

Trabajo de Fin de Grado

Estudio de la formación de aldehídos de Strecker a partir de diacetilo y de quinonas

Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias



Laura D. Aguerri Fernández

Directora:
Ana Escudero Carra

Junio 2019



Universidad
Zaragoza

Resumen

Un exceso de oxidación en el vino puede acabar con las propiedades aromáticas y la vida del mismo. Los máximos responsables del aroma del vino oxidado son los aldehídos, como el acetaldehído o los aldehídos de Strecker (fenilacetaldehído, metional, isobutiraldehído, 3-metilbutanal y 2-metilbutanal). Estos últimos se forman en la degradación de Strecker, una reacción entre un aminoácido específico y un compuesto dicarbonílico. Los aminoácidos precursores son fenilalanina, metionina, valina, leucina e isoleucina, respectivamente. En el presente trabajo se estudia la formación de los aldehídos de Strecker a partir de dos compuestos dicarbonílicos distintos: el diacetilo y la 4-metilquinona (producto de la oxidación del 4-metilcatecol). Los análisis de aldehídos se llevaron a cabo tras una derivatización, mediante una extracción en fase sólida y posterior inyección en un cromatógrafo de gases con detector espectrómetro de masas. Se llevaron a cabo dos experiencias siendo la matriz vino sintético. En la primera, se trabajó con disoluciones 1mM de diacetilo y cada uno de los aminoácidos correspondientes. Las muestras estuvieron 32 días a temperatura ambiente y después se analizaron. Los rendimientos de reacción varían entre 0,007-0,07 %. En la segunda experiencia se trabajó con disoluciones 1mM de 4-metilcatecol y de los aminoácidos, y se añadieron metales y O_2 , necesarios para producir el compuesto dicarbonílico a partir del fenol. Las muestras se incubaron a 35°C y después de 57 días se analizaron. Los rendimientos de formación de aldehídos oscilan entre el 9-40 %. En ambos experimentos se observan diferencias significativas en la concentración de aldehídos de Strecker según el aminoácido utilizado, siendo cada aldehído específico de su aminoácido. La metionina fue el aminoácido más reactivo de forma significativa en ambas experiencias.

Abstract

An excess of wine oxidation may well diminish wine's aromatic properties and, consequently, its life. Aldehydes, like acetaldehyde as well as Strecker aldehydes (phenylacetaldehyde, methional, isobutyraldehyde, 3-methylbutanal, and 2-methylbutanal), are the major responsible of wine's oxidized flavour. The latter are formed in the Strecker degradation, when a chemical reaction between an specific amino acid and a carbonyl compound takes place. Phenylalanine, methionine, valine, leucine and isoleucine are the precursor amino acids of these aldehydes. In this study, the Strecker aldehydes' formation is promoted by using diacetyl and 4-methylquinone (oxidized product of 4-methylcatechol) as carbonyl compounds. Analysis of aldehydes was performed by using a gas chromatograph with mass spectrometer detector after their derivatization. Two experiments were set up and in both the matrix was synthetic wine. In the first one, 1mM diacetyl solution plus solutions of each amino acid were used. Samples were stored for 32 days at room temperature before their analysis. Reaction yields were between 0,007-0,07 %. In the second experiment solutions of 4-methylcatechol (1mM), amino acids were used and metals and oxygen were added. Samples were incubated during 57 days at 35°C and then analysed. Reaction yields were between 9-40 %. Significant differences in Strecker aldehyde's concentration depending on the amino acid used were found in both experiments. Methionine was the most reactive precursor amino acid in the two of them.

Índice

1. Introducción	1
1.1. El aroma del vino	1
1.2. Formación de aldehídos en la oxidación	2
1.3. Análisis de aldehídos	3
2. Objetivos	4
3. Material y métodos	4
3.1. Reactivos y disoluciones	4
3.2. Material	6
3.3. Instrumentación	7
3.4. Experiencias	7
3.4.1. Experimento 1	7
3.4.2. Experimento 2	13
4. Resultados y discusión	14
4.1. Experimento 1	14
4.2. Experimento 2	17
5. Conclusiones	24
Referencias	25

1. Introducción

1.1. El aroma del vino

Lo que percibimos como aroma de un vino no es sino la suma de una multitud de interacciones y combinaciones, todas ellas complejas, entre diferentes compuestos y receptores sensoriales.¹ La diversidad de especies químicas volátiles que contribuyen al aroma es tal que su caracterización resulta especialmente complicada.² Por ejemplo, familias de especies como los glúcidos, alcoholes, ácidos orgánicos o aldehídos dan como resultado una gran variedad de notas sensoriales. Sin embargo, la relación entre ellos y entre la matriz y su aportación al aroma y sabor del vino no es siempre proporcional. Hay combinaciones que potencian la acción de uno de los odorantes (sinérgicas) y otras que la disminuyen (antagónicas).¹ El resultado final depende no sólo de la variedad de la uva y del proceso de fermentación, sino también de los cambios que experimenta en las etapas posteriores así como de las condiciones ambientales a las que está expuesto. Se puede decir que se trata de un sistema químico dinámico, que evoluciona continuamente.³ En este sentido, el oxígeno influye sustancialmente en la calidad del vino, que experimenta su plenitud en la etapa de maduración.⁴

La comprensión del proceso de oxidación en el vino representa un reto para los enólogos, ya que afecta al envejecimiento del vino, especialmente en vinos blancos.⁵ La oxidación es un proceso complejo que depende cinéticamente de diversos factores como la temperatura o el pH.⁶ En él intervienen una amplia gama de especies químicas, tales como oxígeno, metales, compuestos fenólicos o aminoácidos.⁷ Sin embargo, son los aldehídos como el acetaldehído o los aldehídos de Strecker los principales responsables del envejecimiento y del aroma oxidado del vino.

El oxígeno molecular presente en el vino se encuentra en su estado triplete por lo que su capacidad de interactuar con los otros componentes es baja debido a la estabilidad del estado fundamental en el que se halla. Sin embargo, en presencia de algún catión metálico (normalmente un metal de transición en bajo estado de oxidación) su estabilidad puede verse afectada y se produce su activación. Se pueden formar así diversas especies radicales con un papel activo en el proceso de oxidación del vino.⁴ De este modo, el mecanismo de oxidación propuesto para este sistema consta de una cesión de un electrón por parte del ión metálico (mayoritariamente Fe^{2+} o Cu^+) a la molécula de oxígeno, lo que daría lugar al ion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) que en la matriz vínica se encontraría en forma de radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}). De esta manera, varias reacciones tendrían lugar sucesivamente: primero el radical hidroperoxilo se reduciría a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez, por reacción de Fenton con Fe^{2+} en ausencia de sulfitos o SO_2 , se podría reducir dando radical hidroxilo (HO^{\cdot}), una especie oxidante muy poderosa capaz de oxidar casi todo tipo de compuestos orgánicos.⁷⁻¹⁰

En el siguiente esquema se recoge la secuencia de transformaciones que sigue el oxígeno:

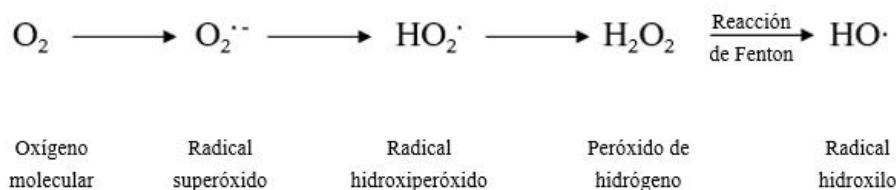


Figura 1: Transformaciones del oxígeno a pH vínico. Diagrama adaptado¹⁰

1.2. Formación de aldehídos en la oxidación

La formación de aldehídos es uno de los cambios ligados a los procesos de oxidación que sufre el vino y que afecta a las propiedades aromáticas y, por ende, a la vida del mismo. Por ejemplo, la aparición de aromas como el olor a patata cocida (indicador de presencia de metional) o a miel (indicador de presencia de fenilacetaldehído) se asocian con el deterioro oxidativo del vino.³

Por su parte, los aldehídos son especies electrófilas que pueden verse involucradas en numerosas reacciones y procesos químicos, tanto reversibles como irreversibles. Así pues, pueden reaccionar con especies de carácter nucleófilo como el SO₂, donde se produce una reacción reversible en la que se forman aductos muy estables, los hidroxialquilsulfonatos.¹¹

Si no hay especies en el medio capaces de reaccionar con los aldehídos, estos se acumulan y producen el aroma característico a vino oxidado. Entre estos compuestos, los de mayor importancia sensorial son el acetaldehído y los denominados *aldehídos de Strecker* (fenilacetaldehído, metional, isobutiraldehído, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal),¹² con olores a manzana, patata cocida, miel, almendra amarga, malta y queso.³

Varios estudios han sugerido la existencia de distintas vías para la síntesis de estos aldehídos. Por ejemplo, mediante la Degradación de Strecker¹³⁻¹⁵ o mediante un mecanismo de peroxidación en el que un alcohol se oxida directamente dando lugar al correspondiente aldehído.^{9,16} En la Degradación de Strecker, un mol de aminoácido reacciona con un mol de compuesto α-dicarbonílico y se forma un mol de aldehído.

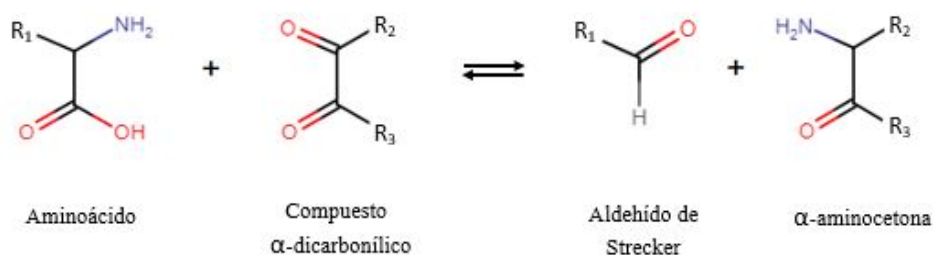


Figura 2: Degradación de Strecker

Existe una fuerte correlación entre la concentración de aminoácidos presentes y la formación de aldehídos de Strecker en vinos viejos, siendo ésta más débil para vinos jóvenes.¹¹ Además, los aldehídos que se forman son específicos para cada aminoácido: fenilacetaldehído a partir de fenilalanina, metional a partir de metionina, isobutiraldehído a partir de valina, 3-metilbutanal a partir de leucina y 2-metilbutanal a partir de isoleucina.¹³ Es por ello que los aminoácidos presentes en el vino, como en cualquier otro alimento, juegan un papel esencial en este proceso.

En un estudio¹³ sobre la formación de los componentes de aromas por reacción de aminoácidos con compuestos dicarbonílicos se identificaron isobutiraldehído, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, metional y fenilacetaldehído cuando disoluciones sintéticas de los aminoácidos precursores se hicieron reaccionar con glioxal, metilglioxal, diacetilo y pentan-2,3-diona. Recientemente también se ha sugerido que la formación de fenilacetaldehído en vinos tintos va ligada al descenso de diacetilo.¹¹ Asimismo, no sólo los compuestos dicarbonílicos alifáticos son capaces de producir la reacción de Strecker. Las *o*-quinonas también pueden reaccionar con aminoácidos y formar los aldehídos de Strecker. Diversos estudios han probado la formación de fenilacetaldehído^{12,17} y metional¹⁷ en vinos a partir de las quinonas formadas en condiciones oxidativas de diferentes compuestos como la (+)-catequina, el ácido cafeico o el ácido gálico. En este proceso juegan un papel importante el Fe^{2+} y el Cu^{2+} , que activan el oxígeno, como se ha explicado anteriormente.

1.3. Análisis de aldehídos

Los aldehídos son especies difíciles de analizar cuantitativamente debido a que son muy reactivas, volátiles y polares. Dada su limitada estabilidad, la preservación de los mismos en las muestras para su análisis es complicada.³ Además, los problemas para su cuantificación se acentúan debido a que poseen unas propiedades cromatográficas y de espectrometría de masas muy pobres,^{3,18} formando colas y solapamientos cromatográficos que hacen difícil una determinación precisa.

En el caso de las muestras vínicas los inconvenientes aumentan debido principalmente a dos factores: una matriz con alto contenido en alcohol y de carácter volátil, y un gran número de especies carbonílicas diferentes en grandes concentraciones, como el acetaldehído o el ácido pirúvico.¹⁸

Por todo ello, las técnicas más utilizadas en la actualidad para el análisis de aldehídos hacen uso de su preconcentración-derivatización.¹⁹ De esta forma, los analitos son transformados selectivamente en otras especies menos polares y con un mayor peso molecular, que las hace menos volátiles y reactivas, a la vez que el volumen de muestra disminuye, consiguiendo una concentración mayor de analito. Según la fase sobre la que se realice la preconcentración se distinguen extracciones en fase líquida (LLE), extracción en fase sólida (SPE) o microextracción en fase sólida (SPME), entre otras. Si bien es cierto que la SPME es más rápida y automatizable que el resto, se obtienen mejores resultados de repetibilidad, incertidumbre y efectos matriz con la SPE.³

Entre los agentes derivatizantes más empleados se encuentra la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH), si la separación posterior es por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), o el *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina (PFBHA), para la separación por cromatografía de gases (GC). En este último caso, se pueden emplear distintos detectores: de ionización a la llama (FID), por captura electrónica (ECD) o por espectrometría de masas (MS).³

Por ello, para el análisis de los aldehídos de Strecker en este trabajo se realizó una extracción en fase sólida y una derivatización con PFBHA. El análisis posterior se realizó con un GC-MS.

2. Objetivos

En cuanto a los objetivos académicos, el presente trabajo pretende aunar las destrezas y conocimientos adquiridos a lo largo del grado y aplicarlos a un problema real, como es la comprensión del proceso de oxidación en los vinos. Abarca también el desarrollo personal y profesional del estudiante durante un trabajo continuado dentro de un laboratorio, enfrentándose por primera vez a los problemas reales derivados del trabajo experimental.

El objetivo específico del trabajo es conocer la especificidad del diacetilo o la quinona formada a partir del 4-metilcatecol con los aminoácidos precursores de los aldehídos de Strecker en muestras vínicas sintéticas.

3. Material y métodos

3.1. Reactivos y disoluciones

Se realizaron dos experimentos para estudiar la formación de los aldehídos de Strecker a partir de diacetilo (Experimento 1) y de 4-metilcatecol (Experimento 2). Para la realización de los experimentos se prepararon disoluciones de los correspondientes aminoácidos:

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

- Experimento 1

Se preparó un vino sintético 1 (VS1) con una composición de 5g/L de glicerina (Glicerol, *PanReac*, CAS No. 56-81-5; $\geq 99,5\%$), 5g/L de ácido tartárico (L(+)-Tartaric Acid, *PanReac*, CAS No. 87-69-4; $\geq 99\%$) y etanol (Ethanol, *LiChrosolv*, CAS No. 64-17-5; $\geq 99\%$) al 12% en agua destilada. Se ajustó el pH a 3,5.

Para este experimento se utilizaron, además del vino sintético 1, una disolución de diacetilo en etanol (2,3-Butanedione, *Sigma Aldrich*, CAS No. 431-03-8; 97%) y los aminoácidos descritos

anteriormente, ambos en concentración 1mM.

- Experimento 2

Se preparó un vino sintético 2 (VS2) a partir del VS1, al que se le añadió Fe^{2+} en forma de cloruro de hierro (II) y Cu^{2+} en forma de cloruro de cobre (II), hasta conseguir una concentración de 5 y 0,2 mg/L respectivamente.

Para este experimento se utilizó una disolución de 4-metilcatecol en agua destilada (4-methylcatechol, *Sigma Aldrich*, CAS No. 452-86-8; $\geq 95\%$), los aminoácidos y vino sintético 2. La concentración del fenol y de los aminoácidos fue de 1mM.

- Disoluciones madre

En las siguientes tablas se recopilan las disoluciones madre preparadas a partir de los reactivos anteriores y sus concentraciones.

AA	Concentración (g/L)
Phe	5,1
Met	5,0
Val	5,3
Leu	5,9
Ile	5,5

Tabla 1: Disoluciones madre de cada aminoácido (AA) en agua destilada

	Concentración (g/L)
Diacetilo	10,0
4-metilcatecol	10,2

Tabla 2: Disoluciones madre de diacetilo en etanol y de 4-metilcatecol en agua destilada

	Concentración (g/L)
Cloruro de hierro (II)	2,9
Cloruro de cobre (II)	0,7

Tabla 3: Disoluciones madre de metales en agua destilada

Aldehídos de Strecker	Concentración (g/L)
Fenilacetaldehído	1,6
Metional	1,7
Isobutiraldehído	3,3
3-metilbutanal	3,3
2-metilbutanal	3,8

Tabla 4: Disoluciones madre de aldehídos de Strecker en etanol

- Análisis de aldehídos de Strecker

Para la preparación de muestras se realizó una extracción en fase sólida (SPE). Los reactivos utilizados en este proceso son:

- PFBHA (O-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride, *Sigma Aldrich*, CAS No. 57981-02-9; $\geq 99\%$) para la disolución de derivatizante
- Metanol (Methanol, *Scharlab*, CAS No. 67-56-1; $\geq 99,9\%$) y diclorometano (Dichloromethane, *Fischer Scientific*; CAS No. 75-09-2; $\geq 99,8\%$) para el acondicionamiento
- Hidrógenocarbonato de sodio (Sodium hydrogen carbonate, *Sigma Aldrich*, CAS No. 144-55-8; $\geq 99,7\%$) para la disolución de lavado
- Hexano (n-Hexane, *UniSolv, Merck*, CAS No. 110-54-3; $\geq 99\%$) para la elución
- Estándares internos (IS): Fenilacetaldehído deuterado (Phenyl-d5-acetaldehyde, *Eptes*; CAS No. 879549-73-2; $\geq 95\%$) y metional deuterado (Methional-d3, *Eptes*; CAS No. 136430-27-8; $\geq 90\%$)
- Aldehídos de Strecker: Fenilacetaldehído (Phenylacetaldehyde, CAS No. 122-78-1); Metional (Methional, CAS No. 3268-49-3); Isobutiraldehído (Isobutyraldehyde, CAS No. 78-84-2); 3-metilbutanal (3-methylbutanal, CAS No. 590-86-3); 2-metilbutanal (2-methylbutanal, CAS No. 96-17-3)
- Resina LiChrolut[®] EN (polímero de etilvinilbenceno-divinilbenceno; *Merck*)

3.2. Material

El material utilizado para el trabajo experimental fue:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| ▪ Matraces de 15, 20 y 25 mL y de 1L | ▪ Probetas |
| ▪ Botes Pirex | ▪ Balanza analítica (<i>HR 200, AnD Weighing</i>) |
| ▪ Viales de 2, 12 y 20 mL | ▪ Granatario (<i>WANT</i>) |
| ▪ Viales de inserto de 150 μ L | ▪ Jeringas Hamilton de 200 y 100 μ L |
| ▪ Espátulas | ▪ Medidor de pH (<i>micropH 2002, CRISON</i>) |
| ▪ Vasos de precipitados | ▪ Agitador magnético (<i>MST Magnetic Stirrer, VELP Scientifica</i>) |
| ▪ Micropipetas | |
| ▪ Bureta | |

Durante la realización del experimento 2, además, se utilizaron:

- Sensores de oxígeno (*Pst3, Nomasense*)
- Medidor portátil de oxígeno de fibra óptica (*Fibox 3 LCD-trace, PreSens*)
- Baño de agua con agitación (*OLS Aqua Pro Shaking Water Bath, GRANT*)

Para la preparación de muestras en el análisis de aldehídos se utilizaron cartuchos de SPE de polipropileno de 1mL de capacidad, reservorios y adaptadores. Los cartuchos estaban conectados a un sistema de extracción en fase sólida semiautomático (*VAC Elut 20, Varian*). También se utilizó un horno a 35°C para la reacción de derivatización.

3.3. Instrumentación

El equipo utilizado para el análisis de las muestras fue un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas con un detector cuadrupolo (*Gas Chromatograph Mass Spectrometer, GCMS-QP-2010, Shimadzu*). Se trabaja con ventanas en modo SIM según la Tabla 5. La columna utilizada fue una DB-WAXetr de dimensiones 30m, 0.25mm x 0.5µm. La presión fue de 68,8 kPa. El gas portador fue helio. El horno se programó de manera que la temperatura fue de 40°C durante 4 min y después se utilizó una rampa de 10°C/min hasta 250°C. Se utilizó un inyector automático (*SPL1 Split/Splitless Shimadzu AOC-5000*), que trabajó en modo splitless. La temperatura del inyector fue de 250°C y se inyectaron 3µL.

Comienzo (min)	Final (min)	m/z iones detectados
14,60	15,20	181, 250, 195, 239, 253
15,60	18,10	181, 239, 195, 253, 266
22,20	23,20	181, 252, 299, 302
23,20	24,00	181, 239, 252, 313
24,00	24,80	181, 91, 297, 96, 301

Tabla 5: Ventanas del detector

3.4. Experiencias

3.4.1. Experimento 1

- Condiciones

Se prepararon 22 viales de 13 mL llenos hasta su límite con diferente contenido. Se dejaron cerrados y sellados durante 32 días a temperatura ambiente. Previamente al cierre de los viales, se desplazó el oxígeno de las disoluciones borboteando nitrógeno.

- Muestras

A partir de las disoluciones madre descritas en el apartado 3.1 se prepararon 11 sistemas de reacción diferentes con dos réplicas A y B cada uno. La matriz utilizada en este experimento fue vino sintético 1.

El contenido de los sistemas queda recogido en la siguiente tabla:

Sistema	Contenido
1	1mM Phe + 1mM Diacetilo
2	1mM Phe
3	1mM Met + 1mM Diacetilo
4	1mM Met
5	1mM Val + 1 mM Diacetilo
6	1mM Val
7	1mM Leu + 1mM Diacetilo
8	1mM Leu
9	1mM Ile + 1mM Diacetilo
10	1mM Ile
11	1mM Diacetilo

Tabla 6: Sistemas de reacción Experimento 1

Transcurridos los 32 días, se dio por finalizado el experimento y se dio paso al método preparativo de muestra para su posterior análisis. La preparación de las muestras se realizó mediante una extracción en fase sólida. Este proceso consiste en la retención de los analitos en un lecho de adsorbente (en este caso, resina LiChrolut EN) y su posterior elución para análisis.

Para la calibración usamos estándares internos (IS) y calculamos factores de respuesta con dos puntos: el punto “0” (VS0 o blanco); y el punto “alto” (VSFR o dopado), que contiene los analitos (los aldehídos de Strecker) en concentración conocida y similar a la que esperamos encontrar en nuestros sistemas.

Para mejorar la selectividad y sensibilidad del método, es necesario realizar una derivatización de los analitos como paso previo a la extracción.

El proceso queda resumido en el siguiente diagrama:



Figura 3: Diagrama de flujo del proceso

- 1. Preparación de disoluciones:** Se prepararon la disolución de derivatizante (10 g/L de PFBHA en agua destilada), la disolución de lavado (disolución agua/metanol al 60 % (v/v) en metanol y 1%(m/m) en hidrógenocarbonato de sodio) y el vino sintético (de igual composición que VS1) necesarios para la extracción.

También se preparó la disolución de estándares internos (IS: una única disolución 20 mg/L de fenilacetaldehído deuterado y 20 mg/L de metional deuterado en etanol) y la de dopado, que contiene los cinco aldehídos de Strecker en concentración conocida (una única disolución en etanol de 20 mg/L para todos los aldehídos excepto el metional, que tiene una concentración de 10 mg/L).

- 2. Adición de IS a las muestras:** Los 22 viales que contenían los sistemas de reacción se abrieron y sufrieron el mismo tratamiento. En un matraz de 10 mL se adicionaron 28 μ L de la disolución de IS, 300 μ L de la disolución de derivatizante y se enrasó con el contenido de los viales. El volumen del matraz de trasvasó a un vial nuevo y se llevó a incubar. Este proceso se realizó de manera inmediata tras la apertura de los viales para evitar su saturación con el oxígeno presente en el aire.

Además se prepararon dos matraces de 25 mL para la elaboración del punto “0” y del punto “alto” del factor de respuesta. Ambos contenían la misma cantidad de la disolución de IS y de la disolución de derivatizante pero, además, se añadió cierta cantidad de la disolución de dopado en el matraz del punto “alto”. Se enrasaron con vino sintético. El contenido de cada matraz queda recogido en la tabla 6. Por cada matraz, se elaboraron 2 viales de 10 mL trasvasando este volumen con una pipeta y se llevaron a incubar junto con el resto de muestras.

Disolución	Volumen añadido a VS0	Volumen añadido a VSFR
IS	70 μ L	70 μ L
Derivatizante	750 μ L	750 μ L
Dopado	No	200 μ L
VS1	Enrase	Enrase

Tabla 7: Volúmenes añadidos a los matraces de 25 mL de VS0 y VSFR (factor de respuesta)

El siguiente diagrama resume los pasos seguidos por los sistemas de reacción y muestras durante el experimento hasta este momento:

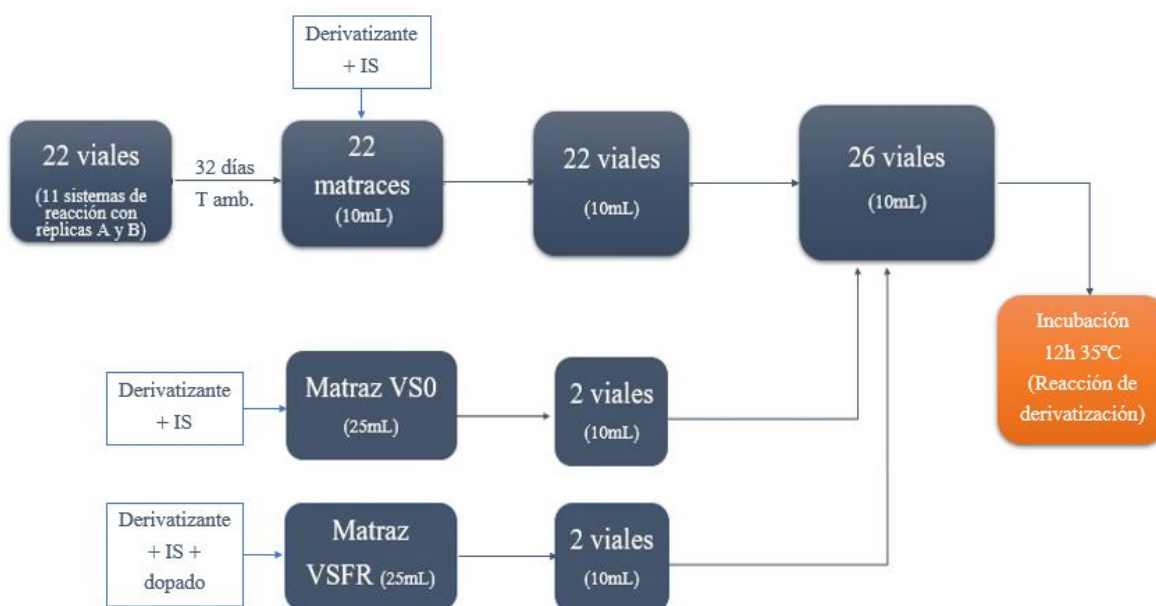


Figura 4: Diagrama de flujo de las muestras

- Reacción de derivatización:** Los viales se incubaron en un horno a 35°C durante 12h y se produjo la reacción de derivatización. El derivatizante utilizado es PFBHA. Este compuesto reacciona con los grupos carbonilo de los aldehídos formados y se generan oximas. Se obtiene el isómero E y el isómero Z, que a veces se separan en el cromatograma y otras veces no.

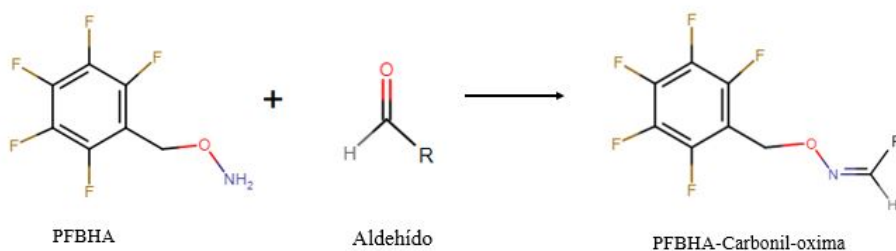


Figura 5: Reacción de derivatización

- Extracción SPE:** Una vez transcurridas las 12h, se sacaron los viales del horno. Por cada vial de muestra se preparó un cartucho de 1 mL de capacidad provisto de un disco fritado o fritz, en el que se pesaron 30 mg de resina y se introdujo otro disco fritado encima para evitar que la resina se saliera. Todos los cartuchos se dispusieron conectados por su extremo inferior a un sistema de vacío provisto de vasos colectores. Por el extremo superior se acoplaron mediante un adaptador a un reservorio de plástico. La extracción consta de varias etapas:

- Etapa de acondicionamiento: Se activa la resina, que posteriormente reaccionará con las oximas formadas al derivatizar los analitos. La activación se consigue haciendo pasar cierto volumen de uno o más disolventes de determinada polaridad. En este punto es necesario tener en cuenta que antes de pasar la muestra, se haya percolado a través de la resina una disolución lo más parecida posible a la matriz de las muestras (en nuestro caso, una matriz vínica sintética). Por tanto, los disolventes pasan de mayor a menor polaridad: se adicionó primero 1 mL de diclorometano (muy polar), después 1 mL de metanol (menos polar), y por último, 1 mL de vino sintético (matriz de las muestras). Entre el paso de un reactivo y otro, fue necesario esperar hasta que todo el volumen adicionado hubiera atravesado el cartucho por acción de la gravedad, ya que en este punto el sistema de vacío no está conectado.
 - Etapa de carga de muestra: Se adicionaron los 10 mL de muestra al cartucho. Los analitos quedan retenidos en el adsorbente así como compuestos de polaridad similar. El eluato y compuestos no afines a la resina salen del cartucho y son recogidos en los vasos colectores. En esta etapa se utilizó el vacío para aligerar el paso de la muestra. Es importante controlar la velocidad de paso de muestra de cada cartucho, que fue aproximadamente de 2 gotas/s, así como la presión, que no puede superar los 20psi.
 - Etapa de lavado: Se eliminan los compuestos que por similitud en polaridad a los analitos, también han quedado retenidos en la resina. Esto se consigue haciendo pasar un disolvente de cierta polaridad a través del cartucho. De esta manera, se adicionaron 10mL de disolución de lavado. De igual forma que en la etapa anterior, el sistema de vacío estaba conectado.
 - Etapa de secado: Se eliminan los restos de disolventes por secado a vacío durante, al menos, 15 minutos. Cuando la resina experimenta un cambio de color al quedar seca y se observa cómo las partículas que la forman están sueltas, se apaga el vacío, se desmontan los reservorios y adaptadores y se retiran los cartuchos.
5. **Elución**: Con una bureta se adicionaron 1,2 mL de hexano en los cartuchos ya secos. Cada cartucho estaba colocado encima de un vial de 2mL de capacidad. Como el volumen de elución es significativamente más pequeño que el volumen inicial de muestra (1,2 mL frente a los 10 mL iniciales), se consigue una preconcentración de las muestras antes del análisis. Los viales se cerraron con un tapón provisto de un séptum.
6. **Inyección en GC**: Los viales con séptum se llevaron al cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) donde se pincharon. Los cromatogramas fueron tratados posteriormente con el software del equipo (GC-MS Postrun Analysis).

La siguiente figura se corresponde con una parte del cromatograma de la muestra VSFR A, a modo de ejemplo. En el eje Y se representa la intensidad mientras que en el eje X el tiempo de retención (min). En él se identifican el 2-metilbutanal (suma de isómeros; $t_r=15,97$) y el 3-metilbutanal (isómero 1: $t_r=16,30$ e isómero 2: $t_r=16,54$). Los diferentes cromatogramas iónicos superpuestos se corresponden con los distintos m/z de los iones de cuantificación y de confirmación (239, 253, 181 y 195 para el 2-metilbutanal; 239, 195, 181 y 266 para el 3-metilbutanal).

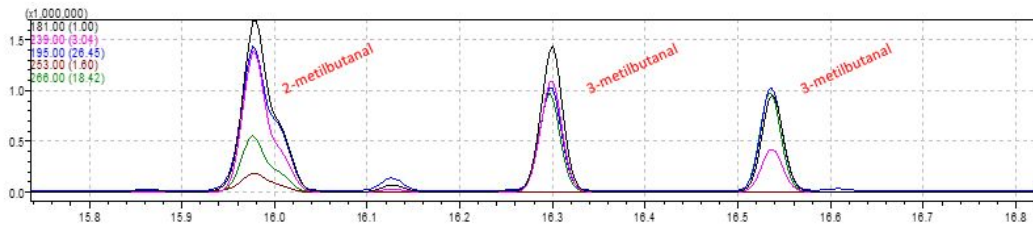


Figura 6: Fragmento del cromatograma de la muestra VSFR A

Se integraron los picos de los analitos y de los IS. En la siguiente tabla aparecen los tiempos de retención, los IS correspondientes a cada analito y las relaciones m/z de los iones de cuantificación y de los iones de confirmación:

Compuesto	IS	Tr (min)	Ion cuantificación m/z	Ion confirmación m/z
Isobutiraldehído (suma de isómeros)	Metional deuterado	14,95	250	195, 239, 181
2-metil-butanal (suma de isómeros)	Fenilacetaldehído deuterado	15,97	239	253, 195, 181
3-metilbutanal (isómero 1)	Fenilacetaldehído deuterado	16,31	239	195, 266, 181
3-metilbutanal (isómero 2)	Fenilacetaldehído deuterado	16,54	239	195, 266, 181
Metional deuterado (IS)		22,58	302	252, 181
Metional (suma de isómeros)	Metional deuterado	22,61	299	252, 181
Fenilacetaldehído deuterado (IS)		24,24	301	96, 181
Fenilacetaldehído (suma de isómeros)	Fenilacetaldehído deuterado	24,31	297	91, 181

Tabla 8: Datos para la cuantificación de los aldehídos de Strecker

Para calcular las concentraciones de los aldehídos de Strecker, primero se calcularon las señales (áreas relativas) de cada analito en cada una de las muestras (S_i^α):

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

donde A_i^α es el área absoluta del pico del analito i en la muestra α y $A_{IS(i)}^\alpha$ es el área absoluta del pico del estándar interno del analito i en la muestra α .

Después se calcularon los factores de respuesta de cada analito:

$$FR_i = \frac{S_i^{FR} - S_i^0}{C_i^{FR} - C_i^0} \quad (2)$$

donde S_i^{FR} es la señal (área relativa) de cada analito en el punto alto (VSFR) y C_i^{FR} su concentración; mientras que S_i^0 es la señal (área relativa) en el punto cero (VS0) y C_i^0 la concentración de cada analito en el mismo, que es 0 mg/L ya que la disolución VS0 no contenía disolución de dopado.

Finalmente, para calcular la concentración de cada analito en las muestras (C_i^α) el factor de respuesta se aplicó de tal forma:

$$C_i^\alpha = \frac{S_i^\alpha}{FR_i} \quad (3)$$

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) de los aldehídos de Strecker para este método son:

Aldehído	LD	LC
Isobutiraldehído	0,004	0,014
2-metilbutanal	0,027	0,091
3-metilbutanal	0,026	0,086
Metional	0,292	0,972
Fenilacetaldehído	0,154	0,513

Tabla 9: Límites de detección y cuantificación ($\mu\text{g/L}$)

3.4.2. Experimento 2

- Condiciones

Se prepararon 22 viales de 13 mL de capacidad con 11 mL de cada uno de los sistemas saturados con aire. Se dejó espacio de cabeza para conseguir una concentración de O_2 disuelto cercana a la saturación, necesaria para oxidar el fenol. La matriz de las muestras fue vino sintético 2, que contenía Fe(II) y Cu(II). Cada vial llevaba un sensor de oxígeno incorporado. Se dejaron cerrados y sellados a temperatura ambiente (10 días). Durante este tiempo se tomaron varias medidas de oxígeno de los viales. Como el oxígeno se consumía muy despacio, a los 10 días se introdujeron en un baño de agua a 35°C con agitación, donde permanecieron 47 días. Durante este tiempo también se tomaron medidas del oxígeno disuelto presente en los viales para asegurar un consumo de oxígeno suficiente para formar la 4-metilquinona y así poder darse la reacción de Strecker.

- Muestras

A partir de las disoluciones madre descritas anteriormente se prepararon 22 viales de muestra (11 viales con réplicas A y B) con el siguiente contenido:

Sistema	Contenido
1	1mM Phe + 1mM 4-metilcatecol
2	1mM Phe
3	1mM Met + 4-metilcatecol
4	1mM Met
5	1mM Val + 4-metilcatecol
6	1mM Val
7	1mM Leu + 4-metilcatecol
8	1mM Leu
9	1mM Ile + 4-metilcatecol
10	1mM Ile
11	4-metilcatecol

Tabla 10: Sistemas de reacción Experimento 2

Transcurridos los 57 días se dio por finalizado el experimento y se sacaron los viales del baño. Se realizó entonces el mismo procedimiento que en el experimento 1. Se derivatizaron los 26 viales y se realizó una extracción en fase sólida seguida de la elución con hexano y el análisis en el GC-MS.

4. Resultados y discusión

4.1. Experimento 1

En este experimento se quería determinar el nivel de reactividad del diacetilo con cada uno de los aminoácidos precursores de los aldehídos de Strecker. Los resultados de los análisis de los aldehídos aparecen en las siguientes tablas:

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/L}$)				
	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhído
Phe + Diacetilo A	<LD	<LD	<LD	<LD	16,0
Phe + Diacetilo B	<LD	<LD	<LD	<LD	14,1
Media	-	-	-	-	15,0
RSD (%)					6,4
Phe A	7,0	<LD	<LD	<LD	5,0
Phe B	<LD	<LD	<LD	<LD	5,0
Media	-	-	-	-	5,0
RSD (%)					2,1

Tabla 11: Concentración de cada analito en las muestras con el aminoácido fenilalanina

Concentración ($\mu\text{g/L}$)					
Muestra	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Met + Diacetilo A	<LD	10,1	3,9	66,2	<LD
Met + Diacetilo B	<LD	<LD	<LD	75	<LD
Media	-	-	-	70,9	-
RSD (%)				9,0	
Met A	5,0	<LD	0,9	<LD	<LD
Met B	<LD	<LD	3,0	<LD	<LD
Media	-	-	1,9	-	-
RSD (%)			41,4		

Tabla 12: Concentración de cada analito en las muestras con el aminoácido metionina

Concentración ($\mu\text{g/L}$)					
Muestra	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Val + Diacetilo A	5,0	<LD	<LD	<LD	<LD
Val + Diacetilo B	5,1	<LD	<LD	<LD	<LD
Media	5,0	-	-	-	-
RSD (%)	6,9				
Val A	3,9	<LD	<LD	<LD	<LD
Val B	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Media	-	-	-	-	-
RSD (%)					

Tabla 13: Concentración de cada analito en las muestras con el aminoácido valina

Concentración ($\mu\text{g/L}$)					
Muestra	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Leu + Diacetilo A	<LD	<LD	21,0	<LD	<LD
Leu + Diacetilo B	<LD	<LD	19,4	<LD	<LD
Media	-	-	20,2	-	-
RSD (%)			9,5		
Leu A	6,0	<LD	8,1	<LD	<LD
Leu B	<LD	<LD	7,0	<LD	<LD
Media	-	-	7,6	-	-
RSD (%)			15,1		

Tabla 14: Concentración de cada analito en las muestras con el aminoácido leucina

Concentración ($\mu\text{g/L}$)					
Muestra	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Ile + Diacetilo A	<LD	11,0	<LD	<LD	<LD
Ile + Diacetilo B	<LD	15,1	<LD	<LD	<LD
Media	-	13,0	-	-	-
RSD (%)		22,0			
Ile A	4,9	9,0	1,9	<LD	<LD
Ile B	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Media	-	-	-	-	-
RSD (%)					

Tabla 15: Concentración de cada analito en las muestras con el aminoácido isoleucina

Concentración ($\mu\text{g/L}$)					
Muestra	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Diacetilo A	<LD	10,0	<LD	<LD	<LD
Diacetilo B	7,1	<LD	<LD	<LD	<LD
Media	-	-	-	-	-
RSD (%)					

Tabla 16: Concentración de cada analito en las muestras con diacetilo sin aminoácidos

La siguiente tabla resume las concentraciones y sus intervalos de confianza (IC) expresadas en mM de los aldehídos de Strecker obtenidos a partir de cada aminoácido:

Concentración (mM)					
	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldehído
Val	$6,93 \cdot 10^{-5} \pm 1,50 \cdot 10^{-7}$				
Ile		$1,51 \cdot 10^{-4} \pm 2,30 \cdot 10^{-5}$			
Leu			$2,32 \cdot 10^{-4} \pm 1,15 \cdot 10^{-5}$		
Met				$6,82 \cdot 10^{-4} \pm 4,35 \cdot 10^{-5}$	
Phe					$1,25 \cdot 10^{-4} \pm 8,50 \cdot 10^{-6}$

Tabla 17: Resumen de las concentraciones medias (\bar{x}) de aldehídos de Strecker en el experimento 1 *Intervalo de confianza (IC) = $\bar{x} \pm s/\sqrt{n}$, siendo s la desviación estándar y n el número de muestras*

Los resultados muestran la especificidad de la reacción: cada uno de los aldehídos de Strecker sólo aparece cuando se introduce en el sistema el aminoácido precursor correspondiente junto con el diacetilo (fenilalanina-fenilacetaldehído; metionina-metional; valina-isobutiraldehído; leucina-3-metilbutanal; isoleucina-2-metilbutanal). Se observa una excepción: en una de las réplicas también aparecen 2-metilbutanal y 3-metilbutanal cuando el aminoácido era metionina, pero en una concentración seis veces inferior o menor a la del metional.

En algunas muestras que sólo contenían aminoácido también se determinaron ciertas cantidades de aldehídos (por ejemplo, en Leucina A se detectaron isobutiraldehído y 3-metilbutanal). Este hecho puede sorprender, dado que no son un sistema aminoácido + compuesto dicarbonílico. Sin embargo, no tenemos que obviar el hecho de que muchos aldehídos se encuentran ya en el medio ambiente (forman parte de los llamados compuestos orgánicos volátiles (VOCs)). Incluso se llegaron a detectar isobutiraldehído y 2-metilbutanal en los viales que no contenían ningún aminoácido, tan sólo diacetilo. Además, en la mayoría de los casos en los que esto ocurre, las concentraciones que aparecen son menores que en aquellos sistemas que contienen el aminoácido y el compuesto dicarbonílico.

Las desviaciones estándar relativas (RSD (%)) que aparecen en las tablas se refieren a la imprecisión acumulada del proceso de oxidación (dos réplicas A y B) y del método de análisis (reacción de derivatización, elución, inyección y cromatografía). Por lo general, son inferiores al 15 %, excepto para el 2-metilbutanal, que es algo mayor (22 %) o 3-metilbutanal (41,4 %) en las muestras de control del aminoácido metionina.

Las concentraciones de los aldehídos de Strecker obtenidos en los sistemas oscilan entre $6,9 \cdot 10^{-5}$ mM (en el caso del isobutiraldehído) y $6,8 \cdot 10^{-4}$ mM (en el caso del metional). Por

tanto, los rendimientos de la reacción para nuestros sistemas, partiendo de 1mM de los precursores son de entre 0,007 % y 0,07 %. En la única referencia¹³ de la que se tiene constancia de la reacción de los diferentes aminoácidos con diacetilo, sólo se aportan resultados cualitativos de los aldehídos de Strecker obtenidos, por lo que no es posible la comparación de estos resultados cuantitativos.

Precisamente, destaca también el hecho de que sea el aminoácido metionina el precursor que forma mayor cantidad de aldehído de Strecker. En el estudio del que surgió la idea de este trabajo,¹¹ se consideraba la posibilidad de que fuera la fenilalanina el aminoácido que reaccionase con el diacetilo de una manera específica. A la vista de estos resultados no podemos dar por válida esta hipótesis.

Se realizó un análisis estadístico de la varianza (ANOVA) de un factor ($\alpha=0,05$) para comparar las medias de las concentraciones de aldehídos de Strecker según el aminoácido utilizado. El resultado del test muestra que existen diferencias significativas en la concentración de aldehído según el aminoácido utilizado. También se realizó un test de Fisher ($\alpha=0,05$) para ver si existían diferencias significativas entre pares de grupos.

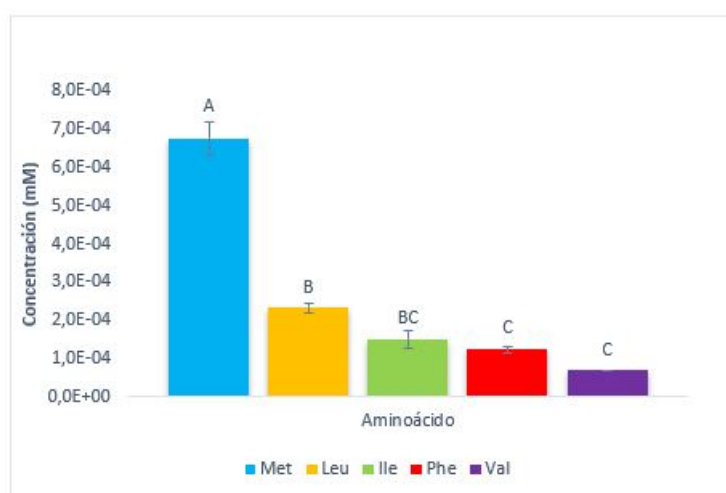


Figura 7: Representación de las concentraciones medias de los aldehídos y de las comparaciones por pares según el aminoácido precursor. *Letras diferentes indican diferencias significativas.*

A la vista de los resultados, se puede afirmar que existen diferencias significativas entre las concentraciones de aldehídos de Strecker obtenidas con el aminoácido metionina (A) y el resto (grupos B, BC y C). También hay diferencias significativas entre la concentración obtenida con leucina (B) y fenilalanina (C); así como las obtenidas entre leucina (B) y valina (C).

4.2. Experimento 2

En este experimento se pretendía estudiar la reacción de formación de los aldehídos de Strecker a partir de la quinona del 4-metilcatecol y observar si había también alguna especificidad compuesto dicarbonílico-aminoácido. Los resultados de los análisis de aldehídos se muestran en la siguientes tablas:

Concentración ($\mu\text{g/L}$)					
Muestra	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhid
Phe + 4-MeCat A	4,0	<LD	<LD	<LD	18698,1
Phe + 4-MeCat B	No lo tenemos en cuenta por posible apertura del vial				
Media	-	-	-	-	-
RSD (%)					
Phe A	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Phe B	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Media	-	-	-	-	-
RSD (%)					

Tabla 18: Concentración de cada analito en las muestras con el aminoácido fenilalanina

Concentración ($\mu\text{g/L}$)					
Muestra	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhid
Met + 4-MeCat A	<LD	10,9	<LD	41811,0	<LD
Met + 4-MeCat B	<LD	<LD	<LD	42218,1	<LD
Media	-	-	-	42014,5	-
RSD (%)				0,7	
Met A	<LD	2,9	<LD	100,2	<LD
Met B	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Media	-	-	-	-	-
RSD (%)					

Tabla 19: Concentración de cada analito en las muestras con el aminoácido metionina

Concentración ($\mu\text{g/L}$)					
Muestra	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhid
Val + 4-MeCat A	10062,0	<LD	<LD	<LD	<LD
Val + 4-MeCat B	8119,0	<LD	<LD	<LD	<LD
Media	9090,5	-	-	-	-
RSD (%)	15,1				
Val A	4,9	<LD	<LD	<LD	<LD
Val B	<LD	3,0	<LD	<LD	<LD
Media	-	-	-	-	-
RSD (%)					

Tabla 20: Concentración de cada analito en las muestras con el aminoácido valina

Concentración ($\mu\text{g/L}$)					
Muestra	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhid
Leu + 4-MeCat A	<LD	<LD	8619,0	<LD	<LD
Leu + 4-MeCat B	No lo tenemos en cuenta por posible apertura del vial				
Media	-	-	-	-	-
RSD (%)					
Leu A	<LD	4,0	9,9	<LD	<LD
Leu B	<LD	3,0	7,2	<LD	<LD
Media	-	3,5	8,5	-	-
RSD (%)		20,9	21,5		

Tabla 21: Concentración de cada analito en muestras con el aminoácido leucina

Concentración ($\mu\text{g/L}$)					
Muestra	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhidó
Ile + 4-MeCat A	23,0	7026,1	<LD	<LD	<LD
Ile + 4-MeCat B	22,9	8280,2	<LD	<LD	<LD
Media	22,9	7653,1	-	-	-
RSD (%)	1,9	11,6			
Ile A	<LD	17,0	<LD	<LD	<LD
Ile B	<LD	7,0	<LD	<LD	<LD
Media	-	12,0	-	-	-
RSD (%)		54,6			

Tabla 22: Concentración de los analitos en las muestras con el aminoácido isoleucina

Concentración ($\mu\text{g/L}$)					
Muestra	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhidó
4-metilcatecol A	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
4-metilcatecol B	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Media	-	-	-	-	-
RSD (%)					

Tabla 23: Concentración de cada analito en las muestras con 4-metilcatecol sin aminoácidos

En la siguiente tabla se resumen las concentraciones y sus intervalos de confianza (IC) expresadas en mM de los aldehídos de Strecker encontradas en las muestras según el aminoácido utilizado:

Concentración (mM)					
	Isobutiraldehído	2-metilbutanal	3-metilbutanal	Metional	Fenilacetaldéhidó
Val	0,13 \pm 0,01				
Ile		0,09 \pm 0,01			
Leu			0,10*		
Met				0,40 \pm 1,95 \cdot 10 ⁻³	
Phe					0,15*

Tabla 24: Resumen de las concentraciones medias (\bar{x}) de aldehídos de Strecker en el experimento 2 *Intervalo de confianza (IC)* = $\bar{x} \pm s/\sqrt{n}$, siendo s la desviación estándar y n el número de muestras. *Sólo una réplica considerada

Antes de la discusión de los resultados conviene explicar que durante el análisis de algunas de las muestras de este experimento (en concreto, aquellas que llevaban aminoácido y 4-metilcatecol), el detector llegó a saturarse. Esto es consecuencia de la alta concentración en la que se encontraban algunos de los aldehídos (por ejemplo, en el caso del metional la concentración fue de 42,01 mg/L). Por esto, los extractos afectados y sus réplicas fueron diluidos (dilución 1:5) y se analizaron de nuevo. Los datos de las tablas ya tienen en cuenta la dilución empleada. Además, al inyectar dos de las muestras (sistema 1B y sistema 7B) el cromatograma no estaba saturado, mientras que los de sus réplicas sí. Ante la duda de si la irreproducibilidad de estos datos se debía a un error humano en la preparación de las muestras o no, se estudiaron también las medidas de oxígeno tomadas durante todo el experimento. Se vio que en todo momento las muestras y sus réplicas mantenían la concordancia en la medida de oxígeno, excepto en las últimas medidas de esos dos viales, que inexplicablemente variaban en gran medida. Podemos quizá atribuir esto a una posible apertura del vial o fisura en la silicona que mantenía

los viales sellados. Por tanto, no se tienen en cuenta estas dos muestras para la sucesiva discusión.

Los resultados muestran la especificidad aminoácido precursor-aldehído de Strecker sobre la que ya se ha discutido anteriormente. En algunos de los casos, además del aldehído de Strecker correspondiente, se determinaron otros, siendo las concentraciones de estos últimos mucho menores con respecto a las de los primeros. Por ejemplo en el caso de la fenilalanina, en el que en una de las réplicas con 4-metilcatecol se determinó isobutiraldehído (4,0 $\mu\text{g/L}$) además de fenilacetaldehído (18698,1 $\mu\text{g/L}$); o en el caso de la metionina, donde se detectó 2-metilbutanal (10,9 $\mu\text{g/L}$) además de metional (41811,0 $\mu\text{g/L}$).

En algunas de las muestras que no contenían 4-metilcatecol también se encontraron aldehídos, si bien es cierto que en todos los casos la concentración fue baja en comparación con la que se obtenía cuando sí había 4-metilcatecol. Esto ocurre, por ejemplo, en el caso de la isoleucina, donde se determinó 2-metilbutanal en concentración de 12,0 $\mu\text{g/L}$ en los sistemas donde sólo estaba el aminoácido, frente a 7653,1 $\mu\text{g/L}$ en las muestras donde también había 4-metilcatecol.

Las desviaciones estándar relativas (RSD (%)) que aparecen en las tablas se refieren a la imprecisión acumulada del proceso de oxidación y del método de análisis. En general, son inferiores al 15 %, excepto en los sistemas con sólo aminoácido, donde las concentraciones de aldehídos son inferiores.

Las concentraciones de aldehído de cada sistema con aminoácido varían hasta cuatro veces (desde 0,09 mM en el caso del isobutiraldehído hasta 0,40 mM en el caso del metional), que se traduce en unos rendimientos de entre el 9 y el 40 % según el aminoácido utilizado. En bibliografía consultada,¹⁷ se estudian las concentraciones de fenilacetaldehído y metional obtenidas utilizando distintos compuestos fenólicos capaces de formar quinonas (ácido cafeico, ácido gálico y (+)-catequina). Éstas variaban entre 40-70 $\mu\text{g/L/día}$ para el fenilacetaldehído y 200-250 $\mu\text{g/L/día}$ para el metional. Con respecto a las concentraciones iniciales que utilizaban de compuestos fenólicos (0,6mM), en 57 días los rendimientos obtenidos hubieran sido de entre 0,05-11 % para el fenilacetaldehído y 18-23 % para el metional, dependiendo del fenol utilizado. En nuestro caso, los rendimientos para estos dos aldehídos de Strecker son del 15 y 40 %, respectivamente, por lo que se puede extraer que el 4-metilcatecol da mejores resultados en la reacción de Strecker que otros compuestos fenólicos estudiados anteriormente.

Se realizó un test estadístico de la varianza (ANOVA) de un factor ($\alpha=0,05$) y se encontró que había diferencias significativas entre las concentraciones medias de aldehídos de Strecker obtenidas según el aminoácido utilizado. Asimismo, se llevó a cabo un test de Fisher ($\alpha=0,05$) para ver las diferencias entre pares de grupos. Según los resultados (ver Figura 8), se puede concluir que existen diferencias significativas entre las concentraciones de aldehído utilizando la metionina (grupo A) y las encontradas utilizando el resto de los aminoácidos (B, BC, CD, D). También hay diferencias significativas entre las concentraciones medias de aldehído al utilizar fenilalanina (B) y leucina (CD) e isoleucina (D); así como entre valina (BC) e isoleucina (D).

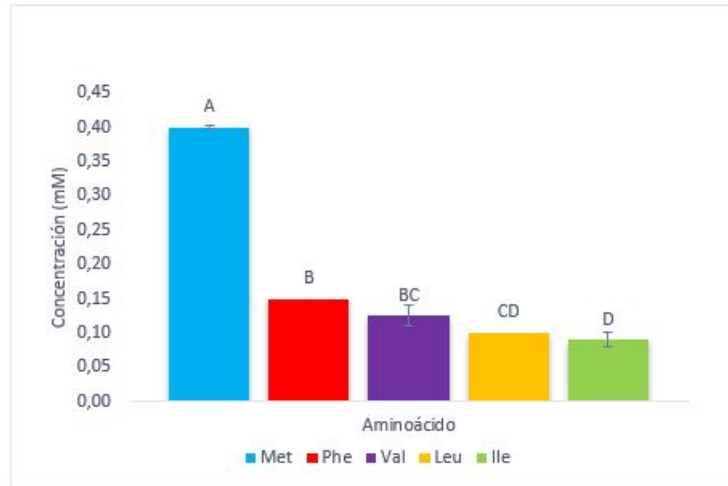


Figura 8: Representación de las concentraciones medias de los aldehídos y de las comparaciones por pares según el aminoácido precursor. *Letras diferentes indican diferencias significativas.*

Para esta experiencia se necesitaba la presencia de oxígeno. Durante los 10 primeros días los viales permanecieron en reposo a temperatura ambiente. Se tomaron medidas de oxígeno y su consumo no era suficiente. Se pensó que la reacción podría no estar sucediendo, motivo por el cual se introdujeron los viales en el baño de agua termostatzado. Así, los viales permanecieron 47 días más a 35°C y con agitación. Los datos de medidas de oxígeno se recogen en el Anexo I. Las gráficas de medida de oxígeno durante los 57 días que duró el experimento se muestran a continuación. No se muestran en ellas los datos de las réplicas anómalas.

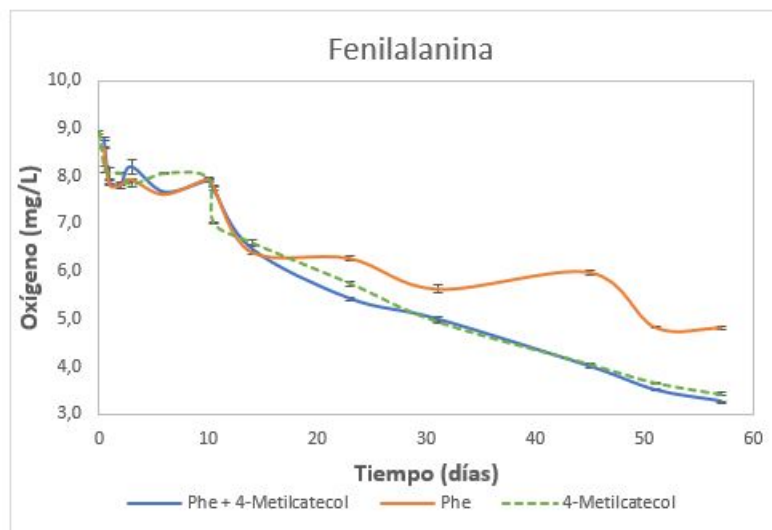


Figura 9: Oxígeno disuelto de los sistemas con fenilalanina y de los sistemas control del fenol

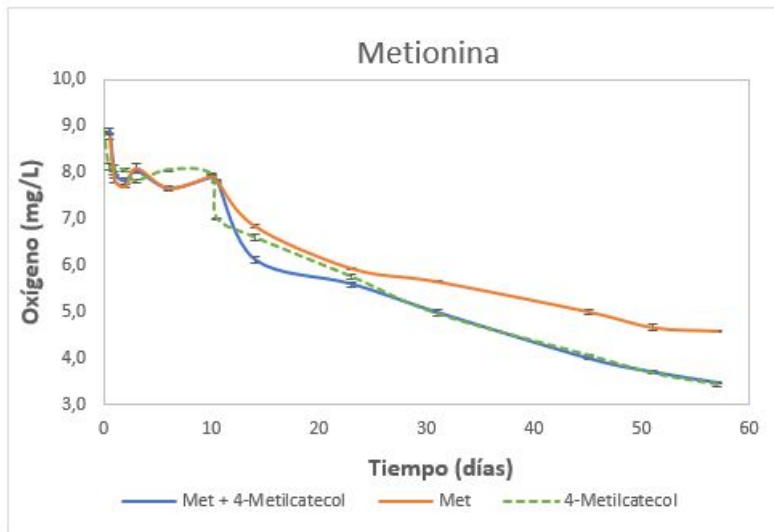


Figura 10: Oxígeno disuelto de los sistemas con metionina y de los sistemas control del fenol

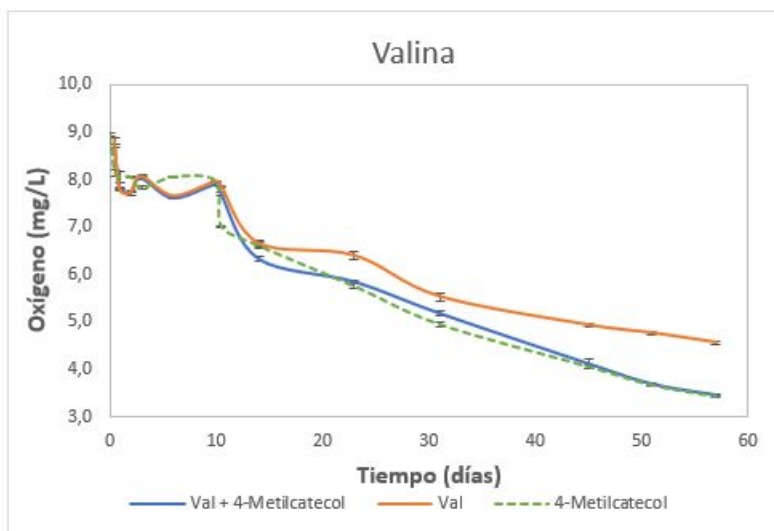


Figura 11: Oxígeno disuelto de los sistemas con valina y de los sistemas control del fenol

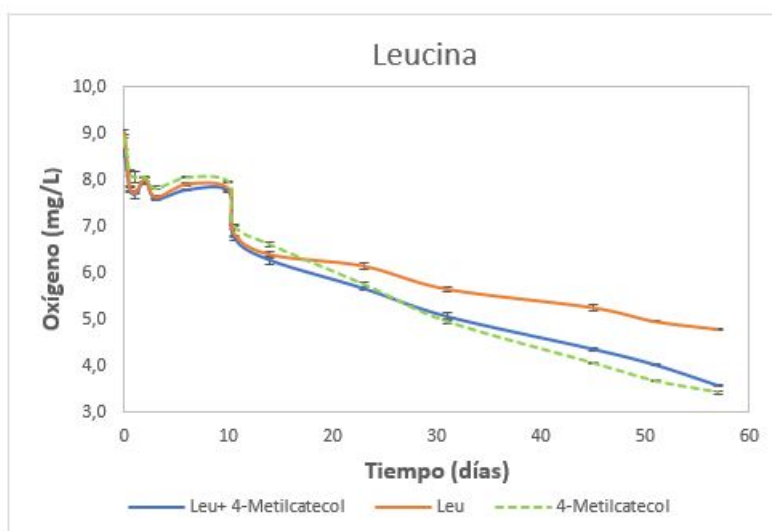


Figura 12: Oxígeno disuelto de los sistemas con leucina y de los sistemas control del fenol

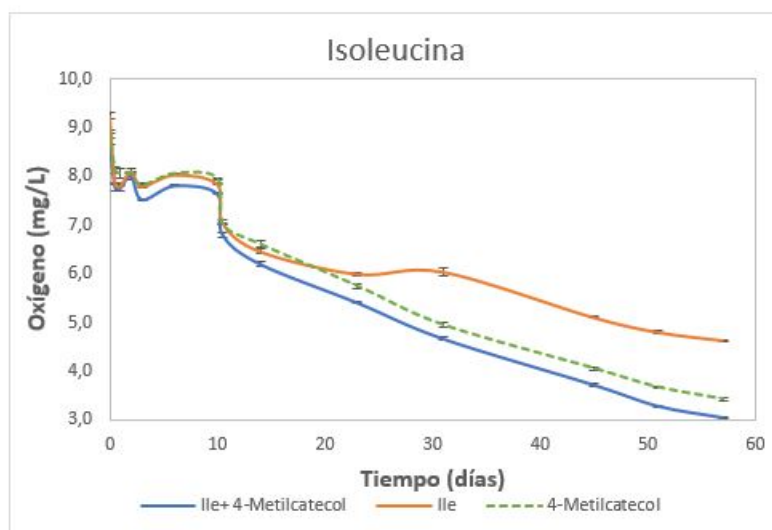


Figura 13: Oxígeno disuelto de los sistemas con isoleucina y de los sistemas control del fenol

En las gráficas se observa cómo inicialmente existe un descenso brusco del nivel de oxígeno disuelto, que se estabiliza en los diez primeros días a temperatura ambiente. Cuando se introducen en el baño de agua a 35°C con agitación, el consumo de oxígeno se acelera, suponiendo la transformación de 4-metilcatecol a 4-metilquinona, compuesto que reaccionaría con los aminoácidos (en las muestras en las que están presentes) y generaría los aldehídos de Strecker.

En los viales que sólo contenían aminoácido, el oxígeno disuelto también disminuye, aunque en menor medida que aquellos que contenían aminoácido + 4-metilcatecol. No hay que olvidar que, aunque no haya compuesto fenólico, sí hay otros compuestos que pueden ser oxidados (como el etanol a acetaldehído).

En todas las gráficas se observa cómo las dos réplicas de cada muestra se comportan de forma reproducible (ver barras de error). Los sistemas de 4-metilcatecol con aminoácido y sin

él difieren muy poco en la cinética de consumo (trazado similar). La formación de aldehídos no parece desplazar la reacción de formación de quinonas hacia la derecha, ni por tanto aumentar el consumo de oxígeno.

5. Conclusiones

En la degradación de Strecker se da una especificidad aminoácido precursor-aldehído de Strecker formado (fenilalanina-fenilacetaldehído, metionina-metional, valina-isobutiraldehído, leucina-3-metilbutanal e isoleucina-2-metilbutanal). El diacetilo es un compuesto carbonílico precursor de la reacción. El rendimiento de la reacción partiendo de concentraciones 1mM de los reactivos ha sido de un 0,07% para la metionina, como aminoácido más reactivo. De forma significativa, el segundo aminoácido más reactivo fue la leucina. Los aminoácidos que menos reaccionaron fueron la fenilalanina y la valina, ésta última con un rendimiento del 0,007% en las condiciones probadas (vino sintético, 32 días y temperatura ambiente).

El 4-metilcatecol fue oxidado a 4-metilquinona, compuesto reactivo de la reacción de Strecker. Existen diferencias significativas en la concentración de aldehído de Strecker formado a partir del aminoácido correspondiente. De forma significativa y con un rendimiento del 40%, la metionina es el aminoácido que más reacciona con la 4-metilquinona, seguida de la fenilalanina. La isoleucina es el menos reactivo, con un rendimiento del 9% en las condiciones probadas (vino sintético, 57 días, 35°C, presencia de oxígeno, Fe y Cu) .

Referencias

- [1] Styger, G.; Prior, B.; Bauer, F. F. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **2011**, *38*, 1145.
- [2] Polášková, P.; Herszage, J.; Ebeler, S. E. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 2478–2489.
- [3] Bueno, M. Estrategias analíticas para la determinación de compuestos carbonílicos. Nuevos avances en la comprensión de los procesos de oxidación en carne de cordero y vino. Ph.D. thesis, Universidad de Zaragoza, 2016.
- [4] Ugliano, M. *Journal of agricultural and food chemistry* **2013**, *61*, 6125–6136.
- [5] Escudero, A.; Asensio, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. *Food chemistry* **2002**, *77*, 325–331.
- [6] Martins, R. C.; Monforte, A. R.; Silva Ferreira, A. *Journal of agricultural and food chemistry* **2013**, *61*, 5371–5379.
- [7] Danilewicz, J. C. *American Journal of Enology and Viticulture* **2003**, *54*, 73–85.
- [8] Waterhouse, A. L.; Laurie, V. F. *American Journal of Enology and Viticulture* **2006**, *57*, 306–313.
- [9] Wildenradt, H.; Singleton, V. *American Journal of Enology and Viticulture* **1974**, *25*, 119–126.
- [10] Díaz, V. C. Caracterización de los procesos químicos asociados a la oxidación del vino. Ph.D. thesis, Universidad de Zaragoza, 2017.
- [11] Bueno, M.; Marrufo-Curtido, A.; Carrascón, V.; Fernández-Zurbano, P.; Escudero, A.; Ferreira, V. *Frontiers in chemistry* **2018**, *6*, 20.
- [12] Monforte, A. R.; Martins, S. I.; Silva Ferreira, A. C. *Journal of agricultural and food chemistry* **2018**, *66*, 2459–2466.
- [13] Pripis-Nicolau, L.; De Revel, G.; Bertrand, A.; Maujean, A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 3761–3766.
- [14] Singleton, V. L. *American Journal of Enology and Viticulture* **1987**, *38*, 69–77.
- [15] Rizzi, G. P. *Journal of agricultural and food chemistry* **2006**, *54*, 1893–1897.
- [16] Jarauta, I.; Cacho, J.; Ferreira, V. *Journal of agricultural and food chemistry* **2005**, *53*, 4166–4177.
- [17] Oliveira, C. M.; Santos, S. A.; Silvestre, A. J.; Barros, A. S.; Ferreira, A. C. S.; Silva, A. M. *Food chemistry* **2017**, *228*, 618–624.
- [18] Culleré, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. *Analytica chimica acta* **2004**, *524*, 201–206.
- [19] Spiteller, G.; Kern, W.; Spiteller, P. *Journal of Chromatography A* **1999**, *843*, 29–98.

