	20,6	0,00397	0,08	0,57	2,32	6,19	10,5
VF-2015	53,8	0,00486	0,26	1,80	7,31	19,1	31,4
MT-2018	13,7	0,00576	0,08	0,54	2,17	5,54	8,80
FP-2018	20,1	0,00664	0,13	0,91	3,63	9,05	14,0
BG-2018	7,32	0,00799	0,06	0,40	1,56	3,76	5,58
RB-2018	20,7	0,01007	0,21	1,41	5,40	12,3	17,3
VMG-2018	26,0	0,00936	0,24	1,65	6,37	14,8	21,2
GF-2018	30,5	0,00944	0,29	1,95	7,52	17,5	24,9
VT-2018	51,3	0,00868	0,44	3,03	11,8	27,8	40,6
VM-2018	22,2	0,00703	0,16	1,07	4,22	10,4	15,9

Tabla 10. Predicción del consumo de acetaldehído (mg/L) en vinos sin alterar la concentración de acetaldehído nativo.

Las medias, mínimos, máximos y desviaciones, segregadas para todos y sólo para tintos se muestran también a continuación en la **tabla 11**.

		CH ₃ CHO inicial (mg/L)	k ₀	1 día	1 semana	1 mes	3 meses	6 meses
TODOS	promedio	25,2	0,00677	0,17	1,19	4,67	11,4	17,3
	min	7,30	0,00352	0,03	0,24	0,97	2,61	4,44
	max	53,8	0,01007	0,44	3,03	11,8	27,8	40,6
	desv	14,6	0,00236	0,12	0,81	3,14	7,4	10,7
TINTOS	promedio	21,6	0,00585	0,12	0,82	3,27	8,27	13,2
	min	7,30	0,00352	0,03	0,24	0,97	2,61	4,44
	max	53,8	0,01007	0,26	1,80	7,31	19,1	31,4
	desv	14,7	0,00229	0,08	0,53	2,12	5,3	8,5

Tabla 11. Predicción del consumo de acetaldehído (mg/L) en vinos sin alterar la concentración de acetaldehído nativo. Valores medios, mínimos y máximos teniendo en cuenta todos los vinos y sólo los tintos.

En un proceso de oxidación hemos de asumir que se genera acetaldehído [14, 15], aunque sea menos del que en principio se haya pensado (**capítulo 6**), por lo que las cantidades de acetaldehído que se consumirán serán superiores a las registradas en este experimento donde no hemos alterado la concentración de acetaldehído, y podemos estimarlas de acuerdo con las conclusiones que sacamos en el **apartado 3.2** (donde llevamos todos los vinos hasta 38 mg/L de acetaldehído total):

1. Un vino tinto con concentración de acetaldehído en exceso consume una cantidad aproximadamente fija de acetaldehído de unos 13,2 mg/L por mes.
2. Si tuviera mucho SO₂ libre (>20 mg/L), la cantidad de acetaldehído consumida disminuiría en proporción (no tenemos datos para verificarlo, pero es una asunción razonable).
3. Sólo si se acumularan cantidades de acetaldehído libre muy altas, superiores a 25 mg/L, los consumos serían superiores. Esta sería una posibilidad remota, ya que, hasta la fecha, no hemos registrado vinos con esas acumulaciones “repentinas”.

Puede verse que las cantidades de acetaldehído consumidas por los vinos en equilibrio están muy por debajo de los 13,2 mg/L en un mes. Por ejemplo, el tinto que más llegó a consumir alcanza 7,3 mg/L/mes (**tabla 11**), que es un valor muy cercano a lo que consumió el vino CH (8,2 mg/L/mes) en el experimento del **apartado 3.2 (tabla 4)**. Este vino era el que tenía tanto SO₂ libre, que no tuvo ningún exceso de facto de acetaldehído. Su cantidad inicial de acetaldehído era la más alta de aquel grupo.

Por tanto, podemos considerar que los vinos tintos en procesos de oxidación intensos, consumirán no más de 13,2 mg/L/mes.

4. Resumen y conclusiones

El consumo de acetaldehído en los vinos se caracteriza por ser un proceso lento, relativamente constante y que depende de la historia previa del vino. Pensamos que la limitada reactividad del acetaldehído puede deberse al establecimiento de enlaces lábiles con el propio material polifenólico. Éstos aductos suaves se romperían en el ataque de la hidracina en el método de derivatización, -al igual que ocurre con los hidroxietilsulfonatos- y se contabilizarían como acetaldehído total; pero limitarían la reactividad del acetaldehído por no estar presente en forma "libre". Ni en una matriz muy reactiva como pueden ser el de las FFAs se ha encontrado consumo total de acetaldehído, alcanzándose niveles basales de acetaldehído remanente de 15 mg/L cuando se dopa una FFA con 25 mg/L de acetaldehído.

Se ha encontrado una dependencia mínima de la composición polifenólica específica del vino, dependencia que se manifiesta a través de la edad del vino. La cinética de consumo de acetaldehído parece estar determinada por la edad del vino, la capacidad de estabilizar el carbocación (pH) y la concentración de acetaldehído inicial. La cinética es de primer orden siempre que el consumo sea menor al 0,75 % diario.

En términos cuantitativos, un vino tinto a 25°C consume acetaldehído atendiendo a las siguientes premisas:

1. A una velocidad mínima de 0,22 mg/L/día en condiciones de equilibrio, es decir, cuando no hay generación adicional de acetaldehído, y la concentración de acetaldehído libre es baja.
2. A una velocidad media constante de 0,43 mg/L/día siempre y cuando pueda haber una acumulación de acetaldehído.
3. La velocidad máxima de consumo se da en condiciones de máxima acumulación y mínima presencia de SO₂, llegando a alcanzarse valores de hasta 0,79 mg/L/día.

5. Referencias

1. Alegre, Y., et al., *Development of a new strategy for studying the aroma potential of winemaking grapes through the accelerated hydrolysis of phenolic and aromatic fractions (PAFs)*. Food Research International, 2020. **127**.
2. Han, G.M., et al., *A rapid, one step preparation for measuring selected free plus SO₂-bound wine carbonyls by HPLC-DAD/MS*. Talanta, 2015. **134**: p. 596-602.
3. OIV, *OIV-MA-AS323-04A Sulphur dioxide. Compendium of International Methods of Analysis*, 2009.
4. Marrufo-Curtido, A., et al., *A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines and some observations about the influence of wine initial chemical composition*. Food Chemistry, 2018. **248**: p. 37-45.
5. Han, G.M., et al., *Yeast alter micro-oxygenation of wine: oxygen consumption and aldehyde production*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017. **97**(11): p. 3847-3854.
6. Marrufo-Curtido, A., et al., *Evidencias de los diferentes equilibrios acetaldehído - material polifenólico de los vinos*. Libro de comunicaciones del XIV Congreso Nacional de Investigación Enológica 2018: p. 194-198, ISBN: 978-84-09-12074-1.
7. Margalith, P.Z., *Flavor Microbiology* 1981: Charles G. Thomas.
8. Peterson, A.L. and A.L. Waterhouse, *H-1 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**(36): p. 6869-6878.
9. Han, G.M., M.R. Webb, and A.L. Waterhouse, *Acetaldehyde reactions during wine bottle storage*. Food Chemistry, 2019. **290**: p. 208-215.
10. Bueno, M., et al., *Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation*. Frontiers in Chemistry, 2018. **6**.
11. de Azevedo, L.C., et al., *Evaluation of the formation and stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(21): p. 8670-8680.
12. Jackowetz, J.N. and R.M. de Orduna, *Survey of SO₂ binding carbonyls in 237 red and white table wines*. Food Control, 2013. **32**(2): p. 687-692.
13. Sheridan, M.K. and R.J. Elias, *Reaction of Acetaldehyde with Wine Flavonoids in the Presence of Sulfur Dioxide*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(45): p. 8615-8624.
14. Elias, R.J., et al., *Identification of Free Radical Intermediates in Oxidized Wine Using Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(10): p. 4359-4365.
15. Danilewicz, J.C., *Reactions Involving Iron in Mediating Catechol Oxidation in Model Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2013. **64**(3): p. 316-324.

CAPÍTULO VII

**Acerca de los balances de materia en la
oxidación del vino**

CAPÍTULO VII

Acerca de los balances de materia en la oxidación del vino

1. Introducción

Como hemos visto a lo largo de la presente tesis, la cinética de consumo de acetaldehído en los vinos tintos es limitada, errática y no es consistente con las asunciones previamente presentadas en los modelos del **capítulo 2**. Los resultados tampoco respaldan la existencia de una categoría bien definida de polifenoles reactivos con aldehídos (ARPs) (**capítulo 4**). Esto nos lleva a pensar que los mecanismos de oxidación aceptados están sobrevalorando la formación de acetaldehído a partir del oxígeno [1, 2], en línea con el apunte realizado por Kreitman y col. sugiriendo que algunos fenoles (ácidos hidroxicinámicos) pueden interaccionar selectivamente con el radical 1-hidroxiethyl $\text{CH}_3\text{CHOH}\cdot$ [3], inhibiendo la formación de acetaldehído. Además, un apunte mucho más reciente muestra que los niveles de radicales $\text{HO}\cdot$ dependen en gran medida de la composición fenólica del vino [4].

En este último capítulo de tesis se presentan una serie de trabajos con el objetivo último de estimar el rendimiento de formación de acetaldehído por cada molécula de oxígeno consumido por el vino.

2. Materiales y métodos

2.1. Efecto de la procedencia del acetaldehído (formado o añadido) sobre la velocidad de consumo de acetaldehído en disoluciones de malvidina-3-O-glucósido y catequina y sobre la naturaleza de los productos formados

2.1.1. Preparación de un vino modelo capaz de soportar reacción de Fenton

Partimos de disoluciones de vino sintético (13 % de etanol, 5 g/L de ácido tartárico, 5 g/L de glicerina, 56 mg/L de Fe (II) y pH 3,5) inspiradas en las empleadas para el estudio de la reacción de Fenton por Danilewicz y col [5], pero con un nivel muy superior de Fe(II) para asegurar que el consumo de O_2 pueda proseguir hasta consumir una saturación, sin necesidad de un polifenol que regenere el Fe(II). De esta manera, el control y las muestras conteniendo un polifenol podrían tener consumos equivalentes. Se probaron diferentes concentraciones de Cu (II) con el fin de asegurar que la velocidad de consumo de O_2 fuera adecuada, ni muy rápida ni muy lenta. Para ello, se preparan por duplicado viales con vino sintético con diferentes concentraciones de Cu (II) 0,02/0,05/0,1/0,25/0,5 mg/L a partir de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Los viales se llevan a saturación de oxígeno y se incuban a 35 grados. Se controla la formación de acetaldehído tras derivatización y análisis HPLC [6] a estos tiempos (0, 1, 2 y 5 horas; 1, 2, 5, y 8 días –resultados mostrados en la **tabla 1 del anexo 4**). Las

condiciones elegidas fueron 13,3 % de etanol, 5 g/L de ácido tartárico, 5 g/L de glicerina, 56 mg/L de Fe (II), 0,02 mg/L de Cu (II), pH 3,5; incubar 10 días a 35 grados.

2.1.2. Preparación de muestras para el ensayo

Con el vino sintético conteniendo 13,3 % de etanol, 5 g/L de ácido tartárico, 5 g/L de glicerina, 56 mg/L de Fe (II), 0,02 mg/L de Cu (II) y pH 3,5, se prepararon las siguientes composiciones polifenólicas:

- a) Malvidina-3-O-glucósido (M3OG) (0,51mM)
- b) Catequina (1,81mM)
- c) una mezcla de M3OG (0,39mM) y catequina (0,40mM)

Se prepararon 3 pares de viales para cada uno de estos 3 vinos modelo. Un par de ellos fueron dopados con acetaldehído (0,25mM, 11mg/L) en anoxia (2 viales de HPLC de 2 mL) y fueron almacenados 10 días a 35 °C. El segundo par fue saturado con aire (8mg/L de O₂) y mantenido el mismo tiempo y temperatura, en este caso los viales fueron de 13 mL REF: 60810-1965 de la marca Kimble. Estos viales estaban provistos de un sensor de oxígeno PST3 de la empresa Nomacor y se midió el oxígeno una vez al día. El tercer par fue almacenado en idénticas condiciones en completa anoxia sin adición de acetaldehído (2 viales de HPLC de 2 mL). Se añadieron como controles adicionales muestras duplicadas de vino sintético en anoxia y vino sintético con una saturación (8mg/L de O₂).

Tras los 10 días de incubación a 35°C, se analizó acetaldehído total por HPLC [6] y los productos de reacción acetaldehído-polifenoles. Los compuestos fenólicos de bajo peso molecular fueron cuantificados e identificados por UPLC-DAD-MS siguiendo el método descrito por González-Hernández y col. [7]. Los análisis se realizaron con un sistema LC Waters Acquity Ultra Performance (Milford, MA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas Microtof-Q (Q-TOF) de Bruker Daltonik (GMBH, Alemania) con una interfaz de electrospray.

En base a los productos de reacción esperados y descritos anteriormente por otros autores [8] se buscaron e integraron las masas exactas que aparecen en la **tabla 1**.

Compuestos supuestos	MS calculada exacta	Nº de cargas
VITISINA B	517,13	1+
M3OG-puente etilo-M3OG (isómero 1)	506,14	2+
M3OG-puente etilo-M3OG (isómero 2)	506,14	2+
Catequina-puente etilo -Catequina (isómero 1)	605,16	1-
Catequina-puente etilo -Catequina (isómero 2)	605,16	1-
Catequina-puente etilo -Catequina (isómero 3)	605,16	1-
Catequina-puente etilo-M3OG (isómero 1)	809,20	1+
Catequina-puente etilo-M3OG (isómero 2)	809,20	1+

Tabla 1. *Productos de reacción esperados, masas calculadas exactas y número de cargas.*

2.2. Determinación de la velocidad de consumo de O_2 por las FFAs (material polifenólico directamente extraído de las uvas)

Las FFAs (fracciones fenólicas y aromáticas extraídas de uva) fueron obtenidas en nuestro laboratorio en cartuchos C18 siguiendo la metodología descrita por [9]. Estas fracciones etanólicas están exentas de sulfuroso, aminoácidos, metales y acetaldehído.

La FFA usada en este ensayo es la pT2. La codificación de las FFAs consta de tres caracteres. La primera letra se refiere a la fecha de toma de muestra: pre vendimia (p) momento en el cual las uvas están inmaduras y éstas se cortaron una semana antes a la fecha de vendimia y vendimia (v) donde las uvas están en su momento óptimo de maduración. La segunda letra está referida a la variedad de uva y puede ser T: Tempranillo o G: Garnacha. Por último, se coloca un número que indica la procedencia de las uvas y puede ser: 1- Bodega Dominio de Pingus de la DO Ribera del Duero; 2- Bodegas Ramón Bilbao de la Denominación de Origen (DO) Somontano; y 3- Bodegas Ilurce de la DO Rioja.

El objetivo de este ensayo fue comprobar que estas fracciones fenólicas una vez reconstituidas en vino sintético (5g/L ácido tartárico, pH 3.5, 5g/L glicerina), consumieran oxígeno a una velocidad similar al vino. Además, se evaluó la importancia del Fe (II), Cu (II) y SO_2 en la cinética de consumo de O_2 por parte de la FFA reconstituida. Para ello, se probaron vinos sintéticos con FFA pT2 (13,3%) y diferentes cantidades (en mg/L) de estos metales: Fe (II) (0/1/5) a partir de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$; Cu (II) (0/0,1/0,5) a partir de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; SO_2 (0/25) a partir de metabisulfito de sodio 99% ($Na_2S_2O_5$). Se aplicó a la FFA (pT2), una saturación de oxígeno (8 mg/L de O_2) y se controló el nivel de oxígeno una vez al día según se explica en Carrascón y col. [10].

2.3. Estimación del H_2O_2 no SO_2 empleado en la formación de acetaldehído usando FFAs. Relación entre la cinética de consumo de oxígeno y la formación de acetaldehído

En esta experiencia se trabajó de nuevo con la FFA pT2 siguiendo la composición química establecida en la experiencia anterior (**apartado 2.2**). Es decir la FFA se reconstituyó en vino sintético al 13.3 % (para obtener un 13.3 % de etanol), con 5 g/L de ácido tartárico, 5 g/L de glicerina, 5 mg/L de hierro (II), 0,2 mg/L de Cu (II), 0,2 mg/L de Mn (II) y pH 3,5. Una alícuota de este vino sintético reconstituido fue adicionado de 120 mg/L acetaldehído e incubada en anoxia a 35 grados, con monitorización semanal de su nivel de acetaldehído, durante el tiempo necesario para que su nivel de acetaldehído se estabilizara, lo que ocurrió

tras el consumo de 60 mg/L de acetaldehído en 50 días. Esta alícuota se denominó “FFA envejecida”, en contraste con la preparada con FFA fresca, que se denominó “FFA joven”.

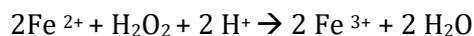
Ambas muestras se sometieron a una oxidación a 35 grados, saturando con aire y poniendo en contacto con espacio de cabeza [11] con un aporte total de 35mg/L de O₂ a cada muestra por duplicado en WITs independientes y se controló la acumulación de acetaldehído por HPLC [6] (muestreo 0, 1, 2, 4, 7, 10, 12, 16, 18, 21 días). Para la interpretación de los datos se hizo uso de las cinéticas de consumo obtenidas en el **apartado 3.1 del capítulo 5** y que se detallan en el **apartado 3.3.1 de este capítulo**.

2.4. Estudio del efecto de la presencia de compuestos azufrados en el rendimiento de la formación de acetaldehído a partir del oxígeno consumido

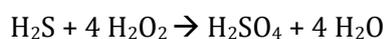
Para este ensayo se usó un vino tinto del año 2014 de la variedad Garnacha. Se analizaron al inicio el SO₂ libre y total por Rankine [12] y el acetaldehído total por HPLC [6]. Después, se introdujo en la cámara de anoxia donde se tomaron dos alícuotas, una de las cuales se mantuvo sin modificación como control. La segunda se dopó con las cantidades máximas que, según bibliografía [13] [14] [15] [16], tiene el vino de los siguientes compuestos azufrados: glutatión 40 mg/L, cisteína 10 mg/L, metionina 30 mg/L, H₂S 0,5 mg/L. Ambas muestras fueron adicionadas con 1,69 mM (57,5 mg/L) de agua oxigenada, que se corresponde con la cantidad molar necesaria para oxidar por completo el SO₂ total, los compuestos azufrados añadidos, los cationes metálicos reducidos (se asumió 5 mg/L de Fe(II), y además oxidar etanol para formar 15 mg/L de acetaldehído (**ecuaciones 4-9**).



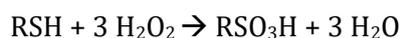
Ecuación 4. Oxidación de sulfuroso con agua oxigenada.



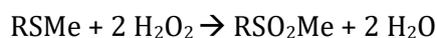
Ecuación 5. Oxidación de hierro (II) con agua oxigenada.



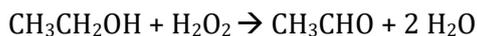
Ecuación 6. Oxidación de sulfhídrico con agua oxigenada.



Ecuación 7. Oxidación de las especies RSH (glutatión y cisteína) con agua oxigenada.



Ecuación 8. Oxidación de la especie RSM_e (metionina) con agua oxigenada.



Ecuación 9. Formación de acetaldehído por oxidación con agua oxigenada.

Se repartieron las muestras por duplicado en viales de trabajo y se incubaron en anoxia a 25°C. Se controló el acetaldehído total por HPLC [6] a los tiempos 0, 1, 2, 3, 6 y 7 días.

3. Resultados y discusión

3.1. Efecto de la procedencia del acetaldehído (formado o añadido) sobre la velocidad de consumo de acetaldehído en disoluciones de malvidina-3-O-glucósido y catequina y sobre la naturaleza de los productos formados

Los resultados obtenidos hasta el momento no respaldan la existencia de una categoría bien definida de polifenoles reactivos con acetaldehído (índice de ARPs), como lo habían sugerido los modelos PLS [13], y sugieren además que la capacidad real del vino para consumir acetaldehído está muy por debajo (de media 0,43 mg/L/día **capítulo 5**) de la requerida para explicar las pobres acumulaciones de acetaldehído observadas en los experimentos de oxidación. Aunque se supone que la reacción del acetaldehído transcurre por la vía del carbocatión, nos ha parecido obligado preguntarnos, dado que el acetaldehído se forma en un sistema radicalario en el que hay varias especies intermedias, si no sería posible que la reacción con los polifenoles, no fuera protagonizada por el acetaldehído, sino por alguno de sus precursores radicalos (radicales α -hidroxietilo e hidroxietilperoxilo) (ver **figura 1**). La pregunta nos parece pertinente, porque si este fuera el caso, la reacción de condensación con los polifenoles podría ser mucho más rápida de lo que hemos sido capaces de medir en experimentos en los que el acetaldehído se añade ya preformado. Esta diferencia de velocidad podría explicar el importante desfase existente entre las magras cantidades de acetaldehído acumuladas en los experimentos de reacción y los relativamente limitados consumos de acetaldehído observados tanto en experimentos con vinos como con FFAs.

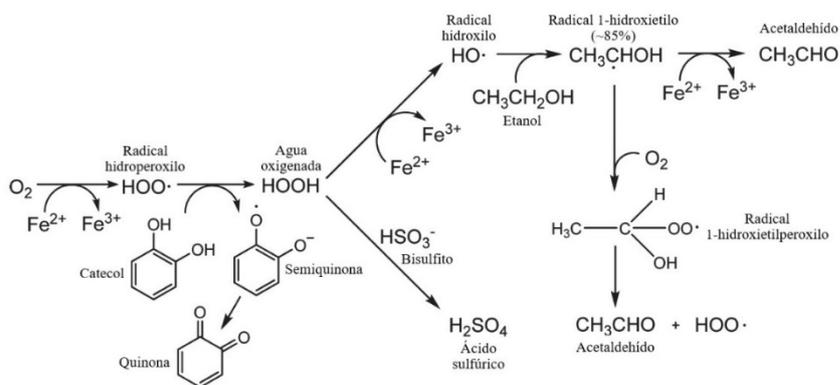


Figura 1. *Reacción de Fenton. Formación detallada del acetaldehído por medio de los radicales 1-hidroxi etilo y 1-hidroxi etilperoxilo. Figura adaptada de la referencia [1].*

Para abordar esta hipótesis, lo primero que se estableció fue la composición de un vino sintético que nos permitiera formar acetaldehído “in situ” por oxidación del alcohol a partir de la reacción Fenton, a fin de comparar la reactividad de dicho acetaldehído frente a una muestra equivalente en la que el acetaldehído haya sido añadido. Además, impusimos al sistema la restricción de que el consumo de O₂ pudiera tener lugar sin necesidad de ningún polifenol que formara una quinona, regenerando el Fe(II), por lo que aumentamos la disponibilidad de Fe (II) subiendo su concentración a 56 mg/L. En este vino sintético pudimos comprobar que la cantidad de oxígeno disuelto tras la saturación fue de 8,03 ± 0,05 mg/L y en el mismo, tras 10 días de reacción, se midió por HPLC una formación de acetaldehído de 11,13 mg/L ± 1,09 mg/L, que se corresponde con gran precisión con la cantidad esperada para esa masa de oxígeno, de acuerdo con la estequiometría 1:1 de la reacción.

A este medio de reacción se le añadieron malvidina 3-O-glucósido (M3OG), catequina o mezcla de las dos, midiéndose la acumulación de acetaldehído. Este valor fue comparado con la cantidad de acetaldehído desaparecida por reacción con los polifenoles en medios equivalentes guardados el mismo tiempo en anoxia estricta y conteniendo 11mg/L de acetaldehído.

Los resultados del ensayo se muestran en la **tabla 2**. La **tabla 2** da la concentración de acetaldehído reaccionada (la diferencia entre la concentración de acetaldehído medida en la muestra al final del experimento frente a la medida en un control conteniendo la cantidad inicial o esperada de acetaldehído). Puede verse que en 10 días las cantidades de acetaldehído reaccionadas son muy pequeñas en todos los casos, tan solo significativamente diferentes de cero en las muestras conteniendo catequina, confirmando la lentitud de estas reacciones de condensación al pH del vino (3,5) [17]. Lo más relevante para nuestro propósito es confirmar que en ningún caso, la cantidad de acetaldehído reaccionado fue superior cuando éste fue generado por oxidación del alcohol. De hecho, en el único caso en el que hubo disminución significativa de acetaldehído por reacción, ésta fue claramente menor en el ensayo en el que el acetaldehído se generó por oxidación. Puede además observarse que la cantidad reaccionada es la mitad, que es lo esperado si la cinética de reacción del acetaldehído es igual en ambas condiciones y tenemos en cuenta que en la generación por oxidación, el nivel promedio de acetaldehído es justo mitad del que había en otro sistema. Este resultado nos permite rechazar la hipótesis de que alguna de las reacciones de los polifenoles con el acetaldehído sea más rápida a través de alguno de sus

radicales precursores y, por tanto, que las velocidades de reacción de acetaldehído que hemos registrado en los distintos experimentos, sean inferiores a las reales.

	Medio 1: añadir el acetaldehído en anoxia	Medio 2: formar acetaldehído en oxidación
Malvidina	0.0 ± 0.8	-0.3 ± 0.8
Catequina	3.6 ± 1.2*	1.8 ± 1.2*
Malvidina + catequina	0.6 ± 0.8	0.3 ± 0.8

Tabla 2. Concentración de acetaldehído consumido (mg/L) tras 10 días de incubación a 35 °C.

* Significativamente diferente de 0.

El análisis HPLC-MS de polifenoles confirma y afina estos resultados, tal y como se ve en la **tabla 3 y en la figura 2**. En las muestras que contuvieron sólo malvidina se midieron cantidades relevantes de vitisina B y de los dos isómeros posibles de los puentes malvidina-malvidina. Las cantidades de los 3 productos estuvieron en mayores concentraciones en la disolución que contuvo todo el acetaldehído añadido desde el comienzo, con factores que van de factor 1,5 superior para la vitisina a factores 3,1 y 4 para los isómeros 1 y 2 del dímero. En el caso de la catequina, se encontraron los 3 isómeros mayoritarios del dímero con puente de etilo. En este caso hubo mayor formación, y las concentraciones encontradas en la muestra incubada con acetaldehído fueron 6,9, 5,8 y 6,2 veces superiores a la muestra en la que se oxidó el alcohol. En cuanto a la disolución mixta, se encontraron dos isómeros del dímero mixto antociano-tanino, en ambos casos 3,3 y 3,5 veces más concentrados en las muestras incubadas con acetaldehído.

Es decir, los precursores del acetaldehído (los radicales α -hidroxietilo e hidroxietilperoxilo) no son más reactivos con los polifenoles que el acetaldehído ya formado, en consonancia con observaciones de otros autores que observaron que la cinética de consumo de acetaldehído no se ve acelerada en presencia de oxígeno, sugiriendo que éste no forma parte en la reacción como reactivo [18].

	MS buscada	Catequina Medio 1	Catequina Medio 2	M3OG Medio 1	M3OG Medio 2	Mezcla Medio 1	Mezcla Medio 2
VITISINA B	517,13	nd	nd	7.032,2	4.624,5	8.907,2	5.503,4
M3OG-puente etilo-M3OG (isómero 1)	506,14	nd	nd	13.789	4.561,3	14.149	4.767,2
M3OG-puente etilo-M3OG (isómero 2)	506,14	nd	nd	2.538,1	633,63	3.687,8	784,50
Catequina-puente etilo-Catequina (isómero 1)	605,16	42.797	6.196,6	nd	nd	nd	nd
Catequina-puente etilo-Catequina (isómero 2)	605,16	34.190	5.931,4	nd	nd	nd	nd
Catequina-puente etilo-Catequina (isómero 3)	605,16	6.574,0	1.065,5	nd	nd	nd	nd
Catequina-puente etilo- M3OG (isómero 1)	809,20	nd	nd	nd	nd	34.415	10.379
Catequina-puente etilo- M3OG (isómero 2)	809,20	nd	nd	nd	nd	57.928	16.524

Tabla 3. Áreas absolutas de los productos de reacción entre acetaldehído (MEDIO 1: dopado y MEDIO 2: formado “in situ” por oxidación) y polifenoles: Malvidin3-O-glucósido (M3OG), catequina y una mezcla de ambos: M3OG más catequina.

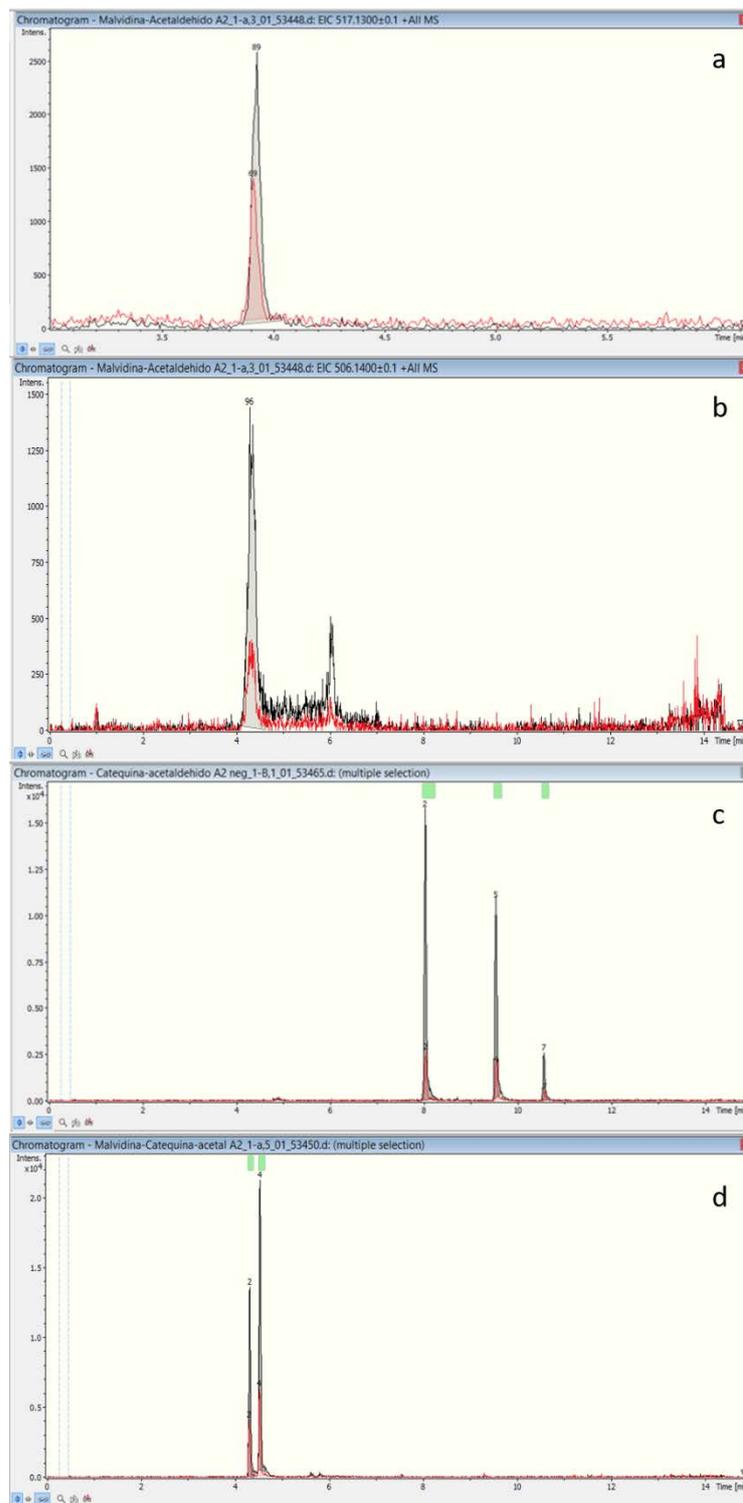


Figura 2. Comparativa de cromatogramas del experimento. En negro muestras con el medio 1 (acetaldehído dopado desde el principio) y en rojo medio 2 (acetaldehído formado “in situ” por oxidación). Figura 2a muestras de malvidina con los medios 1 y 2 para la masa 517,13 (Vitisina B). Figura 2b muestras de malvidina con los medios 1 y 2 para la masa 506,14 (isómeros M3OG-puente etilo-M3OG). Figura 2c muestras de catequina con los medios 1 y 2 para la masa 605,16 (isómeros de Catequina-puente etilo-catequina). Figura 2d muestras de mezcla con los medios 1 y 2 para la masa 809,20 (isómeros de M3OG-puente etilo-catequina).

3.2. Determinación de la velocidad de consumo de O₂ por las FFAs (material polifenólico directamente extraído de las uvas)

Para el uso de las FFAs en ensayos de incubación en anoxia y en condiciones oxidativas, se verificó primero su capacidad para consumir O₂ y las cantidades, en su caso, necesarias de cationes metálicos y sulfuroso para hacerlo a velocidades propias de un vino tinto. Esto se realizó porque según la bibliografía ambos elementos son necesarios para que el consumo de O₂ tenga lugar a velocidad apreciable en los vinos. Los metales son necesarios para activar el oxígeno, lo que hacen a través de un complejo Cu-Fe [5, 19], y el SO₂ es esencial para evitar que las quinonas se acumulen, bien sulfonándolas, bien reduciéndolas al difenol inicial. En ausencia de SO₂, la acumulación de quinonas acabaría provocando un enlentecimiento de la capacidad del vino de consumir O₂ [20]. Se midieron en cada caso la velocidad inicial de consumo de O₂, definida como el O₂ consumido en el primer día de oxidación y la velocidad media, definida como el consumido en la primera semana, dividido por 7. Los resultados de las experiencias realizadas con distintos niveles de Fe, Cu y SO₂ se resumen en la **figura 3**.

En términos generales, puede constatar que la FFA en todas las condiciones ensayadas consumió oxígeno a una velocidad superior a la encontrada normalmente en vinos [21], ya que a las primeras 92 horas (3,83 días) de incubación había consumido el 95 % de la saturación. Esto ocurrió incluso en la muestra que no contuvo ni Fe, ni Cu, ni SO₂, (aunque es cierto que la muestra control está en el grupo que más lento consume el oxígeno tal y como se ve en la **tabla 4**). Es importante constatar que este resultado está en contradicción con el modelo establecido por Danilewicz de consumo de O₂ por el vino, ya que, según dicho modelo y como se ha comentado anteriormente, son precisos tanto cationes metálicos de Cu y Fe como SO₂ [2]. Está fuera del alcance del presente trabajo el estudio de las causas de este comportamiento inesperado. Se debe constatar, sin embargo, que tal y como se aprecia en la **tabla 2 del Anexo 4**, las FFAs tienen una concentración de taninos similar a los vinos, pero pueden contener hasta cuatro veces más de antocianos, lo que sin duda contribuye a su excepcional capacidad para consumir O₂.

Puede verse en la **tabla 4**, que la concentración alta de metales permite obtener velocidades iniciales mayores, mientras no ocurre lo mismo para la velocidad media donde por ejemplo el ensayo 5 con máxima concentración de Fe (II) está en el último grupo. Los ensayos 5, 0 y 4 con poco o bajo nivel de cobre son los más lentos, por lo que se resalta el papel del cobre en la oxidación [5, 19, 22, 23]. El sulfuroso sólo tiene efecto activador del consumo de oxígeno a niveles de cobre bajos.

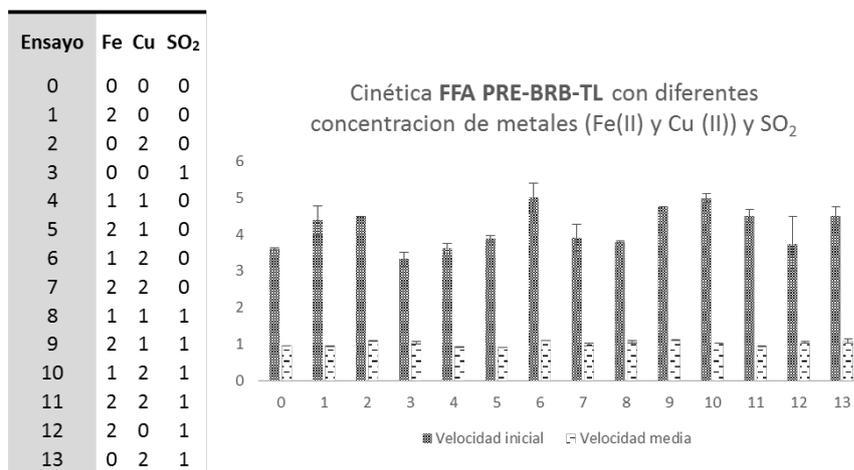


Figura 3- Parámetros cinéticos: velocidad inicial (mg/L/día) y media (mg/L/día) para las diferentes concentraciones de metales (Fe (II) y Cu (II)) y SO₂ ensayadas. Las barras de error representan la desviación estándar entre las réplicas. Factores (mg/L): Fe (0/1/5); Cu (0/0,1/0,5); SO₂ (0/25).

Ensayo	Fe	Cu	SO ₂	Velocidad Inicial mg/L/día	Velocidad media mg/L/día
6	1	2	0	5,00 a	1,10 ab
10	0	2	0	4,98 ab	1,03 abcde
9	2	1	1	4,75 ab	1,12 a
11	2	2	1	4,49 abc	0,95 de
13	0	2	1	4,5 abcd	1,10 ab
2	0	2	0	4,49 abcd	1,09 bcd
1	2	0	0	4,37 bcde	0,94 fg
7	2	2	0	3,90 cdef	1,00 ef
5	2	1	0	3,87 def	0,92 g
8	1	1	1	3,79 ef	1,07 bcd
12	2	0	1	3,74 f	1,05 bcde
4	1	1	0	3,61 f	0,92 g
0	0	0	0	3,59 f	0,97 fg
3	0	0	1	3,33 f	1,04 cde

Tabla 4- Parámetros cinéticos: velocidad inicial (mg/L/ 1 día) y media (mg/L/día). para las diferentes concentraciones de metales (Fe (II) y Cu (II)) y SO₂ ensayadas. Factores (mg/L): Fe (0/1/5); Cu (0/0,1/0,5); SO₂ (0/25). Diferentes letras indican diferente grupo en el test de Fisher para cada velocidad (p= 0,05). Los ensayos se presentan de mayor a menor velocidad inicial.

El papel del manganeso no se comprobó, ya que su acción catalítica depende sobre todo de la concentración de hierro y cobre presente en el vino, y se ha descrito también tiene un papel limitado en la producción de acetaldehído [24], por lo que se estableció una concentración fija de 0,2 mg/L.

La composición definitiva de las muestras fue 13,3 % de FFA (para obtener un 13,3 % de etanol); con 5 g/L de ácido tartárico, 5 g/L glicerina, 5 mg/L de Fe (II), 0,2 mg/L de Cu (II), 0,2 mg/L de Mn (II) y pH 3,5 (ajustado con NaOH).

3.3. Estimación del H_2O_2 no SO_2 empleado en la formación de acetaldehído usando FFAs. Relación entre la cinética de consumo de oxígeno y la formación de acetaldehído.

El objetivo de este ensayo es comparar la acumulación diferencial de acetaldehído por parte de reconstituidos obtenidos a partir de una misma FFA sometida o no a un proceso previo de reacción con el acetaldehído. Dado que la FFA original ni tiene acetaldehído ni SO_2 , el experimento debe permitir averiguar datos fundamentales acerca de la cinética de acumulación de acetaldehído y acerca de la tasa real de formación de acetaldehído por oxidación del alcohol **Acumulación diferencial de acetaldehído durante la oxidación**

Se trabajó con la reconstitución de una FFA pT2 “fresca” o “joven” y la reconstitución de la misma FFA “envejecida”. Para preparar la FFA “envejecida” se dopó al inicio con 120 mg/L de acetaldehído. A los 10 días había consumido 60 mg/L de acetaldehído y mantiene una concentración de acetaldehído de otros 60 mg/L, que ya no parecen consumirse, como se puede ver en la línea azul correspondiente a la muestra dopada con 120 de la **figura 4**, al menos no se observó ninguna disminución durante un periodo adicional de 20 días. Puede decirse que la FFA “envejecida” tras 30 días tiene su capacidad de consumo de acetaldehído si no completamente “agotada”, sí muy limitada. Ambos reconstituidos fueron sometidos a un proceso de oxidación forzada siguiendo el protocolo de oxidación de Marrufo-Curtido y col [11] durante el cual se fue analizando el acetaldehído, tal y como se muestra en la **figura 5**.

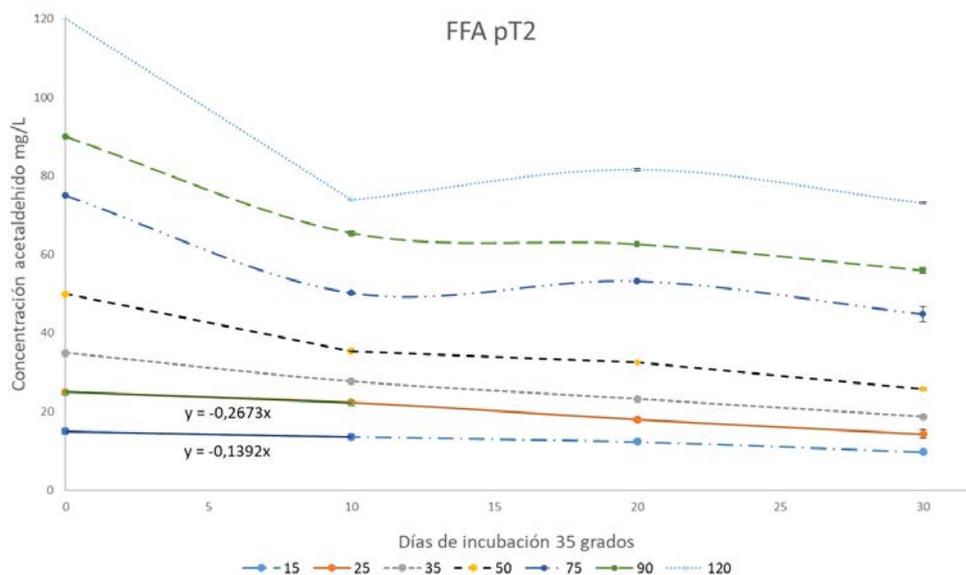


Figura 4. Caracterización de la cinética de consumo de acetaldehído a 35 °C, cuando se dopa con 7 niveles de acetaldehído (15, 25, 35, 50, 75 y 120 mg/L) la FFA (pT2). Las barras de error en cada punto representan el error como s/\sqrt{n} . Detalle del consumo en los primeros 10 días cuando se dopa con 15 y 25 mg/L de acetaldehído. La preparación de la FFA envejecida se representa con la muestra 120 (línea azul de puntos).

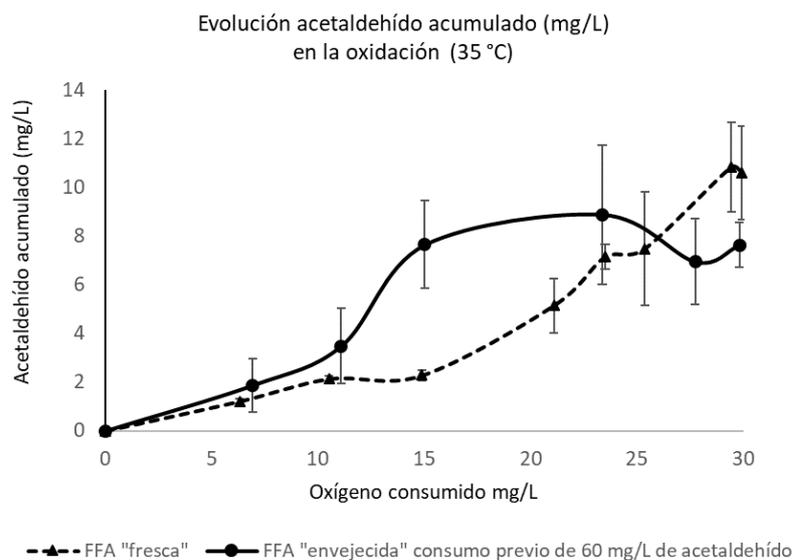


Figura 5. Evolución de acetaldehído acumulado (mg/L) frente el O_2 consumido (mg/L). Las barras de error representan la incertidumbre del acetaldehído acumulado en cada punto $\sqrt{(S_f^2 + S_0^2)}$.

La evolución del acetaldehído acumulado para ambas FFAs comienza a diferenciarse a partir de 10 mg/L de oxígeno consumido, punto en el cual la FFA envejecida empieza a acumular acetaldehído con mayor pendiente, tal y como era de esperar dado su historial de consumo previo. La mayor extensión de los intervalos de confianza de los valores en esta muestra hay que atribuirlos a que se trata de concentración acumulada, y el valor es por tanto la diferencia entre la concentración medida y la concentración inicial, que era de

alrededor de 60 mg/L. Puede verse en cualquier caso que a partir del consumo de 16 mg/L de O₂, la acumulación de acetaldehído en esta FFA se estabiliza, alcanzándose un valor máximo de 8,89 ± 2,86 mg/L de acetaldehído en el punto 23 mg/L de oxígeno consumido, para luego disminuir ligeramente. Esto es, durante los primeros 16 mg/L de O₂ consumidos, el reconstituido de la FFA envejecida, o consume mucho menos acetaldehído que la FFA nueva, o produce mucho más durante la oxidación. Sin embargo, la **figura 5** sugiere que esta FFA reactiva su capacidad para consumir acetaldehído a partir del día 11 (que se corresponde con el punto de 23 mg/L de O₂ consumido). Es llamativo que esta FFA, que había llegado a una situación de no consumo de acetaldehído en anoxia, a pesar de estar éste en claro exceso, vuelve a consumirlo como consecuencia del consumo de O₂. Pensamos que esto podría atribuirse a procesos de despolimerización de taninos, que aumentarían la reactividad de la FFA, al igual que se ha descrito para vinos almacenados en corchos permeables al aire [25].

En términos cuantitativos, sin embargo, habría que matizar la capacidad de esta despolimerización de taninos sobre la capacidad de consumo de acetaldehído de la FFA envejecida, ya que McRae y col. atribuyen tan solo 0,02 mg/L/ día de acetaldehído consumido a la formación de pigmentos poliméricos, mientras que en nuestro experimento estaríamos hablando de consumos bastante mayores. Dejemos, de momento, de lado el acetaldehído esperado a partir del consumo de O₂, en cuyo caso estaríamos hablando de varios mL de acetaldehído por día. Si nos centramos en la comparación entre las dos FFAs, y aceptamos la hipótesis de que la diferencia se debe a la mayor capacidad de consumo de la FFA fresca, la Figura 5 muestra que ésta ha de haber consumido no menos de 6 mg/L más que la FFA envejecida tras el consumo de 15 mg/L de O₂, y esto ocurrió en el día 4, por lo que el consumo de esta FFA habría de ser no inferior a 1,5 mg/L/día.

En cualquier caso, dicho consumo más eficiente de acetaldehído por parte de la FFA fresca parece verse mermado tras el consumo de 20 mg/L de O₂, lo que provoca una acumulación paulatina de acetaldehído en este reconstituido, que acaba alcanzando el máximo valor al final de la oxidación (10,6 ± 1,6 mg/L de acetaldehído).

3.3.2. Consideraciones y estimaciones acerca de la formación de acetaldehído

Consideraremos inicialmente que el 100% del agua oxigenada formada en la primera reducción del O₂ reacciona a partir de la reacción de Fenton, con un rendimiento 100% de radical HO•, que oxida el etanol formando el radical 1-hidroxietilo (precursor de acetaldehído) en un 85 % [1]. Bajo esta consideración se muestran los cálculos resumidos en la **tabla 5**. Tras el primer día de oxidación, en el que se registró un consumo de 6,3 mg/L

de O₂ en el reconstituido conteniendo la FFA fresca, debería haberse producido, $\frac{6,3}{32} \times 44 \times 0,85 = 7,39 \text{ mg/L}$ de acetaldehído. Como en ese mismo momento se determinó una acumulación experimental de 1,25 mg/L de acetaldehído, el razonamiento nos llevaría a pensar que el acetaldehído consumido es de $7,39 - 1,25 = 6,16 \text{ mg/L}$ en el primer día de oxidación. Este valor choca con el hecho de que nunca hemos registrado consumos tan altos para niveles iniciales de acetaldehído tan bajos. Podemos hacer el mismo razonamiento para la FFA envejecida. En este caso, la cantidad de O₂ consumida el primer día fue de 6,95 mg/L, que con la misma consideración debería haber formado, $\frac{6,9}{32} \times 44 \times 0,85 = 8,1 \text{ mg/L}$ de acetaldehído, observándose una acumulación de 1,88, lo que nos llevaría a pensar que han reaccionado $8,12 - 1,88 = 6,14 \text{ mg/L}$ de acetaldehído en el primer día. Aunque la cantidad de acetaldehído real de este reconstituido en este punto es de 66,71 mg/L, la FFA estuvo con un nivel de 64,83 mg/L durante más de 20 días sin consumo significativo alguno, por lo que no parece creíble que haya podido consumir dicha cantidad. Es además muy significativo el hecho de que las dos FFAs, la fresca y la “agotada”, de acuerdo con la consideración previa, estarían consumiendo exactamente la misma cantidad de acetaldehído.

Por tanto, pasaremos a un segundo grupo de consideraciones basadas en las velocidades de consumo de acetaldehído para la FFA joven cercanas a las medidas en los experimentos de adición en anoxia realizados con esta misma FFA mostrados en las líneas de tendencia mostradas en la **figura 4**. Dichos experimentos permiten conocer con cierta precisión las velocidades de consumo de acetaldehído en los 10 primeros días cuando las concentraciones de éste son de 15, 25 o 35 mg/L (**figura 4**). Dado que las concentraciones de acetaldehído acumulado en ningún caso son superiores a 12 mg/L, emplearemos tan solo las dos primeras dosis para estimar la velocidad. Las velocidades de consumo para esa FFA se pueden estimar mediante una función cuadrática, tal y como se muestra en la gráfica mostrada en la **figura 6**. Dicha función ha sido empleada para estimar, en cada tramo, la cantidad de acetaldehído probablemente consumido por la FFA fresca, a partir de los datos experimentales.

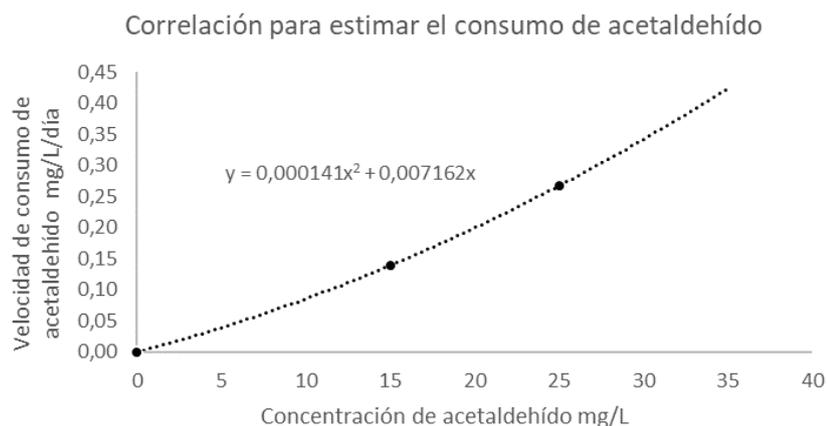


Figura 6. Datos de velocidad de consumo de acetaldehído de la FFA fresca en función de la concentración de acetaldehído dopada. El punto de dopaje de 35 mg/L se ha excluido ya que, como se indicó en su momento, daba una velocidad muy superior.

Días	O ₂ consumido (mg/L)	CH ₃ CHO medido mg/L	s	CH ₃ CHO (mg/L) acumulado por tramo	CH ₃ CHO (mg/L) esperado por tramo	CH ₃ CHO (mg/L) reaccionado más probable	CH ₃ CHO (mg/L) formado	Formado/ esperado (%)
0,00	0,00	0,00	0,2					
1,00	6,30	1,20	0,2	1,2±0,26	7,39	0,0044	1,25	17,0%
2,20	10,5	2,20	0,2	0,9±0,23	4,92	0,0151	0,95	19,2%
3,90	14,9	2,30	0,2	0,2±0,26	5,10	0,0285	0,18	3,50%
7,20	21,1	5,30	0,8	3,0±0,83	7,25	0,0989	3,05	42,0%
9,00	23,5	7,30	0,4	2,0±0,89	2,81	0,0908	2,06	73,2%
10,9	25,4	7,60	1,7	0,3±1,7	2,17	0,1136	0,45	20,8%
17,9	29,5	10,9	1,3	3,3±2,1	4,77	0,5462	3,86	81,0%
30,0	29,9	10,6	1,4	-0,3±1,9	0,57	1,1292	0,83	146%
TOTAL				10,6±1,5	35,0	2,00	12,6	36,1%
TRAMO 0-17,9 d TOTAL OXIDAC.				10,9±1,4	34,4	0,90	11,8	34,3%

Tabla 5. Resumen de datos para la FFA fresca: días de oxidación, oxígeno consumido (mg/L) y acetaldehído (mg/L) medido por HPLC. Acetaldehído (mg/L) acumulado por tramo. Acetaldehído esperado en cada tramo a partir del oxígeno (Oxígeno /32) *44*0.85. Acetaldehído reaccionado más probable aplicando la función cuadrática de la **figura 6**. Acetaldehído formado = acetaldehído acumulado /tramo + acetaldehído reaccionado más probable. Formado/ esperado (%). Cómputo total de cada columna teniendo en cuenta todos los puntos y excluyendo el último.

Los resultados de estas estimaciones se muestran en la **tabla 5**. La cantidad de acetaldehído esperado en cada tramo se ha calculado a partir de la suposición de que el 85% del H₂O₂ formado en la 1ª reducción del O₂ va a oxidar alcohol para formar acetaldehído. El acetaldehído reaccionado más probable se ha calculado empleando para cada tramo una velocidad de consumo de acetaldehído sacada de la curva polinómica de la **figura 6** anterior correspondiente a la concentración promedio de acetaldehído del dicho tramo y aplicándola a la duración del tramo. El acetaldehído formado es simplemente la suma del acetaldehído medido y el reaccionado. Finalmente, en la columna encabezada por Formado/esperado se da para cada tramo, la relación entre la cantidad de acetaldehído formado y el esperado de acuerdo con las expectativas anteriormente enunciadas. Este cociente representa la proporción de agua oxigenada que se ha invertido en oxidar funciones alcohol mediante el

radical hidroxilo $\text{HO}\cdot$ generado en la reacción de Fenton y se podría denominar " H_2O_2 CH_3CHO ". Los datos de este cociente hay que tomarlos con cierta precaución, sobre todo para los valores finales, ya que la incertidumbre en dichos valores es muy alta. El término dominante en la incertidumbre de este cociente es la incertidumbre en el acetaldehído acumulado por tramo, que es particularmente alto en los tres últimos.

No obstante lo anterior, puede observarse que los valores en los tres primeros tramos, que acumulan un consumo de 15 mg/L de O_2 , lo equivalente a 2 saturaciones, son muy bajos; inferiores al 20%. En el cuarto y quinto tramos, los valores van creciendo, de manera que tomado en general parece que conforme avanza la oxidación, la proporción de alcohol oxidado va subiendo hasta hacerse mayoritaria. Esto puede verse con ayuda de la representación de este cociente frente al tiempo mostrada en la **figura 7**. El último punto, que nominalmente correspondía a 145%, ha sido rebajado a 100% para evitar que dominara sobre el resto. En dicho tramo, que corresponde a 12 días, la cantidad de O_2 consumido fue sin embargo de tan solo 0,4 mg/L, y la cantidad de acetaldehído formada es muy pequeña y va acompañada de una alta incertidumbre relativa. A pesar de esa "rebaja", la correlación entre este cociente y el tiempo es significativa ($P=0,007$), de manera que puede decirse que conforme progresa la oxidación el % de H_2O_2 CH_3CHO aumenta de manera significativa. No obstante, es llamativo que este cociente parece "oscilar" como puede verse en el tercer y quinto tramos, en los que toma valores muy inferiores a los observados en los tramos anteriores y siguientes. En global y para todo el proceso, la proporción de alcohol formado, con respecto al máximo posible y hasta ahora esperado, es de un 34% en los 18 días que dura el consumo significativo de oxígeno, y de un 36,1% si incluimos también los últimos 12 días en los cuales ya el consumo de O_2 fue residual (**tabla 5**). Si nos limitamos al intenso consumo de O_2 observado en los 4 primeros días, equivalente a dos saturaciones completas y cubierto en los tres primeros tramos de la tabla, puede verse que el acetaldehído esperado es la suma del esperado en cada tramo, $7,39+4,92+5,10=17,41$ mg/L, mientras que la cantidad de acetaldehído formado fue tan sólo de 2,38 mg/L ($1,25+0,95+0,18=2,38$ mg/L), por lo que la fracción de H_2O_2 invertida en oxidar alcoholes (H_2O_2 CH_3CHO) es tan solo $2,38/17,41=13,7\%$. Inversamente, la fracción de H_2O_2 invertida en oxidar otros componentes del vino diferentes del alcohol (H_2O_2 not CH_3CHO) sube al 86,3%.

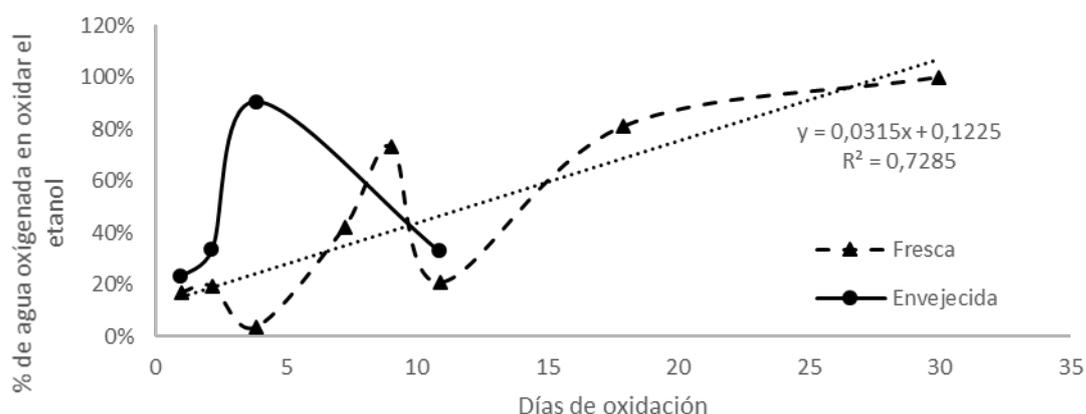


Figura 7. Representación de la estimación de las fracciones de etanol oxidadas con respecto a la esperada asumiendo que el 100% del H_2O_2 formada en la 1ª reducción del O_2 entra en la reacción Fenton y que el 85% del radical $OH\cdot$ oxida etanol.

Podemos hacer un tratamiento similar, más comprometido, puesto que no tenemos todos los datos, para la FFA envejecida (quitamos datos anómalos). En este caso, y tal y como hemos podido comprobar experimentalmente, asumiremos que la FFA no consume nada de acetaldehído durante los 3 primeros tramos. En estos tramos hay un intenso consumo de O_2 (15 mg/L en 3,9 días), y en el tercero hay una intensa formación de acetaldehído, tal y como se puso de manifiesto en la **figura 5**. Los cálculos y estimaciones se resumen en la **tabla 6**. En el cuarto tramo (del día 3,9 al 10,9, con un consumo de poco más de 8 mg/L de O_2), hemos supuesto que vuelve a haber consumo de acetaldehído y hemos estimado la velocidad de consumo a partir de los datos del quinto tramo, en el que hay un consumo claro de acetaldehído asociado a un consumo de O_2 relativamente pequeño. Con esta estimación, la proporción de " H_2O_2 CH_3CHO ", esto es, de alcoholes oxidados en este cuarto tramo es del mismo orden que la observada en el primer y segundo tramos. Si mantuviéramos la asunción de que en el cuarto tramo sigue sin haber consumo de acetaldehído, el cociente formado/esperado pasaría a ser del 12% en el cuarto tramo. Finalmente, y dado que a partir del cuarto tramo hay ya demasiados interrogantes acerca de la capacidad de esta FFA para consumir acetaldehído, ya no se harán más estimaciones. Con las consideraciones anteriores, las estimaciones de la proporción de alcoholes oxidados, son bastante razonables. Ligeramente superiores las dos primeras a las observadas en la FFA fresca, y muy superior la del tercer tramo, que sin embargo no pasa del 100%. Obsérvese que, si para este tramo hubiéramos supuesto que el consumo de acetaldehído estaba activo, este cociente se hubiera hecho mayor que 1.

Días	O ₂ consumido (mg/L)	CH ₃ CHO medido mg/L	s	CH ₃ CHO acumulado mg/L	CH ₃ CHO (mg/L) acumulado por tramo	CH ₃ CHO (mg/L) esperado por tramo	CH ₃ CHO reaccionado	CH ₃ CHO formado	Formado/ esperado (%)
0,00	0,00	64,80	0	64,8					
1,00	6,95	66,70	1,1	66,7	1,88	8,12	0	1,88	23,2%
2,20	11,1	68,30	1,1	68,3	1,62	4,86	0	1,62	33,3%
3,90	15,03	72,50	1,4	72,5	4,16	4,59	0	4,16	90,4%
10,90	23,37	73,70	1,6	73,7	1,24	9,75	1,9	3,19	32,8%
17,90	27,75	71,80	0,8	71,8	-1,94	5,11			
30,0	29,82	72,50	0,4	72,5	0,69	2,42			
TOTAL					7,64	34,9			39,7%

Tabla 6. Resumen de datos para la FFA envejecida: días de oxidación, oxígeno consumido (mg/L) y acetaldehído (mg/L) medido por HPLC. Acetaldehído (mg/L) acumulado por tramo. Acetaldehído esperado en cada tramo a partir del oxígeno (Oxígeno /32) *44*0.85. Acetaldehído reaccionado: se asume que la FFA no consume nada. Acetaldehído formado = acetaldehído acumulado /tramo + acetaldehído reaccionado más probable. Formado/ esperado (%). Total de cada columna teniendo en cuenta todos los puntos y excluyendo el último.

En términos globales, para los 4 tramos de la oxidación cubiertos, que corresponden al consumo de 23,4 mg/L de O₂ en unos 11 días, la proporción de alcohol oxidado a acetaldehído no llega al 40% del esperado, y la proporción de H₂O₂ invertida en oxidar otros metabolitos (H₂O₂ noCH₃CHO) asciende al 60%. Para el tramo equivalente, la FFA fresca muestra un H₂O₂ CH₃CHO inferior al 25% y un H₂O₂ not CH₃CHO superior al 75%.

3.3.3. Velocidad de consumo de O₂ y oxidación del etanol

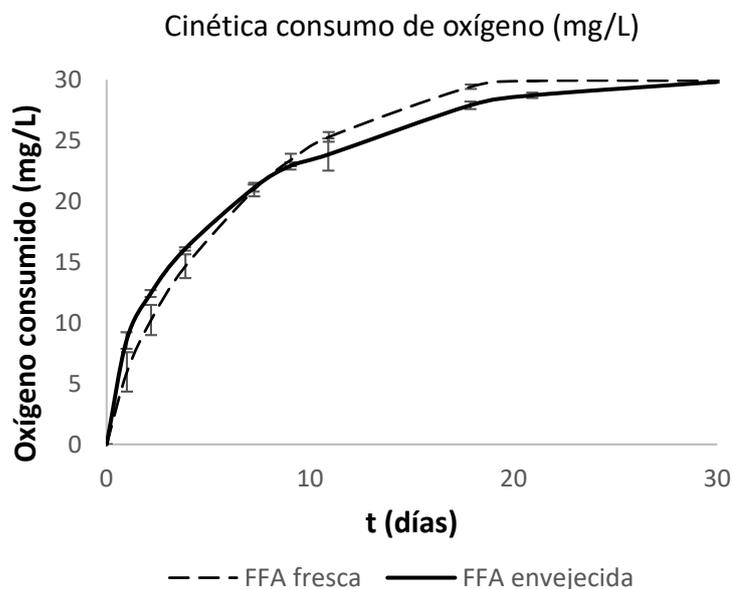


Figura 8. Cinética consumo de oxígeno (mg/L) frente días de oxidación Las barras de error representan $\sqrt{(S_f^2 + S_0^2)}$.

Atendiendo a la disparidad de comportamientos observados en la acumulación de acetaldehído entre la FFA original (fresca) y la FFA tratada con acetaldehído (envejecida),

según se vio en la **figura 5**, podría pensarse que la cinética de consumo de oxígeno ha de ser muy diferente en ambas muestras. Sin embargo, un vistazo a la **figura 8** muestra cinéticas de consumo de oxígeno aparentemente bastante similares. Pero si representamos las velocidades de consumo de O_2 y de acumulación de acetaldehído, esto es, las primeras derivadas con respecto al tiempo de ambas funciones, se pueden ver algunas interesantes coincidencias. Estas representaciones se muestran en la **figura 9**.

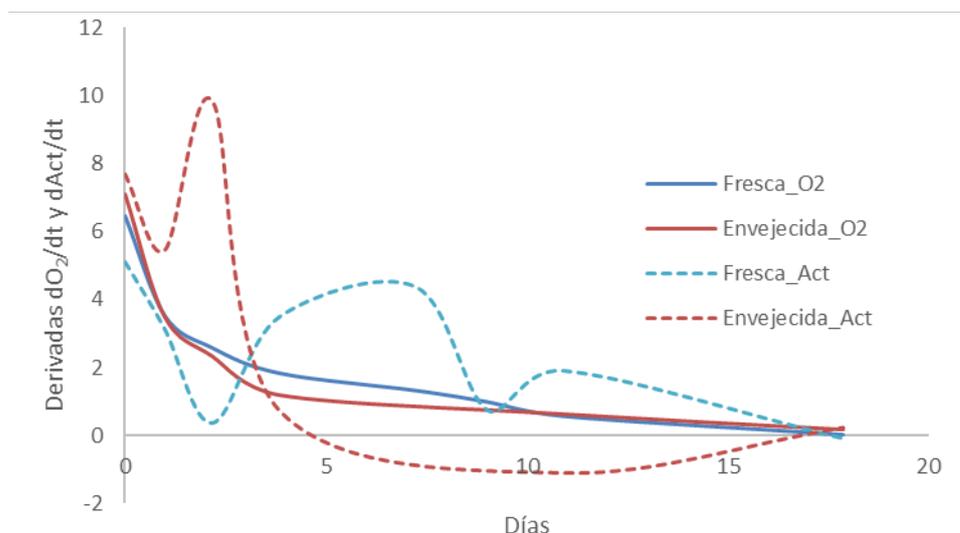


Figura 9. Representación de las primeras derivadas con respecto al tiempo de las curvas de acumulación de acetaldehído (líneas de puntos) y de las de consumo de O_2 (líneas continuas) para una FFA “fresca” y la misma FFA “envejecida” por incubación en presencia de acetaldehído. Por motivos de escala, las derivadas de acumulación de acetaldehído se han multiplicado por 4.

Puede verse que en ambas funciones de velocidad de consumo de O_2 (líneas continuas), hay un claro cambio de pendiente alrededor del día dos, que coincide con un máximo en la velocidad de acumulación de acetaldehído en la FFA envejecida (línea discontinua roja), y un mínimo para este parámetro en la fresca. Puede verse también que hay un segundo cambio de pendiente en la velocidad de acumulación de O_2 , solo visible en la FFA fresca, hacia los 10 días, cambio que igualmente coincide con un máximo en la velocidad de acumulación de acetaldehído. La **figura 9** sugiere, ciertamente, que la velocidad de consumo de O_2 y la curva de acumulación de acetaldehído están relacionadas.

La **figura 9** muestra claramente que la velocidad inicial de consumo de O_2 es relativamente similar en ambas FFAs, un poco mayor en la envejecida. Dicha velocidad va decreciendo rápidamente al comienzo con el tiempo, y lo hace con mayor rapidez en la envejecida. Cuando cambia la pendiente hacia el segundo día, se agudizan las diferencias, de manera que la FFA envejecida pasa a consumir O_2 de manera más lenta a la vez que comienza a acumular acetaldehído, observándose el máximo en la tasa de oxidación del etanol (**figura 7**). En ese mismo momento, la FFA fresca alcanza un mínimo en la velocidad de acumulación

de acetaldehído, que como se puede apreciar en la **figura 7**, coincide con el periodo en que menor proporción de etanol es oxidado.

Los cambios en la velocidad de oxidación están obviamente relacionados con el hecho de que algunos de los polifenoles monoméricos que se van oxidando forman quinonas inestables que tienden a polimerizarse con facilidad [26, 27], a veces formando polifenoles condensados con potenciales redox menores que los de sus ortodifenoles de partida [26], lo que provoca aumentos en la velocidad de consumo de O_2 . Los cambios en las fracciones " H_2O_2 CH_3CHO " y " H_2O_2 no CH_3CHO " son más complicados de explicar en el momento actual. Si bien es cierto que la reacción de Fenton ha sido asociada a consumos rápidos de O_2 [2, 28], debe tenerse en cuenta que es una reacción radicalaria muy compleja. El mecanismo propuesto contempla la reacción del oxígeno con el radical 1-hidroxietilo hasta formar rápidamente el radical hidroxietilperoxilo [28, 29], que de manera más lenta se descompone para dar radicales hidroperoxilo y acetaldehído. Puede argumentarse que los cambios en las fracciones " H_2O_2 CH_3CHO " y " H_2O_2 not CH_3CHO " están relacionados con la efectividad con la que los ácidos cinámicos presentes en el vino son capaces de secuestrar los radicales 1-HER, pero probablemente haya otras especies implicadas, incluso algunas que podrían reaccionar directamente con el H_2O_2 , compitiendo con el SO_2 , de las cuales conocemos bastante poco y de sus cinéticas relativas. Igualmente es difícil explicar cómo es posible que los cambios introducidos por el tratamiento de una FFA con acetaldehído, que esencialmente incrementará la cantidad de polifenoles condensados por puente de etilo [30] y provocará una disminución de polifenoles monoméricos, apenas afecte al consumo de oxígeno, pero lo haga de manera relevante en la cantidad de acetaldehído formado, que es mayor.

3.3.4. Cálculo del % de agua oxigenada empleada en formar acetaldehído en vinos tintos

En este punto del trabajo, con todo lo que sabemos sobre el consumo de acetaldehído podemos rescatar los datos cuantitativos de la oxidación del **capítulo 2** y calcular el porcentaje de agua oxigenada que se emplea en formar acetaldehído (" H_2O_2 CH_3CHO ") y su complementario, el que se emplea en oxidar otras especies por mecanismos no Fenton (" H_2O_2 no CH_3CHO "), tras oxidarlos con 30 mg/L de oxígeno no SO_2 . En aquel experimento se oxidaron 8 vinos tintos españoles (4 jóvenes y 4 envejecidos) a dos temperaturas (25 y 45 °C), nos fijaremos en la experiencia a temperatura ambiente.

Los cálculos que se presentan en la **tabla 7** son análogos a los realizados para las FFAs en el epígrafe anterior. En este caso se usan las siguientes premisas de consumo de acetaldehído en vinos (recogidas en el **capítulo 6**):

- a) En condiciones en las que no hay una oxidación efectiva que conduzca a posibles acumulaciones de acetaldehído, la velocidad de consumo de oxígeno se estima mediante la expresión:

$$U_{\text{acetaldehído}} = 0,01795 \cdot \frac{C_{\text{acetaldehído}}^{\circ}}{pH \cdot F_{\text{edad}}} - 0,00063 \quad [10]$$

Ecuación 10. Modelo que predice el consumo de acetaldehído en vinos tintos no sometidos a procesos de oxidación.

Aunque en el experimento se prevé acumulación de acetaldehído, se incluirá este dato como referencia en la **tabla 7**. Se recoge en la columna cuyo encabezado reza “CH₃CHO reaccionado en equilibrio”.

- b) En los casos en los que pueda haber una acumulación no excesiva de acetaldehído, se aplicará el dato obtenido de que la velocidad de consumo de acetaldehído es constante, tomando a 25°C un valor de $0,43 \pm 0,04$ mg/L por día. Este valor se recoge en la **tabla 7** en la columna de encabezado “CH₃CHO mínimo reaccionado”.
- c) En casos extremos de máxima acumulación de acetaldehído y mínima presencia de SO₂, se podría alcanzar el consumo máximo que estimamos en 0,79 mg/L/día (a 25°C). Este valor se recoge en la **tabla 7** en la columna de encabezado “CH₃CHO máximo reaccionado”.

Los valores de CH₃CHO reaccionado mínimo y máximo se suman a los valores acumulados medidos para dar las cantidades de CH₃CHO mínima y máxima formadas. Finalmente, a partir de las cantidades de CH₃CHO esperadas, estimadas bajo la hipótesis de que todo el H₂O₂ asociado a O₂ no SO₂ forma radicales HO• y el 85% de estos oxidan etanol a CH₃CHO, se obtienen los % formados/esperado mínimo y máximo, que son las fracciones “H₂O₂ CH₃CHO”.

Los resultados mostrados en la **tabla 7** muestran que las fracciones “H₂O₂ CH₃CHO” son bastante variables, ya que toman valores, en el caso de las mínimas, desde tan solo 8,85% hasta el 61,8%. La máxima variabilidad se observa entre los vinos envejecidos, que incluyen los dos ejemplares extremos. Por el contrario, los vinos jóvenes tienen fracciones “H₂O₂ CH₃CHO” mucho más homogéneas, de entre 30,6 y 48,7%. Si nos referimos a las fracciones máximas de “H₂O₂ CH₃CHO”, que son valores que podríamos definir como los más extremos posibles y que seguro que están sobre-estimados, las fracciones varían entre el 34,8% y el 116%, y entre el 51,4% y el 77,9% para los vinos jóvenes. Puede hacerse la consideración

que los valores denominados mínimos son en realidad los más probables, puesto que en el experimento de oxidación considerado no puede hablarse de alta acumulación de acetaldehído en ningún caso. Estos valores mínimos son bastante consistentes con los observados en las FFAs.

	Días oxidación	O ₂ consumido (mg/L)	CH ₃ CHO inicio mg/L	s	CH ₃ CHO final mg/L	s	CH ₃ CHO acumulado mg/L	CH ₃ CHO (mg/L) esperado por tramo	CH ₃ CHO reaccionado (mg/L) en equilibrio (Modelo)	CH ₃ CHO mínimo reaccionado (mg/L)	CH ₃ CHO máximo reaccionado (mg/L)	CH ₃ CHO mínimo formado (mg/L)	CH ₃ CHO máximo formado (mg/L)	Formado/ esperado mínimo (%)	Formado/ esperado máximo (%)
SL-2011	52,7	30,0	28,4	0,9	27,4	0,8	-1,0	35,1	4,81	22,7	41,6	21,7	40,6	61,8	116
TS-2012	52,7	34,0	26,2	0,1	22,4	0,6	-3,8	39,7	4,72	22,7	41,6	18,9	37,8	47,5	95,2
BL-2010	27,0	32,0	31,6	0,6	23,3	0,1	-8,3	37,4	2,51	11,6	21,3	3,31	13,0	8,85	34,8
CH-2009	52,6	34,0	26,7	0,2	23,7	0,5	-3,0	39,7	4,23	22,6	41,6	19,6	38,6	49,4	97,0
MF-2014	19,5	29,0	17,1	0,1	19,1	0,7	2,0	33,9	1,76	8,39	15,4	10,4	17,4	30,6	51,4
TP-2013	29,4	31,0	13,3	0,4	18,3	0,3	5,0	36,2	1,63	12,6	23,2	17,6	28,2	48,7	77,9
HV-2014	29,4	32,0	17,0	0,0	20,5	0,3	3,5	37,4	2,89	12,6	23,2	16,1	26,7	43,2	71,5
BS-2014	30,6	32,0	16,4	1,0	19,4	1,0	3,0	37,4	2,88	13,2	24,2	16,2	27,2	43,2	72,7
Media envejecidos														41,9%	85,7%
Media jóvenes														41,4%	68,3%
Media envejecidos sin BL														52,9%	102,7%
Media jóvenes														41,4%	68,3%

Tabla 7. Resumen de datos para la oxidación de vinos tintos a 25 °C (**capítulo 2**): días de oxidación, oxígeno consumido (mg/L) y acetaldehído (mg/L) medido al inicio y final de la oxidación. Acetaldehído (mg/L) acumulado en la oxidación. Acetaldehído esperado en cada tramo a partir del oxígeno (Oxígeno /32) *44*0.85. Acetaldehído reaccionado en equilibrio usando el modelo indicado en la **ecuación 10**. Acetaldehído mínimo reaccionado (0,43 mg/L/día) y Acetaldehído máximo reaccionado (0,79 mg/L/día) Acetaldehído formado = acetaldehído acumulado + acetaldehído reaccionado. Formado/ esperado (%). Media del % del formado/ esperado para envejecidos (los 4 primeros) y los jóvenes (4 últimos). Media del % del formado/ esperado para envejecidos y jóvenes obviando el BL-2010.

3.4. Estudio del efecto de la presencia de compuestos azufrados en el rendimiento de la formación de acetaldehído a partir del oxígeno consumido

Los experimentos anteriores confirman de manera indubitable que el H₂O₂ formada durante la oxidación del vino no va de manera mayoritaria a la oxidación del etanol, salvo en ciertas circunstancias. Por el contrario, esta molécula va a la oxidación preferente, bien por vía directa, bien por atrapamiento selectivo de alguno de los radicales intermedios, de diversos antioxidantes contenidos en el vino. Se ha demostrado, en particular, que los ácidos cinámicos son capaces de evitar la oxidación del etanol por reacción directa con el radical 1-HER• [31]. Otras moléculas que podrían interferir en la reacción Fenton de diversas maneras son algunas de las especies azufradas que el vino contiene, ya que es sabido que el H₂O₂ puede oxidar de manera directa funciones mercapto a formas disulfuro, e incluso que puede forzar la oxidación de sulfuros a sulfóxidos y sulfonas [32]. Es además destacable que, en varios experimentos previos, se han identificado formas oxidadas de metionina y cisteína [33] y que se ha señalado que los compuestos azufrados pueden interaccionar con el radical 1- hidroxietilo [3]. En este epígrafe veremos si es cierto que estos componentes, en las concentraciones a las que pueden llegar a estar en vinos, son capaces de afectar de manera significativa la formación de acetaldehído, y en qué proporción pueden hacerlo.

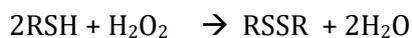
La estrategia seguida ha sido oxidar un vino tinto que contiene 6,4 mg/L de SO₂ libre, fortificado o no con los principales compuestos azufrados del vino, con agua oxigenada en un ambiente de anoxia estricta. Los compuestos adicionados han sido glutatión (40 mg/L), cisteína (10 mg/L), metionina (30 mg/L) y H₂S (0,5 mg/L). Se comparará el acetaldehído acumulado en el vino tinto control frente al del mismo vino tinto fortificado con los compuestos azufrados indicados.

Los resultados del experimento se muestran en la **figura 10**. Como puede verse, la adición de los compuestos a estudio tiene un efecto muy significativo sobre la acumulación de acetaldehído, cuyos niveles en la muestra fortificada fueron casi un 17% inferiores. En concreto, en la muestra control (sin añadir azufrados) se formaron 35,4 mg/L de acetaldehído y en la muestra fortificada, 29,4 mg/L, esto es se formaron 6 mg/L (0,14 mM) de acetaldehído menos.

Considerando que 1 mol de agua oxigenada forma un mol de radical OH• y que éste cuando reacciona con el etanol forma 0,85 moles del radical 1-hidroxietilo (1-HER•) que es el precursor del acetaldehído [1], se requieren $0,14/0,85 = 0,16$ mM de agua oxigenada para formar ese acetaldehído, o sea, 5,45 mg/L. Dado que la cantidad de H₂O₂ añadida fue de 1,69 mM (57,5 mg/L), los compuestos azufrados han “secuestrado” el 9,5% del H₂O₂ añadida.

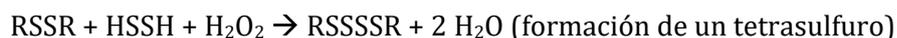
Veamos cuál es el destino más probable de esos 5,45 mg/L de H₂O₂.

La oxidación de los mercaptanos a sus formas disulfuro sigue una estequiometría 2:1



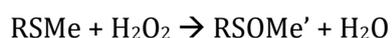
Ya que se adicionaron 40 mg/L (0,13 mM) de glutatión, 10 mg/L (0,08 mM) de cisteína y 0,5 mg/L de H₂S (0,015 mM), se necesitan, de acuerdo con la estequiometria indicada, (0,13+0,08+0,015) mM / 2= 0,112 mM (3,82 mg/L) de agua oxigenada para oxidarlos hasta los disulfuros, por lo que quedan sin explicar 1,62 mg/L (=5,45-3,82) de agua oxigenada.

Esta cantidad remanente puede proseguir la oxidación del H₂S a polisulfuros y polisulfanos mixtos, varios de los cuales han sido descritos recientemente en vino [34]



Y que podría explicar fácilmente otro 0,13 mg/L de agua oxigenada si se obtiene el tetrasulfano a partir del sulfhídrico.

La siguiente oxidación que podrían llevar a cabo los 1,49 mg/L de agua oxigenada remanentes, sería la oxidación de sulfuros, como la metionina, a su correspondiente sulfóxido.



Como de metionina tenemos 30 mg/L, que son 0,20 mM, se podrían consumir en esta reacción hasta 6,8 mg/L de H₂O₂, ya por encima de la cantidad de H₂O₂ empleada en oxidar estas moléculas. Si los 1,49 mg/L de H₂O₂ disponibles se invirtieran completamente en esta oxidación, se estaría oxidando un 22% de la metionina presente.

Por tanto, puede sugerirse que el H₂O₂ que se ha detraído de la oxidación del etanol, se ha invertido en la oxidación cuantitativa de H₂S y mercaptanos a disulfuros, polisulfanos y polisulfuros y una pequeña parte sobrante (un 20%) a la oxidación de una fracción de los sulfuros presentes a los correspondientes sulfóxidos. Puede también concluirse que la oxidación de estas moléculas azufradas no parece ocurrir hasta los niveles de oxidación superiores posible (sulfona o ácido sulfónico), sino que parece llegar tan sólo hasta la formación de disulfuros y polisulfuros y, de manera parcial, a sulfóxidos.

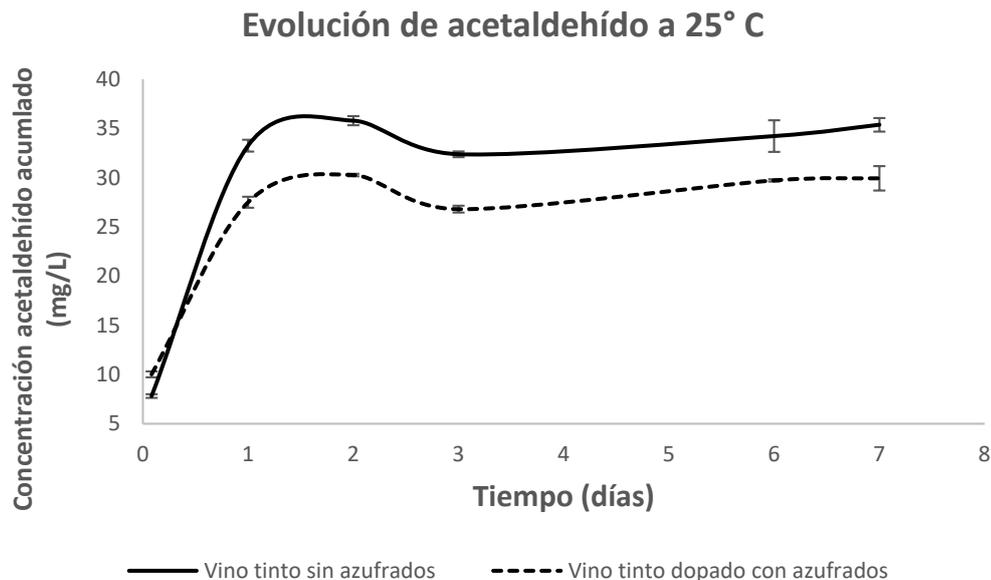


Figura 10. Acetaldehído acumulado (mg/L) en un vino control y un vino dopado con azufrados tras oxidar con agua oxigenada = Concentración (mg/L) día x - concentración original del vino (mg/L). El primer punto se refiere a la acumulación de acetaldehído justo después de añadir el agua oxigenada. Las barras de error representan $\sqrt{(S_f^2 + S_0^2)}$.

Balance del H_2O_2 :

En la muestra control, los 57,5 mg/L de H_2O_2 (1,69 mM) se han invertido en:

1. Oxidar 5,6 mg/L de SO_2 libre (0,0875 mM de agua oxigenada)
2. Producir 35,4 mg/L de acetaldehído por oxidación de 37 mg/L de etanol (0,805 mM de agua oxigenada)
3. Otros alcoholes y ácidos mayoritarios por la misma vía Fenton (unos 0,142 mM, de manera que el 85% haya ido a oxidar etanol)

Por tanto, quedan sin justificar $1,69 - (0,1 + 0,805 + 0,142) = 0,643$ mM de H_2O_2 , que se habrán invertido en oxidar:

1. las formas reducidas de cationes metálicos (0,045 mM asumiendo 2,5 mg/L de Fe(II)),
2. los mercaptanos nativos (0,065 mM, asumiendo 20 mg/L de glutatión) [3],
3. el H_2S (0,029 mM, asumiendo 0,5 mg/L llevados a tetrasulfano o tetrasulfuro) [34]
4. material polifenólico y otras especies (0,518 mM, para cuadrar el balance)

Los cálculos para este vino y para el dopado con una cantidad adicional de azufrados se muestran a continuación en la **tabla 8**.

	Concentración mg/L	Mmol	mM	%	Concentración mg/L	Mmol	mM	%
SO ₂	5,6	64	0,088	5,20%	6,5	64	0,102	6,00%
Acetaldehído	35,4	44	0,805	47,6%	29,4	44	0,668	39,5%
Radical (2-HER*)			0,142	8,40%			0,118	7,00%
Fe(II)	2,5	56	0,045	2,60%	2,5	56	0,045	2,60%
Glutacion	20	307	0,065	3,90%	20	307	0,065	3,90%
H ₂ S	0,5	34	0,029	1,70%	0,5	34	0,029	1,70%
Polifenoles			0,518	30,6%			0,504	29,8%
Plus azufrados							0,160	9,50%
		TOTAL	1,691	100%		TOTAL	1,691	100%

Tabla 8. Propuesta de destino del uso del agua oxigenada añadida para oxidar un vino tinto control y vino tinto con dopado con azufrados. Eliminación del sulfuroso libre medido por Rankine [12], formación de acetaldehído medido por HPLC [6], el resto de las estimaciones se han calculado según bibliografía: uso del 15 % en compuestos mayoritarios [1], oxidación de glutación hasta disulfuro [3] y oxidación del ácido sulfhídrico hasta tetrasulfuro o tetrasulfano [34].

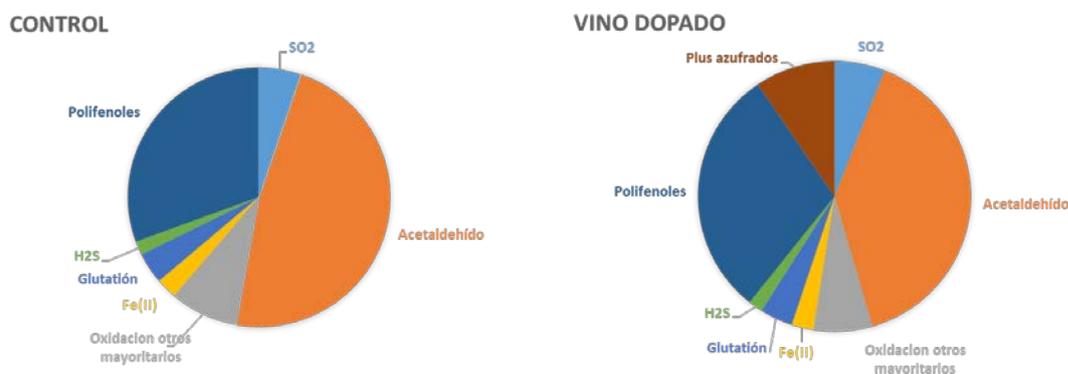


Figura 11. Comparación del destino del uso del agua oxigenada añadida para oxidar un vino tinto control y vino tinto con dopado con azufrados de acetaldehído.

Por tanto, puede concluirse que el H₂O₂ formada en la reducción del O₂, no tiene como destinos mayoritarios la oxidación de SO₂ y la oxidación del etanol, tal y como parece deducirse de los esquemas de oxidación propuestos por Wildenradt & Singleton y después revisados por Danilewicz [2, 35-37] y comúnmente aceptados; sino que una fracción de la misma se empleará en la oxidación de H₂S y mercaptanos a disulfuros [3], polisulfuros y polisulfanos [34] e incluso en la oxidación de una fracción de sulfuros como la metionina, a sus sulfóxidos. Una segunda fracción, se dedicará a oxidar material fenólico, cuya naturaleza hasta el momento actual, es pobremente conocida. Finalmente, sólo una fracción, que en bastantes casos no será mayoritaria, irá a oxidar etanol.

3.5. Reinterpretación de los modelos del capítulo 2

No obstante, la existencia en los procesos de oxidación de fracciones “H₂O₂ not CH₃CHO” de considerable magnitud obliga a hacer una relectura de los modelos PLS presentados en el **capítulo II (Tablas 5a y 5b)** explicando la acumulación de acetaldehído en los distintos vinos. En estos modelos, lo que se modelizó fue lo que entonces denominamos “fracción de acetaldehído no reaccionada” (o retenida) que no es más que el cociente entre el acetaldehído medido y el acetaldehído esperado, y que está, por tanto, relacionada con el concepto que denominamos fracción “H₂O₂ CH₃CHO”. No es exactamente igual, ya que en el trabajo original se asumía que todo el H₂O₂ no reaccionado con SO₂ se había transformado en acetaldehído, mientras que ahora el H₂O₂ no reaccionada con SO₂ se divide en:

1. “H₂O₂ CH₃CHO”
 - a. Acetaldehído remanente
 - b. Acetaldehído reaccionado, estimado por cálculo
2. “H₂O₂ no CH₃CHO”

Esto es, la fracción de acetaldehído remanente es la fracción de acetaldehído no reaccionado. El modelo que desarrollamos establecía que la capacidad de cada vino de acumular acetaldehído viene limitada por sus contenidos en algunos polifenoles mono o diméricos, como la epicatequina-3-O-galato, la MV3G o el dímero catequín-etil-malvidín. En aquel momento interpretamos su papel como compuestos consumidores de acetaldehído. En este punto podríamos especular que se trata en realidad de sustratos que compiten con el alcohol en la oxidación e inhiben, de un modo u otro, la formación del acetaldehído. Como se mencionó antes, la inhibición podría hacerse por reacción directa con el H₂O₂, o mediante el quenching de alguno de los radicales derivados del 1-HER•. La epicatequina-3-O-galato (**tabla 5a**) se ha demostrado que reacciona más fácilmente con el oxígeno que sus correspondientes no galatos [38], pero hasta donde conocemos, su capacidad de evitar la producción de acetaldehído no ha sido estudiada. No obstante, la posibilidad de que algunas de estas sustancias compitan directamente por el H₂O₂, estarían en consonancia con las observaciones de Ferreira y col [21] y Carrascón y col [23] relativas a la existencia de un oxidante más activo que el SO₂ y capaz de evitar el consumo de éste antioxidante incluso estando disponible.

Es también remarcable que las curvas de velocidades de consumo de O₂ mostradas en la **figura 9**, son consistentes con la observación de que la cinética de consumo de O₂ está negativamente relacionada con la cantidad de acetaldehído del vino [21, 23, 33]. En la misma línea están los resultados incluidos en **figura 11**. En este ensayo se envejeció la FFA

pT2 con consumos previos de 8 y 36 mg/L de acetaldehído, quedando remanentes 17 y 24 mg/L respectivamente (quedan codificadas como FFA 8, 17 y FFA 36, 24). Se les aplicó una saturación (8-9 mg/L de oxígeno) a las muestras y a sus controles FFA 0, 17 y FFA 0, 24. En las curvas de cinética de oxígeno **figura 11** se observa que la que contiene menor cantidad de acetaldehído (FFA 8, 17) es la que más rápido consume el oxígeno, seguida de la FFA 36, 24, mientras que los dos controles usados en este experimento consumieron el oxígeno más lentamente. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los polifenoles condensados por puentes de etilo tienden a consumir el oxígeno más rápido que las muestras control [26].

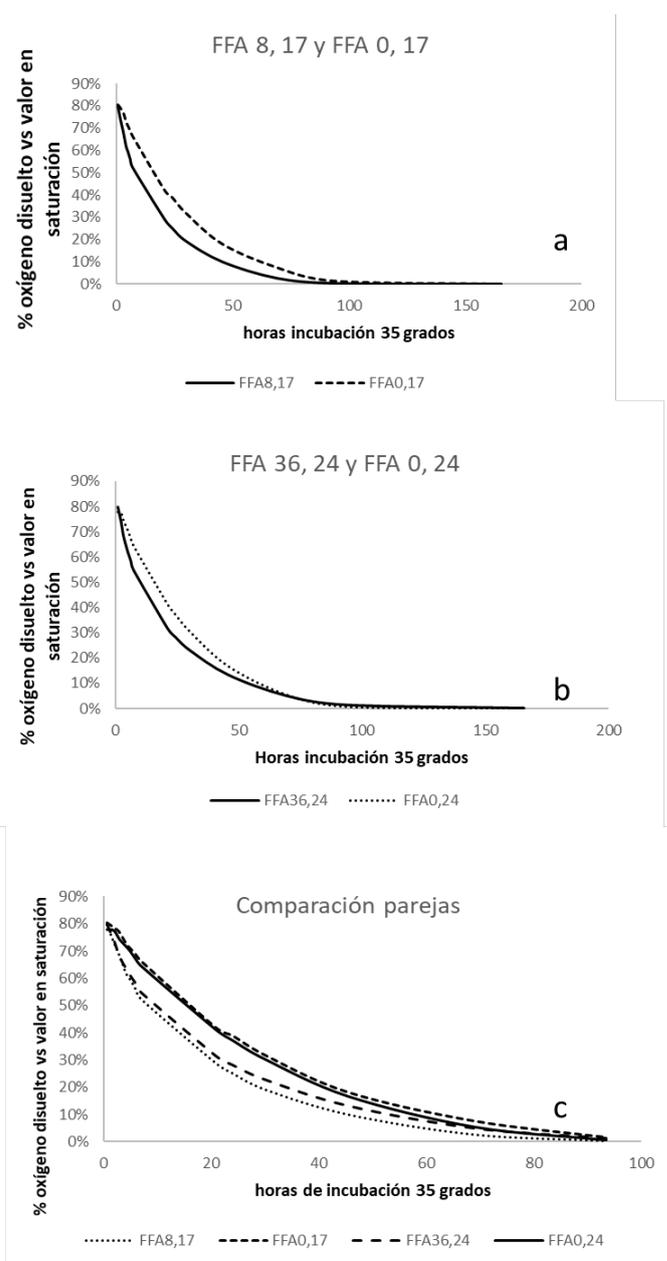


Figura 11. Consumo de oxígeno disuelto de la FFA pT2 (% respecto al inicio) en función del tiempo. **11a** comparación de la FFA 8,17 y su control 0,17. **11b** comparación de la FFA 36,24 y su control 0,24. **11c** comparación de las dos parejas.

4. Conclusiones

1. La reacción acetaldehído – material fenólico no se ve acelerada incluso si se realiza en presencia de acetaldehído formado in situ, por lo que no hay razones para suponer que los consumos de acetaldehído medidos en vinos o en fracciones polifenólicas, no representen bien los consumos reales en procesos de oxidación en vino.

2. Los estudios realizados con fracciones fenólicas extraídas directamente de uvas han permitido establecer que la proporción de alcohol efectivamente oxidado a acetaldehído, o fracción “ $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ CH}_3\text{CHO}$ ” es bastante pequeña, situándose de media entre el 34 y el 41%. Esta fracción va incrementándose a lo largo del proceso de oxidación, llegando a ser mayoritaria sólo en los últimos periodos en los que la velocidad de consumo es muy baja.

3. Demostrado que es posible emplear las velocidades de consumo de acetaldehído medidas en otros experimentos, es factible estimar las fracciones de “ $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ CH}_3\text{CHO}$ ” y “ H_2O_2 not CH_3CHO ” en cualquier experimento de oxidación controlada en el que se mida con el tiempo el O_2 , SO_2 y acetaldehído total. La aplicación al experimento analizado en el capítulo 2 confirma que las fracciones “ $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ CH}_3\text{CHO}$ ” son muy variables entre los vinos envejecidos, tomando valores de desde tan solo 8,85% hasta el 61,8%, mientras que para los jóvenes estuvieron entre el 30,6 y el 48,7%.

4. Se ha comprobado, finalmente, que los compuestos azufrados mayoritarios del vino, son capaces de reducir en un 17% la cantidad de acetaldehído formado. Mediante cálculos estequiométricos se concluye que los mercaptanos son cuantitativamente oxidados a disulfuros, que el H_2S es llevado a tetrasulfanos o incluso a polisulfanos superiores, y que una pequeña proporción de sulfuros, como la metionina, podrían ser oxidados a sus sulfóxidos, descartándose, sin embargo, que se alcancen estados de oxidación superiores.

5. Como conclusión final, queda demostrado que la oxidación del alcohol no es el proceso dominante en la segunda reducción del O_2 durante la oxidación del vino, en ausencia de SO_2 . Los distintos cálculos estequiométricos y de reactividad nos permiten establecer que en los procesos de oxidación habituales, tan sólo entre el 30 y el 50% del H_2O_2 formada en la primera reducción del O_2 se emplea en oxidar etanol, un 15% adicional oxida cationes y mercaptanos, y el resto oxida polifenoles a través de mecanismos, que salvo para el caso de los ácidos cinámicos, no son bien conocidos.

5. Referencias

1. Elias, R.J., et al., *Identification of Free Radical Intermediates in Oxidized Wine Using Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(10): p. 4359-4365.
2. Danilewicz, J.C., *Reactions Involving Iron in Mediating Catechol Oxidation in Model Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2013.
3. Kreitman, G.Y., V.F. Laurie, and R.J. Elias, *Investigation of Ethyl Radical Quenching by Phenolics and Thiols in Model Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(3): p. 685-692.
4. Marquez, K., et al., *Production of hydroxyl radicals and their relationship with phenolic compounds in white wines*. Food Chemistry, 2019. **271**: p. 80-86.
5. Danilewicz, J.C. and P.J. Wallbridge, *Further Studies on the Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfite in Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2010. **61**(2): p. 166-175.
6. Han, G.M., et al., *A rapid, one step preparation for measuring selected free plus SO₂-bound wine carbonyls by HPLC-DAD/MS*. Talanta, 2015. **134**: p. 596-602.
7. Gonzalez-Hernandez, M., et al., *Ultra Performance Liquid Chromatography Coupled to Ultraviolet-Vis and Mass Spectrometry Detector for Screening of Organic Acids and Polyphenols in Red Wine in High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Practices and Procedures*, Y. Zuo, Editor 2014, Nova Science Pub Inc: New York.
8. Blanco-Vega, D., S. Gomez-Alonso, and I. Hermosin-Gutierrez, *Identification, content and distribution of anthocyanins and low molecular weight anthocyanin-derived pigments in Spanish commercial red wines*. Food Chemistry, 2014. **158**: p. 449-458.
9. Alegre, Y., et al., *Development of a new strategy for studying the aroma potential of winemaking grapes through the accelerated hydrolysis of phenolic and aromatic fractions (PAFs)*. Food Research International, 2020. **127**.
10. Carrascon, V., et al., *Oxygen and SO₂ Consumption Rates in White and Rose Wines: Relationship with and Effects on Wine Chemical Composition*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017. **65**(43): p. 9488-9495.
11. Marrufo-Curtido, A., et al., *A procedure for the measurement of Oxygen Consumption Rates (OCRs) in red wines and some observations about the influence of wine initial chemical composition*. Food Chemistry, 2018. **248**: p. 37-45.
12. OIV, *OIV-MA-AS323-04A Sulphur dioxide. Compendium of International Methods of Analysis*, 2009.
13. Bueno, M., et al., *Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation*. Frontiers in Chemistry, 2018. **6**.
14. Ugliano, M., et al., *Evolution of 3-Mercaptohexanol, Hydrogen Sulfide, and Methyl Mercaptan during Bottle Storage of Sauvignon blanc Wines. Effect of Glutathione*,

- Copper, Oxygen Exposure, and Closure-Derived Oxygen*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(6): p. 2564-2572.
15. Fracassetti, D., et al., *Light-induced reactions of methionine and riboflavin in model wine: Effects of hydrolysable tannins and sulfur dioxide*. Food Chemistry, 2019. **298**.
 16. Martínez, J. and E.L.y.E. García-Escudero, *Efecto varietal sobre el contenido de glutatión en mostos y vinos blancos*. 37th World Congress of Vine and Wine and 12th General Assembly of the OIV (Part 2), 2014: p. 06003.
 17. Timberlake, C.F. and P. Bridle, *INTERACTIONS BETWEEN ANTHOCYANINS, PHENOLIC COMPOUNDS, AND ACETALDEHYDE AND THEIR SIGNIFICANCE IN RED WINES*. American Journal of Enology and Viticulture, 1976. **27**(3): p. 97-105.
 18. Sheridan, M.K. and R.J. Elias, *Reaction of Acetaldehyde with Wine Flavonoids in the Presence of Sulfur Dioxide*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(45): p. 8615-8624.
 19. 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): p. 319-328.
 20. Danilewicz, J.C., J.T. Seccombe, and J. Whelan, *Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2008. **59**(2): p. 128-136.
 21. Ferreira, et al., *Oxygen Consumption by Red Wines. Part I: Consumption Rates, Relationship with Chemical Composition, and Role of SO₂*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(51): p. 10928-10937.
 22. Carrascon, V. and V. Ferreira. *Accurate and sensitive determination of free and total sulfur dioxide and acetaldehyde in wine by headspace gas chromatography mass spectrometry*. in *IX In Vino Analytica Scientia*. 2015. Trento (Italy).
 23. Carrascon, V., et al., *Oxygen Consumption by Red Wines. Part II: Differential Effects on Color and Chemical Composition Caused by Oxygen Taken in Different Sulfur Dioxide-Related Oxidation Contexts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(51): p. 10938-10947.
 24. Danilewicz, J.C., *Chemistry of Manganese and Interaction with Iron and Copper in Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2016. **67**(4): p. 377-384.
 25. McRae, J.M., et al., *Effect of Wine pH and Bottle Closure on Tannins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(47): p. 11618-11627.
 26. Singleton, V.L., *Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines and Model Systems - Observations and Practical Implications*. American Journal of Enology and Viticulture, 1987. **38**(1): p. 69-77.
 27. CHEYNIER, V., C. OWE, and J. RIGAUD, *Oxidation of Grape Juice Phenolic Compounds in Model Solutions*. Journal of Food Science, 1988. **53**(6): p. 1729-1732.
 28. Elias, R.J. and A.L. Waterhouse, *Controlling the Fenton Reaction in Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(3): p. 1699-1707.

29. Danilewicz, J.C., *Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper*. American Journal of Enology and Viticulture, 2003. **54**(2): p. 73-85.
30. Baranowski, E.S. and C.W. Nagel, *KINETICS OF MALVIDIN-3-GLUCOSIDE CONDENSATION IN WINE MODEL SYSTEMS*. Journal of Food Science, 1983. **48**(2): p. 419-&.
31. Gislason, N.E., B.L. Currie, and A.L. Waterhouse, *Novel Antioxidant Reactions of Cinnamates in Wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(11): p. 6221-6226.
32. Waterhouse, A.L., G.L. Sacks, and D.W. Jeffery, *Understanding Wine Chemistry*. Understanding Wine Chemistry 2016, Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 1-443.
33. Carrascon, V., et al., *The kinetics of oxygen and SO₂ consumption by red wines. What do they tell about oxidation mechanisms and about changes in wine composition?* Food Chemistry, 2018. **241**: p. 206-214.
34. Kreitman, G.Y., et al., *Copper(II)-Mediated Hydrogen Sulfide and Thiol Oxidation to Disulfides and Organic Polysulfanes and Their Reductive Cleavage in Wine: Mechanistic Elucidation and Potential Applications*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017. **65**(12): p. 2564-2571.
35. Wildenradt, H.L. and V.L. Singleton, *The Production of Aldehydes as a Result of Oxidation of Polyphenolic Compounds and its Relation to Wine Aging*. American Journal of Enology and Viticulture, 1974. **25**(2): p. 119-126.
36. Danilewicz, J.C., *Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper*. American Journal of Enology and Viticulture, 2007. **58**(1): p. 53-60.
37. Danilewicz, J.C., *Reaction of Oxygen and Sulfite in Wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2016. **67**(1): p. 13-17.
38. Cheynier, V. and J.M. Ricardo da Silva, *Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyltartaric acid and polyphenol oxidase*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991. **39**(6): p. 1047-1049.
39. Vallverdu-Queralt, A., et al., *A comprehensive investigation of guaiacyl-pyranoanthocyanin synthesis by one-/two-dimensional NMR and UPLC-DAD-ESI-MSn*. Food Chemistry, 2016. **199**: p. 902-910.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado un método de oxidación a 25° C, que permite caracterizar la cinética de consumo de oxígeno de vinos de una manera muy exacta y precisa. Una de las principales ventajas introducidas por esta metodología es la posibilidad de aportar altas dosis de oxígeno, obteniéndose por ello, la categorización completa de la cinética de consumo de oxígeno que se ha descrito con 6 velocidades. Los modelos que relacionan la cinética y la composición inicial de 8 vinos tintos revelan que el acetaldehído total, los metales (Cu, Fe y Mn), el sulfuroso libre y la absorbancia a 520 y 620 nm parecen definir estas velocidades.
- Se ha comprobado que al aplicar el método de oxidación a 8 vinos tintos se ha alcanzado la formación *de novo* de acetaldehído y aldehídos de Strecker. Asumiendo que el principal producto de la oxidación es el acetaldehído, se ha estimado la concentración de acetaldehído teóricamente formada que, en comparación con la cantidad acumulada experimental ha permitido obtener la concentración de acetaldehído teórico consumido – este valor alcanzó los 45 mg/L en vinos jóvenes en 30 días-. Se hipotetiza que esa concentración de acetaldehído es consumida por los polifenoles durante la oxidación, y a esos polifenoles reactivos con aldehídos los denominamos (ARPs). Los modelos que relacionan la acumulación (o acetaldehído sin reaccionar) con la composición inicial de los vinos tintos predicen que los ARPs serán principalmente antocianos y taninos pequeños. Los modelos obtenidos para los aldehídos de Strecker parecen confirmar la existencia de ARPs y sugieren que la vía prioritaria de formación de aldehídos es la degradación de Strecker a partir de sus aminoácidos precursores, y que el diacetilo (α - dicarbonilo) podría ser un precursor específico del fenilacetaldehído.
- La cinética de consumo de oxígeno a 45 °C es más rápida que a temperatura ambiente. Aunque con el método acelerado de oxidación se definen 3 velocidades, es posible obtener la mayoría de los tramos cinéticos a 25 °C modelizando con respecto a medidas de oxígeno disuelto a 45 °C. En cuanto a la acumulación de acetaldehído y aldehídos de Strecker, la acumulación de 2-metilbutiraldehído, 3-metilbutiraldehído, metional y en menor medida isobutiraldehído a 45 °C es muy similar y está correlacionada con la cantidad acumulada a temperatura ambiente. Sin embargo, para el fenilacetaldehído y acetaldehído los patrones de acumulación se ven muy afectados por la temperatura de incubación. Según los modelos, la temperatura de oxidación influye en los dos procesos que afectan a la acumulación

de aldehídos: formación de quinonas (α -dicarbonilo) y la reacción de los aldehídos con los antocianos (ARPs). La existencia de los ARPs comienza a estar cuestionada ya que experimentos independientes donde se dopan aldehídos de Strecker en anoxia, la estabilidad de los mismos parece ser independiente a la composición polifenólica de los vinos.

- Se ha comprobado que el diacetilo no es particularmente reactivo en la degradación de Strecker y que no es un precursor específico del fenilacetaldehído. Además, se ha demostrado que la acumulación de aldehídos de Strecker depende más del pH y el tiempo de oxidación que de la composición polifenólica del vino.
- Aunque se han probado varias estrategias en el desarrollo del método de ARPs, no ha sido posible obtener un índice que lo defina. El principal motivo es que la reactividad del acetaldehído de un vino es muy limitada y errática como para explicar el escaso acetaldehído acumulado durante la oxidación. El papel consumidor de acetaldehído atribuido a antocianos y taninos pequeños necesita ser reinterpretado dentro del ciclo de oxidación.
- El consumo de acetaldehído en FFAs en condiciones anoxia es dependiente de la concentración de dopado e independiente de la composición química de las mismas. La FFA más reactiva ha consumido acetaldehído a una velocidad de 0,9 mg/L/día. La cinética de consumo de acetaldehído es rápida (orden 3) y se va ralentizando con el tiempo. Esta pérdida de reactividad podría ser debida a la formación de aductos acetaldehído-polifenol. Estos “aductos intermedios” serían lo suficientemente estables como para evitar que el acetaldehído esté disponible para reaccionar irreversiblemente con el material polifenólico; y lo suficientemente lábiles como para romperse en el método de determinación con DNPH y obtenerse señal analítica. Para poder confirmar esta hipótesis sería necesario determinar el acetaldehído libre.

En vinos, el consumo de acetaldehído es lento alcanzando una velocidad de 0,2 mg/L/día. La velocidad de consumo de acetaldehído se ha conseguido modelizar en función de la concentración de acetaldehído inicial, pH y edad del vino. En vinos el consumo de acetaldehído sigue una reacción de pseudo primer orden.

Durante los procesos de oxidación donde el acetaldehído se puede acumular, el consumo de acetaldehído es lento y prácticamente independiente de la composición polifenólica. La velocidad media de consumo es de $0,43 \pm 0,04$ mg/L/día. En los

casos más extremos -donde hay más acetaldehído en exceso de partida-, la velocidad de consumo puede alcanzar 0,79 mg/L/día.

- Se ha demostrado que el principal destino del agua oxigenada formada en la oxidación no es la formación de acetaldehído. Los resultados sugieren que como mínimo un 50 % del H₂O₂ se emplea en oxidar otros compuestos mayoritarios del vino, como polifenoles, cationes y mercaptanos. Esto explicaría por qué en los modelos donde se explicaba la acumulación de acetaldehído, los antocianos y taninos aparecieran con coeficientes negativos; ya que estos compuestos mayoritarios en lugar de consumir acetaldehído, se estarían oxidando inhibiendo por tanto la formación de este aldehído.

ANEXOS

Anexo 1. Información suplementaria del Capítulo III

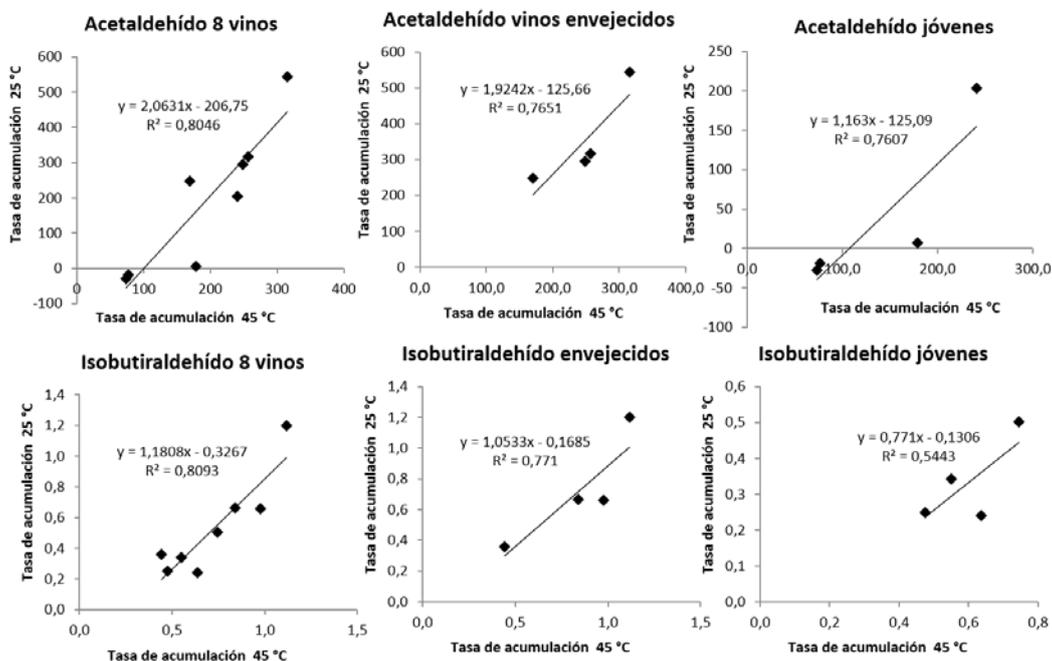


Figura 1. Representación de la tasa de acumulación (calculado usando la ecuación 2) a 45 grados frente a 25 grados para acetaldehído e isobutiraldehído.

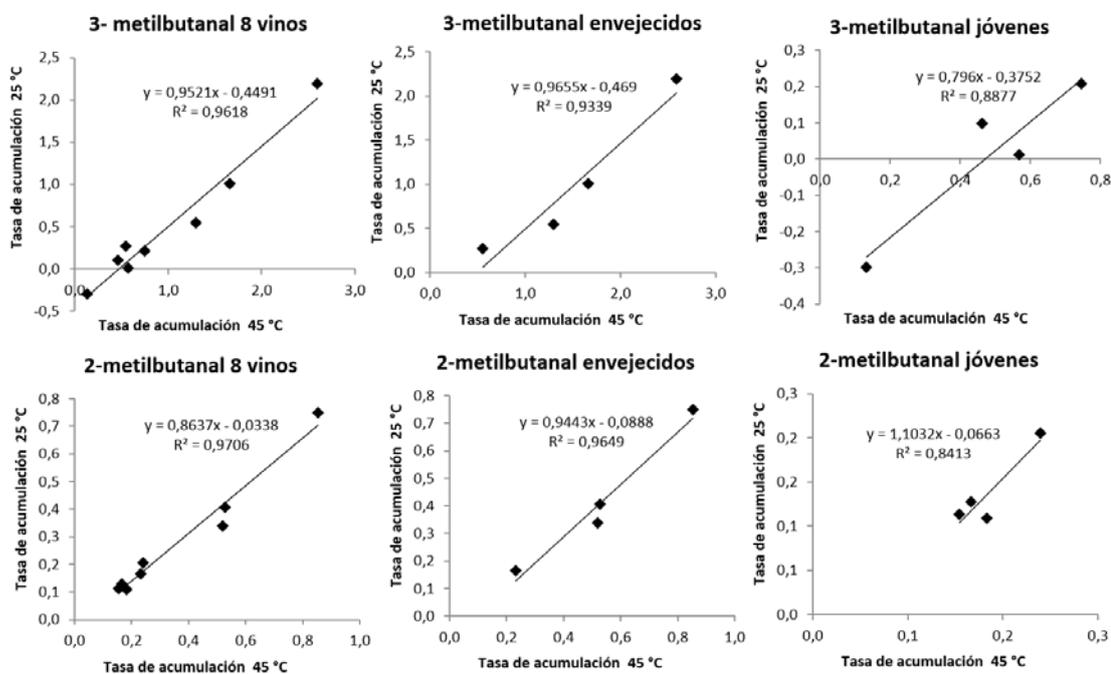


Figura 2. Representación de la tasa de acumulación (calculado usando la ecuación 2) a 45 grados frente a 25 grados para 3-metilbutanal y 2-metilbutanal.

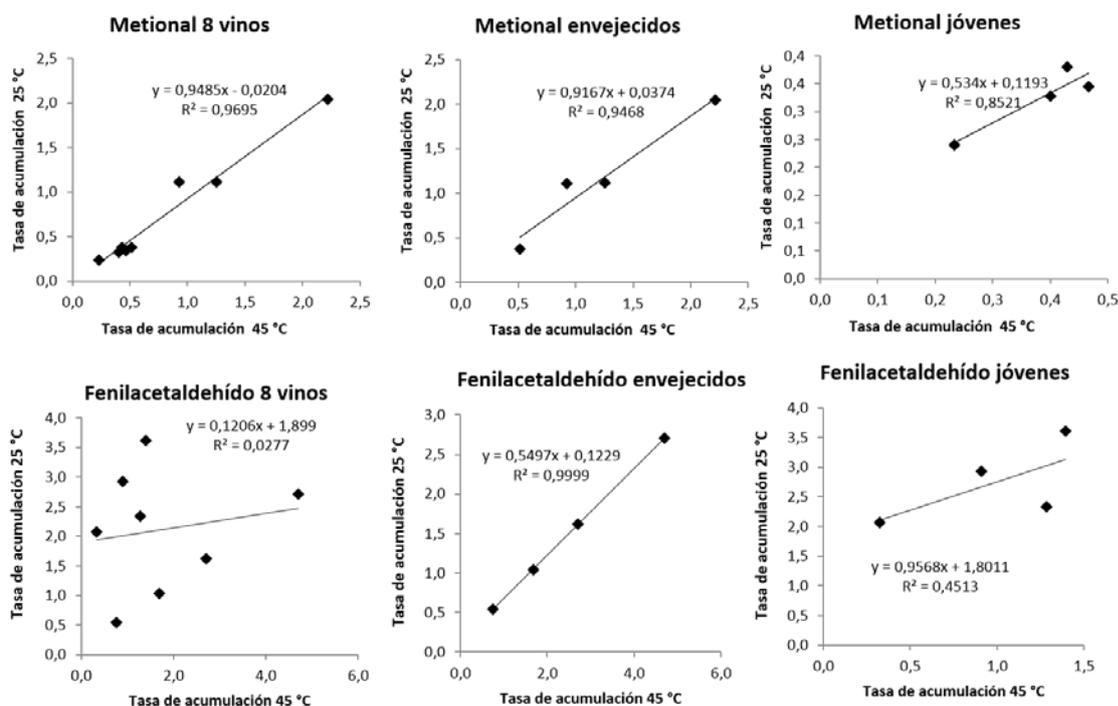


Figura 3. Representación de la tasa de acumulación (calculado usando la ecuación 2) a 45 grados frente a 25 grados para metional y fenilacetaldehído.

	25 ° C incubación durante 36 días				
	Isobutiraldehído µg/L	2-metilbutanal µg/L	Isovaleraldehído µg/L	Metional µg/L	Fenilacetaldehído µg/L
SL	26,4 ± 0,4	10,3 ± 0,3	65,4 ± 0,1	80,0 ± 0,2	76,3 ± 0,3
TS	22,5 ± 0,3	10,0 ± 0,4	56,7 ± 0,2	69,9 ± 0,3	53,6 ± 0,5
BL	23,7 ± 0,1	10,5 ± 0,5	59,3 ± 0,1	66,1 ± 0,5	53,8 ± 0,8
CH	24,8 ± 0,9	10,8 ± 0,2	64,9 ± 0,1	76,6 ± 0,8	70,9 ± 0,4
MF	20,5 ± 0,8	7,60 ± 0,2	62,8 ± 0,2	37,3 ± 0,3	50,9 ± 0,5
TP	24,4 ± 0,5	10,7 ± 0,1	41,8 ± 0,2	58,4 ± 0,2	42,8 ± 0,7
HV	22,6 ± 1,6	9,70 ± 0,1	48,5 ± 0,3	66,6 ± 0,2	51,9 ± 0,9
BS	25,4 ± 1,4	11,1 ± 0,3	62,8 ± 0,4	75,9 ± 0,4	70,4 ± 1,2

	45 ° C incubación durante 5 días				
	Isobutiraldehído µg/L	2-metilbutanal µg/L	Isovaleraldehído µg/L	Metional µg/L	Fenilacetaldehído µg/L
SL	64,0 ± 0,3	22,2 ± 0,5	74,9 ± 0,1	84,8 ± 1,2	108 ± 0,2
TS	52,2 ± 0,2	21,2 ± 0,8	64,5 ± 0,1	77,0 ± 0,5	84,9 ± 0,1
BL	54,6 ± 0,1	22,1 ± 0,9	78,7 ± 0,1	75,3 ± 0,7	89,8 ± 1,1
CH	67,2 ± 0,1	25,2 ± 0,6	84,5 ± 0,1	85,3 ± 0,9	116 ± 1,4
MF	56,9 ± 0,4	23,2 ± 0,5	83,2 ± 0,5	74,9 ± 0,3	79,2 ± 0,6
TP	62,0 ± 0,5	22,9 ± 0,1	61,5 ± 0,1	69,6 ± 0,0	77,5 ± 0,7
HV	54,5 ± 0,7	20,6 ± 0,2	78,6 ± 0,3	74,1 ± 0,3	83,4 ± 0,9
BS	50,0 ± 0,8	20,5 ± 0,1	70,8 ± 0,3	77,2 ± 0,4	87,5 ± 0,5

Tabla 1. Concentraciones µg/L de los aldehídos de Strecker encontradas después las incubaciones a 25 y 45 grados. Incertidumbre expresada como desviación estándar.

	IPT	
	Media	s
SL	61,8	0,0
SL 25	57,0	0,0
SL 45	60,7	0,2
TS	63,1	0,0
TS 25	57,7	0,2
TS 45	63,7	0,6
BL	58,2	0,8
BL 25	52,2	0,1
BL 45	59,6	1,6
CH	71,5	0,3
CH 25	66,2	0,2
CH 45	72,7	0,2
MF	48,8	2,0
MF 25	43,9	2,4
MF 45	49,8	0,5
TP	50,8	2,2
TP 25	31,2	0,6
TP 45	52,5	0,1
HV	53,0	2,5
HV 25	32,4	0,4
HV 45	55,2	0,1
BS	46,9	1,8
BS 25	29,6	0,2
BS 45	46,4	4,4

Tabla 2. Valores medios y desviación estándar de los valores de IPT de los vinos a tiempo inicial y tras las oxidaciones a 25 y 45 grados en el ensayo de oxidación con 35 mg/L de O_2 no SO_2 .

Anexo 2. Información suplementaria del Capítulo IV

Experimento 1

Muestra	Isobutiraldehído	2- metilbutanal	3- metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhid
Phe +					
Diacetilo					
A	< LD	< LD	< LD	< LD	16
Phe +					
Diacetilo					
B	< LD	< LD	< LD	< LD	14
Media	-	-	-	-	15
RSD (%)					9,4
Phe A	7,0	< LD	< LD	< LD	5,0
Phe B	< LD	< LD	< LD	< LD	5,0
Media	-	-	-	-	5,0
RSD (%)					0
Met +					
Diacetilo					
A	< LD	10	3,9	66	< LD
Met +					
Diacetilo					
B	< LD	< LD	< LD	75	< LD
Media				71	
RSD (%)				8,8	
Met A	5,0	< LD	0,9	< LD	5,0
Met B	< LD	< LD	3,0	< LD	< LD
Media			2,0		
RSD (%)			76		
Val +					
Diacetilo					
A	5,0	< LD	< LD	< LD	< LD
Val +					
Diacetilo					
B	5,1	< LD	< LD	< LD	< LD
Media	5,1				
RSD (%)	1,4				
Val A	3,9	< LD	< LD	< LD	< LD
Val B	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Media					
RSD (%)					
Leu +					
Diacetilo					
A	< LD	< LD	21	< LD	< LD

Leu + Diacetilo					
B	< LD	< LD	19	< LD	< LD
Media			20		
RSD (%)			5,6		
Leu A	6,0	< LD	8,1	< LD	< LD
Leu B	< LD	< LD	7,0	< LD	< LD
Media			7,6		
RSD (%)			10		
Ile + Diacetilo					
A	< LD	11	< LD	< LD	< LD
Ile + Diacetilo					
B	< LD	15	< LD	< LD	< LD
Media		13			
RSD (%)		22			
Ile A	4,9	9,0	1,9	< LD	< LD
Ile B	< LD				
Media					
RSD (%)					
Diacetilo					
A	< LD	10	< LD	< LD	< LD
Diacetilo					
B	7,1	< LD	< LD	< LD	< LD
Media					
RSD (%)					

Tabla 1. Resultados del experimento 1. Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) de aldehídos cuantificados en cada uno de los sistemas.

Experimento 2

	2-	3-	4-	5-	6-
Muestra	Isobutiraldehído	metilbutanal	metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhidó
Phe + 4-					
MeCat A	4,0	< LD	< LD	< LD	18.698,5
Phe + 4-					
MeCat B	Se pierde la muestra porque se rompe el vial				
Media	-	-	-	-	-
RSD (%)					
Phe A	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Phe B	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Media	-	-	-	-	-
RSD (%)					
Met + 4-					
MeCat A	< LD	11	< LD	41.811,0	< LD
Met + 4-					
MeCat B	< LD	< LD	< LD	42.218,4	< LD
Media				42.015,2	
RSD (%)				0,7	
Met A	< LD	2,9	< LD	100	< LD
Met B	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Media					
RSD (%)					
Val + 4-					
MeCat A	10.062,4	< LD	< LD	< LD	< LD
Val +4-					
MeCat B	8.119,3	< LD	< LD	< LD	< LD
Media	9.091,4				
RSD (%)	15				
Val A	4,9	< LD	< LD	< LD	< LD
Val B	< LD	3,0	< LD	< LD	< LD
Media					
RSD (%)					
Leu + 4-					
MeCat A	< LD	< LD	8.619,5	< LD	< LD
Leu + 4-					
MeCat B	Se pierde la muestra porque se rompe el vial				
Media					
RSD (%)					
Leu A	< LD	4,0	10	< LD	< LD
Leu B	< LD	3,0	7,2	< LD	< LD
Media		3,5	8,6		
RSD (%)		20	22		
Ile + 4-					
MeCat A	23	7.026,1	< LD	< LD	< LD
Ile + 4-					
MeCat B	23	8.280,3	< LD	< LD	< LD

Media	23	7.653,2			
RSD (%)	0,3	12			
Ile A	< LD	17	< LD	< LD	< LD
Ile B	< LD	7,0	< LD	< LD	< LD
Media		12			
RSD (%)		59			
4-MeCat					
A	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
4-MeCat					
B	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Media					
RSD (%)					

Tabla 2. Resultados del experimento 2. Concentraciones ($\mu\text{g/L}$) de aldehídos cuantificados en cada uno de los sistemas

Anexo 3. Información suplementaria del Capítulo V

1. Resultados ensayo 2

Días a 70°	Coeficiente	Tinto 2016		Tinto 2015		Tinto 2014		Tinto 2013		Tinto 2010	
		% Eliminación	Incertidumbre %								
1	0,5	18,1	1,0	17,4	5,4	20,0	5,0	18,3	4,7	19,2	4,3
4	2,0	27,4	3,5	31,9	5,4	40,1	4,6	33,0	5,0	29,4	4,3
5	1,8	30,2	2,2	32,1	5,7	38,9	4,1	36,3	4,6	31,7	4,7
7	1,3	32,0	0,6	36,2	6,2	38,2	4,2	37,6	5,2	31,9	4,9

Tabla 1- Resultados correspondientes a ensayos 2. % de acetaldehído consumido en vinos dopados con 300 mg/L de acetaldehído e incubados a 70 grados. Incertidumbre (desviación estándar expresada en %) teniendo en cuenta la incertidumbre de una diferencia $\sqrt{(s_1)^2 + (s_2)^2}$. Coeficiente de diferenciación teniendo en cuenta la variabilidad entre vinos y la reproducibilidad del ensayo.

Anexo 4. Información suplementaria del Capítulo VII

Días	Acetaldehído (mg/L)	s
0	2,37	1,9
0,04 (1 hora)	3,47	1,9
0,21 (5 horas)	5,78	1,8
1	8,65	3,9
2	7,08	1,1
5	7,56	2,0
8	9,95	1,3

Tabla 1. Evolución de acetaldehído formado en vino sintético conteniendo 13,3 % de etanol, 5 g/L de ácido tartárico, 5 g/L de glicerina, 56 mg/L de Fe (II), 0,02 mg/L de Cu (II), pH 3,5; tras aplicar una saturación (7 mg/L de oxígeno) e incubar a 35 grados.

Extracto de polifenoles de uva pT2	
Nombre	mM
ANTOCIANOS	
Delfinidina-3-glucósido	1,40
Cianidina-3 glucósido + Delfinidin-3-glucósido	4,25
Petunidina -3- glucósido	1,39
Peonidina - 3- glucósido	9,31
Malvidina 3-O- glucósido	4,68
Miricetina glucósido	0,28
Malvidina 3- glucósido hidratada	0,08
Malvidina 3- glucósido hidratada + vitisina A	0,01
Petunidin 3 - O-acetil glucósido	0,04
Malvidina-3-acetil-glucósido	0,36
Quercitina glucósido	0,21
Malvidina-3-o-acetil-glucósido	0,36
Cianidin-3 glucósido + Coumaril-glucósido	0,04
Petunidin 3 - O-Coumaril	0,16
Mircetina	0,03
Quercitina	0,21
TANINOS	
Epigallocatequina	3,71
Epicatequina galato	1,16
Catequina	0,42
Epigallocatequina terminal	0,06
Epicatequina galato terminal	0,19
Catequina terminal	0,34

Tabla 2- *Cuantificación de antocianos de la FFA reconstituida de tempranillo pT2 siguiendo la metodología de [39]. Contenido en taninos (Análisis después de floroglucinólisis: donde en un medio nucleófilo se pueden depolimerizar los taninos y se obtiene información de las unidades superiores y las unidades terminales).*

Anexo 5. Importancia sensorial de los aldehídos de Strecker en vinos tintos. Evaluación de la eliminación de aldehídos de Strecker mediante resinas

1. Introducción

Desde el punto de vista sensorial, la acumulación de aldehídos pueden llegar a suponer un detrimento en la calidad de los vinos [1]. Hasta la fecha no hay ningún estudio sensorial que determine en qué momento se comienza a apreciar la disminución de la calidad aromática con respecto a la concentración de estos compuestos. Se conoce que los responsables de los aromas a oxidación son el acetaldehído y los aldehídos de Strecker, principalmente el metional y el fenilacetaldehído [2-4].

En la industria vitivinícola, está bastante implementado el uso de intercambiadores catiónicos con el fin de evitar la quiebra tartárica [5-8]. El objetivo de este procedimiento es retirar cationes calcio y potasio incorporando protones, se evita así el riesgo de precipitación tartárica y se aumenta la acidez (algo que se persigue sobre todo en vinos tintos). Los estudios hasta el momento se han centrado en el uso de resinas de intercambio iónico para mejorar el color o evitar quiebras y evaluar cómo afecta el tratamiento en la calidad organoléptica de los vinos al final. Actualmente se investiga en tratamientos en bodega que permitan eliminar sustancias nocivas para el vino como ácido acético o etilfenoles. De estas ideas surgió la hipótesis de localizar una metodología que pudiera eliminar aldehídos de oxidación presentes en el vino.

En este anexo compuesto de 2 experimentos, destinamos los dos primeros al estudio del origen de los aldehídos, llevando a cabo la degradación de Strecker con dos α -dicarbonilos diferentes: diacetilo y el procedente de 4-metilcatecol. El experimento 3 tiene como objetivo estudiar la acumulación y reactividad de los aldehídos de Strecker tras un proceso controlado de oxidación. El análisis sensorial de los aldehídos de Strecker es la base del experimento 4, en donde se pretende entender el impacto sensorial que tiene la ruptura de los hidroxialquilsulfonatos durante el almacenamiento del vino. Y en el último apartado, se evaluarán diferentes resinas como vía de eliminación de aldehídos.

2. Materiales métodos

2.1. Análisis sensorial de aldehídos de Strecker-Experimento 1

Para el análisis sensorial se usaron dos contextos sintéticos diferentes: un vino modelo de tinto joven y otro vino modelo de tinto envejecido. La composición base de estos modelos fue la que se detalla en la siguiente **tabla 1** y está basado en el trabajo de De la fuente y col. [9].

Compuestos	Concentración en vino (mg/L)	
	Vino Tinto Joven	Vino tinto envejecido
Alcohol isoamílico		180
β-feniletanol		30
ácido acético		150
acetato de etilo		50
ácido hexanoico		2
ácido isovalerianico		0,3
diacetilo		0,4
hexanoato de etilo		1
acetato de isoamilo		1
2-metilbutirato de etilo		0,12
vanillato de etilo		0,25
g-nonolactona		0,02
β-damascenona		0,004
β-ionona		0,0003
vainillina	0,070	0,17
guaiacol	0,010	0,03
whiskilactona	0	0,2
eugenol	0	0,02
furaneol	0	0,1
acetovanillona	0	0,2
pH		3,5
Glicerina (g/L)		10
Quinina (mg/L)		7
Goma arábica (mg/L)		75
Etanol (%)		12
Ácido tánico (mg/L)	50	100
Ácido tartárico (g/L)	5	4

Tabla 1. Muestras preparadas para el experimento 1

Los niveles de aldehídos de Strecker presentes en las muestras simulaban la ruptura de los aductos aldehídos-sulfuroso por procesos de oxidación, de forma que el vino aumenta su concentración de formas libres de aldehídos (son las formas volátiles y que podemos percibir). Las concentraciones elegidas estaban basadas en los porcentajes de liberación de aldehídos durante la oxidación [10] (**tabla 2**):

- i. Los vinos habitualmente presentan en el espacio de cabeza, el 30% de isobutiraldehído y 2-metilbutanal que presentan totalmente.

- ii. Los vinos habitualmente presentan en el espacio de cabeza, el 10% del metional, fenilacetaldehído e isovaleraldehído que presentan totalmente.

	Alto Aldehídos		Medio Aldehídos		Bajo Aldehídos		
	Nivel 6	Nivel 3	Nivel 5	Nivel 2	Nivel 4	Nivel 1	
	TOTAL µg/L	LIBRE µg/L	TOTAL µg/L	LIBRE µg/L	TOTAL µg/L	LIBRE µg/L	
Isobutiraldehído	50	15	30	9	15	4,5	
2-metilbutanal	20	6	12	3,6	6	1,8	30 % de libre en HS
Isovaleraldehído	51	5,1	30	3	15	1,5	
Fenilacetaldehído	91	9,1	54	5,4	30	3	
Metional	32	3,2	19	1,9	10	1	10 % de libre en HS

Tabla 2. Concentraciones propuestas para el análisis sensorial, donde para cada nivel (alto, medio y bajo) hay dos muestras una que se corresponde con el nivel habitual de aldehído LIBRE en los vinos comerciales y el TOTAL que simula una liberación total de aldehído por oxidación.

Los vinos sintéticos no contenían sulfuroso, por lo que la concentración añadida se correspondía con la fracción libre. Se usaron 6 niveles ascendentes de aldehídos de Strecker, en la **tabla 3** están las concentraciones reales presentadas a los catadores.

µg/L	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6
Isobutiraldehído	4,3	8,5	14,2	16,6	33,2	55,3
2-metilbutanal	3,7	7,3	12,2	11,7	23,4	38,9
Isovaleraldehído	2,5	5,0	8,5	24,3	48,6	82,6
Fenilacetaldehído	4,7	8,5	14,4	49,2	88,6	149,2
Metional	1,3	2,4	4,0	13,5	25,6	43,1

Tabla 3. Concentraciones presentadas en cada contexto.

El análisis sensorial se llevó a cabo con un panel de 20 catadores expertos (enólogos e investigadores con amplia experiencia en catas) del Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología (LAAE). El panel se compuso de 13 mujeres y 7 hombres con edades comprendidas entre 25 y 63 años (edad media 37 años). Se sirvieron 20 mL de cada muestra en copas negras (ISO 3591,1977) codificadas con 3 dígitos y cubiertas con una placa Petri. Se presentaron a cada catador las 7 copas dispuestas al azar (las 6 copas con una muestra por duplicado para evaluar la repetibilidad de cada juez).

Se pidió que olieran las copas de izquierda a derecha y la primera tarea fue evaluar la calidad ortonasal de las muestras usando una sola escala estructurada continua de 10 cm. En el cero ponía baja calidad, en el 5 calidad media y a los 10 cm ponía alta calidad. La **Ficha 1** presenta la tarea 1 del análisis sensorial.

Ficha 1: Tarea 1

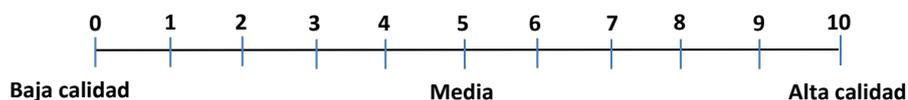


Código sujeto.....

Fecha.....

En la mesa dispone de **7 copas**. Cada copa está codificada con un número de tres cifras.

- En primer lugar, **huela los vinos** de izquierda a derecha.
- A continuación, basándose **EXCLUSIVAMENTE EN EL AROMA** de los vinos, sitúe en la escala (marcando con una “X” y escribiendo sus códigos) las muestras de acuerdo a su **CRITERIO DE CALIDAD**.



Ficha 2: Tarea 2**Código sujeto.....****Fecha.....**

Para finalizar, indique 2-3 atributos que describan los vinos que ha calificado como menor y mayor **CALIDAD DEL AROMA**. Puede volver a oler los vinos si lo desea, pero **NO DEBE MODIFICAR SU RESPUESTA**.

Menor calidad	Mayor calidad
1.	1.
2.	2.
3.	3.

La segunda tarea solicitada a los jueces (**Ficha 2**) fue indicar dos o tres atributos (evitando términos hedónicos) a los vinos que habían definido como de mayor y menor calidad. Después 3 catadores expertos que no habían participado en la sesión sensorial agruparon los atributos en grupos según su significado, por medio de una tarea de triangulación [11]. Primero la triangulación se hizo de forma independiente por cada juez y después se alcanzó un consenso final de grupos que fue usado para calcular el % de citación (**ecuación 4**).

$$\% \text{ de citación} = \frac{N^{\circ} \text{ de veces citado el atributo}}{N^{\circ} \text{ de catadores}} \times 100$$

Ecuación 4. Cálculo del % de citación.

El tratamiento de datos se basó en medir la calidad como la distancia en cm señalada por cada catador y se realizó un anova de dos factores para cada contexto. El Análisis de la varianza (ANOVA), de Componentes Principales (PCA) y el análisis de clúster (dendograma) se realizaron con XLSTAT complemento de Microsoft Excel 2013.

2.2. Estudio acerca de la capacidad potencial de distintas resinas para eliminar aldehídos en vinos-Experimento 2.

En este estudio se evaluaron dos estrategias (ver esquema de **reacción 2 del capítulo 6**):

- i. Retirar el aldehído libre forzando un desplazamiento del equilibrio (aldehído-SO₂) usando extracción en fase sólida (Scavengers)
- ii. Retirar directamente el aducto (hidroxialquilsulfonato) por intercambio iónico (puro y mixto).

Se probaron las siguientes resinas:

- i. Resinas Scavengers (No regenerables): Siliabond y Etilendiamino
- ii. Resinas Intercambio aniónico mixto (Regenerables): Oasis MAX, Bond Elut Certify II, Strata X-A y Strata X-AW. Este tipo de resina requería un acondicionamiento previo con metanol y secar a vacío bajo corriente de nitrógeno.
- iii. Resinas Intercambio Puro (Regenerables): Dowex 1x2 y Amberlite IRA 900.

Se usó un vino blanco Velitierra 2015, Verdejo Rueda; que habíamos cuantificado anteriormente y presentaba niveles altos de aldehídos totales. Para estudiar el factor SO₂, se establecieron dos niveles:

- Primer nivel: sulfuroso libre y total que trajese el vino.

- Segundo nivel: llevar el vino hasta 40 mg/L de sulfuroso libre.

Como testigos del experimento se incubó el vino con los dos niveles de sulfuroso sin añadir resinas.

El experimento se preparó dentro de la cámara de anoxia, se usaron WIT de 60 mL de capacidad llenos hasta arriba y la dosis empleada de resina fue de 10 g/L. Se incubaron 24 horas a 25 °C en un baño orbital, 130 rpm. Pasadas estas 24h, se introdujeron los WIT de nuevo en la cámara, se dejó decantar y se procedió a los análisis.

Los análisis a tiempo cero y tras el tratamiento fueron los siguientes:

- i. Parámetros de color siguiendo las recomendaciones de la OIV [12]
- ii. Acidez total por valoración volumétrica ácido base midiendo el final de la valoración con un pH metro hasta pH 7
- iii. pH por potenciometría
- iv. Aldehídos totales de Strecker por HS-SPME-CG-MS según lo expuesto en el procedimiento de Bueno y col, [13] y siguiendo las instrucciones detalladas en el **capítulo 2**.
- v. Acetaldehído total por CG-FID según el procedimiento detallado en el **capítulo 2**.

2.2.1. Análisis sensorial del tratamiento: test triangulares

Al final del tratamiento se llevó a cabo una evaluación sensorial informal. Como se disponía de poco volumen de muestra se realizaron pruebas triangulares con dos catadores expertos. Se presentaron a cada juez 3 copas negras con 15 mL de muestra tapadas con placas Petri y dispuestas al azar con diferentes combinaciones (una de ausencia y otra de presencia), siendo A: testigo y B: aplicación de resina (procedimiento AENOR ISO 4120:2004). Cada muestra estaba codificada con 3 dígitos. Se les pidió a los catadores que identificaran la muestra diferente en función del aroma y sabor.

3. Resultados y discusión

3.1. Análisis sensorial de aldehídos de Strecker – Experimento 1

En este análisis sensorial, los niveles de aldehídos de Strecker presentes en las muestras simulan la ruptura de los aductos aldehído-sulfuroso por procesos de oxidación, de forma que el vino aumenta su concentración de aldehídos en forma libre (son las formas volátiles y que podemos percibir).

Se han preparado 3 niveles (alto, medio y bajo) y dentro de cada nivel hay dos muestras:

- i. Contenido “libre”: se refiere a concentraciones de aldehídos que se encuentran libres (sin formar aductos con el SO_2) y que normalmente están presentes en los vinos comerciales recién abiertos, por tener niveles de sulfuroso adecuados para la conservación.
- ii. Contenido “total”: simula que por oxidación se han ido liberando los aductos aldehído - SO_2 y por ello la concentración de aldehídos es mayor.

El detalle de todas las muestras se encuentra en las **tablas 3 y 4** del apartado de materiales y métodos.

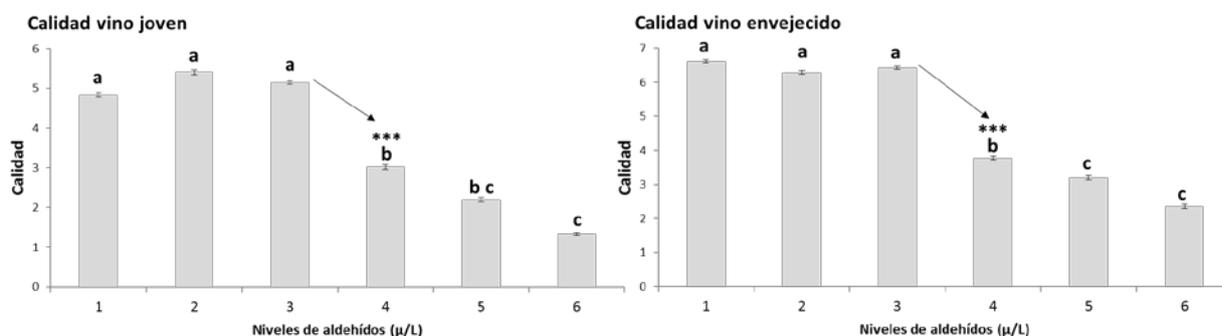


Figura 1. Comparación de la calidad media obtenida en el test sensorial en dos contextos: vino tinto joven y vino tinto envejecido. Las barras de error representan la desviación estándar. Las diferencias han sido calculadas mediante el anova de dos factores (vino modelo como factor fijo y jueces como factor variable). *** indica el nivel de significancia con $p < 0,001$. Diferentes letras indican diferente grupo en test de Fisher ($p=0,05$)

Como se observa en la **figura 1**, el aumento de concentración de aldehídos hace que la calidad percibida disminuya en los dos contextos de forma significativa. El panel de expertos castiga más el aumento de concentración de aldehídos (simulación de la ruptura de los aductos aldehído-sulfuroso) en los vinos con niveles altos de aldehídos totales frente a los vinos con niveles bajos (en ambos contextos) (ver **tabla 15**).

Diferencias dentro de nivel	Vino Joven	Vino envejecido
Nivel alto (6-3)	3,81	4,07
Nivel medio (5-2)	3,21	3,08
Nivel bajo (4-1)	1,82	2,84

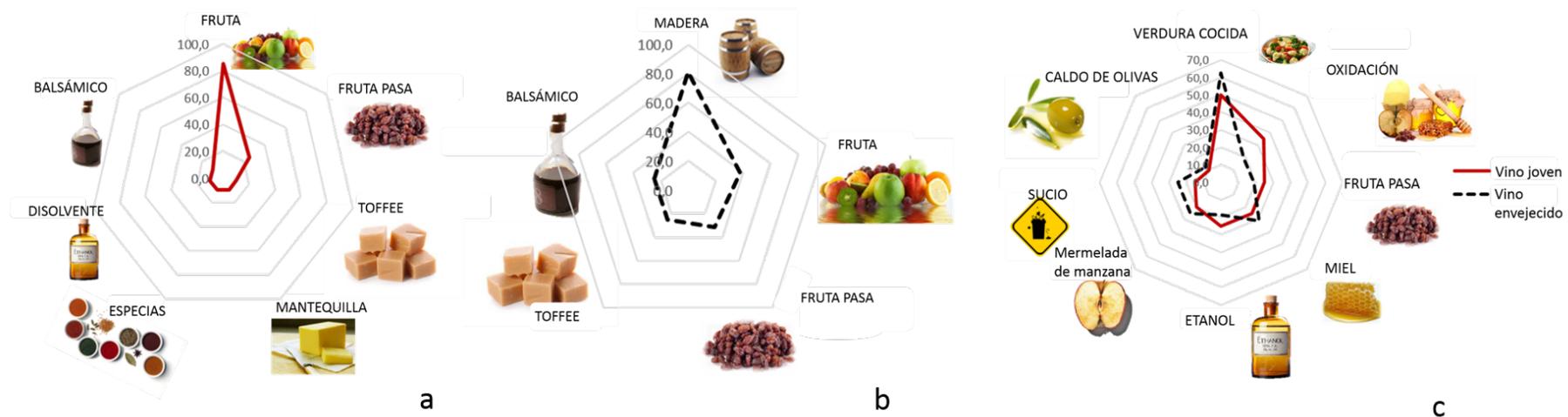
Tabla 4. Diferencias de calidad dentro de cada contexto. Las diferencias se han calculado con los valores medios obtenidos para las muestras "total" menos los valores medios obtenidos para las muestras "libre".

Los resultados de los atributos usados para los vinos de mayor y menor calidad muestran que en el vino joven se enmascara el carácter frutal y se pasa a verdura cocida, oxidado, fruta pasa, miel/alcohólico/fusel, manzana pasada y caldo de olivas. Para el vino envejecido se enmascara la madera, y aparecen atributos que definen la oxidación: verdura cocida, miel, manzana pasada, sucia y oxidada (**figuras 2 a, b y c**).

Hay que destacar que el descriptor de fruta pasa coincide como descriptor de alta y baja calidad, esto se debe a que para algunos jueces es un criterio de alta y que para otros (menos del 20%) es de baja calidad. No es un ejemplo aislado, ya que Saenz-Navajas y col, obtuvieron que el mismo atributo podía ser usado en vinos de alta gama como asociado a la calidad, mientras que en vinos de menor precio, lo consideraban como un atributo negativo [14].

En conclusión, se ha encontrado que en todos los casos la liberación de aldehídos por ruptura de los aductos sulfuroso-aldehído causa una clara depreciación de la calidad en los vinos. Además, esta depreciación es mayor cuando los niveles de aldehídos totales son mayores que cuando son menores. Desde el punto de vista descriptivo, el carácter frutal de los vinos jóvenes se enmascara encontrando atributos que definen la oxidación.

El detrimento de la calidad comienza en el nivel 4 que contiene los siguientes niveles de aldehídos: 13 µg/L de metional, 49 µg/L de fenilacetaldehído, 17 µg/L de isobutiraldehído, 12 µg/L de 2-metilbutanal y 24 µg/L de 3-metilbutanal. Más del 75 % de los vinos comerciales recién abiertos contienen niveles mayores al nivel 4, por lo que parece razonable buscar herramientas que nos ayuden a disminuir la presencia de aldehídos de Strecker en los vinos. En el siguiente experimento se evaluará la capacidad potencial de distintas resinas comerciales para eliminar aldehídos en vinos.



Figuras 2 a, b y c. Gráficos de frecuencia de citación para los dos contextos: a) vino joven clasificado como de alta calidad, b) Vino envejecido clasificado como alta calidad y c) vino joven y envejecido clasificados como baja calidad.

3.2. Estudio acerca de la capacidad potencial de las distintas resinas para eliminar aldehídos en vinos- Experimento 2.

En la **tabla 5** aparece información relativa a la reutilización y coste de las diferentes resinas estudiadas en este apartado.

	Código	Resinas	Regenerables	Coste Euros/gramo
Scavengers	SLB	Siliabond	NO	15,0
	ETDM	Etilendiamino	NO	9,9
Modo Mixto	MAX	Oasis MAX	SI	56,7
	BEC	Bond Elut Certify II	SI	13,7
	SAX	Strata X-A	SI	15,0
	SAW	Strata X-AW	SI	15,0
Intercambio aniónico Puro	1X2	Dowex 1x2	SI	1,5
	IRA	Amberlite IRA 900	SI	0,15

Tabla 5. Información de resinas usadas en el estudio.

3.2.1. Reproducibilidad y efectividad del tratamiento con resinas

En la **tabla 6** aparecen los resultados de la efectividad de la retirada de los 6 aldehídos tratados para cada una de las resinas y los dos contenidos diferentes de sulfuroso.

La reproducibilidad del proceso fue buena, para todos los casos % RSD < 15%. Excepto para la resina SLB para los aldehídos más volátiles (isobutiraldehído, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal). Esta resina presenta los mismos problemas de reproducibilidad en los dos ensayos (**tabla 6**).

Los porcentajes de eliminación encontrados son importantes: en el isobutiraldehído van del 2,3 al 22,4%. Para el 2-metilbutanal, del 0,2 al 47%. Para el 3-metilbutanal del 0,8 al 40,5 %. Para el metional del 15 al 42,8% de eliminación.

El fenilacetaldehído aumenta su concentración tras estar 24h con los scavengers. Este tipo de resinas no consigue retirar fenilacetaldehído, y al final del proceso la concentración de aldehído ha aumentado. Se barajan dos posibles opciones que expliquen esto:

- a) Algún nucleófilo que esté presente en la resina consiga romper aductos estables (que no es capaz de romper el método de determinación de aldehídos totales mediante el uso del glioxal).
- b) Otra posibilidad es que haya una cesión de alguna traza contaminante como el aminoácido fenilalanina, de forma que se formaría fenilacetaldehído si hay presente en el medio α -dicarbonilos mediante la degradación de Strecker.

Sin embargo, el fenilacetaldehído, presenta buena eliminación con resinas de modo mixto como es el caso de Oasis MAX, Strata X-A y Strata X-AW, con porcentajes de eliminación entre 67% y 92 %, para los dos niveles de sulfuroso. Este tipo de resinas presentan en sus estructuras anillos aromáticos que se estabilizarían con la reacción del fenilacetaldehído. Además, tienen gran tamaño de poro y área superficial específica (727-889 m²/g), haciendo más favorable la reacción con el fenilacetaldehído que es una molécula voluminosa. El intercambio aniónico puro presenta menor eliminación para el fenilacetaldehído.

El acetaldehído presenta eliminaciones entre el 3 y 20 %. Son porcentajes de eliminación muy elevados si tenemos en cuenta trabajos anteriores donde la concentración de acetaldehído total no cambió de forma significativa, cuando se aplicó a un vino de la variedad Airén un intercambio iónico en columna con el objetivo de mejorar el color del mismo [15].

	Isobutiraldehído µg/L			2-metilbutanal µg/L			3-metilbutanal µg/L			Metional µg/L			Fenilacetalddehído µg/L			Acetaldehído mg/L		
	media	s	%RSD	media	s	%RSD	media	s	%RSD	media	s	%RSD	media	s	%RSD	media	s	%RSD
ENSAYO 1: SO₂ libre 12,8 mg/L. SO₂ total 142,8 mg/L																		
TESTIGO	10,6	0,7	6,2	4,85	0,4	9,4	50,5	2,1	4,2	9,80	0,5	5,5	31,6	0,4	1,2	49,7	0,9	1,8
SLB	5,40	2,5	46	1,22	0,7	57	33,9	4,7	14	7,11	1,1	15	415	6,7	1,6	46,0	5,2	11
ETDM	9,80	0,5	4,7	3,97	0,0	0,7	49,5	0,9	1,8	10,1	0,5	4,7	35,9	1,0	2,7	51,5	1,2	2,3
MAX	9,40	0,7	7,6	3,68	0,3	7,9	35,5	4,2	12	5,65	1,0	18	<LC			47,7	0,0	0,1
BEC	9,50	0,2	1,9	4,00	0,3	8,1	48,0	1,0	2,0	7,87	0,1	1,5	21,1	2,9	14	51,0	1,3	2,6
SAX	8,80	1,0	11	2,53	0,4	14	35,8	2,7	7,6	6,19	0,5	8,3	<LC			44,8	1,4	3,1
SAW	12,5	1,1	8,8	3,15	0,7	22	30,1	0,9	3,0	6,79	0,1	0,9	<LC			43,5	0,4	0,9
1X2	8,30	0,3	4,1	2,91	0,2	5,7	40,0	0,0	0,1	6,83	0,3	3,7	25,5	0,6	2,4	41,0	0,4	1,0
IRA	8,90	0,1	0,6	3,48	0,2	6,0	44,6	1,7	3,8	8,38	0,4	5,0	25,8	1,5	5,7	44,0	0,5	1,1
ENSAYO 2: SO₂ libre 36,8 mg/L. SO₂ total 172,8 mg/L																		
TESTIGO	10,0	0,2	2,3	4,71	0,7	14	47,5	1,1	2,2	9,21	0,2	1,7	28,5	0,1	0,5	48,5	3,2	6,5
SLB	4,80	2,4	50	1,31	0,7	57	34,8	9,1	26	7,60	0,5	6,0	363	5,5	1,5	40,1	3,3	8,3
ETDM	10,8	0,1	0,8	4,74	0,0	0,4	47,2	0,6	1,4	11,2	0,9	7,9	41,6	1,3	3,1	47,5	1,7	3,6
MAX	9,30	0,4	4,5	4,67	0,1	1,5	39,4	1,6	4,0	6,40	0,1	2,3	<LC			45,7	0,1	0,3
BEC	10,1	0,1	1,3	4,63	0,6	12	47,1	0,5	1,1	7,50	0,1	1,5	22,9	0,7	3,1	45,3	0,8	1,7
SAX	8,90	0,8	8,6	3,32	0,3	8,8	32,8	3,3	11	6,10	1,4	23	<LC			46,9	1,3	2,9
SAW	12,3	0,5	4,3	3,80	0,0	0,1	25,5	1,4	5,4	5,90	0,5	7,7	<LD			44,4	1,7	3,9
1X2	8,50	0,4	4,7	3,91	0,2	4,2	36,7	0,6	1,7	6,90	0,2	2,4	19,6	3,0	15	38,8	0,5	1,2
IRA	9,80	1,3	13	4,67	0,3	6,9	40,4	3,1	7,6	7,00	0,3	4,7	19,2	3,7	19	40,6	0,8	2,0

Tabla 6. Concentración de aldehídos de Strecker total µg/L y acetaldehído total mg/L en las dos condiciones ensayadas 1 y 2 tras las 24 horas de incubación a 25 °C Para el fenilacetalddehído LD 3µg/L y LQ 10 µg/L.

3.2.2. Efecto del sulfuroso en la eliminación

Al añadir sulfuroso estaríamos favoreciendo la formación de los aductos (hidroxialquilsulfonatos) y se esperaría a priori un mayor efecto en las resinas de intercambio iónico puro y mixto. Hemos encontrado que el añadir sulfuroso sólo ha favorecido la eliminación del acetaldehído de manera significativa para las resinas de intercambio iónico puro BEC ($p= 0,018$); 1x2 ($p= 0,017$) e IRA ($p= 0,018$). Como ya hemos comentado en el apartado anterior, el fenilacetaldehído se ha eliminado de forma muy eficaz en las resinas de modo mixto, si estudiamos el efecto del sulfuroso sólo se ha obtenido una mayor reducción, al añadir sulfuroso, en la resina 1x2 ($p=0,05$).

Que sólo se hayan obtenido efectos significativos en estos dos aldehídos puede deberse a que el acetaldehído es el compuesto más reactivo con el SO_2 [16], y aunque la constante de formación del aducto con el metional es mayor a la del fenilacetaldehído (50.10^3 frente $17.10^3 \text{ l}/[\text{M}]$ [13]); el aducto del fenilacetaldehído se podría estabilizar en las estructuras de anillos aromáticos de las resinas mixtas.

3.2.3. Efectos a nivel sensorial, pH, IPT y color

Se llevó a cabo un test triangular informal para las resinas que habían presentado mejores datos de reducción de aldehídos. Las elegidas fueron todas las de intercambio iónico mixto: MAX, BEC, SAX, SAW y la resina IRA, de intercambio iónico puro. Los dos catadores encontraron en todos los casos el vino tratado diferente tanto ortonasal como retronasalmente.

Ante estos resultados sensoriales se analizó el SO_2 libre y total, pH, IPT y color de todas las muestras, encontrando también diferencias muy evidentes entre el tratamiento y el testigo (**tabla 7 y 8**).

	% DE ELIMINACIÓN							
	SO ₂ LIBRE		SO ₂ TOTAL		IPT		COLOR	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2
SLB	-16	-3,5	9,0	31	0,1	-4,7	29	32
ETDM	0,1	13	17	23	12	10	16	20
MAX	11	37	22	27	45	42	76	75
BEC	6,0	11	27	16	8,6	3,8	24	20
SAX	13	19	38	34	48	44	85	83
SAW	0,4	18	34	29	31	23	72	75
1X2	0,3	30	45	52	39	38	68	68
IRA	13	35	28	57	44	45	63	64

Tabla 7. % de eliminación en el sulfuroso libre y total, IPT y color. Ensayo 1: niveles de sulfuroso de vino y Ensayo 2: corrigiendo el sulfuroso libre hasta 40 mg/L.

Para el scavenger SLB se obtiene tras la incubación mayor concentración de sulfuroso libre, poniendo en evidencia que el proceso ha funcionado bien y se ha conseguido desplazar el equilibrio (el scavenger reacciona con el aldehído libre y se libera SO₂). En el ensayo 2 donde se ha corregido el sulfuroso libre hasta 40 mg/L, se ha encontrado sólo un 3 % de liberación de sulfuroso libre, lo que puede indicar que la ruptura del aducto (aldehído-SO₂) debida a la eliminación del aldehído no está muy favorecida a concentraciones altas de aducto (**ver tabla 7**) [13, 16]. El otro scavenger parece haber sido menos eficaz si tenemos en cuenta este parámetro, aunque se observa de nuevo casi la misma diferencia entre el ensayo 1 y 2.

Para las resinas de intercambio iónico (reacción sobre el aducto), se espera que conforme avance el proceso se disminuya el sulfuroso libre y total. Y es efectivamente lo que se obtiene y está reflejado en la **tabla 7**. El hecho de añadir más sulfuroso al vino (ensayo 2), parece afectar sobre todo a las resinas de intercambio iónico puro 1x2 e IRA.

Con respecto al IPT y color, las resinas se comportan de la misma forma en los ensayos 1 y 2. El descenso de estos parámetros puede deberse sobre todo a la eliminación de catequinas y ácidos hidroxicinámicos [15]. Hermonsín y col, establecieron en su trabajo de selección de resinas de intercambio iónico, un criterio de eliminación máxima de color del 35 % para no comprometer el resto de las propiedades sensoriales [15]. Como vemos en la **tabla 7**, sólo los scavengers cumplirían esta premisa, obteniéndose una disminución de color muy acusada para el resto de resinas a excepción de la BEC.

	pH		Acidez total g/L	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 1	Ensayo 2
TESTIGO	3,23	3,12	5,43	5,43
SLB	3,22	3,15	5,27	5,40
ETDM	3,74	3,75	3,54	3,55
MAX	3,20	3,14	5,31	5,37
BEC	3,17	3,13	5,55	5,55
SAX	3,20	3,12	5,19	5,33
SAW	3,61	3,40	4,54	4,62
1X2	3,06	3,03	5,11	5,09
IRA	3,02	3,04	5,15	5,05

Tabla 8. pH y acidez total (g/L de ácido tartárico) de los tratamientos y el testigo de cada ensayo. Ensayo 1: niveles de sulfuroso de vino y Ensayo 2: corrigiendo el sulfuroso libre hasta 40 mg/L.

Tal y como vemos en la **tabla 8**, sólo para las resinas ETDM y SAW hay una disminución acusada de acidez, hecho totalmente indeseable a nivel enológico. Los cambios a nivel de pH comprometerían la estabilidad del vino, sabemos que cuanto menor es el pH más SO₂ molecular tendremos presente y es esta forma del sulfuro al que se le atribuyen principalmente las funciones antioxidantes y antimicrobianas.

De manera general se puede concluir que las resinas que mejor se comportan serían las de intercambio iónico mixto SAX y MAX. Se cumple que están en la media de eliminación de todos los aldehídos y no modifican en gran medida el pH y acidez total. Está claro que la dosis de resina usada (10g/L) es inviable desde el punto de vista económico y con respecto al detrimento del resto de parámetros sensoriales (color, aroma y sabor).

Hay que tener en cuenta que en algunos casos la concentración de algunos aldehídos aumenta después del tratamiento con resinas: es el caso de isovaleraldehído con los scavengers y la resina SAW. Es más notable aún el aumento de la concentración de fenilacetaldehído y acetaldehído con scavengers (ETDM). Además, este tipo de resina disminuye bruscamente la acidez total. Por todo ello, podemos descartar el uso de scavengers en este contexto.

4. Conclusiones

1- Se ha demostrado que la acumulación de aldehídos de Strecker conduce a un detrimento de la calidad de los vinos (experimento 1). Se ha encontrado que tanto a niveles altos como bajos de aldehídos, el aumento de su concentración en el espacio de cabeza por la liberación de los hidroxialquilsulfonatos causa una clara depreciación de calidad en los vinos. Desde el punto de vista descriptivo, el carácter frutal de los vinos jóvenes se enmascara encontrando atributos que definen la oxidación. El detrimento de la calidad comienza con los siguientes niveles de aldehídos: 13 µg/L de metional, 49 µg/L de fenilacetaldehído, 17 µg/L de isobutiraldehído, 12 µg/L de 2-metilbutanal y 24 µg/L de 3-metilbutanal. Más del 75 % de los vinos comerciales recién abiertos contienen niveles mayores que estos aldehídos, por lo que parece razonable buscar herramientas que nos ayuden a disminuir la presencia de aldehídos de Strecker en los vinos.

2- En el experimento 2 se ha encontrado que las resinas de intercambio iónico mixto han ofrecido los mejores resultados de eliminación de aldehídos manteniendo el pH y acidez total, aunque han empeorado aromas y color. La adición de sulfuroso solo mejora significativamente la eliminación de acetaldehído y fenilacetaldehído.

Las que han ofrecido mejores resultados han sido SAX y MAX sin añadir sulfuroso, que nos proporcionan alrededor de 17-12% de eliminación para el isobutiraldehído, 47-25% para el 2-metilbutanal, 29-30% para el 3-metilbutanal, 37-42% para el metional y 78-87% para el fenilacetaldehído (SAX y SAW respectivamente). No obstante, debido a la dosis de resina empleada en el experimento, sería necesario indagar más en este tema a escala industrial para poder alcanzar conclusiones de aplicabilidad.

5. Referencias

1. Ferreira, et al., *Key Changes in Wine Aroma Active Compounds during Bottle Storage of Spanish Red Wines under Different Oxygen Levels*. Journal of agricultural and food chemistry, 2014. **62**(41): p. 10015-27.
2. Cullere, L., J. Cacho, and V. Ferreira, *An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(3): p. 876-881.
3. Escudero, A., J. Cacho, and V. Ferreira, *Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study*. European Food Research and Technology, 2000. **211**(2): p. 105-110.
4. Escudero, A., et al., *Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(9): p. 4268-4272.
5. Kontogiannopoulos, K.N., et al., *Tartaric acid and polyphenols recovery from winery waste lees using membrane separation processes*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2017. **92**(12): p. 2934-2943.
6. Walker, T., et al., *Quality, sensory and cost comparison for pH reduction of Syrah wine using ion exchange or tartaric acid*. Journal of Food Quality, 2004. **27**(6): p. 483-496.
7. Ibeas, V., A.C. Correia, and A.M. Jordao, *Wine tartrate stabilization by different levels of cation exchange resin treatments: impact on chemical composition, phenolic profile and organoleptic properties of red wines*. Food Research International, 2015. **69**: p. 364-372.
8. Lasanta, C., I. Caro, and L. Perez, *The influence of cation exchange treatment on the final characteristics of red wines*. Food Chemistry, 2013. **138**(2-3): p. 1072-1078.
9. de-la-Fuente-Blanco, A., M.P. Saenz-Navajas, and V. Ferreira, *On the effects of higher alcohols on red wine aroma*. Food Chemistry, 2016. **210**: p. 107-114.
10. Bueno, M., V. Carrascón, and V. Ferreira, *Release and Formation of Oxidation-Related Aldehydes during Wine Oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(3): p. 608-617.
11. Ferrero-del-Teso, S., et al., *Effect of grape maturity on wine sensory and chemical features: The case of Moristel wines*. Lwt-Food Science and Technology, 2020. **118**.
12. OIV, *Chromatic Characteristics. Compendium of International Methods of Analysis*, 2009.
13. Bueno, M., J. Zapata, and V. Ferreira, *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**: p. 33-42.
14. Saenz-Navajas, M.P., et al., *Orthonasal aroma characteristics of Spanish red wines from different price categories and their relationship to expert quality judgements*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2012. **18**(3): p. 268-279.

15. Hermosín, I., *Resinas de intercambio iónico: estado del arte y proyecciones futuras*. Enoforum 2017 Vicenza, Italia.
16. de Azevedo, L.C., et al., *Evaluation of the formation and stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(21): p. 8670-8680.

Anexo 6. Elucidación de los productos de reacción entre el metional y el fenilacetaldehído con los polifenoles del vino.

1. Introducción

En el capítulo II se hipotetizó que la acumulación de acetaldehído y aldehídos de Strecker en los procesos de oxidación de los vinos venía determinada por la composición polifenólica [1], de forma que cuanto mayor concentración de antocianos y pequeños taninos contuviera el vino, menor acumulación de aldehídos al final de la oxidación, ya que estos polifenoles (nucleófilos) estarían reaccionando irreversiblemente con los aldehídos (electrófilos). El mecanismo de reacción lo propuso Timberlake en 1976 [2] para la condensación de polifenoles mediada por acetaldehído, al tratarse de una sustitución nucleofílica la reacción está más favorecida conforme disminuye el pH [3]. Aunque se han descrito los productos de reacción entre algunos aldehídos de Strecker (isobutiraldehído, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal y fenilacetaldehído) con catequina y malvidina-3-O-glucósido en disoluciones sintéticas [4, 5] y recientemente se han construido bases de datos de masas teóricas contemplando este tipo de reacciones [6], nunca se han caracterizado estas reacciones para el metional y fenilacetaldehído en matrices vínicas; siendo éste el principal objetivo del presente estudio. Para abordar esta tarea se emplearán extractos de polifenoles obtenidos directamente de la uva, así como de un vino joven y envejecido. El procedimiento de extracción de polifenoles desarrollado en nuestro laboratorio [7] nos permite tener pool de material polifenólico sin presencia de sulfuroso o acetaldehído, lo que facilita en gran medida los estudios de reactividad con aldehídos de Strecker.

2. Materiales y métodos

Se han usado dos tipos de matrices. El primer medio es un vino sintético (10% de etanol a pH 2,2) que se prepara siguiendo el procedimiento descrito por Es Safi y col [8]. Como material polifenólico se añade catequina (Sigma-Aldrich-Alemania) o malvidina-3-O-glucósido (Extrasynthese - Francia) o una mezcla de ambas y se incuban a temperatura ambiente con aldehídos de Strecker (metional y fenilacetaldehído) en las relaciones molares que se indican en la **tabla 1**.

Muestra	Catequina	Malvidina 3-O-glucósido	Aldehído
1: CAT+PHE	25mM		PHE 1250 mM
2: CAT+M3OG+PHE	25mM	25mM	PHE 2500 mM
3: CAT+MET	25mM		MET 1250 mM
4: CAT+M3OG+ MET	25mM	25mM	MET 2500 mM
5: Ref CAT	25mM		
6: Ref CAT+M3OG	25mM	25mM	

Tabla 1. Preparación de las muestras sintéticas. CAT (catequina), M3OG (malvidina-3-O-glucósido), MET (metional), PHE (fenilacetaldehído).

En el segundo set de muestras el material polifenólico usado se extrae en nuestro laboratorio según el protocolo descrito por Alegre y col [7]. Se trata de extractos polifenólicos (FFAs) de uva de tempranillo, vino joven 2018 y vino envejecido 2014 elaborados con la misma variedad de uva. Cada una de las FFAs se reconstituyeron en vinos sintéticos al 10 % de etanol y en un primer lugar se cuantificaron los antocianos y taninos por UPLC-DAD-MS2 [9], las muestras se inyectaron por duplicado en modo positivo y negativo. Una vez conocida la composición polifenólica, las muestras se doparon con diferentes concentraciones de aldehídos y a dos pH diferentes, tal y como se detalla en la **tabla 2**. Se incuban a temperatura ambiente y se determinaron los polifenoles a las 4 horas, 1,2, 3 y 7 días. Para cada tiempo de muestreo se realiza también una floroglucinólisis, así se conocerá la proporción relativa de subunidades terminales y las subunidades de extensión liberadas como derivados de floroglucinol por despolimerización [9]. El número total de unidades terminales permitirá conocer el grado medio de polimerización [10]. Las muestras despolimerizadas se analizaron por UPLC-MS usando el mismo método anterior.

	FFA uva		FFA vino joven		FFA vino viejo	
	pH 2,2	pH 3,5	pH 2,2	pH 3,5	pH 2,2	pH 3,5
Control	1	5	9	13	17	21
Metional 50x	2	6	10	14	18	22
Fenilacetaldehído 50x	3	7	11	15	19	23
Vino oxidado	4	8	12	16	20	24

Tabla 2. Esquema de las 24 muestras reconstituidas con FFAs. Para cada FFA se ensayan dos valores de pH y se incuban de forma independiente con una relación molar 50x de aldehído (metional y fenilacetaldehído). La muestra denominada como vino oxidado se ha preparado añadiendo 200 µg/L de metional/ 400 µg/L de fenilacetaldehído.

3. Resultados preliminares

Los datos se están tratando actualmente. Los resultados preliminares muestran varios productos de reacción que evolucionan con el tiempo. En la muestra sintética que contiene catequina y fenilacetaldehído se han encontrado entre otras, las masas 393, 683 y 1075. La masa 393 se corresponde con la unión (vinil) del fenilacetaldehído y el tanino. La masa 683 se ha identificado como un dímero de catequinas mediado por el enlace etilo del fenilacetaldehído. La masa 1075 se corresponde con la condensación catequina-fenilacetaldehído en etilo- catequina-catequina. A continuación, en la **tabla 3** se incluyen la cuantificación de las FFAs analizadas.

	Extracto de polifenoles de uva pT2	Extracto de polifenoles vino 2018	Extracto de polifenoles vino 2014
Nombre	mM	mM	mM
ANTOCIANOS			
Delfinidina-3-glucósido	1,40	0,23	0,07
Cianidina-3 glucósido + Delfinidin-3-glucósido	4,25	0,02	0,00
Petunidina-3- glucósido	1,39	0,45	0,08
Peonidina - 3- glucósido	9,31	0,08	0,01
Malvidina 3-O- glucósido	4,68	2,02	0,48
Miricetina glucósido	0,28	0,22	0,21
Malvidina 3- glucósido hidratada	0,08	0,03	0,00
Malvidina 3- glucósido hidratada + vitisina A	0,01	0,02	0,09
Petunidin 3 - O-acetil glucósido	0,04	0,02	0,01
Malvidina-3-acetil-glucósido	0,36	0,02	0,01
Quercitina glucósido	0,21	0,12	0,15
Malvidina-3-o-acetil-glucósido	0,36	0,09	0,03
Cianidin-3 glucósido + Coumaril-glucósido	0,04	0,01	0,02
Petunidin 3 - O-Coumaril	0,16	0,04	0,00
Miricetina	0,03	0,24	0,44
Quercitina	0,21	0,01	0,14
TANINOS			
Epigallocatequina	3,71	4,95	2,93
Epicatequina galato	1,16	1,16	0,88
Catequina	0,42	0,53	0,44
Epigallocatequina terminal	0,06	0,04	0,00
Epicatequina galato terminal	0,19	0,46	0,51
Catequina terminal	0,34	0,08	0,05

Tabla 3. Contenido de polifenoles en los extractos de uva y vino analizados.

4. Referencias

1. Bueno, M., et al., *Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation*. *Frontiers in Chemistry*, 2018. **6**.
2. Timberlake, C.F. and P. Bridle, *INTERACTIONS BETWEEN ANTHOCYANINS, PHENOLIC COMPOUNDS, AND ACETALDEHYDE AND THEIR SIGNIFICANCE IN RED WINES*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1976. **27**(3): p. 97-105.
3. McRae, J.M., et al., *Effect of Wine pH and Bottle Closure on Tannins*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013. **61**(47): p. 11618-11627.
4. Pissarra, J., et al., *Reaction Between Malvidin 3Glucoside and (+)Catechin in Model Solutions Containing Different Aldehydes*. *Journal of Food Science - J FOOD SCI*, 2003. **68**: p. 476-481.
5. Escott, C., et al., *Study of the Interaction of Anthocyanins with Phenolic Aldehydes in a Model Wine Solution*. *Acs Omega*, 2018. **3**(11): p. 15575-15581.
6. Cave, J.R., et al., *Omics Forecasting: Predictive Calculations Permit the Rapid Interpretation of High-Resolution Mass Spectral Data from Complex Mixtures*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019. **67**(48): p. 13318-13326.
7. Alegre, Y., et al., *Development of a new strategy for studying the aroma potential of winemaking grapes through the accelerated hydrolysis of phenolic and aromatic fractions (PAFs)*. *Food Research International*, 2020. **127**.
8. Es-Safi, N.E., et al., *Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerization of flavanols*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. **47**(5): p. 2088-2095.
9. Carrascon, V., et al., *The kinetics of oxygen and SO₂ consumption by red wines. What do they tell about oxidation mechanisms and about changes in wine composition?* *Food Chemistry*, 2018. **241**: p. 206-214.
10. Ducasse, M.A., et al., *Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines*. *Food Chemistry*, 2010. **118**(2): p. 369-376.

