



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Máster en

## Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Factores con efecto en la generación de aldehídos aromáticos en procesos de oxidación

Factors affecting the development of aromatic aldehydes in oxidation processes

Autor/es

María José Gómez Cruz

Directores

Vicente Ferreira González

Mónica Bueno Fernández

Facultad de Veterinaria

2020-2021

---

## **Agradecimientos**

A continuación, quiero agradecer a todas las personas que me han apoyado durante el periodo en el que he desarrollado el propio Trabajo Fin de Máster.

En primer lugar, agradecer a Vicente Ferreira su confianza para formar parte de este proyecto de investigación, así como su enseñanza, entrega y dedicación.

En segundo lugar, agradecer a Mónica el esfuerzo, dedicación, sabiduría, paciencia, comprensión y confianza para enseñarme y guiarme durante el desarrollo del presente Trabajo Fin de Máster.

En tercer lugar, al personal científico e investigador del LAAE, desde el primer momento me acogisteis y ofrecisteis vuestra ayuda para aprender y mejorar, transmitís una gran motivación y entrega.

En cuarto lugar, hacia los docentes del máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos, en particular aquellos en los que sus asignaturas guardan relación con el propio Trabajo Fin de Máster, por su dedicación en cada una de sus clases, con las que he conseguido asentar unas bases para llevar a cabo este trabajo.

Por último, a mi familia y amigos, desde un lugar de La Mancha de cuyo nombre no olvido y llevo conmigo, que en todo momento me habéis mostrado un apoyo incondicional, confianza y cariño. Sin olvidarme de mencionar a mis mañicos, gracias por todo.

## INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
ABREVIATURAS.....	3
1.INTRODUCCIÓN .....	4
1.1.El aroma del vino .....	4
1.2.Presencia de aldehídos y fenoles en el vino.....	5
1.3.Formación de los aldehídos de Strecker en el vino durante el envejecimiento .....	6
2.OBJETIVOS .....	7
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1.Equipos y Materiales .....	8
3.2.Reactivos y Disoluciones.....	9
3.3.Análisis de Aldehídos.....	12
3.4.Diseño experimental.....	16
3.4.1.Experimento 1 .....	16
3.4.2.Experimento 2 .....	19
3.5.Tratamiento de datos .....	21
4.RESULTADOS Y DISCURSIÓN.....	23
4.1.Efecto de los catalizadores metálicos en la formación de aldehídos de Strecker a partir de aminoácidos y compuestos dicarbonílicos .....	23
4.2.Efecto de los compuestos fenólicos en la formación de aldehídos de Strecker....	32
4.2.1.Efecto del compuesto fenólico en el consumo de oxígeno .....	35
4.3.Efecto diferencial del tipo de compuesto $\alpha$ -dicarbonilo en la degradación de Strecker.....	37
5.CONCLUSIONES .....	40
6.BIBLIOGRAFÍA .....	41

## RESUMEN

El aroma del vino está formado por un conjunto de compuestos volátiles, que va evolucionando a lo largo del tiempo. Durante el envejecimiento, el aroma puede llegar a evolucionar de forma negativa cuando ciertos compuestos se generan en cantidades muy superiores a sus umbrales de olfacción. Ciertos aldehídos como el metional, fenilacetaldehído, isobutanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal pueden llegar a ser responsables del fin de la vida útil de un vino. Estos aldehídos se forman a través de la degradación de Strecker. En esta ruta, un compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico reacciona con un aminoácido (metionina, fenilalanina, valina, isoleucina y leucina respectivamente) para dar el aldehído. En el presente trabajo se estudia el posible efecto catalítico de metales (Fe, Cu, Mn) en la formación de aldehídos y el efecto del tipo de  $\alpha$ -dicarbonilo de partida: preformado o quinonas formadas *in situ* a partir de compuestos fenólicos en procesos oxidativos. El estudio se llevó a cabo mediante dos experimentos en los cuales la matriz fue de vino sintético. En el primer experimento, se trabajó con disoluciones de 1mM de diacetilo o metilglioxal, una disolución 0.2 mM de cada uno de los aminoácidos precursores y en presencia de distintas combinaciones de metales en condiciones de anoxia. En el segundo experimento, se trabajó con disoluciones 1 mM de ácido gálico o 4-metilcatecol, la misma disolución de aminoácidos (0.2 mM de cada uno), presencia de metales y oxígeno. Las muestras se incubaron durante 33 días a 35°C y posteriormente se analizaron aplicando una previa derivatización de los aldehídos que fueron extraídos de la matriz mediante extracción en fase sólida. Los extractos fueron inyectados en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas. El experimento 1 confirmó el papel catalítico de determinadas combinaciones de metales sin la presencia de oxígeno. Se ha encontrado un efecto negativo en la interacción  $\text{Fe}^{2+}$  x  $\text{Mn}^{2+}$  y un efecto positivo del  $\text{Mn}^{2+}$ . También se aprecia la influencia negativa del  $\text{Fe}^{2+}$  en la formación de aldehídos con la excepción del metional, para el cual la presencia de hierro influye positivamente. Los valores de rendimiento en este experimento oscilaron entre 0,005% y 0,117% para diacetilo, y 0,019% y 1,155% para el metilglioxal mientras que en el experimento 2 se obtuvieron unos valores de entre 0,34% y 1,42% a partir del ácido gálico, y de 2,93% y 10,5% con el 4-metilcatecol. Con la excepción del fenilacetaldehído, el sistema con 4-metilcatecol ha formado 10 veces más aldehídos que el ácido gálico y 100 veces más que el metilglioxal y diacetilo.

## ABSTRACT

The aroma of wine is composed of a set of volatile compounds, which evolves over time. During ageing, the aroma can evolve negatively when certain compounds are generated in quantities much higher than their olfactory thresholds. Certain aldehydes such as methional, phenylacetaldehyde, isobutanal, 2-methylbutanal and 3-methylbutanal can be responsible for the end of a wine's shelf life. These aldehydes are formed through Strecker degradation. In this route, an  $\alpha$ -dicarbonyl compound reacts with an amino acid (methionine, phenylalanine, valine, isoleucine and leucine respectively) to generate the aldehyde. In the present work, the possible catalytic effect of metals (Fe, Cu, Mn) on the formation of aldehydes and the effect of the nature of the  $\alpha$ -dicarbonyl type: preformed or quinones formed *in situ* from phenolic compounds in oxidative processes were studied. The study was carried out in two experiments in which the matrix was synthetic wine. In the first experiment, 1 mM solutions of diacetyl or methylglyoxal, a 0.2 mM solution of each of the precursor amino acids and in the presence of different combinations of metals were employed under anoxic conditions. In the second experiment, 1 mM solutions of gallic acid or 4-methylcatechol, the same solution of amino acids (0.2 mM of each), the presence of metals and oxygen were used. The samples were incubated for 33 days at 35°C and subsequently analysed by prior derivatization of the aldehydes, which were extracted from the matrix by solid-phase extraction. The extracts were injected into a gas chromatograph coupled to mass spectrometry. Experiment 1 confirmed the catalytic role of certain metal combinations without the presence of oxygen. A negative effect of  $\text{Fe}^{2+} \times \text{Mn}^{2+}$  interaction and a positive effect of  $\text{Mn}^{2+}$  were found. The negative influence of  $\text{Fe}^{2+}$  on the formation of aldehydes is also observed except for methional, for which the presence of iron has a positive influence. The yield values in this experiment ranged from 0.005% to 0.117% for diacetyl, and 0.019% to 1.155% for methylglyoxal, while in experiment 2 values of 0.34% to 1.42% were obtained from gallic acid, and 2.93% to 10.5% with 4-methylcatechol. With the exception of phenylacetaldehyde, the system with 4-methylcatechol formed 10 times more aldehydes than gallic acid and 100 times more than methylglyoxal and diacetyl.

## **ABREVIATURAS**

- AA: Aminoácidos
- ANOVA: Análisis de varianza
- BDO: Sistema que contiene Diacetilo
- DSR: Desviación Estándar Relativa
- GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas
- IS: Estándar Interno
- LAAE: Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología
- MGO: Sistema que contiene Metilglioxal
- PFBHA: *O*-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzil)hidroxilamina clorohidrato
- SIM: Monitorización del Ion Seleccionado
- SPE: Extracción en Fase Sólida

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. El aroma del vino**

El conjunto de compuestos volátiles presentes en un vino es responsable de la calidad del aroma del mismo (Polásková, Herszage y Ebeler, 2008; Muñoz-González et al., 2011). En el vino se pueden encontrar aromas florales, afrutados, especiados y amaderados provenientes de compuestos como los terpenos, ésteres, alcoholes, ácidos grasos, acetatos, metoxipirazinas o aldehídos, entre otros (Ter Schure et al., 1998; Regodón Mateos, Pérez-Nevado y Ramírez Fernández, 2006; Bloem et al., 2007; Bloem et al., 2008; Hernanz et al., 2009; Park, Shaffer y Bennett, 2009; Obreque-Slér, Peña-Neira y López-Solís, 2010).

Para conseguir un determinado tipo de perfil aromático, son importantes una serie de factores tales como la etapa de maduración de la propia uva, las técnicas de procesamiento, las estrategias de fermentación y el envejecimiento en barrica (Antonelli et al., 1999; Delfini et al., 2001; Estévez, Gil y Falqué, 2004 ; Regodón Mateos, Pérez-Nevado y Ramírez Fernández, 2006; Styger, Prior y Bauer, 2011; Liang et al., 2021). Los procesos que influyen en la composición aromática final del vino pueden ser físicos, químicos o enzimáticos. Antes de la fermentación se producen de tipo enzimático y oxidativo, durante la fermentación sobre todo por la acción de levaduras y después de la fermentación por procesos redox, hidrolíticos o de extracción como es el caso del envejecimiento en barrica (Herrero, 2015).

La percepción del aroma del vino presenta una gran complejidad no sólo debido al gran número de componentes, sino también a la influencia por parte de la matriz (que afectará a la volatilidad de los compuestos) y a variables psicológicas que entran en juego en el momento del consumo del vino (Muñoz-González et al., 2011). Esta percepción debe ser analizada mediante el cálculo de factores de impacto específicos. Esto en su medida, depende del impacto que presente cada olor relacionado con la concentración en la mezcla y el umbral de percepción de cada olor (Leffingwell y Leffingwell, 1991). No obstante, los olores de menor impacto pueden influir para cambiar la percepción de otros olores en una mezcla, dando lugar a interacciones competitivas, cooperativas, destructivas o creativas (Ferreira, de la Fuente-Blanco y Sáez-Navajas, 2021).

## 1.2. Presencia de aldehídos y fenoles en el vino

Los aldehídos y fenoles son compuestos que contribuyen de manera importante en las propiedades organolépticas del vino. Los carbonilos y en particular aldehídos, son moléculas muy reactivas, ya que pueden reaccionar con los polifenoles del vino, aminoácidos, proteínas y con el dióxido de azufre (Bueno, Carrascón y Ferreira, 2016). Algunos de ellos se han identificado como los compuestos aromáticos más importantes que se forman tras la oxidación del vino, como es el caso del metional, fenilacetaldehído, isobutanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal (Singleton y Kramlinga, 1976; Escudero et al., 2000; Escudero et al., 2002; Silva Ferreira et al., 2003).

Destacar que, en el vino se forman diacetilo y metilglioxal por la actividad microbiana y durante el envejecimiento (Pripis-Nicolau et al., 2000) llegando a cantidades medias de 5 mg/L para el diacetilo (Bueno, Carrascón y Ferreira, 2016) y 1,8 mg/L para el metilglioxal (Barros et al., 1999).

Se estudió la reactividad del diacetilo y metilglioxal de forma cuantitativa ya que en estudios anteriores se ha observado cualitativamente que cuando se encuentran junto a aminoácidos (Tabla 1) dan lugar a aldehídos de Strecker detectándose olores no muy agradables (Pripis-Nicolau et al., 2000).

Tabla 1. Aminoácidos precursores de aldehídos de Strecker junto con sus umbrales de olfacción (Ferreira et al., 2014).

<b>Aminoácido</b>	<b>Aldehído intermedio</b>	<b>Umbral de olor (µg/L)</b>
<b>Valina</b>	Isobutanal	6,0
<b>Isoleucina</b>	2-metilbutanal	16,0
<b>Leucina</b>	3-metilbutanal	4,6
<b>Fenilalanina</b>	Fenilacetaldehído	1,0
<b>Metionina</b>	Metional	0,5

Por otro lado, los compuestos fenólicos contribuyen en el gusto del vino aportando amargor y astringencia (Ferrer-Gallego et al., 2014). Pueden influir en el sabor de los alimentos a través de sus reacciones con compuestos carbonílicos y debido a sus propiedades antioxidantes pueden influir en las reacciones de oxidación lipídica (Delgado, Zamora y Hidalgo, 2015). Uno de los fenoles considerados más reactivos en la formación de aldehídos de Strecker y asociado a la oxidación del vino es el ácido gálico (Monforte et al., 2019; Monforte, Martins y Silva Ferreira, 2020). Por eso, para este estudio se eligió usar ácido gálico y 4-metilcatecol que, aunque no está presente en el



vino se considera el fenol más sencillo que representa a aquellos fenoles que pueden formar quinonas (Danilewicz, 2007).

### 1.3. Formación de los aldehídos de Strecker en el vino durante el envejecimiento

Algunos vinos requieren de un periodo de envejecimiento en botella para conseguir una determinada evolución en el aroma y por tanto, una calidad óptima (Ugliano, 2013). De esta forma, se reduce la astringencia (Chira, Jourdes y Teissedre, 2012) y se estabiliza el color (Pérez-Magariño y González-San José, 2004). A veces, esta evolución puede ser negativa ya que un exceso de oxígeno puede influir y producir aromas típicos de oxidación y otras veces la ausencia de oxígeno produce aromas de reducción (Ugliano, 2013; Ferreira et al., 2014).

Dentro de esos aromas típicos de oxidación, se encuentran los cinco aldehídos que se han comentado en el apartado anterior. A estos aldehídos se les denominan aldehídos de Strecker porque pueden formarse a partir de la degradación de Strecker (Figura 1). Para ello un aminoácido reacciona con un compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico, que podría venir de la degradación de azúcares. Este compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico también puede ser una quinona que proviene de la oxidación de compuestos fenólicos (Rizzi, 2006) (Figuras 1 y 2). En este segundo caso, el papel catalizador de los metales ha sido bien demostrado (Danilewicz, 2007; Monforte, Martins y Silva Ferreira, 2018). Otros de los factores que influyen en la degradación de Strecker son la temperatura y el pH, donde una temperatura y pH elevados favorecen la reacción (Monforte, Martins y Silva Ferreira, 2018).

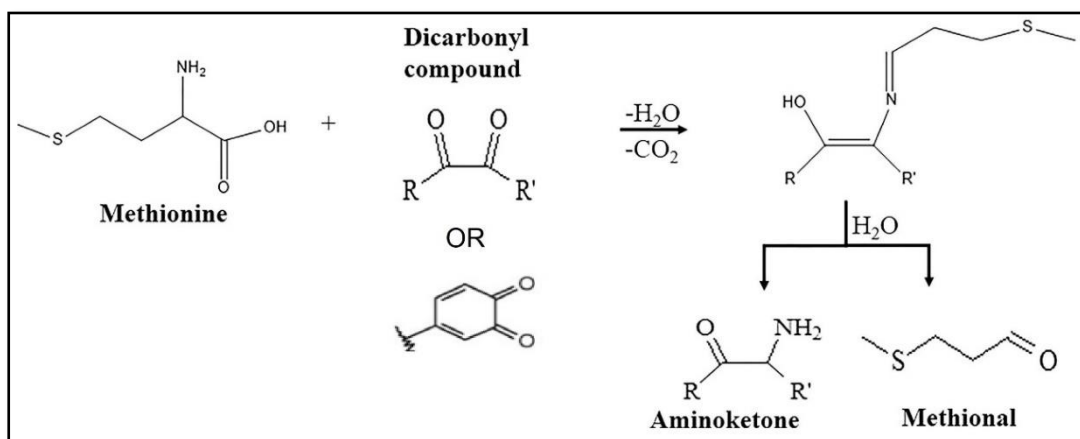


Figura 1. Formación del metional a partir de su aminoácido mediante la reacción de Strecker. Adaptada de las referencias (Grant-Preece et al., 2013; Ephrem et al., 2018).

Sin embargo, existen otras vías de formación de estos aldehídos (Figura 2) como la oxidación directa de sus alcoholes precursores (Ferreira et al., 2014) a través del radical hidroxilo producido tras la reacción de Fenton (Anexo I), la degradación de compuestos de Amadori (Hofmann y Schieberle, 2000a) y la liberación de los aductos formados con el SO<sub>2</sub> (Bueno, Zapata y Ferreira, 2014).

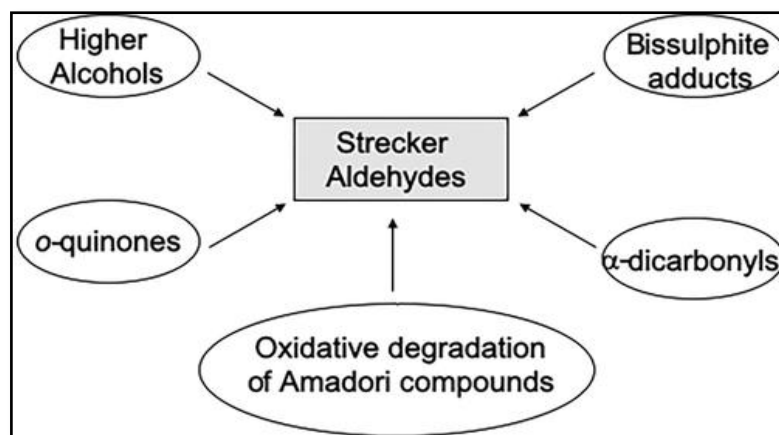


Figura 2. Rutas de formación de aldehídos de Strecker (Monforte, Martins y Silva Ferreira, 2020).

## 2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se estudia el papel relativo jugado por los distintos elementos que forman parte de la reacción de Strecker y que pueden afectar a la generación de aldehídos aromáticos durante la oxidación del vino. Por ello, se plantean como objetivos específicos:

- Estudiar el efecto de los catalizadores metálicos (Fe, Cu, Mn) en la formación de aldehídos a partir de aminoácidos y dicarbonilos.
- Estudiar el efecto diferencial del tipo de  $\alpha$ -dicarbonilo de partida en la formación de aldehídos aromáticos a partir de aminoácidos en procesos oxidativos.

Por otra parte, los objetivos académicos del trabajo son:

- Aplicación de los conocimientos adquiridos en el máster sobre un problema real.
- Formación del estudiante en el método científico.
- Empleo de técnicas cromatográficas
- Realización de análisis estadísticos en el tratamiento de datos.
- Búsqueda bibliográfica.
- Transmisión de conocimientos generados a través de la memoria y defensa del trabajo.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Equipos y Materiales

- Adaptador de cartuchos
- Agitador horizontal Heidolph Promax 1020 (Heidolph Instruments GmbH & Co., Alemania)
- Balanza analítica HR-200 (A&D Weighing Co., EEUU)
- Barras de cola 18cm\*7mm (China)
- Bolsas de vacío PET13/PE70 transparentes 200x200 (Coimbra pack.S.L, España)
- Bureta de 10 mL
- Cámara de anoxia GP (Concept) (Jacomex SAS, Francia)
- Equipo de Ultrasonidos Ultrasons 20 (J.P Selecta S.A., España)
- Espátulas
- Estufa Memmert 35-75 (Mettler GmbH & Co., Alemania)
- Frascos de vidrio de borosilicato Pyrex™ de 1L y 500 mL (Fisher Scientific Inc., EE. UU.)
- Frits de polietileno para cartuchos de 1mL (Supelco Inc., EE. UU.)
- Granatorio W Electronic Scale WT30001K (Want Balance Instrument Co., China)
- Jeringas Hamilton de 200 y 100 µL
- Matraces aforados de 50 y 200 mL (Fisher Scientific Inc., EE. UU.)
- Medidor pH (MicroPH 2002, CRISON)
- Micropipetas de 250, 1000 y 5000 µL (Acura autoclavable, Socorex)
- Pipeta de plástico desechable 10 mL (Fisherbrand., EE. UU.)
- Pipetas Pasteur de vidrio (Labbox Labware S.L., España) y de plástico (Deltalab S.L., España)
- Pistola de silicona 50W (Dweyka)
- Probetas de vidrio de 10 y 100 mL (Laboaragón S. L., España)
- Purificador de agua Mili-Q (Millipore, EEUU)
- Reservorios de 1 mL (Supelco., EEUU)
- Reservorios de 25 mL (Varían Inc., EEUU)
- Resina Supelclean ENVI-Chrom P (Supelco., EEUU)
- Sistema de vacío (vacuum manifold) (Agilent Technologies Inc., EEUU)

- Tubos de vidrio transparente con tapón roscado denominados WIT de 60 mL (capacidad nominal) (WIT, Francia) que contienen Sensores de oxígeno Pst3 (Nomacorc, S.A., Bélgica)
- Vasos de precipitado de plástico de 5 mL y 100 mL (Labbox Labware S.L., España)
- Vasos de precipitado de vidrio de 50 mL (Labbox Labware S.L., España)
- Viales con inserto de capacidad 200µL (ALWSCI Technologies Co., China)
- Viales de 2 mL y viales de 20 mL con cuello roscado y tapón roscado con septum (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU)
- Viales de vidrio 12 mL ambar (ALDO S.L.U, España)

### **3.2. Reactivos y Disoluciones**

Se realizaron dos experimentos para estudiar la formación de aldehídos de Strecker a partir de aminoácidos y compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos ya presentes (experimento 1) o formados *in situ* a partir de polifenoles (experimento 2). En el experimento 1, además se estudió el efecto catalítico de metales (Fe, Cu y Mn) en la formación de aldehídos.

#### **Disolventes**

- Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Fischer Scientific: CAS No. 75-09-2;  $\geq 99,8\%$ ), methanol (MeOH, Scharlab, CAS No. 67-56-1;  $\geq 99,9\%$ ) y una disolución de  $\text{H}_2\text{O}$ /methanol al 12%.
- Hexano (n-Hexane, UniSoly, Merck, CAS No. 110-54-3;  $\geq 99\%$ ).

#### **Aminoácidos**

- L-Fenilalanina (Phe), Sigma Aldrich, CAS No. 63-91-2;  $\geq 98\%$ .
- L-Isoleucina (Ile), Sigma Aldrich, CAS No. 72-32-5;  $\geq 98\%$ .
- L-Leucina (Leu), Sigma Aldrich, CAS No. 61-90-5;  $\geq 98\%$ .
- L-Metionina (Met), Sigma Aldrich, CAS No. 63-68-3;  $\geq 98\%$ .
- L-Valina (Val), Sigma Aldrich, CAS No. 72-18-4;  $\geq 98\%$ .

#### **Metales**

- Ion (II) chloride tetra-hydrate, Sigma Aldrich, CAS No. 13478-10-9;  $\geq 99\%$ .
- Copper (II) sulfate penta-hydrate, Sigma Aldrich, CAS No. 7758-99-8;  $\geq 98\%$ .
- Manganese (II) chloride tetra-hydrate, Sigma Aldrich, CAS No. 13446-34-9;  $\geq 98\%$ .

### **$\alpha$ -Dicarbonilos**

Diacetilo (código BDO; 2,3-butanodiona, Sigma Aldrich, CAS No. 431-03-8; 97%) y metilglioxal (código MGO; 2-oxopropanal, Sigma Aldrich, CAS No. 78-98-8; 40 %).

### **Compuestos fenólicos**

Ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxi-benzoico, Sigma Aldrich, CAS No. 149-91-7; 97,5-102,5%) y 4-metilcatecol (Sigma Aldrich, CAS No. 452-86-8;  $\geq 95\%$ ).

### **Aldehídos**

- Estándares internos: 2-metilpentanal (Merck, CAS No. 123-15-9;  $\geq 98\%$ ), 3-metilpentanal (Alfa Chemistry, CAS No. 15877-57-3;  $\geq 96\%$ ), metional deuterado (3-(metiltio)propionaldehído-d<sub>3</sub>, Eptes; CAS No. 136430-27-8;  $\geq 90\%$ ), fenilacetaldehído deuterado (fenil-d<sub>5</sub>-acetaldehído, Eptes; CAS No. 879549-73-2;  $\geq 95\%$ ).
- Aldehídos de Strecker (Merck): isobutanal (2-metilpropanal, CAS No. 78-84-2,  $\geq 99\%$ ), 2-metilbutanal (CAS No. 96-17-3,  $\geq 95\%$ ); 3-metilbutanal (isovaleraldehído, CAS No. 590-86-3,  $\geq 97\%$ ), metional (3-(metiltio)propionaldehído, CAS No. 3268-49-3,  $\geq 97\%$ ), fenilacetaldehído (CAS No. 122-78-1,  $\geq 95\%$ ).

### **Otros reactivos**

- Agente derivatizante PFBHA (*O*-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzil)hidroxilamina clorohidrato, Sigma Aldrich, CAS No. 57981-02-9;  $\geq 99\%$ ).
- Hidrógenocarbonato de sodio (Sigma Aldrich, CAS No. 144-55-8;  $\geq 99,7\%$ ).
- Sulfato de sodio anhidro (PanReac Applichem, CAS No. 7757-82-6;  $\geq 99\%$ ).

### **Vino sintético**

Para la realización de ambos experimentos, se preparó un vino sintético base compuesto por: 5g/L de glicerina (glicerol, PanReac, CAS No. 56-81-5;  $\geq 99,5\%$ ), 5g/L de L(+)-ácido tartárico (PanReac, CAS No. 87-69-4;  $\geq 99\%$ ) y etanol (LiChrosolu, CAS No. 64-17-5;  $\geq 99\%$ ) al 12% en agua Mili-Q a pH 3,5.

### **Disoluciones madre**

A continuación, se muestran en las siguientes tablas las concentraciones de las disoluciones madre preparadas con los reactivos anteriores y empleadas en ambos experimentos.

Tabla 2. Concentraciones de las disoluciones madre de aminoácidos (AA) en agua Mili-Q.

AA	Concentración (g/L)
<b>VAL (valina)</b>	11,7
<b>ILE (isoleucina)</b>	13,1
<b>LEU (leucina)</b>	13,6
<b>MET (metionina)</b>	14,9
<b>PHE (fenilalanina)</b>	16,5

Tabla 3. Concentraciones de las disoluciones madre de diacetilo, metilglioxal y ácido gálico, en etanol, y del 4-metilcatecol en agua Mili-Q.

	Concentración (g/L)
<b>Diacetilo</b>	12,1
<b>Metilglioxal</b>	10,1
<b>4-Metilcatecol</b>	12,4
<b>Ácido gálico</b>	17,0

Tabla 4. Disoluciones madre de metales en agua Mili-Q.

	Concentración (g/L)
<b>Cloruro de hierro (II), <math>\text{FeCl}_2^{2+}</math></b>	3,00
<b>Sulfato de cobre (II), <math>\text{CuSO}_4^{2+}</math></b>	0,75
<b>Cloruro de manganeso (II), <math>\text{MnCl}_2^{2+}</math></b>	3,00

Tabla 5. Concentraciones de las disoluciones madre de los estándares de aldehídos en etanol.

Estándares	Concentración (g/L)	Analito de correspondencia
<b>2-Metilpentanal</b>	4,76	Isobutanal y 2-metilbutanal
<b>3-Metilpentanal</b>	4,87	3-Metilbutanal
<b>Metional-d3</b>	1,10	Metional
<b>Fenilacetaldehído-d5</b>	1,68	Fenilacetaldehído

Tabla 6. Concentraciones de las disoluciones madre de aldehídos de Strecker en etanol.

Aldehídos de Strecker	Concentración (g/L)
<b>Isobutanal</b>	3,72
<b>2-Metilbutanal</b>	4,30
<b>3-Metilbutanal</b>	3,99
<b>Metional</b>	5,32
<b>Fenilacetaldehído</b>	5,42

### 3.3. Análisis de Aldehídos

El análisis de aldehídos de Strecker se llevó a cabo mediante la derivatización de los mismos para la formación de sus correspondientes oximas, una posterior extracción en fase sólida (SPE) e inyección de los eluatos en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El procedimiento completo es el que se recoge a continuación:

#### 1. Preparación de disoluciones y reactivos

- Disolución de reactivo derivatizante (10 g/L de PFBHA en agua Mili-Q).
- Disolución de lavado (disolución H<sub>2</sub>O/MeOH al 60% (v/v) en metanol y 1%(m/m) en hidrogenocarbonato de sodio).
- Disolución conjunta de estándares internos (IS): (disolución conjunta de 8,15 mg/L de 2-metilpentanal, 6,67 mg/L de 3-metilpentanal, 14,83 mg/L de metional deuterado y 15,00 mg/L de fenilacetaldehído deuterado).
- Disolución de dopado (DOP): disolución conjunta de los aldehídos de Strecker en etanol de 15,88 mg/L de isobutanal, 16,49 mg/L de 2-metilbutanal, 14,46 mg/L de 3-metilbutanal, 14,901 mg/L de metional y 19,81 mg/L de fenilacetaldehído.

#### 2. Preparación de muestras

- Adición de IS a las muestras. En el interior de la cámara de anoxia se abrieron los viales con las muestras. En el caso del experimento 2, las muestras se diluyeron 1/10 y en el caso del experimento 1, se utilizaron las muestras sin diluir. A continuación, se tomaron 10 mL que se llevaron a un vial roscado de tapón con septum, al cual se le añadieron 42 µL de disolución de IS.
- Para la cuantificación por factor de respuesta se prepararon 5 viales con vino sintético y 42 µL de disolución de IS y otros 5 viales con vino sintético, 42 µL de disolución de IS y además 85 µL de disolución de DOP.
- Incubación de los viales. Los viales se sacaron de la cámara de anoxia y se incubaron a 50°C durante 6 horas para que se establezcan los equilibrios entre los aldehídos recién añadidos (tanto los estándares internos como los del factor de respuesta) y los compuestos fenólicos presentes en las muestras. De esta forma, los aldehídos recién añadidos se comportarán igual que los “nativos” de las muestras.

### 3. Reacción de derivatización

- Se dejó atemperar los viales y se les añadió 360 µL de la disolución de reactivo derivatizante a través del septum, evitando así la exposición de la muestra al aire. Los viales se incubaron a 35°C durante 12 horas. La función del PFBHA es reaccionar con los grupos carbonilos presentes en los aldehídos para generar sus correspondientes oximas. Para aquellos carbonilos no simétricos se obtienen los isómeros (E) y (Z), como se puede ver en la figura 3.

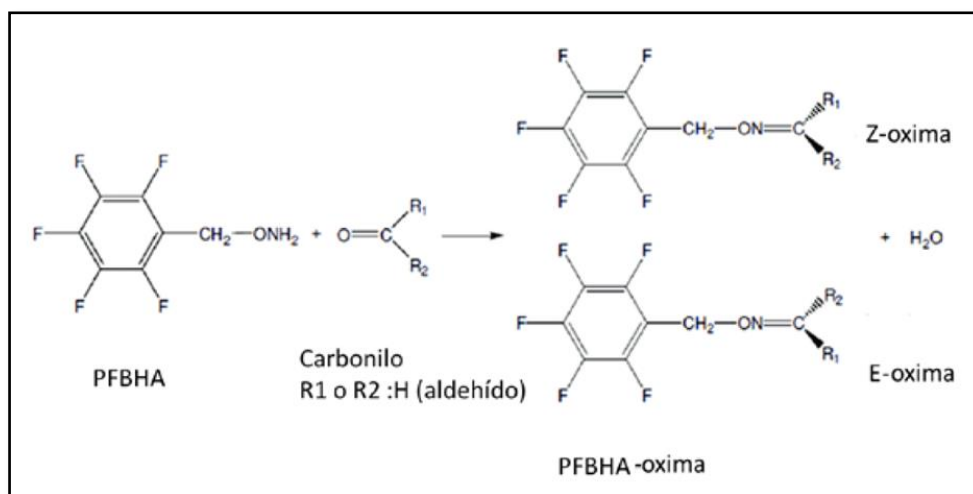


Figura 3. Reacción de derivatización y formación de oximas (isómeros (E) y (Z)). (Marrufo-Curtido, 2021)

### 4. Extracción SPE

- La SPE se realizó en cartuchos de 1 mL de capacidad que contenían 30 mg de resina Supelclean ENVI-Chrom P sujetadas por frits. La parte inferior de los cartuchos se conectó a un sistema de vacío y en la parte superior de los cartuchos se acopló un reservorio de plástico para facilitar la SPE. La extracción consta de varias etapas:

- Acondicionamiento. Cada cartucho se acondicionó con disolventes de distinta polaridad, comenzando por 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, seguido de 1 mL de MeOH y por último, 2 mL de H<sub>2</sub>O/MeOH al 12% (semejante a nuestra matriz).
- Carga de muestra. Se pasaron 10 mL de muestra por cada cartucho. De esta forma los analitos de interés, así como otros carbonilos quedan retenidos en el adsorbente.



- Lavado. Se pasaron 10 mL de disolución de lavado para eliminar excesos de oximas de carbonilos mayoritarios, como las de los ácidos.
- Secado. Se eliminaron los restos de disolventes mediante un secado a vacío de mínimo 45 minutos. Se sabe que el proceso ha finalizado cuando se observa un cambio en la coloración de las resinas y sus partículas quedan sueltas.
- Elución. Una vez secos los cartuchos, las oximas retenidas se eluyeron con 1,2 mL de hexano. Finalmente, Se adicionó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para eliminar los posibles restos acuosos. Se traspasaron 0,8 μL de cada muestra a un vial de inserto para su posterior análisis cromatográfico.

#### 5. Análisis de las oximas por GC-MS

El análisis de las oximas de los aldehídos se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, Shimadzu GCMS-QP-2010 (Shimadzu Corp., Japón) con un cuadrupolo como catalizador. Se inyectaron 3 μL de cada extracto, en modo splitless con el inyector a 250°C y con pulso de presión de 300 kPa durante 1,5 minutos. Se usó helio como gas portador, con una velocidad lineal constante de 40,5 cm/s, resultando en un flujo de 1,26 mL/min y una purga de 1,0 mL/min. La columna cromatográfica usada fue una DB-WAXETR (30 m × 0,25 mm × 0,5 μm) (J&W Scientific, EEUU), siendo estos los parámetros la longitud (m), diámetro (mm) y espesor de la fase (μm). La columna iba precedida de una pre-columna (Supelco Incorporation, EEUU) de 3 m × 0,25 mm. El programa de temperaturas del horno comenzó a 40°C durante 4 min y luego subió a 10°C/min hasta llegar a 250°C, temperatura que se mantuvo durante 10 min. La fuente de ionización utilizada fue impacto electrónico a 220°C y la línea de transferencia se mantuvo a 230°C. El analizador de masas operó en modo SIM (Monitorización del Ión Selectivo) y los iones seleccionados para la identificación y cuantificación de los analitos y estándares se muestran en la tabla 7 junto a las ventanas de adquisición utilizadas.

Tabla 7. Ventanas de adquisición e iones seleccionados en GC-MS para el análisis de aldehídos totales.

Ventanas (min)	T.ret (min)	Compuesto	m/z cuantificación	m/z identificación
<b>14,10-14,55</b>	14,35	Isobutanal	250	239, 195
<b>15,00-17,50</b>	15,41	2-metilbutanal	239	253, 195
	15,73	3-metilbutanal (pico 1)	239	266, 195
	15,96	3-metilbutanal (pico 2)	239	266, 195
	16,30	2-metilpentanal	253	266, 195
	16,99	3-metilpentanal (pico 1)	239	266, 181
	17,19	3-metilpentanal (pico 2)	239	266, 181
<b>21,00-22,70</b>	21,91	Metional deuterado	302	252, 181
	21,94	Metional	299	252, 181
<b>23,45-24,65</b>	23,60	Fenilacetaldehído deuterado	301	181, 96
	23,62	Fenilacetaldehído	91	297, 181

#### 6. Cuantificación de las oximas

Los picos de los analitos y de los estándares internos de los cromatogramas fueron integrados con el software del equipo GC-MS Postrun Analysis P.

Primero se calcularon las áreas relativas de cada analito en cada una de las muestras ( $S_i^\alpha$ ). Esto se consigue dividiendo las áreas absolutas de los picos del analito ( $A_i^\alpha$ ) entre su estándar interno ( $A_{IS(i)}^\alpha$ ) para cada muestra  $\alpha$ , mediante la siguiente ecuación:

$$S_i^\alpha = \frac{A_i^\alpha}{A_{IS(i)}^\alpha}$$

Los estándares internos para cada aldehído estudiado se recogen en la tabla 4.

Después, se calcularon los factores respuesta de cada analito ( $FR_i$ ) siendo  $S_i^{FR}$  la señal media del área relativa de cada analito en el vino sintético dopado y  $C_i^{FR}$  su concentración. Mientras que  $S_i^0$  es la señal media del área relativa del vino sintético sin dopar y  $C_i^0$  es la concentración de cada analito en el mismo, en este caso 0, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$FR_i = \frac{S_i^{FR} - S_i^0}{C_i^{FR} - C_i^0} = \frac{S_i^{FR} - S_i^0}{C_i^{FR}}$$

Por último, este factor de respuesta se aplicó para el cálculo de la concentración de cada analito en cada muestra  $C_i^\alpha$  de la siguiente manera:

$$C_i^\alpha = \frac{S_i^\alpha}{FR_i}$$

Como para los 5 aldehídos estudiados la señal de los analitos fueron nulas en los blancos de método, los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) que se recogen en la Tabla 8, se definieron como la cantidad de analito que da un pico con un alto tres veces mayor o diez veces mayor que la desviación estándar de la señal de la línea base en las proximidades del pico estimado, respectivamente.

Tabla 8. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de los aldehídos de Strecker.

Aldehídos de Strecker	LD (µg/L)	LC (µg/L)
<b>Isobutanal</b>	0,021	0,070
<b>2-metilbutanal</b>	0,027	0,090
<b>3-metilbutanal</b>	0,026	0,087
<b>Metional</b>	0,132	0,440
<b>Fenilacetaldehido</b>	0,445	1,485

### 3.4. Diseño experimental

#### 3.4.1. Experimento 1

Se prepararon muestras de vino sintético con cantidades equimoleculares (1 mM) de compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico (diacetilo y metilglioxal) y aminoácidos (0,2 mM de cada aminoácido, 1 mM en total de aminoácidos) con ocho combinaciones diferentes de metales como se recoge en las tablas 9 y 10. Las concentraciones de metales estudiadas fueron dos: ausencia o presencia de 5 mg/L de  $Fe^{2+}$ , 0.25 mg/L de  $Cu^{2+}$  y 2.5 mg/L de  $Mn^{2+}$ . Es decir, un estudio factorial completo  $2^3$ .

Cada sistema de reacción se preparó por triplicado (réplicas A, B y C), aunque sólo dos de ellas fueron analizadas (réplicas B y C). Además, se prepararon blancos de sistema (Tabla 11) que contenían sólo uno de los dos reactivos (aminoácido o compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico, ya sea diacetilo o metilglioxal) a dos niveles de metales (presencia de todos o ausencia de los 3 metales).

Tabla 9. Sistemas de reacción para el diacetilo.

Sistema	Contenido
<b>BDO1</b>	Vino sintético + 1 mM diacetilo + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup> + Cu <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup>
<b>BDO2</b>	Vino sintético + 1 mM diacetilo + 5 aa (0,2 mM cada uno)
<b>BDO3</b>	Vino sintético + 1 mM diacetilo + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup> + Cu <sup>2+</sup>
<b>BDO4</b>	Vino sintético + 1 mM diacetilo + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Mn <sup>2+</sup>
<b>BDO5</b>	Vino sintético + 1 mM diacetilo + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup>
<b>BDO6</b>	Vino sintético + 1 mM diacetilo + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Cu <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup>
<b>BDO7</b>	Vino sintético + 1 mM diacetilo + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup>
<b>BDO8</b>	Vino sintético + 1 mM diacetilo + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Cu <sup>2+</sup>

Tabla 10. Sistemas de reacción para el metilglioxal.

Sistema	Contenido
<b>MGO1</b>	Vino sintético + 1 mM metilglioxal + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup> + Cu <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup>
<b>MGO2</b>	Vino sintético + 1 mM metilglioxal + 5 aa (0,2 mM cada uno)
<b>MGO3</b>	Vino sintético + 1 mM metilglioxal + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup> + Cu <sup>2+</sup>
<b>MGO4</b>	Vino sintético + 1 mM metilglioxal + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Mn <sup>2+</sup>
<b>MGO5</b>	Vino sintético + 1 mM metilglioxal + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup>
<b>MGO6</b>	Vino sintético + 1 mM metilglioxal + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Cu <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup>
<b>MGO7</b>	Vino sintético + 1 mM metilglioxal + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup>
<b>MGO8</b>	Vino sintético + 1 mM metilglioxal + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Cu <sup>2+</sup>

Tabla 11. Blancos de sistema.

Sistema	Contenido
<b>Blanco1</b>	Vino sintético + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup> + Cu <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup>
<b>Blanco2</b>	Vino sintético + 5 aa (0,2 mM cada uno)
<b>Blanco3</b>	Vino sintético + 1 mM diacetilo + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup> + Cu <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup>
<b>Blanco4</b>	Vino sintético + 1 mM diacetilo + 5 aa (0,2 mM cada uno)
<b>Blanco5</b>	Vino sintético + 1 mM metilglioxal + 5 aa (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup> + Cu <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup>
<b>Blanco6</b>	Vino sintético + 1 mM metilglioxal + 5 aa (0,2 mM cada uno)

En total se prepararon 66 viales de 13 mL llenos hasta su límite, antes del cerrar los viales, se desplazó el oxígeno de las disoluciones borboteando nitrógeno durante aproximadamente 5 min. Este tiempo se calculó haciendo una prueba previa con un vial que contenía un sensor de oxígeno Pst3 y un analizador de oxígeno de fibra óptica Fibox 3 LCD-trace, PreSens de Nomasense (Nomasense). Posteriormente, los viales se sellaron empleando silicona y por último, se envasaron a vacío para asegurar la anoxia total de las muestras. Se dejaron cerrados y sellados durante 33 días y se incubaron a una temperatura de 35°C. Transcurrido este tiempo, los viales se introdujeron en la cámara de anoxia para realizar el análisis de aldehídos formados.

### 3.4.2. Experimento 2

Se prepararon muestras de vino sintético con cantidades equimoleculares (1 mM) de compuestos fenólicos, aminoácidos (0,2 mM de cada aminoácido, 1 mM en total de aminoácidos) y oxígeno (1,1 mM) en la presencia de 5 mg/L de Fe<sup>2+</sup>, 0.25 mg/L de Cu<sup>2+</sup> y 2.5 mg/L de Mn<sup>2+</sup>, como se recoge en la Tabla 12. En este experimento el  $\alpha$ -dicarbonilo se formará *in situ* por oxidación de los compuestos fenólicos 4-metilcatecol y ácido gálico.

Cada sistema de reacción se preparó por duplicado. Además, se prepararon blancos de sistema (sistemas 3-5, Tabla 12) que contenían sólo uno de los dos reactivos (aminoácido o compuestos fenólicos, ya sea 4-metilcatecol o ácido gálico, con oxígeno) en presencia de las mismas concentraciones de metales.

En total se caracterizaron (en términos de peso y volumen real) 10 tubos WIT que contenían un sensor de oxígeno Pst3 cada uno. Para ello los WIT se pesaron vacíos y se midió su volumen exacto con agua. Los tubos se prepararon dejando el espacio de cabeza suficiente para oxidar las muestras con 35 mg/L de oxígeno siguiendo la metodología de Marrufo-Curtido et al. (2018). Los tubos se cerraron y se incubaron a 35°C durante 33 días en agitación a 100 rpm para asegurar que el oxígeno del sistema estuviera en equilibrio (el disuelto con el del espacio de cabeza). Se controló el consumo de oxígeno 1 vez al día, recogieron medidas de O<sub>2</sub> disuelto (por triplicado) de cada tubo gracias al sensor de oxígeno Nomasens. Finalizados los 33 días de incubación, se cuantificó la concentración de aldehídos totales de Strecker formados siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.

Tabla 12. Sistemas de reacción del experimento 2.

<b>Tubo</b>	<b>Sistema</b>	<b>Contenido</b>
<b>WIT-21</b> <b>WIT-22</b>	<b>Sistema1</b>	Vino sintético + 4-metilcatecol (1mM) + 5 aminoácidos (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup> + Cu <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup> + 35 mg/O <sub>2</sub> (1,1 mM)
<b>WIT-23</b> <b>WIT-24</b>	<b>Sistema2</b>	Vino sintético + ácido gálico (1mM) + 5 aminoácidos (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup> + Cu <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup> + 35 mg/O <sub>2</sub> (1,1 mM)
<b>WIT-27</b> <b>WIT-29</b>	<b>Sistema3</b>	Vino sintético + 5 aminoácidos (0,2 mM cada uno) + Fe <sup>2+</sup> + Cu <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup> + 35 mg/O <sub>2</sub> (1,1 mM)
<b>WIT-30</b> <b>WIT-33</b>	<b>Sistema4</b>	Vino sintético + 4-metilcatecol (1mM) + Fe <sup>2+</sup> + Cu <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup> + 35 mg/O <sub>2</sub> (1,1 mM)
<b>WIT-35</b> <b>WIT-36</b>	<b>Sistema5</b>	Vino sintético + ácido gálico (1mM) + Fe <sup>2+</sup> + Cu <sup>2+</sup> + Mn <sup>2+</sup> + 35 mg/O <sub>2</sub> (1,1 mM)

Para calcular el volumen de espacio de cabeza (HS) que había que dejar inicialmente en cada uno de los tubos WIT para lograr tener los 35 mg/L de oxígeno total, hay que tener en cuenta que el oxígeno también se disolverá en el vino sintético, y por tanto se repartirá entre el vino sintético y el HS como se indica en la ecuación:

$$O_2 \text{ total} = O_2 \text{ vino disuelto} + O_2 \text{ HS}$$

La cantidad (mg) de O<sub>2</sub> disuelto se define como el volumen del vino sintético en cada WIT multiplicado por la solubilidad del O<sub>2</sub> en vino sintético a 35°C. La cantidad (mg) de O<sub>2</sub> en el HS viene definida por su volumen obtenido como diferencia de volumen del tubo vacío menos el volumen de vino sintético, entre 1 mol de O<sub>2</sub> en condiciones normales multiplicado por el % de O<sub>2</sub> en el aire y a su vez multiplicado por el peso molecular del O<sub>2</sub>. La ecuación queda de la siguiente manera:

$$O_2 \text{ total} = [V_{\text{vino}}(\text{mL}) + 0'0065 \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)] + \left[ \frac{V_{\text{real recipiente}}(\text{mL}) - V_{\text{vino}}(\text{mL})}{22,4 \text{ mL/mmol}} \times 0'21 \times 32 \left(\frac{\text{mg}}{\text{mmol}}\right) \right]$$

La cantidad (mg) de O<sub>2</sub> total se define como la dosis de O<sub>2</sub> (en nuestro caso 35 mg/L) por el volumen del vino, y simplificando la ecuación, quedaría tal que así:

$$\text{Dosis} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) \times V_{\text{vino}} = [0'0065 + V_{\text{vino}}] + 0'3(V_{\text{real}} - V_{\text{vino}})$$

Finalmente, despejando se obtuvo el volumen de vino sintético que se debía poner en cada WIT para obtener la cantidad de oxígeno deseada (dosis 35 mg/L):

$$V_{\text{vino}}(\text{mL}) = \frac{0'3 \times V_{\text{real recipiente}}}{\text{Dosis}(\text{mg/mL}) + 0'2935}$$

### 3.5. Tratamiento de datos

Se utilizó Microsoft Excel 2016 para el análisis de las concentraciones de las señales cromatográficas mediante el cálculo de las áreas relativas y los factores respuesta. Los resultados que se muestran en las tablas son los valores medios ± su desviación estándar. ANOVAs (Análisis de varianza) tanto de uno como tres factores (Factores: tipo de dicarbonilo o metales respectivamente) se analizaron con el software SPSS (SPSS Statistics v.15 IBM), seguido de la prueba de comparación por pares Post hoc (Duncan (95%)).



Se empleó la extensión XLSTAT (Addinsoft, versión 2019) de Microsoft Excel para la realización de los gráficos 3D de las concentraciones obtenidas en el experimento 1.

Además, se utilizó el programa Design expert (Stat-Ease, Inc., versión 8.0.6) para la modelización de los resultados del efecto catalítico de los metales y sus interacciones siguiendo el modelo propuesto a continuación:

$$y = b_0 + b_{Fe^{2+}}X_{Fe^{2+}} + b_{Cu^{2+}}X_{Cu^{2+}} + b_{Mn^{2+}}X_{Mn^{2+}} + b_{Fe^{2+}Cu^{2+}}X_{Fe^{2+}Cu^{2+}} + b_{Fe^{2+}Mn^{2+}}X_{Fe^{2+}Mn^{2+}} + b_{Cu^{2+}Mn^{2+}}X_{Cu^{2+}Mn^{2+}} + b_{Fe^{2+}Cu^{2+}Mn^{2+}}X_{Fe^{2+}Cu^{2+}Mn^{2+}}$$

$b_0$  = efecto promedio ;  $b_{Fe^{2+}}$ ,  $b_{Cu^{2+}}$ ,  $b_{Mn^{2+}}$  = coeficientes lineales;  $b_{Fe^{2+}x_{Cu^{2+}}}$  $X_{Fe^{2+}x_{Cu^{2+}}}$ ,  $b_{Fe^{2+}x_{Mn^{2+}}}$  $X_{Fe^{2+}x_{Mn^{2+}}}$ ,  $b_{Cu^{2+}x_{Mn^{2+}}}$  $X_{Cu^{2+}x_{Mn^{2+}}}$  = coeficientes de interacción doble;  $b_{Fe^{2+}x_{Cu^{2+}}x_{Mn^{2+}}}$  $X_{Fe^{2+}x_{Cu^{2+}}x_{Mn^{2+}}}$  = coeficiente de interacción triple.

El efecto sobre el modelo y la significación estadística para cada metal se ilustraron en diagramas de Pareto.

## 4. RESULTADOS Y DISCURSIÓN

### 4.1. Efecto de los catalizadores metálicos en la formación de aldehídos de Strecker a partir de aminoácidos y compuestos dicarbonílicos

En el experimento 1, se estudió la reactividad de dos compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos, diacetilo y metilglioxal, frente a una mezcla de aminoácidos precursores de los aldehídos de Strecker y diferentes combinaciones de metales. Se eligió el diacetilo porque recientemente se ha encontrado una relación entre este compuesto y el hierro para la formación de fenilacetaldehído en vinos tintos jóvenes (Bueno et al., 2018). En cuanto al metilglioxal, se ha observado que produce fenilacetaldehído en vino sintético con hierro y cobre (Monforte, Martins y Silva Ferreira, 2020) en presencia de oxígeno. Además, el experimento se llevó a cabo a 35°C porque se ha descrito que las reacciones de formación de aldehídos se aceleran con la temperatura (Monforte, Martins y Silva Ferreira, 2018; Marrufo-Curtido, 2021).

En primer lugar, en las tablas 13 y 14 se puede observar que la reacción ha tenido lugar formando los aldehídos de Strecker, partiendo de 1 mM de aminoácidos y 1 mM de diacetilo, metilglioxal, respectivamente. En las muestras que sólo contenían unos de los reactivos (blancos) también se han producido cantidades cuantificables de los aldehídos de Strecker, siendo mayores en los Blancos 1 y 2 que son aquellos que contenían los aminoácidos precursores de los aldehídos (Tabla 15). Este hecho no es sorprendente porque ya se ha observado en trabajos anteriores (Marrufo-Curtido, 2021). Muchos aldehídos se encuentran ya en el medio ambiente (se usan de forma generalizada en productos de limpieza domésticos) (Zapata et al., 2010). De todas formas, las concentraciones que aparecen en los bancos son menores que las producidas por los sistemas con aminoácido y compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico.

Tabla 13. Concentraciones medias de aldehídos de Strecker ( $\mu\text{g/L}$ ) de cada uno de los sistemas que contienen diacetilo (n=2).

Código	Metales (Fe <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> )	Aldehídos de Strecker ( $\mu\text{g/L}$ )					
		Isobutanal	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	Suma
BDO1	+++	1,05 ± 0,07 <sup>c</sup>	1,50 ± 0,02 <sup>cde</sup>	3,62 ± 0,21 <sup>e</sup>	14,8 ± 0,3 <sup>c</sup>	15,9 ± 0,9 <sup>cd</sup>	36,8 ± 1,3 <sup>c</sup>
BDO2	---	0,940 ± 0,022 <sup>c</sup>	1,14 ± 0,02 <sup>ef</sup>	3,09 ± 0,06 <sup>f</sup>	9,79 ± 0,35 <sup>e</sup>	14,6 ± 0,1 <sup>d</sup>	29,6 ± 0,3 <sup>d</sup>
BDO3	++-	0,916 ± 0,077 <sup>c</sup>	1,31 ± 0,18 <sup>def</sup>	3,47 ± 0,37 <sup>ef</sup>	12,5 ± 0,9 <sup>d</sup>	14,2 ± 0,5 <sup>d</sup>	32,4 ± 1,1 <sup>d</sup>
BDO4	--+	1,53 ± 0,08 <sup>b</sup>	2,22 ± 0,05 <sup>ab</sup>	6,13 ± 0,06 <sup>b</sup>	17,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	28,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	55,4 ± 0,3 <sup>a</sup>
BDO5	+-	1,41 ± 0,27 <sup>b</sup>	1,99 ± 0,37 <sup>bc</sup>	5,29 ± 0,19 <sup>c</sup>	18,4 ± 0,1 <sup>ab</sup>	21,9 ± 1,6 <sup>b</sup>	48,9 ± 2,5 <sup>b</sup>
BDO6	-++	2,06 ± 0,26 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,42 <sup>a</sup>	6,94 ± 0,03 <sup>a</sup>	18,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	28,0 ± 2,4 <sup>a</sup>	58,3 ± 3,7 <sup>a</sup>
BDO7	+ - +	1,52 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,77 ± 0,02 <sup>bcd</sup>	4,49 ± 0,13 <sup>d</sup>	15,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	17,9 ± 0,5 <sup>c</sup>	40,7 ± 0,8 <sup>c</sup>
BDO8	- + -	0,763 ± 0,037 <sup>c</sup>	0,929 ± 0,179 <sup>f</sup>	3,21 ± 0,10 <sup>f</sup>	10,0 ± 0,3 <sup>e</sup>	14,9 ± 0,6 <sup>d</sup>	29,8 ± 1,2 <sup>d</sup>

Las diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). BDO: sistema con diacetilo; +: presencia; -: ausencia.

Tabla 14. Concentraciones medias de aldehídos de Strecker ( $\mu\text{g/L}$ ) de cada uno de los sistemas que contienen metilglioxal (n=2).

Código	Metales (Fe <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> )	Aldehídos de Strecker ( $\mu\text{g/L}$ )					
		Isobutanal	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	Suma
MGO1	+++	2,74 ± 0,27 <sup>c</sup>	4,16 ± 0,00 <sup>b</sup>	7,93 ± 0,40 <sup>c</sup>	18,1 ± 0,8 <sup>c</sup>	23,3 ± 1,9 <sup>b</sup>	56,3 ± 2,1 <sup>bc</sup>
MGO2	---	2,94 ± 0,42 <sup>bc</sup>	3,87 ± 0,51 <sup>b</sup>	7,82 ± 0,07 <sup>c</sup>	14,6 ± 0,6 <sup>d</sup>	24,7 ± 2,7 <sup>b</sup>	53,9 ± 1,1 <sup>c</sup>
MGO3	++-	2,89 ± 0,27 <sup>bc</sup>	5,54 ± 1,05 <sup>b</sup>	9,10 ± 0,49 <sup>bc</sup>	20,2 ± 0,5 <sup>ab</sup>	23,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	61,6 ± 1,1 <sup>bc</sup>
MGO4	--+	4,01 ± 0,96 <sup>ab</sup>	5,60 ± 0,78 <sup>ab</sup>	11,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	21,8 ± 1,9 <sup>a</sup>	37,4 ± 7,2 <sup>a</sup>	79,9 ± 11,5 <sup>a</sup>
MGO5	+-	3,24 ± 0,07 <sup>bc</sup>	4,79 ± 0,23 <sup>b</sup>	10,2 ± 0,4 <sup>ab</sup>	21,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	26,3 ± 2,5 <sup>b</sup>	66,0 ± 3,8 <sup>b</sup>
MGO6	-++	4,49 ± 0,75 <sup>a</sup>	7,55 ± 1,87 <sup>a</sup>	11,3 ± 1,3 <sup>a</sup>	21,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	35,2 ± 4,0 <sup>a</sup>	80,0 ± 4,5 <sup>a</sup>
MGO7	+ - +	2,97 ± 0,20 <sup>bc</sup>	4,26 ± 0,23 <sup>b</sup>	8,94 ± 1,22 <sup>bc</sup>	19,2 ± 0,3 <sup>bc</sup>	22,3 ± 0,7 <sup>b</sup>	57,7 ± 2,2 <sup>bc</sup>
MGO8	- + -	2,99 ± 0,26 <sup>bc</sup>	4,24 ± 0,48 <sup>b</sup>	8,34 ± 0,22 <sup>c</sup>	15,0 ± 0,5 <sup>d</sup>	24,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	54,5 ± 1,1 <sup>c</sup>

Las diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), MGO: sistema con metilglioxal; +: presencia; -: ausencia.

Tabla 15. Concentraciones medias de aldehídos de Strecker ( $\mu\text{g/L}$ ) de cada uno de los blancos ( $n=2$ ).

Código	Metales ( $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ )	Aldehídos de Strecker ( $\mu\text{g/L}$ )					Suma
		Isobutanal	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	
<b>Blanco1</b>	+++	$0,522 \pm 0,002$	$1,34 \pm 0,27$	$0,424 \pm 0,022$	$3,00 \pm 0,20$	$3,06 \pm 0,25$	$8,35 \pm 0,74$
<b>Blanco2</b>	---	$0,435 \pm 0,004$	$1,23 \pm 0,22$	$0,322 \pm 0,050$	$0,79 \pm 0,04$	$1,99 \pm 0,15$	$4,77 \pm 0,06$
<b>Blanco3</b>	+++	$0,501 \pm 0,108$	$0,0644 \pm 0,054$	$0,0393 \pm 0,0354$	$0,154 \pm 0,042$	$0,875 \pm 0,658$	$1,63 \pm 0,85$
<b>Blanco4</b>	---	$0,461 \pm 0,033$	$0,0907 \pm 0,0226$	$0,0658 \pm 0,0001$	$0,206 \pm 0,035$	$1,05 \pm 0,02$	$1,88 \pm 0,12$
<b>Blanco5</b>	+++	$0,267 \pm 0,027$	$1,01 \pm 0,12$	$0,0867 \pm 0,0474$	$0,142 \pm 0,008$	$1,19 \pm 0,45$	$2,69 \pm 0,40$
<b>Blanco6</b>	---	$0,617 \pm 0,050$	$0,0819 \pm 0,0126$	$0,0318 \pm 0,0156$	$0,218 \pm 0,125$	$1,20 \pm 0,48$	$2,15 \pm 0,59$

+: presencia; -: ausencia; Blancos 1 y 2: blanco de aminoácidos; Blancos 3 y 4: blanco de diacetilo; Blancos 5 y 6: blanco de metilglioxal.

Las concentraciones de los aldehídos de Strecker obtenidos se encuentran entre 0,76  $\mu\text{g/L}$  (en el caso del isobutanal) y 28,22  $\mu\text{g/L}$  (en el caso del fenilacetaldehído) para el sistema con diacetilo (Tabla 13) y entre 2,74  $\mu\text{g/L}$  (isobutanal) y 37,35  $\mu\text{g/L}$  (fenilacetaldehído) para el sistema con metilglioxal (Tabla 14). De manera que, conociendo la especificidad de la reacción (Marrufo-Curtido, 2021) y partiendo de 0.2 mM de cada aminoácido precursor se obtuvieron unos rendimientos comprendidos entre 0,005% y 0,117% para el diacetilo y entre 0,019% y 1,155% para el metilglioxal (Tabla 16). En un trabajo anterior donde se hace reaccionar diacetilo con cada uno de los aminoácidos de forma independiente, pero sin la presencia de metales (Aguerri, 2019), los rendimientos obtenidos oscilaron entre 0.007%-0.07%. Además en ese trabajo el único aldehído que se formó en mayores proporciones fue el metional, mientras que en éste, los aldehídos que presentan rendimientos más altos con respecto al resto son el metional y el fenilacetaldehído para ambos tipos de sistemas. Este hecho podría deberse a la presencia de metales, a la competencia al haber puesto todos los aminoácidos juntos o a ambas, favoreciéndose así la formación de fenilacetaldehído levemente.

Se realizaron 8 ANOVAS de 1 factor, para comparar el efecto del compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico para una misma combinación de metales. En general, entre los dos dicarbonilos, el metilglioxal genera más aldehídos de Strecker con respecto al diacetilo ( $p < 0.05$  por lo general,  $p < 0.10$  para isobutanal y metional en el sistema 4, y 2-metilbutanal en el sistema 6), excepto para el fenilacetaldehído donde en los sistemas 5 y 6 no existen diferencias significativas. Esto podría deberse a que el metilglioxal por ser más pequeño reacciona más con los aminoácidos valina, leucina, isoleucina y metionina que el diacetilo. Con la fenilalanina, otros autores han probado compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos de diferente tamaño (glioxal y metilglioxal) sin obtener diferencias en la producción de fenilacetaldehído (Hofmann, Münch y Schieberle, 2000b).

Tabla 16. Rendimientos de cada aldehído de Strecker en cada sistema de diacetilo y metilglioxal.

Código	% Rendimiento				
	Isobutanal	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
<b>BDO1</b>	0,0073	0,0087	0,0210	0,0708	0,0662
<b>BDO2</b>	0,0065	0,0066	0,0179	0,0470	0,0609
<b>BDO3</b>	0,0063	0,0076	0,0202	0,0601	0,0592
<b>BDO4</b>	0,0106	0,0129	0,0356	0,0831	0,1174
<b>BDO5</b>	0,0097	0,0115	0,0307	0,0882	0,0911
<b>BDO6</b>	0,0143	0,0156	0,0403	0,0895	0,1166
<b>BDO7</b>	0,0105	0,0102	0,0261	0,0718	0,0746
<b>BDO8</b>	0,0053	0,0054	0,0187	0,0480	0,0620
<b>MGO1</b>	0,0190	0,0242	0,0460	0,0871	0,0970
<b>MGO2</b>	0,0204	0,0224	0,0454	0,0702	0,1027
<b>MGO3</b>	0,0366	0,0360	0,0613	0,1088	0,1318
<b>MGO4</b>	0,0278	0,0325	0,0647	0,1044	0,1555
<b>MGO5</b>	0,0225	0,0278	0,0594	0,1029	0,1095
<b>MGO6</b>	0,0311	0,0438	0,0655	0,1031	0,1463
<b>MGO7</b>	0,0206	0,0247	0,0519	0,0924	0,0928
<b>MGO8</b>	0,0207	0,0246	0,0484	0,0719	0,0997
<b>Blanco1</b>	0,0036	0,0078	0,0025	0,0144	0,0127
<b>Blanco2</b>	0,0030	0,0071	0,0019	0,0038	0,0083
<b>Blanco3</b>	0,0035	0,0004	0,0002	0,0007	0,0036
<b>Blanco4</b>	0,0032	0,0005	0,0004	0,0010	0,0044
<b>Blanco5</b>	0,0019	0,0058	0,0005	0,0007	0,0049
<b>Blanco6</b>	0,0043	0,0005	0,0002	0,0010	0,0050

BDO: sistema con diacetilo; MGO: sistema con metilglioxal; presencia; -: ausencia; Blancos 1 y 2: blanco de aminoácidos; Blancos 3 y 4: blanco de diacetilo; Blancos 5 y 6: blanco de metilglioxal.

Por otra parte, varios estudios han reflejado que la presencia de metales y oxígeno suele facilitar la degradación de Strecker en vinos cuando las quinonas se forman a partir de polifenoles (Danilewicz, 2016; Monforte et al., 2019). Sin embargo, es casi nula la bibliografía sobre este tema si se parte ya de un compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico, en cuyo caso la reacción no debería necesitar oxígeno. Por eso en este trabajo se ha estudiado el posible efecto catalítico que generan los metales (Fe, Cu, Mn) y sus combinaciones sobre los sistemas con aminoácidos y diacetilo o metilglioxal en ausencia de oxígeno. Se ha seleccionado el estado de oxidación 2 ya que se sabe que en un vino sintético con  $Fe^{3+}$  que se deja en anoxia, se reduce todo a  $Fe^{2+}$  en 2 semanas, seguramente porque

coge los electrones del ácido tartárico (Moreno, 2016) y encontrar el Mn en estado de oxidación 3 es poco común.

La última columna de las tablas 13 y 14 recoge el sumatorio de los aldehídos formados y se aprecia como los sistemas 4 y 6 de ambos carbonilos son los que generan mayor concentración de aldehídos de Strecker significativamente. El sistema 4 combina  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , mientras que el sistema 6 está formado por  $\text{Mn}^{2+}$  exclusivamente, es decir, ambos sistemas tienen en común el  $\text{Mn}^{2+}$ , de esta manera se observa como la influencia de este metal es importante en la formación de los distintos aldehídos.

Por otra parte, los sistemas que significativamente menos aldehídos formaron son el 2 (sin metales) y el 8 (únicamente  $\text{Cu}^{2+}$ ). Este resultado coincide en parte con lo que ocurre con la oxidación del 4-metilcatecol (Danilewicz, 2007): la oxidación es nula si no hay presencia de metales en el vino sintético, escasa cuando únicamente hay  $\text{Cu}^{2+}$ , pequeña si sólo hay  $\text{Fe}^{2+}$  y relevante en presencia de ambos metales. En otro trabajo (Hofmann, Münch y Schieberle, 2000b), se estudió la presencia o ausencia de oxígeno en un sistema con fenilalanina y metilglioxal disueltos en tampón fosfato (pH 7). En ambos casos se produjo fenilacetaldehído pero sin diferencias entre ellos. Además, si a esos sistemas se les añade  $\text{Cu}^{2+}$  tampoco cambia el resultado. Lo mismo se aprecia en la tabla 14, para el fenilacetaldehído, no hay diferencias significativas entre los sistemas MGO2 y MGO8.

Se llevó a cabo la modelización de la formación de cada aldehído catalizada por metales en ausencia de oxígeno para los sistemas aminoácido-diacetilo y aminoácido-metilglioxal. Los coeficientes lineales y de interacción para cada aldehído en cada sistema se recogen en el Anexo II. También se realizaron los diagramas de Pareto que permiten identificar los factores e interacciones más importantes ( $p \leq 0,05$ ), además de indicar si un efecto es positivo o negativo (Anexo III). A continuación, se muestran dos tablas resumen de los efectos significativos encontrados para los sistemas aminoácido-diacetilo (Tabla 17) y aminoácido-metilglioxal (Tabla 18), además del nivel de significación de los ANOVAs. Hay que añadir que en la representación del hierro en las tablas, cuando presenta color de letra rojo indica que tiene un efecto positivo, mientras que si presenta color negro el efecto es negativo.

Tabla 17. Efectos significativos de los metales y sus interacciones en cada aldehído formado a partir de su aminoácido precursor y diacetilo.

Aldehídos de Strecker	Isobutanal	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	Suma
Combinación de metales	+ Mn <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> ***
	- Fe <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> ***	+ Mn <sup>2+</sup> ***	+ Mn <sup>2+</sup> ***	+ Mn <sup>2+</sup> ***	+ Mn <sup>2+</sup> ***	+ Mn <sup>2+</sup> ***
	- Fe <sup>2+</sup> × Cu <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> × Cu <sup>2+</sup> *	- Fe <sup>2+</sup> × Cu <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> × Cu <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> × Cu <sup>2+</sup> ***
	+ Cu <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> *	+ Cu <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> *	- Fe <sup>2+</sup> ***	+ Cu <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> × Cu <sup>2+</sup> **	- Cu <sup>2+</sup> ***
	+ Fe <sup>2+</sup> × Cu <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> *		- Cu <sup>2+</sup> ***	+ Fe <sup>2+</sup> ***	- Cu <sup>2+</sup> **	+ Cu <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> **
			+ Cu <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> **	+ Fe <sup>2+</sup> × Cu <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> ***	+ Fe <sup>2+</sup> × Cu <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> *	- Fe <sup>2+</sup> **
				- Cu <sup>2+</sup> ***		+ Fe <sup>2+</sup> × Cu <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> *

Nivel de significación según el ANOVA: \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001

Tabla 18. Efectos significativos de los metales y sus interacciones en cada aldehído formado a partir de su aminoácido precursor y metilglioxal.

Aldehídos de Strecker	Isobutanal	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	Suma
Combinación de metales	- Fe <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> *	- Fe <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> **	- Fe <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> **	- Fe <sup>2+</sup> × Mn <sup>2+</sup> ***
	- Fe <sup>2+</sup> *		+ Mn <sup>2+</sup> ***	+ Mn <sup>2+</sup> ***	- Fe <sup>2+</sup> **	+ Mn <sup>2+</sup> **
				+ Fe <sup>2+</sup> **	+ Mn <sup>2+</sup> *	- Fe <sup>2+</sup> *

Nivel de significación según el ANOVA: \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001



Queda claro que la influencia de los metales es mayor en el caso del diacetilo que en el del metilglioxal, pero en ambos casos se observa un efecto negativo de la interacción  $\text{Fe}^{2+} \times \text{Mn}^{2+}$  y el efecto positivo del  $\text{Mn}^{2+}$ . Otro efecto que se repite con frecuencia es la influencia negativa del  $\text{Fe}^{2+}$  en la formación de aldehídos con la excepción del metional, donde la presencia de hierro influye positivamente. Para ilustrar de forma gráfica estos efectos, a modo de ejemplo se presentan las gráficas 3D del metional y el fenilacetaldehído obtenidas en los sistemas que contenían metilglioxal (Figuras 4 y 5, respectivamente). Comparando ambas figuras es muy claro el efecto positivo del hierro para la formación de metional y negativo en el caso del fenilacetaldehído (4 sistemas de la parte positiva del eje X). El efecto positivo el manganeso se aprecia en los sistemas 4 y 5, mientras que la interacción negativa  $\text{Fe}^{2+} \times \text{Mn}^{2+}$  se observa en los sistemas 1 y 7. (El resto de los gráficos 3D se encuentran en el Anexo IV).

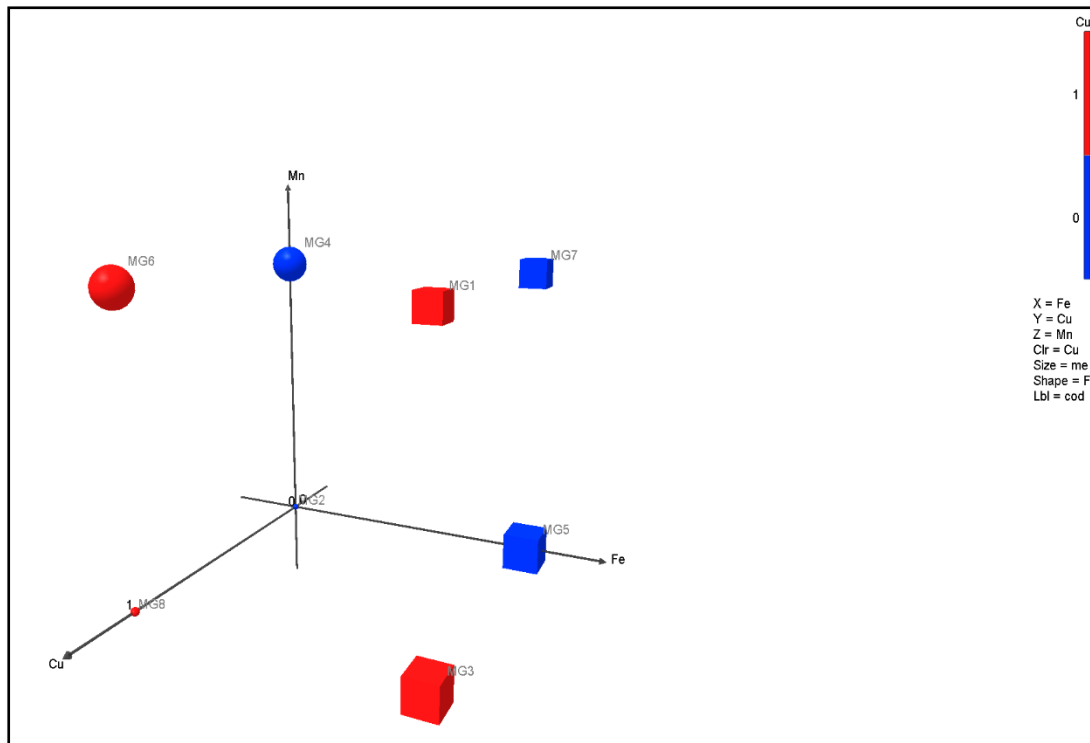


Figura 4. Gráfico 3D de la formación de metional a partir de su aminoácido precursor, metilglioxal y diferentes combinaciones de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  en ausencia de oxígeno. Ejes: eje X =  $\text{Fe}^{2+}$ , eje Y =  $\text{Cu}^{2+}$ , eje Z =  $\text{Mn}^{2+}$ ; Tamaño: directamente proporcional a la concentración del aldehído estudiado; Color: presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  (rojo), ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$  (azul); Forma: presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  (cuadrado), ausencia de  $\text{Fe}^{2+}$  (círculo).

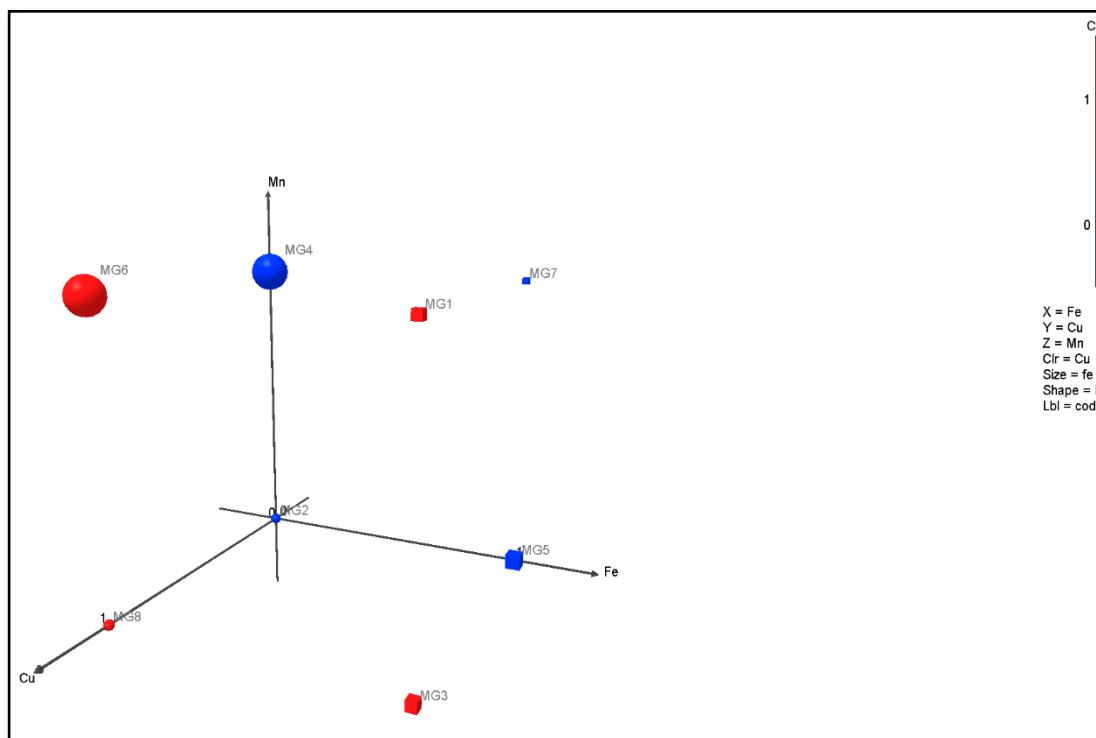


Figura 5. Gráfico 3D de la formación de fenilacetaldehído a partir de su aminoácido precursor, metilglioxal y diferentes combinaciones de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  en ausencia de oxígeno. Ejes: eje X =  $\text{Fe}^{2+}$ , eje Y =  $\text{Cu}^{2+}$ , eje Z =  $\text{Mn}^{2+}$ ; Tamaño: directamente proporcional a la concentración del aldehído estudiado; Color: presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  (rojo), ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$  (azul); Forma: presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  (cuadrado), ausencia de  $\text{Fe}^{2+}$  (circulo).

Estos resultados son los opuestos a los encontrados para la oxidación de polifenoles, donde el hierro juega un efecto positivo importante (Danilewicz, 2007) y el manganeso por sí sólo no es capaz de catalizar, pero acelera la oxidación mediada por hierro en vino modelo (Danilewicz, 2016). De todas formas, esta comparación ha de hacerse con precaución porque estos experimentos citados se realizaron con presencia de oxígeno, necesario para transformar el polifenol en quinona que es la que tiene una estructura de compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico. Es decir, el efecto de los metales que estudian podría tener más que ver con el primer paso (obtención de la quinona) que a la formación de acetaldehído tras la reacción de Fenton (ya que no estudian los aldehídos de Strecker).

Además, en el caso del diacetilo, se observa que la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y la interacción  $\text{Fe}^{2+} \times \text{Cu}^{2+}$  disminuye la formación de aldehídos, mientras que, como ya se ha comentado antes, se puede percibir, que la interacción  $\text{Cu}^{2+} \times \text{Mn}^{2+}$  genera un

incremento en la formación de aldehídos. Resulta llamativo que el sistema MGO6, con presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , sea el que más aldehídos forma, pero su interacción no ha aparecido significativa cuando el dicarbonilo es el metilglioxal en lugar del diacetilo. Por último, la interacción de los tres metales tiene efecto positivo que sobre todo es relevante en la formación de metional ( $p \leq 0,001$ ).

#### 4.2. Efecto de los compuestos fenólicos en la formación de aldehídos de Strecker

En el experimento 2, se estudió la reacción de formación de los aldehídos de Strecker a partir de las quinonas de los compuestos fenólicos (Figura 6), ácido gálico (Figura 7) y 4-metilcatecol (Figura 8), cuando están presentes junto con los cinco aminoácidos precursores. Para que se pueda generar la quinona (compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico generado *in situ*) es necesaria la presencia de oxígeno y la reacción debe estar catalizada por un metal, preferentemente  $\text{Fe}^{2+}$  (Danilewicz, 2007), por eso en este experimento se trabaja con oxígeno y en la presencia de los tres metales ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ).

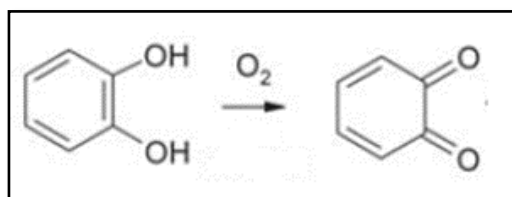


Figura 6. Formación de la quinona en presencia de oxígeno (Danilewicz, 2007).

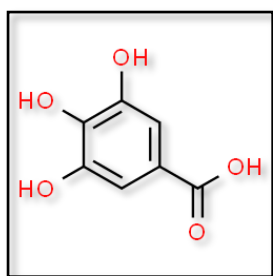


Figura 7. Molécula de ácido gálico (ChemSpider, 2021)

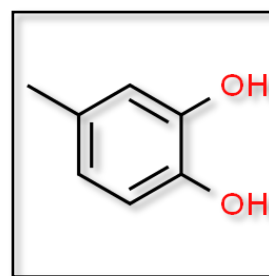


Figura 8. Molécula de 4-metilcatecol (ChemSpider, 2021)

En la tabla 19 se muestran los niveles totales de cada uno de los aldehídos de Strecker formados a partir de las quinonas de los compuestos fenólicos estudiados y de sus aminoácidos precursores. En la misma tabla, también se recogen los valores de los blancos (muestras que contenían uno sólo de los reactivos), que de nuevo son apreciables sobre todo en el caso del blanco que contiene los aminoácidos precursores (Sistema 3). Este hecho está en concordancia con los observado por Monforte et al.

(2020) en la formación de fenilacetaldehído. Una posible explicación de este hecho es que puedan darse otras reacciones gracias a la presencia de oxígeno y de los iones metálicos que dan como resultado la formación de radicales hidroxilo. Estos radicales hidroxilo son capaces de oxidar el ácido tartárico a ácido dioxosuccinico (Fenton, 1905) que puede ser otro sustrato para la degradación de Strecker. Además, está descrito que esos mismos radicales hidroxilo pueden reaccionar con el etanol y formar radicales etoxi, y la presencia de ambos radicales está correlacionada con la oxidación directa de aminoácidos sin la presencia de  $\alpha$ -dicarbonilos para formar aldehídos en disoluciones modelo de cerveza (pH 4,5 y 5% de etanol v/v) (Wietstock y Methner, 2013). De nuevo, las concentraciones que aparecen en los bancos son menores que las producidas por los sistemas con aminoácido y compuesto fenólico, con la excepción del valor de fenilacetaldehído que alcanza valores similares al sistema de ácido gálico con aminoácidos.

Se puede apreciar que de nuevo metional y fenilacetaldehído fueron los aldehídos más formados en ambos sistemas. Además, queda reflejado que el sistema que contienen 4-metilcatecol ha generado una gran cantidad de aldehídos de Strecker con respecto al sistema que contiene ácido gálico, en torno de un orden de magnitud más.

Las concentraciones de los aldehídos de Strecker obtenidos en el experimento 2, se encuentran entre 48,5  $\mu\text{g/L}$  (en el caso del isobutanal) y 296  $\mu\text{g/L}$  (en el caso del metional) cuando el polifenol es el ácido gálico y entre 423  $\mu\text{g/L}$  (en el caso del isobutanal) y 2188  $\mu\text{g/L}$  (en el caso del metional) en el caso del 4-metilcatecol, como se puede observar en la tabla 19. De manera que, partiendo de 0.2 mM de aminoácido precursor se obtuvieron unos rendimientos comprendidos entre 0,34% y 1,42% con ácido gálico y de 2,93% y 10,5% con 4-metilcatecol (Tabla 20) para isobutanal y metional respectivamente en ambos casos. En otro trabajo se encontraron rendimientos entre 3 y 4 veces mayores (entre 9 y 40%) oxidando los aminoácidos a la misma temperatura durante 50 días en la presencia de 4-metilcatecol con  $\text{Fe}^{2+}$  (5 mg/L) y  $\text{Cu}^{2+}$  (0.2 mg/L) (Marrufo-Curtido, 2021). De este hecho se podría decir que la formación de aldehídos por oxidación no es un proceso lineal, sino exponencial que cuadra con la naturaleza radicalaria del mismo. En ambos casos el aldehído que más se produce es el metional, seguido del fenilacetaldehído, seguido de cerca por el 3-metilbutanal. También, coincide el hecho de que se forma el doble de metional que de fenilacetaldehído (Oliveira et al., 2017; Aguerri, 2019).

Tabla 19. Niveles totales de aldehídos de Strecker (g/L) encontrados en cada uno de los sistemas de 4-metilcatecol y ácido gálico (n=2).

Aldehídos de Strecker							
Muestra	Compuesto fenólico	Isobutanal	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhidó	Suma
<b>Sistema1</b>	4-metilcatecol + aa	423 ± 17	514 ± 28	766 ± 33	2188 ± 104	1355 ± 25	5247 ± 208
<b>Sistema2</b>	Ácido gálico + aa	48,5 ± 7,5	63,7 ± 6,6	110 ± 5	296 ± 9	220 ± 5	738 ± 34
<b>Sistema3</b>	Blanco aa	18,7 ± 1,5	27,8 ± 3,6	35,5 ± 7,4	109 ± 28	195 ± 14	386 ± 55
<b>Sistema4</b>	Blanco 4-metilcatecol	3,01 ± 0,11	3,53 ± 0,38	0,796 ± 0,017	2,50 ± 0,23	15,3 ± 0,5	25,1 ± 0,7
<b>Sistema5</b>	Blanco ácido gálico	2,86 ± 0,10	5,35 ± 0,09	1,24 ± 0,19	2,21 ± 0,36	16,5 ± 0,0	28,1 ± 0,7

aa: conjunto de aminoácidos; Todos los sistemas contienen 35mg/L O<sub>2</sub>, 5 mg/L de Fe<sup>2+</sup>, 0.25 mg/L de Cu<sup>2+</sup> y 2.5 mg/L de Mn<sup>2+</sup>

Tabla 20. Rendimientos de cada aldehído de Strecker en cada sistema de 4-metilcatecol y ácido gálico.

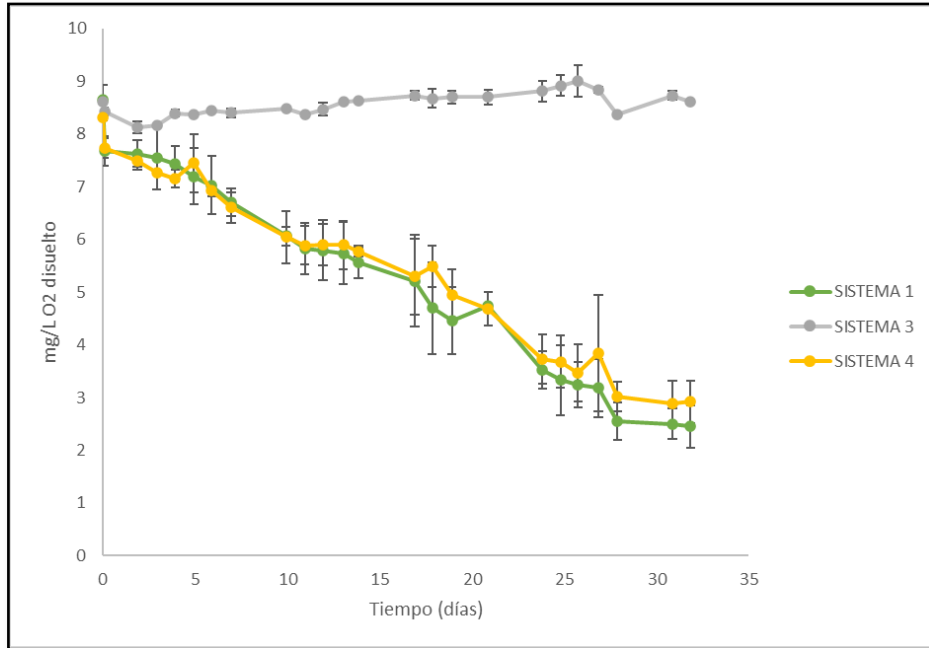
% Rendimiento						
Muestra	Compuesto fenólico	Isobutanal	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhidó
<b>Sistema1</b>	4-metilcatecol + aa	2,9343	2,9884	4,4473	10,5035	5,6372
<b>Sistema2</b>	Ácido gálico + aa	0,3363	0,3698	0,6378	1,4207	0,9166
<b>Sistema3</b>	Blanco aa	0,1297	0,1612	0,2062	0,5226	0,8105
<b>Sistema4</b>	Blanco 4-metilcatecol	0,0209	0,0205	0,0046	0,0120	0,0636
<b>Sistema5</b>	Blanco ácido gálico	0,0199	0,0311	0,0072	0,0106	0,0685

aa: conjunto de aminoácidos; Todos los sistemas contienen 35mg/L O<sub>2</sub>, 5 mg/L de Fe<sup>2+</sup>, 0.25 mg/L de Cu<sup>2+</sup> y 2.5 mg/L de Mn<sup>2+</sup>

#### 4.2.1. Efecto del compuesto fenólico en el consumo de oxígeno

Durante el desarrollo del experimento 2, también se realizó la medición del oxígeno disuelto de las muestras de cada sistema durante los 33 días que se incubaron a 35°C en agitación. Estas medidas se han representado gráficamente (Figura 9).

a)



b)

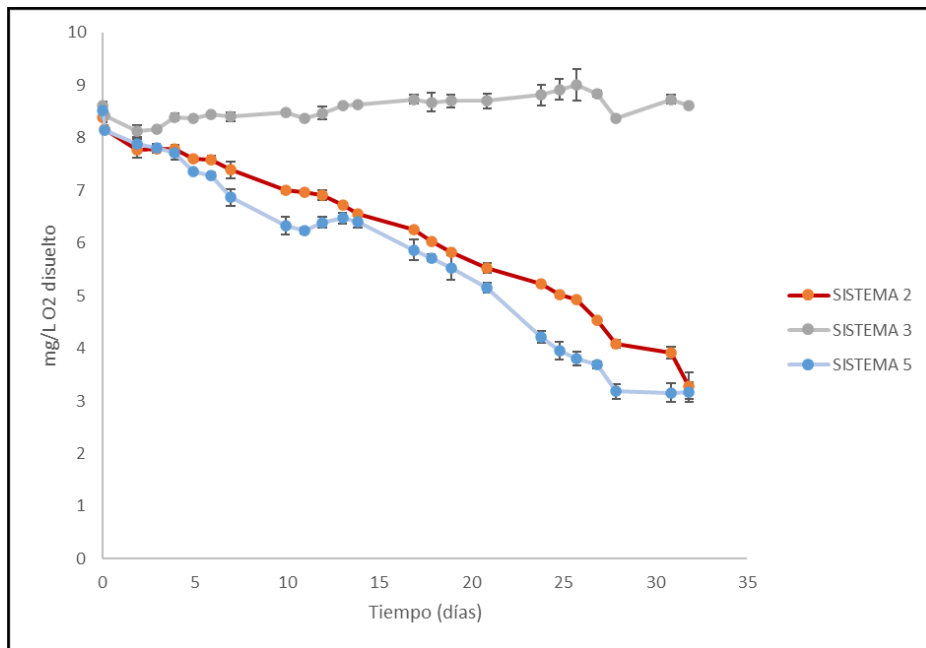


Figura 9. Oxígeno disuelto medio en los cinco sistemas estudiados a lo largo del periodo de incubación (n=2). a) Sistemas con 4-metilcatecol. b) Sistemas con ácido gálico.

En primer lugar, se observa como el oxígeno disuelto de la pareja de tubos de los sistemas 2 y 5 (que contienen ácido gálico) presentan menores desviaciones estándar que es sistema 3 (sólo aminoácidos) y mucho menores que los sistemas 1 y 4 (con 4-metilcatecol).

En las gráficas se puede observar cómo existe un descenso del nivel de oxígeno disuelto más o menos constante en todos los sistemas que contienen fenoles (sistemas 1-2 y 4-5). Para el sistema 3, que sólo contienen los aminoácidos, sólo se observa un descenso del oxígeno disuelto hasta el día 3 y luego una acumulación. Como ya se ha explicado en el apartado anterior, la presencia de oxígeno y metales puede producir radicales hidroxilo capaces de oxidar el ácido tartárico a ácido dioxosuccinico (Fenton, 1905), el etanol a acetaldehído (Wildenradt y Singleton, 1974) o los aminoácidos a aldehídos (Wietstock y Methner, 2013). Para el último caso, el mecanismo propuesto no consume oxígeno una vez se hayan generado los radicales (Anexo V), lo que cuadraría con la tendencia en el oxígeno observada para el sistema 3 (Figura 9).

A parte de representar las medidas directas del oxígeno disuelto en los tubos, se realizó la representación gráfica del oxígeno consumido de cada sistema. Esto se pudo hacer gracias a que sabemos exactamente la cantidad de oxígeno que había inicialmente en cada tubo. Se muestra como ejemplo la gráfica del sistema 2 (Figura 10), mientras que el resto de las gráficas se adjuntan en el Anexo VI.

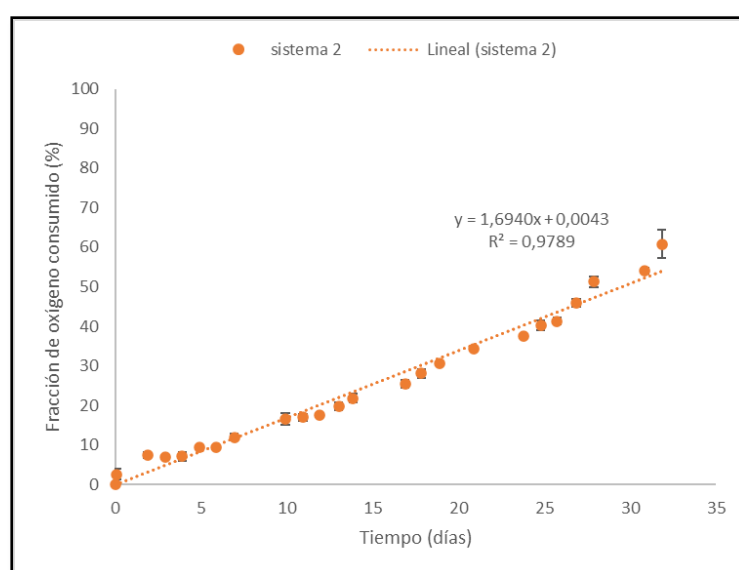


Figura 10. Fracción de oxígeno consumido en el sistema 2, que contiene ácido gálico (1 mM) y el conjunto de todos los aminoácidos (0.2 mM de valina, leucina, isoleucina, metionina y fenilalanina).

En estas gráficas se puede observar el nivel de oxígeno consumido y gracias a la ecuación de mínimos cuadrados, la fracción consumida al día. En el ejemplo del sistema 2, se alcanza el 60% de oxígeno consumido y la fracción diaria consumida es de 1,69. La tabla 21 recoge los datos de los sistemas con fenoles.

Tabla 21. Datos del consumo de oxígeno de los distintos sistemas con compuestos fenólicos.

	Compuesto fenólico	Fracción consumida	Fracción consumida /día	R <sup>2</sup>
<b>Sistema 1</b>	4-metilcatecol + aa	72 ± 4	2,1349 ± 0,0565	0,9848
<b>Sistema 2</b>	Ácido gálico + aa	61 ± 4	1,6940 ± 0,0530	0,9789
<b>Sistema 4</b>	Blanco 4-metilcatecol	65 ± 5	1,9607 ± 0,059	0,9802
<b>Sistema 5</b>	Blanco ácido gálico	63 ± 1	1,9588 ± 1,1354	0,9771

El sistema 1, que contiene 4-metilcatecol y aminoácidos, es el que más oxígeno consumió durante el experimento en comparación con el resto de sistemas, sin embargo esta diferencia no es significativa.

Según el análisis de varianza realizado a la fracción consumida total y a la fracción consumida al día (pendiente de las rectas de mínimos cuadrados), los sistemas 1 y 2 con respecto a sus blancos (sistemas 4 y 5) muestran una cinética parecida. Por lo tanto, el consumo de oxígeno depende únicamente de la presencia de polifenoles, se formen o no aldehídos en el medio.

#### **4.3. Efecto diferencial del tipo de compuesto $\alpha$ -dicarbonilo en la degradación de Strecker**

Una vez mostrados y comentados los resultados de los experimentos 1 y 2, se decidió estudiar el efecto de **tener el  $\alpha$ -dicarbonilo presente o que se formara a partir de un compuesto fenólico** en el propio sistema. Para ello, se eligieron los sistemas comparables, que fueron aquellos que contenían la presencia de los tres metales. En el caso de tener ya el  $\alpha$ -dicarbonilo presente hay que recordar que la presencia de oxígeno no era necesaria, mientras que para formarlo a partir de un compuesto fenólico la presencia de oxígeno y metales es imprescindible (Danilewicz, 2016).

En la tabla 22 se muestran los resultados del ANOVA de un factor, además de reflejar los resultados de la prueba Duncan. Claramente se puede observar que el sistema con 4-metilcatecol ha generado de forma significativa mayor cantidad de aldehídos que el resto, seguido del sistema con ácido gálico y con grandísimas diferencias con los



sistemas de metilglioxal y diacetilo donde no existen diferencias significativas entre ellos. Pero para ver mejor la magnitud de estas diferencias se ha restado el blanco del sistema con aminoácidos a cada uno de los sistemas estudiados. Así se observa en la Tabla 23 que para el isobutanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal y metional las diferencias entre el sistema de ácido gálico frente los sistemas con metilglioxal y diacetilo son de un factor 10 o un poco mayores, respectivamente; y las diferencias del sistema con 4-metilcatecol frente al ácido gálico son de nuevo de un factor 10 y frente al metilglioxal y diacetilo de un factor 100 o mayores. El fenilacetaldehído merece un comentario exclusivo. En este caso la diferencia entre el sistema de ácido gálico frente al de diacetilo es de un factor 2, el resultado obtenido a partir del metilglioxal es similar al del ácido gálico y ambos son 40 veces menores que el resultado obtenido con el 4-metilcatecol.

Tabla 22. Niveles totales de aldehídos de Strecker ( $\mu\text{g/L}$ ) encontrados en los sistemas con  $\alpha$ -dicarbonilo de inicio o formado a partir de su fenol (n=2) en la presencia de la misma cantidad de metales.

Código	Aldehídos de Strecker					Suma
	Isobutanal	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído	
Diacetilo (BDO1)	1,05 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	1,50 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	3,62 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup>	14,8 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>	15,9 $\pm$ 0,9 <sup>c</sup>	36,8 $\pm$ 1,3 <sup>c</sup>
Metilglioxal (MGO1)	2,74 $\pm$ 0,27 <sup>c</sup>	4,16 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	7,93 $\pm$ 0,40 <sup>c</sup>	18,1 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>	23,3 $\pm$ 1,9 <sup>c</sup>	56,3 $\pm$ 2,1 <sup>c</sup>
4-metilcatecol (Sistema 1)	423 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	515 $\pm$ 28 <sup>a</sup>	766 $\pm$ 33 <sup>a</sup>	2188 $\pm$ 104 <sup>a</sup>	1355 $\pm$ 25 <sup>a</sup>	5247 $\pm$ 208 <sup>a</sup>
Ácido Gálico (Sistema 2)	48,5 $\pm$ 7,5 <sup>b</sup>	63,7 $\pm$ 6,6 <sup>b</sup>	110 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	296 $\pm$ 9 <sup>b</sup>	220 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	738 $\pm$ 34 <sup>b</sup>

Las diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ),

Tabla 23. Diferencias en los aldehídos de Strecker ( $\mu\text{g/L}$ ) de los sistemas con  $\alpha$ -dicarbonilo de inicio o formado a partir de su fenol (n=2) en la presencia de la misma cantidad de metales frente a sus respectivos blancos.

Código	Aldehídos de Strecker				
	Isobutanal	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Diacetilo (BDO1)	0,53	0,16	3,2	11,8	12,8
Metilglioxal (MGO1)	2,22	2,82	7,51	15,1	20,2
4-metilcatecol (Sistema 1)	404	486	730	2079	1160
Ácido Gálico (Sistema 2)	29,8	35,9	74	187	25

## 5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha estudiado el posible efecto catalítico de los metales Fe, Cu y Mn y sus combinaciones sobre sistemas que contenían aminoácidos con diacetilo o metilglioxal en ausencia de oxígeno. Los rendimientos de formación de aldehídos de Strecker encontrados han sido bajos (entre 0,005% y 0,117% para diacetilo, y 0,019% y 1,155% para el metilglioxal), sin embargo, las cantidades cuantificadas (de 30 a 80  $\mu\text{g/L}$  en total) han sido suficientes para poder evidenciar los efectos de los metales. Lo más destacado ha sido la influencia positiva del  $\text{Mn}^{2+}$  y negativa por parte de la interacción  $\text{Fe}^{2+} \times \text{Mn}^{2+}$ . Además, en el caso del diacetilo, la inesperada y desfavorable interacción de los tres metales ( $\text{Fe}^{2+} \times \text{Cu}^{2+} \times \text{Mn}^{2+}$ ). Esto hace pensar en una competencia entre los dos metales para alcanzar algún sitio activo. En el caso del metional se ha observado la influencia positiva del  $\text{Fe}^{2+}$  mientras que para el resto de los aldehídos esta influencia es de signo contrario.

La diferencia de la naturaleza del compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico usado también fue evaluada. Estos compuestos pueden estar directamente en el medio o formarse a partir de la reacción de fenoles con oxígeno catalizada por metales. En este segundo caso, utilizando como compuesto  $\alpha$ -dicarbonílico las quinonas de ácido gálico y de 4-metilcatecol se obtuvieron rendimientos de reacción mayores que con diacetilo y metilglioxal (0,34% y 1,42% a partir del ácido gálico, y de 2,93% y 10,5% con el 4-metilcatecol). Concretamente, la quinona de gálico produjo 10 veces más isobutanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal y metional que los que generaron el metilglioxal y el diacetilo, mientras que la quinona del 4-metilcatecol lo hizo 100 veces más. Además, se ha demostrado que el consumo de oxígeno depende únicamente de la presencia de polifenoles, se lleguen a formar o no aldehídos en el medio.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguerri, L.D. (2019). *Estudio de la formación de aldehídos de Strecker a partir de diacetilo y de quinonas*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.
- Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C. y Carnacini, A. (1999). "Yeast Influence on Volatile Composition of Wines". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), pp. 1139-1144. DOI: 10.1021/jf9807317.
- Barros, A., Rodrigues, J.A., Almeida, P.J. y Oliva-Teles, M. (1999). "Determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in selected beer and wine, by hplc with uv spectrophotometric detection, after derivatization with o-phenylenediamine". *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol*, 22(13), pp. 2061-2069. DOI: 10.1081/JLC-100101786.
- Bloem, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A. y de Revel, G. (2007). "Vanillin production from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria". *Letters in Applied Microbiology*, 44(1), pp. 62-67. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.02037.x.
- Bloem, A., Lonvaud-Funel, A. y de Revel, G. (2008). "Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*". *Food Microbiology*, 25(1), pp. 99-104. DOI: 10.1016/j.fm.2007.07.009.
- Bueno, M., Carrascón, V. y Ferreira, V. (2016). "Release and Formation of Oxidation-Related Aldehydes during Wine Oxidation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(3), pp. 608-617. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04634.
- Bueno, M., Marrufo-Curtido, A., Carrascón, V., Fernández-Zurbano, P., Escudero, A. y Ferreira, V. (2018). "Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation". *Frontiers in Chemistry*, 6, pp. 20. DOI: 10.3389/fchem.2018.00020.
- Bueno, M., Zapata, J. y Ferreira, V. (2014). "Simultaneous determination of free and bonded forms of odor-active carbonyls in wine using a headspace solid phase microextraction strategy". *Journal of Chromatography A*, 1369, pp. 33-42. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.10.004.
- ChemSpider (2021). ChemSpider. Disponible en: <http://www.chemspider.com/> [Consultado 29-10-2021].

- Chira, K., Jourdes, M. y Teissedre, P. (2012). "Cabernet sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage". *European food research and technology*, 234(2), pp. 253-261. DOI: 10.1007/s00217-011-1627-1.
- Danilewicz, J.C. (2007). "Interaction of Sulfur Dioxide, Polyphenols, and Oxygen in a Wine-Model System: Central Role of Iron and Copper". *Am. J. Enol. Vitic*, 58 pp. 53-60.
- Danilewicz, J.C. (2016). "Chemistry of Manganese and Interaction with Iron and Copper in Wine". *Am. J. Enol. Vitic*. 67:4. DOI: 10.5344/ajev.2016.16033.
- Delfini, C., Cocito, C., Bonino, M., Schellino, R., Gaia, P. y Baiocchi, C. (2001). "Definitive evidence for the actual contribution of yeast in the transformation of neutral precursors of grape aromas". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), pp. 5397-5408. DOI: 10.1021/jf010613a.
- Delgado, R.M., Zamora, R. y Hidalgo, F.J. (2015). "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*, 63(1), pp. 312-318. DOI: 10.1021/jf5047317.
- Ephrem, E., Najjar, A., Charcosset, C. y Greige-Gerges, H. (2018). "Encapsulation of natural active compounds, enzymes, and probiotics for fruit juice fortification, preservation, and processing: An overview". *Journal of Functional Foods*, 48, pp. 65-84. DOI: 10.1016/j.jff.2018.06.021.
- Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J. y Ferreira, V. (2002). "Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants". *Food Chemistry*, 77(3), pp. 325-331. DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00355-7.
- Escudero, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J. y Ferreira, V. (2000). "Clues about the Role of Methional As Character Impact Odorant of Some Oxidized Wines". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), pp. 4268-4272. DOI: 10.1021/jf991177j.
- Estévez, P., Gil, M.L. y Falqué, E. (2004). "Effects of seven yeast strains on the volatile composition of Palomino wines". *International Journal of Food Science & Technology*, 39(1), pp. 61-69. DOI: 10.1046/j.0950-5423.2003.00755.x.

- Fenton, H.J.H. (1905). "Further studies on dihydroxymaleic acid". *Journal of the Chemical Society*, 87, pp. 804-818. DOI: 10.1039/CT9058700804.
- Ferreira, V., Bueno, M., Franco-Luesma, E., Culleré, L. y Fernández-Zurbano, P. (2014). "Key Changes in Wine Aroma Active Compounds during Bottle Storage of Spanish Red Wines under Different Oxygen Levels". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(41), pp. 10015-10027. DOI: 10.1021/jf503089u.
- Ferreira, V., De la Fuente-Blanco, A., Sáez-Navajas, M.P. (2021). "A New Classification of Perceptual Interactions between Odorants to Interpret Complex Aroma Systems. Application to Model Wine Aroma". *Journal of Food*, 10(7), 1627. DOI: 10.3390/foods10071627.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J.M., Rivas-Gonzalo, J.C. y Escribano-Bailón, M.T. (2014). "Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: synergistic effect and modulation by aromas". *Food Research International*, 62, pp. 1100-1107. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.05.049.
- Grant-Preece, P., Fang, H., Schmidtke, L.M. y Clark, A.C. (2013). "Sensorially important aldehyde production from amino acids in model wine systems: Impact of ascorbic acid, erythorbic acid, glutathione and sulphur dioxide". *Food Chemistry*, 141(1), pp. 304-312. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.100.
- Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, ÁF., Meléndez-Martínez, A.J., González-Miret, M.L. y Heredia, F.J. (2009). "Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard". *Food Chemistry*, 113(2), pp. 530-537. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.096.
- Herrero, P. (2015). *Caracterización químico-sensorial del aroma de vinos procedentes de diferentes variedades tintas y blancas. Nuevas estrategias cuantitativas y quimio-sensoriales*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Hofmann, T. y Schieberle, P. (2000a). "Formation of Aroma-Active Strecker-Aldehydes by a Direct Oxidative Degradation of Amadori Compounds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), pp. 4301-4305. DOI: 10.1021/jf000076e.
- Hofmann, T., Münch, P. y Schieberle, P. (2000b). "Quantitative model studies on the formation of aroma-active aldehydes and acids by Strecker-type reactions". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), pp. 434-440. DOI: 10.1021/jf990954c.

- Leffingwell, J. y Leffingwell, D. (1991). "GRAS flavor chemical detection thresholds". *Perf Flav*, 16, pp. 2-19.
- Liang, Z., Zhang, P., Zeng, X. y Fang, Z. (2021). "The art of flavored wine: Tradition and future". *Trends in Food Science & Technology*, 116, pp. 130-145. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.07.020.
- Marrufo-Curtido, A. (2021). *Formación, reacción y acumulación de acetaldehído y aldehídos de Strecker durante la oxidación del vino*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Marrufo-Curtido, A., Carrascón, V., Bueno, M., Ferreira, V. y Escudero, A. (2018). "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*, 248, pp. 37-45. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.12.028
- Monforte, A.R., Martins, S. I. F. S. y Silva Ferreira, A.C. (2018). "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*, 66(10), pp. 2459-2466. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b00264.
- Monforte, A.R., Martins, S. I. F. S. y Silva Ferreira, A.C. (2020). "Impact of Phenolic Compounds in Strecker Aldehyde Formation in Wine Model Systems: Target and Untargeted Analysis". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(38), pp. 10281-10286. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b02674.
- Monforte, A.R., Oliveira, C., Martins, S. I. F. S. y Silva Ferreira, A.C. (2019). "Response surface methodology: A tool to minimize aldehydes formation and oxygen consumption in wine model system". *Food Chemistry*, 283, pp. 559-565. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.01.063.
- Moreno, B.D. (2016). *Estudio de la capacidad reductora de antioxidantes naturales en medios modelo*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.
- Muñoz-González, C., Rodríguez-Bencomo, J.J., Moreno-Arribas, M.V. y Pozo-Bayón, M.Á (2011). "Beyond the characterization of wine aroma compounds: looking for analytical approaches in trying to understand aroma perception during wine consumption". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(5), pp. 1497-1512. DOI: 10.1007/s00216-011-5078-0.

- Obreque-Slér, E., Peña-Neira, A. y López-Solís, R. (2010). "Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), pp. 3729-3735. DOI: 10.1021/jf903659t.
- Oliveira, C.M., Santos, S.A.O., Silvestre, A.J.D., Barros, A.S., Silva Ferreira, A.C., Silva, A.M.S. (2017). "Quinones as Strecker degradation reagents in wine oxidation processes". *Food Chemistry*, 228, pp. 618-624. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.034.
- Park, Y.C., Shaffer, C.E.H. y Bennett, G.N. (2009). "Microbial formation of esters". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), pp. 13-25. DOI: 10.1007/s00253-009-2170-x.
- Pérez-Magariño, S. y González-San José, M.L. (2004). "Evolution of Flavanols, Anthocyanins, and Their Derivatives during the Aging of Red Wines Elaborated from Grapes Harvested at Different Stages of Ripening". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), pp. 1181-1189. DOI: 10.1021/jf035099i.
- Polásková, P., Herszage, J. y Ebeler, S.E. (2008). "Wine flavor: chemistry in a glass". *Chemical Society Reviews*, 37(11), pp. 2478-2489. DOI: 10.1039/b714455p.
- Pripis-Nicolau, L., de Revel, G., Bertrand, A. y Maujean, A. (2000). "Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions". *J Agric Food Chem*, 48(9), pp. 3761-3766. DOI: 10.1021/jf991024w.
- Regodón Mateos, J.A., Pérez-Nevado, F. y Ramírez Fernández, M. (2006). "Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine". *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1), pp. 151-157. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.048.
- Rizzi, G.P. (2006). "Formation of Strecker Aldehydes from Polyphenol-Derived Quinones and  $\alpha$ -Amino Acids in a Nonenzymic Model System". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), pp. 1893-1897. DOI: 10.1021/jf052781z.
- Silva Ferreira, A.C., Oliveira, C., Hogg, T. y Guedes de Pinho, P. (2003). "Relationship between Potentiometric Measurements, Sensorial Analysis, and Some Substances Responsible for Aroma Degradation of White Wines". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), pp. 4668-4672. DOI: 10.1021/jf034217z.



- Singlenton, V.L. y Kramlinga, T.E. (1976). "Browning of White Wines and an Accelerated Test for Browning Capacity". *American Journal of Enology and Viticulture*, 27, pp. 157-160.
- Styger, G., Prior, B. y Bauer, F.F. (2011). "Wine flavor and aroma". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(9), pp. 1145-1145. DOI: 10.1007/s10295-011-1018-4.
- Ter Schure, E.G., Flikweert, M.T., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. y Verrips, C.T. (1998). "Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxo acids but is not essential for fusel alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*". *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), pp. 1303-1307. DOI: 10.1128/AEM.64.4.1303-1307.1998.
- Ugliano, M. (2013). "Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), pp. 6125-6136. DOI: 10.1021/jf400810v.
- Wietstock, P. y Methner, F.-J. (2013). "Formation of Aldehydes by Direct Oxidative Degradation of Amino Acids via Hydroxyl and Ethoxy Radical Attack in Buffered Model Solutions". *BrewingSci*, 66, pp. 104–113.
- Wildenradt, H.I. y Singleton, V.I. (1974). "Production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging". *American Journal of Enology and Viticulture*, 25(2): pp. 119-126.
- Zapata, J., Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J. y Ferreira, V. (2010). "Comparison of extraction techniques and mass spectrometric ionization modes in the analysis of wine volatile carbonyls". *Analytica Chimica Acta*, 660(1), pp. 197-205. DOI: 10.1016/j.aca.2009.09.041.