

Trabajo Fin de Grado

Estrategias para gestionar el nivel de aldehídos de
Strecker

Strategies to manage the levels of Strecker aldehydes

Autor/es

David Marzo Méndez

Director/es

Ana Escudero Carra

Ángel Manuel Aragón Capone

Facultad de Ciencias
Departamento de Química Analítica
Junio 2023

Resumen

Los aldehídos de Strecker son compuestos volátiles responsables de la pérdida de calidad aromática de los vinos en condiciones de oxidación. Se caracterizan por ser sensorialmente activos, y proceden de sus respectivos aminoácidos de Strecker (leucina / 3-metilbutanal, isoleucina / 2-metilbutanal, valina / isobutanal, metionina / metional) y fenilalanina / fenilacetaldehído). El objetivo del trabajo ha sido verificar la posibilidad de reducir la tasa de formación de aldehídos de Strecker durante la oxidación mediante la adición de aminoácidos competitivos (sacrificiales) no formadores de estos aldehídos tan activos sensorialmente. Se ha trabajado con vino sintético y vino tinto dopados con metales y aminoácidos de Strecker para forzar la oxidación y reacción de Strecker. Y se han cuantificado los aldehídos de Strecker generados mediante su correspondiente derivatización con O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina (PFBHA), extracción en fase sólida y GC-MS. Se han realizado 3 experiencias: una en vino sintético probando independientemente con los aminoácidos sacrificiales alanina, ácido glutámico, serina, treonina, tirosina, glicina y ácido aspártico; una segunda en vino tinto con los 4 últimos aminoácidos sacrificiales de forma independiente y una tercera en el mismo vino tinto con 3 concentraciones diferentes de tirosina o de ácido aspártico. Apenas se encontraron descensos significativos en las concentraciones generadas de aldehídos de Strecker al añadir los aminoácidos sacrificiales. Sin embargo, al considerar las tasas de formación de aldehídos con respecto al oxígeno consumido se han observado niveles inferiores con respecto al control, sobre todo en los ensayos con tirosina y ácido aspártico independientemente de la concentración aplicada (1 - 4 mM).

Abstract

Strecker aldehydes are volatile compounds responsible for the loss of aromatic quality in wines under oxidation conditions. These sensory-active compounds derive from their respective Strecker amino acids (leucine / 3-methylbutanal, isoleucine / 2-methylbutanal, valine / isobutanal, methionine / metional and phenylalanine/phenylacetaldehyde). The aim of this study was to verify the possibility of reducing the formation rate of Strecker aldehydes during oxidation by adding competitive (sacrificial) amino acids which do not form these sensory-active aldehydes. Synthetic wine and red wine spiked with metals and Strecker amino acids were used to induce oxidation and Strecker reaction. The levels produced of Strecker aldehydes were quantified through derivatization with PFBHA, solid-phase extraction, and GC-MS. Three experiments were conducted: one with synthetic wine testing sacrificial amino acids such as alanine, glutamic acid, serine, threonine, tyrosine, glycine, and aspartic acid; a second one with red wine using the last four sacrificial amino acids; and a third one with the same red wine using three different concentrations of tyrosine and aspartic acid. There were hardly any significant differences in the generated concentrations of Strecker aldehydes when sacrificial amino acids were added. However, when considering the formation rates of aldehydes in relation to the oxygen consumed, lower levels were observed compared to the control, especially in the experiments with tyrosine and aspartic acid, regardless of the applied concentration (1 - 4 mM).

Abreviaturas empleadas

Aa: aminoácido

aaS: aminoácido precursor de aldehídos de Strecker

Ala: Alanina

ANOVA: Análisis de varianza (Analysis of Variance)

AS: Aldehído de Strecker (Strecker Aldehyde)

Asn: Asparagina

Asp: Ácido aspártico

FID: Detector de Ionización de Llama (Flame Ionization Detector)

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

Gln: Glutamina

Glu: Ácido glutámico

Gly: Glicina

His: Histidina

HS: Espacio de cabeza (Head-space)

Ile: Isoleucina

IS: Estándar Interno (Internal Standard)

Leu: Leucina

Met: Metionina

OIV: Organización Internacional de la Viña y el Vino

PFBHA: O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina

Phe: Fenilalanina

Ser: Serina

SIM: Monitorización del Ion Seleccionado (Selected Ion Monitoring)

TF_{AS}: Tasas de formación de aldehídos de Strecker

Thr: Treonina

Tyr: Tirosina

Val: Valina

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	El sentido del olfato y el aroma	1
1.2.	Aroma en el vino.....	2
1.3.	Aldehídos de Strecker	3
1.4.	Caracterización de los aldehídos de Strecker.....	5
2.	OBJETIVOS	5
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1.	Material de laboratorio.....	6
3.2.	Reactivos y muestras.....	6
3.2.1.	Muestras	6
3.2.2.	Aminoácidos	7
3.2.3.	Método Rankine.....	7
3.2.4.	Determinación aldehídos.....	7
3.3.	Disoluciones de trabajo.....	7
3.3.1.	Experiencia I: Cribado de aminoácidos sacrificiales en vino sintético	8
3.3.2.	Experiencia II: Evaluación de Gly, Tyr, Thr y Asp, como aminoácidos sacrificiales, en matriz de vino tinto	8
3.3.3.	Experiencia III: Evaluación del impacto de la concentración de Tyr y Asp como aminoácidos sacrificiales.....	8
3.4.	Determinación de SO ₂ total a través del método Rankine	8
3.5.	Procedimiento de oxidación acelerada.....	9
3.6.	Cuantificación de aldehídos de Strecker	10
3.6.1.	Adición y equilibrado de estándares internos y derivatización.....	10
3.6.2.	Extracción de oximas por extracción en fase sólida (SPE).....	10
3.6.3.	Diagrama del proceso.....	10
3.6.4.	Análisis de oximas por GC-MS	11
3.6.5.	Cuantificación de las oximas	11
3.7.	Análisis de datos	12
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1.	Experiencia I.....	12
4.2.	Experiencia II.....	14
4.3.	Experiencia III	16
5.	CONCLUSIONES	18
6.	Referencias.....	19

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El sentido del olfato y el aroma

El sentido del olfato pertenece al grupo de sentidos químicos, ya que sus quimiorreceptores son estimulados por los compuestos presentes en el aire (moléculas odorantes), la percepción de estas sustancias por el sentido del olfato es a lo que se le denomina olor. Desde los albores del ser humano el olfato ha sido de suma importancia para la supervivencia, capacitándonos para percibir olores desagradables y asociarlos a sustancias nocivas (gases contaminantes, alimentos en putrefacción, etc.). Junto con el sentido del gusto, colabora en la percepción de los sabores, y nos permite identificar alrededor de 10000 olores diferentes. Además, tiene un gran impacto en el estado de ánimo del individuo o incluso puede utilizarse como marcador temprano de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, esquizofrenia, Parkinson, etc.¹

Para que una molécula pueda ser detectada, debe poseer ciertas características. Por ejemplo, su tamaño debe ser lo suficientemente pequeño para ser volátil (peso molecular del rango 30-300 g/mol); de modo que sea capaz de alcanzar la mucosa de la nariz, disolviéndose en ella. Otra característica muy relevante son las propiedades físicas de las moléculas (polaridad, fuerzas intermoleculares, solubilidad en agua).^{1,2} A continuación en la ilustración I se esquematiza el proceso de olfacción, desde la captación de la molécula odorante hasta la creación de una serie de impulsos nerviosos que son integrados por el cerebro para generar la percepción olfativa.³

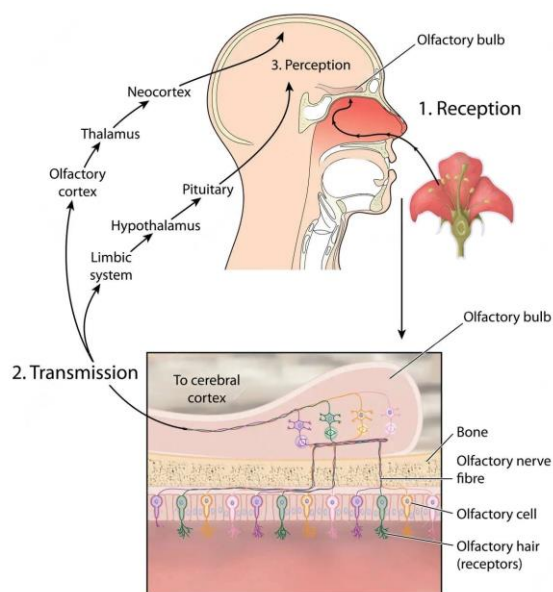


Ilustración I. Sentido del olfato, ciclo para generar una respuesta al olor. (1): Recepción, (2): Transmisión y (3): Percepción.³

La transcendencia del aroma en el ser humano puede verse reflejada en hallazgos que demuestran cómo el arte de combinar aromas para obtener fragancias se remonta a las civilizaciones de Egipto y Mesopotamia. Un ejemplo de un grupo muy codiciado de moléculas aromáticas es el de los terpenos, que ha sido descubierto en vasijas de estas épocas, y que abundan en ciertos árboles y plantas, como el cedro libanés (β -pineno, terpinoleno, (E)- γ -altantone, etc.). De hecho, estos compuestos siguen siendo unas de las principales moléculas odorantes que se pueden encontrar en los perfumes de la actualidad.

Con el desarrollo de la síntesis orgánica durante el siglo XX se consiguieron reproducir en el laboratorio muchas de estas moléculas causantes de interesantes notas aromáticas, haciendo innecesaria su extracción de la naturaleza y abriendo la puerta a una combinación de alrededor de 10^{18} posibilidades de aromas.⁴

La teoría más utilizada para clasificar los olores fue desarrollada por J. Amoore en 1970, clasificándolos según la cualidad percibida, estructura y dificultad de identificación por los individuos (anosmia). Inicialmente se planteó que los olores primarios eran 7: acre, floral, almizclado, etéreo, alcanforado, mentolado y pútrido. Sugiriendo que en la membrana olfativa hay receptáculos o huecos que aceptan o rechazan las moléculas odorantes. Esta teoría ha sido aceptada, pero con muchos matices. Debe aplicarse a cientos de receptores y no restringirse únicamente a siete. Además, cada uno de ellos muestra afinidad a varias moléculas. En la actualidad se conocen más de 60 anosmias, o descriptores, de modo que siguiendo esta teoría el número de olores primarios será cercano a este.¹

1.2. Aroma en el vino

El vino es, exclusivamente, la bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial, de uvas frescas, estrujadas o no, o de mosto de uva. Además del alcohol, esta bebida fermentada tiene otros componentes aromáticos mayoritarios como los alcoholes superiores, acetoína, acetaldehído, diacetilo, ácidos grasos y sus ésteres etílicos entre muchos otros. La presencia de diferentes componentes de la matriz (proteínas, etanol, fenoles, ...) va a actuar sobre la solubilidad de los odorantes y sobre el impacto real de estos en nuestro sistema sensorial. Al aumentar la solubilidad de los odorantes en la matriz, tendremos menos moléculas causantes de olor en fase volátil, siendo más difícil detectarlas.²

Los odorantes de un vino son el resultado de las distintas reacciones químicas y bioquímicas que se producen desde la uva hasta el momento de su consumo. Según su origen bioquímico pueden clasificarse en varietales, fermentativos, de la madera o de evolución. Tradicionalmente, se emplea una clasificación confusa basada en el momento de desarrollo del aroma, en primarios, secundarios y terciarios.⁵ Sin embargo, esa clasificación obvia que el aroma varietal se puede manifestar en momentos muy diferentes del desarrollo.⁶

- Aromas varietales (primarios en la clasificación tradicional): aquellos que provienen de la propia cepa. Los aportados por la uva ya sea en forma de precursores o en su forma aromática. Estos a su vez pueden ser divididos según su percepción sensorial en: florales, vegetales, frutales, minerales, especiados y terrosos/alquitranados.
- Aromas fermentativos (secundarios en la clasificación tradicional): son aquellos compuestos aromáticos que se desarrollan durante las fermentaciones alcohólicas y malolácticas y por tanto depende del tipo de microorganismos presentes y de las condiciones en las que tienen lugar estos procesos. Según la nota perceptiva aportada pueden categorizarse como aromas: fermentativos (pan y bizcocho), lácticos y amílicos (esmalte de uñas, plátano y barniz).
- Aromas de la madera (terciarios o bouquet en la clasificación tradicional): Son los componentes aromáticos extraídos de la madera en forma de aromas o de precursores aromáticos.

- Aromas de evolución (también terciarios o bouquet en la clasificación tradicional): Se trata de los compuestos volátiles que se desarrollan por reacción química a partir de metabolitos primarios (ácidos, aminoácidos, azúcares, H_2S y sus precursores) durante la etapa de envejecimiento o crianza en bodega (u otros contenedores) y la maduración en botella de los vinos.

Se ha demostrado que la composición de aminoácidos de la uva influye directamente en la composición aromática del vino. Tienen una gran importancia en la asimilación del nitrógeno de la levadura en el proceso de fermentación alcohólica y son precursores de compuestos odorantes durante este proceso, como son los alcoholes superiores y los aldehídos de Strecker (AS).⁷

También la composición aminoacídica de los vinos influye en los aromas de evolución, los cuales vienen marcados por la ausencia o presencia de O_2 . Así, se diferencia la evolución reductiva de la evolución oxidativa, respectivamente.

1.3. Aldehídos de Strecker

Es incuestionable que la oxidación controlada del vino es un proceso necesario para que este alcance niveles de calidad óptimos, teniendo efectos positivos como una disminución de la astringencia, así como la estabilización del color.⁸ Pero si la oxidación no es controlada, puede conllevar una serie de modificaciones perjudiciales tanto en la composición como en propiedades sensoriales, observándose el desarrollo de coloraciones amarillentas y marrones y deterioro del aroma.

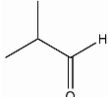
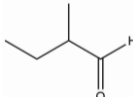
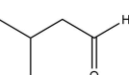
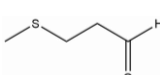
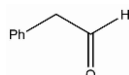
Aldehído de Strecker	Isobutanal	2-metilbutanal	3-metilbutanal	metional	fenilacetaldehído
Estructura					
Aminoácido precursor	Valina	Isoleucina	Leucina	Metionina	Fenilalanina
Aroma	Miel	Almendra amarga	Malta y queso	Patata cocida	Manzana
Umbral de olor (µg/L)	6,00	16,00	4,60	0,50	1,00

Ilustración II. Estructuras y diferentes propiedades sensoriales de los aldehídos de Strecker.

Los AS son compuestos de gran interés en el vino ya que estos son causantes de su deterioro aromático. Esto se debe a que en concentraciones bajas aportan complejidad al aroma del vino, pero cuando estas superan ciertos niveles, son los responsables de la pérdida de la frescura del vino y de la aparición de aromas relacionados con la oxidación, convirtiéndose en la principal causa de deterioro aromático en vinos procedentes de variedades neutras.⁹ Los diferentes umbrales de olor y estructuras de los AS aparecen recogidas en la Ilustración II.

El carácter altamente electrófilo de los aldehídos hace que sean muy reactivos con las moléculas nucleófilas presentes en el vino, como el SO_2 o compuestos fenólicos, cuyas reacciones han sido ampliamente estudiadas. Tradicionalmente, el SO_2 se ha usado para controlar la proliferación de microorganismos no deseados y la oxidación de polifenoles durante la producción del vino.¹⁰ A pesar de las ventajas en su aplicación, la reacción de SO_2 con aldehídos genera aductos inodoros conocidos como α -hidroxialquilsulfonatos.¹¹ Sin embargo, estas uniones son reversibles, y, conforme el SO_2 se oxida, los aldehídos con los que había formado los α -hidroxialquilsulfonatos se van liberando, haciendo que queden libres los aromas desagradables producidos por los AS.⁹

Los AS se pueden formar a través de la degradación de Strecker o mediante la oxidación de alcoholes superiores.¹² La primera vía es la más importante en el vino y consiste en una reacción de transferencia de grupos amino entre un α -dicarbonilo y un aminoácido. El aminoácido es desaminado y posteriormente descarboxilado y transformado en aldehído (Ilustración III). Sólo 5 aminoácidos forman aldehídos sensorialmente problemáticos: leucina (Leu), isoleucina (Ile), valina (Val), metionina (Met) y fenilalanina (Phe) (Ilustración II). La oxidación de algunos polifenoles del vino da lugar a quinonas, siendo algunas de ellas compuestos α -dicarbonílicos que podrían dar lugar a AS.⁹

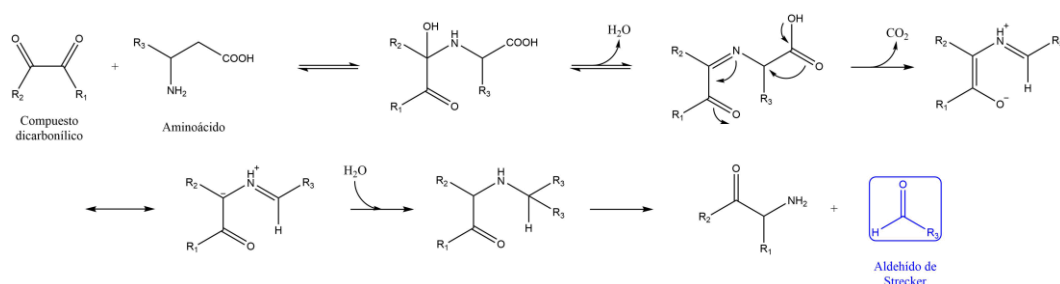


Ilustración III. Mecanismo de la degradación de Strecker

El mecanismo aceptado para explicar el proceso oxidativo del vino, y por tanto la aparición de quinonas, aparece en la Ilustración IV. Este sugiere que una vez el O_2 ha sido disuelto en el vino, es activado por metales en estados de oxidación bajos (Fe^{2+} y Cu^{2+}), haciendo que se forme el radical hidroxoperoxi (HO_2^{\cdot}) y Fe^{3+} . Estos iones oxidados reaccionan con los grupos catecol de los compuestos fenólicos del vino, formando Fe^{2+} de vuelta. A su vez el radical HO_2^{\cdot} reacciona con los fenoles para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a través del ciclo de Fenton reacciona con el Fe^{2+} para formar otro radical oxidante, el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), capaz de oxidar prácticamente cualquier compuesto orgánico (entre ellos alcoholes y fenoles). Como podemos observar, el SO_2 también juega un papel importante, forma parte de dos reacciones, la primera sirve para eliminar el H_2O_2 , reduciéndolo a H_2O y por lo tanto bloqueando la reacción de Fenton. Por otro lado, también puede reaccionar con las quinonas para reducirlas a catecoles o formando sulfonato.¹³

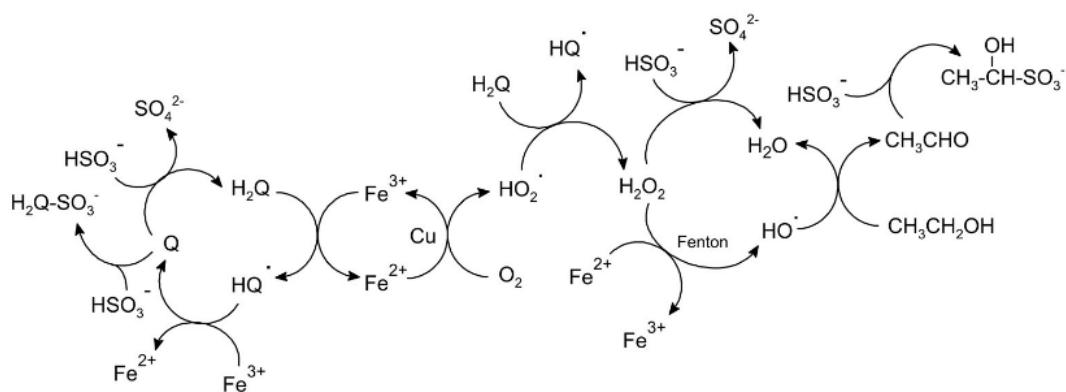


Ilustración IV. Mecanismo de oxidación del vino y reacciones del SO_2 .

Para intentar aminorar el deterioro aromático producido por los AS a partir de sus correspondientes aminoácidos (aaS) se ha considerado el resto de los aminoácidos del vino, como sacrificiales para “neutralizar” las quinonas existentes en sistemas de oxidación. La alanina (Ala) podría producir acetaldehído, que a esos niveles sería sensorialmente irrelevante. La glicina (Gly), si da la reacción, producirá formaldehído.

Otros aminoácidos, podrían dar la reacción y producir aldehídos no volátiles, caso de la arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu) o histidina (His). Por tanto, puede pensarse que la adición de aminoácidos (Aa) diferentes a los aaS podría dar la degradación de Strecker sin producir aldehídos de tal impacto odorante. Esto disminuiría la disponibilidad de compuestos α -dicarbonílicos en el vino para producir aldehídos de oxidación a partir de los aaS. Obviamente, los aminoácidos elegidos tienen que ser efectivos (competir con los aaS) y los subproductos de la reacción tienen que ser inocuos sensorial y químicamente.

1.4. Caracterización de los aldehídos de Strecker

Los AS se caracterizan por ser compuestos volátiles, polares y lábiles, que unido a unas pobres propiedades cromatográficas y malas señales espectrométricas, hace que sea necesaria su derivatización para su correcto análisis. Los derivatizantes más comunes para el análisis de aldehídos son: 2,4-dinitrofenilhidracina, 2-aminoetanotiol, 2,4,5-triclorofenilhidracina, pentafluorofenilhidracina y *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina (PFBHA). Siendo el último el más empleado para análisis vínicos.¹⁴ En la Ilustración V se puede observar el producto formado (oxima) a partir de la reacción del aldehído con PFBHA.

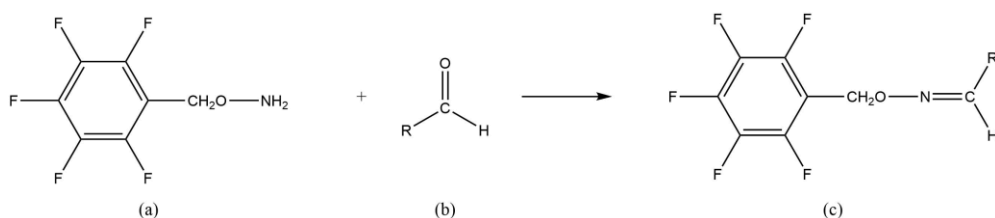


Ilustración V. Reacción de derivatización entre PFBHA y aldehído genérico para generar una oxima.

En función de la fase sobre la que se realice la concentración o derivatización se van a distinguir: extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME) o extracción en fase líquida (LLE). Pese a que la SPME es la más rápida y automatizable, con la SPE se obtienen mejores resultados atendiendo a la incertidumbre, efectos matriz y repetibilidad.¹⁵

Las oximas que se forman en esta reacción tienen unas excelentes propiedades cromatográficas que permiten su separación a través de cromatografía de gases (GC), pudiéndose detectar con detectores de: captura electrónica (ECD), ionización de llama (FID) o mediante espectrometría de masas (MS).¹⁶

2. OBJETIVOS

El objetivo académico fue verificar la posibilidad de reducir la formación de aldehídos de Strecker durante la oxidación del vino mediante la adición de aminoácidos competitivos no formadores de AS.

El objetivo didáctico fue el desarrollo personal y académico del estudiante, empleando recursos bibliográficos, mediante aplicación de técnicas cromatográficas y espectrométricas, con el uso del análisis estadístico y a través de la preparación de la memoria escrita y defensa.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material de laboratorio

- Agitador horizontal Heidolph Promax 1020 (Heidolph Instruments GmbH & Co., Alemania)
- Balanza analítica HR-200 (A&D Weighing Co., EE. UU.)
- Balanza de granatario W Electronic Scale WT30001K (Want Balance Instrument Co., China)
- Cámara de anoxia GP(Concept) (Jacomex SAS, Francia)
- Cartuchos de 3 mL de polipropileno (Varian Inc., EE. UU.)
- Equipo de Ultrasonidos Ultrasons 20 (J.P Selecta S.A., España)
- Estufa Memmert 10-800 (Memmert GmbH & Co., Alemania)
- Frascos de vidrio de borosilicato PyrexTM de 100 y 150 mL (Fisher Scientific Inc., EE. UU.)
- Frits de polietileno para cartuchos de 3 mL (Supelco Inc., EE. UU.)
- Manta calefactora Fibroman-C 500 mL (J.P Selecta S.A., España)
- Matrazes aforados de 10, 15, 20, 25, 150 mL (Fisher Scientific Inc., EE. UU.)
- Matraz de corazón y esférico, regulador de vacío y columna de refrigeración (Sumalsa S.A., España)
- Medidor de pH, *micropH 2002* (CRISON, España)
- Medidor portátil de oxígeno de fibra óptica, *Fibox 3 LCD-trace* (PreSens, Regensburg, Germany)
- Microjeringas de 50, 100 y 250 μ L (Hamilton Co., EE. UU.)
- Pipetas de 5, 10 y 20 mL (Globe Scientific Inc., EE. UU.)
- Pipetas Pasteur de vidrio (Labbox Labware S.L., España) y de plástico (Deltalab S.L., España)
- Reservorios de 75 mL (Varian Inc., EE. UU.)
- Sistema de vacío (vacuum manifold) (Agilent Technologies Inc., EE. UU.)
- Vasos de precipitado de 25 mL (Labbox Labware S.L., España)
- Viales de 2, 12, 20, 30 y 150 mL, viales de 20 mL para espacio de cabeza (HS) con cuello roscado y tapón roscado de septum (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU)
- Viales inserto de 150 μ L (ALWSCI Technologies Co., China)
- Zapatilla de pesada (Scharlab S.L., España)

3.2. Reactivos y muestras

3.2.1. Muestras

Para el vino sintético se utilizó:

- Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido tartárico $\geq 99\%$, hidrogenocarbonato de sodio (Panreac, Barcelona, España)
- Hidróxido de sodio (Scharlau (Barcelona, España)
- Agua purificada en un sistema Milli-Q[®] de Millipore (Bedford, Alemania)
- $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (PanReac AppliChem ITW Reagents Co., EE. UU.)

En aquellos experimentos que evaluaron el rendimiento de ciertos aminoácidos en matriz de vino tinto, el vino escogido es de variedad Garnacha de la D.O. Campo de Borja de la añada 2022.

3.2.2. Aminoácidos

Aminoácidos de Strecker: valina $\geq 99\%$, isoleucina $\geq 98\%$, leucina $\geq 99\%$, metionina $\geq 99\%$ y fenilalanina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Aminoácidos sacrificiales: alanina $\geq 98\%$, tirosina $\geq 98\%$, ácido aspártico $\geq 99\%$, ácido glutámico $\geq 99\%$, serina $\geq 99\%$, glicina $\geq 99\%$, treonina $\geq 98\%$, (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

3.2.3. Método Rankine

NaOH 0,01M, H₂O₂ al 3% p/v (10 vol.), indicador 4,4 combinado (rojo de metilo-azul de metileno) y H₃PO₄ al 85% (PanReac AppliChem ITW Reagents Co., EE. UU.).

3.2.4. Determinación aldehídos

PFBHA (*O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina) (Sigma-Aldrich Co., EEUU), agua Milli-Q[®] provista con un sistema Millipore Q-Pod Millipore y resina LiChrolut[®] EN (40-120 μ m) (Merck Millipore Corp., Alemania), NaHCO₃ (PanReac AppliChem ITW Reagents Co., EEUU), etanol absoluto calidad LiChrosolv HPLC, metanol (99,8%) y diclorometano (99,8%) calidad Distol Pesticide Residue Grade y n-hexano calidad Organic Trace Analysis (Fisher Scientific Inc, EEUU). 2-metilpropanal (isobutiraldehído) $\geq 99\%$, 2-metilbutanal $\geq 95\%$, 3-metilbutanal $\geq 95\%$, fenilacetaldehído $\geq 95\%$ y 3-(metiltio)propionaldehído (metional) $\geq 98\%$, 2-metilpentanal $\geq 98\%$, fenilacetaldehído-d₅ $\geq 95\%$, 3(metil-d₃-tio) propionaldehído (metional-d₃) $\geq 90\%$. (Eptes Sàrl, Suiza).

3.3. Disoluciones de trabajo

Tanto para la preparación del vino sintético como para las diferentes condiciones experimentales, se prepararon diferentes disoluciones madre que pueden consultarse en la Tabla I.

Compuestos vino sintético	Concentración (g/L)	Aminoácido	Concentración (g/L)
FeCl ₂ 4H ₂ O	2,82	Met [aaS]	30,00
MnCl ₂ 4H ₂ O	3,08	Phen [aaS]	33,00
Cu(SO ₄) 5H ₂ O	2,49	Iso [aaS]	26,00
4-metilcatecol	12,60	Leu [aaS]	26,00
		Val [aaS]	23,00
		Ala	35,22
		Gly	29,94
		Tyr	36,10
		Ser	20,84
		Thr	23,69
		Glu	29,09
		Asp	26,84

Tabla I. Concentraciones de las distintas especies empleadas a lo largo de las experiencias, [aaS]: aminoácido precursor de AS.

3.3.1. Experiencia I: Cribado de aminoácidos sacrificiales en vino sintético

Se comenzó con una disolución hidroalcohólica (12% v/v) con metales (5 ppm de Fe(II), 0,2 ppm de Cu(II) y 0,2 ppm de Mn(II)) y 5 g/L de ácido tartárico, a la que se le añadieron los diferentes aaS para que quedasen en una concentración 0,2 mM cada uno y 4-metilcatecol en una concentración 2mM. Este vino sintético base sirvió de control y además se separó en diferentes alícuotas. Cada una de ellas se corresponde con el dopado de un aminoácido sacrificial diferente (Ala, Gly, Tyr, Ser, Thr, Glu y Asp), todos a concentración 2 mM, para finalmente realizar un ajuste del pH a 3,5 empleando para ello NaOH 2M.

3.3.2. Experiencia II: Evaluación de Gly, Tyr, Thr y Asp, como aminoácidos sacrificiales, en matriz de vino tinto

Este segundo ensayo parte del cribado realizado previamente, por lo que se emplean Gly, Tyr, Thr y Asp como aminoácidos sacrificiales. Además, en lugar de utilizar una disolución sintética se pasó a emplear un vino tinto como una mejor aproximación a una matriz real, aunque de nuevo fue fortificada con metales y aaS para forzar las reacciones. En este caso, el procedimiento de preparación y las concentraciones añadidas fue similar al empleado en la experiencia I, a diferencia de que no se añadió 4-metilcatecol, debido a la presencia natural en suficiente concentración de fenoles en el vino.

3.3.3. Experiencia III: Evaluación del impacto de la concentración de Tyr y Asp como aminoácidos sacrificiales

Finalmente, en el último ensayo se emplearon concentraciones variables de Tyr y Asp (1, 2 y 4 mM) en el mismo vino tinto que en la experiencia anterior, para así estudiar el efecto de la concentración de aminoácido sacrificial en la inhibición de la degradación de Strecker. La preparación de las disoluciones fue similar a las anteriores experiencias, incluyendo la adición de metales y los aaS.

3.4. Determinación de SO₂ total a través del método Rankine

En enología, se define como dióxido de azufre total a las especies libres SO₂, H₂SO₃, HSO₃⁻ y SO₃⁻², y a los aductos de la especie HSO₃⁻ con compuestos carbonílicos del vino. El método descrito por Rankine (Rankine & Pocock, 1970) y recomendado por la OIV (OIV,2009) se basa en la aspiración con una corriente de aire del SO₂ libre que se encuentra en la muestra acidificada y calentada. Dicho SO₂ se oxida con una disolución de H₂O₂ contenida en un matraz corazón (Ilustración VI) para generar H₂SO₄ que posteriormente será valorado frente a NaOH 0,01M. El indicador empleado para esta reacción el rojo de metilo-azul de metileno, apreciándose el viraje de morado a verde.

Este procedimiento con el montaje que aparece en la ilustración VI se llevó a cabo en la tercera experiencia con vino comercial, para considerar el nivel de SO₂ total en la dosis de O₂ aplicada en la oxidación.



Ilustración VI. Imagen esquemática del montaje para llevar a cabo el método Rankine.

3.5. Procedimiento de oxidación acelerada

Con el fin de introducir una cantidad conocida de oxígeno, se caracterizó tanto el volumen de los viales empleados como la densidad de los vinos. De esta manera, a través de la pesada del volumen dispuesto en cada recipiente es posible conocer el volumen del espacio de cabeza para cada alícuota y conociendo el nivel de O_2 atmosférico (21% v/v) es posible determinar la dosis de éste. Para las dos primeras experiencias la dosis de O_2 fue de 20 mg/L

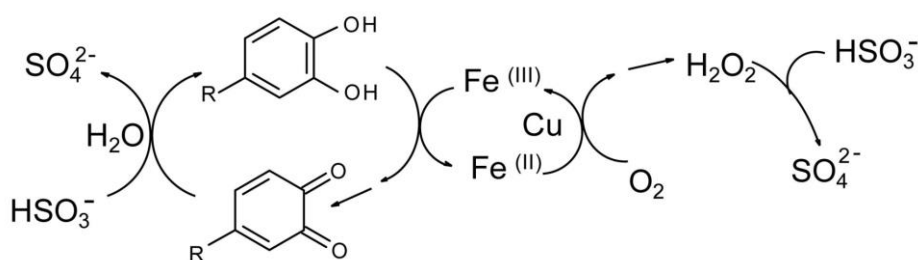


Ilustración VII. Oxidación de fenoles en vino con presencia de sulfitos.

Para la experiencia III, se considera la presencia de sulfitos en el vino, por lo que, teniendo en cuenta a través del ciclo de Fenton (Ilustración VII), que la estequiometría de la reacción es de 2 moles de SO_2 por cada mol de O_2 consumido durante el periodo de oxidación, la concentración de O_2 será de 35 mg/L sobre el necesario para consumir el SO_2 estequiométrico.

En todos los experimentos, cada condición se preparó por duplicado. Las muestras fueron dispuestas en viales estancos y se mantuvieron a una temperatura de 35 °C en agitación horizontal constante a lo largo de 15 días. Durante este periodo, se realizó un seguimiento del O_2 disuelto utilizando un sensor de O_2 Pst3 (Nomacorc S.A., Thimister-Clermont, Bélgica) que se empleará para el cálculo del consumo total de cada muestra, y que en última instancia será aplicado para estimar la tasa de formación de cada aldehído por mg de O_2 consumido en cada condición (TF_{AS}).

3.6. Cuantificación de aldehídos de Strecker

3.6.1. Adición y equilibrado de estándares internos y derivatización

Los viales con las diferentes muestras se introdujeron a la cámara de anoxia (Jacomex, Francia), que garantiza unos niveles de O_2 inferiores a 1 mg/L en su atmósfera. Ahí, se tomaron 12 mL de cada uno, llevándolos a viales de 20 mL de espacio de cabeza (HS) de tapón roscado con septum, a estos se les añadieron 50 μ L de disolución de estándares internos: disolución en etanol conjunta de 20 mg/L de 2-metilpentanal (IS de 2-metilbutanal e isobutanal), 3-metilbutanal deuterado (IS de 3-metilbutanal), metional deuterado (IS de metional) y fenilacetaldehído deuterado (IS de fenilacetaldehído). Para la cuantificación, se empleó una metodología basada en el factor respuesta, donde a un pool de las muestras además de los estándares internos también se les añadió disolución dopada (disolución conjunta de 20 mg/L de isobutanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, metional y fenilacetaldehído). Una vez añadidas las disoluciones de estándares internos y de dopado los viales se sacaron de la cámara de anoxia y se llevaron a un horno a 50 °C durante 5 horas, favoreciendo el equilibrio entre los estándares internos de aldehídos añadidos con los compuestos de la matriz. Transcurridas las 5 horas se añadieron 360 μ L de disolución derivatizante (10 g/L de PFBHA en agua Milli-Q®) y se dejó reaccionar durante 12 horas para provocar la reacción de formación de oximas.

3.6.2. Extracción de oximas por extracción en fase sólida (SPE)

La SPE se realizó en cartuchos de 30 mg de resina polimérica Supelclean™ ENVITM-Chrom P de Supelco (Bellefonte, EE. UU.). Los cartuchos se acondicionaron con diclorometano, etanol y una disolución de etanol/agua a 12% (v/v) antes de añadir los 10 mL de cada una de las muestras tratadas según el apartado anterior. Una vez añadidas las muestras se utilizó una disolución de lavado al 1% de hidrogenocarbonato de sodio al 60% (v/v) de metanol en agua para poder eliminar los excesos de oximas de carbonilos mayoritarios y de ácidos. Después del secado de los cartuchos a vacío, las oximas se extrajeron empleando una elución de 1,2 mL de hexano.

3.6.3. Diagrama del proceso

De forma esquemática quedan reflejados en la Ilustración III los distintos pasos del método utilizado.

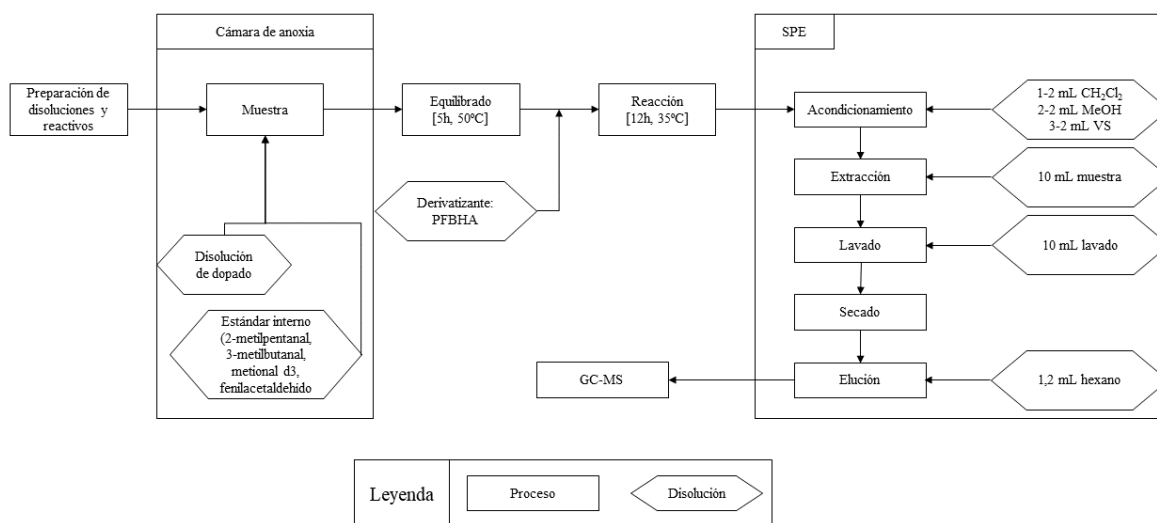


Ilustración VIII. Diagrama de flujo del proceso.

3.6.4. Análisis de oximas por GC-MS

Ventana (min)	Tiempo de retención (min)	Analitos	m/z cuantificación	m/z identificación
14,60-15,40	14,89	Isobutanal	250	195,239
	15,94	2-metilbutanal	239	165,253
	16,23	3-metilbutanal deuterado (pico1)	268	195,241
15,61-18,20	16,26	3-metilbutanal (pico1)	266	181,295
	16,47	3-metilbutanal deuterado (pico2)	268	195,241
	16,49	3-metilbutanal (pico2)	266	181,195
	16,83	2-metilpentanal	253	195,266
22,20-23,20	22,49	Metional deuterado	302	181,252
	22,52	Metional	299	181,252
24,00-25,00	24,2	Fenilacetaldehído deuterado	301	96,181
	24,23	Fenilacetaldehído	297	96,181

Tabla II. Ventanas de adquisición de iones seleccionados en GC-MS de las oximas de los aldehídos de Strecker y los estándares internos.

Se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas con un cuadrupolo (*Gas Chromatograph Mass Spectrometer, GCMS-QP-2010, Shimadzu*). La adquisición tuvo lugar en modo SIM según se indica en la tabla III. En el cromatógrafo de gases se empleó una columna DB-WAXetr 30 x 0,25 x 0,5, siendo estos parámetros de la longitud (m), diámetro interno (mm) y espesor de fase (μm) respectivamente. Se empleó una presión de 68.8 kPa y el gas portador fue Helio. En el horno se fijó una temperatura de 40°C durante 4 minutos y después se hizo una rampa de 10 °C / min hasta alcanzar los 250 °C. El inyector empleado fue automático (SPL1 Split/Splitless Shimadzu AOC-5000) trabajando en modo *Splitless*, a una temperatura de 250 °C y con un volumen de inyección de 3 μL. alcanzar los 250 °C.

3.6.5. Cuantificación de las oximas

Como se menciona anteriormente, la cuantificación emplea una metodología de factor respuesta, en la que inicialmente se calcularon las áreas relativas (A_{rel}^{α}) de cada analito, aplicando la ecuación 1:

$$A_{rel}^{\alpha} = \frac{A_i^{\alpha}}{A_{IS(i)}^{\alpha}} \quad (1)$$

Siendo A_i^{α} el área absoluta del analito i de la muestra α y $A_{IS(i)}^{\alpha}$ el área absoluta del pico del estándar interno del analito i en la muestra α . Después se calcularon los factores de respuesta de cada analito según la ecuación 2:

$$FR_i = \frac{C_i^{DOP} - C_i^{SDOP}}{A_{rel}^{DOP} - A_{rel}^{SDOP}} = \frac{C_{ad}}{A_{rel}^{DOP} - A_{rel}^{SDOP}} \quad (2)$$

Siendo A_{rel}^{DOP} el área relativa de cada analito en el ensayo dopado (VS-D) y C_i^{DOP} su concentración, A_{rel}^{SDOP} es el área relativa del ensayo sin dopar (VS-SD) y C_i^{SDOP} su concentración, la cual será 0 ya que no contenía disolución de dopado, de modo que la diferencia de estas concentraciones ($C_i^{DOP} - C_i^{SDOP}$) corresponde a la concentración adicionada (C_{ad}). Podremos saber para cada analito la relación entre concentración y área relativa. Finalmente, al aplicarlo a las áreas relativas de cada muestra podremos determinar su concentración aplicando la ecuación 3.

$$C_i^\alpha = FR_i \cdot A_{rel}^\alpha \quad (3)$$

3.7. Análisis de datos

Los datos de consumo de oxígeno, concentración total y TF_{AS} fueron tratados siguiendo un análisis de varianza (ANOVA) de un factor (condición como variable cualitativa y concentración/ TF_{AS} como cuantitativa) o de dos factores en el caso de la 3ª experiencia (Tyr/Asp y dosis como variables cualitativas y concentración/tasa como cuantitativas). Además, con el fin de identificar los subgrupos significativamente diferentes, se realizó la prueba post-hoc de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) de Fisher. Todo ello a través del programa XLSTAT (versión 2014; Addinsoft, NY, EE. UU.).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido al papel en el detrimento de la calidad sensorial del vino y en el acortamiento de su vida útil, se persigue con estos ensayos la posibilidad de impedir la formación de AS en el mayor grado posible. Para eso se ha pensado en aminoácidos que compitan con los aminoácidos de Strecker en su reacción con los compuestos dicarbonílicos del vino. Se ha trabajado en vino sintético con 4-metilcatecol y en vino tinto real, ambos con un suplemento de aaS y metales.

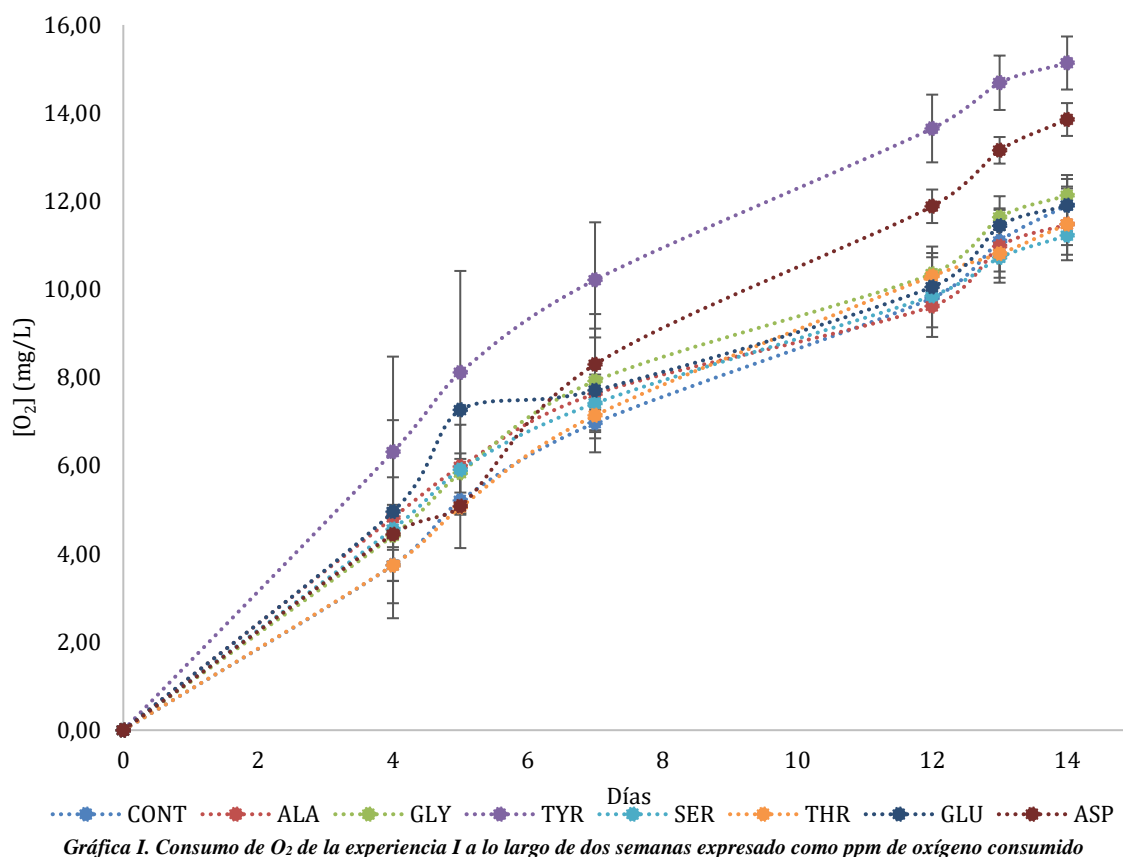
Tras la cuantificación de los AS generados con la presencia de los aminoácidos sacrificiales, el tratamiento de estos datos sigue un doble enfoque, concentraciones totales de isobutanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, metional y fenilacetaldehído y la tasa de formación de cada uno de ellos por mg de O_2 consumido a lo largo de la oxidación de 15 días.

4.1. Experiencia I

En esta experiencia se consideraron inicialmente como aminoácidos sacrificiales aquellos que pudieran reaccionar con dicarbonilos a través de la degradación de Strecker sin generar aldehídos sensorialmente activos. Se eligieron Ser, Ala, Thr, Glu, Tyr, Asp y Gly.

Haciendo el seguimiento del O_2 disuelto a lo largo de las dos semanas, y calculando el consumido (Gráfica I) queda evidenciado que para los ensayos Tyr y Asp tenemos un consumo mayor (15,14 y 13,85 mg/L respectivamente frente a los 11,69 mg/L que ha consumido de media el resto) en comparación a los demás desde que se empezaron a tomar datos para Tyr y a partir del día 8 para el Asp. Esto se puede deber a las condiciones en las que se encontraban estos aminoácidos ya que para disolverlos se necesitó aumentar el pH, aunque se controló el mismo en las muestras finales (pH=3,5).

Está demostrado que dentro del rango de pHs de los vinos, a pHs más altos se consume más rápido el oxígeno y se forman más aldehídos de Strecker que a pH más bajos, esto es debido a que los polifenoles que forman parte de la reacción de la degradación de Strecker se van a encontrar desprotonados en mayor cantidad, dando lugar a una velocidad de reacción superior.¹²



Ensayo	Isobutanal	2-Metilbutanal	3-Metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Control	100,55 ± 0,00 ^C	143,88 ± 0,00 ^C	214,00 ± 0,00 ^C	337,65 ± 0,00 ^C	405,69 ± 0,05 ^A
SER	98,61 ± 1,99 ^C	138,86 ± 2,65 ^C	198,01 ± 2,24 ^C	316,30 ± 4,12 ^C	386,15 ± 37,34 ^A
ALA	101,18 ± 6,32 ^C	140,81 ± 0,48 ^C	210,04 ± 5,03 ^C	328,21 ± 3,65 ^C	347,95 ± 27,07 ^A
THR	86,78 ± 0,10 ^C	124,61 ± 0,04 ^C	196,27 ± 0,36 ^C	302,24 ± 1,17 ^C	388,15 ± 63,76 ^A
GLU	102,02 ± 16,66 ^C	133,98 ± 10,32 ^C	195,69 ± 12,79 ^{BC}	308,50 ± 24,35 ^{BC}	363,23 ± 32,51 ^A
TYR	133,31 ± 30,64 ^B	203,12 ± 34,56 ^B	256,87 ± 30,09 ^B	399,99 ± 51,84 ^B	337,71 ± 47,01 ^A
ASP	195,81 ± 20,46 ^A	273,39 ± 20,38 ^A	330,56 ± 4,90 ^A	528,97 ± 6,24 ^A	390,44 ± 32,93 ^A
GLY	107,80 ± 0,00 ^C	144,69 ± 0,00 ^C	199,18 ± 0,00 ^C	315,18 ± 0,00 ^C	347,89 ± 0,04 ^A
p	0,002	0,001	0,001	0,001	0,802

Tabla III. Concentración expresada en µg/L de los aldehídos de Strecker en función del ensayo realizado, incertidumbre expresada como ± sd, las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) (test ANOVA-Fisher) entre las muestras con la misma cantidad de precursores de Strecker.

Ensayo	Consumo O ₂	Isobutanal	2-Metilbutanal	3-Metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Control	11,91 ± 0,69 ^B	13,64 ± 0,70 ^B	19,89 ± 1,50 ^B	29,64 ± 2,24 ^{AB}	46,69 ± 3,51 ^{AB}	56,09 ± 4,22 ^A
SER	11,22 ± 0,22 ^B	13,81 ± 0,82 ^B	19,44 ± 1,14 ^B	27,72 ± 1,41 ^{ABCD}	44,28 ± 2,33 ^{ABCD}	53,95 ± 3,09 ^{AB}
ALA	11,48 ± 0,81 ^B	13,64 ± 0,06 ^B	19,02 ± 1,04 ^B	28,35 ± 0,97 ^{ABC}	44,32 ± 2,09 ^{ABC}	47,11 ± 6,39 ^{AB}
THR	11,48 ± 0,69 ^B	11,13 ± 1,01 ^B	15,98 ± 1,48 ^B	25,17 ± 2,36 ^{CD}	38,76 ± 3,42 ^{CD}	49,41 ± 3,59 ^{AB}
GLU	11,90 ± 0,60 ^B	13,64 ± 2,52 ^B	17,90 ± 1,77 ^B	26,13 ± 2,27 ^{BC}	41,21 ± 4,14 ^{BC}	48,43 ± 3,29 ^{AB}
TYR	15,14 ± 0,60 ^A	12,13 ± 3,05 ^B	18,51 ± 3,49 ^B	23,39 ± 3,17 ^D	36,43 ± 5,39 ^D	30,76 ± 4,85 ^D
ASP	13,85 ± 0,37 ^A	18,68 ± 2,23 ^A	26,08 ± 2,33 ^A	31,52 ± 0,93 ^A	50,44 ± 1,34 ^A	37,25 ± 3,69 ^{BCD}
GLY	12,13 ± 0,20 ^B	14,29 ± 0,11 ^B	19,18 ± 0,15 ^B	26,40 ± 0,21 ^{BCD}	41,77 ± 0,32 ^{BCD}	46,10 ± 0,36 ^{BC}
p	0,00002	0,053	0,019	0,047	0,039	0,003

Tabla IV. Tasa de formación expresada en µg aldehído/mg O₂ consumido en función del ensayo realizado, incertidumbre expresada como ±sd, las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) (test ANOVA-Fisher) entre las muestras con la misma cantidad

De la tabla IV se infiere que la acumulación absoluta de isobutanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal y metional es significativamente mayor que el control para Asp y Tyr (p<0,05). Por otro lado, el fenilacetaldehído sigue un comportamiento diferente, acumulándose de forma similar en todos los ensayos, sin apreciarse diferencias significativas (p>0,05).

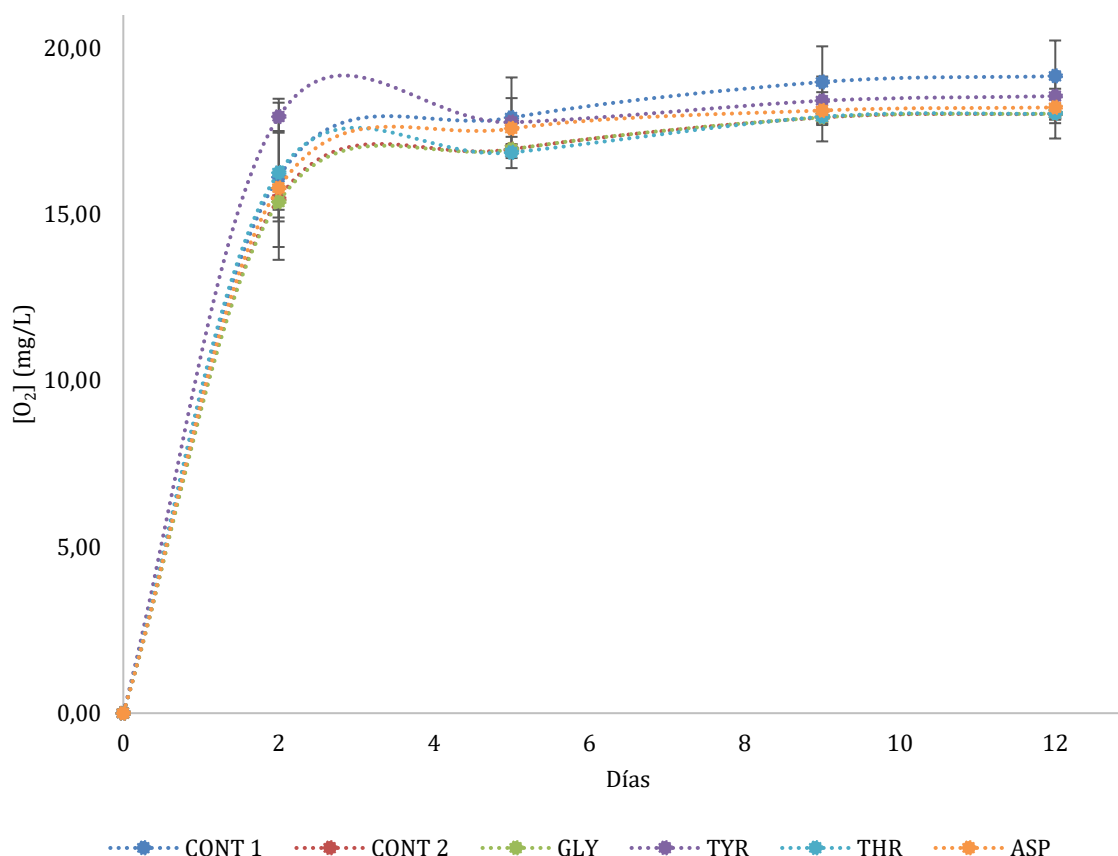
En las TF_{AS} se observan diferencias en función del aldehído formado. Por un lado, el ensayo Asp tiene una mayor TF_{AS} de isobutanal, 2-metilbutanal y metional. Sin embargo, y según estábamos buscando, la presencia de treonina y tirosina disminuye las TF_{AS} de 3-metilbutanal y metional con respecto al control. Lo mismo sucede para el fenilacetaldehído con la presencia de tirosina, ácido aspártico y glicina.

Viendo los resultados obtenidos en la experiencia 1, elegimos como aminoácidos sacrificiales aquellos que para algún aldehído de Strecker han proporcionado tasas de formación inferiores al control: glicina (Gly), tirosina (Tyr), treonina (Thr) y ácido aspártico (Asp).

4.2. Experiencia II

Los vinos tintos presentan mayor acumulación de aldehídos de Strecker que los blancos o rosados¹², por lo que la siguiente experiencia ya solo con 4 posibles aminoácidos sacrificiales se realizó en vino tinto. En esta experiencia se pusieron a oxidar 2 controles. El control 1 fue el vino tinto sin ninguna adición y el control 2 fue el vino suplementado con metales y aminoácidos de Strecker al igual que las pruebas con aminoácidos sacrificiales. Este último control fue el que se tuvo en cuenta para las comparaciones.

La dosis de O₂ aportada para la oxidación fue la misma que en el experimento 1, pero la velocidad de consumo fue mucho mayor debido a los polifenoles presentes en la muestra real. Haciendo un análisis del consumo de O₂ a lo largo de los trece días en los que se hizo un seguimiento de este, podemos ver en la gráfica II que nuevamente los ensayos Tyr y Asp presentan consumos de oxígeno aparentemente superior al de los demás. No obstante, los resultados de ANOVA nos indicaron que no existían diferencias significativas ($p > 0,05$) en el consumo total de oxígeno.



Gráfica II. Consumo de O₂ de la experiencia II a lo largo de trece días expresado como ppm de oxígeno consumido

Ensayo	Isobutanol	2-Metilbutanal	3-Metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Control 1	19,12 ± 1,24	5,62 ± 0,34	18,46 ± 0,50	1,93 ± 0,19	33,14 ± 2,11
Control 2	24,35 ± 0,29 ^A	12,28 ± 0,16 ^{AB}	33,76 ± 0,76 ^A	29,08 ± 0,25 ^A	192,37 ± 3,05 ^A
GLY	24,41 ± 0,62 ^A	13,02 ± 1,11 ^A	34,50 ± 3,33 ^A	29,70 ± 2,39 ^A	195,76 ± 24,75 ^A
TYR	19,82 ± 0,19 ^B	11,10 ± 0,77 ^B	34,97 ± 1,02 ^A	30,73 ± 1,70 ^A	192,65 ± 11,17 ^A
THR	23,40 ± 1,51 ^A	12,88 ± 0,71 ^{AB}	34,62 ± 1,06 ^A	31,38 ± 1,45 ^A	200,44 ± 9,80 ^A
ASP	20,63 ± 0,41 ^B	11,85 ± 0,51 ^{AB}	35,14 ± 1,51 ^A	32,03 ± 0,70 ^A	198,57 ± 2,23 ^A
p	0,005	0,185	0,941	0,386	0,955

Tabla V. Concentración expresada en µg/L de los aldehídos de Strecker en función del ensayo realizado, incertidumbre expresada como ± sd, las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) (test ANOVA-Fisher) entre las muestras con la misma cantidad de precursores de Strecker.

Ensayo	Consumo O ₂	Isobutanal	2-Metilbutanal	3-Metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Control 1	19,16 ± 1,07	1,39 ± 0,24	0,41 ± 0,07	1,35 ± 0,18	0,14 ± 0,03	2,42 ± 0,40
Control 2	18,03 ± 0,17 ^A	1,94 ± 0,07 ^A	0,98 ± 0,04 ^{AB}	2,68 ± 0,01 ^A	2,31 ± 0,04 ^B	15,29 ± 0,14 ^B
GLY	18,03 ± 0,14 ^A	1,94 ± 0,03 ^A	1,03 ± 0,08 ^A	2,73 ± 0,23 ^A	2,35 ± 0,16 ^B	15,51 ± 1,79 ^B
TYR	18,56 ± 0,69 ^A	1,45 ± 0,08 ^B	0,81 ± 0,02 ^C	2,56 ± 0,05 ^A	2,25 ± 0,02 ^B	14,08 ± 0,14 ^B
THR	18,03 ± 0,75 ^A	1,95 ± 0,01 ^A	1,07 ± 0,01 ^A	2,88 ± 0,09 ^A	2,61 ± 0,04 ^A	16,69 ± 0,20 ^A
ASP	18,22 ± 0,01 ^A	1,58 ± 0,04 ^B	0,91 ± 0,04 ^{BC}	2,69 ± 0,13 ^A	2,45 ± 0,06 ^{AB}	15,19 ± 0,23 ^{AB}
p	0,765	0,001	0,010	0,283	0,027	0,168

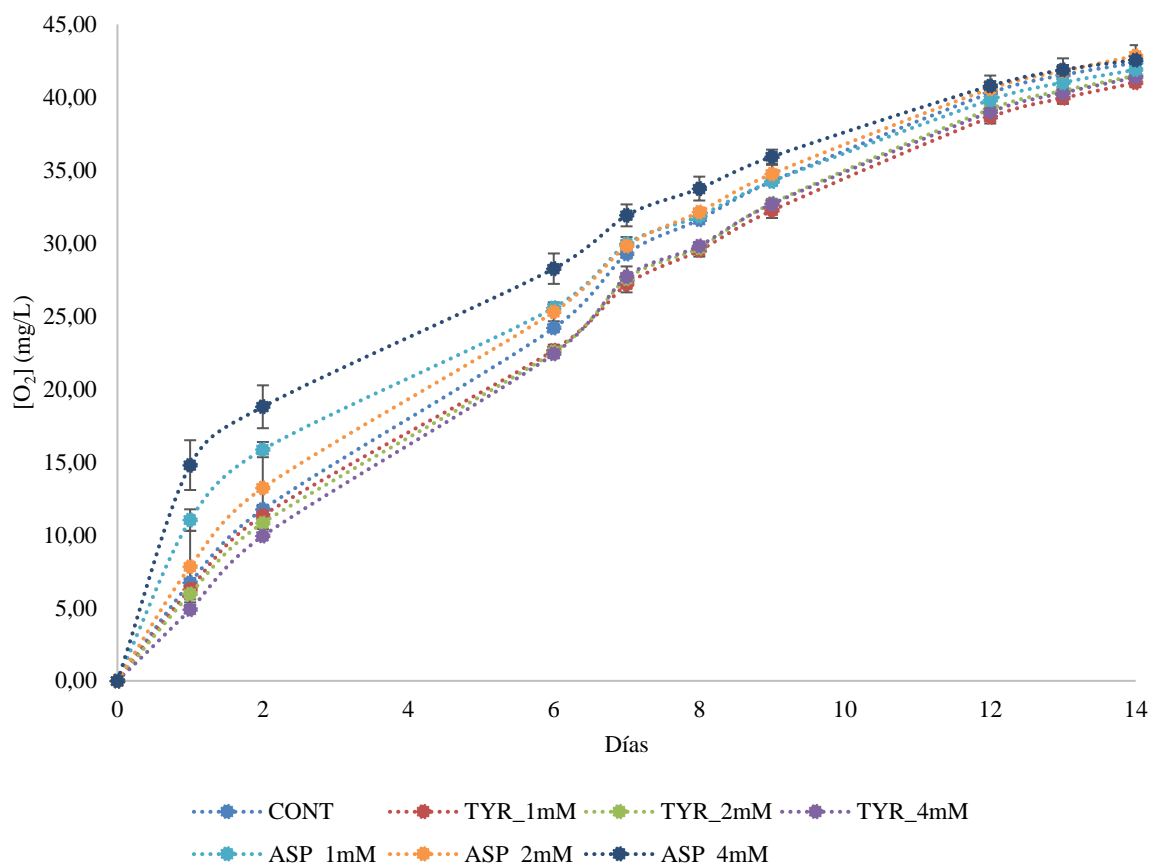
Tabla VI. Tasa de formación expresada en µg aldehído/mg O₂ consumido en función del ensayo realizado, incertidumbre expresada como ±sd, las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) (test ANOVA-Fisher) entre las muestras con la misma cantidad de aaS.

En cuanto a la acumulación de aldehídos puede apreciarse en la tabla V que esta se incrementa en todos los casos con el dopado de precursores. Por eso el ANOVA se realizó entre las muestras con las mismas condiciones en cuanto a concentración de aaS. Solo hay diferencias significativas para el isobutanal cuando se añade tirosina y ácido aspártico, acumulando menos que el control.

En cuanto a las tasas de acumulación (Tabla VI), apreciar que estas son mucho menores que las obtenidas en vino sintético. Para el 2-metilbutanal llegan a ser únicamente un 1 por mil en masa del oxígeno consumido, siendo más de un orden de magnitud superiores cuando el medio es más sencillo (disolución hidroalcohólica, con ácido tartárico y 4-metilcatecol). A la vista de los ensayos realizados con aminoácidos sacrificiales, se aprecia que para isobutanal, 2-metilbutanal y metional hay diferencias significativas (p<0,05), pero solo se obtienen tasas de formación inferiores al control para los dos primeros cuando se dopa con tirosina y ácido aspártico.

4.3. Experiencia III

En base a los resultados obtenidos de la experiencia II se probó con diferentes concentraciones (1, 2 y 4 mM) de los aminoácidos seleccionados (Tyr y Asp). Se trabajó con el mismo vino tinto y solo se utilizó el vino dopado con metales y precursores de Strecker como control. Se tuvo en cuenta el O₂ consumido en la oxidación de SO₂ total (56 mg/L) y por lo tanto se dejó un HS correspondiente a 35 mg/L de O₂ más el necesario para el consumo del SO₂ total.



Gráfica III. Consumo de O₂ de la experiencia II a lo largo de trece días expresado como ppm de oxígeno consumido.

En cuanto al consumo de O₂ parece que inicialmente las muestras dopadas con ácido aspártico consumen más rápidamente el O₂ (Gráfica III). A los 2 días, la muestra Asp 4 mM ha consumido 18,79 mg/L de O₂, mientras que Tyr 4mM ha consumido 9,93 mg/L. Pero en cuanto a oxígeno consumido total apenas hay diferencias entre las 7 muestras, aunque en la Tabla VIII aparece como significativo ($p = 0,038$) por la baja desviación de las medidas.

Ensayo	Isobutanal	2-Metilbutanal	3-Metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Control	63,66 ± 2,65 ^A	61,39 ± 2,96 ^A	100,60 ± 3,47 ^A	100,80 ± 3,78 ^A	163,06 ± 7,46 ^A
TYR 1mM	62,83 ± 1,49 ^A	58,31 ± 1,29 ^A	92,63 ± 0,83 ^B	91,13 ± 1,10 ^B	147,76 ± 0,47 ^B
TYR 2mM	64,46 ± 3,15 ^A	58,66 ± 0,80 ^A	90,99 ± 1,11 ^B	90,12 ± 1,43 ^B	143,74 ± 2,72 ^B
TYR 4mM	63,28 ± 0,47 ^A	57,24 ± 1,11 ^A	90,09 ± 3,32 ^B	87,07 ± 3,06 ^B	138,08 ± 5,06 ^B
ASP 1mM	66,48 ± 4,11 ^A	58,75 ± 1,76 ^A	92,44 ± 1,80 ^B	89,56 ± 0,46 ^B	146,61 ± 1,20 ^B
ASP 2mM	68,72 ± 2,08 ^A	61,40 ± 3,66 ^A	92,24 ± 4,87 ^B	90,99 ± 6,44 ^B	146,80 ± 8,77 ^B
ASP 4mM	65,77 ± 2,19 ^A	59,03 ± 2,00 ^A	91,62 ± 3,06 ^B	90,91 ± 3,52 ^B	144,50 ± 6,07 ^B
p	0,346	0,469	0,103	0,075	0,045

Tabla VII. Concentración expresada en µg/L de los aldehídos de Strecker en función del ensayo realizado, incertidumbre expresada como ± sd, las diferentes letras en las mismas columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) (test ANOVA-Fisher) entre las muestras con la misma cantidad de precursores de Strecker.

Ensayo	Consumo O ₂	Isobutanal	2-Metilbutanal	3-Metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Control	42,37 ± 0,18 ^{AB}	1,30 ± 0,05 ^A	1,25 ± 0,06 ^A	2,05 ± 0,07 ^A	2,05 ± 0,07 ^A	3,32 ± 0,14 ^A
TYR 1mM	40,99 ± 0,31 ^C	1,28 ± 0,02 ^A	1,19 ± 0,02 ^A	1,89 ± 0,01 ^B	1,86 ± 0,01 ^B	3,02 ± 0,01 ^B
TYR 2mM	41,49 ± 0,06 ^{BC}	1,31 ± 0,07 ^A	1,19 ± 0,02 ^A	1,85 ± 0,02 ^B	1,83 ± 0,03 ^B	2,93 ± 0,06 ^B
TYR 4mM	41,37 ± 0,16 ^{BC}	1,29 ± 0,01 ^A	1,17 ± 0,02 ^A	1,84 ± 0,07 ^B	1,78 ± 0,06 ^B	2,82 ± 0,10 ^B
ASP 1mM	41,89 ± 0,01 ^C	1,36 ± 0,09 ^A	1,20 ± 0,04 ^A	1,88 ± 0,03 ^B	1,83 ± 0,01 ^B	2,99 ± 0,01 ^B
ASP 2mM	42,84 ± 0,74 ^A	1,40 ± 0,04 ^A	1,25 ± 0,07 ^A	1,88 ± 0,03 ^B	1,85 ± 0,12 ^B	2,99 ± 0,16 ^B
ASP 4mM	42,56 ± 0,30 ^{BC}	1,35 ± 0,04 ^A	1,21 ± 0,04 ^A	1,88 ± 0,06 ^B	1,86 ± 0,07 ^B	2,96 ± 0,12 ^B
p	0,038	0,359	0,477	0,088	0,065	0,040

Tabla VIII. Tasa de formación expresada en µg aldehído/mg O₂ consumido en función del ensayo realizado, incertidumbre expresada como ±sd, las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) (test ANOVA-Fisher) entre las muestras con la misma cantidad de precursores de Strecker

Según se ve en la tabla VII, las muestras con los aminoácidos sacrificiales (Tyr y Asp) independientemente de su concentración, acumulan menor cantidad (más de un 10% inferior) de 3-metilbutanal, metional y fenilacetaldehído; siendo este último aldehído el más afectado.

En cuanto a las TF_{AS} con respecto al O₂ consumido, se observa lo mismo para el 3-metilbutanal, metional y fenilacetaldehído, disminuyendo en este caso un 5% por la presencia de aminoácido sacrificial, independientemente de la concentración del mismo.

Se realizó un ANOVA de dos factores (aminoácido y concentración) para corroborar que no hay diferencias significativas ni en las tasas de formación, ni en las concentraciones absolutas de los AS, en función de si utilizamos un aminoácido u otro, o si cambiamos de concentración de los mismos.

5. CONCLUSIONES

Los aminoácidos Tyr y Asp podrían ser utilizados como aminoácidos sacrificiales para gestionar la acumulación de aldehídos de Strecker a concentraciones entre 1 y 4 mM.

El efecto de los aminoácidos sacrificiales se ha observado sobre todo en las TF_{AS}. En concentraciones absolutas, los descensos observados con la adición de aminoácidos sacrificiales con respecto al control apenas han sido significativos.

Las experiencias han sido realizadas en vino sintético y vino tinto dopados con metales y aaS. Faltaría corroborarlo en diferentes tipos de vinos en condiciones totalmente reales.

6. Referencias

- (1) de Calvo, O. L. Fisiología Del Olfato. In *Fisiología humana*, 4e; Fernández-Tresguerres, J. A., Ruiz, C. A., Cachafeiro, V., Cardinali, D. P., Escriche, E. E., Gil-Loyzaga, P. E., Juliá, V. L., Teruel, F. M., Pardo, M. R., Menéndez, J. T., Eds.; McGraw-Hill Education: New York, NY, **2016**.
- (2) Ferreira González, V. *La base química del aroma del vino: un viaje analítico desde las moléculas hasta las sensaciones olfato-gustativas. Parte 1: efecto del alcohol y el buffer aromático*; **2009**; Vol. 6.
- (3) Alford, K.; Campo-Velez, A.; Dorch, V. *Human anatomy lab manual malgosia wilk-blaszczak Mavs Open Press Arlington*; **2018**.
- (4) K. C. Nicolaou, Tamsyn Montagnon - *Molecules That Changed the World* (**2008**, Wiley-VCH).
- (5) Perestrelo, R.; Silva, C.; Gonçalves, C.; Castillo, M.; Câmara, J. S. An Approach of the Madeira Wine Chemistry. *Beverages*. MDPI AG March 1, **2020**, pp 1–25. <https://doi.org/10.3390/beverages6010012>.
- (6) Ferreira, V.; Lopez, R. The Actual and Potential Aroma of Winemaking Grapes. *Biomolecules*. MDPI AG December 1, **2019**. <https://doi.org/10.3390/biom9120818>.
- (7) Arias-Pérez, I.; Ontañón, I.; Ferreira, V.; Escudero, A. Maturation of Moristel in Different Vineyards: Amino Acid and Aroma Composition of Mistelles and Wines with Particular Emphasis in Strecker Aldehydes. *Foods* **2022**, *11* (7), 11–21. <https://doi.org/10.3390/foods11070958>.
- (8) Cejudo-Bastante, M. J.; Pérez-Coello, M. S.; Hermosín-Gutiérrez, I. Effect of Wine Micro-Oxygenation Treatment and Storage Period on Colour-Related Phenolics, Volatile Composition and Sensory Characteristics. *LWT - Food Science and Technology* **2011**, *44* (4), 866–874. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2010.10.015>.
- (9) Bueno, M.; Carrascón, V.; Ferreira, V. Release and Formation of Oxidation-Related Aldehydes during Wine Oxidation. *J Agric Food Chem* **2016**, *64* (3), 608–617. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04634>.
- (10) Guerrero, R. F.; Cantos-Villar, E. Demonstrating the Efficiency of Sulphur Dioxide Replacements in Wine: A Parameter Review. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd March 1, 2015, pp 27–43. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.004>.
- (11) De Azevedo, L. C.; Reis, M. M.; Motta, L. F.; Da Rocha, G. O.; Silva, L. A.; De Andrade, J. B. Evaluation of the Formation and Stability of Hydroxyalkylsulfonic Acids in Wines. *J Agric Food Chem* **2007**, *55* (21), 8670–8680. <https://doi.org/10.1021/jf0709653>.
- (12) Marrufo-Curtido, A.; Ferreira, V.; Escudero, A. Factors That Affect the Accumulation of Strecker Aldehydes in Standardized Wines: The Importance of PH in Oxidation. *Molecules* **2022**, *27* (10). <https://doi.org/10.3390/molecules27103056>.
- (13) Bueno, M.; Marrufo-Curtido, A.; Carrascón, V.; Fernández-Zurbano, P.; Escudero, A.; Ferreira, V. Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation. *Front Chem* **2018**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00020>.
- (14) Castejón-Musulén, O.; Manuel Aragón-Capone, A.; Ontañón, I.; Peña, C.; Ferreira, V.; Bueno, M. Accurate Quantitative Determination of the Total Amounts of Strecker Aldehydes Contained in Wine. Assessment of Their Presence in Table Wines. *Food Research International* **2022**, *162*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112125>.
- (15) Bueno, M.; Zapata, J.; Ferreira, V. Simultaneous Determination of Free and Bonded Forms of Odor-Active Carbonyls in Wine Using a Headspace Solid Phase

- Microextraction Strategy. *J Chromatogr A* **2014**, *1369*, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.004>.
- (16) Schmarr, H. G.; Potouridis, T.; Ganß, S.; Sang, W.; Köpp, B.; Bokuz, U.; Fischer, U. Analysis of Carbonyl Compounds via Headspace Solid-Phase Microextraction with on-Fiber Derivatization and Gas Chromatographic-Ion Trap Tandem Mass Spectrometric Determination of Their O-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)Oxime Derivatives. *Anal Chim Acta* **2008**, *617* (1–2), 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.002>.