



Universidad
Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Desarrollo y validación de un método de análisis de compuestos de interés en el aroma del vino.

Development and validation of a method of analysis of compounds of interest in the aroma of wine.

Autor

Ana Isabel Gracia Izquierdo

Director

Ricardo López Gómez

Facultad

Facultad de ciencias / Grado en Química

Año

2018-2019

Desarrollo y validación de un método de análisis de compuestos de interés en el aroma del vino.

El objetivo principal de este trabajo se basa en el diseño de un método que permita cuantificar el SO₂ contenido en un vino modelo, optimizando los parámetros variables de un cromatógrafo de gases con un detector Fotométrico de Llama Pulsante (PFPD). El SO₂ se añade en los vinos como agente antiséptico y antioxidante. Este se añade en forma de hidrogeno sulfito de sodio, y establece una serie de equilibrios en disolución, permitiendo encontrar distintas especies de SO₂ (libre, combinado y molecular). El hecho de tener el analito en diferentes formas, dificulta la determinación debido a que el PFPD solo va a detectar el SO₂ molecular.

Se trató de cuantificar el SO₂ total en forma de SO₂ molecular desplazando los distintos equilibrios en los que se encontraba. La muestra se introdujo en el cromatógrafo mediante espacio de cabeza estático junto con un estándar interno adecuado, y se variaron las condiciones en los distintos experimentos realizados con la finalidad de observar como se comportaba el pico de interés. Para esto, se estudió la repetitividad, la influencia del pH y de la temperatura sobre el pico, la variabilidad del pico al variar el volumen de inyección, la disminución al formar aductos con acetaldehído y el aumento de este al romperlos.

Regular y conocer estas condiciones permitió desarrollar un método mediante el cual se procedió a la cuantificación de las distintas especies en un vino modelo. Para esto se realizó una curva de calibrado siguiendo las condiciones del método desarrollado y se interpoló en ella los valores de señal de muestras de concentración desconocida. Los resultados obtenidos mediante el método desarrollado fueron validados frente al método de referencia Rankine.

Development and validation of a method of analysis of compounds of interest in the aroma of wine.

The main objective of this work is the design of a method that allows to quantify the SO₂ content in a synthetic wine, optimizing the variable parameters of a gas chromatograph with a PFPD detector. SO₂ is added to wines as an antiseptic and antioxidant agent. This compound is added in the form of sodium bisulfite, and establishes a series of equilibria in solution, allowing to find different species of SO₂ (free, combined and molecular). The fact of having the analyte in different forms, makes the determination challenging because the PFPD is only going to detect the molecular SO₂.

It tried to quantify the total SO₂ in the form of molecular SO₂, displacing the different equilibria in which it was found. The sample was introduced into the chromatograph by means of a static head space together with an adequate internal standard, and the conditions in the different experiments were varied in order to observe the behavior of the peak of interest. For this, the repeatability, the influence of pH and temperature on the peak, the variability of the peak when varying the volume of injection, the decrease in forming adducts with acetaldehyde and the increase of this when breaking them were studied.

The optimization of these conditions allowed to develop a method to quantify the different species in a synthetic wine. For this, a calibration curve was carried out following the conditions of the developed method and the signal values of samples of unknown concentration were interpolated in it. The results obtained by the developed method were validated against the reference Rankine method.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Objetivos y planteamiento del trabajo | 4 |
| 3. Parte experimental | 4 |
| 3.1. Muestras, reactivos, materiales y protocolos | 5 |
| 3.1.1. Muestras | 5 |
| 3.1.2. Reactivos | 5 |
| 3.1.3. Materiales | 5 |
| 3.1.4. Protocolos de trabajo del propio laboratorio (LAAE) | 6 |
| 3.1.4.1. Disoluciones de SO ₂ | 6 |
| 3.1.4.2. Preparación de aductos con acetaldehídos | 6 |
| 3.1.4.3. Paul-Rankine OIV-MA-AS323-04A | 7 |
| 3.2. Instrumentación | 7 |
| 3.2.1. Balanza analítica | 7 |
| 3.2.2. pH metro | 7 |
| 3.2.3. Cromatógrafo | 8 |
| 3.2.3.1. Espacio de cabeza | 8 |
| 3.2.3.2. Columna SPB TM -SULFUR | 8 |
| 3.2.3.3. Detector PFPD | 9 |
| 3.2.3.4. Condiciones del cromatógrafo | 9 |
| 4. Resultados y discusión | 10 |
| 4.1. Optimización cromatográfica | 10 |
| 4.1.1. Optimización del rango de medida del detector | 10 |
| 4.1.2. Búsqueda de un estándar interno adecuado | 11 |
| 4.1.3. Optimización de la duración del cromatograma | 11 |
| 4.2. Optimización condiciones de incubación | 12 |
| 4.3. Estudio repetitividad | 13 |
| 4.4. Estudio pH (2,0 y 3,5) | 14 |
| 4.5. Estudio temperatura y pH (con y sin acetaldehído) | 16 |
| 4.6. Calibrado | 19 |
| 4.7. Validación frente a Rankine | 21 |
| 5. Conclusiones | 23 |
| 6. Referencias | 24 |

1. INTRODUCCIÓN

El dióxido de azufre SO₂ se utiliza en la elaboración de vinos como conservante, gracias a su acción antibacteriana y antioxidante. El SO₂ es una molécula neutra y muy volátil, sin embargo, en medio acuoso, esta molécula se comporta como un ácido diprótico débil (H₂SO₃). El H₂SO₃ es muy inestable y difícil de detectar ya que forma parte de un conjunto de equilibrios que coexisten en la matriz del vino. Se puede concluir que a pH ácido el equilibrio se desplaza y la especie mayoritaria es HSO₃⁻ ¹.



La especie HSO₃⁻ es muy nucleófila y formará aductos con especies electrófilas, como pueden ser los carbonilos de los acetaldehídos². La presencia de HSO₃⁻ es muy importante, ya que tiene un fuerte carácter reductor que permite su reacción con las moléculas de oxígeno evitando la oxidación del vino¹. Se observa que puede inhibir el comportamiento de numerosas enzimas, que catalizan reacciones no deseadas². Se conoce la manera en que esta especie se combina con acetaldehído (entre otras especies) haciéndolo menos volátil, favoreciendo la eliminación de olores indeseados.

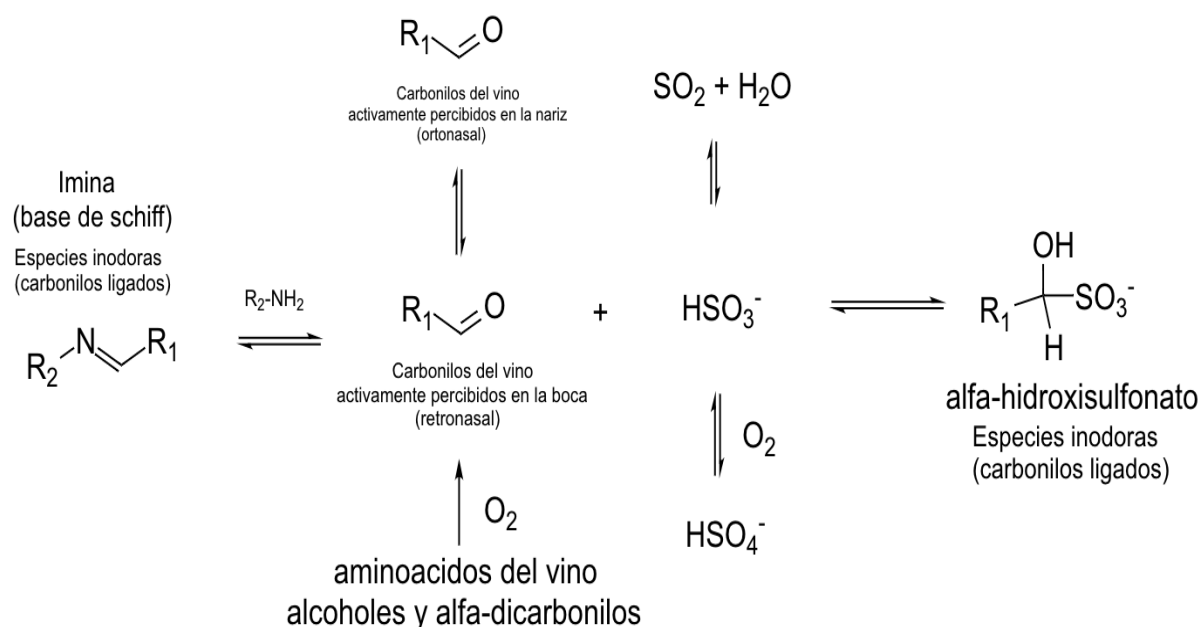


Figura 1. Diagrama explicativo sobre las reacciones dadas en la matriz de un vino.

El SO₂ molecular impide el crecimiento de microorganismos y levaduras. El mecanismo que sigue tiene varias etapas entre ellas: la reducción de cofactores y vitaminas, la reducción de puentes disulfuro en proteínas y la reacción con ácidos nucleicos².

Se puede distinguir entre SO₂ libre y SO₂ ligado/combinado. El SO₂ libre esta constituido mayoritariamente por HSO₃⁻ y en una menor parte por SO₂ molecular. Estas dos especies se encuentran en un equilibrio químico controlado por el pH. Se puede establecer de forma aproximada cual será la concentración de las distintas especies en la matriz de un vino según esta grafica:

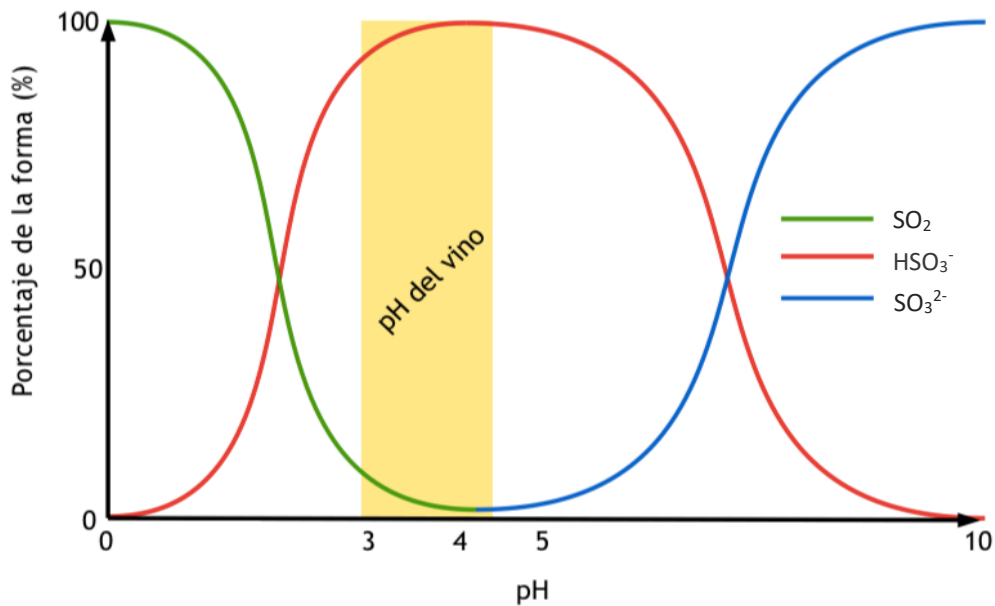


Figura 2. Porcentaje de las distintas formas del SO₂ en el vino según el pH³.

El SO₂ ligado/combinado está constituido por las moléculas de HSO₃⁻ que se encuentran formando aductos con las sustancias electrófilas del vino, como pueden ser moléculas de acetaldehído (entre otras). La mayoría de estas moléculas de HSO₃⁻ constituyen enlaces débiles, y la concentración de estos aductos varia mucho en la muestra. Se pueden encontrar en menor medida moléculas de HSO₃⁻ que se unen con más fuerza a los carbonilos en disolución y es necesario aplicar más energía para romperlas.

$$[\text{SO}_2 \text{ Libre}] = [\text{HSO}_3^-] + [\text{SO}_2 \text{ molecular}] \quad (2)$$

$$[\text{SO}_2 \text{ combinado}] = [\text{HSO}_3\text{-formando aductos}] \quad (3)$$

$$[\text{SO}_2 \text{ total}] = [\text{SO}_2 \text{ combinado}] + [\text{SO}_2 \text{ Libre}] \quad (4)$$

En las bodegas tradicionales, las concentraciones de SO₂ libre y molecular se determinan de forma rutinaria (semanal o mensualmente) con el fin de llevar un control de la calidad de los vinos. Se puede realizar la medición del SO₂ libre y molecular desde tres perspectivas diferentes².

1. **Análisis volumétrico o colorimétrico.** En él los reactivos oxidantes se agregan directamente a la muestra. El método más conocido es la valoración yodométrica, en la cual se usa un indicador de almidón o potenciométrico.
2. **Oxidación por aireación (A-O)⁴.** El objetivo se basa en aislar y cuantificar el SO₂ molecular mediante la acidificación de la muestra. Para esto se destila el SO₂ molecular y se recolecta en un matraz que contiene peróxido de hidrogeno. Esta reacción química dará lugar a ácido sulfúrico que posteriormente será valorado⁴.
3. **Separación y cuantificación del SO₂ libre sin ajustar el pH o sin diluir (no perturbadores).** Este tipo de métodos son mas raros de ver en la industria del vino, ya que requieren equipos más sofisticados. Estos métodos incluyen la electroforesis capilar⁵ del HSO₃⁻, o la cuantificación del espacio de cabeza SO₂ libre utilizando cromatografía de gases⁶ o métodos colorimétricos.

Los métodos que involucran dilución, cambios de pH o dependen de la destrucción del SO₂ libre probablemente sobrestiman el contenido de este, ya que los aductos formados por el HSO₃⁻ se disociarán y se medirán como libres. Los principales métodos utilizados en la industria del vino parecen sobreestimar el contenido de SO₂ libre en un promedio de 15% en vinos blancos y en un 30% en vinos tintos². El porcentaje de error en los vinos tintos se debe a la disolución de los aductos de antocianina-hidrogenosulfito.

Los motivos de estas medidas incorrectas son aún desconocidos. La oxidación por aireación, y/o los métodos relacionados con este son más adecuados que los métodos no perturbadores para predecir la capacidad antioxidante del SO₂ en un vino, ya que las formas débilmente ligadas sustituirán parcialmente las reservas de SO₂ libre.

Sin embargo, la fracción de antocianina-hidrogenosulfito medida por A-O y otros métodos clásicos tiene una actividad antimicrobiana despreciable, y estos métodos parecen ser poco adecuados para predecir la estabilidad microbiana del vino tinto. A pesar de estos problemas, la A-O y los métodos relacionados son reproducibles en los laboratorios.

El SO₂ total puede determinarse disociando las formas de SO₂ ligadas antes o durante el análisis con cualquiera de los métodos nombrados. Esto se puede lograr mediante el tratamiento de la muestra con una base. De esta manera se favorece la presencia de la especie SO₃²⁻ y se hidrolizan de los aductos antes de la acidificación de la muestra (en las valoraciones yodométricas). En el caso de A-O la disociación de los aductos se produce por el calentamiento de la muestra².

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El objetivo principal del trabajo es el diseño de un método que permita obtener un buen pico cromatográfico para el SO₂. Para esto se requiere aprender a manejar el cromatógrafo de gases utilizado, así como el software que lo dirige.

Antes de empezar a trabajar, es necesario optimizar los parámetros cromatográficos⁷ con la finalidad de obtener los distintos picos de interés con una resolución adecuada en el menor tiempo posible. Un parámetro fundamental a regular es la sensibilidad del detector PFPD⁸ (específico para compuestos azufrados), ya que es muy sensible y se satura fácilmente. Se tendrán que buscar las condiciones óptimas para conseguir obtener la mayor cantidad de información posible sin que el PFPD llegue a saturar, variando así distintos parámetros como volumen de inyección, rango del detector, concentración de la muestra etc.

Es necesario que el método diseñado, sea reproducible y los resultados obtenidos tengan una % DSR aceptable. Para esto se necesitará un estándar interno que corrija las distintas variaciones que sufre la muestra desde que se incuba hasta que llega al detector. Para adecuar la muestra a los problemas reales que sufre un vino, se realizarán diferentes experimentos que permitan estudiar la influencia de distintos agentes (temperatura, pH, contenido de sustancias electrófilas) sobre el contenido de analito.

Cuando se tienen todos los parámetros variables controlados, se procederá a la cuantificación mediante una recta de calibrado, la cual permitirá calcular el contenido de SO₂ presente en una muestra.

Se necesitarán validar los resultados obtenidos por medio del método desarrollado frente al método de referencia Paul-Rankine OIV-MA-AS323-04A según la organización de la viña y el vino⁹.

3. PARTE EXPERIMENTAL

En primer lugar, destacar que toda la parte experimental del trabajo se ha realizado en las instalaciones del Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología del departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza. En este apartado se explica como se prepararon las muestras, los reactivos que se usaron y la instrumentación que se utilizó para llevar a cabo los distintos experimentos. Se explican también los protocolos seguidos por el laboratorio.

3.1. Muestras, reactivos, materiales y protocolos.

3.1.1. Muestras.

Todas las muestras se prepararon de forma similar. Se introducían 12 mL de muestra en un vial de 20 mL y se colocaban en el muestreador automático para su análisis por espacio de cabeza estático. La composición base era un vino modelo con cantidades variables de SO₂, estándar interno, ácido tricloroacético y acetaldehído de acuerdo con el experimento realizado en cada momento y que se detallará en las correspondientes secciones.

3.1.2. Reactivos.

- Ácido L-tartárico al 99%. Panreac.
- Glicerina 99,5%. Panreac.
- Etanol 99,9%. Sigma Aldrich.
- Agua ultra pura miliQ. Milipore.
- Bisulfito de sodio 97%. Panreac.
- NaOH 99 %. Scharlau.
- MES (Metil Etil Sulfuro) 96%. Sigma Aldrich.
- Ácido tricloroacético 99%. Panreac.
- Acetaldehído 99,5%. Sigma Aldrich.
- N₂ 99%. Air Liquide.
- Ácido fosfórico al 25%. Panreac.
- Peróxido de hidrogeno 3%. Panreac.
- Indicador Vinikit (Mezcla azul de metileno y rojo de metilo). Panreac.

3.1.3. Materiales.

- Botellas de pírex 1L, 500 mL y 250 mL.
- Material aforado de laboratorio.
- Pipetas Paster.
- Pipeteador automático.
- Pipetas de plástico de 10 y 5 mL.
- Micropipetas de distintos tamaños (20-200 µL, 2-20 µL, 0,5-5 µL)
- Viales con chapa.
- Cámara de anoxia.
- Horno calefactor.
- Jeringa metálica.
- Material para Rankine: matraz corazón, matraz de balón, cronometro, trompa de vacía, montaje de refrigeración.

3.1.4. Protocolos.

Algunas de las operaciones que se realizaron durante este trabajo se encuentran escritas en protocolos de trabajo del propio laboratorio (LAAE). A continuación, se detallan someramente dichos protocolos.

3.1.4.1. Disoluciones de vino modelo dopado con SO₂.

Se preparaba 1L de vino a partir de 5 g de ácido tartárico, 10 g de glicerina, 130 mL de etanol y agua ultra pura. Tras preparar el vino en un matraz aforado de un litro, se trasvasa a una botella de vidrio pírex y se ajusta el pH hasta pH 3,5.

Para preparar el vino modelo dopado con SO₂, se preparaba una disolución patrón a partir del reactivo sólido Na₂S₂O₅, el cual se disolvía en vino modelo. Esta disolución se preparaba de manera exacta con una concentración de aproximadamente 2000 mg/L (Anexo 1). La disolución patrón se preparaba diariamente debido a la inestabilidad del SO₂ y a partir de esta se preparaban el resto de diluciones a la concentración deseada.

3.1.4.2. Preparación de aductos con acetaldehído.

Para que el vino modelo se acerque a las condiciones de un vino real, se va a introducir acetaldehído en las respectivas disoluciones ya que este compuesto es el aducto mayoritario en el vino. Para esto se va a introducir acetaldehído en proporción 1:1 con el SO₂. Según los cálculos realizados (Anexo 2), se tienen que inyectar en las respectivas disoluciones 410 µl de acetaldehído procedente de una disolución de 5000 mg/L. Es necesario que todos los trabajos que impliquen la manipulación de acetaldehído se lleven a cabo en el interior de la cámara de anoxia. El objetivo de preparar y preservar las disoluciones en la cámara de anoxia, es evitar la oxidación y favorecer la formación de aductos entre el SO₂ y el acetaldehído. Todas las disoluciones que contienen acetaldehído deben de permanecer 12 h en el interior de la cámara, para dar tiempo a la formación de los aductos.



Figura 3. Cámara de anoxia en la que se realizaron las disoluciones de acetaldehído.

3.1.4.3. Paul-Rankine OIV-MA-AS323-04A.

Se introducen en el matraz de balón 5 mL de ácido fosfórico al 25% junto con 10 mL de muestra de vino. El montaje refrigerador se conecta a la corriente de agua. En el matraz corazón se ponen 4 mL de agua oxigenada junto con dos gotas de indicador Vinikit. Se observa que el matraz corazón adquiere una tonalidad verde intenso. A continuación, se añaden unas gotas de NaOH 0,01M hasta hacer virar el indicador hasta una tonalidad violeta y se acopla al montaje. Una vez todo montado, se acciona la trompa de vacío y se contabilizan 15 min con ayuda de un cronómetro. Cuando pasan los 15 min, se retira el matraz corazón y se valora con NaOH 0,01M.

Con ayuda de la relación aportada por el método $V_{\text{NaOH}} \times 32 = [\text{SO}_2]$ (mg/L) se puede calcular el SO_2 que ha sido arrastrado. Un ciclo Rankine completo consta de dos intervalos de 15 min. En el primer intervalo se mide el SO_2 libre y el proceso es idéntico al descrito anteriormente. En el segundo intervalo se mide el SO_2 combinando con ayuda de una manta eléctrica que rodea al matraz balón. Este calor aportado permite romper los aductos en el caso de que los haya.



Figura 4. Equipo utilizado para Paul-Rankine.

3.2. INSTRUMENTACIÓN.

3.2.1. Balanza analítica.

Se utiliza una balanza de la casa comercial AND y del modelo HR-200.

3.2.2. pH metro.

Se utiliza un pH metro de la casa comercial CRISON y del modelo micropH 2002.

3.2.3. Cromatógrafo.

Se va a utilizar un cromatógrafo de gases, Varian CP 3800, cuyo gas portador utilizado es una corriente de hidrógeno. El equipo consta de un inyector automático, modelo Combipal de la marca CTCAnalitics, en el que produce la incubación de la muestra. El detector utilizado es un PFPD específico para la detección de azufrados, del que a continuación, se explicará su funcionamiento. Para este equipo hemos colocado una columna SPB™-SULFUR con unas dimensiones de 15 m x 0,32 mm x 4 μm.

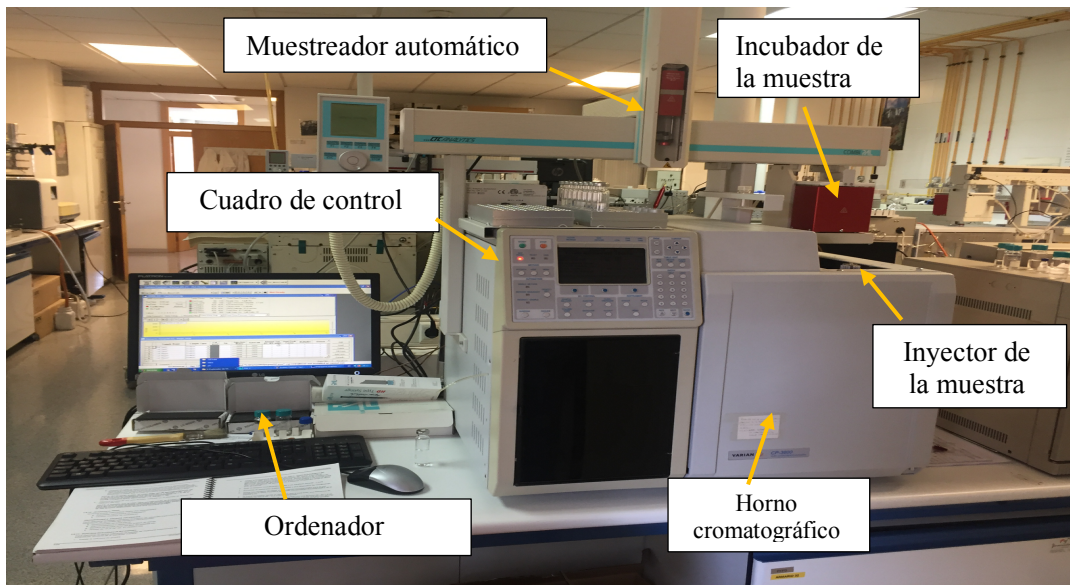


Figura 5. Imagen tomada del laboratorio de análisis de aroma y enología. Se muestra el cromatógrafo con el que se trabaja y sus distintos componentes.

La inyección de la muestra se realiza por inyección en espacio de cabeza. La columna y el detector utilizados son específicos para la determinación de compuestos azufrados.

3.2.3.1. Espacio de cabeza.

La inyección de la muestra por espacio de cabeza estático es una técnica de extracción en la que la muestra es calentada y se deja que alcance el equilibrio. Una vez que se establece el equilibrio, una fracción de los 8 mL de espacio de cabeza será transferida al cromatógrafo mediante una jeringa de gases. Las variables principales de esta técnica son la temperatura, el volumen de inyección y el tiempo de incubación.

3.2.3.2. Columna SPB™-SULFUR.

Fase de dimetilpolisiloxano 100%, ligada y entrecruzada. Columna de carácter apolar, diseñada especialmente para el análisis de compuestos azufrados (en nuestro caso, vino modelo dopado con SO₂). Esta columna tiene una estabilidad térmica garantizada, con un

bajo nivel de sangrado. Las dimensiones son 15 m de longitud, diámetro de la columna 0,32 mm y espesor de fase de 4 μm .

3.2.3.3. Detector PFPD.

Un detector PFPD⁸ (pulsed flamed photometric detector) es un detector fotométrico de llama pulsada. Este detector permite tanto la detección de azufre como la de fósforo. Es un detector de respuesta cuadrática. Esto quiere decir que para obtener una relación lineal señal frente a concentración las señales obtenidas deben transformarse en su raíz cuadrada. La llama en el PFPD pulsa porque los caudales de hidrógeno y aire no mantienen una combustión continua. La pulsación de llama pasa por cuatro etapas: llenado, inflamación, propagación y emisión.

La primera etapa es la de llenado, en ella se mezclan el aire e hidrógeno y penetran en la cámara de combustión. Después se produce la inflamación en la que la mezcla de gases combustibles entra en la cámara del encendedor alcanzando una bobina caliente inflamándose. Se produce un frente de llama que se desplaza hasta la parte inferior de la cámara en la que este se apaga. En esta fase de la propagación las moléculas de la muestra (compuestos azufrados) se rompen en moléculas simples o en átomos y se produce la emisión, en la cual los átomos de la muestra forman especies excitadas electrónicamente dando lugar a una luz emitida que llegará al fotodetector. La emisión del fondo de la llama se completa en menos de 0,3 ms después de la propagación, mientras que las especies moleculares de fósforo y azufre emiten durante un tiempo mucho más largo. Esta diferencia en los tiempos de emisión mejora la detectividad y la selectividad del PFPD.

3.2.3.4. Condiciones cromatográficas.

Las condiciones cromatográficas se establecieron modificando los parámetros establecidos en un método diseñado anteriormente con el mismo equipo¹⁰.

La temperatura del inyector se mantuvo 150°C. La temperatura de la columna a la que entraba la muestra era de 50°C, esta temperatura se mantenía hasta el minuto 1,1, en el cual se iniciaba una rampa de temperaturas en la que la temperatura del horno ascendía hasta 120°C a una velocidad de 20°C/min. El detector estaba a una temperatura de 300°C y en un rango de sensibilidad de 8. El voltaje fotomultiplicador era de 570 V y estaba activado el modo de respuesta cuadrática. El detector trabajaba con un factor de ganancia 10. El caudal de gas portador (hidrógeno) que llegaba al detector es de 11 mL/min y el caudal de los flujos de aire 1 y 2, es de 17 y 10 mL/min respectivamente. El flujo que atravesaba la columna es de 2 mL/min de hidrógeno.

Por otro lado, las condiciones de incubación de la muestra se regulaban desde el Combipal, que es un muestreador automático con un software específico que trabaja simultáneamente con el software del cromatógrafo. Al igual que en el cromatógrafo, vamos a trabajar modificando las condiciones del método existente¹⁰. Se realizaron

distintas pruebas y se estableció un tiempo de incubación de 5 min y calentamiento a 30°C.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se van a comentar todos los experimentos realizados (especificando las condiciones con mas detalle) y los resultados que se obtuvieron de cada uno de ellos. Lo primero fue la optimización cromatográfica, dentro de la cual se adecuó el rango de medida del detector, se encontró un estándar interno adecuado, y se acorto el tiempo del cromatograma. Después se modificaron las condiciones de incubación, se realizó un estudio de repetitividad, se observo la influencia del pH y se conoció el comportamiento del SO₂ al formar aductos con acetaldehído.

4.1. Optimización cromatográfica.

Una vez instalada la columna, se procedió a acondicionarla realizando varios ciclos de blancos con el objetivo de que salieran todas las sustancias que podían encontrarse en la columna y produjeran ruido adicional a la medida.

La primera disolución que se inyectó fue la de vino modelo sin SO₂, la cual se usó para tener blanco de la matriz sobre la cual se iba a trabajar. El cromatograma obtenido presentaba una ligero elevación previa al pico de interés, que se asocia a la presencia de una impureza azufrada no identificada (podría corresponderse con Tiosulfato S₂O₅, 0,05%) en el ácido tartárico (99% de pureza). Puesto que esta impureza no interfería en la determinación del SO₂ ni del estándar interno, se consideró que el blanco era adecuado.

4.1.1. Optimización del rango de medida del detector.

Como se comentó en la sección de material y métodos, el detector PFPD tiene una respuesta cuadrática que depende del número de átomos de azufre de la molécula de estudio. Por esta razón, es fácil exceder el rango lineal de respuesta y sufrir una saturación de los picos. Por tanto, es necesario optimizar el rango de medida del detector para obtener la mejor sensibilidad dentro de un rango lineal adecuado para nuestras muestras.

En el equipo de trabajo, el rango de medida del detector se puede variar entre 8, 9 y 10. Al disminuir el rango se está disminuyendo la sensibilidad con la que se toma la medida. Si el detector se satura quiere decir que es demasiado sensible, y la señal es demasiado grande como para cuantificarla. Entonces lo que se hizo fue realizar diferentes pruebas a diferentes concentraciones de SO₂ (5, 50 y 250 mg/L, a pH 3,5 y V_{iny}=1 mL) con el detector a rango 9.

A 5 mg/L se veía un pico muy pequeño, el cual proporciona una medida muy inexacta. A 250 mg/L el pico para el SO₂ se saturaba y lo mismo sucedía a 50 mg/L. Ante este problema, se vio que a rango 9, el detector es demasiado sensible, y a concentraciones

relativamente bajas se va a saturar. Ante esto se decidió realizar las medidas a rango 8, en el cual si que se podía medir hasta 50 mg/L sin llegar a saturar.

4.1.2. Búsqueda de un estándar interno adecuado.

El análisis del espacio de cabeza estático es una técnica rápida y sencilla, muy adecuada para compuestos muy volátiles. Sin embargo, sufre de problemas de reproducibilidad debido fundamentalmente a problemas de variabilidad en la temperatura de extracción o en la misma matriz. Por esta razón, se tiene que introducir un estándar interno en una concentración adecuada, que varíe de la misma manera que el analito y permita referenciar la respuesta del mismo a la del estándar interno para obtener resultados cuantitativos fiables. Es necesario que el estándar interno tenga un tamaño de pico adecuado y mantenga una separación razonable respecto del pico de interés.

Para asegurar que el estándar interno cumple estos requisitos se prepararon distintas disoluciones, todas ellas con una concentración de 30 mg/L de SO₂ en vino modelo y distintas cantidades de Etil Metil Sulfuro (EMS) concretamente 10, 20 y 40 µL de una disolución de 11,14 mg/L (preparada a partir de una disolución patrón de 10000 mg/L), y se pincharon en el cromatógrafo.

Se pudo observar como con 10 µL apenas se apreciaba el estándar interno. Con 20 µL se veía relativamente bien, pero se decidió poner en todas 40 µL, por que era el que más señal daba y permitiría trabajar con un rango mayor de concentraciones.

4.1.3. Optimización de la duración del cromatograma.

Para reducir la duración del cromatograma se llevo a cabo una optimización del programa de temperatura del horno de columnas. La temperatura de la columna a la que entraba la muestra en el método base¹⁰ era de 35°C, esta temperatura se mantenía hasta el minuto 3, en el cual se iniciaba una rampa de temperaturas en la que la temperatura del horno ascendía hasta 140°C a una velocidad de 20°C/min. Debido a que el cromatograma duraba un total de 14 minutos, se cambió la velocidad de calentamiento de la columna para conseguir que se calentara antes en menos tiempo. Se realizaron dos pruebas:

1. En la primera, el cromatograma fue acortado a 6,50 min. Para esto se subió la temperatura a la que entraba la muestra a 50°C que se mantenían durante 3 minutos. En los 3 minutos siguientes se subía la temperatura a una velocidad de 20°C/min, hasta llegar a 110°C en los cuales se mantenía durante medio minuto.
2. En la segunda, el cromatograma fue acortado a 5,1 min. Para esto se subió la temperatura a la que entraba la muestra a 50°C que se mantenían durante 1,1 minutos. En los 3,5 minutos siguientes se subía la temperatura a una velocidad de 20°C/min, hasta llegar a 120°C en los cuales se mantenía durante medio minuto.

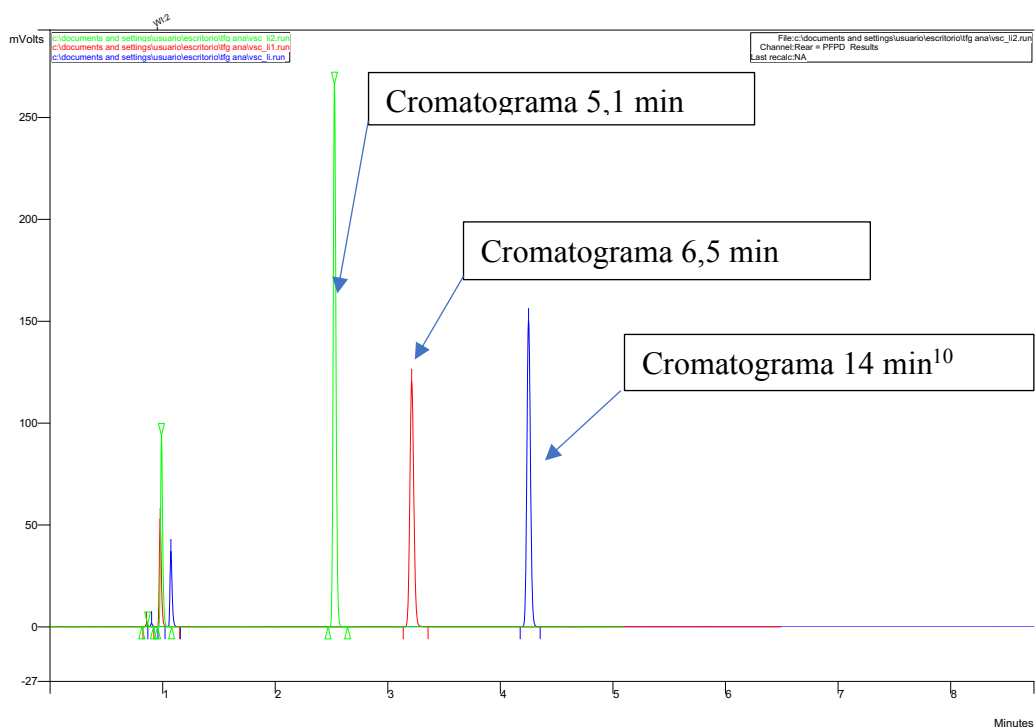


Figura 6. Comparativa entre las distintas rampas de temperatura y el tiempo de duración del cromatograma.

Como el último pico salía a $t_r=2,44$ min (segunda prueba), se obtenía margen suficiente para reducir el cromatograma hasta 5,1 min, sin afectar a la resolución de los picos.

4.2.Optimización condiciones de incubación.

Uno de los parámetros críticos en relación con la optimización del método, es el tiempo de incubación de la muestra. Al ser un método que inyecta los gases presentes en el espacio de cabeza del vial, es necesario estudiar los cambios que el tiempo y temperatura de incubación provocan en la respuesta del analito y del estándar interno.

El método inicial¹⁰ de incubación de la muestra, requería de una agitación durante 15 min a 30°C. Entonces se realizaron nueve disoluciones de vino modelo dopado con 30 mg/L de SO₂, inyectando 1 mL a pH 3,5. Se inyectaron las nueve a 30°C variando el tiempo de incubación en grupos de tres (5 min, 10 min, 15 min). Para decidir si podemos considerar las %DSR iguales o diferentes se va a realizar un test ANOVA.

Tabla 1. Test ANOVA para las distintas áreas de SO₂ a distintos tiempos de incubación.

| Grupos | Promedio | Varianza | DSR% | P(F) |
|---------------|-----------------|-----------------|-------------|-------------|
| 5 min | 0,4170 | 0,0011 | 8% | 0,037 |
| 10 min | 0,4586 | 0,0005 | 5% | |
| 15 min | 0,4821 | 0,0001 | 2% | |

Como la variancia en los tres casos, es menor que el valor P(F) no podemos considerar que las %DSR sean iguales. Pero como la diferencia entre los valores promedio es relativamente pequeña, se decidió realizar todos los experimentos con un tiempo de incubación de 5 min.

Con este tiempo fijado se estudiaron también las temperaturas de 30°C, 40°C y 60°C. Se vio como a 60°C el pico de interés desaparecía. A 30°C y 40°C los picos resultaron ser prácticamente iguales. Entonces se decidió dejar la temperatura a 30°C.

4.3. Estudio repetitividad.

Para asegurar que el método proporciona datos reproducibles, la primera etapa es realizar un estudio de repetitividad. Lo cual permitirá analizar si existe algún tipo de tendencia al inyectar las muestras, o existe algún factor que interfiera a la hora de obtener resultados semejantes. El objetivo de este estudio es obtener una primera estimación de la reproducibilidad en condiciones de repetitividad.

Hay que tener en cuenta que la respuesta del detector es cuadrática, y una desviación relativamente pequeña será mostrada en el cromatograma elevada al cuadrado haciendo que su apariencia sea mayor.

El estudio de repetitividad se hizo con vino modelo dopado con SO₂ a 30 mg/L sin estándar e inyectando un 1 mL a pH 3,5. Con esto se pretendía estudiar si había alguna variación en la muestra antes de introducir el estándar.

Se colocaron 5 replicas de 30 mg/L de SO₂, y se observó que la impureza del ácido tartárico tenía una desviación estándar relativa (%DSR) de 2,65, mientras que el pico asociado al SO₂ tenía una %DSR de 4,39. La %DSR del analito se consideró satisfactoria teniendo en cuenta la técnica utilizada y que no se estaba corrigiendo con el estándar interno.

Tabla 2. Datos obtenidos para las cinco replicas de 30 mg/L de SO₂ sin estándar interno.

| AREAS | REP 1 | REP 2 | REP 3 | REP 4 | REP 5 | PROMEDIO | s | %DSR |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------|-------|------|
| Impureza | 67,16 | 64,62 | 60,92 | 62,70 | 61,39 | 62,41±0,75 | 1,66 | 2,66 |
| SO₂ | 331,37 | 229,44 | 243,41 | 255,39 | 245,64 | 243,47±4,78 | 10,70 | 4,39 |

Tras este experimento, se procedió a introducir un estándar interno para observar como variaba la muestra en presencia de este. Se introdujeron 10 replicas de 30 mg/L junto con 40 µL de MES e inyectando un 1 mL de espacio de cabeza a pH 3,5. Se calcularon las raíces de las áreas y se compararon con las áreas del estándar interno, obteniendo así las áreas relativas para el SO₂. Estas áreas relativas (área de SO₂ entre área de EMS) eran muy similares ya que tenían una %DSR de 0,59 y además, se observó que no seguían ninguna tendencia.

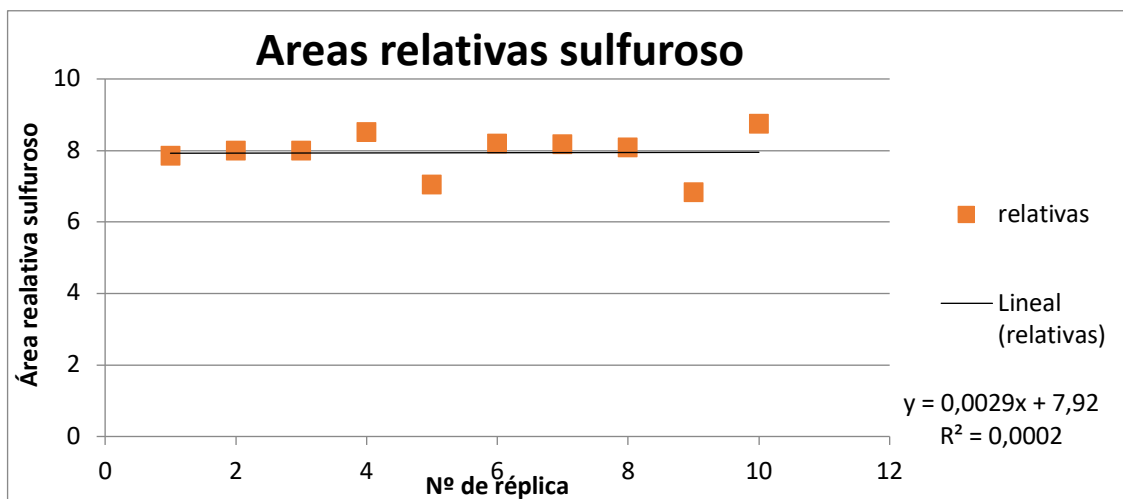


Figura 7. Estudio de repetitividad. En esta imagen se puede observar como las áreas relativas no siguen ninguna tendencia.

4.4. Estudio pH (2 v 3,5)

Una vez optimizadas las condiciones cromatográficas y de muestreo se procedió al estudio de la influencia del pH. El SO₂ presente en los vinos forma aductos con otras especies presentes en las matrices de los vinos, especialmente con los carbonilos electrófilos como el acetaldehído. Bajar el pH es una forma de romper estos aductos y liberar el SO₂ presente en forma ligada. También el pH va a influir en el equilibrio entre SO₂ y sulfito ácido (figura 2).

En el presente estudio se está trabajando con vinos modelo lo que permite seleccionar la presencia o ausencia de carbonilos. Para estudiar la influencia del pH se comenzó con un vino modelo sin carbonilos, dopado con un cierto contenido de SO₂ que se encuentra formando un equilibrio ácido-base como el descrito anteriormente², desde pH 3,5 hasta pH 1.

Al bajar el pH lo que sucede es que se desplaza el equilibrio ácido-base hacia la formación de SO₂. Lo que resulta en una respuesta mucho mas grande. Para bajar el pH se empleó un ácido fuerte orgánico (ácido tricloroacético 4,7M procedente de un reactivo solido al 99% de pureza), que permitiera bajar hasta pH=1 sin atacar a la jeringa metálica utilizada.

Para determinar cuanto ácido se tenía que echar en las disoluciones de vino con 30 mg/L de SO₂, se realizaron dos valoraciones para conseguir pH 2 (120 µL) y pH 1 (1,2 mL). Se añadieron los distintos volúmenes de ácido tricloroacético a las muestras, realizando dos réplicas de cada pH y se mantuvieron dos réplicas de vino modelo dopado con 30 mg/L de SO₂ a pH 3,5.

Como cabía esperar, a pH 2 y a pH 1, la respuesta del pico de SO₂ aumentó significativamente, aunque como contrapartida, esto provocó una saturación del detector que podía ser corregida a todos los pH variando el volumen de inyección.

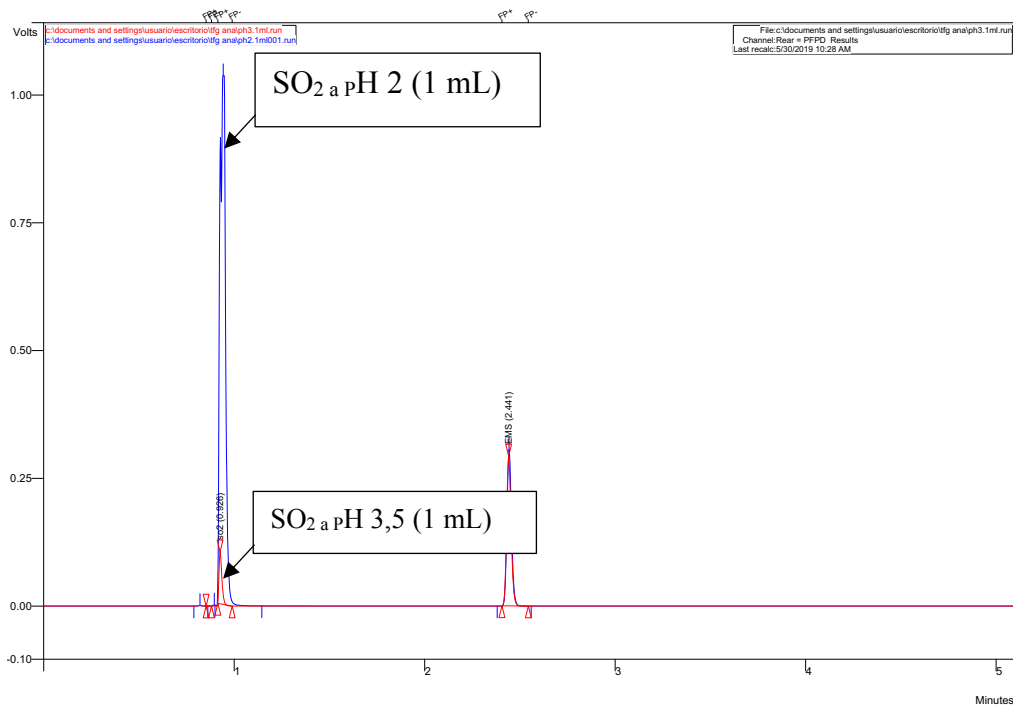


Figura 8. Cromatograma que muestra la diferencia en la cantidad de SO₂ molecular cuando se desplaza el equilibrio ácido-base. En esta imagen también se aprecia como se satura el detector, ya que lo máximo que puede medir es 1V.

Se observó que a pH 2 inyectando 0,1 mL el pico se visualizaba perfectamente, y para pH 1 cogiendo el mismo volumen se seguía saturando. El hecho de trabajar con un detector de respuesta cuadrática de elevada sensibilidad, no permitió poder ver distintas concentraciones de SO₂. En el instante en el que se tenían concentraciones ligeramente diferentes, se tenían problemas de saturación, o se tenían problemas de cuantificación por que el pico era demasiado pequeño para medirlo. Como se estaba trabajando en rango 8 (el mínimo permitido por el equipo) se tuvieron que modificar los volúmenes de inyección para conseguir ver distintas concentraciones en un mismo rango y poder compararlas mediante áreas relativas.

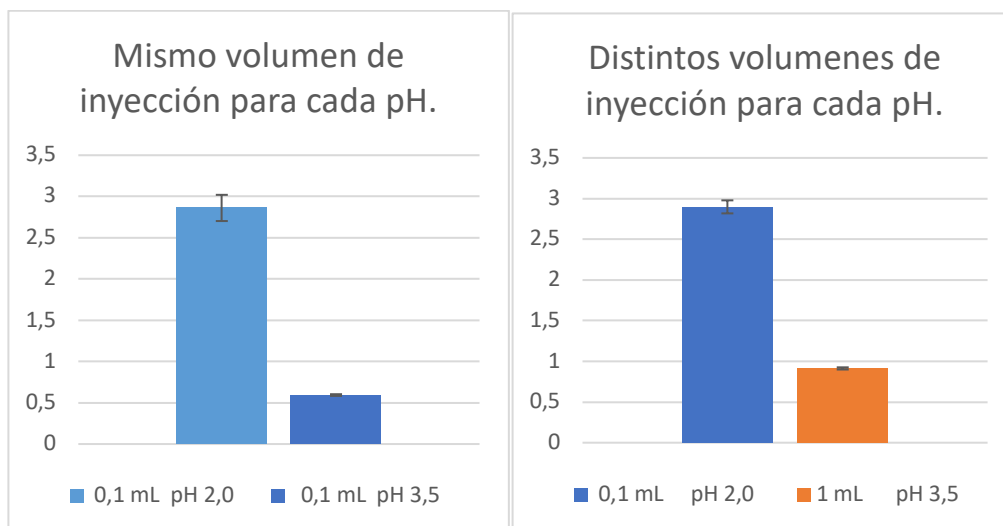


Figura 9. Diagramas de barras. Representa el promedio de las áreas relativas para el pico de SO₂ en función del pH y el volumen de inyección. Las barras de error corresponden a la desviación estándar dividida entre la raíz del número de replicas.

Ante esto, se decidió que todos los experimentos realizados a pH 2 se harían inyectando 0,1 mL y los experimentos realizados a pH 3 se realizarían cogiendo 1 mL.

El problema de estos experimentos realizados bajando el pH, era que eran muy poco reproducibles, entonces se decidió dejar estabilizando los viales durante una hora tras la adición del ácido, y efectivamente se vio que los valores del pico de SO₂ eran repetitivos y reproducibles. También se comprobó, que el hecho de trabajar con estas disoluciones en el interior de la cámara de anoxia afectaba a la repetitividad, haciendo que los resultados fueran mas exactos y reproducibles de un día para otro.

4.5. Estudio temperatura y pH (con acetaldehído).

Este estudio se centra en observar como afecta la temperatura y el pH a la rotura de unos aductos previamente formados que simularán las condiciones del SO₂ en un vino real.

Se prepararon varias disoluciones con diferente relación molar SO₂/acetaldehído en la cámara de anoxia (1:1, 2:1, 2:3) para observar en que proporción se formaban los aductos y cuanto disminuía el pico de SO₂ molecular conforme aumentaba la cantidad de acetaldehído. Para realizar estas pruebas, se prepararon cinco viales con cada una de las distintas proporciones, se inyectaron 0,1 mL del espacio de cabeza a pH 2,0. La proporción de aductos considerada optima para la realización de los experimentos fue SO₂ /acetaldehído 1:1. Se eligió dicha proporción (1:1), porque a cantidades mayores de acetaldehído (2:3) el pico del SO₂ molecular era tan pequeño que no permitía una correcta cuantificación.

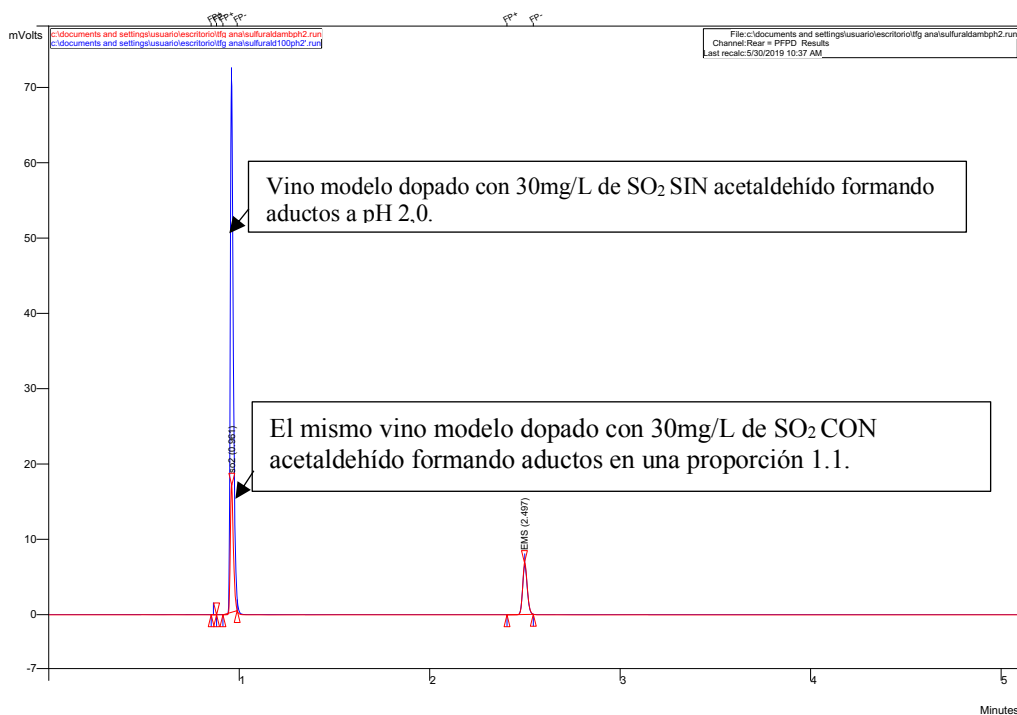


Figura 10. Comparativa entre el contenido de SO₂ molecular detectado por el PFPD. El cromatograma rojo representa la situación en la que hay aductos y el resto de SO₂ que no se aprecia está en forma combinada. El cromatograma azul representa la situación en la que todo el SO₂ molecular esta libre.

Una vez decidida la proporción de SO₂/acetaldehído adecuada para observar correctamente la formación de los aductos, se prepararon por triplicado las siguientes muestras de vino modelo que contenían todas ellas 30 mg/L de SO₂:

- Vino modelo sin acetaldehído a pH 3,5 como referencia para calcular cuanto se desplaza el equilibrio ácido base respecto a pH 2,0.
- Vino modelo sin acetaldehído a pH 2,0. Estos viales darán la cantidad máxima de SO₂ molecular detectado por el PFPD.
- Vino modelo dopado con acetaldehído 1:1 a pH 3,5. Las condiciones de este vino modelo son las mas parecidas a un vino real, y nos servirá para calcular cuanto SO₂ combinado podemos liberar al disminuir el pH.
- Vino modelo dopado con acetaldehído en proporción 1:1 llevado a pH 2,0. Estos viales contendrán la cantidad de SO₂ molecular tras haber sufrido una ruptura de aductos al bajar el pH.

Tabla 3. Áreas relativas de SO₂ obtenidas en diferentes condiciones de pH y contenido de acetaldehído. Los valores para las áreas relativas son valores promedio de tres replicas acompañados de \pm su desviación estándar dividida entre $\sqrt{3}$.

| Condiciones | Área relativa a pH 3,5 | Área relativa a pH 2,0 |
|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Sin acetaldehído | 0,61 \pm 0,07 | 9,54 \pm 0,26 |
| Con acetaldehído | 0,14 \pm 0,02 | 1,37 \pm 0,04 |

En la tabla 3, se puede apreciar como en las disoluciones que no hay acetaldehído al bajar el pH a pH 2,0 se tiene 16 veces más de SO₂ molecular. Si se compara a pH 3,5 se puede ver que hay cuatro veces menos cantidad de SO₂ molecular en las muestras con acetaldehído que en las muestras sin acetaldehído, esto es un indicio de que se están formando aductos y que el SO₂ molecular disminuye.

Es importante mencionar que a pH 2, al añadir acetaldehído se acomplejará un 86% del SO₂ molecular. Para las muestras con acetaldehído se va a apreciar como bajando el pH desde 3,5 hasta 2,0 se rompe un 10,21% de los aductos formados.

Se vio que al bajar el pH la cantidad de aductos disociados era muy pequeña (10,21%). Este fenómeno limita severamente la aplicabilidad del método a un vino real ya que todo el SO₂ que no es liberado de los aductos, es un error a la hora de determinar el SO₂ total que contiene una muestra.

Puesto que la bajada en el pH no permitía romper cuantitativamente todos los aductos, se planteó subir la temperatura para favorecer el desplazamiento total como se hace en otros métodos de determinación de SO₂. La temperatura seleccionada con este propósito fueron 100°C. Los viales con el vino modelo se llevaron a 100°C en una estufa calefactora durante una hora. Una vez transcurrido este periodo los viales se dejaron enfriar para inyectarlos al cromatógrafo en las condiciones habituales.

Para este experimento se ensayaron tres viales con acetaldehído y uno sin acetaldehído (100°C y 1 h en todos los casos). Fuera de la estufa se dejaron dos viales sin acetaldehído y dos con acetaldehído como referencia para la comparación con las mismas condiciones a 100°C. Todos los viales de este experimento se encontraban a pH 2.

Se vio que los viales que no contenían acetaldehído, el contenido en SO₂ (30 mg/L) se mantenía constante a 100° y a temperatura ambiente. En cambio, los viales que contenían acetaldehído si que presentaron un ligero cambio

Tabla 4. Comparativa de las áreas relativas de SO₂ en las distintas condiciones en las que se manipulan los aductos formados. Los valores para las áreas relativas son valores promedio de tres replicas acompañados de \pm su desviación estándar dividida entre $\sqrt{3}$.

| Condiciones | Área relativa SO ₂ | Condiciones | Área relativa SO ₂ . |
|---|-------------------------------|---|---------------------------------|
| Vino modelo sin acetaldehído a T _{AMB} | 8,53±0,21 | Vino modelo sin acetaldehído a 100°C | 8,48±0,27 |
| Vino modelo con acetaldehído a T _{AMB} | 1,30±0,04 | Vino modelo con acetaldehído a 100° | 2,67±0,03 |
| Porcentaje de SO₂ libre: 15% | | Porcentaje SO₂ libre: 31% | |

Las conclusiones del experimento son que la incubación a 100°C durante una hora dobla el porcentaje de SO₂ liberado de los aductos con acetaldehído respecto a bajar el pH a 2,0 sin calentar, pero sin embargo se observa que no se alcanza el 100% de liberación de SO₂ ni siquiera en estas condiciones.

4.6. Calibrado.

Para conseguir cuantificar el contenido de SO₂ en un vino modelo dopado con SO₂ se realizó una recta de calibrado con distintas concentraciones de SO₂, con estándar interno, sin aductos, a pH 2 e inyectando 0,1 mL.

Se escogieron los siguientes puntos para preparar las disoluciones: 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L y 30 mg/L y se analizaron tres replicas de cada uno de ellos. Se introdujeron en la columna y se representaron las áreas relativas promedio del SO₂ frente a las concentraciones conocidas.

Tabla 5. Valores recta de calibrado. Los valores para las áreas relativas son valores promedio de tres replicas acompañados de \pm su desviación estándar dividida entre $\sqrt{3}$.

| Concentración (mg/L) | Área relativa SO ₂ |
|----------------------|-------------------------------|
| 1,00 | 0,96±0,01 |
| 5,00 | 1,71±0,02 |
| 10,00 | 3,20±0,10 |
| 20,00 | 5,81±0,06 |
| 30,00 | 8,47±0,07 |

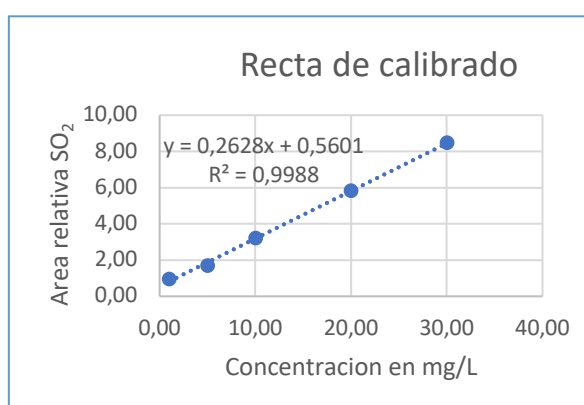


Figura 11. Recta de calibrado obtenida.

Donde se obtiene la recta de calibrado $Y=0,2628x + 0,5601$. Con esta recta ya se puede conocer el contenido de SO_2 molecular detectado por el PFPD, que en el caso del vino modelo sin acetaldehído coincidirá con el SO_2 total. Como a partir de esta recta de calibrado se van a cuantificar las distintas disoluciones, es necesario conocer el ruido instrumental que afecta a la medida y así poder establecer: límite de detección, límite de cuantificación y rango lineal.

El ruido instrumental se calcula midiendo en el cromatograma de 1 mg/L, la altura promedio de los picos de ruido en la zona alrededor del SO_2 . Este pico tiene una altura de 4 μV . En el cromatograma se aprecia como para 1 mg/L la altura del pico obtenido es de 7000 μV .

$$LD = \frac{3 \cdot S_A}{m} = \frac{3 \cdot 4 \text{ uV} \cdot 1000 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{7000 \text{ uV}} = 1,71 \text{ mg/L.}$$

$$LC = \frac{10 \cdot S_A}{m} = \frac{10 \cdot 4 \text{ uV} \cdot 1000 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{7000 \text{ uV}} = 5,71 \text{ mg/L.}$$

$$\text{Rango Lineal} = 1,71 \text{ mg/L} - 50 \text{ mg/L.}$$

Se ha diseñado un tratamiento específico de los datos para las situaciones en las que se dispone de un vino modelo con aductos, que consiste en calcular un factor al que se le ha llamado “factor de adecuación para vinos modelo con aductos/acetaldehído, FAVSA” el cual se ha experimentado que se mantiene constante realizando experimentos de condiciones similares. En nuestro caso los aductos son formados con la especie acetaldehído en una proporción 1:1.

$$FAVSA = \frac{\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{ de } SO_2 \text{ molecular en el vino sintético sin aductos}}{\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{ de } SO_2 \text{ molecular en el vino sintético con aductos}} \quad (4)$$

Tenemos dos factores FAVSA obtenidos experimentalmente. Uno de ellos es el factor FAVSA a temperatura ambiente y el otro es el FAVSA a 100°. Este factor depende de la proporción de acetaldehído formando aductos en el vino y de la temperatura a la que se ha tratado la muestra.

$$FAVSA_{T_{AMB}} = 10,8 \quad FAVSA_{100^\circ} = 3,7$$

$$[SO_2]_{TOTAL} = FAVSA * [SO_2]_{molecular \text{ en vino modelo con aductos}} \quad (5)$$

Tabla 6. Cálculos realizados a partir del factor FAVSA. En la sexta columna se ve la aproximación realizada utilizando el factor calculado que ayuda a conocer la concentración de SO_2 total a partir de una muestra con aductos.

| Datos experimentales a pH 2, estabilizado durante 1 h e inyectando 0,1 mL de muestra | | | | | | | |
|--|----------------------------|---------------------------|----------------------|------|-------|---|-----------|
| Muestra | | área rel. SO ₂ | mg/L SO ₂ | ± IC | FAVSA | [SO ₂] _{total} con aductos Calculado con FAVSA | Error % |
| | | | Y=0,2628x + 0,5601 | | | | |
| REP1 | Sin Acetaldehído | 8,32 | 29,5 | 0,21 | 10,8 | 30,24 | 1 |
| | Acetaldehído | 1,3 | 2,8 | 0,04 | | | |
| REP2 | Sin Acetaldehído con calor | 8,74 | 31,1 | 0,27 | 3,7 | 30,71 | 2 |
| | Acetaldehído con calor | 2,75 | 8,3 | 0,03 | | | |
| REP1' | Sin Acetaldehído | 8,74 | 31,1 | 0,21 | 10,8 | 30,24 | 1 |
| | Acetaldehído | 1,3 | 2,8 | 0,04 | | | |
| REP2' | Sin Acetaldehído con calor | 8,21 | 29,1 | 0,27 | 3,7 | 29,23 | 3 |
| | Acetaldehído con calor | 2,65 | 7,9 | 0,03 | | | |
| Error total promedio | | | | | | | 2% |

4.7. Validación frente a Rankine.

Rankine es el método oficial para determinación de SO₂, y es probablemente el método más habitual en las bodegas. Sin embargo, tiene desventajas como su laboriosidad y el error asociado a la determinación del punto final de la valoración que se estima que está alrededor del 11%. En este estudio se decidió utilizar el método Rankine para validar los resultados obtenidos mediante el método cromatográfico desarrollado en la presente memoria.

Dos réplicas de cada muestra se analizaron por el método Rankine; una de las muestras estaba constituida por vino modelo dopado con 30 mg/L de SO₂, mientras que la otra estaba constituida por vino modelo dopado con 30 mg/L de SO₂ e incubado con 410 µg de acetaldehído. La obtención de los valores con Rankine se hace a partir de una volumetría. Según este método para calcular el contenido de SO₂ en disolución hay que usar la siguiente fórmula:

$$[\text{SO}_2]_{\text{molecular}} = V_{\text{NaOH}} * 32$$

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 7. Tabla de valores obtenidos con el método de referencia Rankine.

| RANKINE | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------|--------------|----------------|
| MUESTRA | | V_{NaOH} | mg/L | Total | Error % |
| REP 1 | Sin Acetaldehído | 0,85 | 27,2 | 33,6 | 12 |
| | Sin Acetaldehído con calor | 0,2 | 6,4 | | |
| REP 1' | Sin Acetaldehído | 0,8 | 25,6 | 27,2 | 9 |
| | Sin Acetaldehído con calor | 0,05 | 1,6 | | |
| REP 2 | Con Acetaldehído | 0,15 | 4,8 | 24 | 20 |
| | Con Acetaldehído con calor | 0,6 | 19,2 | | |
| REP 2' | Con Acetaldehído | 0,1 | 3,2 | 30,4 | 1 |
| | Con Acetaldehído con calor | 0,85 | 27,2 | | |
| Error total promedio producido | | | | | 11% |

La idea de hacer dos medidas en cada repetición, era que en la primera pudiéramos determinar el SO₂ libre y en la segunda al aplicar calor se pudiese determinar el SO₂ combinado. Como se ve en los resultados, en las replicas que no hay acetaldehído, al calentar solo determinarnos el SO₂ total de la disolución, no se está rompiendo ningún aducto.

Como se mencionó anteriormente se observa en la tabla 8 que el método Rankine produjo un error que se encuentra en promedio alrededor del 10%, aunque este hecho es conocido en las bodegas, se asume dicho error dado que para las decisiones de producción y dosificación del SO₂ no es un error relevante. Por comparación, se observa que el método cromatográfico desarrollado produce valores más exactos que el de referencia.

5. CONCLUSIONES.

Puede decirse que los objetivos planteados al inicio del trabajo se han satisfecho con éxito. Se ha conseguido desarrollar y validar un método de análisis rápido, automatizado, lineal y reproducible.

El método consiste en introducir en un vial con chapa de septum cerrado a vacío, 12 ml de vino modelo dopado de SO₂. Introducir con ayuda de una jeringa metálica 40 µL de MES y bajar la muestra a pH 2 para desplazar el equilibrio ácido base con 120 µL de ácido tricloroacético. Una vez introducidos el ácido y el estándar dejar estabilizar una hora. Cuando pasa el tiempo establecido se lleva al cromatógrafo y se realizan las medidas. Estas se interpolan en la recta de calibrado y se obtiene la concentración en mg/L de SO₂ total de la disolución.

Si además del dopado con SO₂ tenemos aductos formados con acetaldehído, se dejan estabilizar los viales en una estufa calefactora durante una hora con el propósito de romper parte de los aductos. Cuando pasa el tiempo establecido se llevan al cromatógrafo y se realizan las medidas. Los valores obtenidos para las áreas se interpolan en la recta de calibrado y la concentración obtenida se multiplica por el factor FAVSA para 100°C y así se obtiene la concentración de SO₂ total.

Desde el punto de vista del análisis de vinos modelo el método desarrollado es satisfactorio. Sin embargo, para proponerlo como una alternativa real al método Rankine habría que realizar un estudio (que por razones de tiempo queda fuera del trabajo realizado en este TFG) sobre la aplicabilidad del método cromatográfico a vinos reales. Cabe esperar que el porcentaje de aductos de SO₂ rotos en un vino real durante la incubación no sea un porcentaje fijo como en el caso de los vinos modelo y, por tanto, habría que trabajar en conseguir unas condiciones de incubación que favorecieran una mayor liberación del SO₂ desde los correspondientes aductos.

6. REFERENCIAS.

1. Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Doneche, B.; Lonvaud, A. The use of sulfur dioxide in must and wine treatment. *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications*, **2006**, 193-197.
2. Waterhouse, A. L.; Sacks, G. L.; Jeffery, D. W. *Understanding wine chemistry*; John Wiley & Sons, Inc: Chichester, West Sussex, UK, 2016; .
3. Guerrero, R. F.; Cantos-Villar, E.; Puertas, B.; Ortiz Somovilla, V. Sulfuroso en la elaboración de vinos. Alternativas.

https://hortintl.cals.ncsu.edu/sites/default/files/articles/sulfuroso_elaboracion_vinos.pdf.
4. Buechsenstein, J. W.; Ough, C. S. SO₂ determination by aeration-oxidation: a comparison with Ripper. *Am. J. Enol. Vitic.* **1978**, *29*, 161-164.
5. Ruiz-Jiménez, J.; Luque, d. C. On-line pervaporation-capillary electrophoresis for the determination of volatile acidity and free sulfur dioxide in wines. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2231-2238.
6. Carrascon, V.; Ontañón, I.; Bueno, M.; Ferreira, V. Gas chromatography-mass spectrometry strategies for the accurate and sensitive speciation of sulfur dioxide in wine. *Journal of Chromatography A* **2017**, *1504*, 27-34.
7. Aberl, A.; Coelhan, M. Determination of sulfur dioxide in wine using headspace gas chromatography and electron capture detection. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2013**, *30*, 226-233.
8. Amirav, A.; Jing, H. Pulsed flame photometer detector for gas chromatography. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3305-3318.
9. International Organisation of Vine and Wine Compendium of international methods of wine and must analysis. **2012**.
10. Franco-Luesma, E.; Ferreira, V. Quantitative analysis of free and bonded forms of volatile sulfur compounds in wine. Basic methodologies and evidences showing the existence of reversible cation-complexed forms. *Journal of chromatography. A* **2014**, *1359*, 8.