



**Universidad**  
Zaragoza



## Trabajo Fin de Grado

Evaluación directa de fracciones purificadas de polisulfuros precursores de  $\text{H}_2\text{S}$  y metanotiol: reducción química y extracción en fase sólida.

Autor:

**Juan Carlos Serrano Cortés**

Directores:

**Vicente Ferreira González**

**Susana Ainsa Zazurca**

**Departamento de Química Analítica**

**Universidad de Zaragoza**

2024

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
1.1 VSCs Y DEFECTO DE REDUCCIÓN DEL VINO .....	5
1.2 FORMAS DE H <sub>2</sub> S Y MERCAPTANOS LIGEROS.....	5
1.3 ORIGEN DEL PROBLEMA .....	6
1.4 ESTRATEGIAS DE REMEDIACIÓN .....	7
1.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE PRECURSORES.....	8
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>9</b>
3.1 DISOLVENTES Y REACTIVOS.....	9
3.2 MUESTRAS ESTUDIADAS.....	9
3.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO .....	10
3.3.1 Análisis del SO <sub>2</sub> libre .....	10
3.3.2 Análisis del SO <sub>2</sub> total .....	11
3.3.3 Análisis de las formas totales (libres, complejas y oxidadas) .....	11
3.4 OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA REDUCCIÓN QUÍMICA DE LOS PRECURSORES OXIDADOS DEL H <sub>2</sub> S, MESH, ETSH Y DMS.....	11
3.4.1 Evaluación del papel del SO <sub>2</sub> como interferencia en la reducción química de los precursores oxidados del H <sub>2</sub> S y mercaptanos ligeros .....	12
3.5 ESTUDIO DEL AISLAMIENTO SEMIPREPARATIVO DE LOS PRECURSORES EN FASE REVERSA (C18).....	12
3.5.1 Optimización de las fases de elución .....	12
3.5.2 Estudio de metodologías para la eliminación del SO <sub>2</sub> de las muestras de vino .....	13
3.5.2.1 Eliminación mediante modificación del Rankine .....	14
3.5.2.2 Eliminación mediante acidulación + reposo + desalcoholización.....	14
3.5.2.3 Eliminación mediante trampa de NaOH.....	14
3.6 ESTUDIO DE LA ELIMINACIÓN DEL SO <sub>2</sub> Y DEL FRACCIONAMIENTO DE PRECURSORES OXIDADOS MEDIANTE EL USO DE RESINAS DE INTERCAMBIO ANIÓNICO PURO. ....	15
3.6.1. Efecto del pH .....	15
3.6.2 Efecto del aumento del volumen de la resina .....	16
3.6.3 Efecto de la fuerza iónica y de elución.....	16
3.6.4 Efecto combinado del pH, la fuerza iónica y de elución .....	16
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y TRATAMIENTO DE DATOS.....	17
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>17</b>

<b>4.1. OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA REDUCCIÓN QUÍMICA DE LOS PRECURSORES OXIDADOS DEL H<sub>2</sub>S, MESH Y ETSH.....</b>	<b>17</b>
4.1.1 Evaluación del papel del SO <sub>2</sub> como interferencia en la reducción química de los precursores oxidados del H <sub>2</sub> S y mercaptanos ligeros.....	18
<b>4.2 ESTUDIO DEL AISLAMIENTO SEMIPREPARATIVO DE LOS PRECURSORES EN FASE REVERSA (C18).....</b>	<b>19</b>
4.2.1 Optimización de las fases de elución .....	19
4.2.2 Estudio de metodologías para la eliminación del SO <sub>2</sub> de las muestras de vino. ....	21
<b>4.3 ESTUDIO DE LA ELIMINACIÓN DEL SO<sub>2</sub> Y DEL FRACCIONAMIENTO DE PRECURSORES OXIDADOS MEDIANTE RESINAS DE INTERCAMBIO ANIÓNICO PURO.....</b>	<b>23</b>
4.3.1 Optimización de las fases de elución .....	23
4.3.1.1 Efecto del pH .....	23
4.3.1.2 Efecto del aumento del volumen de la resina .....	24
4.3.1.3 Efecto de la fuerza iónica y de elución. ....	25
4.3.1.4 Efecto combinado del pH, la fuerza iónica y de elución .....	26
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>27</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>28</b>

# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ALD: Acetaldehído

BR: “Brine” o salmuera

Cys: Cisteína

DMS: Dimetilsulfuro

EMS: Etil metil sulfuro

EtOH: Etanol

EtSH: Etanotiol

GC: Cromatografía gas

GSH: Glutación

H<sub>2</sub>S: Ácido sulfhídrico

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido sulfúrico

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: Ácido fosfórico

HCl: Ácido clorhídrico

HS: “headspace” o espacio de cabeza

HS-GC-SCD: análisis del espacio de cabeza por cromatografía gas acoplado a un detector específico de azufre

MeOH: Metanol

MeSH: Metanotiol

MMI: inyector multimodo

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: Disulfito de sodio

NaCl: Cloruro de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

SCD: Detector de quimioluminiscencia de azufre

SO<sub>2</sub>: Dióxido de azufre

SPME: “Solid phase microextraction” o microextracción en fase sólida

TCEP: Tris-(2-carboxietil) fosfina

VS: Vino sintético

VSCs: “Volatile sulfur compounds” o compuestos volátiles de azufre

VTR\_DA: Vino tinto con tendencia a reducirse vinificado con azufre micronizado en 2022 y sometido a desalcoholización

VTR22: Vino tinto con tendencia a reducirse vinificado con azufre micronizado en 2022

## RESUMEN

La presencia de compuestos azufrados volátiles (VSCs) en el vino, como el sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) el metanotiol ( $\text{MeSH}$ ) y otros mercaptanos, por encima de sus umbrales de olfacción provoca aromas desagradables que recuerdan a huevo podrido o a camembert pasado, entre otros. Este problema se conoce como defecto de reducción. Se origina a partir de la reducción espontánea de precursores oxidados de tipo di- o poli-sulfuro durante el almacenamiento anóxico del vino. En el presente trabajo se aborda la determinación de estos precursores tras su reducción química a  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{MeSH}$  y otros mercaptanos, mediante su análisis en el espacio de cabeza por cromatografía gas acoplado a un detector específico de azufre (HS-GC-SCD). Para ello, se optimizó un método de reducción química acelerado que reduce cuantitativa y eficientemente los precursores, pero, tras comprobarse que también reduce parcialmente el  $\text{SO}_2$ , tanto libre como combinado, a  $\text{H}_2\text{S}$ , se desarrollaron dos métodos complementarios de preparación de muestra mediante extracción en fase sólida. Ambos métodos permiten obtener dos fracciones de distinta polaridad de precursores oxidados, perfectamente separadas del  $\text{SO}_2$  y sus combinaciones. El primer método emplea resinas de fase reversa C18 y el segundo resinas de intercambio aniónico puro.

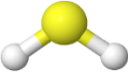
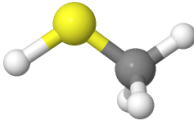
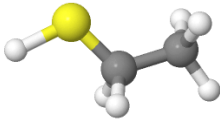
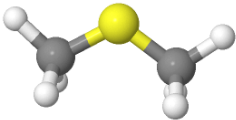
## ABSTRACT

The presence of volatile sulfur compounds (VSCs) in wine, such as hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ), methanethiol ( $\text{MeSH}$ ) and other mercaptans, above their olfactory thresholds causes unpleasant aromas like rotten egg or overmatured camembert, among others. This problem is known as reduction defect and originates from the spontaneous reduction of oxidized precursors of the di- and poly-sulfide types, during the anoxic storage of wine. The present work addresses the determination of these precursors after their chemical reduction to  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{MeSH}$  and other mercaptans, which are further analyzed by headspace gas chromatography coupled to a specific sulfur detector (HS-GC-SCD). To this end, an accelerated chemical reduction method that quantitatively and efficiently reduces the precursors, was optimized, but, after verifying that it also partially reduces  $\text{SO}_2$ , both free and combined, to  $\text{H}_2\text{S}$ , two complementary solid phase extraction sample preparation methods were developed. Both methods allow obtaining two fractions of different polarity of oxidized precursors, perfectly separated from  $\text{SO}_2$  and its combinations. The first method uses C18 reversed phase resins and the second uses pure anion exchange resins.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 VSCs Y DEFECTO DE REDUCCIÓN DEL VINO

Los compuestos volátiles azufrados (VSCs, por sus siglas en inglés) son un grupo de moléculas pequeñas y volátiles que tienen en su composición al menos un átomo de azufre<sup>1</sup>. El sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), el metanotiol (MeSH), el etanotiol (EtSH) y el dimetil sulfuro (DMS) son VSCs con un fuerte impacto en el aroma del vino porque tienen pesos moleculares y umbrales de olfacción bajos y elevada volatilidad. La acumulación excesiva de H<sub>2</sub>S, MeSH, EtSH y, eventualmente, otros mercaptanos, recibe el nombre de defecto de reducción. En la Tabla 1, se representan estos azufrados junto a su estructura, peso molecular, umbral de olfacción y descriptor olfativo.

<i>Tabla 1: Propiedades de los principales VSCs <sup>2</sup></i>				
Compuesto	Estructura	Peso molecular (g/mol)	Umbral de olfacción (µg/L)	Descriptor olfativo
Sulfuro de hidrógeno (H <sub>2</sub> S)		34.08	1	Huevos podridos
Metanotiol (MeSH)		48.11	2	Putrefacción
Etanotiol (EtSH)		62.13	1	Cebolla
Dimetil sulfuro (DMS)		62.13	25	Repollo, trufa

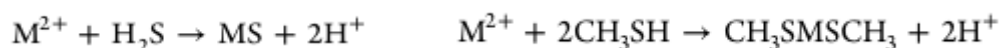
Muchas de estas moléculas son responsables de producir olores desagradables para los consumidores y su presencia constituye uno de los mayores problemas en varios sectores dentro de la industria alimenticia, incluida la industria vinícola. Se estima que son causantes del 30% de los defectos encontrados en los vinos comerciales<sup>3</sup>, lo cual se traduce en grandes pérdidas económicas y de imagen para las empresas productoras. En 2015, el defecto de reducción del vino tuvo una repercusión en el sector a nivel global de 28 mil millones de euros<sup>4</sup>. La presencia de estos compuestos, a partir de determinados niveles por encima de sus umbrales de olfacción, reduce drásticamente la calidad del vino y aumenta el rechazo de los consumidores hacia el producto. Por ello, hay un creciente interés en limitar o eliminar la producción de H<sub>2</sub>S y mantener la presencia de aquellos volátiles que aporten aromas agradables.

## 1.2 FORMAS DE H<sub>2</sub>S Y MERCAPTANOS LIGEROS

El H<sub>2</sub>S y los mercaptanos en el vino existen en especies agrupables en tres categorías diferentes continuamente interconectadas a través de equilibrios químicos: formas libres, formas acomplejadas con metales y formas oxidadas como polisulfuros. De todas las formas en las que

el H<sub>2</sub>S y los mercaptanos pueden encontrarse, únicamente las formas libres son las responsables de producir malos olores<sup>5</sup>.

Otra característica destacable es la capacidad del H<sub>2</sub>S y MeSH de formar complejos reversibles no volátiles con diversos iones metálicos de varios metales de transición<sup>5</sup>, tal y como se observa en la Figura 1. Los complejos se dan mayoritariamente con Fe(II), Cu(II), Cu(I) e incluso Zn(II)<sup>6</sup>.



*Figura 1. Reacción de las formas libres de H<sub>2</sub>S y MeSH con cationes metálicos dando lugar a las formas acomplejadas*

En cuanto a los polisulfuros, algunos de ellos actúan como precursores oxidados y son susceptibles de ser los causantes de la constante acumulación de H<sub>2</sub>S y mercaptanos durante el almacenamiento anóxico del vino. La existencia de estas especies también explica la ineficiencia de la mayoría de las técnicas de remediación, como la aireación y la formación de complejos con metales, que solo son eficaces para eliminar las formas libres. Estos precursores oxidados siguen siendo pobremente conocidos, aunque estudios recientes<sup>7,8</sup> sugieren que pueden tratarse de persulfuros (R-S<sub>n</sub>-SH), polisulfuros (R-S<sub>n</sub>-R) o politionatos derivados de los anteriores (R-S<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), siendo R habitualmente cisteína, glutatión o polipéptidos más complejos. Si bien estos compuestos no están ampliamente caracterizados, hay pruebas de que los vinos almacenados en anoxia son capaces de producir grandes cantidades de H<sub>2</sub>S y MeSH, como muestran los resultados obtenidos en los experimentos de la tesis doctoral de Susana Ainsa Zazurca, en actual desarrollo en el Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología. En el caso del H<sub>2</sub>S, a 35°C en 15 meses, cerca de 200 µg/L; a 50°C en 10 meses, más de 600 µg/L; y a 75°C tras 1 mes, hasta 2.3 mg/L. En cuanto al MeSH, a 35°C en 15 meses, más de 100 µg/L; a 50°C en 10 meses, cerca de 260 µg/L; y a 75°C tras 1 mes, alrededor de 180 µg/L. La Tabla 2 recoge todos los posibles precursores de H<sub>2</sub>S y mercaptanos que se han sido considerados hasta el momento.

**Tabla 2: Precursores con más posibilidades de causar la aparición de H<sub>2</sub>S y mercaptanos durante el almacenamiento anóxico del vino<sup>2</sup>**

Tipo de compuesto	Fórmula	Especie liberada
Complejos metálicos	[MS], [MSH] <sup>+</sup> , [MSCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ...	H <sub>2</sub> S y mercaptanos
Disulfuros	R-S-S-R'	Mercaptanos
Polisulfano	H-S <sub>n</sub> -H	H <sub>2</sub> S
Organopolisulfanos	R-S <sub>n</sub> -H	H <sub>2</sub> S y mercaptanos
Diorganopolisulfanos	R-S <sub>n</sub> -R'	H <sub>2</sub> S y mercaptanos
Politionatos	R-S <sub>n</sub> -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> S, SO <sub>2</sub> y mercaptanos

### 1.3 ORIGEN DEL PROBLEMA

El H<sub>2</sub>S juega un papel fundamental en el crecimiento y metabolismo de las levaduras empleadas en las fermentaciones alcohólicas, siendo un intermedio para la formación de aminoácidos azufrados como la cisteína (Cys), la metionina o el glutatión (GSH), un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina. La levadura *Saccharomyces Cerevisiae* puede sintetizar H<sub>2</sub>S a partir de fuentes de azufre inorgánico como son los sulfatos, sulfitos e incluso azufre elemental. Estas fuentes de azufre elemental son añadidas intencionalmente y desempeñan papeles muy importantes, por ejemplo, los sulfitos actúan como agente antioxidante y el azufre elemental es usado como fungicida en la viña.

Es necesario hacer mayor hincapié en la importancia y los efectos que tiene la presencia del dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) en los vinos. El SO<sub>2</sub> tiene un uso enológico ampliamente extendido ya que se trata tanto de un potente antioxidante como de un importante agente antimicrobiano. Puede encontrarse en concentraciones considerablemente altas, siendo el límite legal indicado por la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino) 150-200 mg/L para vinos secos<sup>4</sup>. Se ha sugerido que juega un papel importante en el desarrollo de olores desagradables causados por VSCs<sup>9</sup>, en vino, se encuentra disuelto como H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, en equilibrio con SO<sub>2</sub> gas (que se determina conjuntamente con el H<sub>2</sub>S libre<sup>10</sup>) y con la forma HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que es un poderoso nucleófilo que puede reaccionar con compuestos carbonílicos presentes en el vino como el acetaldehído (ALD) y el gliceraldehído formando hidroxisulfonatos<sup>11</sup>, tal y como se muestra en la Fig. 2

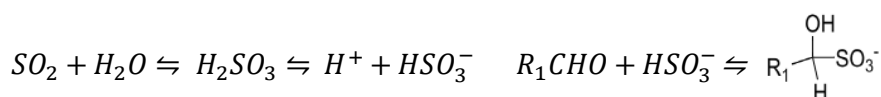


Figura 2. Equilibrio sulfitos-hidroxisulfonatos en la matriz del vino

Los VSCs se forman mayoritariamente durante los procesos de fermentación, durante la cual, una buena parte son evaporados, arrastrados por el CO<sub>2</sub> y otra parte se estabiliza bajo la forma de complejos con los metales o de formas oxidadas. Posteriormente, durante el almacenamiento anóxico del vino<sup>12</sup>, los VSCs pueden volver a acumularse como consecuencia de procesos de reducción que aún no son totalmente comprendidos<sup>29</sup>. En los últimos años, este hándicap se ha agravado debido al desarrollo tecnológico de itinerarios de vinificación y embotellado que minimizan el contacto del vino con el oxígeno. Por ejemplo, el uso de sistemas de cierre de rosca con septa impermeables minimiza la difusión del oxígeno hacia el interior de la botella. El almacenamiento anóxico de los vinos favorece el aumento del carácter reductivo, teniendo como consecuencia procesos redox que desencadenan la liberación sistemática de estos volátiles<sup>7,13</sup>. Todo este proceso conlleva una serie de lentas y continuas reacciones químicas no muy comprendidas entre las que podrían incluirse reacciones de tiólisis, sulfitólisis o tiosulfitólisis<sup>79</sup>. Como puede verse en las Fig. 3 y 4, la tiólisis (equivalente a la hidrólisis, pero empleando tioles en lugar de agua) produce la escisión de un compuesto por la acción de un grupo sulfhidrilo (R-SH) y es una reacción típica de varios procesos catabólicos. Por otro lado, la sulfitólisis y tiosulfitólisis consisten en la escisión de enlaces disulfuro (-S-S-) por reacción con sulfito y tiosulfito respectivamente a través de reacciones S<sub>N</sub>2

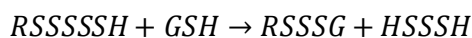


Figura 3. Reacción de tiólisis llevada a cabo por glutatión



Figura 4. Reacción de sulfitólisis de un disulfuro

## 1.4 ESTRATEGIAS DE REMEDIACIÓN

A lo largo de los años se han empleado diversas estrategias para eliminar los olores desagradables provocados por el H<sub>2</sub>S y los mercaptanos, entre las cuales una de las más utilizadas es la aireación-oxigenación. Este procedimiento tiene como objetivo el arrastre de los VSCs a la atmósfera con la propia corriente de aire, pero la oxidación de una proporción más o menos elevada a formas di y polisulfuro es difícilmente evitable, por lo que el problema puede reaparecer. Otra estrategia empleada para intentar deshacerse de los VSCs consiste en emplear iones de Cu, con los que estos compuestos forman sulfuros insolubles. Sin embargo, en el vino la interacción H<sub>2</sub>S - iones Cu es muy compleja, formándose complejos no volátiles<sup>5,14</sup>, que permanecen en el vino, por lo que con



el paso del tiempo, los compuestos responsables de los olores desagradables reaparecen. En resumen, ningún método de remediación garantiza la completa eliminación del problema, ya que tan solo transforman la fracción volátil odorífera, en fracciones inodoras que permanecen en el vino, por lo que, eventualmente, acabará provocándose la acumulación de  $H_2S$  y mercaptanos ligeros.

### 1.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE PRECURSORES

La complejidad de la matriz de trabajo y todos los posibles procesos químicos causantes de la liberación a largo plazo de  $H_2S$  y mercaptanos hacen que determinar el conjunto de precursores sea una tarea complicada. Hace algunos años, se propuso un ensayo combinando la adición de tris-(2-carboxietil) fosfina (TCEP) con la de batocuproina, un acomplejante de Cu(I), para la determinación de las formas precursoras, tanto de las oxidadas como de las acomplejadas con Cu(I)<sup>15</sup>. Sin embargo, experimentos recientes<sup>16</sup> han demostrado que la combinación de TCEP y batocuproína en las condiciones del ensayo propuesto, a temperatura ambiente y con análisis inmediato tras la adición del reactivo, no es capaz de reducir de manera instantánea todas las formas oxidadas, que, en vino blanco, tardan varios días en reducirse. En vino tinto, el reactivo pareció desactivarse enseguida, reduciéndose cantidades muy pequeñas de los precursores. Esto implica, que el ensayo propuesto no es válido para determinar los precursores oxidados de  $H_2S$  y MeSH en vinos.

La principal técnica analítica empleada para la determinación de los VSCs es la cromatografía de gases acoplada a detectores selectivos de azufre<sup>10</sup>. Uno de los más usados es el detector fotométrico de llama pulsada (pFPD, por sus siglas en inglés) debido a su alta sensibilidad y facilidad de uso, pero su rango de trabajo es bastante limitado. La otra opción más empleada es el detector de quimioluminiscencia del azufre (SCD), que cuenta con una sensibilidad similar a la del pFPD permitiendo rangos de trabajo de varias órdenes de magnitud. Ambos detectores son muy sensibles y no suelen exigir procesos de preconcentración de la muestra como la micro extracción en fase sólida (SPME).

Por las razones expuestas anteriormente, y pese a todas las técnicas desarrolladas para la detección de VSCs, no existe ningún procedimiento válido actualmente para la detección y caracterización de los precursores oxidados responsables de la progresiva producción de  $H_2S$  y mercaptanos. Este proceso es complicado incluso con técnicas directas como HPLC-MS. Si bien algunos autores han mostrado que es posible determinar algunos polisulfuros empleando esta estrategia<sup>17</sup>, difícilmente puede incluir todos aquellos polisulfuros que incluyan estructuras proteicas, cuya masa molecular excede de largo los rangos de masa/carga ( $m/z$ ) del detector; a no ser que se obtengan moléculas policargadas. Es además remarcable, que varios de los experimentos desarrollados hasta el momento con el objetivo de caracterizar químicamente la fracción de precursores<sup>18</sup> deducen su comportamiento a partir de patrones sintéticos como Cys-S-S-SH o G-S-S-SH, estructuras que podrían diferir de manera remarcable en propiedades de los polisulfuros asociados a las proteínas. Es por ello muy importante, desarrollar estrategias analíticas que permitan la cuantificación y caracterización química de las fracciones de precursores oxidados de  $H_2S$  y MeSH.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo es desarrollar un procedimiento para la evaluación de las fracciones de precursores oxidados de  $\text{H}_2\text{S}$  y MeSH presentes en los vinos.

Para ello se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Optimizar un método de reducción química rápida que permita transformar las formas oxidadas de  $\text{H}_2\text{S}$ , MeSH y, eventualmente, otros mercaptanos, para su subsiguiente determinación mediante análisis del espacio de cabeza por cromatografía gas acoplado a un detector específico de azufre (HS-GC-SCD).
2. Optimizar un método de fraccionamiento en fase sólida sobre sorbente C18 (fase reversa) para obtener fracciones de precursores de  $\text{H}_2\text{S}$  y MeSH perfectamente separadas del  $\text{SO}_2$  y sus aductos.
3. Optimizar un método de fraccionamiento en fase sólida en modo intercambio iónico puro para obtener fracciones de precursores de  $\text{H}_2\text{S}$  y MeSH perfectamente separadas del  $\text{SO}_2$  y sus aductos.

## 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 3.1 DISOLVENTES Y REACTIVOS.

El etanol (EtOH) y metanol (MeOH)  $\geq 99.9\%$  empleados fueron suministrados por Fisher Chemicals® (Barcelona, España). El agua ultrapura se obtuvo de un sistema de purificación de agua Milli-Q Millipore® (Bedford, Alemania).

En cuanto a los reactivos utilizados, el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )  $\geq 96\%$ , el ácido tartárico ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ )  $\geq 99\%$ , el ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ )  $\geq 99.7\%$ , el cloruro de sodio (NaCl)  $\geq 99.5\%$ , el hidróxido de sodio (NaOH)  $\geq 98\%$  y el disulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )  $\geq 97\%$  se adquirieron de PanReac®. El ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )  $\geq 85\%$  se obtuvo de VWR Chemicals®, el ácido clorhídrico (HCl)  $\geq 37\%$  de Scharlau® y la TCEP de Sigma-Aldrich®.

Además, se utilizaron las siguientes disoluciones:

- Salmuera: se disolvieron 350 g de NaCl en 1 L de agua Milli-Q y se agitó la mezcla en un baño sonicador adquirido de JP Selecta™ hasta disolver la mayor cantidad de sal posible. Se borboteó nitrógeno a través de una pipeta Pasteur de vidrio para purgar todo el oxígeno posible y, tras 15 minutos, se vertió 500 mg de ácido ascórbico. Por último, se dejó purgar 5 minutos más.
- Vino sintético (VS) que se preparó a partir de una disolución de agua Milli-Q con 12% de etanol (EtOH) a la que se añadió 5 g/L de ácido tartárico y se ajustó el pH a 3.5 empleando una disolución de hidróxido de sodio (NaOH).
- Agua tartárica: se disolvió 0.5 g de ácido tartárico en 100 mL de agua Milli-Q y se ajustó su pH a 3.5 mediante disoluciones de NaOH.

### 3.2 MUESTRAS ESTUDIADAS

Las muestras de estudio fueron vino sintético (VS) y un vino tinto con tendencia a reducirse, el cual se vinificó con azufre micronizado en 2022 (VTR22), cuya caracterización puede observarse en la Tabla 3:

<b>Tabla 3: Caracterización inicial del VTR22</b>	
<b>pH</b>	4.43
<b>Potencial redox (mV)</b>	-73.4

Además, se utilizó VTR22 desalcoholizado. El proceso de desalcoholización consistió en rotaevaporar (modelo R-215 de BÜCHI®) 200 mL de VTR22 a alto vacío (18 mbar) y 30°C hasta obtener un volumen entre la tercera y cuarta parte de su volumen original, unos 60 mL. Esta muestra desalcoholizada se denominó VTR\_DA.

Por otro lado, algunas muestras se doparon con cantidades variables de SO<sub>2</sub>, lo cual se llevó a cabo a partir del reactivo sólido Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, que en agua se disocia en dos moléculas de SO<sub>2</sub>:



Figura 5. Descomposición de disulfito de sodio para dar dos moléculas de SO<sub>2</sub>

### 3.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

El espacio de cabeza de las muestras se analizó mediante la técnica HS-GC-SCD, con un cromatógrafo Agilent 7890B, equipado con una columna capilar SPB-1 SULFUR (30 m x 0.32 mm de diámetro interno x 4 µm de espesor de fase), y la detección de los VSCs se realizó con el detector selectivo 8355 SCD. El equipo también cuenta con un muestreador automatizado Combi-PAL de CTC Analytics (Zwinger, Suiza). La inyección se llevó a cabo en un inyector multimodo (MMI) de Agilent con un “glass liner” de 1 mm de diámetro interno para la determinación de las formas libres de los compuestos, que requieren del empleo de una trampa de criofocalización (CTS 2, Gerstel); y de 4 mm para la evaluación de los BRs de los compuestos, cuyo método de análisis no emplea criofocalización. Ambos *glass liners* suministrados por Agilent.

#### 3.3.1 Análisis del SO<sub>2</sub> libre

En un vial encapsulable de SPME de 20 mL de capacidad, se añadieron 10.8 mL de agua Milli-Q acidulada a pH=1.2 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y 1.2 mL de muestra (dilución 1:10). El vial se encapsuló inmediatamente después realizando un cierre hermético mediante una chapa de aluminio con septum de Agilent®. Todo el proceso preparativo descrito se realizó dentro de una cámara anóxica fabricada por Jacomex®. Seguidamente, el vial se sacó de la cámara, se le añadió el patrón interno, 40 µL de disolución de etil metil sulfuro (EMS), a una concentración de 10 mg/L en etanol, y se colocó en el “tray” del muestreador automático del HS-GC-SCD.

El método cromatográfico comienza con la incubación del vial a 30°C durante 15 minutos. A continuación, la jeringa termostatzada a 40°C toma 1 mL del espacio de cabeza del vial y lo inyecta con un split 1:2 en el inyector cromatográfico. Este método emplea la criofocalización de la muestra mediante el uso de nitrógeno líquido. El programa de temperatura del horno cromatográfico es de 35°C durante 3.8 minutos y sube hasta 160°C a 10°C/min manteniendo esta temperatura 0.5 minutos. La unidad criogénica se encuentra a -150°C durante 0.8 minutos y luego se eleva rápidamente a 20°C/s hasta los 300°C. El gas portador es helio a un flujo de 2 mL/min durante los primeros 0.8 minutos y luego baja a 1.4 mL/min.

El quemador del SCD opera a una temperatura de 800°C, con un flujo de aire de 50 mL/min.

### 3.3.2 Análisis del SO<sub>2</sub> total

En un vial encapsulable de SPME de 10 mL de capacidad, se añadieron 1 mL de muestra y 0.5 mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) al 25%. Se encapsuló con una chapa magnética y se incubó a 160°C durante 15 minutos con el objetivo de liberar todo el SO<sub>2</sub> que se encuentre acompañado formando hidroxisulfonatos. Seguidamente, se dejó atemperar y se introdujo en la cámara de anoxia. En estas condiciones de bajo oxígeno, se preparó el vial de análisis (encapsulable de SPME de 20 mL) donde se añadieron 11 mL de agua Milli-Q acidulada a pH=1.2 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y 1 mL de la muestra previamente atemperada e introducida en cámara (dilución 1:12). El vial se chapó herméticamente justo después de prepararlo. Fuera de la cámara, se añadieron 40 µL de patrón interno, disolución de EMS (10 mg/L en etanol) a cada vial, el cual se cargó en el *tray* del muestreador automático.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con y sin criofocalización debido a una incidencia puntual con el Dewar de nitrógeno líquido, que nos obligó a prescindir de la criofocalización en varias ocasiones.

Las condiciones cromatográficas y del detector son idénticas al método del SO<sub>2</sub> libre.

### 3.3.3 Análisis de las formas totales (libres, complejas y oxidadas)

Para poder liberar los azufrados de sus uniones con metales se emplea salmuera, que aporta numerosos cloruros que interaccionan con las formas BRs, mientras que la reducción de las formas oxidadas se realiza mediante la adición de TCEP. Para garantizar que las reacciones se completan en tiempos razonables, las muestras se incuban a 70°C.

En un vial encapsulable de SPME de 20 mL se añadieron 30 mg de TCEP, 11.5 mL de salmuera y 0.5 mL de muestra (dilución 1:24). Se realizó un cierre hermético utilizando chapas de aluminio con septum justo después de preparar cada vial. Todo el proceso preparativo descrito se realizó dentro de la cámara anóxica. Fuera de cámara, se añadieron 40 µL de disolución de EMS (2 mg/L en etanol) como patrón interno al vial de análisis, el cual se cargó en el *tray*. A continuación, el método incubó cada muestra a 70°C durante 25 minutos. Tras este tiempo, la jeringa termostatzada a 80°C toma 1 mL del espacio de cabeza y lo inyecta con un split 1:15.

Las condiciones del cromatógrafo y del detector son las mismas a las descritas en los métodos anteriores, exceptuando que no se emplea la criofocalización de la muestra, que la temperatura inicial del horno se mantiene 3 minutos y que el flujo de helio en los primeros 0.8 minutos es de 0.9 mL/min.

Todos estos métodos empleados para realizar el análisis cromatográfico de las muestras fueron validados previamente<sup>16</sup>

## 3.4 OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA REDUCCIÓN QUÍMICA DE LOS PRECURSORES OXIDADOS DEL H<sub>2</sub>S, MESH, ETSH Y DMS

Se utilizó el método descrito en el apartado 3.3.3 para llevar a cabo la reducción química rápida de los precursores de los VSCs. Se estudió el tiempo óptimo de incubación de las muestras: 25, 50, 75 y 100 min. Se empleó como muestra VTR22.

Se hizo un duplicado para cada tiempo de estudio. El patrón interno se añadió a cada vial de análisis en los últimos 25 min de incubación de este, antes de la inyección cromatográfica. Para el primer tiempo de muestreo, el patrón se añadió antes de la incubación. Las muestras se

analizaron mediante HS-GC-SCD empleando una fuerte dilución de salmuera, empleada para determinar las formas BRs, para evaluar el contenido en  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{MeSH}$ ,  $\text{EtSH}$  y  $\text{DMS}$ .

### **3.4.1 Evaluación del papel del $\text{SO}_2$ como interferencia en la reducción química de los precursores oxidados del $\text{H}_2\text{S}$ y mercaptanos ligeros**

Se estudió la posibilidad de que el  $\text{SO}_2$  se comportara como una interferencia reduciéndose a  $\text{H}_2\text{S}$ , por lo que se prepararon los siguientes viales de SPME de 20 mL dentro de la cámara de anoxia:

1. 10 mL VTR22 como control
2. 10 mL VTR22 dopado con  $\text{SO}_2$  (20 ppm recién añadidos)
3. 10 mL VTR22 dopado con  $\text{SO}_2$  (50 ppm recién añadidos)
4. 10 mL VTR22 dopado con  $\text{SO}_2$  (20 ppm y 1 g/L de ALD añadidos una semana anterior y dejados reaccionar)
5. 10 mL VTR22 dopado con  $\text{SO}_2$  (50 ppm y 1 g/L de ALD añadidos una semana anterior y dejados reaccionar)

A cada una de estas condiciones se les aplicó el método descrito en el apartado 3.3.3, pero con el tiempo de incubación del vial de análisis optimizado en el apartado 3.4. Se realizó un duplicado de cada vial.

## **3.5 ESTUDIO DEL AISLAMIENTO SEMIPREPARATIVO DE LOS PRECURSORES EN FASE REVERSA (C18)**

Las moléculas que interfieren en la determinación del  $\text{H}_2\text{S}$  procedente de los precursores oxidados son formas de  $\text{SO}_2$ , tanto en sus formas libres ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_3$  y  $\text{HSO}_3^-$ ) como en su combinación con acetaldehído (1-hidroxietilsulfonato). Dado que todas ellas son moléculas pequeñas y polares con formas cargadas negativamente, han de ser pobremente retenidas en fases reversas. Puede suponerse que una buena parte de los precursores buscados serán menos polares, ya que las cadenas de polisulfuros son tanto menos polares cuanto mayor sea la cadena. Por ello, se emplearon lechos de extracción en fase sólida formados por cartuchos de 3 mL de volumen, rellenos con 500 mg de fase reversa C18 con un volumen muerto aproximado de 0.5 mL. El objetivo inicial fue retener los precursores, que presumimos menos polares que las formas de  $\text{SO}_2$ , y eluir éstas como interferencias. Los cartuchos se introdujeron en la cámara de anoxia 24h antes de su uso, lugar donde se realizaron los fraccionamientos.

Los cartuchos utilizados en los siguientes experimentos fueron acondicionados con 2 mL de MeOH para activar la resina y lavados con 2 mL de agua tartárica. Seguidamente, se aplicó presión positiva para secar ligeramente la resina. La carga de muestra fue de 0.5 mL.

### **3.5.1 Optimización de las fases de elución**

Se comenzó aplicando el fraccionamiento en la C18 a la muestra VTR\_DA, ya que se desalcoholizó previamente para facilitar la retención de las sustancias más polares. Una vez aplicado el volumen de 0.5 mL de vino desalcoholizado, se aplicaron eluciones sucesivas con volúmenes de 2 mL de mezclas de disolventes de fuerza creciente, tal y como se indica en la Tabla 4. Se recogieron volúmenes de 1 mL en viales de 1.5 mL de HPLC. Las fases empleadas tuvieron un pH de 3.5.

<b>Tabla 4: Primer método de elución en C18</b>				
Fases de elución				
	Agua tartárica	20% MeOH	50% MeOH	100% MeOH
Fracciones recogidas (mL)	1	1	1	1
	1	1	1	1

Con el objetivo de obtener una separación óptima, se realizó un segundo fraccionamiento para disminuir aún más el poder de elución de las primeras fases extraídas. Como no era posible emplear un eluyente con menor fuerza que el agua, se añadió a ésta un exceso de NaCl (250 g/L) ya que según el principio del efecto “*Salting out*”, la presencia de sales disminuye en gran medida el poder de solvatación del agua, favoreciendo la extracción a fases hidrofóbicas de las moléculas más polares.

Para ello, se empleó de nuevo la muestra VTR\_DA, preparándose 3 alícuotas de muestra: la primera el vino tan cual, como control (VC), a la segunda se le añadieron 30 ppm de SO<sub>2</sub> y a la tercera 30 ppm SO<sub>2</sub> y 1 g/L de ALD. Las alícuotas se incubaron a temperatura ambiente durante 6 días en la cámara de anoxia para asegurar que en la muestra con acetaldehído, todo el SO<sub>2</sub> está formando 1-hidroxietilsulfonato.

Para este fraccionamiento se emplearon solo dos fases de elución: agua tartárica con 250 g/L de NaCl y disolución 70% MeOH con la que se pretendía eluir todos los polisulfuros precursores de H<sub>2</sub>S que sí se retenían en mayor o menor medida en la fase estacionaria. Como se muestra en la Tabla 5, se utilizaron 2 mL de fase de agua tartárica con sal, de la que se obtuvieron 4 fracciones de 0.5 mL cada una, y 3 mL de disolución 70% MeOH, obteniendo 3 fracciones de 1 mL.

<b>Tabla 5: Segundo método de elución en C18</b>		
Fases de elución		
	Agua tartárica (250 g/L)	70% MeOH
Fracciones recogidas (mL)	0.5	1
	0.5	1
	0.5	1
	0.5	

En ambos fraccionamientos, las fracciones eluidas fueron analizadas según el método explicado en el apartado 3.3.3. con el tiempo de incubación optimizado en el apartado 3.4.

### 3.5.2 Estudio de metodologías para la eliminación del SO<sub>2</sub> de las muestras de vino

Se valoraron tres posibles técnicas para eliminar el SO<sub>2</sub>:

- Muy enérgica: mediante la purga de la muestra fuertemente acidulada y muy caliente con nitrógeno, siguiendo una modificación del método Rankine<sup>19</sup> empleado habitualmente para valorar cuantitativamente el SO<sub>2</sub>.
- Medianamente enérgica, mediante la acidulación de una alícuota de vino, que se dejó reposar varios días en anoxia para dejar que los hidroxisulfonatos se rompieran, tras lo cual la muestra fue sometida a desalcoholización en el rotavapor.
- Suave, simplemente almacenando el vino acidulado en un vial cerrado conteniendo una trampa de NaOH, en la que debería irse disolviendo el SO<sub>2</sub> liberado.

En todos los métodos planteados se llevaron las muestras del vino VTR22 hasta un pH considerablemente ácido, <2, para así desplazar los equilibrios y favorecer la liberación de SO<sub>2</sub> tal y como representa la Fig. 6.

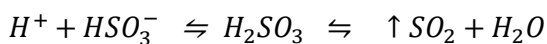


Figura 6. Equilibrio hidrogeno sulfitos-SO<sub>2</sub> libre

Las muestras así tratadas, fueron primero neutralizadas con NaOH 1M hasta llevarlas al su pH original, luego se dejaron reposar 2 días y, finalmente, se realizó el segundo fraccionamiento y tratamiento de muestra descrito en el apartado 3.5.1.

### 3.5.2.1 Eliminación mediante modificación del Rankine

Se tomaron 300 mL de VTR22 y se acidularon con ácido fosfórico concentrado hasta pH 1.3. Posteriormente, la muestra se calentó a 80°C durante 1 hora, con agitación magnética y borboteando nitrógeno. Se analizó por el método de análisis definido en el apartado 3.3.1.

Además, para asegurar una completa eliminación del SO<sub>2</sub> tras la aplicación del Rankine modificado, se llevó a cabo la desalcoholización de la muestra en el rotavapor hasta reducir su volumen a un cuarto del original. Se volvió a analizar por el mismo método (apartado 3.3.1).

### 3.5.2.2 Eliminación mediante acidulación + reposo + desalcoholización

Se barajó la posibilidad de emplear los siguientes ácidos: clorhídrico (HCl) o sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Ambos cuentan con un pKa lo suficientemente bajo como para alcanzar fácilmente un pH muy ácido sin utilizar un elevado volumen, algo que sí sucede con otros ácidos como el H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Sin embargo, cada uno de ellos podía presentar ciertas desventajas: el HCl es una sustancia muy volátil que podría causar daños en las columnas cromatográficas de los analizadores; y el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> podría ser una interferencia debido a su reducción a H<sub>2</sub>S en presencia de la TCEP. Se estudió el efecto de cada ácido mediante la preparación de estas 3 muestras:

- 0.5 mL de VTR22 + 11.5 mL salmuera + 30 mg TCEP
- 0.5 mL de VTR22 acidificado a pH 1.7 con HCl + 11.5 mL salmuera + 30 mg TCEP
- 0.5 mL de VTR22 acidificado a pH 1.7 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 11.5 mL salmuera + 30 mg TCEP

Se analizaron las muestras por el método descrito anteriormente en el apartado 3.3.3. Se hizo un duplicado para cada muestra.

Seguidamente, se llevó a cabo la eliminación del SO<sub>2</sub> mediante la acidulación de 200 mL de VTR22 hasta pH 1.2 empleando una disolución al 12% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, que se dejó reposar en condiciones de anoxia durante 4 días para conseguir la liberación de la mayor parte del SO<sub>2</sub> combinado posible. Seguidamente, se desalcoholizó la muestra en el rotavapor y se midió nuevamente el SO<sub>2</sub> libre restante (apartado 3.3.1) antes de llevar a cabo el segundo fraccionamiento en C18 que explica la Tabla 5.

### 3.5.2.3 Eliminación mediante trampa de NaOH

En un matraz redondo de 100 mL de fondo plano, se vertieron 80 mL de VTR22 acidulado hasta pH 1.2 con disolución 12% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En el interior del matraz se introdujo un vial de 20 mL de SPME que contenía 10 mL de disolución de NaOH 1M. Este recipiente se cerró herméticamente de forma que ambas disoluciones están separadas espacialmente, pero comparten el mismo espacio de cabeza. La idea es que el SO<sub>2</sub> libre viaje hasta la disolución trampa y sea retenido gracias a sus propiedades ácidas, así poco a poco los equilibrios que lo involucren se inclinarán a favor de la liberación de más SO<sub>2</sub> proveniente de los sulfitos y sus formas acomplejadas. Todo el proceso se llevó a cabo en el interior de la cámara de anoxia. Se tomaron muestras del VTR22 acidulado a lo largo de una semana, que se analizaron mediante el método explicado anteriormente en el apartado 3.3.1.

Transcurrida la semana, se desalcoholizó la muestra de VTR22 acidulado en el rotavapor (reduciéndose su volumen de 80 a 25 mL) y se fraccionó en la resina C18. Dichas fracciones se analizaron mediante el método desarrollado en el apartado 3.3.3.

### 3.6 ESTUDIO DE LA ELIMINACIÓN DEL SO<sub>2</sub> Y DEL FRACCIONAMIENTO DE PRECURSORES OXIDADOS MEDIANTE EL USO DE RESINAS DE INTERCAMBIO ANIÓNICO PURO.

Exponer al vino a condiciones extremas de pH y temperatura podría inducir cambios en la fracción de precursores que se pretende identificar. Por ello, se estudió el uso de resinas de intercambio aniónico puro para retener a los sulfitos e hidroxisulfonatos. La resina escogida para estos experimentos fue Amberlite™ IRA-900, que está funcionalizada con aminas cuaternarias.

La resina se preparó pesando 1 g en un vaso de precipitados de 100 mL, se cubrió con agua Milli-Q para acondicionarla, se agitó suavemente durante 1 minuto y se dejó reposar durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se desechó la mayor parte del agua sobrenadante y se repitió el proceso dejando reposar 10 minutos. Se vertió 1 mL de resina acondicionada en el interior de un cartucho de SPE vacío de 3 mL de capacidad, quedando protegida en ambos extremos entre dos filtros de polietileno, proporcionados por Supelco.

#### 3.6.1. Efecto del pH

En primer lugar, se realizó un primer fraccionamiento cargando sobre la resina 0.5 mL de VS dopado con 100 ppm de SO<sub>2</sub> y 1 g/L ALD, incubado durante una semana. El fraccionamiento se realizó con 2 mL de una primera fase de elución, recogida en 2 fracciones de 1 mL, seguido de otros 2 mL de una segunda fase, recogida de la misma manera (Tabla 6). En segundo lugar, se repitió este mismo fraccionamiento empleando disoluciones con pH ajustado a 3 con HCl al 0.37%, que es un pH más cercano al natural del vino.

<i>Tabla 6: Eluciones de VS a través de la resina para estudiar el efecto del pH en la retención de SO<sub>2</sub></i>		
	Fases de elución	
	Agua Milli-Q	70% MeOH
Fracciones recogidas (mL)	1	1
	1	1

En tercer lugar, se estudió más a fondo la capacidad real de las resinas de retener SO<sub>2</sub>, tanto libres como sus formas combinadas en hidroxisulfonatos. Para ello se trató de mejorar la efectividad del método disminuyendo la velocidad de flujo de las eluciones. Se repitió el proceso esquematizado en la Tabla 6 para dos muestras diferentes:

1. VS dopado con 100 ppm de SO<sub>2</sub>
2. VS dopado con 100 ppm de SO<sub>2</sub> y 1 g/L de ALD dejado reposar 3 días + 20 ppm de SO<sub>2</sub> añadidos justo antes de comenzar el procedimiento.

Las fracciones obtenidas de estos 3 experimentos se analizaron mediante el método descrito en el apartado 3.3.2 con crioforescencia.

Por último, se valoró la interacción que el resto de los componentes del vino pudieran tener con la resina. Se cargó la muestra, 0.5 mL de VTR22, que se eluyó con una fracción de Milli-Q de 1 mL y otra con disolución 70% MeOH de también 1 mL. Las fracciones recogidas se analizaron por el método explicado en 3.3.3.



### 3.6.2 Efecto del aumento del volumen de la resina

Se estudió la posibilidad de aumentar la capacidad de extracción mediante el uso de una mayor cantidad de resina y realizando las eluciones a una velocidad moderada.

Se cargaron 0.5 mL de VS dopado con 100 ppm de  $\text{SO}_2$  y 1 g/L de ALD a un cartucho conteniendo un 50% más de resina que los usados en los experimentos anteriores. Posteriormente se sometió la muestra al fraccionamiento ya descrito en la Tabla 6. Las fracciones se analizaron por el método desarrollado en el apartado 3.3.2 con criofocalización.

### 3.6.3 Efecto de la fuerza iónica y de elución

Los fraccionamientos se realizaron con disoluciones de MeOH (al 20 y 50%), aciduladas a pH 3 con HCl y con concentraciones crecientes de NaCl, como se puede observar en la Tabla 8. El volumen de carga de muestra fue de 0.5 mL sobre la resina Amberlite IRA-900. En total, se realizaron 4 fraccionamientos, 2 de ellos para la muestra VTR22 y otros 2 para VS dopado con 100 ppm de  $\text{SO}_2$  y 1 g/L de ALD. Para cada muestra se realizaron 2 fraccionamientos, uno con 20% de MeOH en las fases de elución y otro con un 50%.

**Tabla 8: Eluciones de VTR22 y VS a través de resinas con gradiente de fuerza iónica.**

Fracciones recogidas (mL)	Fases de elución de 20 y 50% MeOH					
	0M NaCl	0.005M NaCl	0.025M NaCl	0.125M NaCl	0.625M NaCl	3.125M NaCl
	2	2	2	2	2	2

En las fracciones de VTR22 se aplicó el método de análisis del apartado 3.3.3 mientras que para las fracciones de VS se siguió el proceso de análisis del 3.3.2. sin criofocalización.

### 3.6.4 Efecto combinado del pH, la fuerza iónica y de elución

Se repitió el procedimiento descrito en el apartado 3.6.3, pero en esta ocasión, incorporando cambios en la última parte del fraccionamiento (Tabla 9). Se añadieron 2 fracciones de 2 mL cada una para la fase a 3.125M de NaCl para asegurar la extracción de todos los compuestos que, bajo estas condiciones, podrían ser eluidos. Además, se recogieron otras 3 fracciones a 3.125M de NaCl llevadas hasta pH=1 con HCl, con el objetivo de poder extraer los precursores aniónicos fuertemente retenidos.

**Tabla 9: Eluciones de VTR22 y VS a través de resinas con gradiente de fuerza iónica y pH**

Fracciones recogidas (mL)	Fases de elución de 20 y 50% MeOH						
	0M NaCl	0.005M NaCl	0.025M NaCl	0.125M NaCl	0.625M NaCl	3.125M NaCl	3.125M NaCl pH=1
	2	2	2	2	2	2	2
						2	2
						2	2

Se realizaron 4 fraccionamientos, 2 de ellos para la muestra VTR22 y otros 2 para VTR22 dopado con 50 ppm de  $\text{SO}_2$  y 1 g/L de ALD, que se mantuvo reposando en anoxia durante 3 días para asegurar la formación de hidroxisulfonatos. Para cada muestra se realizaron 2 fraccionamientos, uno con 20% de MeOH en las fases de elución y otro con un 50%. Todas las fracciones se sometieron al proceso de análisis descrito en el apartado 3.3.3.

En todos los fraccionamientos se eluyeron todas las fracciones presentadas en la Tabla 9, pero en algunos de ellos las primeras fracciones extraídas, correspondientes a los eluyentes con menor concentración de NaCl, no fueron analizadas, pues en el apartado 3.6.3 se hizo suficiente hincapié

sobre ellas. En el caso del VTR22 dopado eluido con disoluciones 20% MeOH no se analizaron a 3 primeras fracciones y para el VTR22 sin dopar eluido también con disoluciones 20% MeOH los análisis comenzaron al alcanzar la concentración de sal 3.125M.

### 3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y TRATAMIENTO DE DATOS

Se llevaron a cabo cálculos estadísticos simples empleando Excel 2013. Para la comparación de medias de diferentes grupos de muestras con al menos dos replicas, se llevó a cabo un test t asumiendo varianzas iguales, considerando resultados significativos a  $P < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA REDUCCIÓN QUÍMICA DE LOS PRECURSORES OXIDADOS DEL H<sub>2</sub>S, MESH Y ETSH

La muestra de vino fuertemente diluida con salmuera y conteniendo el reductor TCEP fue incubada a 70°C durante tiempos crecientes. La cantidad de H<sub>2</sub>S liberada fue monitorizada por GC-SCD del espacio de cabeza, mostrándose los resultados, en forma de áreas relativas, en la Figura 7.

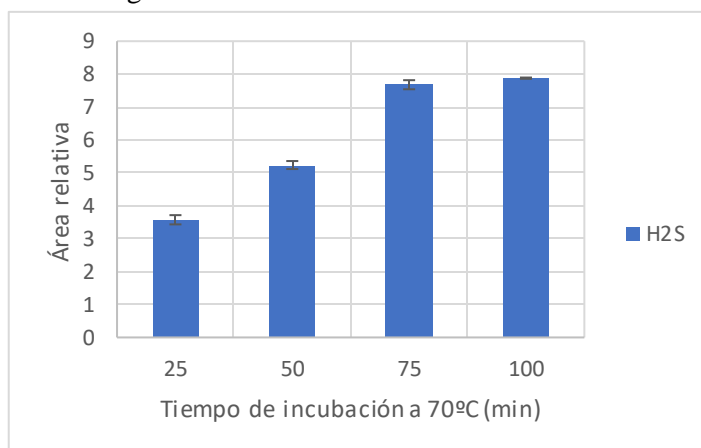


Figura 7. Evolución del H<sub>2</sub>S producido por el vino tras 100 min de reducción química a 70°C. (n=2)

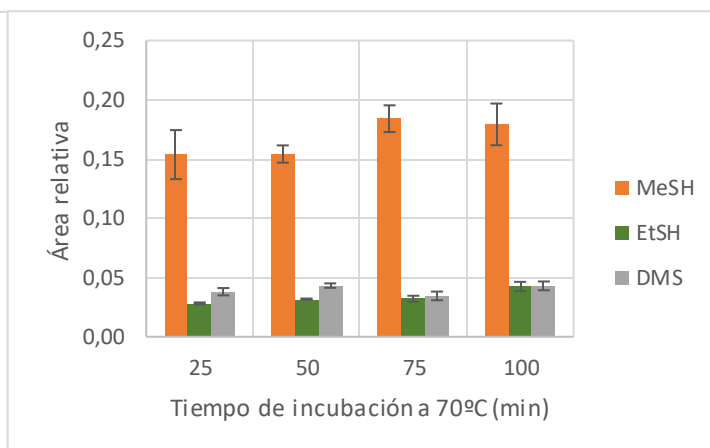


Figura 8. Evolución del MeSH, EtSH y DMS producidos por el vino tras 100 min de reducción química a 70°C. (n=2)

Tal y como se observa en la Fig. 7 las áreas de H<sub>2</sub>S aumentan hasta los 75 min de incubación, a partir de los cuales se estancan, lo que sugiere que se ha completado la reducción, por lo que se toman 75 min como el tiempo requerido para la reducción química de los precursores oxidados.

En la Fig. 8 podemos apreciar cómo, a diferencia de lo observado en el H<sub>2</sub>S, el MeSH, EtSH y DMS medidos no parecen ser afectados de forma significativa por el tiempo de incubación aplicado.

Estos resultados son esperados, tanto en cuanto a la rapidez del proceso, como al hecho de que sea la producción de H<sub>2</sub>S la que lleve más tiempo. La fuerte dilución de la muestra en el medio saturado de Cl<sup>-</sup> y la elevada temperatura, justifica que la reducción de estos precursores, que a temperatura ambiente y sin dilución lleva varios días, sea tan rápida. La mayor rapidez en la liberación de mercaptanos se debe a que estos por fuerza han de ser la parte terminal de la molécula.

#### 4.1.1 Evaluación del papel del SO<sub>2</sub> como interferencia en la reducción química de los precursores oxidados del H<sub>2</sub>S y mercaptanos ligeros.

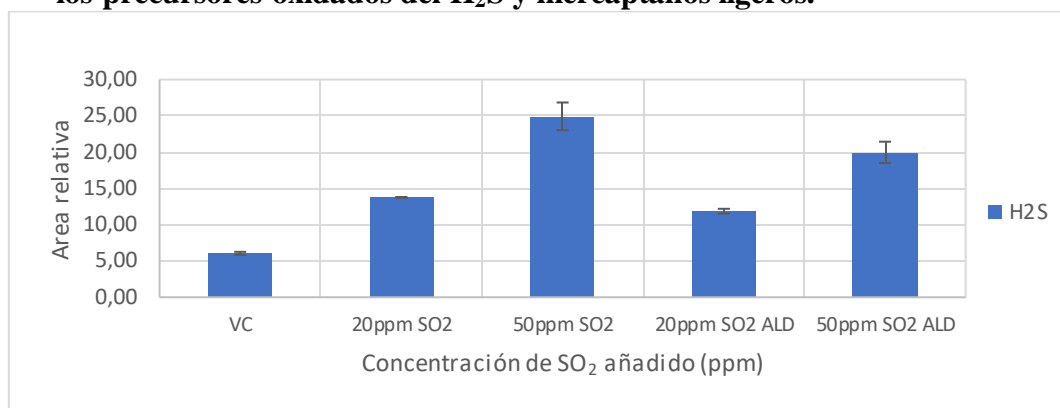


Figura 9. Comparación señales de H<sub>2</sub>S en vino control y muestras dopadas con SO<sub>2</sub> y acetaldehído (n=2)

Para ello, se analizó por el procedimiento anterior el mismo vino fortificado o no con cantidades crecientes de SO<sub>2</sub> y acetaldehído. Los resultados se muestran en la Fig. 9, en la que se aprecia cómo los viales dopados con SO<sub>2</sub> ofrecieron áreas relativas para el H<sub>2</sub>S mayores a las obtenidas con el VTR22 sin dopar, por lo que podemos confirmar que el SO<sub>2</sub> actúa como interferencia positiva aumentando la señal de H<sub>2</sub>S. Además, la adición de 1g/L de ALD solo reduce ligera, pero no significativamente, las señales de H<sub>2</sub>S (t Student P=0,028 para test de dos colas).

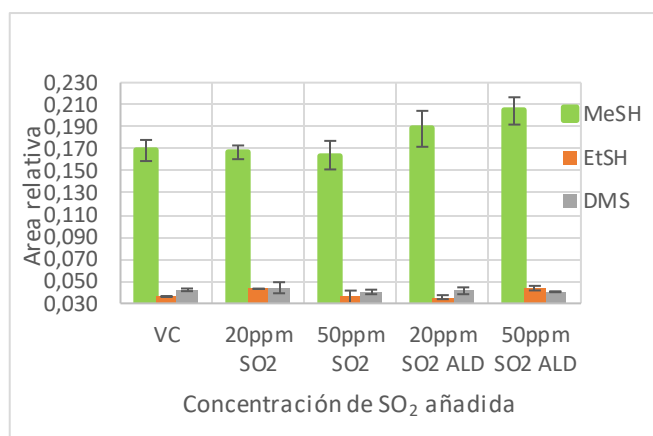


Figura 10. Comparación señales de MeSH, EtSH y DMS en vino control y muestras dopadas con SO<sub>2</sub> y acetaldehído (n=2)

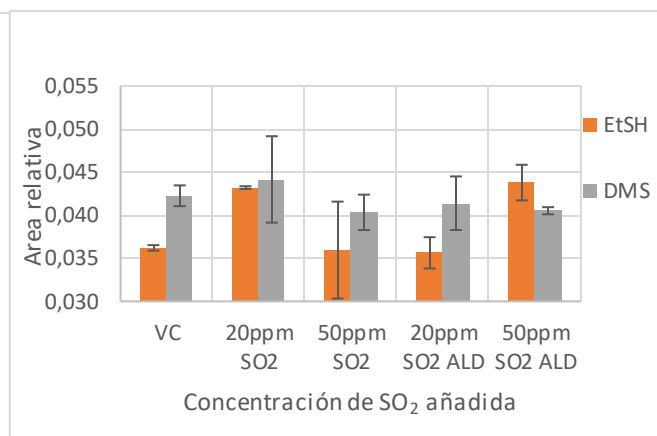


Figura 11. Comparación señales de MeSH y EtSH en vino control y muestras dopadas con SO<sub>2</sub> y acetaldehído (n=2)

Por otro lado, el MeSH, EtSH y DMS (Fig. 10 y 11) no mostraron diferencias significativas al comparar el VTR22 y el VTR22 dopado, lo cual era esperado.

Por tanto, se ha de concluir que tanto el SO<sub>2</sub> en su forma libre como combinada suponen una clara interferencia positiva a la hora de cuantificar los precursores de H<sub>2</sub>S. Esta interferencia no puede eliminarse, además, por adición de acetaldehído. Por tanto, la TCEP no puede usarse en un ensayo directo como reductor químico de los precursores del H<sub>2</sub>S, ya que parte de la señal obtenida procederá de las distintas formas de SO<sub>2</sub> presentes en el vino y no de los precursores oxidados de H<sub>2</sub>S.

## 4.2 ESTUDIO DEL AISLAMIENTO SEMIPREPARATIVO DE LOS PRECURSORES EN FASE REVERSA (C18)

### 4.2.1 Optimización de las fases de elución

Un pequeño volumen de vino desalcoholizado, fortificado o no con SO<sub>2</sub> y acetaldehído, fue fraccionado en el sistema SPE-C18, empleando fases móviles de polaridad decreciente. Cada fracción fue reducida y analizada por GC-SCD. Los resultados, como áreas relativas se muestran en las Fig. 12 y 13.

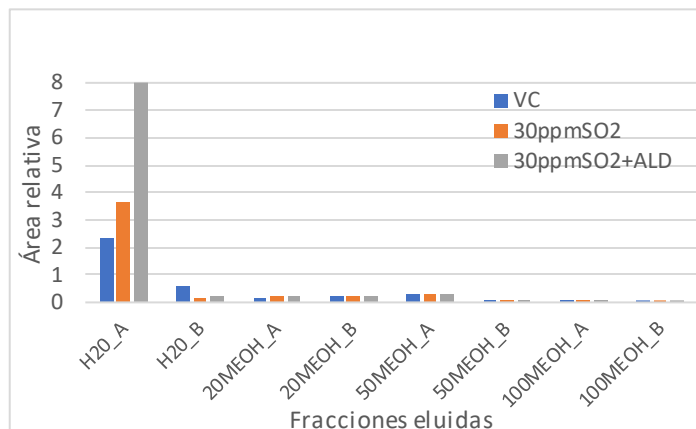


Figura 12. Comparación señales de H<sub>2</sub>S en vino control y muestras dopadas con SO<sub>2</sub> y acetaldehído tras elución a través de fase reversa C18

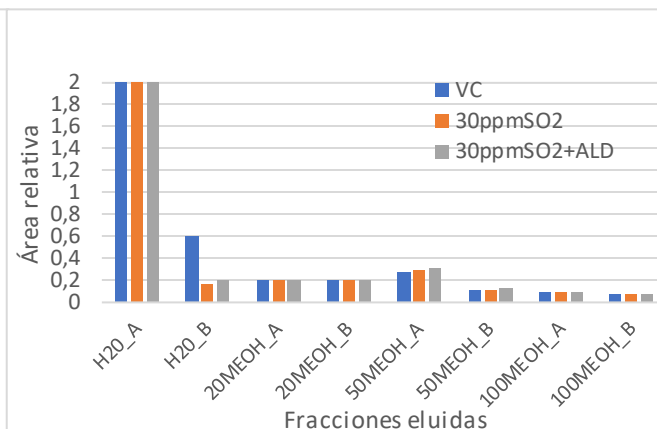


Figura 13. Ampliación de la figura 12.

Como puede apreciarse, la adición de SO<sub>2</sub> tan sólo afecta a la cantidad de H<sub>2</sub>S medida en las fracciones eluidas con agua tartárica, lo que confirma que tanto el SO<sub>2</sub> como sus formas combinadas apenas se retienen en sorbentes C18. Llama la atención la mayor área relativa obtenida en la segunda fracción con el control VTR\_DA. También es llamativo el hecho de que la presencia de acetaldehído parece hacer más eficiente la reacción de la TCEP con el SO<sub>2</sub> añadido, facilitando su reducción a H<sub>2</sub>S.

También son interesantes los valores obtenidos para los mercaptanos ligeros de mayor importancia que podemos apreciar en las Fig. 14 y 15.

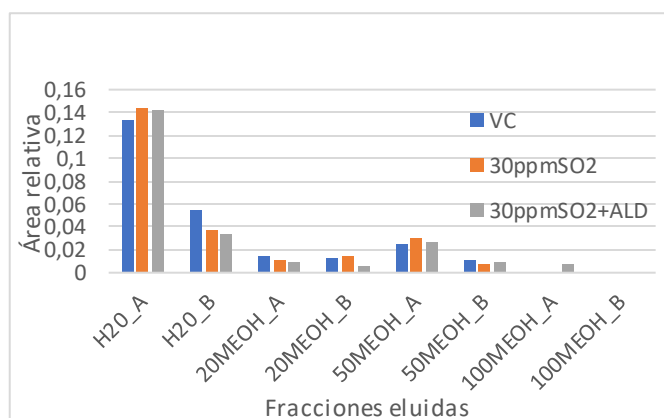


Figura 14. Comparación señales de MeSH en vino control y muestras dopadas con SO<sub>2</sub> y acetaldehído tras elución a través de fase reversa C18

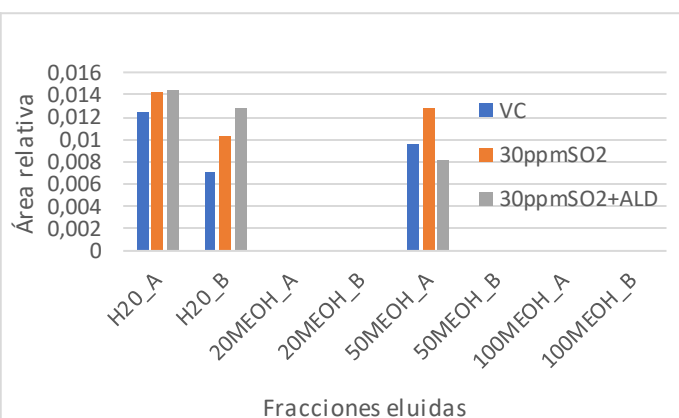


Figura 15. Comparación señales de EtSH en vino control y muestras dopadas con SO<sub>2</sub> y acetaldehído tras elución a través de fase reversa C18

Las tres muestras de VTR\_DA control, VTR\_DA dopado con SO<sub>2</sub> y VTR\_DA dopado con SO<sub>2</sub> y ALD parecen seguir la misma tendencia: la mayor parte del MeSH se recoge en las primeras fracciones de agua tartárica eluidas y se observa un repunte en la primera elución con 50% de MeOH. El EtSH únicamente aparece en las fracciones eluidas con agua tartárica y en la primera elución con 50% MeOH.

Por tanto, el sistema C18 permite aislar del SO<sub>2</sub> y sus aductos y una fracción de precursores de H<sub>2</sub>S, MeSH y EtSH de baja polaridad, eluyendo al 50% de MeOH. La fracción de precursores más polar, sin embargo, coeluye con el SO<sub>2</sub> y sus aductos en las fracciones de agua tartárica.

A continuación, se ensayó la posibilidad de incrementar la retención de los componentes más polares mediante la introducción de sal tanto en la muestra como en la primera fase de elución. Los resultados empleando agua tartárica con exceso de sal (fase 1) y una disolución 70% MeOH (fase 2), se muestran en las figuras 16 y 17.

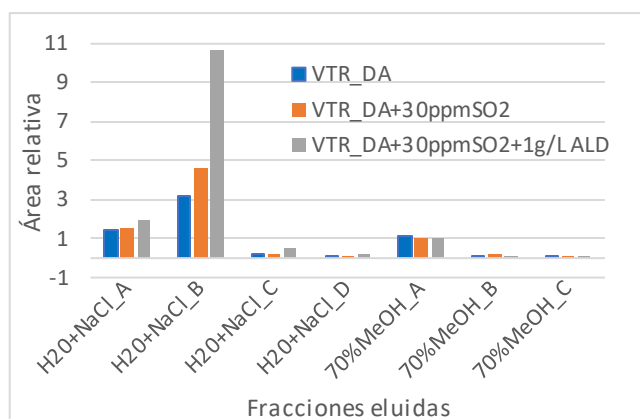


Figura 16. Comparación señales de H<sub>2</sub>S en vino control y muestras dopadas con SO<sub>2</sub> y acetaldehído tras elución a través de fase reversa C18

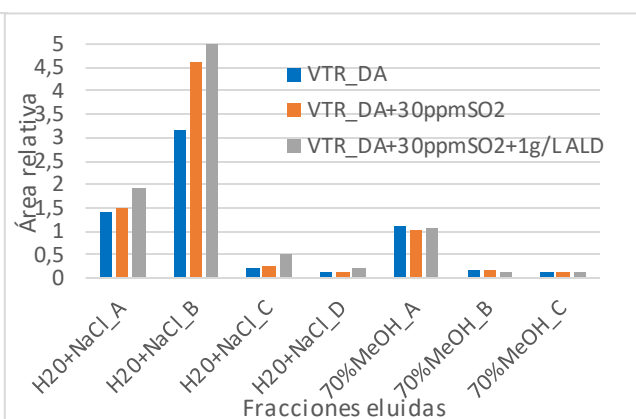


Figura 17. Ampliación de la figura 16

Ambas figuras evidencian que la adición de NaCl ha cumplido su función, ya que la mayor parte de compuestos azufrados se concentran en la segunda fracción de agua tartárica salada, no en la primera, y es en esta segunda fracción en la que eluyen tanto el SO<sub>2</sub> como su aducto con el acetaldehído. Esto es, tanto SO<sub>2</sub> como el 1-hidroxietilsulfonato, aumentan su retención en la fase C18 en presencia de sal.

Es remarcable que la primera fracción (denotada H2O+NaCl\_A) no aumenta con la presencia de SO<sub>2</sub> y apenas lo hace con la de su aducto, lo que sugiere que esta primera fracción contiene precursores de H<sub>2</sub>S muy polares que hemos conseguido separar del SO<sub>2</sub> y de su aducto. Podría tratarse de los persulfuros de cisteína o glutatión, cuyos LogP estimados a pH ácido son -1,86 y -4,44, respectivamente (según ACD/Labs Percepta Platform, por Chemspider).

Por último, volvemos a confirmar la presencia de una fracción de precursores menos polares de H<sub>2</sub>S (Fig 17), MeSH (Fig. 18) y EtSH (Fig. 19), bien aislada de SO<sub>2</sub> y su aducto y que eluye en la primera fracción de 70% de MeOH.

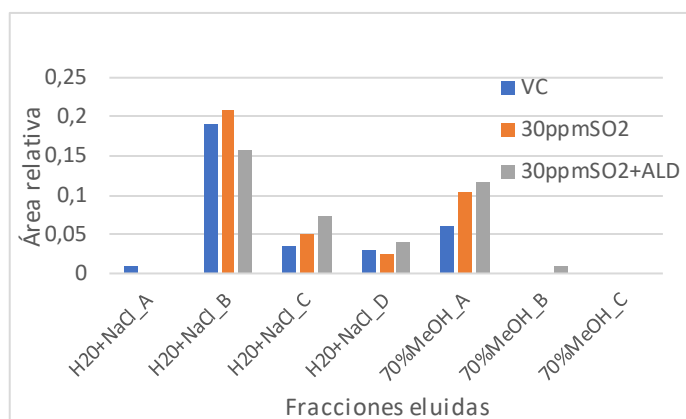


Figura 18. Comparación señales de MeSH en vino control y muestras dopadas con SO<sub>2</sub> y acetaldehído tras elución a través de fase reversa C18

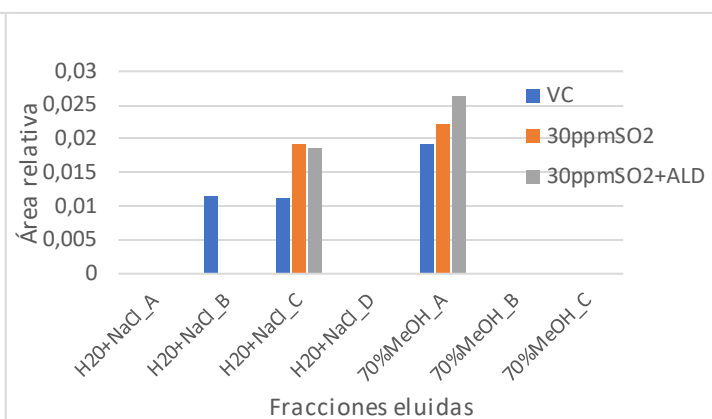


Figura 19. Comparación señales de EtSH en vino control y muestras dopadas con SO<sub>2</sub> y acetaldehído tras elución a través de fase reversa C18

Nuevamente podemos observar en las Fig. 18 y 19 la efectividad de añadir un exceso de NaCl tanto a la muestra como al eluyente, ya que los precursores de ambos mercaptanos eluyen más tardíamente de lo que se observó en el primer fraccionamiento (Fig. 14 y 15) y apenas hay rastro de su presencia en la primera fracción de agua tartárica con 250g/L de NaCl. Puede pensarse que se trata de sus disulfuros con cisteína y glutatión, que deben ser menos polares que los correspondientes persulfuros.

#### 4.2.2 Estudio de metodologías para la eliminación del SO<sub>2</sub> de las muestras de vino.

Dado el efecto pernicioso del SO<sub>2</sub>, libre o combinado, sobre el ensayo directo con la TCEP, se ensayaron tres formas, más o menos energéticas, para intentar eliminarlo. Su eliminación suave permitiría la determinación directa de los precursores de H<sub>2</sub>S. Su eliminación enérgica probablemente causaría cambios composicionales que podrían invalidar el ensayo, pero puede ser de utilidad, no obstante, para diagnosticar si alguna de las fracciones que estamos aislando, contienen o no, SO<sub>2</sub> libre o combinado. En primer lugar, se ensayó el efecto de acidular o no el vino control con HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Los resultados de este ensayo se muestran en la Fig. 20 que da el promedio de las áreas relativas para el H<sub>2</sub>S junto con las desviaciones estándar de los duplicados para las muestras de VC (VTR22 control), VC+HCl (VTR22 acidulado con HCl hasta pH=1) y VC+H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VTR22 acidulado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hasta pH=1)

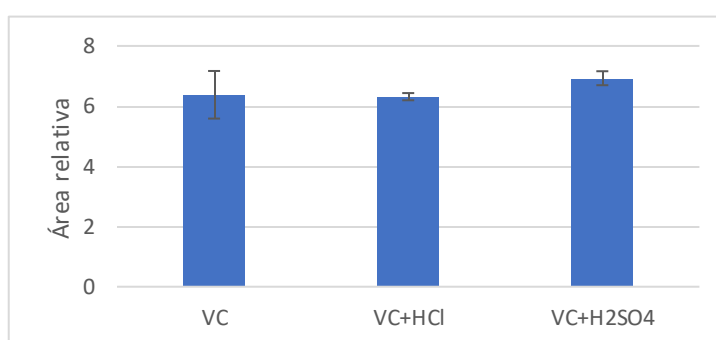


Figura 20. Comparación señales de H<sub>2</sub>S en vino control y vino acidulado con HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. (n=2)

Como puede verse, todas las medidas son bastante similares, no habiendo diferencias estadísticamente significativas ( $P=0.072$  a una cola). Por ello, se usará H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como el ácido más adecuado para experimentos posteriores, ya que no parece ser reducido por el TCEP y presenta menor volatilidad y menor riesgo de dañar el equipo que el HCl.

A continuación, se compara la efectividad de los sistemas de eliminación de SO<sub>2</sub> ensayados: 1) acidificación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> seguida de desalcoholización, 2) purga tipo método Rankine seguida o

no de una desalcoholización, y 3) incubación de VTR22 acidulado junto con una trampa de NaOH 1M durante 1, 5 o 7 días (1d, 5d, y 7d respectivamente). La cantidad de SO<sub>2</sub> remanente se muestra en la Figura 21.

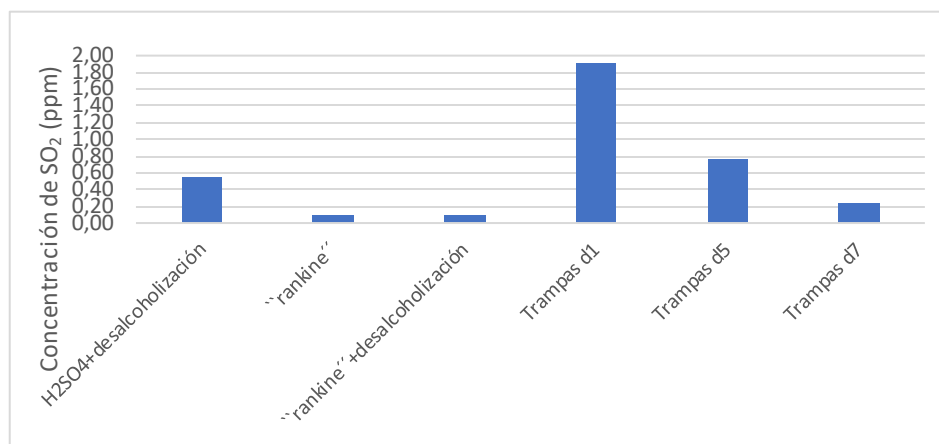


Figura 21. Concentración de SO<sub>2</sub> (ppm) obtenida tras el tratamiento de VTR22 mediante distintas estrategias

Como puede apreciarse, todos los métodos eliminaron SO<sub>2</sub>, si bien el más efectivo, como era de esperar, fue la purga tipo método de Rankine, que fue capaz de bajar la concentración de SO<sub>2</sub> remanente por debajo de los 0.1 mg/L, seguida por la evaporación suave en presencia de NaOH durante 1 semana, en la que la concentración remanente baja de 0,25 mg/L. Es preciso determinar, sin embargo, si someter a las muestras a estos procesos puede afectar o no a los precursores de H<sub>2</sub>S y mercaptanos.

Para verificar este extremo, las muestras tratadas fueron sometidas al mismo fraccionamiento en C18 previamente desarrollado. Los resultados para el H<sub>2</sub>S, como áreas relativas, se presentan en la Fig.22.

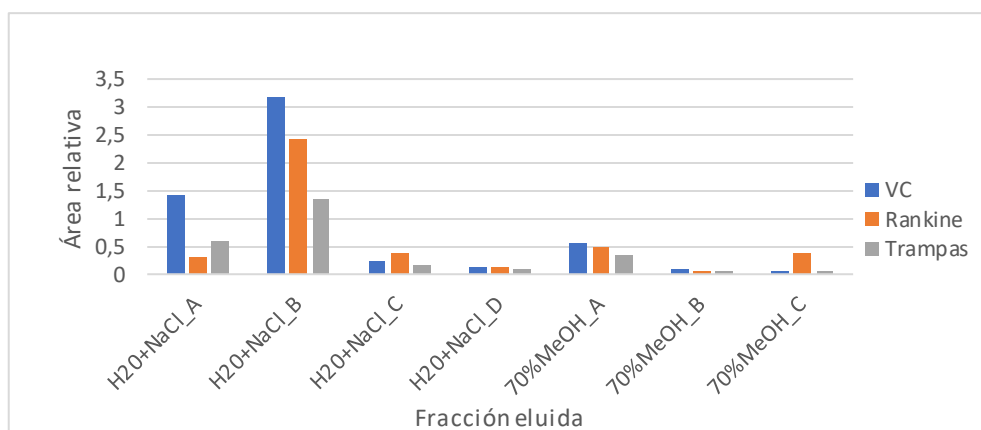


Figura 22. Comparación señales de H<sub>2</sub>S obtenidas en fraccionamientos a través de fase reversa C18 de VTR\_DA control, VTR22 tratado con el método Rankine y VTR22 almacenado con trampa de NaOH.

Puede observarse que la eliminación del SO<sub>2</sub> implica no sólo una reducción en el H<sub>2</sub>S presente en la fracción H2O+NaCl\_B, lo que era esperado, sino una reducción evidente de la fracción A. Esto no era esperado, ya que en esta fracción no eluía SO<sub>2</sub>, lo que sugiere que los precursores polares (posibles persulfuros de cisteína y GSH) son afectados por el proceso. Como era de esperar, los cambios inducidos por la purga tipo Rankine fueron más drásticos, como sugiere la menor área registrada en la fracción A, y las mayores áreas registradas en las fracciones C tanto de agua como de MeOH.

Debe remarcarse que, el hecho de que después de haber eliminado de manera casi completa el  $\text{SO}_2$ , persista la señal en la fracción  $\text{H}_2\text{O}+\text{NaCl}_\text{B}$ , sugiere que en la misma, además del  $\text{SO}_2$ , hay una proporción de precursores de  $\text{H}_2\text{S}$ .

En las Fig. 23 y 24 comparamos los resultados obtenidos para el MeSH y el EtSH.

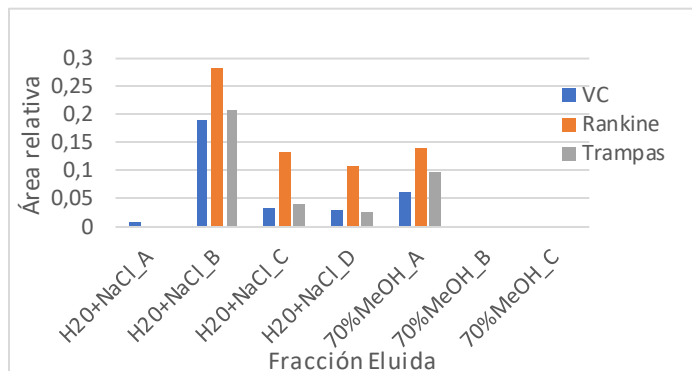


Figura 23. Comparación señales de MeSH obtenidas al fraccionar a través de fase reversa C18: VTR\_DA, VTR22 tratado con el método Rankine y VTR22 almacenado con trampa de NaOH.

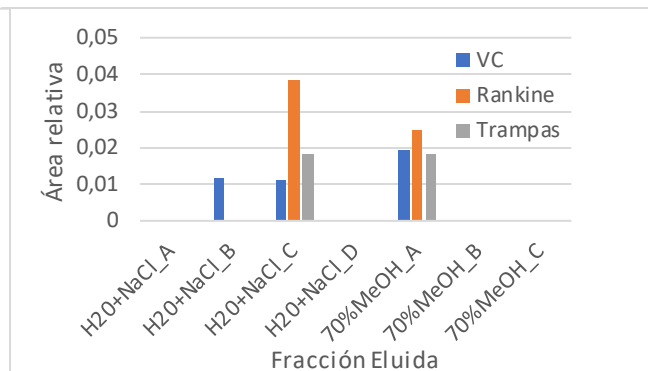


Figura 24. Comparación señales de EtSH obtenidas al fraccionar a través de fase reversa C18: VTR\_DA, VTR22 tratado con el método Rankine y VTR22 almacenado con trampa de NaOH.

En ambos compuestos se aprecian medidas muy similares al control en el caso de la muestra en que el  $\text{SO}_2$  se retiró suavemente mediante la trampa de NaOH, mientras que la eliminación mediante Rankine introduce claras diferencias, induciéndose un aumento de las formas precursoras de MeSH y EtSH. Esto debe atribuirse a haber sometido al vino fuertemente acidulado a elevadas temperaturas (unos  $80^\circ\text{C}$ ).

### 4.3 ESTUDIO DE LA ELIMINACIÓN DEL $\text{SO}_2$ Y DEL FRACCIONAMIENTO DE PRECURSORES OXIDADOS MEDIANTE RESINAS DE INTERCAMBIO ANIÓNICO PURO.

#### 4.3.1 Optimización de las fases de elución

##### 4.3.1.1 Efecto del pH

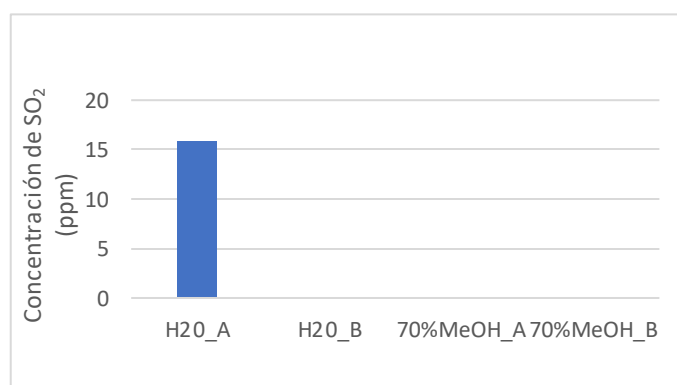


Figura 25. Concentraciones de  $\text{SO}_2$  medidas tras elución de vino sintético a través de Amberlite<sup>TM</sup> IRA-900

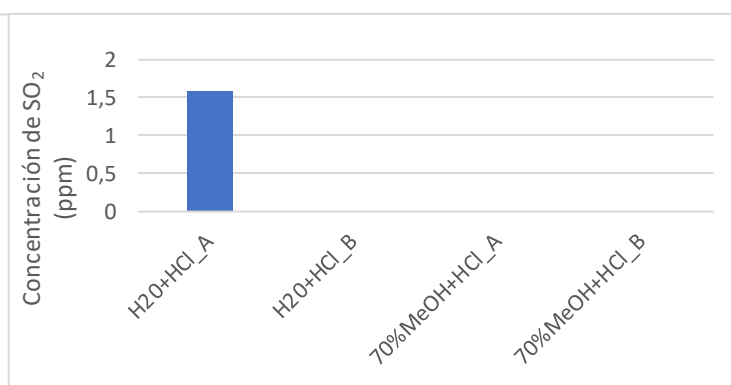


Figura 26. Concentraciones de  $\text{SO}_2$  medidas tras elución de vino sintético con eluyentes acidulados con HCl hasta pH 3 a través de Amberlite<sup>TM</sup> IRA-900

En los dos primeros experimentos, se depositaron 0.5 mL de vino sintético conteniendo 100 ppm de  $\text{SO}_2$  sobre la resina de intercambio iónico y se realizó la elución con agua (Fig. 25) y con agua acidulada (Fig. 26). Como puede observarse, solo se detectó  $\text{SO}_2$  en la primera fracción de agua en ambos casos, lo que sugiere que la resina de intercambio aniónico puro empleada es capaz de



retener eficazmente sulfitos e hidroxisulfonatos, particularmente a pH ácido. Dadas las características del proceso de retención de intercambio iónico, que no es tan rápido como el de reparto, la pequeña cantidad de  $\text{SO}_2$  no retenida podría deberse no a la incapacidad de la resina intercambiadora, sino a que la carga de muestra deba realizarse más despacio y sobre un lecho algo mayor.

De hecho, cuando se repitió el experimento eluyendo muy lentamente muestras de VS con 100 ppm de  $\text{SO}_2$  libre o con 100 ppm de su aducto y 20 ppm de  $\text{SO}_2$  libre, no fue posible encontrar el mínimo rastro de  $\text{SO}_2$  en las fracciones eluidas, lo que confirma que la resina Amberlite™ IRA-900 tiene suficiente capacidad para retener tanto el sulfito libre, como los hidroxisulfonatos, únicamente es necesario eluir la muestra más lentamente.

Si empleando estas condiciones de retención y elución, se estudia el contenido de precursores de  $\text{H}_2\text{S}$  de las fracciones eluidas en el fraccionamiento del vino a estudio, se obtienen los resultados mostrados en la Fig. 27. La primera fracción se obtuvo con 1 mL de agua a pH neutro y la segunda con 1 mL de disolución 70% de MeOH.

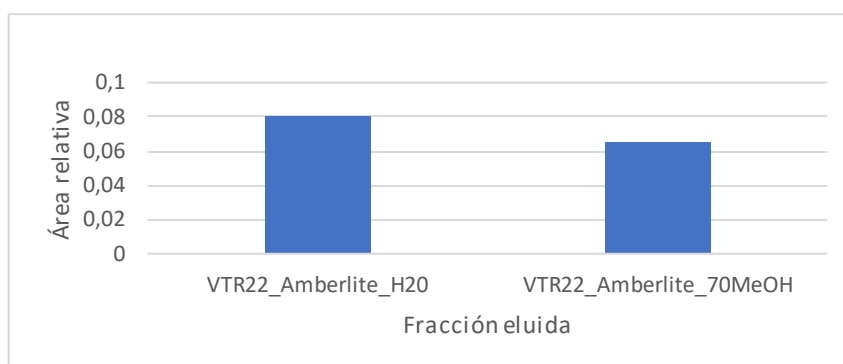


Figura 27. Señales de  $\text{H}_2\text{S}$  medidas tras elución de vino VTR22 con eluyentes acidulados con HCl a través de Amberlite™ IRA-900

En contraste a lo observado en el resto de los experimentos de este apartado que utilizan como muestra VS, sí es posible encontrar compuestos capaces de reducirse a  $\text{H}_2\text{S}$  en todas las fracciones eluidas. Podemos asumir que ninguna de las señales fue causada por  $\text{SO}_2$ , pues la totalidad de éste está retenido en las resinas. Sin embargo, la cantidad de  $\text{H}_2\text{S}$  encontrada fue muy pequeña en comparación a la obtenida en los fraccionamientos y análisis efectuados hasta el momento, lo que parece indicar que buena parte de los compuestos precursores de  $\text{H}_2\text{S}$  también son retenidos por las resinas junto con los sulfitos e hidroxisulfonatos. Otra evidencia que apoya esta hipótesis es que no ha sido posible encontrar la mínima cantidad de MeSH y EtSH, indicando que tanto estos, como sus precursores, también pueden ser retenidos por las resinas.

Esta retención por resinas de intercambio iónico sugiere que, o bien los precursores son aniónicos, o que en las condiciones de trabajo pueden desprotonarse formar asociaciones iónicas con los grupos amino cuaternarios de las resinas. Dado que tan solo los politionatos son aniones puros, esta segunda opción es la más probable, por lo que es asumible pensar que sulfitos e hidroxisulfonatos serán más retenidos que nuestros compuestos de interés, pues su carácter aniónico es mayor. Para corroborar esta hipótesis, se ensayará la elución con un gradiente con fuerza iónica (NaCl), de forma que los  $\text{Cl}^-$  harán eluir en primer lugar precursores del  $\text{H}_2\text{S}$  y los mercaptanos y, posteriormente, sulfitos e hidroxisulfonatos.

#### 4.3.1.2 Efecto del aumento del volumen de la resina

Se pudo comprobar que cuando el lecho se aumentó con un 50% más de resina, la retención del  $\text{SO}_2$  y del 1-hidroxietilsulfonato, fue completa, independientemente de la velocidad de elución.

Sin embargo, el ahorro de tiempo no fue elevado, por lo que se consideró más conveniente realizar extracciones más lentas, pero empleando menos resina.

#### 4.3.1.3 Efecto de la fuerza iónica y de elución.

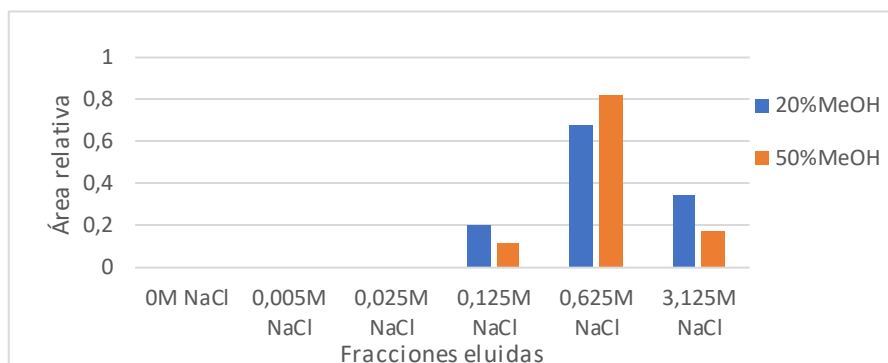


Figura 28. Señales de SO<sub>2</sub> medidas tras elución de VS dopado con 100 ppm de SO<sub>2</sub> y 1 g/L de ALD a través de Amberlite™ IRA-900 con eluyentes acidulados con HCl y aumentando la fuerza iónica.

El perfil de elución del SO<sub>2</sub> y 1-hidroxisulfonato del lecho de intercambio iónico con un gradiente de NaCl, se muestra en la Fig. 28, en la que se confirma como se hipotetizó, que con una concentración suficientemente alta de Cl<sup>-</sup> los sulfitos e hidroxisulfonatos retenidos se pueden extraer de la resina. La mayor parte de estos compuestos eluyeron utilizando una disolución 0.625M en NaCl y todos los remanentes eluyen con una disolución 3.125M. Parece observarse que empleando disoluciones con 50% de MeOH se consiguió una mejor elución, más focalizada en la fracción de 0.625M de NaCl.

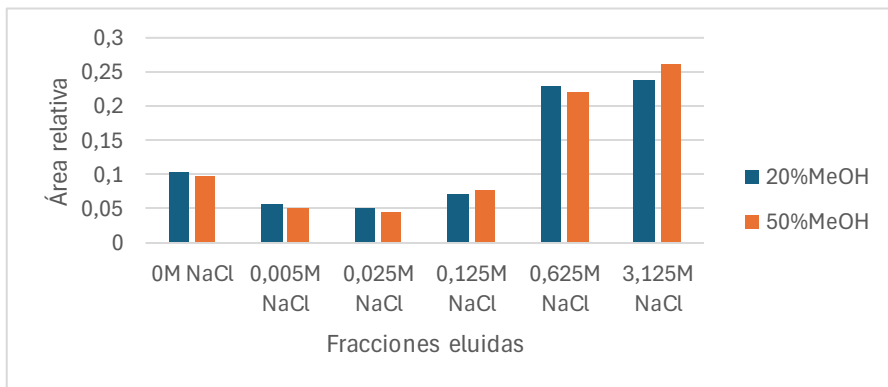


Figura 29. Señales de H<sub>2</sub>S medidas tras elución de VTR22 a través de Amberlite™ IRA-900 con eluyentes acidulados con HCl y aumentando la fuerza iónica.

Cuando el fraccionamiento anterior se aplica al vino a estudio y las fracciones se tratan con TCEP para evaluar la presencia de precursores de H<sub>2</sub>S, se obtiene el perfil mostrado en la Fig. 29, que confirma la elución de una pequeña cantidad de precursores en las tres primeras fracciones, bien separadas de la zona de elución del SO<sub>2</sub> e hidroxisulfonato, lo que sugiere que una proporción relevante de precursores, o coeluye con estas interferencias, o no ha salido todavía del lecho.

Comparando estos resultados con los obtenidos en el fraccionamiento del vino (VTR\_DA control) a través de C18 en el apartado 4.2.1 (Fig. 16 y 17), se concluye que una fracción considerable de los precursores de H<sub>2</sub>S aún debe estar retenida en las resinas. Esta fracción debe tener un alto carácter aniónico para ser retenida con tanta fuerza, por lo que se ensayarán pHs muy bajos para intentar su elución en un próximo experimento.

Las fracciones eluidas con las concentraciones más bajas de NaCl podrían corresponder a la fracción de precursores eluidos en la C18 con el 70% de MeOH, mientras que los precursores aniónicos altamente retenidos corresponderían a la fracción de compuestos muy polares no retenidos en la C18.

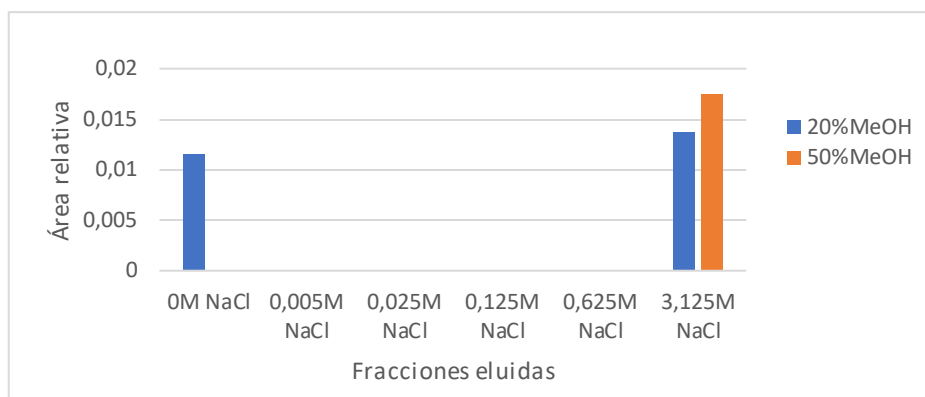


Figura 30. Señales de MeSH medidas tras elución de vino sintético con eluyentes acidulados con HCl y aumentando la fuerza iónica a través de Amberlite™ IRA-900

En el caso concreto del MeSH (Fig. 30) una cierta fracción fue muy fácilmente eluida gracias al MeOH sin la necesidad de incorporar sal, pero el resto solo eluyó con la disolución de mayor fuerza iónica. Cabe destacar que en la fracción eluida con 50% de MeOH y 0M de NaCl, también se observó un pico correspondiente al MeSH, pero su área no fue suficiente como para permitir su integración.

#### 4.3.1.4 Efecto combinado del pH, la fuerza iónica y de elución

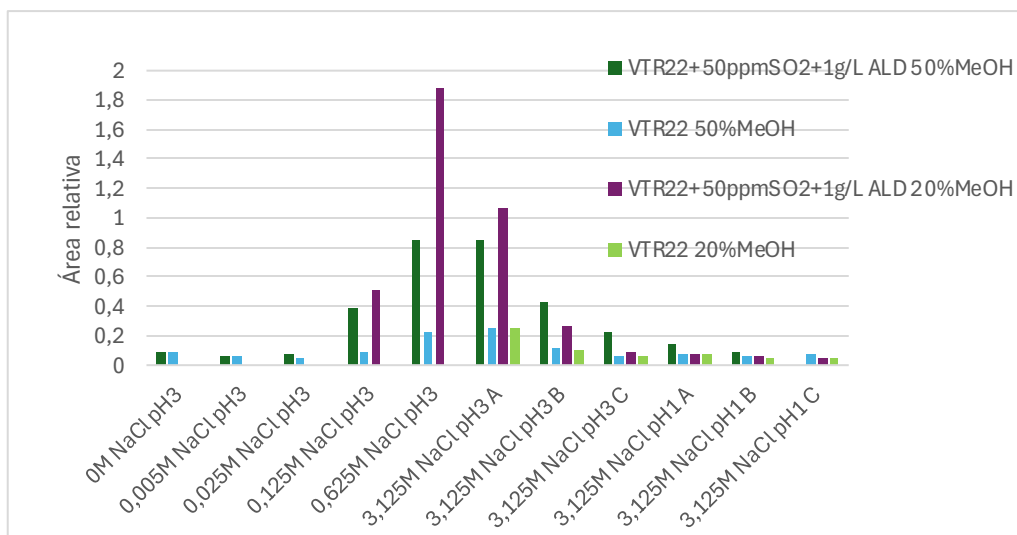


Figura 31. Señales de H<sub>2</sub>S medidas tras elución de VTR22 y VTR22 dopado con 50ppm de SO<sub>2</sub> Y 1g/L de ALD con disoluciones 20 y 50% de MeOH aciduladas usando HCl con gradiente de fuerza iónica y pH a través de Amberlite™ IRA-900

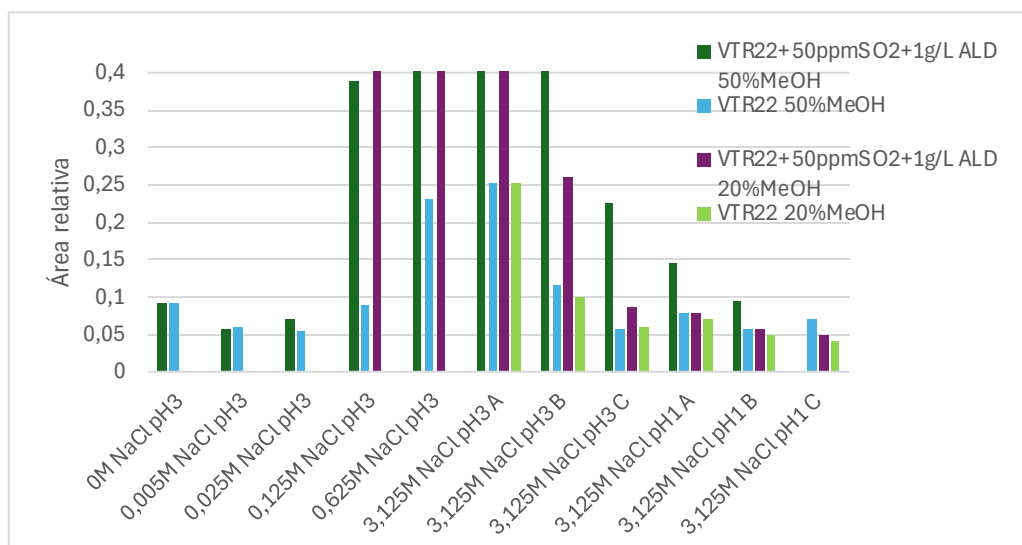


Figura 32. Ampliación de la figura 31

Finalmente, se añadió una última fase de elución de alta fuerza iónica y muy bajo pH. El procedimiento fue entonces aplicado a vino dopado o no con  $\text{SO}_2$  y acetaldehído, empleándose dos niveles de MeOH en la fase móvil. Los resultados se muestran en las Fig. 31 y 32. Puede observarse que el mejor perfil de elución se consigue con un 20% de MeOH, ya que se obtiene una mayor focalización del  $\text{SO}_2$  y el hidroxisulfonato, que dejan de eluir en la fracción C de NaCl 3,125M y pH 3. Esto se debe a una mejor solubilización de las formas iónicas en un medio más acuoso. El perfil de elución es, no obstante, mucho más amplio que el obtenido en la C18 (apartado 4.2.1).

También se observa que a pH=1 y alta fuerza iónica se eluye una fracción de precursores bien separada del  $\text{SO}_2$ , lo confirma el considerable carácter aniónico al pH habitual del vino de algunos precursores de  $\text{H}_2\text{S}$ , que son más retenidos que los sulfitos e hidroxisulfonatos.

## 5. CONCLUSIONES

La incubación de vino fuertemente diluido en salmuera con TCEP a 70°C proporciona una reducción rápida y efectiva de los precursores de  $\text{H}_2\text{S}$ , pero sufre una fuerte interferencia del  $\text{SO}_2$ , tanto libre como combinado.

No es factible eliminar de manera completa el  $\text{SO}_2$  por métodos físicos sin alterar la composición de precursores de  $\text{H}_2\text{S}$  y mercaptanos.

Se han conseguido desarrollar dos métodos de extracción en fase sólida complementarios, uno en fase reversa y otro en intercambio aniónico, para el aislamiento de dos fracciones de precursores oxidados de  $\text{H}_2\text{S}$  y mercaptanos, completamente separadas del  $\text{SO}_2$  en cualquiera de sus formas.

En el sistema C18, es preciso emplear vino desalcoholizado y salado, aislándose una fracción de naturaleza muy polar con elución ácido-salina, y una segunda de naturaleza no polar con elución con el 70% de MeOH.

En el de intercambio aniónico, la carga y elución se han de realizar lentamente, y se consigue una primera fracción aislada no aniónica (poco polar) con elución a baja fuerza iónica, y una segunda muy aniónica por elución a alta fuerza iónica y pH muy ácido.

Los resultados sugieren, sin embargo, que hay una tercera fracción de precursores de naturaleza polar que en ninguno de los dos sistemas SPE puede separarse completamente del SO<sub>2</sub>.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Siebert TE, Solomon MR, Pollnitz AP, Jeffery DW. Selective determination of volatile sulfur compounds in wine by gas chromatography with sulfur chemiluminescence detection. *J Agric Food Chem.* 8 de septiembre de 2010;58(17):9454-62.
2. Kreitman GY, Elias RJ, Jeffery DW, Sacks GL. Loss and formation of malodorous volatile sulfhydryl compounds during wine storage. Vol. 59, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc.; 2019. p. 1728-52.
3. Goode J, Harrop S. Wine faults and their prevalence: data from the world's largest blind tasting. Sulfur compounds: Production and sensory impact on wine. *XXes Entretiens Scientifiques Lallemand*. Vol. 16. 2008. 7-9 p.
4. OIV. State of the Vitiviniculture World Market. 2016;
5. Franco-Luesma E, Ferreira V. Quantitative analysis of free and bonded forms of volatile sulfur compounds in wine. Basic methodologies and evidences showing the existence of reversible cation-complexed forms. *J Chromatogr A.* 12 de septiembre de 2014;1359:8-15.
6. Ferreira V, Franco-Luesma E, Vela E, López R, Hernández-Orte P. Elusive Chemistry of Hydrogen Sulfide and Mercaptans in Wine. *J Agric Food Chem.* 14 de marzo de 2018;66(10):2237-46.
7. Müller N, Rauhut D, Tarasov A. Sulfane Sulfur Compounds as Source of Reappearance of Reductive Off-Odors in Wine. Vol. 8, *Fermentation*. MDPI; 2022.
8. Jastrzebski JA, Allison RB, Friedberg E, Sacks GL. Role of Elemental Sulfur in Forming Latent Precursors of H<sub>2</sub>S in Wine. *J Agric Food Chem.* 6 de diciembre de 2017;65(48):10542-9.
9. Müller N, Rauhut D. Recent developments on the origin and nature of reductive sulfurous off-odours in wine. Vol. 4, *Fermentation*. MDPI AG; 2018.
10. Ontañón I, Vela E, Hernández-Orte P, Ferreira V. Gas chromatographic-sulfur chemiluminescent detector procedures for the simultaneous determination of free forms of volatile sulfur compounds including sulfur dioxide and for the determination of their metal-complexed forms. *J Chromatogr A.* 5 de julio de 2019;1596:152-60.
11. Peterson AL, Waterhouse AL. <sup>1</sup>H NMR: A Novel Approach to Determining the Thermodynamic Properties of Acetaldehyde Condensation Reactions with Glycerol, (+)-Catechin, and Glutathione in Model Wine. *J Agric Food Chem.* 14 de septiembre de 2016;64(36):6869-78.
12. Ugliano M, Dieval JB, Siebert TE, Kwiatkowski M, Aagaard O, Vidal S, et al. Oxygen consumption and development of volatile sulfur compounds during bottle aging of two Shiraz wines. influence of pre- and postbottling controlled oxygen exposure. *J Agric Food Chem.* 5 de septiembre de 2012;60(35):8561-70.

13. Bekker MZ, Kreitman GY, Jeffery DW, Danilewicz JC. Liberation of Hydrogen Sulfide from Dicysteinyl Polysulfanes in Model Wine. *J Agric Food Chem.* 26 de diciembre de 2018;66(51):13483-91.
14. Ugliano M, Kwiatkowski M, Vidal S, Capone D, Siebert T, Dieval JB, et al. Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *J Agric Food Chem.* 23 de marzo de 2011;59(6):2564-72.
15. Kreitman, G. Y., Danilewicz, J. C., Jeffery, D. W., & Elias, R. J. Copper(II)-mediated Hydrogen Sulfide and thiol oxidation to disulfides and organic polysulfanes and their reductive cleavage in wine: mechanistic elucidation and potential applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017; 65(12), 2564-71.
16. Ferreira V, Sánchez-Gimeno D, Ontañón I. A method for the quantitative and reversible trapping of sulfidic gases from headspaces and its application to the study of wine reductive off-odors. *Food Chem.* 30 de septiembre de 2023;421.
17. Van Leeuwen, K. A., Nardin, T., Barker, D., Fedrizzi, B., Nicolini, G., & Larcher, R. A novel LC-HRMS method reveals cysteinyl and glutathionyl polysulfides in wine. *Talanta*, 2020; 218.
18. Huang CW, Deed RC, Parish-Virtue K, Pilkington LI, Walker ME, Jiranek V, et al. Characterization of polysulfides in *Saccharomyces cerevisiae* cells and finished wine from a cysteine-supplemented model grape medium. *Food Microbiol.* 1 de febrero de 2023;109.
19. Gracia Izquierdo AI. Desarrollo y validación de un método de análisis de compuestos de interés en el aroma del vino. Zaragoza; 2019.