



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

➤ RESUMEN.....	3
➤ ABSTRACT.....	4
➤ INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	5
➤ MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
1.- Vinos.....	8
2.- Disolventes y reactivos.....	8
3.- Vino sintético.....	9
4.- Otros materiales.....	9
5.- Caracterización analítica de las muestras.....	9
5.1.- Determinación de dióxido de azúfre (SO ₂) libre y total.....	9
5.1.1.- Método de Rankine	
5.1.2.- Método HS-GC-MS	
5.2.- Determinación de carbonilos libres y totales.....	10
5.3.- Determinación de acetaldehído libre y total.....	10
5.4.-Determinación de índice de polifenoles totales (IPT) e intensidad colorante.....	11
5.5.- Determinación de metales.....	11
5.6.- Determinación de aminoácidos.....	11
6.- Preparación de los equipos y calibración.....	11
6.1.- Preparación del instrumento.....	11
6.2.- Disoluciones madre.....	12
6.3.- Disoluciones intermedias.....	12
6.4.-Disoluciones de calibrado.....	12

7.- Desulfitación.....	14
7.1.- Desplazamiento del equilibrio por borboteo con nitrógeno	
7.2.- Desplazamiento del equilibrio asistido por vacío	
7.3.- Oxidación con peróxido de hidrógeno	
8.- Determinación de la permeabilidad/estanqueidad de los botes.....	15
9.- Procedimiento de preparación de los diferentes sistemas de oxidación....	15
10.- Análisis sensorial.....	16
11.- Tratamiento de datos.....	17
 ➤ RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
1.- Calibración de equipos.....	18
2.- Desulfitación.....	19
3.- Permeabilidad/estanqueidad de los botes testigo.....	23
4.-Consumo de oxígeno de las muestras de vino bajo los diferentes sistemas de oxidación.....	26
5.- Parámetros de formación: comparaciones entre los distintos sistemas de oxidación.....	29
6.- Correlaciones con aminoácidos y metales.....	35
7.- Análisis sensorial.....	36
 ➤ CONCLUSIONES.....	41
 ➤ AGRADECIMIENTOS.....	42
 ➤ REFERENCIAS.....	43
 ➤ ANEXOS.....	47

RESUMEN

Los aldehídos y cetonas son los grupos de moléculas con mayor diversidad sensorial en el vino. Los cambios en las propiedades aromáticas ligadas a procesos de oxidación de un vino están muchas veces relacionados con la cantidad de aldehídos presentes. Dichos aldehídos pueden liberarse de sus complejos no volátiles con el SO₂ o formarse por oxidación directa a partir de sus diversos precursores una vez que el SO₂ libre sea inferior a 5 mg/L.

En este trabajo se ha perfeccionado un procedimiento para la determinación de la formación de aldehídos “*de novo*” y se ha estudiado el efecto de la dosificación de oxígeno en dicho proceso. Para ello se han comparado 4 vinos de diferentes regiones y características, los cuales han sido sometidos a distintos regímenes de oxígeno. Se ha comparado una disposición de cámara de aire durante 7 días frente a una microoxigenación controlada durante 6 semanas, ambas a 40°C para acelerar las reacciones de oxidación.

En ambos sistemas de oxidación se ha alcanzado la formación de aldehídos “*de novo*”, y no se ha observado un efecto claro de la dosificación del oxígeno sobre la formación de aldehídos una vez normalizados los datos, lo que sugiere tanto que la formación de aldehídos “*de novo*” es independiente de la forma de dosificar el oxígeno, como que el control correcto del consumo de éste es esencial para la evaluación comparativa de la capacidad de vinos distintos de formar aldehídos “*de novo*”.

ABSTRACT

The aldehydes and ketones are by far the most diverse molecules from a sensory point of view in the wine. Changes in wine aroma properties linked to oxidation are very often related to the amount of aldehydes. These aldehydes are released from their non-volatile complexes with SO₂ and they also could be formed by direct oxidation from its precursors once free SO₂ levels become smaller than 5 mg / L.

The major aim of the present work is to develop a procedure to the formation of “*de novo*” aldehydes and to study the effect of the oxygen dosage. Four wines from different regions and characteristics have been processed under different regimes of oxygen. A free oxygen consumption (air chamber) for 7 days and a controlled micro-oxygenation for 6 weeks, both at 40 °C to accelerate both the oxidation reactions, have been compared.

In both oxidation systems, a formation of “*de novo*” aldehydes has been reached. It has not been observed a clear effect of the oxygen dosage on the formation of aldehydes once the data was normalized. This result suggests that *de novo* aldehyde formation is independent on the way in which oxygen is applied and that the accurate control of the total oxygen consumed will be essential for determining the specific ability of wines for *de novo* formation of aldehydes

INTRODUCCIÓN

El vino es una matriz aromática extremadamente compleja que contiene gran cantidad de moléculas odorantes pertenecientes a distintas familias químicas, como alcoholes, ésteres, aldehídos, terpenos, fenoles o cetonas. Los aldehídos y las cetonas no representan el mayor número de compuestos, ni siquiera las de aroma más intenso, pero sin duda son el conjunto de moléculas más diverso desde el punto de vista sensorial del vino, jugando un papel relevante en la calidad del mismo. Podemos encontrar aromas muy diferentes, desde cítricos, frescos, dulces, miel (Silvia Ferreira et al. 2002), vainilla, patata cocida (Escudero et al. 2000^a), mantequilla, rancio, pepino, manzana pasada (Escudero et al. 2002), cartón y serrín (Chatonnet et al. 1998^a, Chatonnet et al. 1998^b)

Los cambios en las propiedades aromáticas ligadas a los procesos de oxidación están muchas veces relacionados con la formación de compuestos carbonílicos (Azzara et al. 1992, Jaime-Baró et al. 1977). La formación de algunos de estos compuestos se debe a la oxidación directa de alcoholes (Escudero et al. 2000^b, San Juan et al. 2012, Ferreira et al. 2014^a), la degradación de Strecker a partir de sus respectivos aminoácidos (Rizzi et al 2006), o de compuestos dicarbonílicos o por último como derivados de los α -cetoácidos (Pripis Nicolau et al. 2000). De entre los aldehídos estudiados, el metional, el fenilacetaldehído, y el acetaldehído son los componentes aromáticos con mayor responsabilidad en la evolución del aroma del vino y en el propio aroma a oxidado (Escudero et al. 2000^a, Escudero et al. 2002, Chatonnet et al. 1998^a, Chatonnet et al. 1998^b). El metional y el fenilacetaldehído están relacionados con los aminoácidos metionina y fenilalanina, de los cuales de manera más o menos directa proceden. En teoría, otros aldehídos se pueden formar por este mecanismo, como por ejemplo, el 2-metilpropanal (isobutiraldehído), el 2-metilbutanal y 3-metilbutanal (isovaleraldehído) que provienen de la valina, isoleucina y leucina, respectivamente. El acetaldehído sin embargo, es el producto de oxidación del etanol (Danilewicz et al. 2007). La aparición de estos aldehídos se ve favorecida por las altas temperaturas y la presencia de niveles altos de oxígeno (Silva Ferreira et al., 2002, Bueno et al. 2010). Por lo tanto, estas moléculas pueden ser consideradas como indicadores químicos de los niveles de oxidación en los vinos.

Además, los compuestos carbonílicos son moléculas extremadamente reactivas y se ha demostrado que forman interacciones muy fuertes con otras moléculas (Zapata et al. 2010), especialmente con el SO₂ (Culleré et al. 2011), que es un aditivo del vino, y con el grupo amino de los aminoácidos y de las proteínas (Lermusieau et al. 1999). Las interacciones que forman con el sulfuroso se denominan comúnmente combinaciones bisulfíticas, químicamente son hidroxialquilsulfonatos y son complejos estables no volátiles (De Azevedo et al. 2007; Burrough et al. 1973). Por lo tanto los compuestos carbonílicos en el vino pueden encontrarse en forma libre, responsables del aroma, o asociados formando complejos no volátiles, principalmente con el SO₂, y por tanto inodoros. Estos complejos actúan como una reserva de carbonilos, desplazándose el equilibrio hacia la forma libre conforme el SO₂ desaparece por oxidación (Bueno et al. 2014^a).

Durante el período de envejecimiento el vino adquiere estabilidad y complejidad y en los casos donde se gestiona correctamente, se alcanza su máximo potencial, obteniendo un producto de gran calidad. Por ello, se han publicado muchos estudios sobre el efecto de microoxigenación en la composición polifenólica y el perfil sensorial de los vinos (Anli et al. 2012, Schidtke et al. 2011), sin embargo no se han determinado cómo afectan las aportaciones de oxígeno en las diferentes etapas de vinificación ni se ha estudiado la posible formación de compuestos aromáticos de oxidación en estos procesos.

Actualmente, el proceso de microoxigenación en depósitos de acero inoxidable se ha convertido en una práctica común en bodegas de todo el mundo. La dosis empleada es generalmente similar a los niveles alcanzados de forma tradicional en las barricas de madera (20 a 25 mg/ L por año) (Lemarie et al. 2002), aunque en muchas ocasiones se emplean dosis mucho mayores para acelerar el proceso (4-7 mg/L /mes). Desde hace muchos años se sabe que la formación de pigmentos mixtos entre antocianos y taninos es esencial para la estabilización del color y para la reducción de la astringencia. Una de las vías principales por las que transcurre esta formación de pigmentos es mediante la formación de puentes con el acetaldehído, que se piensa se forma en los procesos de micro-oxidación, tanto natural a través de la barrica, como inducida mediante el borboteo de oxígeno. La existencia previa de acetaldehído ligado al SO₂, podría tener un papel desconocido en este proceso, que hasta el momento no se conoce con precisión. La comprensión de este papel es esencial para la gestión correcta del oxígeno en la crianza.

Asimismo, el control y la determinación del oxígeno disuelto durante las etapas finales de producción, como el embotellado, tendrá también una gran influencia sobre la vida útil de vino; pues el oxígeno presente en la botella oxida preferentemente dióxido de azufre libre ($\text{SO}_2\text{ L}$), produciendo no sólo una desprotección del vino frente al oxígeno (Lopes et al. 2009), sino provocando la liberación de aldehídos de oxidación que pudieran estar ya presentes.

Por todas las razones expuestas en la actualidad no es posible prever la evolución de las propiedades sensoriales de los vinos ya embotellados (O'Brien et al. 2009), ya que por lo general se desconoce la cantidad de aldehídos que ya contiene el vino, la velocidad a la que desaparecerá el sulfuroso y la tendencia del propio vino a formar aldehídos de oxidación una vez que se haya quedado desprotegido sin sulfuroso libre. Hoy en día es posible controlar la entrada de pequeñas dosis de oxígeno durante el envejecimiento en botella controlando la permeabilidad del tapón (Ugliano et al. 2013), lo que se podría emplear para gestionar el envejecimiento en botella (Lopes et al. 2009), ya que una entrada mínima de aire parece ser necesaria para evitar la formación de compuestos azufrados de reducción. Ahora bien, incluso las pequeñas dosis empleadas durante el envejecimiento en botella, podrían ser suficientes para influir negativamente en la evolución del vino (Godden et al. 2005). Por lo tanto se hace necesario conocer y determinar la respuesta de cada vino frente al oxígeno, y en particular su tendencia a formar aromas de oxidación para poder diseñar el envejecimiento en botella de manera óptima.

Los objetivos de este trabajo son perfeccionar un procedimiento para la medición de la formación de aldehídos “*de novo*” durante la oxidación del vino. Además se pretende estudiar el efecto de la dosificación de oxígeno en dicha formación y la relación de dicha formación con las características sensoriales, la concentración inicial de aminoácidos y metales de los vinos.

El objetivo académico es desarrollar las cualidades propias de un investigador mediante la formación en el método científico, el aprendizaje en la utilización de recursos de búsqueda de información científica, la especialización en el uso de técnicas cromatográficas, el tratamiento de los datos obtenidos y el reflejo de todo lo aprendido mediante la escritura de la presente memoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- *Vinos*

En el presente estudio se usaron 5 vinos españoles comerciales diferentes, 4 tintos y 1 blanco, provenientes de 5 denominaciones de origen distintas, como se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Vinos analizados en el experimento incluyendo código, denominación de origen, año, variedad de uva y grado alcohólico

Vino	Código	Denominación de origen	Año	Variedad de la uva	Tipo	Alcohol (v/v)
Coto de Hayas	CH	Campo de Borja	2009	Garnacha	Tinto reserva	14,0
Pago de Capellanes	PC	Ribera del Duero	2013	Tempranillo	Tinto joven roble	13,5
Barón de Ley	BL	Rioja	2010	Tempranillo	Tinto reserva	13,5
Viñas del Vero	VV	Somontano	2013	Cabernet Sauvignon, Merlot	Tinto joven roble	13,5
Veliterra	VT	Rueda	2013	Verdejo	Blanco	12,5

2.- *Disolventes y reactivos*

El etanol utilizado fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania), ácido tartárico 99%, glicerol 99,5%, 1,2-propanodiol 99,5% y metabisulfito de sodio 97% suministrado por Panreac (Barcelona, España); hidróxido de sodio 99% por Scharlau (Barcelona, España); glioal 40% en agua de Aldrich (Madrid, Spain); ácido ortofosfórico 85% Panreac (Barcelona, España); peróxido de hidrógeno 3% Panreac (Barcelona, España) y ácido sulfúrico 96% Panreac (Barcelona, España). El agua fue purificada mediante el sistema Milli-Q® de Millipore (Bedford, Alemania).

Los estándares usados para la cuantificación analítica y el estándar interno fueron suministrados por Aldrich, Fluka (Madrid, España) y Firmenich (Suiza). Estándares químicos: 2,3-pantanodiona >96%, β -damascenona >93%, 3-(metiltio)propionaldehído (metional) \geq 97%, benzaldehído \geq 99%, fenilacetaldehído \geq 95%, 2-metilbutanal >95%, 3-

metilbutanal (isovaleraldehido) >97%, isobutiraldehido >99%, furfural >98%, 5-metilfurfural >97%, acetovanillona >98% y 2,3-butanodiona (diacetilo) >97%. Estándares usados como componentes mayoritarios del vino sintético: octanoato de etilo > 98%, hexanoato de etilo >99%, ácido undecanoico ≥99%, acetato de isoamilo >98%, ácido heptanoico >99%, succinato de dietilo >99%, 2-metilbencilalcohol 98% y acetato de etilo ≥99,7%. Estándar interno: 2- metilbutanoato de metilo ≥98%.

3.- Base del vino sintético

El vino sintético preparado contenía 11% (v/v) de etanol, 5 g/L de ácido tartárico, 10g/L de glicerol y 1,5% (v/v) de 1,2-propanodiol. El pH se ajustó a 3,5 con hidróxido de sodio 1 M. El 1,2- propanodiol fue adicionado a la mezcla acuosa con la finalidad de que la solubilidad y la volatilidad de los compuestos de la matriz sintética fueran lo más parecidas a las de un vino real.

4.- Otros materiales:

En el presente estudio se utilizaron 4 tipos de recipientes cuya diferencia principal es su permeabilidad frente al oxígeno: recipientes Pyrex de 500 mL suministrados por Labbox Labware, S.L. (Barcelona, España), recipientes de poliestireno (PS) de 500mL recipientes de policarbonato (PCB) de 500 mL y recipientes de polietilentereftalatoglicol (PETG) de 500 mL suministrados por VWR® International Eurolab S.L (Barcelona, España). Se comprobó que el volumen real de todos ellos era de 600 mL.

5.- Caracterización analítica de las muestras

5.1.- Determinación de dióxido de azufre (SO₂) libre y total:

La determinación del SO₂ tanto libre como total se llevó a cabo mediante dos métodos de precisión y sensibilidad diferentes.

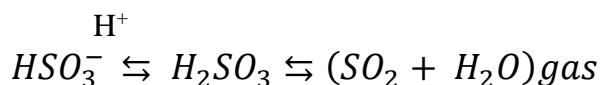
5.1.1.- Método de Rankine

El SO₂ libre y combinado se determinó siguiendo el método de Rankine descrito en Recueil International des Methodes d'Analyses, Paris 1990, consistente en una valoración usando azul de metileno como indicador. Se adicionan 10 mL de vino y se valoraron con hidróxido de sodio 0,01 M hasta la aparición de un color verde, para la determinación de SO₂ libre. Para la determinación de SO₂ combinado se ha de calentar la

muestra durante 20 minutos antes de realizar la valoración. Los niveles de dióxido de azufre total fueron calculados como la suma entre el SO₂ libre y el combinado

5.1.2.- HS-GC-MS

Se determinó el SO₂ libre y total mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas utilizando un método basado en el análisis directo del espacio de cabeza (HS-GC-MS) que está pendiente de publicación. El instrumento que se utilizó fue un cromatógrafo de gases Shimadzu QP-2010. La columna usada fue una DB-WAX 30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 µm de espesor de fase. Antes de introducir cada vial en el carro de muestras se añadió ácido ortofosfórico al 85% para favorecer el medio ácido y asegurar así que el analito pase a fase gas.



5.2.- Determinación de carbonilos libres y totales

La determinación de los carbonilos libres se llevó a cabo mediante la microextracción en fase sólida sin agitación del espacio de cabeza (HS-SPME) con una fibra de polidimetilsiloxano / divinilbenceno de 65 µm de espesor (PDMS / DVB) de Supelco (Madrid, España), seguida de una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se utilizó una columna capilar SPB-1 Sulfur 30 m x 0,32 mm de diámetro interno x 4 µm de espesor de fase. Para la determinación de los carbonilos totales se rompieron los complejos formados con el SO₂ adicionando glioxal 6 g/L y se incubaron las muestras durante 6h a 50°C antes de su análisis. El instrumental utilizado fue un Shimadzu QP-2010 Plus. El procedimiento completo se describe en Bueno et al. 2014^a.

5.3.- Determinación de acetaldehído libre y total

El análisis del acetaldehído libre se llevó a cabo mediante HS-GC-MS, el mismo equipo y con la misma columna que el descrito en el apartado 5.1.2 y que también está pendiente de publicación. Para la determinación del acetaldehído total se rompieron los complejos formados con el SO₂ adicionando glioxal 6 g/L y se incubaron las muestras durante 6 horas a 50°C antes de su análisis.

5.4.-Determinación del índice de polifenoles totales (IPT) e intensidad colorante

El índice de polifenoles totales fue estimado mediante la absorbancia a 280 nm como fue descrito por Ribéreau-Gayon et al. 1970. La intensidad colorante fue expresada como el sumatorio de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm. Para todas las medidas de absorbancia se utilizó el espectrómetro UV-vis UV-1700 Pharma Spec de Shimadzu.

5.5.- Determinación de metales

El análisis de los metales presentes en el vino se llevó a cabo en el Servicio Central de Análisis (Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza). Se realizó una digestión asistida por microondas de las muestras de vino. Las muestras fueron analizadas mediante un plasma de acoplamiento inductivo unido a un espectrofotómetro de emisión óptica (ICP-OES), como fue descrito por González et al. 2008.

5.6.- Determinación de aminoácidos

Los niveles de aminoácidos en el vino se determinaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase reversa con derivatización previa con 6-aminoquinolil-N-hidroxi-succinimidil carbamato (AQC) como se describe en Hernández-Orte et al. 2003.

6.- Preparación de los equipos y calibración

Se llevó a cabo una calibración para todos los métodos de análisis utilizados en el transcurso del experimento, pero solo se describirá la preparación del equipo y la calibración para la determinación de los carbonilos.

6.1.- Preparación del instrumento

Antes de empezar con los análisis se cambió la configuración del equipo. Para comprobar que el equipo estaba en condiciones óptimas se utilizó el test de Grob. La disolución de Grob es el test más utilizado para evaluar la calidad de la columna y su cromatografía. El método fue desarrollado por los Grob desde 1978 hasta 1982 (Grob et al. 1978, Grob et al. 1982). Con el equipo totalmente apagado, se montó la fuente de ionización de impacto electrónico (EI). Se cambió la columna, se colocó un “liner” split/splitless de inyección líquida y se instaló la columna al inyector para su purga y acondicionamiento. Una vez realizado el acondicionamiento, se conectó la columna al espectrómetro de masas y se comprobó la existencia de fugas. Cuando se alcanzó el vacío

suficiente en el detector, se realizó el “autotunning” del equipo. Una vez realizados estos pasos se inyectó la disolución de Grob. Comprobada la idoneidad del equipo se cambió el “liner” al específico para SPME y se ajustaron los parámetros a los establecidos por el método para el análisis de los carbonilos.

6.2.- *Disoluciones madre*

Se prepararon disoluciones individuales de entre 3 a 20 g/L en etanol del estándar interno y de cada uno de los analitos a partir de los patrones puros. Las disoluciones se prepararon por doble pesada, teniendo en cuenta las masas añadidas y la densidad del disolvente para calcular la concentración en mg/L según la *Ecuación 1*.

Ecuación 1:

$$\text{Concentración madre } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{mg compuesto}}{\text{g disolución}} \times \text{densidad del disolvente } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) \times 1000 \text{ mL/L}$$

6.3.- *Disoluciones intermedias*

Se realizaron disoluciones intermedias conjuntas de ciertos analitos en etanol. Todas las diluciones se prepararon por doble pesada y su concentración, en mg/L, se calculó siguiendo la *Ecuación 2*. Se realizaron 3 grupos de diluciones (A, B y C) de más concentradas a menos concentradas. En el grupo A se prepararon 5 disoluciones intermedias así como en el grupo B. En el grupo C solamente se prepararon 2 intermedias.

Ecuación 2:

$$\text{Conc. dilución } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\frac{\text{g disolución madre}}{\text{densidad del disolvente madre } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right)} \times \text{concentración madre } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right)}{\text{g disolución diluida}} \times \text{densidad del disolvente diluido } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right)$$

También se preparó una disolución intermedia de todos los compuestos mayoritarios juntos.

6.4.- *Disoluciones de calibrado*

Para la preparación de las disoluciones de calibrado se emplearon distintos volúmenes de las disoluciones A₁-A₅, B₁-B₅ y C₁-C₂ de tal forma que se obtuvieran en los diferentes puntos de la calibración las concentraciones de los analitos (μg/L) como se muestra en la *Tabla 2*. A la hora de diseñar los puntos de calibración, se tuvo en cuenta que la concentración de unos analitos fuera creciente y de otros decreciente, para evitar los efectos de masa o saturación de la fibra de SPME. En cada uno de los puntos se añadió

una cantidad fija de 200 μL de la disolución del estándar interno, 125 μl de la disolución de mayoritarios para completar la complejidad del vino sintético (*Tabla 3*), se añadieron distintos volúmenes de etanol para que todos los puntos tuvieran el mismo porcentaje y se enrasó a 50 ml de vino sintético.

Tabla 2: Concentraciones de los analitos en cada punto de calibración.

Concentración ($\mu\text{g/L}$)	punto 0	punto 1	punto 2	punto 3	punto 4	punto 5
acetovanillona	0	3142	1203	488	193	69,7
β -damascenona	0	15,5	3,62	0,90	0,42	0,16
2,3-pantanodiona	0	99,0	23,1	5,73	1,41	0,52
isobutiraldehído	0	59,1	13,8	3,43	0,80	0,29
2-metilbutanal	0	39,3	9,21	2,28	0,65	0,24
isovaleraldehído	0	222	51,8	12,8	3,78	1,39
fenilacetaldehído	0	246	38,9	6,67	0,91	0,14
furfural	0	1902	300	52,1	8,21	1,27
5-metilfurfural	0	0,13	1,17	12,0	100	900
metional	0	0,52	1,74	5,42	21,2	76,4
benzaldehído	0	0,36	1,62	7,73	37,4	178
diacetilo	0	6,27	28,4	135	614	2927

Tabla 3: Concentraciones (mg/L) de los compuestos mayoritarios y del estándar interno en los puntos de calibración.

Compuestos mayoritarios	Concentración (mg/L)
Octanoato de etilo	1,0
Hexanoato de etilo	1,0
Ácido undecanoico	1,6
Acetato de isoamilo	3,1
Ácido heptanoico	2,7
Succinato de dietilo	10
2-metilbencíalcohol	50
Acetato de etilo	77

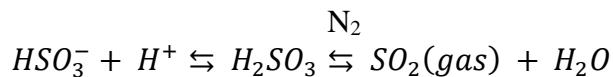
Estándar interno	Concentración (mg/L)
2-metilbutirato de metilo	0,183

7.- *Desulfitación:*

Para el estudio de desulfitación se trabajó siempre con el vino VT y se probaron varios procedimientos diferentes.

7.1.- *Desplazamiento del equilibrio por borboteo con nitrógeno*

La técnica del desplazamiento del equilibrio consistió en borbotear el vino, con nitrógeno 99.9%. Se adicionaron 720 ml de vino en un bote de Pyrex de 1L. Previamente se bajó el pH de la muestra con ácido sulfúrico 96% hasta 2 para desplazar el equilibrio hacia la forma libre del SO₂ y acelerar la desulfitación. Posteriormente se aplicó a) un flujo de nitrógeno constante de 7,8 L/min a temperatura ambiente durante 6 horas, b) un flujo de nitrógeno de 0,25 L/min a temperatura ambiente durante 24 horas y c) un flujo de 0,73 L/min en un baño a 40°C durante 3 horas. Las mediciones de SO₂ se realizaron a lo largo del tiempo por el método Rankine.



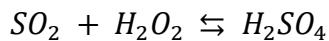
7.2.- *Desplazamiento del equilibrio asistido por vacío*

Para la eliminación del SO₂ libre se utilizó en este caso el Rotavapor® R-215 acoplado a un bomba de vacío V-700 de BÜCHI (Suiza). Previamente se bajó el pH de 720 mL de vino hasta 2. En un matraz específico de 500 mL para el rotavapor se introdujeron 250 mL de ese vino. Se utilizaron diversas condiciones de presión y agitación durante el experimento para comprobar cuál era más efectiva para llevar a cabo la desulfitación de las muestras. Las condiciones del rotavapor fueron: a) 135 r.p.m (revoluciones por minuto) a 25°C con una presión de 640 mbar durante 7 horas, b) 200 r.p.m. a 25°C a 50 mbar durante 4 horas y c) 35 mbar a 200 r.p.m durante 1 hora.

7.3.- *Oxidación con peróxido de hidrógeno*

Se trató de eliminar el SO₂ por oxidación con H₂O₂. Por una parte, a 50 mL de vino se les adicionó la cantidad estequiométrica de H₂O₂ calculada previamente en base a su contenido en SO₂ inicial total. A otros 50 mL de vino, también se les adicionó la misma

cantidad estequiométrica total pero en este caso un 20% del H₂O₂ cada 20 minutos, tardándose un total de 2 horas. Este último procedimiento se repitió con el vino VV.



8.- Determinación de la permeabilidad/estanqueidad de los botes

Para la comprobación de la permeabilidad /estanqueidad de los botes al oxígeno se utilizaron 8 botes testigo, de los 4 materiales diferentes comentados en el apartado 4. Cada tipo de bote se preparó por duplicado. A cada bote vacío se le pegaron 2 sensores de oxígeno Pst 6 (PreSens, Alemania), uno en la parte superior para controlar el oxígeno del espacio de cabeza y otro en la parte inferior para controlar el oxígeno disuelto. Se llenaron los botes con 300 mL de agua/etanol al 13% (v/v) y se sellaron las juntas entre los tapones y los botes con cola blanca comercial. Tanto el llenado como el sellado de los botes se realizaron en el interior de una cámara de atmósfera controlada con argón de Jacomex (Dagneux, Francia), en la cual el oxígeno era inferior al 0.002%. Los botes fueron introducidos en la cámara un día antes de su llenado para que perdieran todo el oxígeno propio del material. Una vez sellados se llevaron a estufas precalentadas previamente a 40°C y se mantuvieron allí los botes de PETG y los de PCB durante 11 días y los botes de PS y Pyrex 24 días bajo las mismas condiciones. Durante el tiempo que permanecieron en la estufa se monitorizó el oxígeno, en el espacio de cabeza y disuelto, diariamente mediante un analizador de oxígeno Normasense de Normacorc S.A. (Aubel, Bélgica).

9.- Procedimiento de preparación de los diferentes sistemas de oxidación

Se abrieron dos botellas de 4 vinos diferentes (CH, PC, BL y VT) dentro de la cámara de atmósfera controlada. El contenido de las botellas se mezcló en el interior de la cámara facilitando así su saturación en argón. Se tomaron muestras para la realización de los análisis iniciales de IPT, color, carbonilos libres y totales, SO₂ libre y total, acetaldehído libre y total, metales y aminoácidos. El resto del volumen de vino se dividió en dos fracciones, cada una de ellas destinada a uno de los dos sistemas de oxidación seleccionados.

Sistema de oxígeno disponible: Se adicionaron 300 mL de vino a botes Pyrex con un espacio de cabeza de aire de 300 mL. Cada vino se preparó por duplicado y se sellaron los botes Pyrex con cola blanca. Los botes se incubaron a 40 °C durante 7 días.

Sistema microoxigenador: En el interior de la cámara en ausencia de oxígeno se adicionaron 300 mL de vino a botes de PS de permeabilidad calculada experimentalmente (3,89 mg/L día a 40 °C) con un espacio de cabeza inicial de argón de 300 mL. Cada vino se preparó por duplicado y todos los botes microoxigenadores se sellaron con cola blanca. Los botes se incubaron a 40 °C durante 6 semanas.

Todos los botes (Pyrex y microoxigenadores) se introdujeron en la cámara un día antes de su llenado para que perdieran el oxígeno propio del material y llevaban un sensor Pst 6 colocado en la zona del espacio de cabeza.

Cada día se controló el consumo de oxígeno con el analizador Normasense. Para la toma de las medidas del oxígeno del espacio de cabeza, se sacaba cada bote de la estufa uno por uno, se medían y posteriormente se volvían a introducir.

Transcurrido el tiempo pertinente a 40 °C para cada sistema de oxidación se volvieron a analizar IPT, color, carbonilos libres y totales, SO₂ libre y total y acetaldehído libre y total.

10.- Análisis sensorial

Se llevaron a cabo dos tipos de análisis sensorial, uno de ellos cualitativo y el otro cuantitativo, con las muestras obtenidas de los 4 vinos en las tres condiciones estudiadas durante el experimento: referencia control (vino inicial), sistema de oxígeno disponible (vino en botes Pyrex durante 7 días) y sistema microoxigenador (vino en botes PS durante 6 semanas).

Análisis sensorial cuantitativo (self-adjusting scale): El panel sensorial consistía en un total de 10 panelistas, 8 mujeres y 2 hombres de entre 23-38 años de edad. Todos ellos pertenecían al personal del laboratorio con una larga experiencia en análisis sensorial y habían sido entrenados previamente en los atributos de oxidación específicos que se cuantificaron. Durante las sesiones de entrenamiento, los sujetos se familiarizaron con aromas de oxidación, sus descriptores y en el uso de una escala semiestructurada de 10 cm. Antes de la sesión se presentaron 3 referencias de los atributos a cuantificar. Se presentaron al panel 14 copas opacas (4 vinos x 3 tratamientos y 2 réplicas) y se pidió que evaluaran de manera ortonasal la intensidad de los atributos de oxidación miel, patata cocida y manzana oxidada. Las copas estaban etiquetadas con códigos de 3 cifras y se

dispusieron en los puestos de cata de forma aleatoria. A cada panelista se le entregó una hoja para realizar el test como la que se adjunta en el *Anexo 1* y se les pidió que puntuaran estos atributos desde el 0 (aroma nada intenso) a 10 (aroma muy intenso).

Análisis cualitativo de agrupación libre (Sorting task): Un panel de 14 miembros evaluó sensorialmente por el método de agrupación libre los 14 vinos (4 vinos x 3 tratamientos y 2 réplicas), los cuales se encontraban en copas opacas etiquetadas con códigos de 3 cifras y que se dispusieron de manera aleatoria en los puestos. Se pidió a los panelistas que agruparan las copas de manera libre en función de su similitud, además que definieran los grupos formados con un máximo de 3 descriptores por grupo, para obtener el perfil descriptivo. A cada panelista se le entregó unas hojas para la realización del test como la que aparece en el *Anexo 2 y 3*.

11.- Tratamiento de datos

Se utilizó el programa SPSS 15.0 para Windows para realizar los análisis de varianza (ANOVA) y se empleó el programa The Unscrambler para realizar los análisis de componentes principales (PCA). Para la realización de los cálculos de correlaciones sencillas se utilizó la hoja de cálculo de Excel 2013, además se utilizó otro complemento de Excel llamado el XLSTAT para el análisis jerárquico del cluster (HCA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- *Calibración de equipos*

Disolución de Grob: Es el test más conocido y utilizado para evaluar la calidad e idoneidad de la columna y de su cromatografía. Su objetivo es monitorizar la eficiencia de la columna y diagnosticar posibles problemas de adsorción y/o carácter ácido base. Esta disolución contiene compuestos de muy variada naturaleza que son capaces de interaccionar de maneras muy diferentes con las fases estacionarias. El cromatograma de la disolución de Grob que se ha obtenido se muestra en la *Figura 1*.

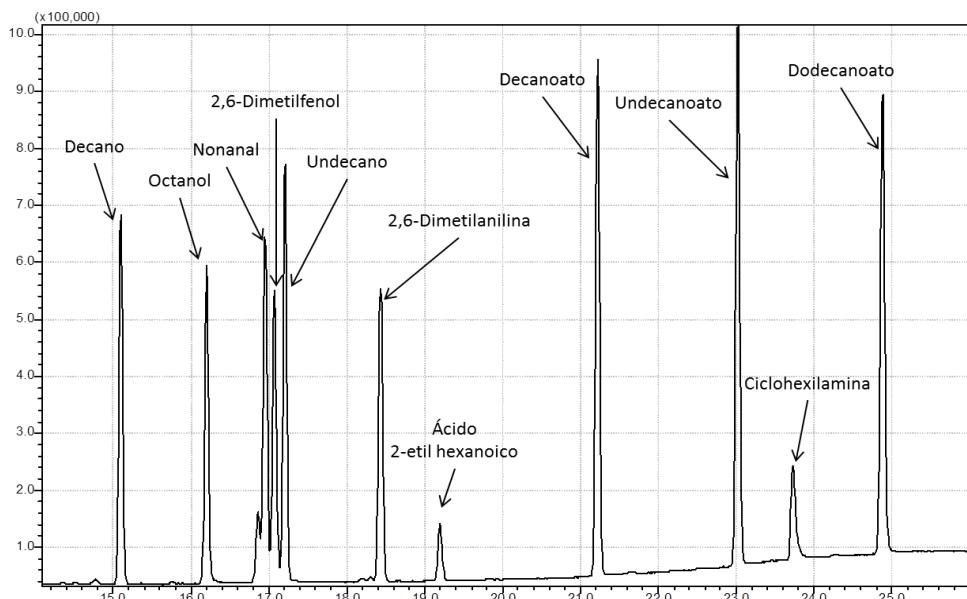


Figura 1: Cromatograma de la disolución de Grob obtenida.

Se puede observar que el perfil cromatográfico obtenido contiene todos los compuestos que se encontraban presentes en la muestra. Se puede apreciar que la columna no ha desarrollado actividad ácida, ya que como se observa en el cromatograma el pico de la ciclohexilamina no presentaba cola y el pico de ácido 2- etilhexanoico no había desaparecido. Además no se observaron problemas de adsorción ya que no se observaron picos anchos o con cola y los tiempos de retención se adecuaron a lo esperado.

Calibración del equipo: Para llevar a cabo la calibración del equipo se prepararon diferentes disoluciones madre para obtener una recta que nos sirviera para determinar la concentración de cada uno de los analitos en las muestras de vino. Una vez se tuvieron los cromatogramas se llevó a cabo la integración de los mismos. Las áreas integradas de los cromatogramas se normalizaron utilizando el patrón interno, obteniendo la áreas

relativas, para evitar los efectos racha. Las áreas relativas de los cromatogramas se usaron en el cálculo de la concentración interpolando los resultados a las rectas de calibrado constituidas para cada analito. Como para cada analito se calibró más de un orden de magnitud, se utilizaron rectas de calibración ponderadas. Este tipo de calibración otorga mayor influencia sobre la recta obtenida a los puntos de menor concentración, y por tanto, menor incertidumbre. En el *Anexo 4* se muestran, a modo de ejemplo, los picos obtenidos para cada aldehído, su masa/carga (m/z) y la concentración en cada caso.

2.- Desulfitación

El dióxido de azufre se sigue adicionando al vino como un antiséptico, protegiendo al vino de la proliferación microbiana, y como agente antioxidante. El dióxido de azufre añadido se combina con azúcares, polifenoles y aldehídos, pero siempre existe una fracción libre. El objetivo de esta memoria es encontrar un procedimiento para la determinación aldehídos “*de novo*”. En estudios anteriores (Bueno et al. 2014^a), se estableció que este hecho ocurre a concentraciones de dióxido de azufre libre ≤ 5 mg/L. Por lo tanto se quería partir de vinos desulfitados hasta esa cantidad de SO₂ libre y bajar de manera considerable el SO₂ total (20-30 mg/L de SO₂ total). Se probaron diversos métodos de desulfitación obteniendo resultados poco satisfactorios, teniendo en cuenta la cantidad de vino que se pretendía desulfitar. Todas las medidas de SO₂ se realizaron con el método Rankine.

Para llevar a cabo el estudio de la desulfitación se eligió el vino VT, un vino blanco con una concentración de SO₂ libre elevada de 32 ± 3 mg/L y una concentración de SO₂ total de 125 ± 17 mg/L. Se deseaba realizar una desulfitación rápida y eficiente de 4 botellas de 750 mL de vino. Para cada procedimiento se fue analizando el SO₂ libre y total a lo largo del tiempo. Las *Figuras 2* y *3* presentan respectivamente la concentración de SO₂ libre y total cuando se alcanza el objetivo establecido (< 5 mg/L de SO₂ libre) y extrapolando el tiempo al volumen deseado de 4 botellas.

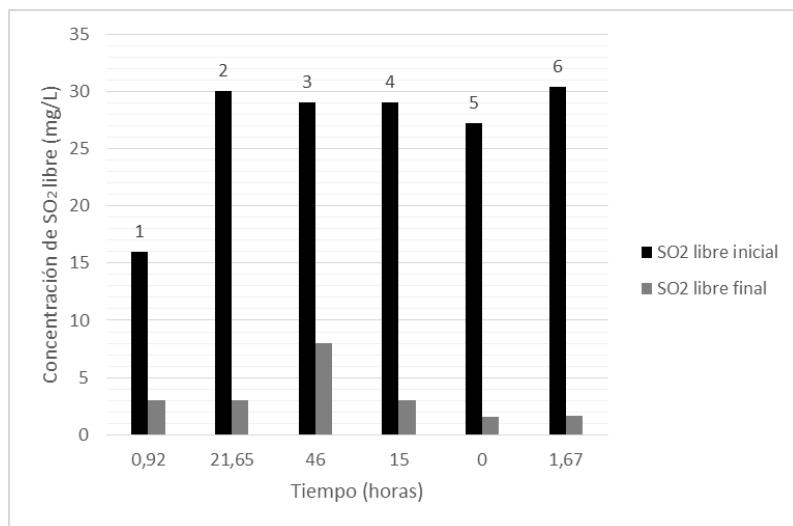


Figura 2. Comparación de la concentración de SO₂ libre en mg/L inicial y final a los diferentes tiempos extrapolados para desulfitar un total de 4 botellas según diversos métodos: 1) borboteo N₂ 7,8 L/min 2) borboteo N₂ 0,25 L/min 3) rotavapor 50 mbar 4) rotavapor 35 mbar 5) adición de la cantidad estequiométrica de H₂O₂ de golpe 6) adición de la cantidad estequiométrica de H₂O₂ de forma lenta.

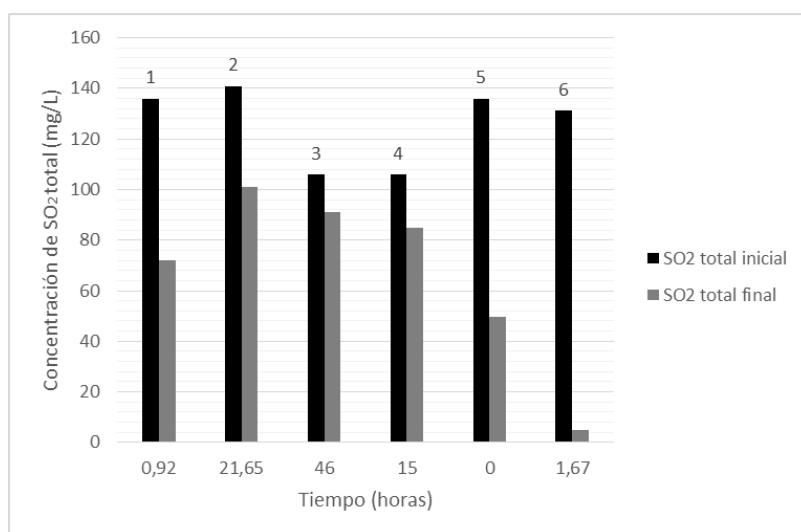


Figura 3. Comparación de la concentración de SO₂ total en mg/L inicial y final a los diferentes tiempos extrapolados para desulfitar un total de 4 botellas según diversos métodos: 1) borboteo N₂ 7,8 L/min 2) borboteo N₂ 0,25 L/min 3) rotavapor 50 mbar 4) rotavapor 35 mbar 5) adición de la cantidad estequiométrica de H₂O₂ de golpe 6) adición de la cantidad estequiométrica de H₂O₂ de forma lenta.

Se puede observar cómo se cumplió el primer objetivo, una concentración <5 mg/L de SO₂ libre, exceptuando el método de desplazamiento del equilibrio por vacío a 50 mbar. Pero en el caso del SO₂ total, los métodos utilizados para llevar a cabo la desulfitación no fueron tan efectivos.

En el caso del borboteo con un flujo de 7,8 L/min, la eliminación del SO₂ libre fue prácticamente total y para el caso del SO₂ total se consiguió eliminar aproximadamente un 50%. Usando un sistema múltiple de corriente de nitrógeno (*Imagen 1*) se pueden desulfitar las 4 botellas en aproximadamente 1 hora. El problema está en el coste del nitrógeno que sería un 60% de una botella (76€, si no se tiene en cuenta el alquiler de la botella). Además aún quedaba demasiado SO₂ total. Se probó entonces con un caudal menor, para ver si era igualmente efectivo pero con un menor coste. La cantidad de SO₂ libre final en el caso del borboteo con flujo de 0,25 L/min fue similar y se eliminó menos del 50% del SO₂ total, menos que en el caso anterior. Se descartó también porque se gastaba el 40% de la botella de nitrógeno (40€ sin el alquiler). Se consideró acelerar las reacciones mediante la utilización de calor, y para ello mientras se borboteaba el vino se mantuvo a 40°C en baño de agua. Al acelerar el desplazamiento del equilibrio también se aceleró el proceso de oxidación del vino, hasta el punto de percibirse sensorialmente, por lo que también se descartó este procedimiento (datos no mostrados). Se consideró entonces la opción de desulfitar las muestras por el método de desplazamiento del equilibrio asistido por vacío.

En este caso y a pesar de haber empleado diferentes condiciones de presión y r.p.m no se consiguió eliminar en proporción tanto de SO₂ total como con el borboteo. El SO₂ libre sí que se eliminó (< 5 mg/L). El problema en este caso fue la falta de comodidad. A 50 mbar se tardarían 46 horas en 12 ciclos de 3 horas y 50 minutos, y a 35 mbar se tardarían 15 horas (12 ciclos de 1 hora y 15 minutos) para desulfitar las 4 botellas.

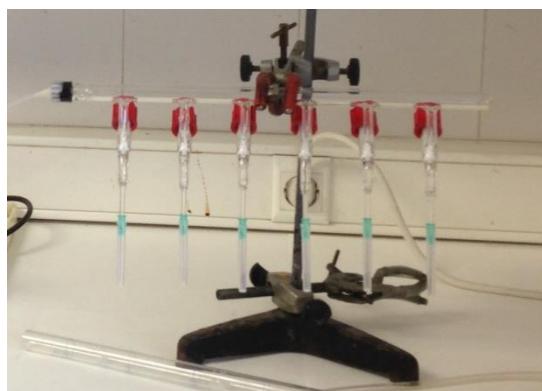


Imagen 1: Sistema múltiple de corriente de nitrógeno

Tras los intentos de eliminar el SO₂ desplazando el equilibrio, se pasó a probar su eliminación por oxidación con H₂O₂. Ya que se añadía la cantidad estequiométrica necesaria, se esperaba la eliminación total del SO₂ en estos experimentos. De nuevo el SO₂ libre bajó de los 5 mg/L, tanto al adicionar el H₂O₂ de golpe como poco a poco. Como se puede observar en la *Figura 3*, solamente la oxidación con peróxido de hidrógeno adicionándolo en una cantidad estequiométrica, de forma lenta y periódica, consiguió bajar la concentración de SO₂ total también por debajo de 5 mg/L. Viendo los resultados obtenidos se decidió comprobar la efectividad de éste último procedimiento. Se utilizó el vino Viñas del Vero (VV), con un SO₂ total de partida de 75,2 mg/L y un SO₂ libre inicial de 17,60 mg/L, que son niveles inferiores a los del VT utilizado. Las comparaciones para los vinos VT y VV para el SO₂ medido tras ser oxidado se presentan en las *Figuras 4* y *5*. Se le adicionó lentamente el peróxido de hidrógeno y se pudo observar que los resultados en el SO₂ libre son similares (*Figura 4*) y la cantidad de SO₂ total remanente era superior al 20% del inicial como se puede observar en las *Figura 5*.

Esta desulfuración rápida se descartó porque en el vino tinto probado el peróxido de hidrógeno adicionado está oxidando otros compuestos, posiblemente polifenoles, que también juegan un papel importante en la oxidación del vino.

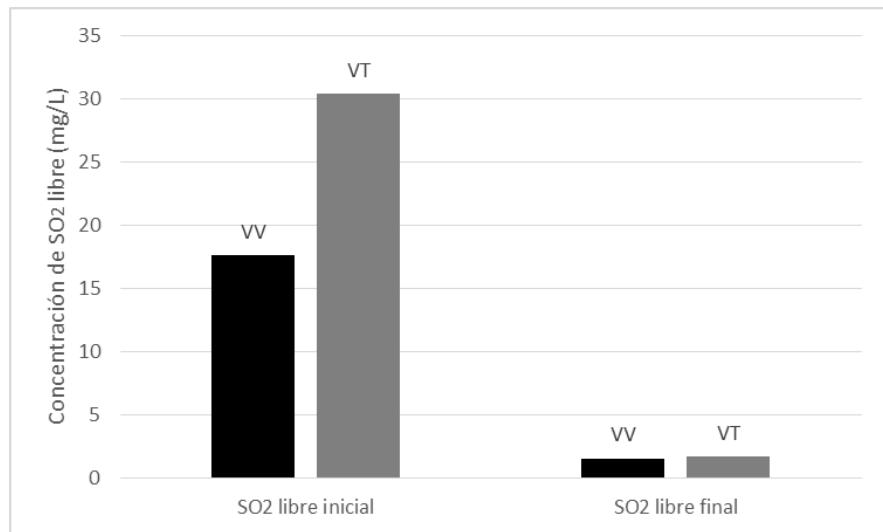


Figura 4: Comparación entre la concentración de SO₂ libre antes y después de desulfurar los vinos Viñas del Vero (VV) y Veliterra (VT) con la cantidad estequiométrica de peróxido de hidrógeno adicionando el 20% cada 20 minutos.

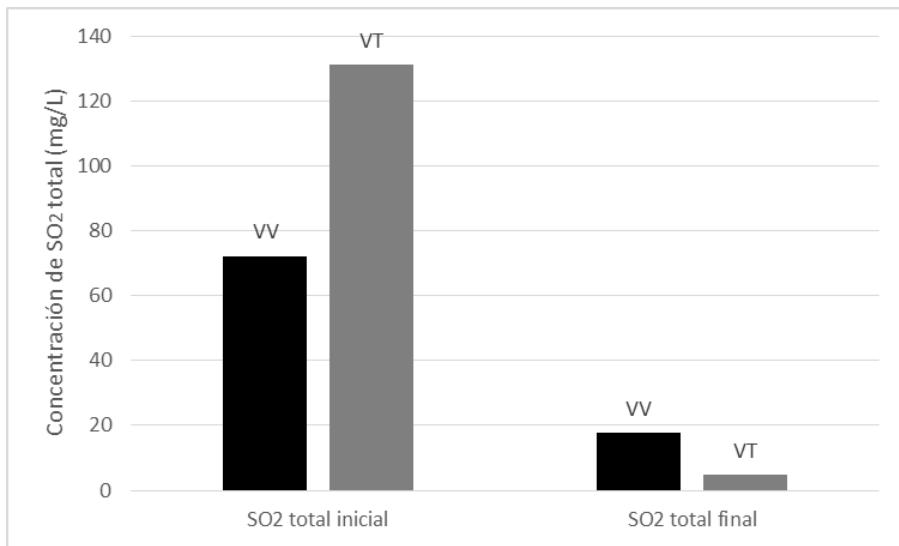


Figura 5: Comparación entre la concentración de SO₂ total antes y después de desulfitar los vinos Viñas del Vero (VV) y Veliterra (VT) con la cantidad estequiométrica de peróxido de hidrógeno adicionando el 20% cada 20 minutos.

3.- Permeabilidad/estanqueidad de los botes testigo

Tras tomar la decisión de que no íbamos a eliminar previamente SO₂, debíamos aportar a los vinos mayor cantidad de oxígeno, suficiente para oxidar primero el SO₂ y luego los aldehídos. Además no sólo se tuvo que realizar un seguimiento de los carbonilos que se fueron formando, sino también del sulfuroso, libre y total. Se ideó un sistema microoxigenador (botes de diferentes materiales) para simular las condiciones que sufre el vino dentro en condiciones de oxigenación controlada. Por otra parte, se ideó un sistema de oxígeno disponible que se asemejaría a un accidente en bodega donde el vino capta oxígeno de golpe en mayores proporciones.

Se planteó el uso de un sistema de botes cuya permeabilidad fue estudiada. Se eligieron inicialmente 4 tipos de materiales diferentes: PETG, PCB, PS y Pyrex. El primer paso fue determinar la permeabilidad de cada uno de ellos. Los tres primeros recipientes se eligieron como modelos de microoxigenadores, y el recipiente de Pyrex se eligió como un recipiente donde la permeabilidad sería prácticamente nula y se estudió su estanqueidad. Dentro de la cámara de anoxia, a cada recipiente se le adicionaron 300 mL de disolución hidroalcohólica al 13% (v/v) en etanol. Los botes se cerraron y sellaron dentro de la cámara. Una vez los recipientes estuvieron preparados, se introdujeron en estufas a 40°C para acelerar las reacciones de oxidación. Los resultados obtenidos tras

medir diariamente el O₂ en el espacio de cabeza y el disuelto en el líquido se pueden observar en la *Figura 6*. Se comprobó que la concentración de oxígeno disuelto en comparación al del espacio de cabeza era despreciable en todos los casos (<4%), por lo que de cara a la preparación de los recipientes para los vinos reales se pondría solo un sensor en la parte superior. Las medidas del O₂ del espacio de cabeza se obtuvieron en hPa por lo que mediante la *Ecuación 3* se transformó a mg/L. Las medidas de O₂ disuelto se obtienen directamente en mg/L.

Ecuación 3:

$$\frac{mg}{L} \text{ de } O_2 = \frac{hPa \text{ medidos} \times 0,00098692 \frac{atm}{hPa}}{\frac{volumen \text{ L}}{0,082 \frac{atm}{mol \text{ K}} \times 295 \text{ K}}} \times 32000 \text{ mg/mol}$$

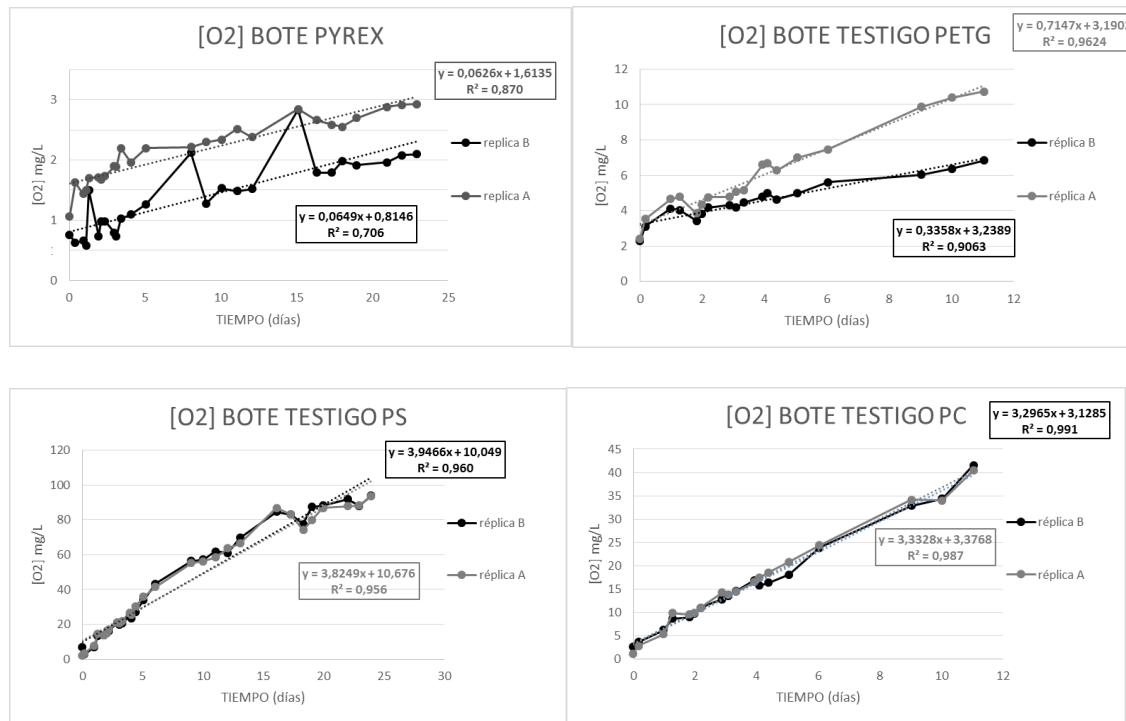


Figura 6: Consumo de oxígeno en mg/L de cada bote frente al tiempo en días. El oxígeno consumido se representa como el sumatorio entre el oxígeno que se ha acumulado en el espacio de cabeza más el que se ha disuelto en el líquido.

Estudiando las pendientes (mg/L día) obtenidas de los gráficos, las conclusiones que se obtienen son las siguientes. En los botes Pyrex la entrada de oxígeno fue de 0,064 mg/L día, una cantidad despreciable frente a los 300 mL de cámara de aire que se deseaba poner en los botes. Es decir, que en 7 días que se pensaba mantener el experimento entrarían 0,45 mg/L despreciables frente a los 262 mg/L teóricos de oxígeno de la cámara de aire. La pendiente de la recta es la misma por lo que el oxígeno que entra es el mismo, pero se observan diferencias entre las réplicas A y B, posiblemente por el oxígeno residual inicial del bote. Por lo tanto, este tipo de bote por ser estanco se eligió como modelo de sistema de oxígeno disponible en el espacio de cabeza.

Los resultados de la permeabilidad de oxígeno en cada recipiente microoxigenador se muestran en la *Tabla 4*. La reproducibilidad de los botes PS y PCB fue muy buena, con pendientes similares y coeficientes de correlación >95%. Los botes PETG no fueron tan reproducibles, no entró la misma cantidad de oxígeno en ambos. A la vista de los resultados, se seleccionó el bote PS como el microoxigenador para utilizar con vinos reales, ya que en un estudio anterior (Bueno et al. 2014^b) se estimó que el consumo de O₂ necesario para llegar a la zona de formación, estaría entre 40-100 mg/L.

Tabla 4: Comparación de la permeabilidad al oxígeno de los diferentes tipos de microoxigenadores a una temperatura de 40°C

Microoxigenador	Permeabilidad O ₂ mg/L día
PS	3,88
PCB	3,31
PETG	0,52

4.- Consumo de oxígeno de las muestras de vino bajo los diferentes sistemas de oxidación

Microoxigenación

Los resultados del consumo de oxígeno observados para cada vino en los microoxigenadores (botes PS) se detallan en la *Figura 7*. El consumo de O₂ se calculó como la diferencia del oxígeno que permeaba (calculado previamente a través de la permeabilidad del bote testigo a 40°C) y el oxígeno que se medía diariamente mediante los sensores situados en el espacio de cabeza. Las mediaciones del espacio de cabeza se tomaban varias veces al día, al inicio del experimento. Observando las fluctuaciones causadas por las bajadas de temperatura al realizar las mediciones, se estableció que la mejor manera era medir siempre a la misma hora cada día. Se observó que los cambios bruscos de temperatura afectaban al equilibrio entre el oxígeno disuelto en el vino y el oxígeno que se encontraba en el espacio de cabeza, y esto podría explicar las fluctuaciones que se observan en los gráficos.

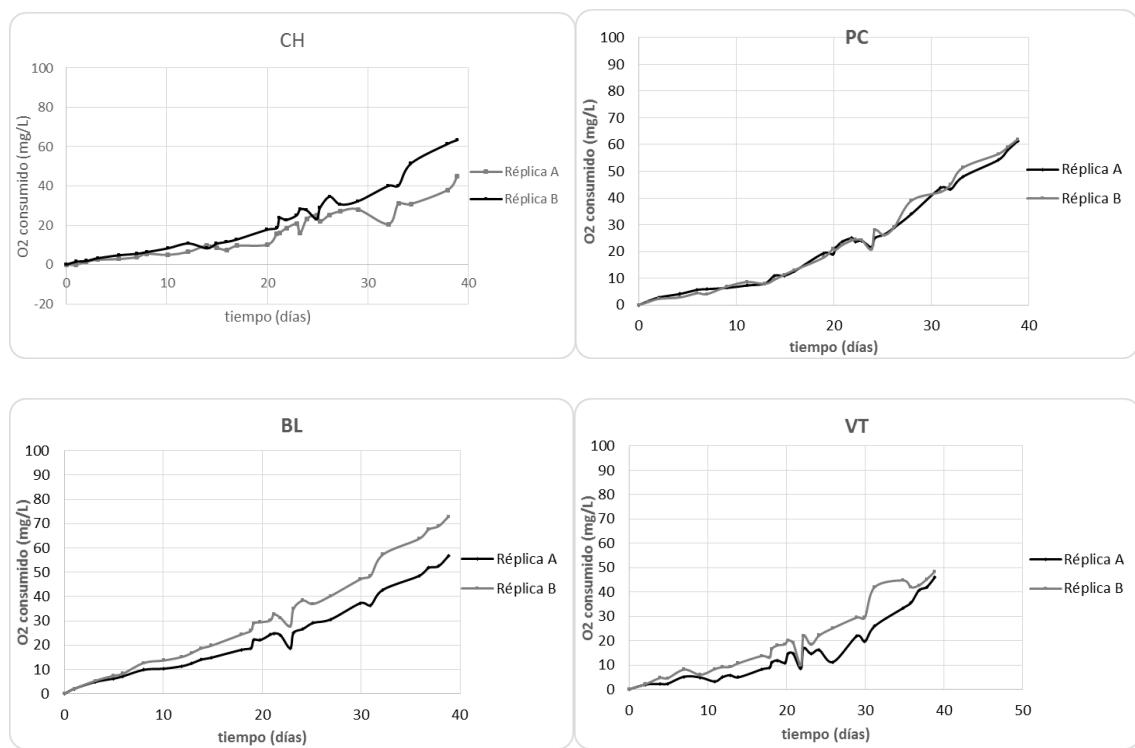


Figura 7: Consumo de oxígeno en mg/L de los 4 vinos en los microoxigenadores PS frente al tiempo en días.

Se realizaron mediciones del oxígeno durante 42 días y como se puede observar sorprende que el consumo de los vinos tintos es bastante similar. El vino CH consumió $54,8 \pm 12,2$ mg/L, el vino PC, mucho más reproducible, consumió $61,6 \pm 0,5$ mg/L de oxígeno y el vino BL $64,8 \pm 11,4$ mg/L. Las diferencias entre las réplicas a veces se explican por la imprecisión del sensor, un 3% de la medida obtenida (especificaciones técnicas recogidas en el manual). El vino blanco VT tuvo un consumo de oxígeno ligeramente menor en comparación con los vinos tintos ($47,1 \pm 1,7$ mg/L) como se esperaba. Este hecho está relacionado con la menor cantidad de polifenoles presentes en el vino blanco. Se puede observar también, que con el método de microoxigenación el consumo de oxígeno se va acelerando.

Sistema de oxígeno disponible

Para el sistema de oxígeno disponible el O₂ consumido se calculó como la concentración de oxígeno disponible inicial (262 mg/L) menos el medido en el espacio de cabeza. Estos valores parecían demasiado bajos. Además, se observó que la réplica A y la réplica B de los botes Pyrex de todos los vinos habían sido demasiado diferentes, seguramente debido al modo de preparación. Para asegurar que los bajos valores de consumo de oxígeno en los botes Pyrex no se debían a que inicialmente no hubiera O₂ suficiente, se preparó otro bote testigo diferente, con 300 mL de vino sintético con dos sensores (en el espacio de cabeza y en el líquido) y que se preparó con cámara de aire y se selló de la misma forma que los botes con vinos reales. El bote se sacó de la cámara antes de sellarlo, se esperaron 30 segundos a que se intercambiara el argón por aire y se forzó la entrada de más aire en el espacio de cabeza pipeteando 10 veces con una pipeta Pasteur de 3 mL vacía. La mayor parte de la irreproducibilidad viene dada en el paso del sellado con cola, cuyo tiempo variaba, obteniéndose distintas cantidades de O₂ inicial en el espacio de cabeza de cada bote. Se esperaba que en el espacio de cabeza de partida hubiera 262 mg/L de oxígeno disponible, para que el vino captara lo que deseara. Pero realizando mediciones rápidas y consecutivas con el sensor en este bote testigo, se comprobó que se partía de una concentración aproximadamente de 100 mg/L, que serían suficientes para asegurar que cada vino tomara el oxígeno que quisiera. Al no controlar exactamente la cantidad inicial de O₂ que había en los botes Pyrex, no se pudo calcular el consumo de oxígeno de los vinos a través de las medidas tomadas con el sensor.

Para los botes Pyrex se calculó el O₂ consumido utilizando la diferencia de absorbancia medida a 420 nm. En un estudio realizado anteriormente se encontró una correlación entre el consumo de oxígeno medido con el mismo sensor y la diferencia de absorbancia a 420 nm, como se explica más detalladamente en Ferreira et al. 2014^a. Para determinar si los resultados obtenidos por este método eran comparables a los del sensor en nuestras muestras, se realizó un test t por parejas, relacionando ambos métodos con los datos obtenidos en los microoxigenadores PS. Se concluyó que no había diferencias significativas entre unos resultados y otros, por lo que para calcular el consumo de oxígeno de los botes Pyrex se utilizó la correlación antes descrita (diferencia de absorbancia a 420 nm). Los resultados obtenidos del consumo de oxígeno de los 4 vinos estudiados se muestran en la *Figura 8*.

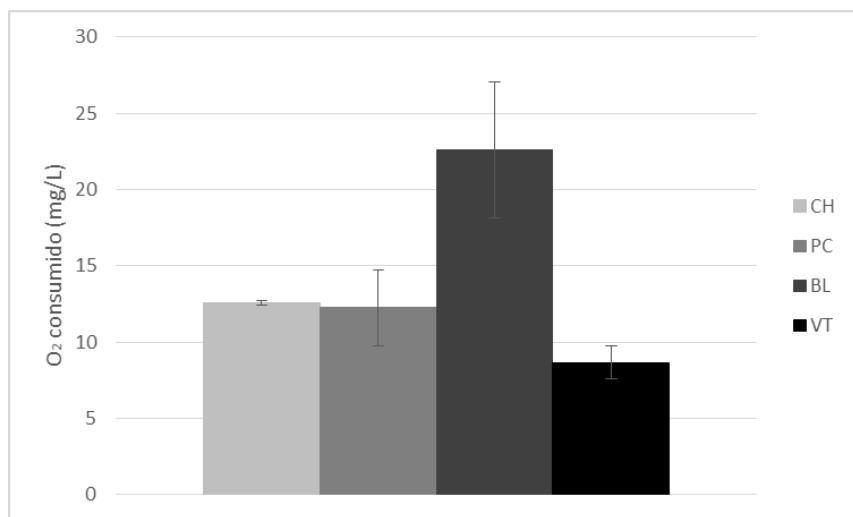


Figura 8: Consumo de oxígeno de cada vino calculada mediante la absorbancia a 420 nm en el sistema de oxígeno disponible tras una semana a 40°C.

Se puede observar que el vino BL ha sido el que mayor cantidad de oxígeno a consumido con el sistema de oxígeno disponible, prácticamente el doble en comparación con el resto de los vinos. El consumo de los vinos CH y PC ha sido prácticamente el mismo, unos 13 mg/L. En el caso del VT, que es el vino blanco, el consumo ha sido menor en comparación con los vinos tintos, como ocurrió en el caso de los microoxigenadores. Los resultados de consumo de oxígeno en el Pyrex son concordantes con los resultados obtenidos con los microoxigenadores.

5.- Parámetros de formación: comparaciones entre los distintos sistemas de oxidación

Se han evaluado los distintos sistemas de oxidación (sistemas de oxígeno disponible y microoxigenación) a través de diversos parámetros en base a los resultados obtenidos de oxígeno consumido y SO₂ (*Anexo 5*) y la concentración de aldehídos (*Anexo 6*). Solamente se han calculado estos parámetros para los 3 aldehídos sensorialmente más importantes (metional, fenilacetaldehído y acetaldehído) y para los otros 3 aldehídos de Strecker (isobutiraldehído, 2-metilbutanal, isovaleraldehído), que en estudios anteriores (Bueno et al. 2014^b) han cobrado importancia como indicadores de oxidación. El resto de los resultados obtenidos de los carbonilos libres y totales se recogen en el *Anexo 7*.

El primer parámetro estudiado fue la *formación neta* de aldehído. Se calculó como la diferencia de aldehído total en el momento final y aldehído total en el momento inicial (*Tabla 5*).

Tabla 5: Formación neta en µg/L, exceptuando el acetaldehído (mg/L) de los aldehídos bajo los dos sistemas de oxidación en los 4 vinos estudiados.

Formación neta														
Isovaleraldehído						Isobutiraldehido						2-metilbutanal		
	Pyrex		PS			Pyrex		PS			Pyrex		PS	
	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s
CH	16,9	3,54	180	15,8	10,6	4,45	70,1	6,42	1,17	0,26	10,3	0,05		
PC	18,8	4,65	74,2	5,95	6,74	0,56	44,93	4,83	0,71	0,08	4,39	0,43		
BL	39,2	19,9	162	2,03	8,66	5,00	45,5	3,37	1,43	0,54	7,23	0,25		
VT	23,7	2,20	113	20,3	3,14	0,44	24,1	6,38	0,56	0,02	2,07	0,38		
Acetaldehido						Metional						Fenilacetaldehido		
	Pyrex		PS			Pyrex		PS			Pyrex		PS	
	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s
CH	-18,2	3,91	-0,41	10,2	3,17	0,22	16,1	0,37	25,5	4,89	86,3	1,03		
PC	-12,2	0,64	5,77	3,49	1,68	0,06	5,93	0,87	28,0	5,27	54,8	4,22		
BL	18,5	1,10	30,7	0,53	3,49	0,39	13,7	0,36	44,9	8,66	74,6	4,49		
VT	15,2	8,21	7,98	4,02	1,17	0,17	9,85	3,29	16,7	5,94	111	30,6		

En ambos sistemas de oxidación las concentraciones de SO₂ libre fueron inferiores a 5 mg/L y como se observa en la *Tabla 5*, se ha logrado en ambos casos llegar hasta el punto en el que comienza la formación de aldehídos “*de novo*”. Cabe destacar que el acetaldehído en el caso de los vinos CH y PC da una cifra negativa. Eso nos indica que había mayor concentración de acetaldehído en el vino inicial que en el vino oxidado en los sistemas de cámara de aire, es decir desaparece, se oxida o reacciona. Se puede observar que la formación neta ha sido mayor en los microoxigenadores mantenidos 6 semanas a 40°C.

Ya que los botes han estado diferentes períodos de tiempo consumiendo O₂ a 40 °C, se decidió normalizar la formación neta por los mg/L del oxígeno consumido en cada recipiente (*Tabla 6*). Se puede observar que la diferencia una vez normalizando los recipientes no es tan elevada.

Tabla 6: Formación de aldehídos normalizada por el oxígeno consumido para cada sistema de oxidación en los 4 vinos estudiados.

Formación normalizada por el oxígeno consumido													
Isovaleraldehído				Isobutiraldehido				2-metilbutanal					
	Pyrex	PS	Pyrex	PS	Pyrex	PS	Pyrex	PS	Pyrex	PS	Pyrex	PS	
	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	
CH	1,35	0,30	3,41	1,05	0,80	0,36	1,31	0,28	0,09	0,02	0,19	0,04	
PC	1,53	0,07	1,20	0,08	0,57	0,16	0,72	0,07	0,06	0,01	0,07	0,01	
BL	1,68	0,55	2,53	0,41	0,37	0,15	0,70	0,15	0,06	0,01	0,11	0,01	
VT	2,75	0,09	2,39	0,51	0,37	0,10	0,51	0,10	0,04	0,00	0,04	0,00	
Acetaldehido				Metional				Fenilacetaldehído					
	Pyrex	PS	Pyrex	PS	Pyrex	PS	Pyrex	PS	Pyrex	PS	Pyrex	PS	
	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	
CH	- 1,45	0,29	0,01	0,19	0,25	0,02	0,30	0,06	2,03	0,42	1,61	0,34	
PC	-1,02	0,25	0,09	0,06	0,14	0,02	0,09	0,14	2,29	0,03	0,88	0,08	
BL	0,83	0,11	0,48	0,08	0,16	0,01	0,21	0,04	1,99	0,01	1,17	0,28	
VT	1,83	0,17	0,16	0,08	0,14	0,04	0,21	0,07	1,90	0,45	2,37	0,73	

El tercer parámetro considerado fue la normalización de la formación de aldehído descontando la cantidad de oxígeno invertido en oxidar el SO₂ (*Tabla 7*), teniendo en cuenta que cada mol de oxígeno oxida dos moles de SO₂

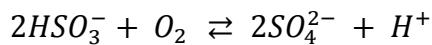


Tabla 7: Formación de aldehídos normalizada por el oxígeno consumido no invertido en oxidar el SO₂. Resultados mostrados solo para vinos tintos.

Formación neta normalizada por el oxígeno consumido no invertido en SO ₂													
Isovaleraldehído							Isobutiraldehido				2-metilbutanal		
Pyrex		PS		Pyrex		PS		Pyrex		PS			
Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s
CH	3,39	1,07	4,10	1,42	2,04	1,10	1,57	0,40	0,23	0,07	0,23	0,06	
PC	3,03	0,48	1,38	0,09	1,10	0,19	0,83	0,08	0,11	0,01	0,08	0,01	
BL	2,24	0,60	2,80	0,50	0,49	0,17	0,78	0,09	0,08	0,01	0,12	0,02	
Acetaldehido							Metional				Fenilacetaldehido		
Pyrex		PS		Pyrex		PS		Pyrex		PS			
Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s	Media	s
CH	-3,58	0,37	0,02	0,22	0,63	0,11	0,35	0,08	5,12	1,55	1,93	0,44	
PC	-1,98	0,28	0,10	0,06	0,27	0,01	0,11	0,01	4,52	0,44	1,02	0,88	
BL	1,12	0,22	0,53	0,09	0,21	0,03	0,23	0,05	2,68	0,18	1,30	0,33	

Los resultados del vino VT para el parámetro de formación de aldehídos normalizado por el oxígeno consumido no invertido en oxidar el SO₂ se presentan por separado en la *Tabla 8*. Los valores negativos, del sistema de oxígeno disponible, en este caso no significan lo mismo que en las tablas anteriores. Teóricamente este vino no ha consumido suficiente oxígeno para explicar la oxidación de todo el SO₂, por lo tanto no se debería haber comenzado la formación de aldehídos. Sin embargo en los valores netos se ha visto formación. Estos resultados son concordantes con un estudio realizado por Vanesa Carrascón y Ernesto Franco, aún pendiente de publicación. Este estudio se realizó con el vino VT 2012, en condiciones anoxia a 50°C. Se observó que 13 mg/L de SO₂ total desaparecieron en 7 días y hasta 20 mg/L a lo largo de 23 días (*Tabla 9*). Esta desaparición confirma que el vino estudiado VT 2013 sí que invirtió oxígeno en oxidar aldehídos.

Tabla 8: Formación de aldehídos normalizada por el oxígeno consumido no invertido en oxidar el SO₂. Resultados mostrados solo para el VT

Formación neta normalizada por el oxígeno consumido no invertido en SO ₂												
Isovaleraldehido				Isobutiraldehido				2-metilbutanal				
Pyrex		PS		Pyrex		PS		Pyrex		PS		
Media	s.d	Media	s.d	Media	s.d	Media	s.d	Media	s.d	Media	s.d	
VT	-11,5	1,48	0,08	1,42	-1,52	0,16	1,04	0,39	-0,17	0,01	0,08	0,02
Acetaldehido				Metional				Fenilacetaldehido				
Pyrex		PS		Pyrex		PS		Pyrex		PS		
Media	s.d	Media	s.d	Media	s.d	Media	s.d	Media	s.d	Media	s.d	
VT	-7,31	3,72	0,32	0,13	-0,57	0,06	0,42	0,18	-8,13	3,17	4,81	1,85

Tabla 9: Concentración de SO₂ total medido al mantener el vino VT 2012 a 50°C sin oxígeno durante 23 días.

Días	0	7	23
SO ₂ total (mg/L)	166	153	147

Se realizaron ANOVA de dos factores (sistema de oxidación, vino y se estudió la interacción entre ambos) de cada parámetro calculado. La significación de los resultados obtenidos se muestra en la *Tabla 10*.

Se puede observar que en la formación neta se dan muchas interacciones, pero cuanto más se normaliza el parámetro, éstas interacciones disminuyen y el nivel de significación de los factores también. Como ejemplo para explicar que es una interacción se construyó la *Figura 9*. En este estudio una interacción entre los factores significa que los sistemas de oxidación se comportan de forma diferente para cada vino estudiado.

Tabla 10: Nivel de significación de los resultados de los ANOVA de los diferentes parámetros de formación con respecto al sistema de oxidación, al tipo de vino y a la interacción entre ambos.

	Sistema de oxidación	Vino	Sistema oxidación x Vino
Formación neta			
acetaldehído	*	***	*
isobutiraldehído	***	***	**
2-metilbutanal	***	***	***
isovaleraldehído	***	**	**
metional	***	**	**
fenilacetaldehído	***	n.s.	*
Formación / O₂ consumido			
acetaldehído	n.s.	**	**
isobutiraldehído	*	**	n.s.
2-metilbutanal	**	***	*
isovaleraldehído	n.s.	*	*
metional	n.s.	**	n.s.
fenilacetaldehído	*	n.s.	*
Formación / O₂ consumido no invertido en SO₂			
acetaldehído	***	***	***
isobutiraldehído	n.s.	*	n.s.
2-metilbutanal	n.s.	**	n.s.
isovaleraldehído	n.s.	n.s.	n.s.
metional	**	***	*
fenilacetaldehído	***	n.s.	n.s.

* < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001

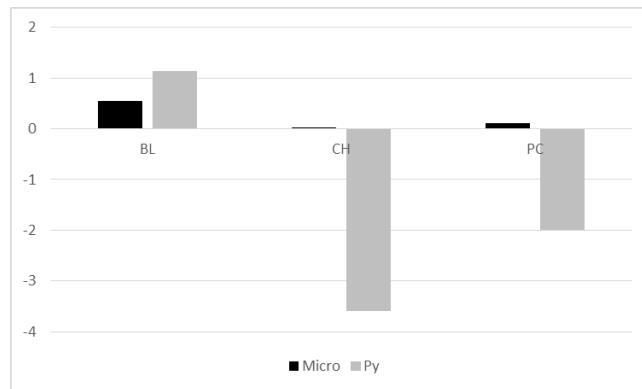


Figura 9: Ejemplo de la interacción entre el vino y el sistema de oxidación para el parámetro de formación del acetaldehído corregido por el O₂ consumido no invertido en oxidar el SO₂. Micro: microoxigenador; Py: sistema de oxígeno disponible (Pyrex).

A la vista de la falta de significación para algunos de los aldehídos, en el parámetro de formación normalizado por el oxígeno consumido no invertido en SO₂, para el factor sistema de oxidación (*Tabla 10*) se buscaron correlaciones entre ambos sistemas. Para el isobutiraldehído (*Figura 10*) se puede observar como a medida que se van normalizando los parámetros, la correlación entre ambos sistemas de oxidación es mayor. En este ejemplo y para el 2-metilbutanal la pendiente llega a ser muy similar a 1, y por lo tanto los parámetros de ambos sistemas de oxidación son muy similares. En los *Anexos 8-12*, se muestran las correlaciones de los restantes aldehídos.

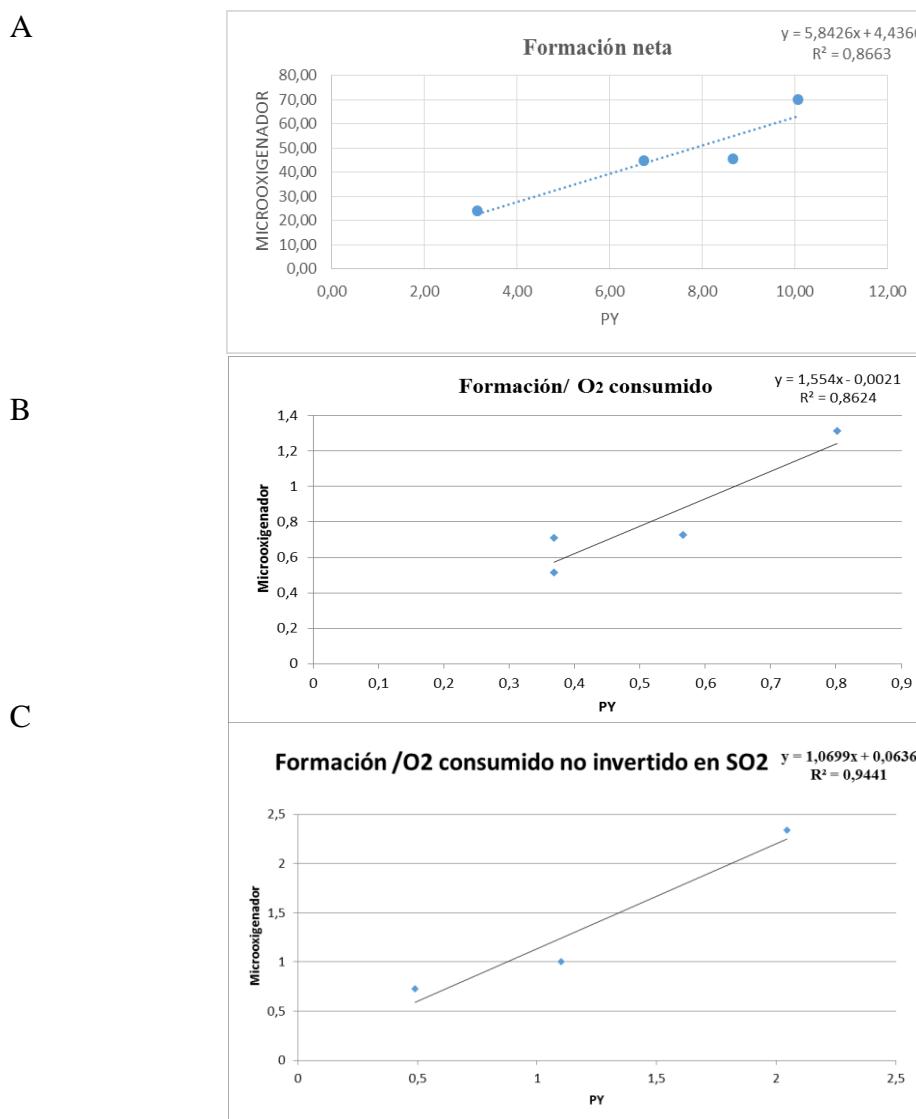


Figura 10: Correlación entre los sistemas de oxidación para la concentración de isobutiraldehído a medida que se van normalizando los parámetros. A) Formación neta; B) Formación/ oxígeno consumido; C) Formación/ oxígeno no invertido en oxidar el SO₂. Py: sistema de oxígeno disponible.

Las correlaciones obtenidas sorprenden, ya que en función de estos datos podría plantearse la hipótesis de que la formación de aldehídos es independiente del sistema de oxidación que se ha usado.

6.- *Correlaciones con aminoácidos y metales*

En el presente estudio se quiso también correlacionar la presencia de metales y aminoácidos con los parámetros calculados y con las concentraciones de carbonilos totales iniciales, ya que en estudios anteriores (Ferreira et al. 2014^a) se habían encontrado indicios de que podría haber ciertas relaciones. Las concentraciones obtenidas tanto de los aminoácidos como de los metales se pueden observar en la tabla de todos los resultados en el *Anexo 13*.

Aminoácidos: No hay correlación entre los aminoácidos y los parámetros de formación calculados pero se observó que solamente para el metional había una correlación clara con la metionina, en concordancia con lo observado en Ferreira et al. 2014^b. En el resto de los 4 aldehídos de Strecker estudiados se observó que había una cierta tendencia pero no se puede afirmar que a mayor concentración inicial del aminoácido precursor mayor cantidad de aldehídos totales iniciales. Podría deberse a que no se han estudiado suficientes vinos.

Metales: No se han encontrado correlaciones entre los metales y los parámetros de formación calculados, ni con las concentraciones de aldehído total inicial. Como se puede observar en el *Anexo 13* no se ha podido estudiar las correlaciones con el cobre porque se halla por debajo del límite de detección en la mayoría de los vinos.

7.- Análisis sensorial

Análisis cualitativo de agrupación libre (sorting task): En el dendograma obtenido del test de agrupación libre (*Figura 11*) podemos ver como se agrupan las diferentes muestras. Fueron concordantes con lo esperado, ya que la mayoría de los panelistas agruparon los vinos por su grado de oxidación. Podemos observar que las réplicas se encuentran agrupadas juntas.

Los vinos iniciales y aquellos contenidos en botes Pyrex se englobaron en el grupo I, donde hemos visto que el grado de oxidación fue menor. Los jueces describieron este grupo como especiado, fruta roja, compota. En su mayoría son vinos envejecidos en barrica de roble, lo que justifica las notas especiadas, de cuero y fruta pasa. Destaca que en los descriptores no encontramos ninguna nota relacionada con la oxidación. Esto puede ser debido a que una ligera formación de aldehídos (metional) ha sido correlacionada con aromas agradables de fruta madura por otros autores (San Juan et al 2011). Además en el caso de los vinos almacenados en los botes Pyrex (vinos PC y BL) se observa un aumento en la concentración libre de diacetilo (aroma a fresa/nata) y 2,3-pentanodiona (aroma a gominolas) (*Anexo 7*) cuyos aromas agradables podrían enmascarar el leve olor de oxidación.

Por otro lado, el vino blanco de referencia y el contenido en el bote Pyrex fueron agrupados conjuntamente en el grupo II y fueron descritos como fruta tropical, fruta blanca, floral, sin detectar tampoco ninguna nota de oxidación. En el grupo III se han agrupado las dos muestras de vino blanco contenido en los botes microoxigenadores, este grupo fue descrito como basura, oxidado. El grupo con más descriptores de oxidación fue el grupo IV, donde se agruparon todas las muestras de vino tinto que habían estado contenidas en los botes microoxigenadores, coincidiendo con los resultados de formación de aldehídos que también fue mucho mayor. Todas las muestras fueron descritas como fruta pasa, miel, verdura cocida.

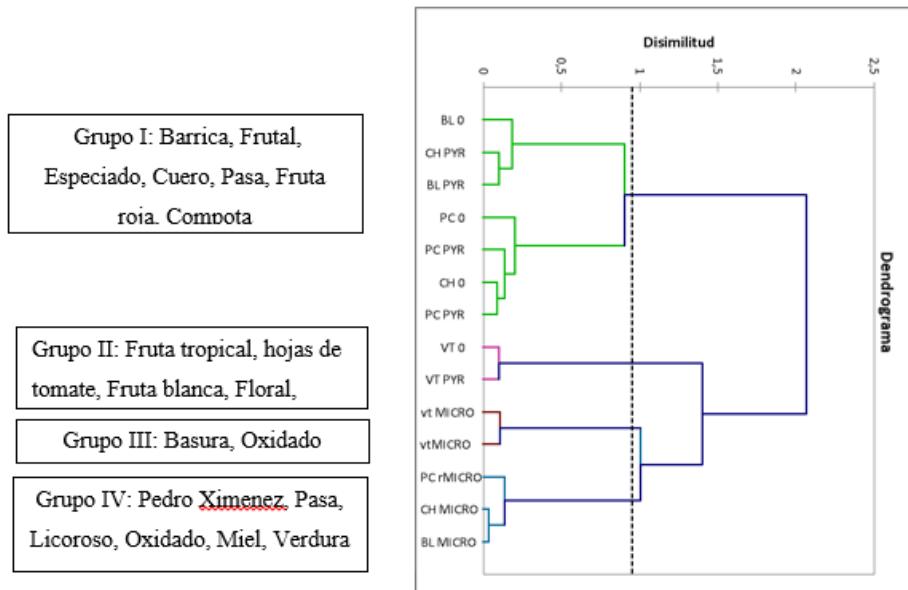


Figura 11: Dendrograma obtenido por medio de cluster de los datos en el test de agrupación libre. Descriptores más empleados por los jueces en la descripción de los grupos. CH: Coto de Hayas; BL: Barón de Ley; PC: Pago de Capellanes; VT: Veliterra; PYR: Pyrex; MICRO: Microoxigenadores y 0: Vino de referencia.

Análisis sensorial cuantitativo (self-adjusting scale): Antes de comenzar el tratamiento de estos datos se realizó un ANOVA de tres factores (juez, muestra y réplica). Se encontró interacción muestra por juez y por ello se realizó un PCA para cada atributo para ver cómo se distribuyen los jueces, y así asegurar que todos los jueces utilizaban la escala de la misma forma. Para cada atributo hubo dos jueces que no valoraron de la misma forma que el resto y no se tuvieron en cuenta sus puntuaciones a la hora de realizar el análisis estadístico. A modo de ejemplo se muestra el PCA para el atributo miel y como se puede observar en la *Figura 12* se descartaron los jueces MA y J. Eliminados los jueces, se repitió el mismo ANOVA y no se encontraron diferencias significativas para las réplicas. Para cada juez se calculó el valor medio de las réplicas. Tras esta operación se realizó un ANOVA de dos factores, sistema de oxidación y vino. No se encontraron interacciones entre ambos factores por lo que se presentan los datos por separado. En los casos donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) se realizó un análisis tipo Duncan para formar agrupaciones. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 13* y *Tabla 11*.

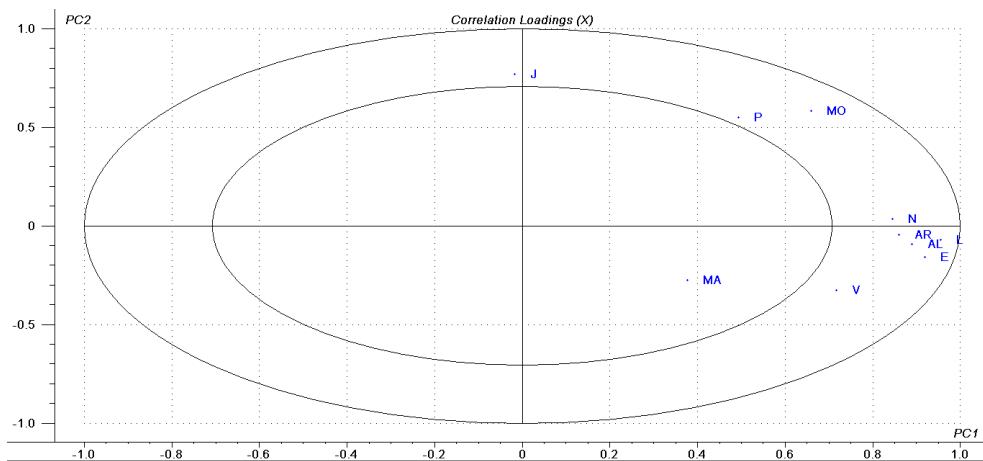


Figura 12: Análisis de componentes principales (juez/ muestra) para el atributo miel.

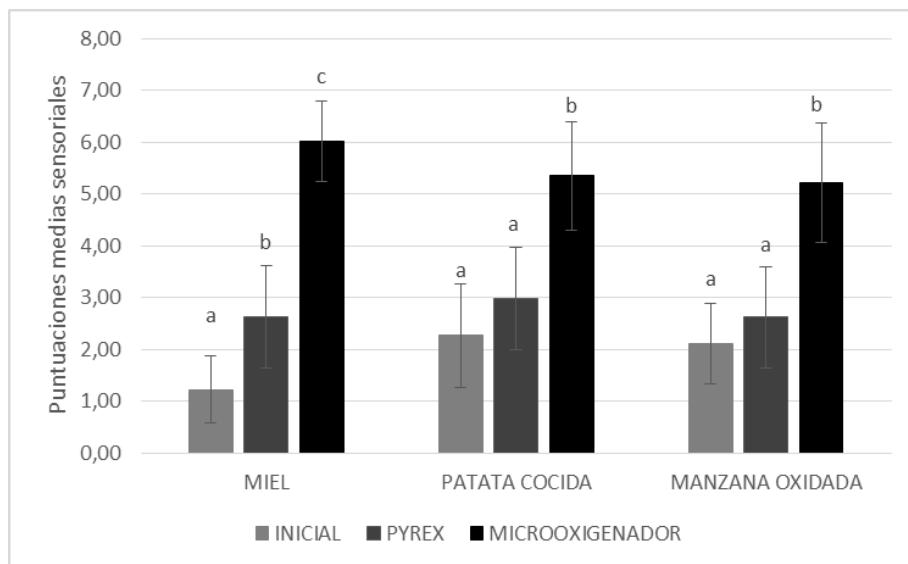


Figura 13: Puntuaciones sensoriales medias de los vinos estudiados. Las barras de error se han calculado como $s/(n)^{1/2}$; s) desviación estándar; n) número de panelistas. Letras diferentes indican la presencia de diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,05$); letras iguales indican la presencia de una tendencia ($p \leq 0,1$).

Tabla 11: Medias y error estándar de la media (s. e. m) de los atributos de oxidación por vino.

n.s: no significativo; *** ($p < 0,001$)

	CH	PC	BL	VT	Significación				
	media	s.e.m	media	s.e.m	s.e.m				
Miel	3,94 ^b	1,13	2,37 ^a	0,85	4,54 ^b	1,09	2,31 ^a	1,08	***
Patata cocida	4,02	1,08	2,93	1,09	4,58	1,19	2,58	0,96	n.s.
Manzana oxidada	3,92	1,17	2,08	0,89	3,31	0,99	3,98	1,25	n.s.

En cuanto a los sistemas de oxidación se han encontrado diferencias significativas ($p < 0,05$) para los tres atributos de oxidación. Como se puede observar en la *Figura 13*, la mayor puntuación para todos los atributos fue obtenida en los tres casos por el sistema de microoxigenación, que como ya hemos comentado anteriormente fue el que presentaba mayor grado de oxidación (formación neta). Para los atributos patata cocida y manzana oxidada este sistema se diferencia significativamente de los otros dos. Sólo para el atributo miel se diferencia el vino de referencia, del que estuvo 7 días en bote Pyrex, del microoxigenador durante 6 semanas. Los valores no nulos de los vinos control pueden deberse al hecho de haberlos conservado en la cámara (sin presencia de oxígeno) durante todo el experimento y podrían haber evolucionado ligeramente.

Según el factor vino (*Tabla 11*), sólo se encuentran diferencias significativas para el atributo miel. Sorprendentemente, en este caso el vino PC se agrupa junto al vino VT (blanco), al contrario de lo que se observó en el test de agrupación libre de forma general.

Observando estos resultados se correlacionaron los aldehídos libres (fenilacetaldehído, metional y acetaldehído) que se habían determinado mediante las técnicas de cromatografía, con las medias sensoriales para cada atributo (*Figura 14*).

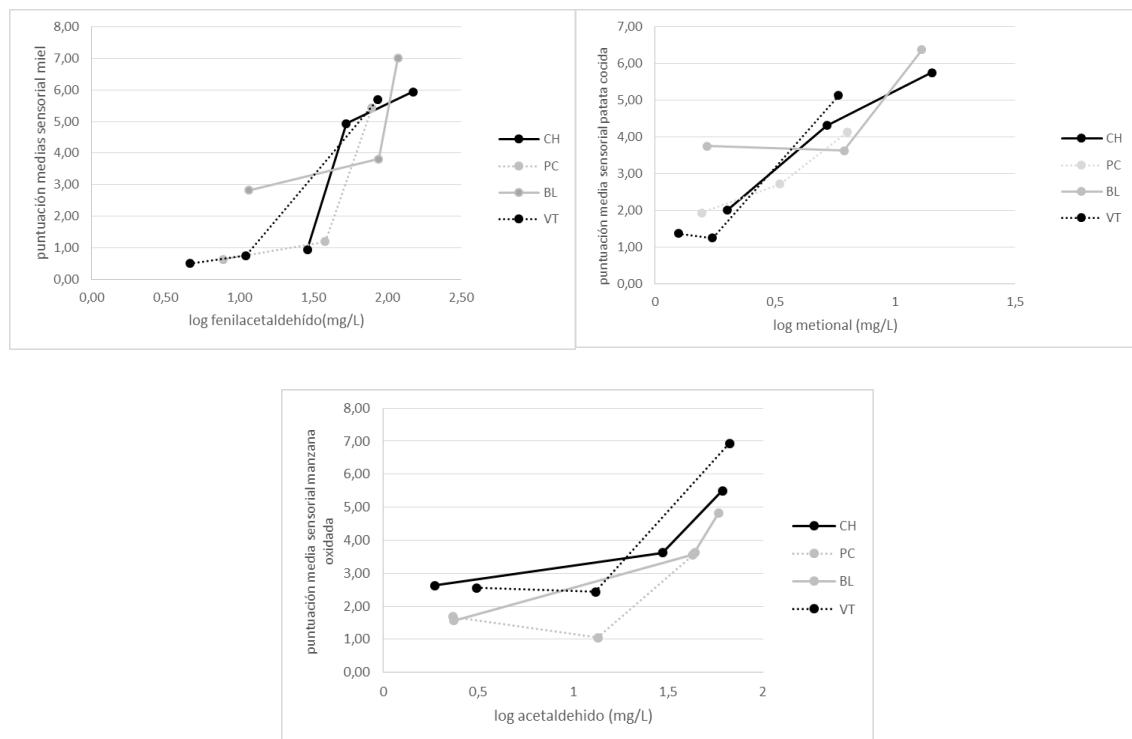


Figura 14: Correlación del logaritmo de la concentración en mg/L, de los compuestos libres responsables de los aromas miel, patata cocida y manzana oxidada frente a las puntuaciones medias sensoriales obtenidas.

Se puede observar que las concentraciones iniciales en cada vino son diferentes y son puntuadas acorde a esas diferencias. Se observa que a concentraciones iniciales pequeñas del compuesto los valores ortonasales obtenidos son bajos, pero conforme el vino evoluciona y aumentan las concentraciones del analito libre los vinos reciben una puntuación mayor de los atributos correspondientes. Es decir, existe una correlación positiva entre la cantidad de aldehído libre y la puntuación obtenida.

Evolución del color: Los análisis sensoriales se llevaron a cabo en copas negras, porque el estudio se centró en el aroma de los aldehídos. También para evitar prejuicios del panel al observar el color de las muestras. A posteriori y a modo de curiosidad algunos miembros del panel entrenado quisieron ver la evolución del color. Se tomó nota de sus comentarios y se presentan en la *Tabla 12*.

Tabla 12: Comentarios sobre el color de las muestras (a) del menisco (b) de cada vino en cada recipiente.

		CH	PC	BL	VT
Inicial	a-	Granate	a- Cereza	a- Granate	a- Amarillo pajizo
	b-	Rubí	picota	b- Rubí	b- Acerado/incoloro
Pyrex	a-	Rubí	a- Cereza	a- Rubí	a- Amarillo pajizo
	b-	Rubí	picota	b- Marrón/teja	b- Amarillo
Microoxigenador	a-	Marrón/teja	a- Rubí	a- Marrón/teja	a- Amarillo dorado
	b-	Marrón/teja	b- Marrón/teja	b- Marrón/teja	b- Amarillo

Se observa una clara evolución del color a lo largo de la oxidación, coherentes con los resultados espectrofotométricos del *Anexo 14*. Los vinos tintos control presentan tonalidades granates en el caso de los reservas y cereza picota en el caso del vino joven. El espectro de un vino joven en general presenta un máximo a 520 nm, correspondiente al color rojo, y unas componentes amarilla (420 nm) y azul (620 nm) relativamente importantes. Con la oxidación los vinos tintos evolucionan hacia tonalidades más marrones. En los datos espectrofotométricos se observa un aumento de la componente amarilla frente a la roja (absorbancia 420/520) con la oxidación, llegando a ser mayor el valor obtenido a 420 que a 520 en el caso de los microoxigenadores.

En el vino blanco (VT) el color evoluciona de un amarillo pajizo a tonalidades doradas con la oxidación. El vino blanco presenta su máximo a 420 nm por lo que posee unas componentes amarillas importantes.

CONCLUSIONES

Ambos sistemas de oxidación estudiados han alcanzado la formación de aldehídos *“de novo”*, aunque los vinos en el sistema de oxígeno disponible consumieron menos oxígeno del esperado.

No se ha observado un efecto claro de la dosificación del oxígeno sobre la formación de los aldehídos una vez se normalizan los resultados por el oxígeno consumido no invertido en oxidar el SO₂. Este importante resultado sugiere que la formación de aldehídos *“de novo”* es un parámetro independiente tanto de la cantidad de oxígeno dosificada, como de la forma en que se dosificó, requiriéndose más esfuerzo experimental para verificar la generalidad de esta conclusión. Cualquier sistema sería por tanto adecuado para medir la capacidad un vino para la formación de novo de aldehídos, aunque de los sistemas estudiados, los microoxigenadores ofrecieron mejor precisión en la medida del oxígeno en el espacio de cabeza.

No se encontró una relación entre la formación y la concentración de aminoácidos precursores iniciales y metales presentes en el vino, lo que podría deberse al limitado número de muestras y a la acción de múltiples variables en la formación de estos componentes.

Sensorialmente se agruparon los vinos según el grado de oxidación, además de obtenerse claras correlaciones entre los aldehídos libres y sus aromas característicos.

Se puede concluir que se ha desarrollado una metodología con la que poder calcular el potencial de un vino de formar aldehídos *“de novo”*. La metodología podría mejorarse alargando el tiempo del sistema de oxidación de oxígeno disponible o acortando el tiempo del sistema microoxigenador. Otra opción sería seguir estudiando el proceso de desulfitación de las muestras.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (proyecto CICYT 230183). Agradecer al Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (LAAE) toda la ayuda recibida, así como el trato que se me ha brindado.

REFERENCIAS

- Anli R., Cavuldak Ö. A review of microoxygenation application in wine. *J of the Inst of Brewing*, 2012. 118(4), 368-385.
- Azzara C. D., Campbell L. B. Off-flavors of dairy products. Off-flavors in foods and beverages, 1992. 329-374.
- Bueno M., Culleré L., Cacho J., Ferreira V. Chemical and sensory characterization of oxidative behavior in different wines. *Food Res Int* 2010 6; 43(5):1423-1428.
- 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 of Chromatogr A* 2014^a. 1369, 33.
- Bueno M., Franco-Luesma E., Carrascón V., Ferreira V. Evaluation of key free and bound aroma carbonyls in wine for a better understanding of their release or formation through oxidation. 2014^b. Book of Abstracts of 14th Weurman Flavour Research Symposium.
- Burroughs L. F., Sparks A. H. Sulphite-binding power of wines and ciders. III. Determination of carbonyl compounds in a wine and calculation of its sulphite-binding power. *J Sci Food Agric*, 1973. 24(2), 207-217.
- Chatonnet P. Volatile and odoriferous compounds in barrel-aged wines: Impact of cooperage techniques and aging conditions. *Chem of wine flav* 1998^a. 180-207.
- Chatonnet P., Dubourdieu D. Identification of Substances Responsible for the 'Sawdust' Aroma in Oak Wood. *J Sci Food Agric* 1998^b. 76, 179-188
- Culleré L., Ferreira V., Cacho J. Analytical Methods: Analysis, occurrence and potential sensory significance of aliphatic aldehydes in white wines. *Food Chem* 2011. 127(3), 1397.
- Danilewicz J. Interaction of Sulfur Dioxide, Polyphenols, and Oxygen in a Wine-Model System: Central Role of Iron and Copper. *Am. J. Enol. Vitic*, 2007. 58, 53-60

De Azevedo L., Reis M., Motta L., da Rocha G., Silva L., de Andrade J. Evaluation of the formation and stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines. *J Agric Food Chem*, 2007. 55(21), 8670.

Escudero A., Cacho J., Ferreira V. Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography–olfactometric study. *European Food Res & Techno* 2000^a. 211(2), 105.

Escudero A., Hernández-Orte P., Cacho J., Ferreira V. Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. *J Agric Food Chem* 2000^b. 48(9), 4268.

Escudero A., Asensio E., Cacho J., Ferreira V. Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chem* 2002. 77(3), 325.

Ferreira V., Bueno M., Franco-Luesma E., Culleré L., Fernández-Zurbarano P. Key Changes in Wine Aroma Active Compounds during Botle Storage of Spanish Red Wines under Different Oxygen Levels. *J Agric Food Chem*, 2014^a. 62, 10015-10027.

Ferreira V., Bueno M., Franco-Luesma E. New insights in to the chemistry involved in aroma development during wine bottle aging: slow redox processes, metal catalytic reactions, chemical equilibrium shifts and perceptual laws. *Abstr. Papers Am. Chem. Soc*, 2014^b. 248, 118-AGFS.

González A., Armenta S., Pastor A., De la Guardia M. Searching the Most Appropriate Sample Pretreatment for the Elemental Analysis of Wines by Inductively Coupled Plasma-Based Techniques. *J. Agric. Food Chem.*, 2008. 56 (13), 4943–4954

Godden P, Lattey K, Francis L, Gishen M, Cowey G, Holdstock M, Bramley B. Towards offering wine to the consumer in optimal condition—the wine, the closures and other packaging variables: a review of AWRI research examining the changes that occur in wine after bottling. *Wine Ind. J*, 2005. 20(4), 20-30.

Grob K., Grob G., Grob K. J. Cromosome, standardized quality test for glass capillary columns. *J of Chrom* 1978. 156, 1-20.

Grob K., Grob G. Capillary columns with immobilized stationary phases. *J of High Resolution Chrom & Chrom Communications* 1982. 5, 349-354.

Hernández-Orte P., Ibarz M. J., Cacho J., Ferreira V. Amino Acid Determination in Grape Juices and Wines by HPLC Using a Modification of the 6-Aminoquinolyl-N - Hydroxysuccinimidyl Carbamate (AQC) Method. *Chrom. 2003.* 58, 29-35.7

Jaime-Baró A., Quiros-Carrasco J. Les conditions de formation des aldehydes dans les vins. Relation et importance en rapport avec les phénomènes d'oxydation et les caractéristiques organoleptiques. *L'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin* 1977. 50, 253-267.

Lemaire T, Allen M, Bel N, Rowe G, Wall G. Use of gases in winemaking, ASVO Seminar Proceedings, Adelaide 2002. 54

Lermusieau G., Noel S., Liegeois C., Collin S. Nonoxidative mechanism for development of trans-2-nonenal in beer. *Journal ASBC*, 1999. 57, 29-33.

Lopes P., Silva M.Pons, A., Tominaga T., Lavigne V., Saucier C. Dubourdieu D. Impact of oxygen dissolved at bottling and transmitted through closures on the composition and sensory properties of a Sauvignon blanc wine during bottle storage. *J. Agric. Food Chem.*, 2009. 57(21), 10261-10270.

O'Brien V., Francis L., Osidacz P. Packaging choices affect consumer enjoyment of wines. *Wine Ind. J.* 2009. 24, 48-54.

Pripis-Nicolau L, de Revel G, Bertrand A, Maujean A. Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *J Agric Food Chem*, 2000. 48(9), 3761.

Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts; Office International de la Vigne et du Vins: Paris, 1900.

Ribéreau-Gayon P. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chim. Analyt.*, 1970. 52, 627-631.

Rizzi, G. P. Formation of Strecker Aldehydes from Polyphenol-Derived Quinones and α -Amino Acids in a Nonenzymic Model System *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 1893–1897

San Juan F, Ferreira V, Cacho J, Escudero A. Quality and aromatic sensory descriptors (mainly fresh and dry fruit character) of Spanish red wines can be predicted from their aroma-active chemical composition. *J. Agric. Food Chem.*, 2011. 59, 7916- 7924.

San Juan F, Cacho J, Ferreira V, Escudero A. Aroma chemical composition of red wines from different price categories and its relationship to quality. *J. Agric. Food Chem.*, 2012. 60, 5045-5056.

Silva Ferreira A., de Pinho P., Rodrigues P, Hogg T. Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *J Agric Food Chem*, 2002. 50(21), 5919.

Schmidtke L., Clark A., Scollary G. Micro-oxygenation of red wine: techniques, applications, and outcomes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2011. 51(2), 115-131.

Ugliano M. Oxygen contribution to wine aroma evolution during bottle aging. *J Agric Food Chem* 2013. 61(26), 6125-6136

Zapata J., Mateo-Vivaracho L., Cacho J., Ferreira V. Comparison of extraction techniques and mass spectrometric ionization modes in the analysis of wine volatile carbonyls. *Analytica chimica acta*, 2010. 660(1), 197-205.

ANEXOS

Anexo 1: Hoja para la realización del test de self-adjusting scale

Nombre: _____ **Fecha:** _____

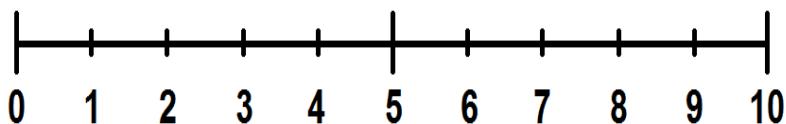
Se presentan 3 referencias. Deben oler las referencias (de izquierda a derecha):

- a. miel
- b. patata cocida
- c. manzana pasada

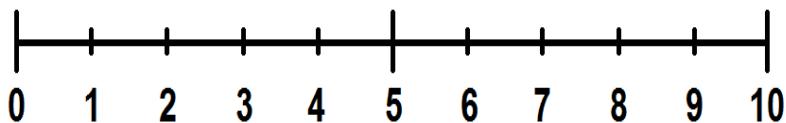
En el puesto, se presentan catorce copas:

HUELA cada MUESTRA (exclusivamente por vía ortonasal) y sitúe los vinos en esta escala de intensidad. Puede colocar varios vinos juntos.

Miel



Patata cocida



Manzana pasada



Anexo 2: Instrucciones para la prueba de agrupación libre (Sorting task).

Clasificación en base a la semejanza del aroma

INSTRUCCIONES DE LA PRUEBA DE CLASIFICACIÓN

En la mesa se presentan 14 copas de vino. Cada una está codificada con un número de tres cifras.

Le pedimos que HUELA cada MUESTRA (exclusivamente por vía ortonasal) y que CONSTITUYA VARIOS GRUPOS de vino basándose en la SEMEJANZA ENTRE LOS AROMAS:

- En primer lugar le pedimos que huela las muestras de izquierda a derecha. A continuación puede proceder libremente
- Puede oler cada muestra tantas veces como desee y puede utilizar todo el tiempo que necesite para realizar este test
- Los grupos los debe hacer sobre la mesa, moviendo las copas de vino y agrupándolas físicamente, en función de su similitud
- Puede haber tantos grupos como desee (una copa puede ser un grupo por sí misma si así lo estima)

Anexo 3: Hoja a cumplimentar para la prueba de agrupación libre

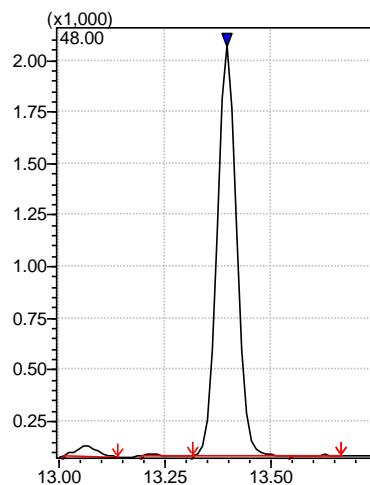
CODIGO SUJETO.....

FECHA.....

GRUPO	CÓDIGOS DE LAS MUESTRAS	ATRIBUTOS (Máximo de 2-3 atributos)
GRUPO I		
GRUPO II		
GRUPO III		
GRUPO IV		
GRUPO V		
GRUPO VI		
GRUPO VII		
GRUPO VIII		
GRUPO IX		
GRUPO X		

Anexo 4: Picos obtenidos para cada aldehído y para el estándar interno en su ventana de adquisición, su masa/carga y su concentración.

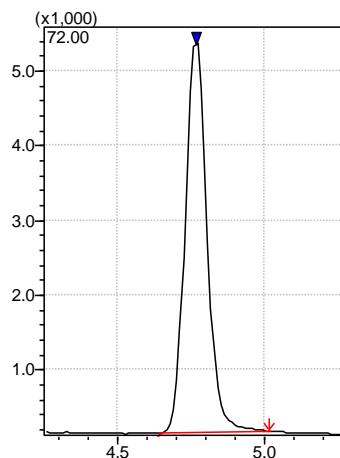
METIONAL



m/z 48

Concentración: 21,2 $\mu\text{g/L}$

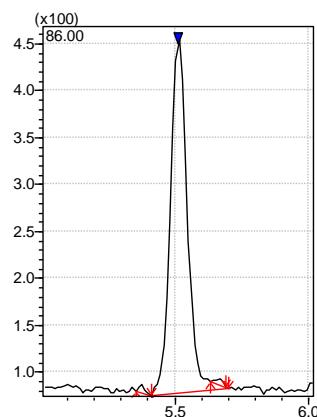
ISOBUTIRALDEHÍDO



m/z 72

Concentración: 59,1 $\mu\text{g/L}$

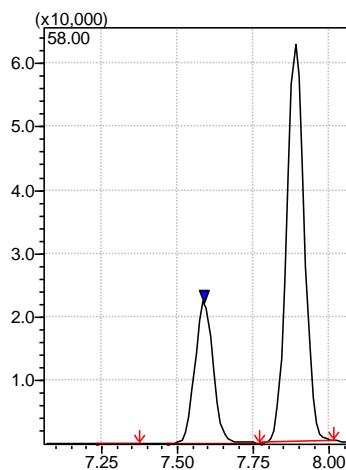
DIACETILO



m/z 86

Concentración: 28,4 $\mu\text{g/L}$

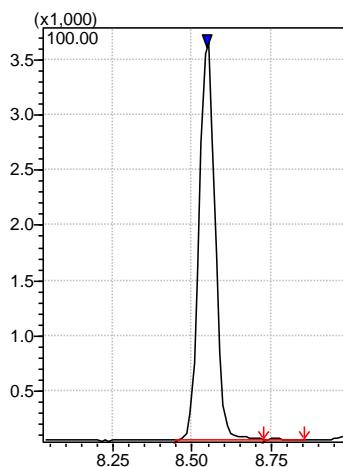
ISOVALERALDEHÍDO y 2-METILBUTANAL



m/z 58

Concentraciones:
isovaleraldehído (izq.): 222, $\mu\text{g/L}$
2-metilbutanal (dcha.): 39,3 $\mu\text{g/L}$

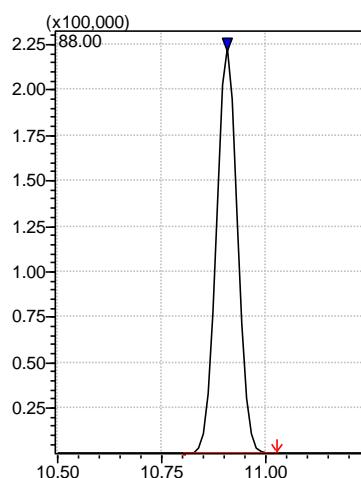
2,3-PENTANODIONA



m/z 100

Concentración: 99,0 $\mu\text{g/L}$

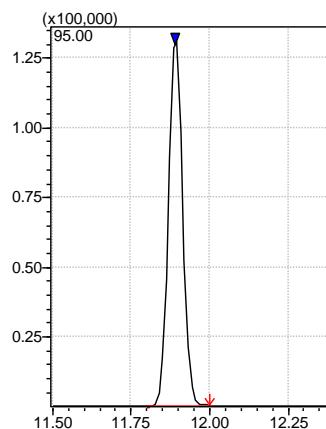
2-METILBUTANOATO DE METILO



m/z 88

Concentración: 183 $\mu\text{g/L}$

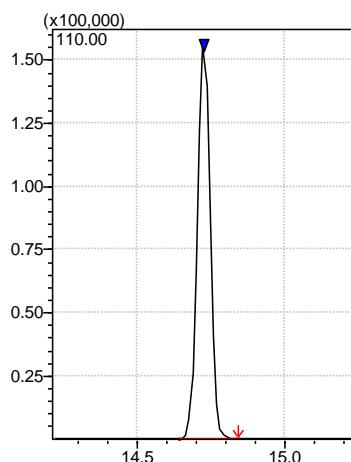
FURFURAL



m/z 95

Concentración: 1902 $\mu\text{g/L}$

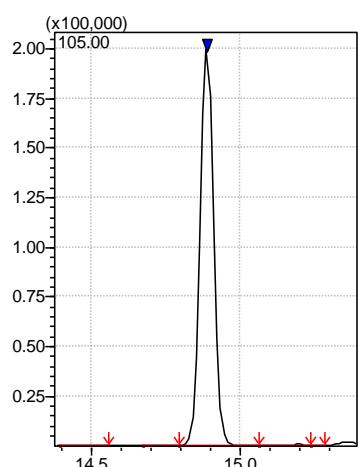
5-METILFURFURAL



m/z 110

Concentración: 900 $\mu\text{g/L}$

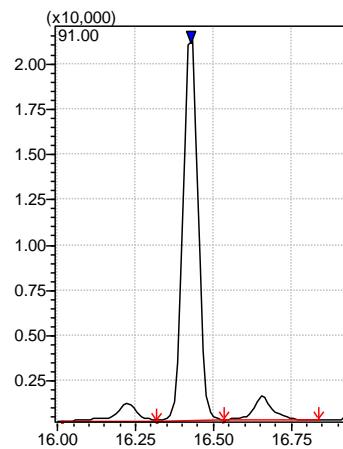
BENZALDEHÍDO



m/z 105

Concentración: 178 $\mu\text{g/L}$

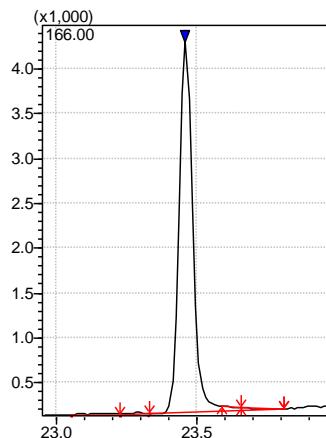
FENILACETALDEHÍDO



m/z 91

Concentración: 38,9 µg/L

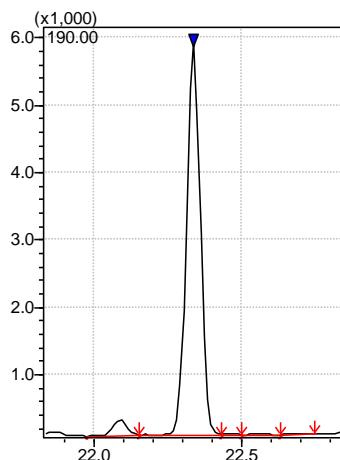
ACETOVANILLONA



m/z 166

Concentración: 3142 µg/L

β-DAMASCENONA



m/z 190

Concentración: 15,5 µg/L

Anexo 5: Resultados obtenidos de oxígeno consumido y valores de SO₂ libre y total en los vinos iniciales, en los sistemas de oxígeno disponible (Pyrex) y en los microoxigenadores. Se presenta su media y su desviación estándar (s) de los 4 vinos estudiados

	O ₂ consumido (mg/L)			SO ₂ (mg/L)			SO ₂ Total		
				SO ₂ libre					
	Media	±	s	Media	±	s	Media	±	s
CH Inicial	0,00			6,22	1,1		40,2		21,0
CH Pyrex	12,6	0,2		3,88	1,2		10,2	5,6	
CH Microoxigenador	54,8	12,2		0,00	0,7		5,65	1,1	
PC Inicial	0,00			20,2	1,3		37,2	3,7	
PC Pyrex	12,2	2,5		4,26	1,2		12,9	7,6	
PC Microoxigenador	61,6	0,5		0,00	0,7		5,46	1,1	
BL Inicial	0,00			10,5	1,0		29,6	4,9	
BL Pyrex	22,6	4,5		3,38	1,3		6,94	5,4	
BL Microoxigendor	64,8	11,4		0,00	0,7		5,60	1,1	
VT Inicial	0,00			19,0	1,2		112	40,8	
VT Pyrex	8,64	1,1		4,83	1,2		69,6	5,4	
VT Microoxigenador	47,1	1,7		0,00	0,7		18,4	3,8	

Anexo 6: Aldehídos utilizados en el cálculo de los parámetros de oxidación. Concentraciones iniciales, y resultantes de la microoxigenación y el sistema de oxígeno disponible (Pyrex). Se representa la media y la desviación estándar (s).

	ACETALDEHIDO (mg/L)						ALDEHÍDOS (μg/L)															
	Acetaldehído libre			Acetaldehído total			Isobutiraldehído libre				Isobutiraldehído total				2-Methylbutanal libre				2-Methylbutanal total			
	Media	±	s	Media	±	s	Media	±	s	Media	±	s	Media	±	s	Media	±	s	Media	±	s	
CH inicial	1,87	0,0		64,8		1,9	12,3	0,3		17,2		0,3	1,45	0,0		2,29		0,0				
CH Pyrex	29,6	0,5		46,5		4,9	24,1	1,2		27,2		4,1	2,80	0,1		3,43		0,1				
CH Micro	61,2	5,5		64,4		6,5	73,4	19,2		87,7		1,9	10,2	1,0		12,6		0,1				
PC Inicial	2,32	0,8		38,7		0,5	5,15	0,2		8,59		0,2	0,67	0,0		1,02		0,0				
PC Pyrex	13,5	8,5		26,5		0,8	13,1	1,5		15,3		0,6	1,49	0,0		1,71		0,0				
PC Micro	44,0	2,6		44,5		2,2	50,5	4,6		53,5		4,5	5,15	0,1		5,41		0,1				
BL Inicial	2,35	0,3		30,4		0,7	7,38	0,8		10,6		0,3	0,77	0,0		1,17		0,0				
BL Pyrex	42,8	14,1		48,9		1,4	16,9	2,8		19,2		4,6	2,23	0,2		2,60		0,2				
BL Micro	58,5	1,8		61,3		0,4	54,6	5,1		56,1		3,3	7,79	0,2		8,41		0,1				
VT Inicial	3,12	0,0		103		1,3	3,13	0,1		5,98		0,2	0,41	0,0		0,83		0,0				
VT Pyrex	13,1	0,5		118		10,3	5,75	0,1		9,12		0,4	0,75	0,0		1,19		0,0				
VT Micro	66,7	3,3		111		2,6	27,8	5,4		30,1		5,8	2,62	0,1		2,90		0,1				

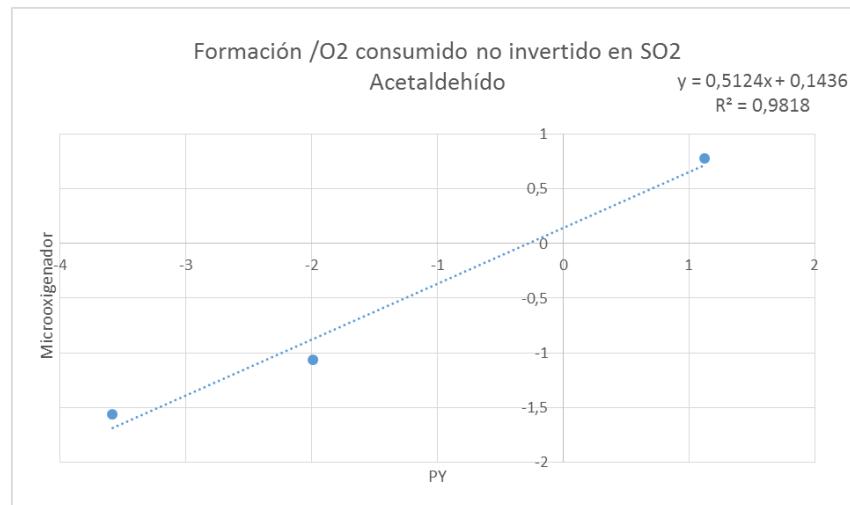
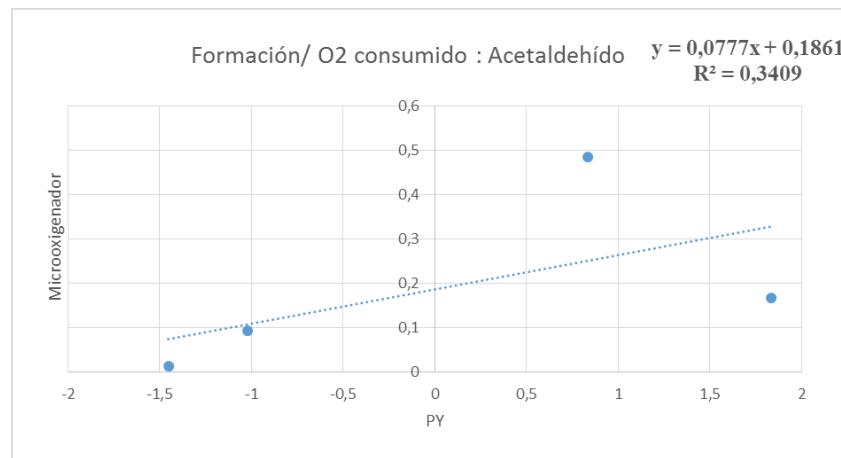
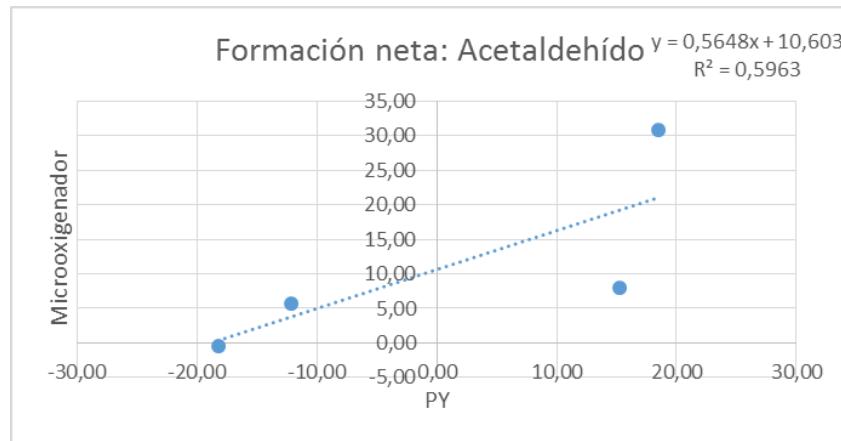
	Isovaleraldehído				Metional				Fenilacetaldehído											
	Libre		total		libre		total		libre		total									
Media	±	s	Media	±	s	Media	±	s	Media	±	s	Media	±	s						
9,83	0,7		76,2		3,4	2,00	0,7		6,11		1,2	28,9	1,8		83,6		6,8			
59,6	5,4		93,1		6,6	5,19	1,0		10,6		2,2	52,8	47,8		109		7,7			
202	112,4		257		29,2	14,2	11,9		22,2		4,1	150	36,4		170		7,5			
4,19	1,4		42,8		0,4	1,57	0,3		3,35		0,5	7,78	3,7		29,9		1,4			
36,5	22,8		61,6		8,6	3,31	1,5		5,71		1,0	37,9	15,9		57,9		6,9			
99,1	10,1		117		10,9	6,31	1,4		9,29		4,4	78,7	3,7		84,8		6,3			
8,66	0,8		65,2		1,1	1,65	0,5		4,16		0,6	11,5	0,8		38,5		1,9			
83,9	39,8		104		36,8	6,14	2,2		9,07		3,0	87,3	19,0		83,4		11,1			
199	17,5		227		3,9	12,9	2,1		17,9		3,4	118	5,2		113		7,3			
2,99	0,5		63,1		7,5	1,25	0,5		3,75		0,9	4,61	0,2		29,7		2,4			
11,7	1,1		86,8		4,1	1,73	0,6		5,40		1,4	11,1	3,6		46,3		7,5			
111	37,6		176		37,5	5,81	3,9		13,6		16,0	86,0	24,3		140,9		37,5			

Anexo 7: Resultados de los carbonilos ($\mu\text{g/L}$) restantes estudiados en los vinos iniciales (ini), en el sistemas de oxígeno disponible (Pyrex) y en los microoxigenadores (mic). Se presenta la media y la desviación estándar (s) para cada compuesto.

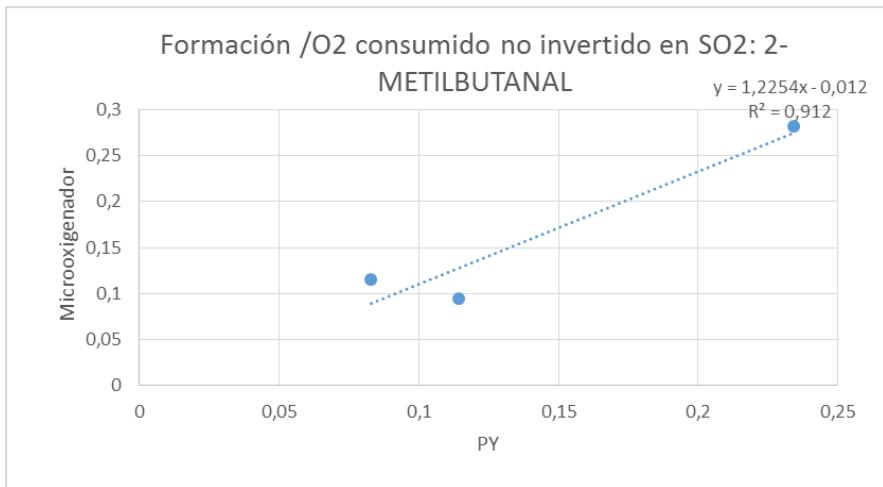
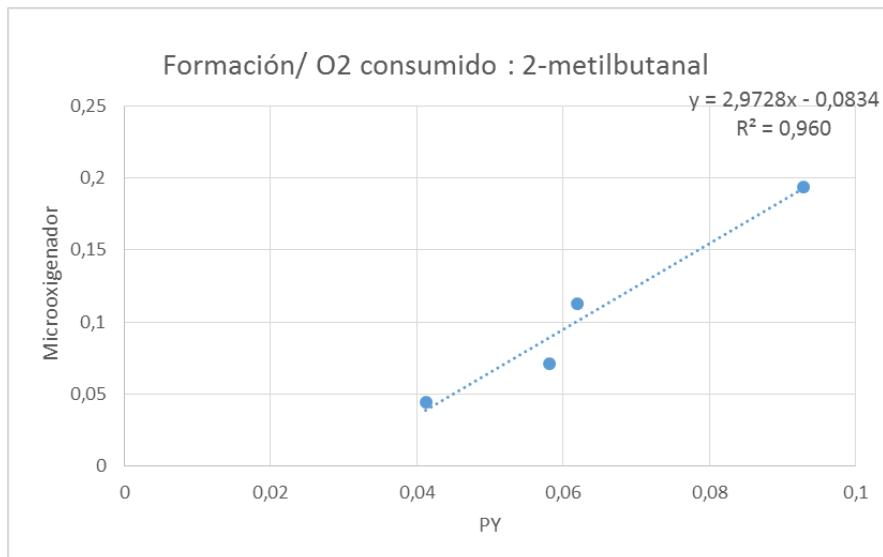
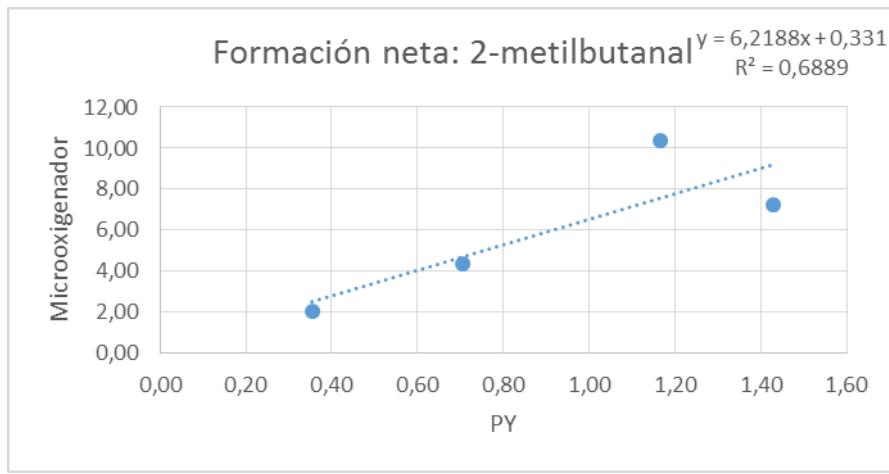
	Benzaldehído						Furfural						5-Methylfurfural					
	libre			total			libre			total			libre			total		
	Media	\pm	s	Media	\pm	s	Media	\pm	s	Media	\pm	s	Media	\pm	s	Media	\pm	s
CH ini	<LD			<LD			262	44	324	17	15,5	0,4	16,9		0,3			
CH PY	0,60	1,4	0,85	2,1	566	38	650	51	17,5	0,3	19,9	0,2						
CH Mic	106	103,6	115	7,7	1369	443	1448	237	39,5	6,5	42,5	2,2						
PC Ini	1,73	1,8	1,67	2,2	259	12	294	13	110	1,0	113	2,0						
PC PY	5,18	6,1	4,28	10,7	424	32	450	23	114	1,0	113	3,0						
PC Mic	87,1	66,1	91,5	41,1	668	32	698	32	89,7	1,0	91,3	3,1						
BL Ini	0,95	0,2	1,37	1,7	222	10	281	23	28,1	0,5	30,0	0,7						
BL PY	7,88	26,8	7,04	19,8	488	30	511	39	32,0	1,4	32,0	0,8						
BL Mic	99,2	73,1	94,0	57,0	926	109	922	69	38,91	1,2	36,4	0,4						
VT Ini	128	24,9	197	67,9	49,0	3	87,0	7	2,80	0,1	3,24	2,7						
VT PY	202	14,2	230	38,7	178	17	224	23	4,03	0,2	4,64	0,1						
VT Mic	262	78,6	273	197,6	1126	310	1298	730	15,2	1,4	17,4	4,9						

	Diacetilo				2,3-Pentanediona				b-Damascenona				Acetovanillona				
	Libre		total		libre		total		libre		total		libre		total		
	Media	\pm	s	Media	\pm	s	Media	\pm	s	Media	\pm	s	Media	\pm	s	Media	\pm
226	94	255	58	<LD			<LD			1,84	0,1	1,91	0,1	762	131	1329	231
226	7	276	47	<LD			<LD			1,73	0,1	1,75	0,0	655	139	1023	171
291	120	299	96	<LD			<LD			1,97	0,2	2,13	0,1	589	100	1336	227
733	170	1075	72	38,6	4,5	73,2	3,3	2,82	0,1	2,84	0,1	292	47	503	78		
974	290	1136	107	70,6	20,1	76,5	3,7	3,20	0,4	3,39	0,4	257	51	527	76		
531	23	522	46	23,0	2,8	22,3	2,5	2,48	0,1	2,61	0,1	401	64	936	179		
768	75	1205	101	19,5	1,4	36,8	2,8	2,08	0,1	2,22	0,1	267	42	449	72		
1038	46	1045	79	32,4	4,6	30,9	3,2	2,36	0,2	2,16	0,1	293	43	454	88		
714	175	692	141	13,7	4,6	12,9	4,2	2,30	0,1	1,89	0,1	408	73	628	93		
36,0	5,0	48,7	7,1	<LD			<LD			4,68	0,1	4,89	0,1	319	81	575	89
51,9	23,0	66,1	3,9	<LD			<LD			4,16	0,2	4,61	0,1	395	63	865	145
92,1	10,0	109	57	<LD			<LD			3,94	0,2	4,08	0,2	933	192	2218	525

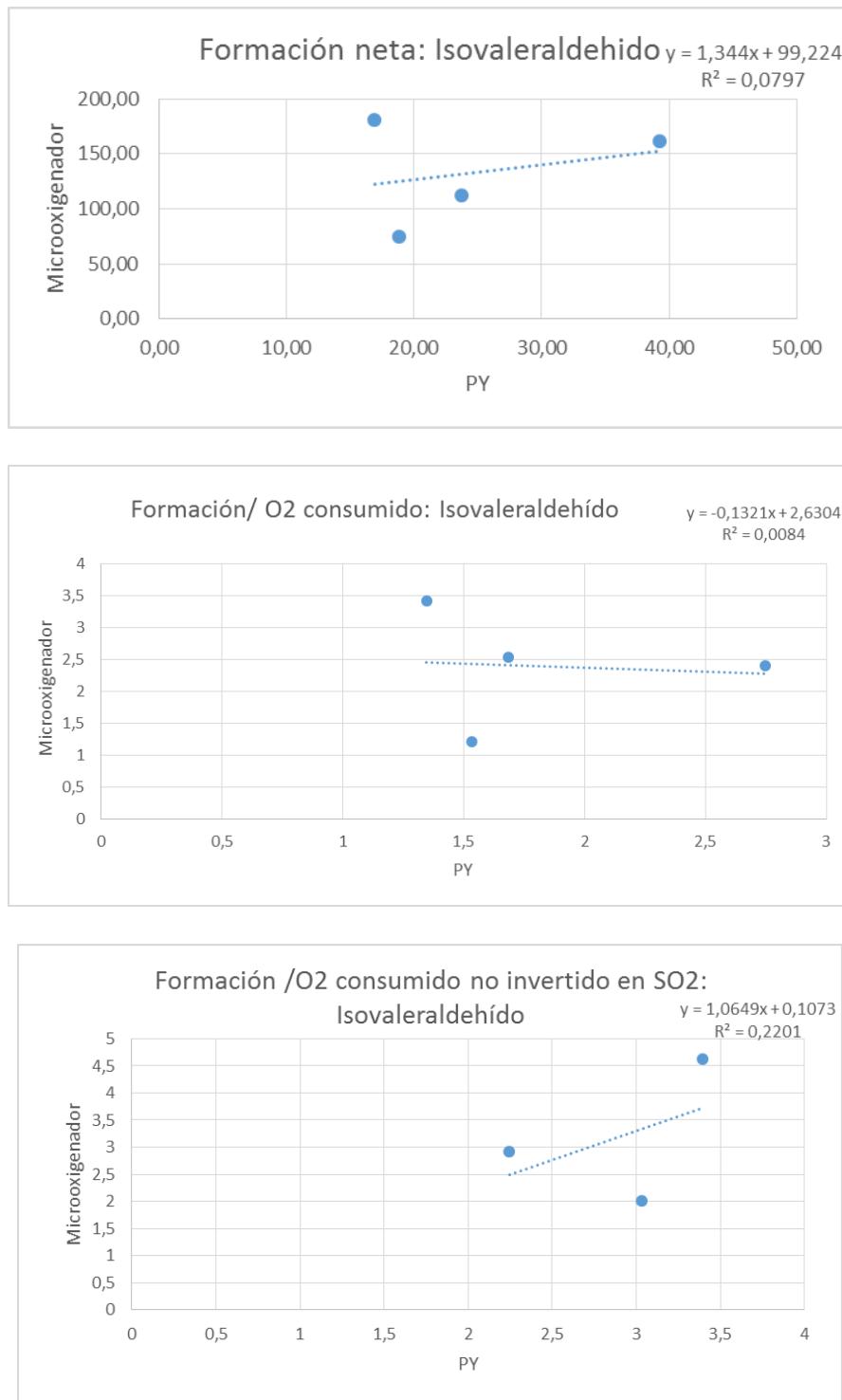
Anexo 8: Correlación entre los sistemas de oxidación para la concentración de acetaldehído a medida que se van normalizando los parámetros. A) Formación neta; B) Formación/ oxígeno consumido; C) Formación/ oxígeno no invertido en oxidar el SO₂. Py: sistema de oxígeno disponible.



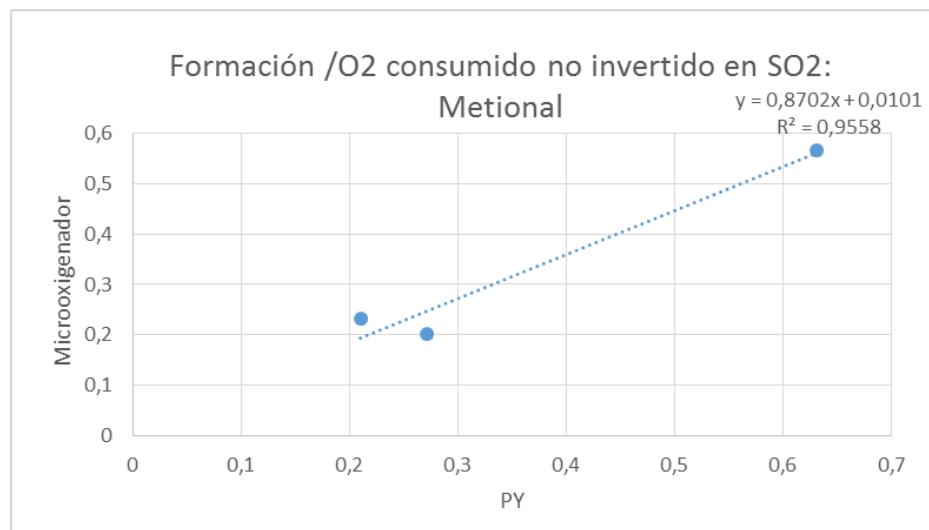
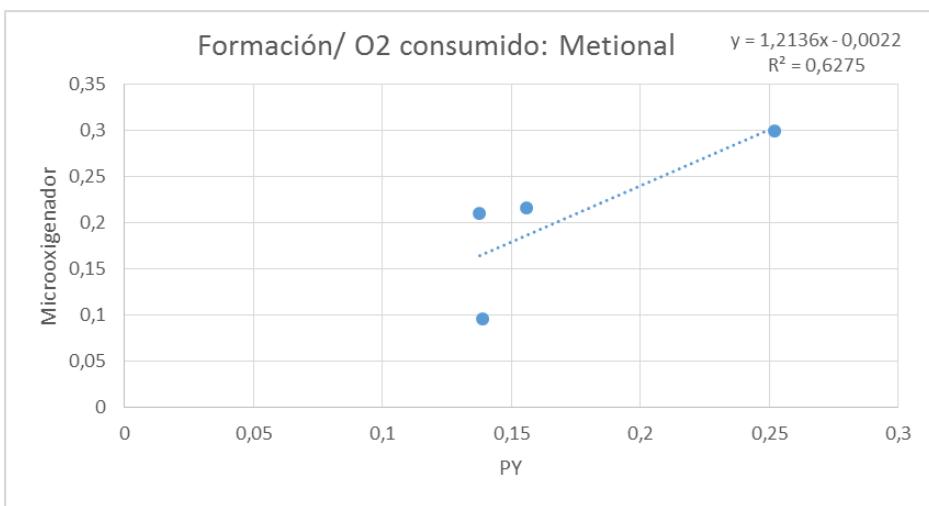
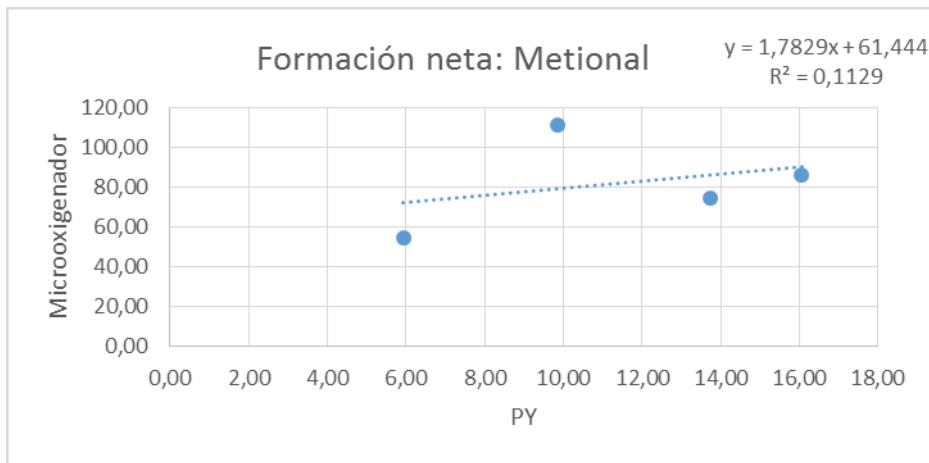
Anexo 9: Correlación entre los sistemas de oxidación para la concentración de 2-metilbutanal a medida que se van normalizando los parámetros. A) Formación neta; B) Formación/ oxígeno consumido; C) Formación/ oxígeno no invertido en oxidar el SO₂. Py: sistema de oxígeno disponible.



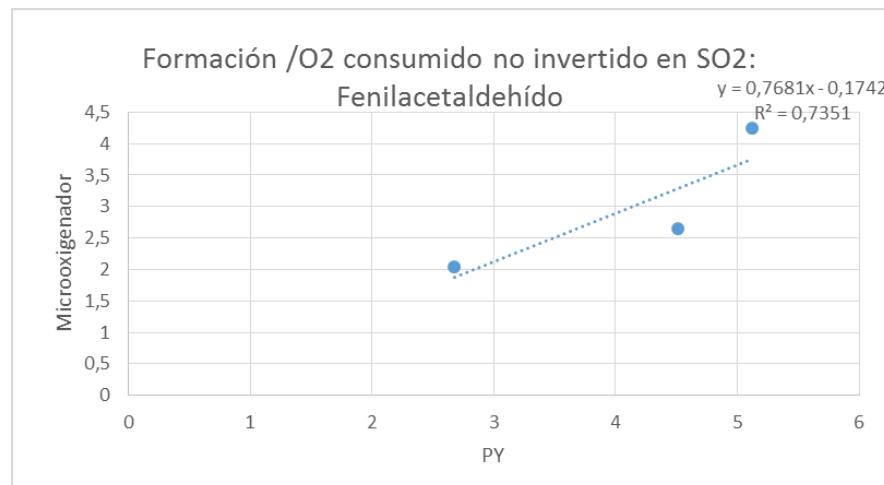
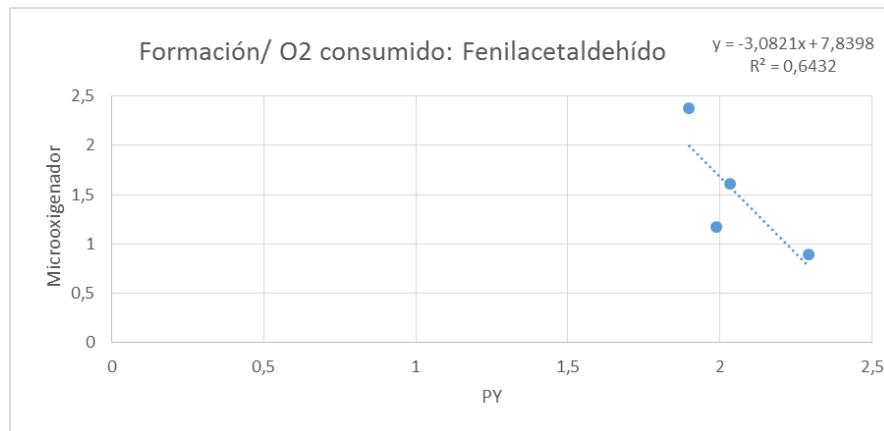
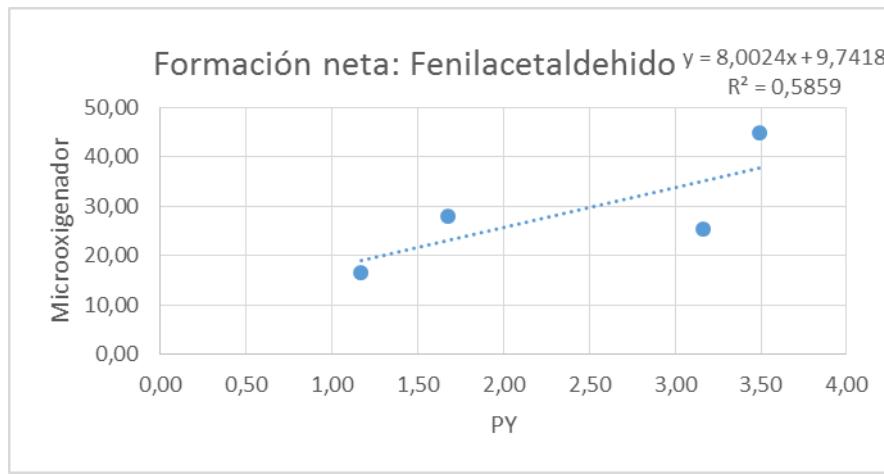
Anexo 10: Correlación entre los sistemas de oxidación para la concentración de isovaleraldehido a medida que se van normalizando los parámetros. A) Formación neta; B) Formación/ oxígeno consumido; C) Formación/ oxígeno no invertido en oxidar el SO₂. Py: sistema de oxígeno disponible.



Anexo 11: Correlación entre los sistemas de oxidación para la concentración de metional a medida que se van normalizando los parámetros. A) Formación neta; B) Formación/ oxígeno consumido; C) Formación/ oxígeno no invertido en oxidar el SO₂. Py: sistema de oxígeno disponible.



Anexo 12: Correlación entre los sistemas de oxidación para la concentración de fenilacetaldehído a medida que se van normalizando los parámetros. A) Formación neta; B) Formación/ oxígeno consumido; C) Formación/ oxígeno no invertido en oxidar el SO₂. Py: sistema de oxígeno disponible.



Anexo 13: Concentraciones (mg/L) de los aminoácidos y los metales de los vinos en los vinos iniciales. Los aminoácidos se presentan su media y su desviación estándar (s).

	METALES				AMINOÁCIDOS														
	Cu	Fe	Mn	Zn	VAL			ILE			LEU			MET			PHE		
					Media	±	s	Media	±	s	Media	±	s	Media	±	s	Media	±	s
CH inicial	<0,08	1,30	0,68		18,4	0,1	9,97	0,1	25,6	0,5	24,2	0,5	19,9	0,9					
PC inicial	<0,08	0,60	0,40		9,89	0,0	3,07	0,0	8,96	0,2	7,64	0,2	7,44	0,4					
BL inicial	<0,08	0,90	0,68		10,7	0,0	5,64	0,1	14,7	0,7	12,1	0,2	9,73	0,5					
VT inicial	0,20	1,20	0,56		10,4	0,0	5,64	0,1	25,2	0,5	8,18	0,2	16,3	0,8					

Anexo 14: Resultados del IPT y el color de los 4 vinos estudiados para los vinos iniciales y los dos sistemas de oxidación. Se presentan la media y la desviación estándar (s)

	IPT			COLOR				
	Media	±	s	Media	sum	λ=420	λ=520	λ=620
CH Inicial	66,8		0,1	10,2	0,0	4,31	4,80	1,06
CH Pyrex	74,5		2,6	11,3	0,0	5,01	5,14	1,13
CH Microo	68,5		8,4	13,2	0,0	6,57	5,39	1,24
PC Inicial	57,6		0,1	10,6	0	3,86	5,61	1,13
PC Pyrex	56,0		0,6	11,9	0,3	4,54	6,13	1,24
PC Microo	58,5		0,2	15,3	0,7	6,90	6,54	1,85
BL Inicial	58,6		0,1	9,82	0,0	4,01	4,63	1,18
BL Pyrex	57,3		0,0	11,9	0,4	5,17	5,26	1,46
BL Microo	61,3		0,2	13,5	0,0	6,90	5,34	1,80
VT Inicial	8,51		0,0	0,08	0,0	0,07	0,01	0,00
VT Pyrex	8,39		0,0	0,12	0,0	0,09	0,02	0,01
VT Microo	9,42		0,2	0,29	0,0	0,22	0,38	0,02