

**"EVOLUCION DE LOS COMPUESTOS CARBONILICOS DURANTE LA  
CONSERVACION DEL CAVA EN RELACION AL PARDEAMIENTO"**

Tesina que presenta D<sup>ña</sup>  
Elvira López Tamames para  
optar al Grado de  
Licenciada en Farmacia.

Ha sido codirigida por la Dra. Concepción Fernández López  
la Dra. M<sup>ra</sup> del Carmen de la Torre Boronat

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, HUMANAS Y DE LA  
NUTRICION.

FACULTAD DE FARMACIA - UNIVERSIDAD DE BARCELONA

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701739263



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
DIVISIÓ DE CIÈNCIES DE LA SALUT  
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES FISIOLÒGIQUES  
HUMANES I DE LA NUTRICIÓ  
NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

La Dra. M<sup>ra</sup> del Carmen de la Torre Boronat, catedrática del Area de Nutrición y Bromatología del Departamento de Ciencias Fisiológicas Humanas y de las Nutrición,

HAGO CONSTAR que la tesina que lleva por título:

" Evolución de los compuestos carbonílicos durante la conservación del cava en relación al pardeamiento "

que presenta Dña. Elvira López Tamames y de la que soy codirectora conjuntamente con la Dra. Concepción Fernández López, ha superado según nuestro criterio los requisitos pertinentes, por lo que puede ser objeto de enjuiciamiento final.

Barcelona, 29 de Septiembre de 1988

Dra. Ma del Carmen de la Torre Boronat

Dra. Concepción Fernández López

A mi madre

Antes de iniciar la exposición de este trabajo, deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que lo han hecho posible.

En primer lugar, deseo agradecer a las Dras. Concepción Fernández López y M<sup>a</sup> del Carmen de la Torre Boronat el prestarme su apoyo y todos los medios a su alcance para llevar a cabo esta Tesina.

Así mismo, mi reconocimiento a todos los miembros del Departamento, en especial al grupo de vinos, por su colaboración y mi más sincera gratitud a todas mis compañeras por su amistad.

## INDICE

1.- Introducción.....	1
2.- Tecnología en la elaboración del vino espumoso.....	3
2.1.- Elaboración del vino base.....	5
2.2.- Segunda fermentación.....	9
3.- El flavor de los vinos.....	12
3.1.- El aroma de los vinos.....	13
3.2.- Aroma prefermentativo.....	14
3.3.- Aroma fermentativo o secundario.....	17
3.4.- Aroma post-fermentativo o terciario.....	20
3.5.-Influencia de la conservación en las características organolépticas y físico-químicas del vino.....	24
3.6.- Participación de los carbonilos volátiles en el aroma del vino envejecido.....	30
3.6.1.- Estudio de las vías de formación de compuestos carbonílicos.....	36
3.6.1.1.- Acetaldehído o etanal.....	47
3.6.1.2.- Benzaldehído.....	52
3.6.1.3.- Aldehídos C <sub>6</sub> .....	54
3.6.1.4.- Diacetilo y acetoina.....	56
3.6.1.5.- Furfural e hidroximetilfurfural...	58

3.7.- Anhidrido sulfuroso en la estabilización de los vinos.....	62
3.7.1.- Propiedad antioxidante y reductora.....	66
3.7.2.- Combinación del SO <sub>2</sub> en el vino.....	67
3.7.3.- Efecto inhibidor de la fermentación.....	70
4.- Modificaciones en el color de los vinos.....	72
4.1.- Pardeamiento enzimático.....	74
4.2.- Pardeamiento no enzimático.....	77
4.2.1.- Reacción de Maillard.....	78
4.2.2.- Oxidación del ácido ascórbico.....	84
4.2.3.- Caramelización.....	86
4.2.4.- Oxidación de polifenoles.....	87
4.3.- Determinación del color.....	92
4.4.- Ensayos de pardeamiento acelerado.....	99
5.- Estudio de los métodos analíticos del aroma.....	106
5.1.- Métodos de concentración y extracción de la fracción volátil.....	108
5.1.1.- Inyección directa.....	108
5.1.2.- Espacio de cabeza.....	110
5.1.3.- Espacio de cabeza dinámico.....	112
5.1.3.1.- Retención en trampas criogénicas.....	115
5.1.3.2.- Retención en trampas adsortivas.....	115

5.1.3.3. - "Trapping" selectivo.....	118
5.1.4. - Destilación y rectificación.....	119
5.1.5. - Concentración por el frío.....	122
5.1.6. - Extracción por disolventes orgánicos.....	122
5.1.7. - Desmixtura.....	126
5.2. -Concentración selectiva de carbonilos volátiles...	128
5.2.1. - Derivatización de carbonilos.....	128
5.2.2. - Separación y cuantificación de DNPS.....	132
5.2.2.1. - Cromatografía en capa fina.....	133
5.2.2.2. - Cromatografía en columna.....	134
5.2.2.3. - Cromatografía de gases.....	135
5.2.2.4. - Cromatografía Líquida (CLAE).....	139
5.3. - Otros métodos de determinación de carbonilos.....	143
5.3.1. - Métodos volumétricos.....	144
5.3.2. - Método espectrofotométricos.....	145
5.3.3. - Métodos enzimáticos.....	147
5.3.4. - Otros métodos de identificación.....	148

## **PARTE EXPERIMENTAL**

6- Descripción de métodos experimentales.....	151
6.1. - Determinación de polifenoles.....	151
6.1.1. - Determinación de polifenoles totales.....	151
6.1.2. - Determinación de o-difenoles.....	152
6.2. - Determinación del color y las características	

espectrales.....	155
6.3.- Determinación del dióxido de azufre.....	156
6.4.- Determinación de: azúcares, etanol y glicerol....	158
6.5.- Determinación de carbonilos.....	161
6.5.1.- Determinación de carbonilos totales .....	161
6.5.1.1.- Descripción del método.....	163
6.5.1.2.- Calibrado.....	164
6.5.1.3.- Ensayo de exactitud-recuperación...166	
6.5.1.4.- Precisión del método.....	167
6.5.2.- Determinación de carbonilos por CLAE.....	169
6.5.2.1.- Concentración y extracción.....	170
6.5.2.2.- Separación por CLAE.....	172
6.5.2.3.- Identificación de los picos.....	173
6.5.2.4.- Interferencia de reactivos.....	178
6.5.2.5.- Calibración y linealidad.....	180
6.5.2.6.- Exactitud - recuperación.....	189
6.5.2.7.- Precisión.....	194
7.- Objetivos y planteamiento del estudio.....	196
8.- Resultados.....	201
8.1.- Azúcares.....	201
8.2.- Alcoholes: glicerol y etanol.....	208
8.3.- Polifenoles.....	211
8.4.- Dióxido de azufre.....	214
8.5.- Color.....	217

8.6. - Carbonilos.....	224
8.6.1. - Carbonilos totales.....	224
8.6.2. - Carbonilos volátiles libres.....	226
8.7. - Relación entre los distintos parámetros.....	237
9. - Conclusiones.....	245

PARTE BIBLIOGRAFICA

## 1. - INTRODUCCION

La preferencia actual en el consumo de vinos blancos, se orienta hacia vinos frescos y afrutados, de graduación alcohólica moderada, relativamente ácidos y poco oxidados, es decir, vinos no evolucionados en su crianza.

Estos vinos jóvenes, muy delicados en su aroma y color, son los que se emplean como vino base para la obtención del cava. El cava es un vino especial, caracterizado por sufrir una segunda fermentación que produce gas de origen endógeno, al que se le exige tenga la misma tonalidad atrayente y viva, aromas florales, relativamente intensos y, todo ello equilibrado sin exceso de etanol. Sin embargo, la laboriosidad de su tecnología, configura un producto especialmente delicado y con problemas de estabilidad de sus propiedades organolépticas, una vez terminado el proceso de manufacturación.

Las modificaciones, que sufre el cava durante el almacenamiento, no mejoran la calidad del producto sino que la hacen disminuir de forma drástica e incluso, pueden llegar a convertirlo en un producto inadecuado para la comercialización.

Ello obliga a que su línea de producción vaya paralela a la de su consumo, lo que acarrea problemas económicos. Por

consiguiente, se ha ido desarrollando una línea de investigación, que tiene como objetivo identificar los compuestos que afectan a las características organolépticas del cava.

El problema de la estabilidad del flavor es complejo, debido a la gran cantidad de sustancias químicas que contiene, a sus interacciones y a los niveles extremadamente bajos en que se encuentran algunas de ellas, pero que pueden bastar para que el producto sea indeseable.

En el presente trabajo, se estudiará la evolución de los compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas), una fracción relativamente poco estudiada, pero, de gran importancia en el desarrollo de "off flavors" oxidados y rancios. Estas sustancias, también guardan relación con el desarrollo del color durante el almacenamiento y conservación del cava, especialmente con fenómenos de pardeamiento y oxidaciones. Asimismo, se sigue la evolución de otros parámetros que pudieran estar relacionados con su presencia en el vino envejecido, como pudiera ser, principalmente, el contenido en azúcares.

## **2. - TECNOLOGIA EN LA ELABORACION DEL VINO ESPUMOSO**

En el siguiente fragmento del artículo 21 del Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes (Ley 25/1970) se define:

**1. Vinos espumosos naturales** son los procedentes de uva de variedades adecuadas, que contienen, como consecuencia de su especial elaboración, gas carbónico, de origen endógeno, y que al ser descorchada la botella y escanciado el vino, forma espuma de sensible persistencia, seguido de un desprendimiento continuo de burbujas.

**2.** El gas carbónico habrá de proceder de una segunda fermentación de los azúcares agregados o naturales del vino base, realizada en envase cerrado, y el producto terminado deberá tener una presión mínima de cuatro atmósferas, medida a 20 °C.

En la elaboración de vino espumoso se utilizan básicamente cuatro métodos:

- **Método "Champenoise"**. Es el más clásico, y consiste en realizar la segunda fermentación en la botella definitiva.

- **Método de trasvase.** En éste, la segunda fermentación tiene lugar en botella pero, al acabar, se trasvasa a una cuba antes del embotellado definitivo.
- **Método de "cuba cerrada discontinua".** En él, todo el proceso de elaboración del vino espumoso transcurre en cubas, hasta su embotellado definitivo.
- **Método de "cuba cerrada continua".** Es semejante al anterior, pero mediante cubas herméticas dispuestas de forma continua.

La elección de estos métodos se lleva a cabo atendiendo a aspectos técnico-económicos y de calidad. La legislación Española (Ley 25/1970) indica ese respecto:

3. Se denominan:

A) **Cava:** Aquel cuya segunda fermentación se realiza en botella, en la que deberá transcurrir todo el proceso de elaboración y crianza hasta la eliminación de lías. Dicho proceso deberá efectuarse en "cavas" o locales de condiciones termicas adecuadas.

B) **De grandes envases:** Aquel cuya segunda fermentación se realiza en grandes envases de cierre hermético, de los que se trasvasa a botellas para su comercialización.

4. El vocablo "cava" y la expresión de "grandes envases" únicamente podrán emplearse en los vinos que hayan sido elaborados, respectivamente, en la forma definida en los apartados anteriores.

El cava, producto objeto de este trabajo, se realiza por el método "Champenois" que representa el 90% del vino espumoso que se

elabora en España, por lo que será ésta la tecnología a la que nos referiremos.

## 2.1. - ELABORACION DEL VINO BASE

En la zona vinícola del Penedés, de donde proceden las muestras analizadas, las variedades de uva empleadas principalmente son: Macabeo, Xarel.lo y Parellada. Su selección debe ser cuidadosa, tratarse de uva sana y escoger el momento óptimo de recolección (adecuada madurez), ya que este punto condiciona una serie de variables complejas, como pueden ser los azúcares, los ácidos, el contenido en sustancias nitrogenadas, y los compuestos aromáticos varietales.

Después de la recolección de la uva, tiene lugar el prensado para la obtención del mosto. Según el grado de presión ejercido durante la extracción, se obtendrán diferentes fracciones de mosto con distinto contenido en azúcares, polifenoles, etc. que condicionarán la calidad del vino. Actualmente, el sistema de prensado más utilizado es el denominado horizontal, pues permite una mayor extracción del mosto a bajas presiones y durante un tiempo corto, lo que evita la trituración de pepitas y escobajos que aportan elevadas sustancias tánicas, y soslayar problemas de oxidación que repercuten en las características organolépticas de los vinos resultantes, (J. Ribereau-Gayon, 1975).

De forma general, se pueden obtener dos tipos de mosto destinados a la elaboración de vino en función de la presión aplicada: el llamado mosto "de primeras" o "flor" que se obtiene durante el llenado de las prensas por el propio peso de la uva, y el denominado "de segundas" obtenido tras alcanzar la presión de 1 Kg/cm<sup>2</sup>.

Durante el prensado, se debe controlar la temperatura, ya que, al aumentarla, se facilita el paso de los compuestos que se hallan en el hollejo de la uva hacia la pulpa, lo que conduce a una disminución de la estabilidad del vino, principalmente, por fenómenos de pardeamiento (Du Plessis, 1983).

Inmediatamente después de la salida del mosto de la prensa, tiene lugar la práctica conocida como sulfitado, que consiste en la adición de dióxido de azufre, a fin de controlar la fermentación y evitar una oxidación intensa del mosto.

El sulfitado previo del mosto condiciona en gran medida la fermentación, por lo que ha de ser moderado a fin de que no se produzca elevada cantidad de acetaldehído, lo que presenta consecuencias negativas en las características organolépticas. La cantidad añadida oscila entre 6-10 g SO<sub>2</sub>/Hl en función del contenido en ácidos, azúcares, la temperatura del prensado y el estado sanitario de las uvas.

Antes de la fermentación, para evitar que ésta se realice en presencia de compuestos que pueden repercutir en la calidad del vino, debe tener lugar el desfangado. Este proceso puede ser estático, con el cual se deja reposar el mosto de 12 a 48 horas a fin de sedimentar las partículas más groseras, o bien dinámico, que puede ser mediante centrifugación o filtración, y que es el más aceptado actualmente.

Una vez desfangado el mosto, se recoge en grandes recipientes donde tendrá lugar la fermentación alcohólica. En el llenado de los tanques fermentativos se usa gas inerte, principalmente nitrógeno, para evitar procesos de oxidación, y se adicionarán levaduras y clarificantes.

Durante la fermentación es importante el control de la temperatura, que oscilará entre 12-15°C, para evitar que se realice de forma tumultuosa, lo que produciría una gran cantidad de CO<sub>2</sub> y una consecuente pérdida de aroma.

Las levaduras más empleadas son del género *Saccharomyces*. J. Ribereau-Gayon y col. (1975) describen distintas especies, e indican que la selección de la misma se basará en la resistencia a la inactivación causada por el alcohol y la adición de SO<sub>2</sub>. Relacionan el metabolismo de distintas levaduras con productos secundarios que pudieran derivar de la fermentación, tal es el caso

del acetaldehído, diacetilo, glicerol y acetoína.

La adición del clarificante, tiene por objeto la obtención de vinos limpios y más estables, siendo los más usados en este aspecto: caseína, gelatina, albúmina e ictiocola. Su empleo está basado en la precipitación de compuestos tánicos por acción coloidal y la eliminación de sustancias proteicas y enzimas oxidantes (influirán en el sabor y color del vino), para lo cual es de elección la bentonita.

La acción del clarificante y la influencia que éste pueda tener en el producto final, depende en gran medida de su naturaleza, del momento de su adición, y del pH y temperatura que fijarán su capacidad de absorción (G. Troost, 1985).

Una vez terminada la fermentación, que dura de 12 a 20 días y que se realiza por separado para cada variedad de uva (al no coincidir su momento de maduración) y para cada tipo de mosto, según la presión ejercida en el prensado, se efectúa el trasiego y se procede a la mezcla o "coupage" de los distintos vinos, cuya proporción variará en función del tipo de cava que se desee obtener, operación que realizan los catadores especializados.

El vino base debe someterse a un proceso de estabilización tartárica, precipitando los cristales de bitartrato potásico, para evitar que una vez acabado el producto, durante el almacenamiento

y por modificaciones de la temperatura, aparezcan dichos cristales.

Antes de proceder a la segunda fermentación, el vino base se filtra para que esté exento de levaduras y bacterias, fijando la Legislación Española (Ley 25/1970) las condiciones mínimas que deben cumplir:

Grado alcohólico (O.I.V.).....	10,8-12,6 % v/v.
Acidez total (en ac. sulfúrico).....	3,5-6 g/l.
Acidez volátil (en ac. acético) menor a .....	0,8 g/l.
Extracto seco no reductor.....	12-20 g/l.
SO <sub>2</sub> libre inferior a.....	20 mg/l.
SO <sub>2</sub> total inferior a.....	170 mg/l.
Presión total superior a.....	4 atms.

## 2.2. - SEGUNDA FERMENTACION

En el embotellado del vino base, se añade una dosis del llamado "licor de tiraje". Esta operación de tiraje consiste en la adición al vino de levaduras y sustratos necesarios (azúcares) para la segunda fermentación, así como clarificantes que faciliten la posterior sedimentación de las lías.

Una vez cerradas las botellas, se almacenan en cavas a

temperatura estable (10-15°C) y en posición horizontal (fase de rima) para que tenga lugar la segunda fermentación que proporciona el gas carbónico característico del vino espumoso.

Terminada la fermentación (4-8 semanas), las botellas se mantienen hasta haber transcurrido un mínimo de nueve meses, según fija la legislación vigente, tras la adición del licor de tiraje (período de maduración).

A continuación, se colocan las botellas invertidas en pupitres especiales, donde son removidas periódicamente para que las lías se depositen junto al corcho (fase de punta).

Después de esta etapa tiene lugar el degüelle, que consiste en descorchar la botella, tras congelar la parte superior donde se encuentran sedimentadas las lías a fin de eliminarlas con la mínima pérdida de anhídrido carbónico. Inmediatamente se rellenan las botellas con el llamado licor de expedición bajo contrapresión de nitrógeno como protección frente a la oxidación. El licor de expedición está compuesto por conservadores (principalmente SO<sub>2</sub>), y vino o mosto con distinta concentración en azúcar, según se deseen obtener los diferentes tipos de cava que fija la legislación:

El licor de expedición podrá estar compuesto de vino, destilado de vino, mosto, sacarosa y aquellas materias adicionales que estén autorizadas para los vinos en general. El vino deberá ser normal y cumplir todos los requisitos que establece la Ley 25/1970 y su Reglamento general.

Estableciendo los siguientes tipos:

Brut.....menos de 20 g de materias reductoras/l.  
Seco..... de 0 a 30 g de materias reductoras /l.  
Semi-seco.....de 30 a 50 g de materias reductoras /l.  
Dulce.....más de 50 g de materias reductoras /l.

Terminado el etiquetado, embalaje, etc. se recomienda que durante el tiempo de almacenaje se mantenga a la temperatura de la cava para asegurar una buena conservación. La composición de los vinos espumosos queda fijada en la Ley 25/1970:

Graduación alcohólica (O.I.V.).....9.5-11.5 % v/v  
Acidez total (en ac. sulfúrico).....3.5-6 g/l  
Extracto seco no reductor.....12.5-20 g/l  
Acidez volátil (en ac. acético). .... menor 0.7 g/l  
SO<sub>2</sub> libre ..... inferior a 20 mg/l  
SO<sub>2</sub> total .....inferior a 170 mg/l

### 3.-EL FLAVOR DE LOS VINOS

El "flavor" de un vino es el resultado del efecto combinado de sus constituyentes sobre los órganos del gusto y el olfato. Cuando se consideran los componentes del flavor es usual dividirlos en volátiles y no volátiles; los primeros dan lugar al aroma y los últimos a las sensaciones del gusto. El aroma de un vino se podría definir como el conjunto de sensaciones percibidas por el órgano olfativo, por vía nasal y retronasal; ésta última, en el momento de la degustación, es el componente olfativo del flavor ( Ortega,1985). Además, psicológicamente, la reacción de una persona a los estímulos del flavor puede estar influida por otras propiedades como el color, el aspecto o la densidad.

El aroma es la parte más importante del complejo de propiedades organolépticas del vino. Por sus efectos sensoriales agradables y su apreciación, también se utiliza como norma de calidad. Los tipos de vinos existentes varían mucho en sus características sensoriales y, por tanto, los criterios para enjuiciarlos cambian.

El aroma del vino está constituido por un amplio conjunto de

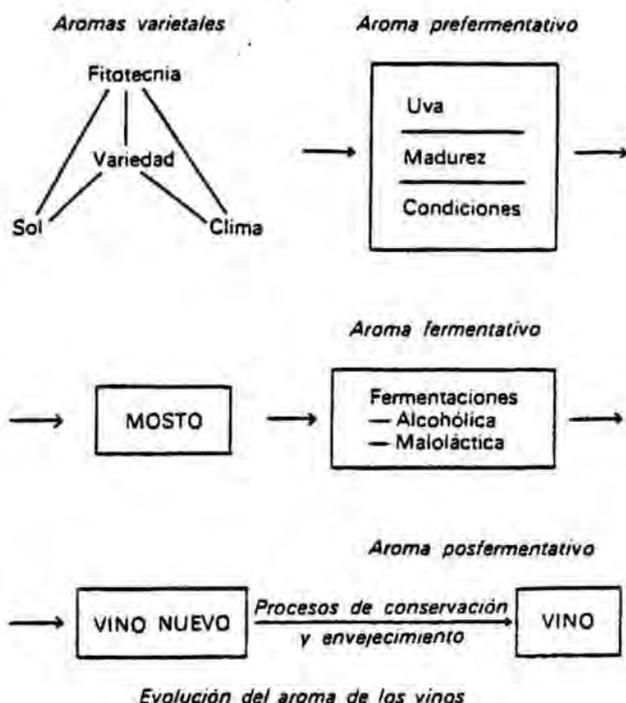
sustancias que, aun hallándose en ínfima concentración, son suficientes para contribuir al flavor global, que en Enología se suele denominar "bouquet". La importancia de cada una de estas sustancias en el "bouquet" depende de su poder olfativo; las que aportan una mayor contribución, casi el 90% de la totalidad, son en gran parte ésteres, alcoholes y terpenos; las otras contribuyen al "bouquet", dándole la sutilidad y especificidad que caracteriza a un vino ( Vernin y col., 1986).

### 3.1. -EL AROMA DE LOS VINOS

Según Vernin y col. (1986) y Ortega (1985), las sustancias volátiles que proporcionan al vino su aroma se pueden clasificar de acuerdo a la etapa en que van apareciendo, al viñedo de procedencia, al sistema de vinificación y a los procesos de envejecimiento, estableciendo las siguientes denominaciones:

- Aroma prefermentativo, o aroma afrutado, aportado por la uva es específico de la cepa de procedencia y su compleja composición puede alterarse durante la elaboración.
- Aroma fermentativo que aparece durante la fermentación por las levaduras como consecuencia de las reacciones, producidas por el metabolismo, sobre los componentes del mosto.
- Aroma postfermentativo, o "bouquet", consecuencia de las modificaciones de los compuestos fermentativos durante los

procesos de maduración y envejecimiento.



### 3.2. -AROMA PREFERMENTATIVO VARIETAL O PRIMARIO

La incidencia sobre el aroma del vino comienza en la viña, donde la variedad de uva tiene mayor importancia, ya que hacia ella convergen las condiciones de sol, clima y fitotecnia.

Particularmente, la fitotecnia tiene unos efectos remarcables sobre el aroma:

- a) Efectos directos: Los abonos nitrogenados, por ejemplo, pueden inducir a un enriquecimiento de la uva en

componentes nitrogenados, aminados y peptídicos, y a un déficit en compuestos glucídicos.

- b) Efectos indirectos: Son los que pueden influir en la maduración del fruto. La uva tiene un grado de madurez y un estado fitosanitario determinados condicionados, en gran medida, por la recolección, transporte, el tiempo de duración, etc.

Según Ortega (1985) este aroma prefermentativo está constituido por los componentes existentes en la uva y en el mosto recién obtenido. Parte de estas sustancias pasan inalteradas al vino, y tienen olores intensos y definidos, pero también hay que añadirle los que se hallan en la uva y que, sin tener olores particulares, son susceptibles de desarrollar un aroma específico en etapas posteriores, son los denominados precursores aromáticos.

En cambio, Vernin y col. (1986) diferencian entre aromas varietales y aromas prefermentativos. Para ellos, los aromas varietales son los específicos de la variedad escogida, se hallan principalmente en la piel y pasan después al mosto y al vino, bien como tales sustancias odorantes o bien modificadas. La piel también contiene precursores (carotenoides, heterósidos...), que no son volátiles de por sí pero, bajo la acción enzimática u otros procesos bioquímicos, pueden ser susceptibles de liberar nuevas sustancias aromáticas.

Resumidamente, clasifican estos aromas varietales en tres categorías según la nota aromática que proporcionan:

-Notas florales: debidas principalmente a compuestos terpénicos oxigenados como linalol, citronelol, terpineol, geraniol... constituyentes de los aceites esenciales.

-Notas afrutadas: Constituidas básicamente por ésteres ligeros y lactonas.

-Notas herbáceas: Debidas a aldehídos y alcoholes de seis átomos de carbono, saturados o insaturados, y a heterociclos nitrogenados (pirazinas).

Define como aromas prefermentativos, aquellos íntimamente ligados a la tecnología usada desde la vendimia hasta la preparación del mosto, porque durante estas etapas se nota una fuerte acción de los sistemas enzimáticos de la baya y, más particularmente, de la piel. Asimismo, indica que el estado de maduración y los tratamientos preparativos del mosto, tales como transporte, prensado, sulfitado, etc., pueden modificar las sustancias inicialmente presentes en el fruto.

Según J.J. Castro (1986) en esta etapa existe un contrasentido ya que, por una parte, se desea extraer al máximo los aromas

varietales de la uva, principalmente los pertenecientes a la familia terpénica, para lo cual se requiere mayor maceración de las partes sólidas con el mosto pero, por otra, hay más peligro de extracción de polifenoles, alcoholes y aldehídos  $C_6$  que proporcionan al vino notas herbáceas y amargas, y una mayor coloración.

### 3.3. - AROMA FERMENTATIVO O SECUNDARIO

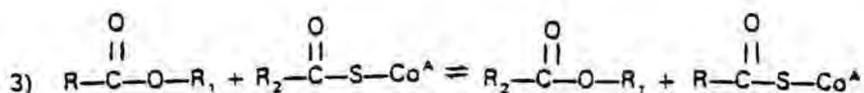
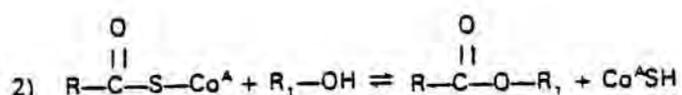
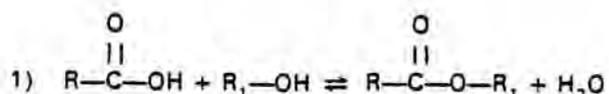
Es el producido por levaduras y bacterias en el curso de la fermentación alcohólica y maloláctica.

Los ésteres, al igual que los alcoholes, son el grupo de sustancias volátiles que más aumenta durante la fermentación. Las cantidades de unos y otros dependen del tipo de levadura y de las condiciones de fermentación

En el curso de la fermentación, además de la producción de etanol a partir de los azúcares, se forman alcoholes como metilbutanol, n-butanol, n-propanol y alcoholes amílicos que tienen su origen en los aminoácidos correspondientes, relacionándose especialmente con las vías de formación de cetoácidos y compuestos carbonílicos. Asimismo, se forma metanol a partir de pectinas y también es conocida la presencia de alcohol beta-feniletílico y alcohol bencílico, y glicerol que proviene de una reacción de retroaldolización de los azúcares y podrá

combinarse con los aldehidos para formar acetales cíclicos.

Estos alcoholes y los ácidos, inicialmente presentes en el mosto o formados a lo largo de la fermentación, originan cantidades importantes de ésteres bajo la acción de esterazas. Según J.Ortega (1985), las principales rutas de formación son:



Predominarán los ésteres etílicos (acetatos de etilo), isoamílicos, beta-feniletílicos, hexílicos, bencílicos, etc. Los más ligeros tienen aromas afrutados, siendo la nota dominante de los vinos jóvenes, y los más pesados dan una nota herbácea aunque no parece existir una correlación entre su cantidad y la calidad de un vino.

Los ácidos grasos, que también desempeñan un papel importante

en el aroma, se producen en parte durante la fermentación siendo notorio en su formación el acetil-CoA. Cuando el alcohol interviene en el desdoblamiento del grupo acilo se forma un éster pero, cuando el agua interviene en la reacción se forma un ácido graso.

Las lactonas forman otra categoría de compuestos cíclicos remarcable, sobre todo la gamma-butirolactona. Se forman enzimáticamente a partir de alcoholes gamma o delta-hidroxilados.

Los azúcares pueden originar pardeamientos enzimáticos y no enzimáticos, dando lugar a compuestos furánicos (furfural, metil-5-furfural, alcohol furfurílico, etc.) y proporcionar al vino aromas desagradables.

Con respecto a los aldehídos, el más importante de ellos es el acetaldehído. Por formar parte del aroma de la uva, ser un producto intermedio de fermentación y por su actividad química influye de manera decisiva sobre la estabilidad y evolución del color, sabor y otras características organolépticas de los vinos. Se forma a partir del ácido pirúvico (o cetoácidos en general) de la fermentación y su concentración se considera como un indicador del estado de oxidación de un vino.

Otros compuestos, como los derivados fenólicos, aminas N-acetilaminas y compuestos volátiles azufrados se forman durante

la fermentación, y aunque en pequeña concentración, tienen un papel importante en el aroma.

Ribereau-Gayon y col. (1975) prestan especial atención a las fermentaciones secundarias que tienen lugar en el vino, en especial la maloláctica que suaviza el aroma de los vinos jóvenes. Esta fermentación maloláctica es esencial en la elaboración y envejecimiento de los vinos tintos.

Bajo la acción de las bacterias (que suceden a las levaduras) se producen descarboxilaciones que forman compuestos menos ácidos, tal es el caso del ácido láctico. Estos ácidos, formados en fermentaciones secundarias, también pueden participar en reacciones de esterificación con los principales alcoholes del vino; así se produce el lactato de etilo, de olor fino y agradable, y el propionato y butirato de etilo. Por todo ello, ésta última etapa de la fermentación es la primera fase de maduración aromática de los vinos destinados a envejecimiento, ya que constituye una desacidificación biológica del vino, en la que el color se modifica y su aroma se transforma alejándose del de la uva y enriqueciéndose en matices y vivacidad.

### 3.4.- AROMA POST-FERMENTATIVO O AROMAS TERCIARIOS

Son los que dan al vino su "bouquet" característico. Después de la fermentación, la evolución del aroma es función de las

condiciones en que se haya realizado la vinificación, de las levaduras utilizadas y de las técnicas de elaboración. En la tabla 1 se citan los principales compuestos aromáticos de uvas y vino. Rapp (1972). Los aromas post-fermentativos están en relación directa con el envejecimiento y están formados esencialmente por alcoholes, ésteres, derivados carbonílicos y acetales.

Según Vernin y col. (1986), a lo largo del envejecimiento tienen lugar una serie de reacciones como hidrólisis, esterificación, oxidación, heterociclación, etc. que liberan nuevos compuestos. También pueden producirse reacciones de pardeamiento que conducen a una serie de compuestos furánicos, pirrólicos y pirazínicos. Así mismo, los compuestos fenólicos y los taninos pueden tener un papel importante como soporte de este aroma.

Esta etapa afectará al aroma de muy distinto modo según el tipo de vino estudiado. Así, los vinos blancos tipo Riesling presentan, durante el envejecimiento, una disminución de los acetatos y un aumento de los ésteres etílicos de diácidos. Estos vinos también contiene furanos (procedentes de la degradación de azúcares), vitispiranos (provenientes de la degradación de carotenoides) y una variación importante en la composición de los terpenos oxigenados (Vernin y col., 1986).

Los vinos que sufren un envejecimiento biológico, como los

**TABLA 1**

**Sustancias aromáticas halladas en los mostos**

Méthanol	Acétone	Butyrate d'éthyle
Éthanol	Butanone-2	Butyrate de butyle-n
Propanol-1	Pentanone-2	Butyrate d'amyle-n
Méthyl-2-propanol-1	Acide formique	Acide balérianique
Butanol-1	Formiate d'éthyle	Valérianate d'éthyle
Méthyl-3-butanol-1	Acide acétique	Acide caproïque
Méthyl-2-butanol-1	Acétate de méthyle	Acide œnanthylrique
Pentanol-1	Acétate d'éthyle	(ou heptanoïque)
Hexanol-1	Acétate de propyle-n	œnanthylate d'hexyle-n
Heptanol-1	Acétate de butyle-iso	Acide caprylique
Octanol-1	Acétate de butyle-n	Caprylate d'éthyle
Décanol-1	Acétate d'amyle-iso	Caprylate d'hexyle-n
Undécanol-1	Acétate d'amyle-n	Acide pélagonique
Hexène-3 cis-ol-1	Acétate d'hexyle-n	Acide caprique
Alcool $\beta$ -phényléthylique	Acétate d'heptyle-n	Caprate d'éthyle
Acétaldéhyde	Acétate d'octyle-n	Acide laurique
Propanal-1	Acétate de nonyle-n	Anthranilate de méthyle
Butanal-1	Acide propionique	Géranol
Pentanal-1	Propionate d'éthyle	Terpinéol
Hexanal-1	Propionate de propyle-n	Limonène
Heptanal-1	Propionate d'amyle-n	Linanol
Décanal-1	Acide butyrique	Ionone- $\alpha$
Hexène-2-al-1		Ionone- $\beta$
Dodécanal-1		Citral

**Sustancias aromáticas halladas en los vinos**

Méthanol	Aldéhyde cinnamique	Butyrate d'éthyle-n
Éthanol	Vanilline	Butyrate-n d'amyle (iso)
Propanol-1	Furfural	Butyrate-n de propyle (iso)
Propanol-2	Terpinéol- $\alpha$	Butyrate d'éthyle (iso)
Butanol-1	Linanol	Acide valérianique-n
Butanol-2	Ionone-n	Valérianate d'éthyle-n
Méthyl-2-propanol-1	Citral	Acide valérianique (iso)
Méthyl-2-butanol-1	Acétone	Valérianate d'éthyle (iso)
Pentanol-1	Acétoïne	Acide caproïque
Pentanol-2	Limonène	Héxylate d'éthyle
Hexanol-1	Géranol	Héxylate d'amyle (iso)
Hexanol-2	Butanone-2	Héxylate de butyle (iso)
Heptanol-1	Pentanone-2	Acide œnanthylrique
Heptanol-2	Hexanone-2	œnanthylate d'éthyle
Octanol-1	Heptanone-2	Acide caprylique
Octanol-2	Nonanone-2	Caprylate d'éthyle
Nonanol-1	Diacétyle	Caprylate de butyle (iso)
Nonanol-2	Acide formique	Caprylate d'amyle (iso)
Décanol-1	Formiate d'éthyle	Acide pélagonique
Décanol-2	Acide acétique	Pélagonate d'éthyle
Undécanol-1	Acétate de méthyle	Acide caprique
Dodécanol-2	Acétate d'éthyle	Caprate d'éthyle
Alcool $\beta$ -phényléthylique	Acétate de propyle (iso)	Caprate d'amyle (iso)
Aldéhyde acétique	Acétate de butyle (iso)	Undécylate d'éthyle
Aldéhyde propionique	Acétate de butyle-n	Acide laurique
Butanal-1	Acétate d'amyle (iso)	Laurate d'éthyle
Méthyl-2-propanal-1	Acétate d'amyle-n	Laurate d'amyle (iso)
Méthyl-2-butanal-1	Acétate d'hexyle-n	Acide myristique
Méthyl-3-butanal-1	Acétate d'heptyle-n	Myristate d'éthyle
Hexanal-1	Acétate $\beta$ -phényléthylique	Anthranilate de méthyle
Heptanal-1	Acide propionique	Benzoate d'éthyle
Octanal-1	Propionate d'éthyle	Cinnamate d'éthyle
Nonanal-1	Propionate de propyle-n	Salicylate d'éthyle
Décanal-1	Propionate de butyle (iso)	Lactate d'éthyle
Dodécanal-1	Propionate d'amyle (iso)	Succinate diéthylique
Aldéhyde benzoïque	Acide butyrique-n	

de Jerez, deben sus características principales al etanal y sus derivados, 2,3-butanodiol y acetoina, que en este tipo de vino presentan cifras elevadas.

Boidron y col. (1969) analizan los componentes de los aromas del vino espumoso y consideran que el proceso de champanización (refiriéndose sólo a la segunda fermentación) y el contacto prolongado de los vinos espumosos con las levaduras implican transformaciones complejas mediante las cuales se acumulan ésteres como acetato de etilo, acetato de isoamilo, caproato de etilo y lactato de etilo y, por otra parte, tienen lugar reacciones de esterificación de alcoholes y la hidrólisis de algunos ésteres.

Una de las fracciones peor estudiadas ha sido la referente a los compuestos carbonílicos, de especial importancia en el envejecimiento en relación con los procesos de óxido-reducción del vino. Los aldehídos y cetonas, debido a su gran reactividad, aparecen implicados en numerosos mecanismos de formación de aromas y, en general, con características organolépticas ya que también afectan a modificaciones del color. Por ello y por sus múltiples interacciones con otros compuestos presentes en el vino, volátiles y no volátiles, el principal papel que se les atribuye es en relación con la estabilidad del vino durante la conservación, por lo que en este trabajo se tratará de profundizar en ellos.

### 3.5.- INLUENCIA DE LA CONSERVACION SOBRE LAS CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS Y ORGANOLEPTICAS DEL VINO

Según J.J.Castro (1986) la calidad final del vino, es la resultante de una larga secuencia biológica iniciada en el viñedo, modificada favorablemente o no, con los procesos bioquímicos que la tecnología prefermentativa condiciona, complementada en la fermentación y respetada más o menos durante la conservación, envejecimiento, embotellado y distribución del vino hasta su llegada al consumidor.

Según el tipo de tecnología empleada el término envejecimiento adquiere una relevancia distintiva ya que, por ejemplo, en la vinificación en rojo este envejecimiento se trata de un proceso deseable para que el vino adquiriera la "solera" requerida, siendo en cambio un proceso problemático para los vinos blancos debido al desarrollo de flavors oxidados y la pérdida del carácter joven y aromático deseado.

Muchos enólogos consideran que en la evolución de las características del vino hay dos etapas: en la primera, el vino gana calidad (maduración); en la segunda, la pierde (envejecimiento). En el caso del cava, la maduración se referirá al período de la segunda fermentación en botella hasta la adición del licor de expedición, a partir de ahí empezará lo que consideraremos en este trabajo como envejecimiento.

Cantarelli (1967) denomina "maderización" al fenómeno de evolución natural de los vinos, sobre todo los vinos blancos, que provoca modificaciones en el color y en el aroma. Se trata claramente de un fenómeno de naturaleza oxidativa, incluso si se produce en aquellas condiciones en las que el aire está aparentemente excluido, como es el caso de los vinos espumosos. Indica que la manifestación más evidente de la maderización es el pardeamiento. Este pardeamiento y la evolución del aroma es el resultado de un conjunto de reacciones que integran a muchos de los constituyentes del vino. Considerando que los principales componentes son glúcidos, aminoácidos, ácidos orgánicos, polifenoles y reductonas en solución hidroalcohólica ácida sugiere como más interesantes por su posible participación en la maderización, las siguientes reacciones:

- Reacciones de los azúcares reductores con aminoácidos y sus productos de degradación (Reacción de Maillard).
- Reacción de compuestos carbonílicos con los aminoácidos.
- Reacción de los glúcidos con ácidos orgánicos, como ácido cítrico y málico.
- Reacción de oxidación de los polifenoles.
- Reacción de los polifenoles con los aminoácidos.
- Reacción de los polifenoles con los compuestos carbonílicos.

Es difícil establecer cuando un vino puede ser considerado

como maderizado o si se trata de una alteración del producto, ya que puede presentar dos aspectos bien distintos: puede representar una etapa necesaria, deseable y provocada en los vinos de postre y dulces, y por otra parte, puede ser un fenómeno negativo en los vinos de mesa, blancos y espumosos cuyas particularidades requieren, sobre todo, la frescura aromática y tonalidades claras.

La intensidad de las dos manifestaciones, cambio de color y olor, es muy variable según las características del vino y las condiciones de conservación. Según Berg (1953), en general, se observa un pardeamiento más marcado cuando la temperatura de conservación es más elevada; por el contrario, el aroma característico es sobre todo función del tiempo de conservación si la temperatura es suficientemente alta. Viene a decir que la modificación del color es un fenómeno que se observa más rápidamente que la variación del aroma.

Las manifestaciones de estos fenómenos en relación al color de los vinos blancos son principalmente la pérdida de su matiz amarillo-verdoso que se torna amarillo dorado intenso, después se vuelve marrónáceo, con una tonalidad más o menos rojiza, hasta la aparición de un sedimento pardo.

En referencia a las modificaciones aromáticas, numerosos estudios han demostrado que el flavor no se mantiene de forma indefinida, sino que evoluciona durante su almacenamiento. Se ha

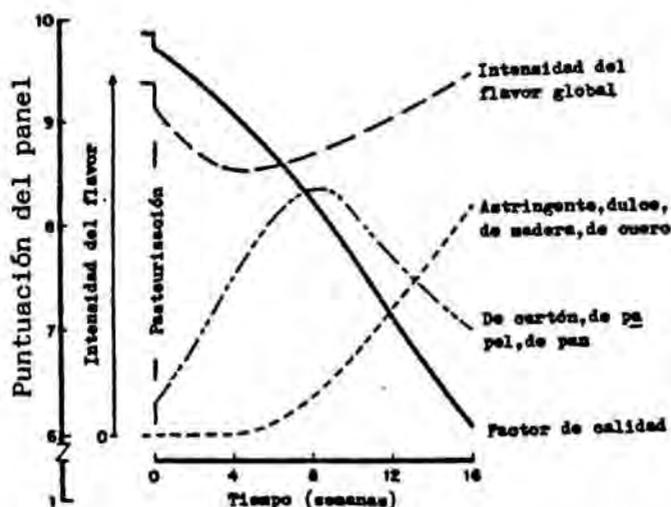
observado que cualquier evolución del flavor fresco suele conducir a la aparición de flavors no deseados ("off flavours") o a la disminución del flavor característico, obteniéndose un vino de inferior calidad que se denomina vino viejo o vino oxidado. En general, se reconoce que el proceso de envejecimiento implica cambios en la composición cualitativa y cuantitativa del vino. Las características que tipifican el flavor envejecido u oxidado, también denominado genéricamente "rancio", no son fáciles de definir ya que no son constantes, sino que se van desarrollando durante el período de almacenamiento y no son debidas a un compuesto en particular sino al conjunto de contribuciones al flavor de muchas sustancias. Diversos autores consideran que la aparición de este aroma rancio se relaciona con la disminución de los ésteres de cadena corta (afrutados) y la aparición de compuestos más pesados. También es de señalar la oxidación del sulfuroso, que se halla combinado principalmente con compuestos carbonílicos, dando lugar a compuestos azufrados y liberando aldehídos y cetonas que contribuyen al flavor oxidado, tal como se expondrá en el siguiente capítulo.

Somers (1983) considera muy difícil evaluar la composición aromática volátil y su transformación en relación a las propiedades organolépticas durante la conservación, ya que los compuestos pertenecen a grupos orgánicos muy diversos. Sin embargo, él y otros autores destacan los compuestos sulfurados volátiles, como el sulfuro de dimetilo que tiene un umbral de

percepción muy bajo (0,06 mg/l) que se sobrepasa ampliamente en largos almacenamientos, contribuyendo al aroma de los vinos blancos viejos.

Otros autores (Simpson, 1979; Marais y Pool, 1980) en estudios sobre las transformaciones del gusto remarcan el hecho de que los ésteres producidos en la fermentación pueden hallarse al principio y mayoritariamente como ésteres de acetato, cuya concentración rebasa ampliamente los equilibrios físico-químico del ácido acético y de los alcoholes; por ello, durante el envejecimiento se puede registrar una disminución rápida en el contenido de estos ésteres con la consiguiente pérdida del frescor afrutado, ligado a reacciones de hidrólisis y nuevas esterificaciones que conducen lentamente a un equilibrio químico.

Meilgaard (1979) ilustra el proceso de envejecimiento aromático en cervezas mediante un panel sensorial según la figura:



Desarrollo del flavor "envejecido" con el tiempo de almacenamiento con agitación a 33°C.

Se puede considerar cada característica del vino como una multitud de reacciones diversas que se desarrollan a ritmo variado, entrañando la interacción de numerosos elementos químicos. Todo este sistema de procesos está sometido a la influencia de parámetros englobados en la composición del vino, tales como el pH, la cantidad de etanol, el contenido en  $\text{SO}_2$ , así como ciertas condiciones en la conservación del vino como, por ejemplo, la temperatura y la absorción de oxígeno.

Muchos autores constatan en el envejecimiento, además de las modificaciones organolépticas, una variación en las sustancias fenólicas y un aumento en el potencial redox.

Cuando finaliza la actividad de las levaduras, el vino joven se halla saturado de  $\text{CO}_2$  y en un estado reducido. En la conservación no se pueden evitar pérdidas de dióxido de carbono debido a la disolución y absorción de oxígeno, acompañado de un aumento del potencial redox.

Se puede considerar el vino joven como un sistema químico y físico-químico extramadamente complejo, con reacciones y equilibrios de toda naturaleza. Algunos pueden sufrir cambios bruscos en el curso de la vinificación como, por ejemplo, los

equilibrios ácidos/sales que son modificados por la precipitación del tartrato potásico, estabilizándose más tarde en el almacenado a baja temperatura.

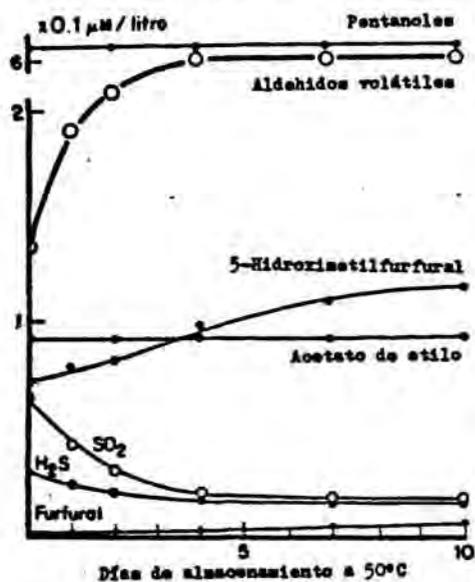
Goranov (1974) indica la conexión entre los procesos de óxido-reducción, con la bioquímica y tecnología vinícola que determine la calidad del vino. En la tecnología destaca la importancia del contacto con el aire y en cuanto a los procesos de óxido-reducción resalta el sulfitado tras la fermentación. Responsabiliza a las sustancias contenidas en el vino tras estos tratamientos como las causantes del cambio en el potencial redox, aun después de la inactivación de los enzimas más oxidativos.

### 3.6. - PARTICIPACION DE LOS CARBONILOS VOLATILES EN EL AROMA DEL VINO ENVEJECIDO

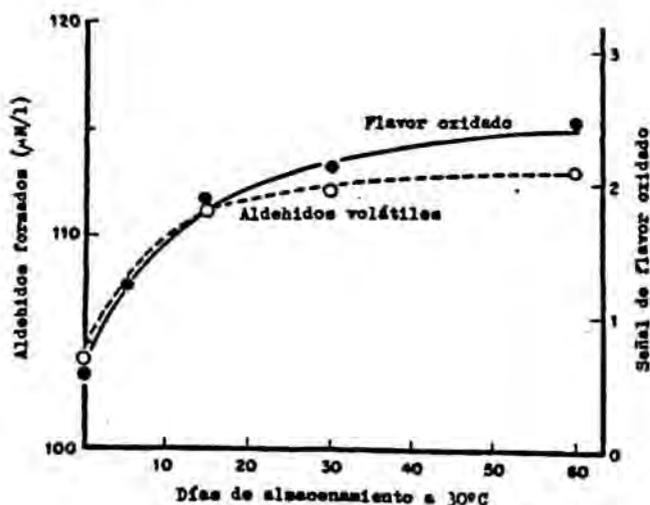
Establecer una relación entre la composición del aroma y el flavor resulta muy complejo, debido al problema de cuantificación de todos los compuestos volátiles, y porque al variar la proporción entre las sustancias cambian igualmente las propiedades aromáticas aunque no en relación directa. Un parámetro que adquiere importancia a la hora de evaluar la contribución de determinada sustancia en el aroma global es el umbral de percepción, que se define como la mínima concentración de un

compuesto que es detectable por un panel de degustación.

En 1979 Hashimoto realiza los primeros estudios comparativos de la evolución del flavor oxidado respecto al aumento de la concentración de carbonilos en la cerveza durante el almacenamiento. Estudia los cambios en los niveles de compuestos volátiles durante el almacenamiento a 50°C y comprueba la relación del incremento de aldehídos volátiles con la aparición del aroma envejecido, según se indica en la figura:



Cambios en los niveles de componentes del flavor durante el almacenamiento.



Aldehídos volátiles responsables del flavor oxidado.

Mediante control sensorial, Meilgaard (1975) demostró que el flavor oxidado en la cerveza está íntimamente ligado a la fracción carbonílica y, en general, define el flavor de estos compuestos carbonílicos como desagradables, empeorando al aumentar su número de átomos de carbono (figura 2).

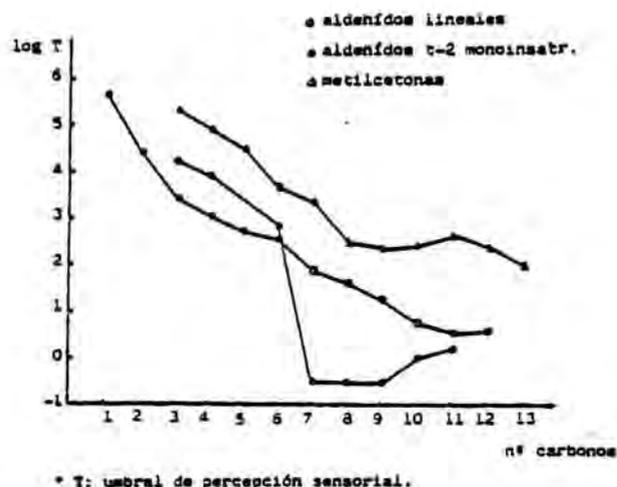


FIGURA 2

Díaz (1983) buscó un compuesto carbonílico que estuviera directamente relacionado con dicho flavor y cuya concentración sirviera como indicador del estado de conservación de las bebidas fermentadas. Tradicionalmente se había elegido al acetaldehído, tal vez por ser mayoritario, sin embargo si se tiene en cuenta los umbrales de percepción (figura 3) se han de considerar de igual o mayor interés otras de estas sustancias, por lo que no se pudo señalar ninguno como indicativo.

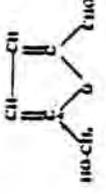
En cervezas la fracción carbonólica del aroma ha sido abordada con más intensidad que en los vinos, sin embargo

Fernández (1988) indica la influencia de estos compuestos volátiles en relación a la inestabilidad de las características cromáticas de los cavas. Los compuestos carbonílicos se encuentran

Compuesto	U.P.S.	Cerveza	Cerveza
	(ppb)	Fresca (ppb)	Envejecida (ppb)
Formaldehído	40000	9	41
Acetaldehído	25000	5800	8200
Propanaldehído	2500	14	-
Butiraldehído	1000	15	30
Valeraldehído	500	-	-
Hexanal	300	11	53
Heptanal	50	-	5
Octanal	40	9	8
Nonanal	15	10	4
Decanal	7	8	-
Undecanal	5	-	-
Dodecanal	3	-	-
Acetoina	50000	700	2500
Diacetilo	150	50	200
Acroleína	15000	1600	2400
Isobutiraldehído	1000	15	94
Isovaleraldehído	600	8	104
Furfural	100000	50	60
Hidroximetilfurfural	100000	-	-
2-Hexenal	600	4	34
2-Heptenal	0.5	-	4
2-Octenal	0.3	-	-
2-Nonenal	0.1	0.05	0.5
2-Decenal	1	-	-
2-Undecenal	3.5	-	-
2,4-Hexadienal	800	-	1
2,5-Nonadienal	0.05	-	0.1
Benzaldehído	1500	2	2
Crotonaldehído	8000	10	12
Acetona	100000	50	50
Metil-etil-cetona	60000	-	-
Metil-isobutil-cetona	1000	20	30
Metional	250	1	-

**Tabla 3 :** Umbrales de percepción (U.P.S.) de los carbonilos volátiles.  
Díaz (1983)

Tabla 4

LOCALIZACION				LOCALIZACION			
FORMULA	NOMBRE	PT. Eb.	UVA VINO	FORMULA	NOMBRE	PT. Eb.	UVA VINO
H-CHO	Metanal Aldehído fórmico	21	-		Hidroximetil-furfural	110	- +
CH <sub>3</sub> -CHO	Etanal Aldehído acético	21	+ +				
CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CHO	Propanal Aldehído propiónico	49	+ +				
CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CHO	Butanal Aldehído butírico	76	+ +		Aldehído benzóico Benzaldehído	178	- +
CH <sub>3</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CHO	Metil-2 propanal Isobutiraldehído	64	- +				
CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CHO	Pentanal Aldehído valeriano	102	+ -		Aldehído cinámico Cinamaldehído	253	- +
CH <sub>3</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CHO	Metil-2 butanal Aldehído isovaleriano	92	- +				
CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CHO	Hexanal Aldehído caproico	128	+ +	CH <sub>3</sub> -CO-CH <sub>3</sub>	Propanona Acetona	36	+ +
CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub> -CHO	Hexen-2 al		+ -	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-CH <sub>3</sub>	Butanona Metilacetona	80	+ -
CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CHO	Heptanal Aldehído enántico	155	- +	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-CH <sub>3</sub>	Pentan-2 ona Metil-propilcetona	102	+ +
CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CHO	Octanal Aldehído caprílico	167	- +	CH <sub>3</sub> -CH(OH)-CO-CH <sub>3</sub>	Acetilmetilcarbóol Acetolna	143	- +
CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CHO	Nonanal Aldehído polargónico	185	- +	CH <sub>3</sub> -CO-CH <sub>2</sub> -CO-CH <sub>3</sub>	Diacetilo 2-3 butanodiona	87	- +
CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -CHO	Decanal Aldehído capríco	208	+ -	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CO-CH <sub>3</sub>	Hexan-2 ona Butilmetilcetona		- +
CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -CHO	Dodecanal Aldehído laurico		+ +	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-CH <sub>3</sub>	Heptan-2 ona		- +
	Furfural 2-Furaldehído	162	- +	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CO-CH <sub>3</sub>	Nonan-2 ona		- +

en el mosto, procedentes de la uva, y aparecen finalmente en el vino en distinta proporción. En la tabla 4 se recogen los distintos carbonilos encontrados en uva y vino.

Al ser sustancias tan implicadas en las características químicas, organolépticas y de conservación se deberá considerar sus mecanismos de formación y sus posibles transformaciones.

### 3.6.1.- ESTUDIO DE LA VIAS DE FORMACION DE LOS COMPUESTOS CARBONILICOS

Parece claro que el envejecimiento del vino se halla relacionado, entre otras cosas, con la modificación de los compuestos carbonílicos tanto en la variación de las características organolépticas como en la alteración de la composición química. Por ello, nos centraremos en el estudio de la vías de formación de estos compuestos.

Dada la gran complejidad de la composición del vino resulta difícil individualizar rutas de formación, ya que todos los procesos posibles pueden tener lugar e intervenir simultáneamente interrelacionándose.

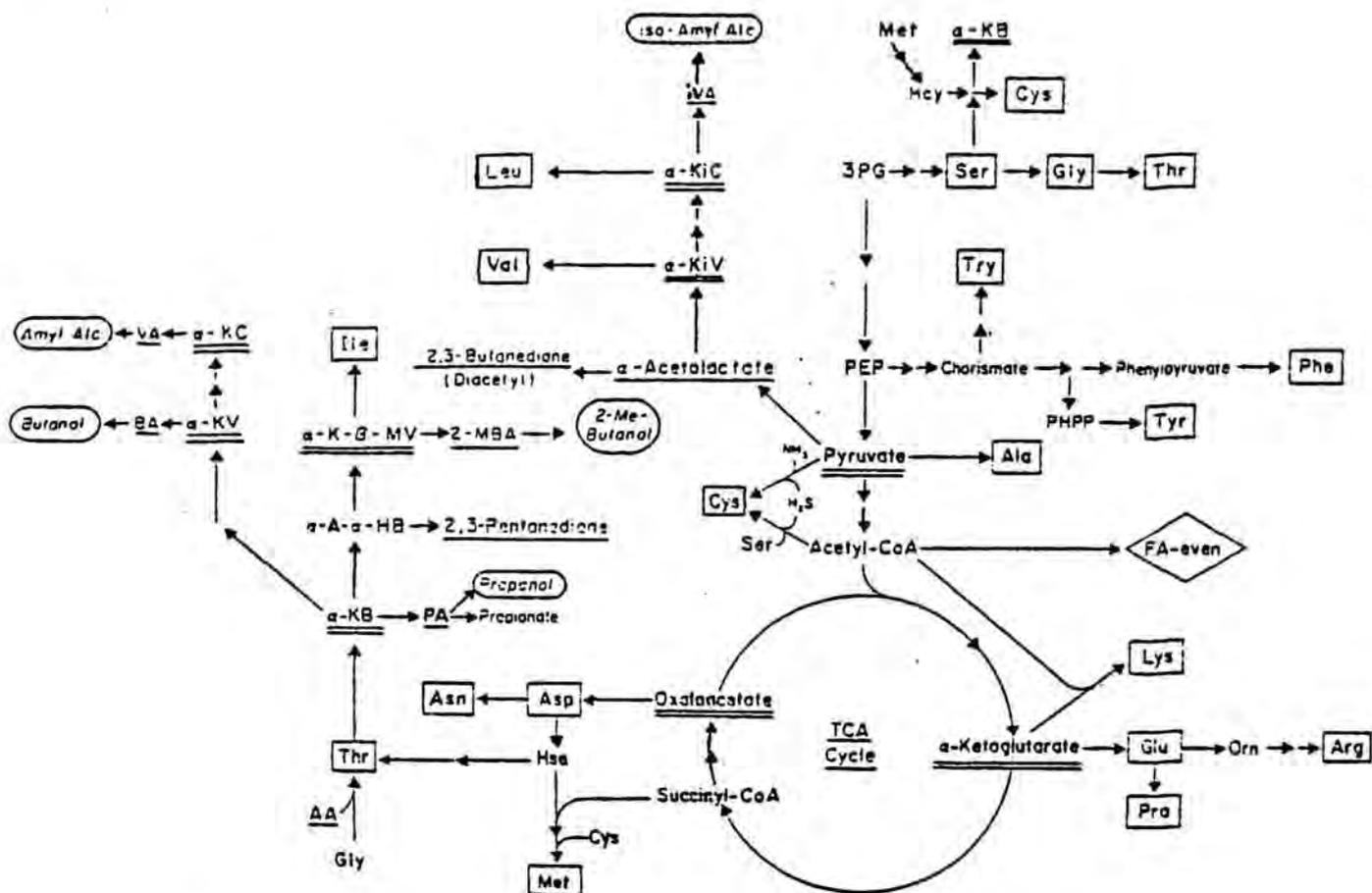
Díaz indica, para el caso especial de la cerveza, las siguientes vías de formación de carbonilos:

- 1.Oxidación de las melanoidinas por los alcoholes superiores.
- 2.Degradación de Strecker de los aminoácidos.
- 3.Degradación oxidativa de las isohumulonas.
- 4.Autoxidación de los ácidos grasos insaturados

En el caso de los vinos, se podría añadir la influencia de los compuestos polifenólicos y la de los glúcidos que pueden jugar un importante papel, sobre todo, en el caso del cava al que se le adiciona licor de tiraje y de expedición rico en azúcares.

Según Nykänen (1986) la clave de todas las reacciones se halla en las levaduras empleadas en la fermentación, ya que la condicionan de gran manera originando gran cantidad de sustancias que aunque en principio, por hallarse en pequeña concentración o en forma de precursores, podrían pasar desapercibidas pero después, bajo otras condiciones, adquirir relevancia. Las rutas metabólicas en la fermentación son complejas y no siempre predecibles, sin embargo en el cuadro 5 se hallan esquematizadas las principales vías biosintéticas.

El contenido en aldehídos, sobre todo de acetaldehído, depende, además del tipo de levadura, de la composición en nutrientes. Así, una deficiencia en nutrientes durante la fermentación incrementa los niveles de aldehídos, ya que disminuye la formación de etanol. Con deficiencia de aminoácidos, la vía de formación de alcoholes de fusel se desvía hacia los cetoácidos que son precursores de compuestos carbonílicos.



## PRINCIPALES VIAS BIOSINTÉTICAS EN LA FERMENTACIÓN

### SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES:

AA = Acetaldehído  
 $\alpha$ -A- $\alpha$ -HB = Alfa-aceto-alfa-hidroxi-butarato  
 $\alpha$ -KB = Alfa-Cetobutarato  
 $\alpha$ -K- $\beta$ -MV = Alfa-Ceto-beta-metilvalerato  
 $\alpha$ -KC = Alfa-Cetocaproato  
 $\alpha$ -KV = Alfa-Cetovalerato  
 $\alpha$ -KiC = Alfa-Cetoisocaproato  
 $\alpha$ -KiV = Alfa-Cetoisovalerato  
 BA = n-Butiraldehído  
 Hcy = Homocisteína

Hse = Homoserina  
 iVA = Iso-Valeraldehído  
 2-MBA = 2-Metil-Butiraldehído  
 Orn = Ornitina  
 PA = Propionaldehído  
 PEP = Fosfo-Enol-Piruvato  
 3PG = 3-Fosfo-Glicerinaldehído  
 PHPP = p-Hidroxi-Fenil-piruvato  
 VA = n-Valeraldehído  
 FA = Ácidos grasos

NOTAS: Los aldehídos y cetonas están subrayados con una raya simple  
 Los carboxílicos están subrayados con doble raya.  
 Los aminoácidos biosintetizados están encerrados en un rectángulo.  
 Los alcoholes de Fusel están encerrados en un óvalo.  
 Los ácidos grasos, con cualquier (even) número de carbonos están encerrados en un rombo

### Cuadro 5

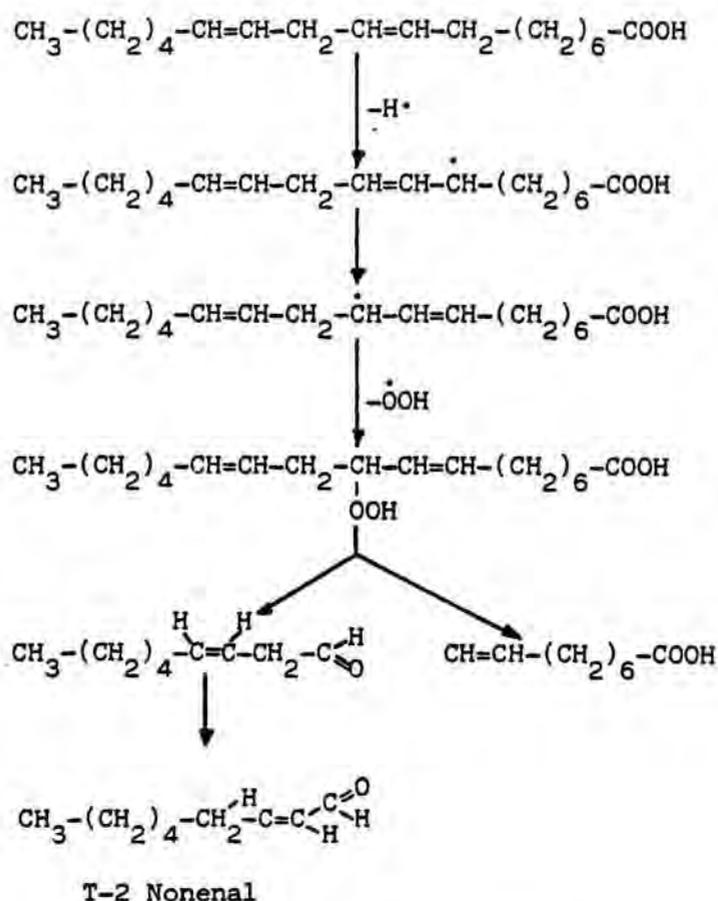
Coincidiendo con lo anterior, se observa que los mecanismos de formación de los compuestos carbonílicos, alcoholes de fusel, cetoácidos, sus ésteres correspondientes y aminoácidos se encuentran relacionados entre sí de acuerdo con la siguiente figura:

Key compounds in the formation of alcohols and amino acids by yeast

Alcohols	Aldehydes	Keto acids	Amino acid
Ethanol	Acetaldehyde	2-Ketopropionic acid	Alanine
Glycol	Glyoxal	3-Hydroxy-2-ketopropionic acid	Serine
1-Propanol	Propionaldehyde	2-Ketobutyric acid	2-Amino-butyric acid
1-Butanol	Butyraldehyde	—	—
2-Methyl-1-propanol	Isobutyraldehyde	2-Ketoisovaleric acid	Valine
2-Methyl-1-butanol	2-Methylbutyraldehyde	2-Keto-3-Methyl-valeric acid	Isoleucine
3-Methyl-1-butanol	Isovaleraldehyde	2-Ketoisocaproic acid	Leucine
1-Hexanol	Hexanal	—	—
Phenethyl alcohol	—	3-Phenyl-2-ketopropionic acid	Phenylalanine
Tyrosol	—	3-(4-hydroxyphenyl)-2-ketopropionic acid	Tyrosine
Tryptophol	—	—	Tryptophan

Asimismo, algunos autores señalan la relación del metabolismo de las levaduras, en la formación de derivados de Acetil-CoA, con la presencia de ácidos grasos libres, que son una fuente potencialmente importante de precursores del aroma. La posibilidad de autoxidación de ácidos grasos, como linoleico y linolénico, produciendo aldehídos  $C_5-C_{12}$  tampoco debe ser despreciable. Así,

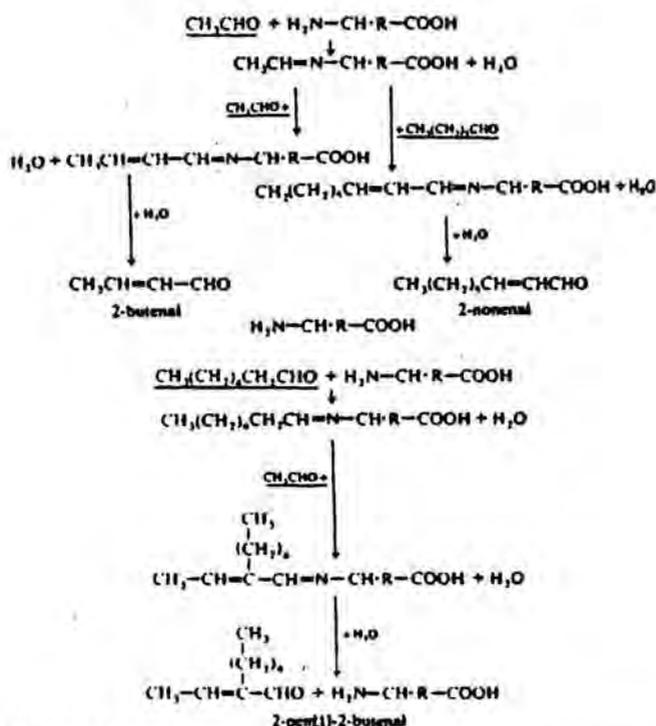
Díaz (1983) resalta la importancia de estos compuestos lipídicos en la formación del t-2-nonenal siguiendo el esquema:



Formación del T-2 Nonenal por autoxidación del ácido linoléico.

Los compuestos carbonílicos no permanecen inalterados sino que, a su vez, pueden reaccionar dando lugar a nuevos compuestos. Así, por ejemplo, los aldehídos insaturados pueden sufrir reacciones de autoxidación originando nuevas sustancias, como es el caso del t-2-nonenal que puede oxidarse formando los aldehídos saturados de cadena carbonada más corta. Hashimoto (1971), en trabajos sobre las cervezas, evidencia la posibilidad de que, durante su almacenamiento, puedan tener lugar reacciones de condensación aldólica con la formación de otros aldehídos y

cetonas. Esta condensación (esquema 6) tendrá lugar en presencia de aminoácidos que sirven de catalizadores a través de la formación de una imina intermedia.

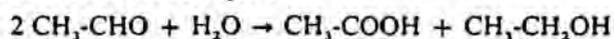


**ESQUEMA 6**

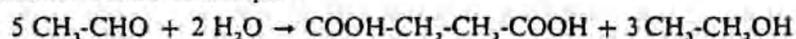
Esquema de la condensación aldólica de los aldehídos a través de la formación de imina intermedia.

Las reacciones de condensación y otras de dismutación de Cannizzaro, suelen tener principalmente como protagonista al acetaldehído (aldehído muy reactivo) y, según Quirós y Baró (1977), originar otros compuestos carbonílicos como acetal, diacetilo, acetil-metil-carbinol y otras sustancias importantes como etanol, ácido succínico y butilenglicol, éste último precursor a su vez de acetoína y diacetilo. Figura 7.

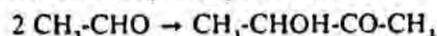
Formation d'acide acétique :



Formation d'acide succinique :



Formation d'acétylméthylcarbinol :



Formation de butanediol-2,3 :

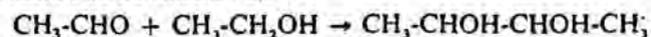


Figura 7

Otras teorías atribuyen la formación de carbonilos a la oxidación de alcoholes, implicando en ello a compuestos polifenólicos. Singleton (1974) indica que la presencia de algunos compuestos fenólicos aceleran la oxidación del etanol a etanal. Supone que la autoxidación de los fenoles produce un oxidante fuerte, probablemente peróxido de hidrógeno, que desencadena una serie de reacciones de oxidación, incluyendo la del etanol en acetaldehído. Así, la formación de compuestos carbonílicos durante la conservación podría ser un fenómeno mucho más complejo que la simple oxidación de los alcoholes por el aire.

En esta misma línea, para Cantarelli (1967) los productos de oxidación de los polifenoles tienen un papel importante en las características del vino maderizado, ya que algunos productos identificados como ácidos fenoles disminuyen al producirse la maderización. A su vez, las reacciones entre carbonilos y polifenoles es un fenómeno bien conocido en los vinos tintos oxidados. Soluciones de leucoantocianos mantenidos a 50°C pardean rápidamente, produciendo un precipitado y un aroma característico a rancio, cuando se añaden aminoácidos. Aislado el precipitado

coloreado, se observa que es debido a quinonas, producidas por la oxidación de los polifenoles, que reaccionan con aminoácidos y aminas secundarias. Por ello, la reacción entre polifenoles y aminoácidos debe jugar un importante papel en la formación del color y aroma del vino maderizado.

Otro de los mecanismos por los que pueden formarse los aldehídos es el llamado pardeamiento no enzimático. En la compleja serie de reacciones que tienen lugar en este proceso y que se hallan esquematizadas en la figura 8 se observa que se inician con la reacción entre azúcares reductores y aminoácidos, y finalizan con la formación de polímeros nitrogenados llamados melanoidinas.

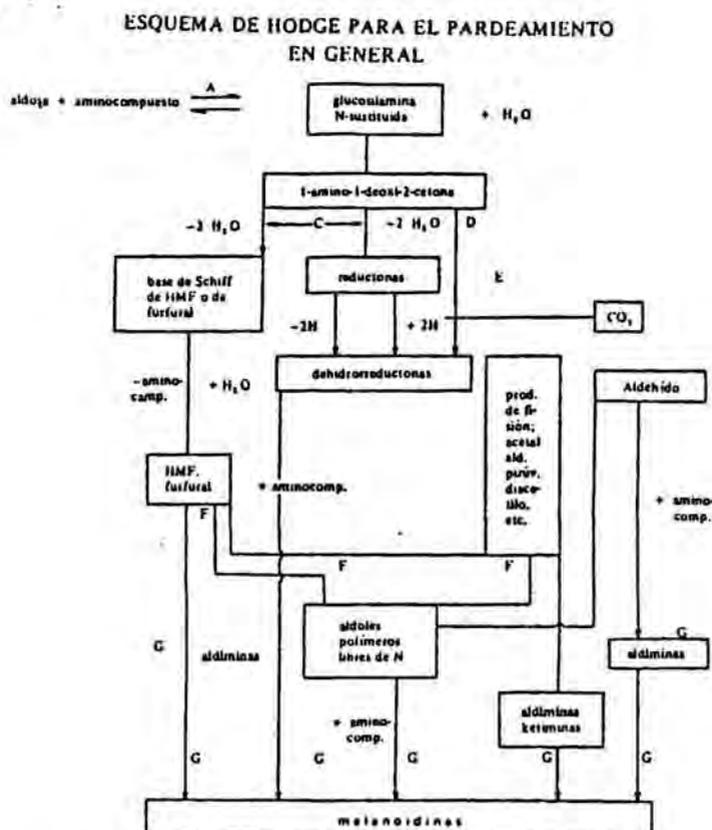


Fig. 8. Esquema de las reacciones de pardeamiento según Hodge (Braverman, 1967, d): A) Reacción de Maillard; B) Reordenación de Amadori; C) Conversión por deshidratación de derivados azucarados de adición o del ácido ascórbico en reducciones, furfural y/o derivados, así como pérdida de grupos amino; D) Productos de fisión; E) Degradación de Strecker; F) Recombinación de restos nitrogenados con carbonilos; G) Polimerización final.

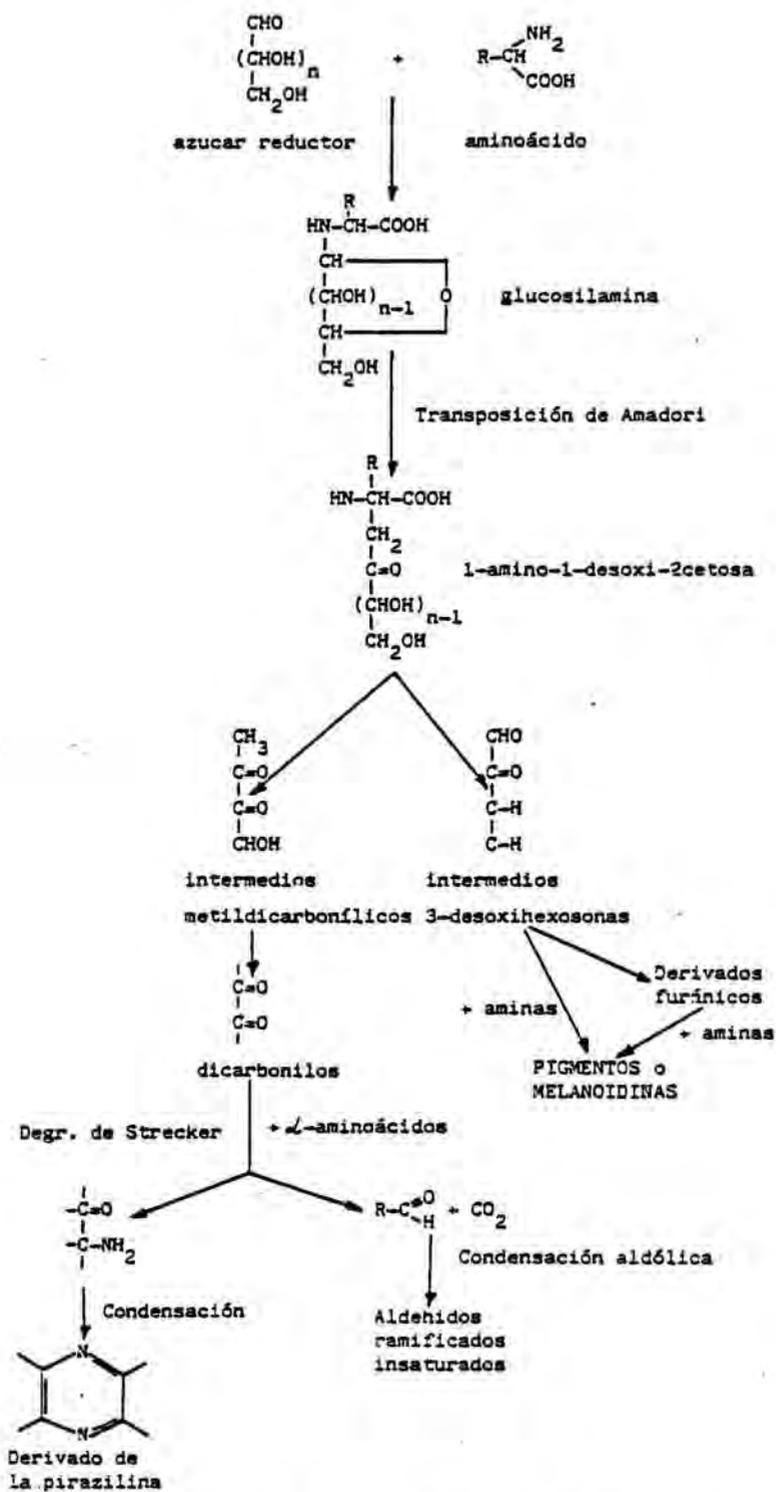


Figura 9 Formación de carbonilos mediante la reacción amino-carbonilo.

Destacaremos las que conducen a la formación de compuestos

carbonílicos (figura 9 ):

- Deshidratación de azúcares: en solución acuosa, ácida o neutra, se obtiene furfural a partir de pentosas; si se parte de hexosas se obtiene 5-hidroximetilfurfural.
- Reacción de Strecker: en presencia de compuestos dicarbonílicos (dehidrorreductonas, piruvaldehído, diacetilo...) o de compuestos carbonílicos alfa-beta-insaturados, los aminoácidos son transformados en aldehídos, con un átomo de carbono menos que el aminoácido de partida y en alfa-aminocetonas.

Cantarelli (1967) remarca que los mismos compuestos carbonílicos derivados de la degradación de azúcares y aminoácidos pueden dar reacciones coloreadas con los mismos aminoácidos e incluso con proteínas.

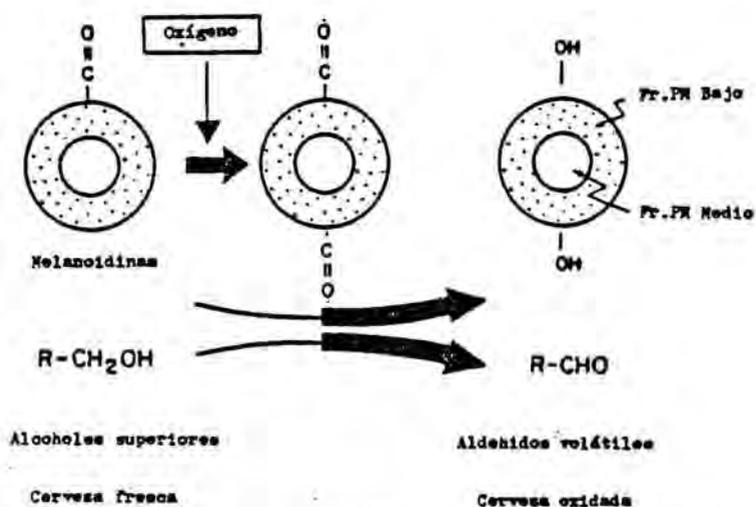
Se ha demostrado que la acción catalítica del ácido ascórbico y trazas de metales pesados favorecen la formación de aldehídos por la reacción amino-carbonilo; sin embargo, es poco probable que ninguno de los aldehídos saturados y derivados del furfural formados afecten al flavor, debido a sus elevados umbrales de percepción, aunque sí influyen en la coloración.

Estas teorías de formación de carbonilos asociadas a los

pardeamientos son muy complejas y se explicarán más detalladamente en el capítulo 4, en relación con las modificaciones del color.

Hay autores que señalan que, durante el almacenamiento al observarse un aumento en la concentración de carbonilos conjuntamente con el pardeamiento, pudiera ser que las melanoidinas, causantes del color pardo, estén relacionadas con la formación de aldehídos y cetonas.

De este modo, Díaz (1983) propone el mecanismo de oxidación de alcoholes superiores por las melanoidinas para dar los correspondientes aldehídos, siendo el oxidante los grupos  $-CO$  presentes en las melanoidinas y teniendo lugar la oxidación a través de la transferencia de átomos de hidrógeno de los alcoholes superiores a los grupos  $-CO$  de las melanoidinas de bajo peso molecular, tal como se muestra en la figura:



Oxidación de los alcoholes superiores por las melanoidinas.

El oxígeno molecular no oxida los alcoholes superiores en ausencia de melanoidinas; sin embargo, la oxidación se ve acelerada por el oxígeno en su presencia. En este caso, es de destacar que se forman cetonas y aldehídos saturados de pocos átomos de carbono y que tienen poca incidencia en el flavor oxidado.

Todas estas teorías son complejas y en su mayoría se hallan relacionadas con la modificación de los compuestos fermentativos mediante procesos oxidativos o reacciones que conectan con el pardeamiento. El origen de aldehídos y cetonas no se puede atribuir exclusivamente a una de estas vías, sin embargo en el caso de algunos de estos compuestos se indican preferentemente alguna de estas rutas, por lo que en los siguientes apartados se expondrá el principal origen y características de los más representativos según la bibliografía.

#### 3.6.1.1. - ACETALDEHIDO O ETANAL

El aldehído acético es el compuesto carbonílico mayoritario. Su participación en el aroma y su papel de activador en la fermentación lo han hecho objeto de múltiples investigaciones.

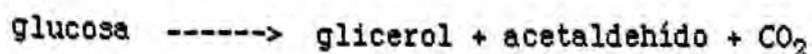
Baró y Quirós (1977) justifican su importancia por múltiples circunstancias: forma parte del aroma de la uva, es un producto

intermediario de fermentación, influye en los mecanismos de óxido-reducción y por su gran reactividad química influye de manera decisiva sobre la estabilidad y evolución del color, del sabor, y demás características organolépticas.

Otra propiedad remarcable del acetaldehído es que, cuando se halla en estado libre, es capaz de reaccionar, por reacciones de condensación, dismutación y acetalización, originando nuevos compuestos carbonílicos que también influyen en el flavor, tal como acetal, diacetilo, acetoína, etc..

El etanal forma parte del aroma varietal de la uva, pero, principalmente, participa del aroma secundario al ser un compuesto intermediario de la fermentación alcohólica que se forma durante ella en cantidad importante, para transformarse enseguida, mayoritariamente, en alcohol etílico. Su concentración pasa por un máximo al principio de la fermentación pirúvica, pero luego hay un predominio de la fermentación gliceropirúvica y la curva del etanal disminuye.

Si al medio de fermentación se añade  $\text{SO}_2$  (caso del vino), el etanal se combina con él establemente y no puede aceptar el protón para dar etanol, por lo que cede el hidrógeno a la hidroxiacetona y la fermentación tendría lugar según la reacción:



con lo que desviaría la fermentación hacia productos secundarios (figura 10).

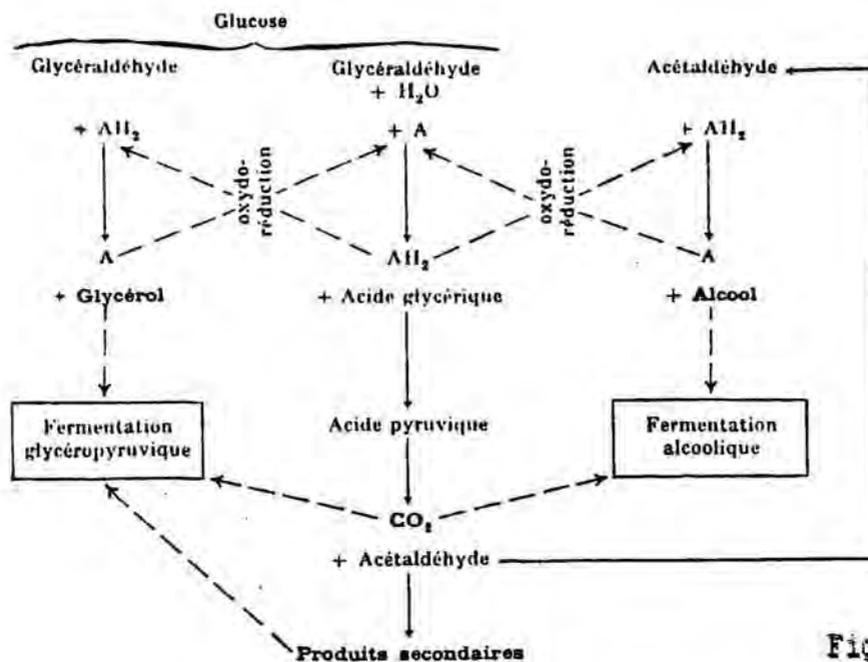


Figura 10

A pesar de esto, debido a la gran formación de etanal y a su elevada velocidad de reacción, la fermentación conduce principalmente a la producción de etanol, con lo que las vías secundarias que producen glicerol y otros productos de segundo orden se ven minimizados.

Con el sulfitado se bloquea el grupo carbonilo, inactivando el acetaldehído en forma de aldehído sulfuroso o ácido etanalsulfónico, siendo la relación SO<sub>2</sub>/etanal próxima a la

relación de sus pesos moleculares a fin de evitar el exceso de SO<sub>2</sub> libre y, sobre todo, de acetaldehído libre que puede dar derivados carbonílicos con una mayor probabilidad de accidentes posteriores (Ribereau-Gayon, 1975). Sin embargo, el sulfitado no deberá ser muy elevado porque la levadura se defiende frente al bloqueo del acetaldehído produciendo más cantidad y derivando hacia vías fermentativas no deseables. (Ver figura 11.)

En la formación de acetaldehído y productos de fermentación secundarios tienen especial importancia las condiciones del medio fermentativo (pH, temperatura, presencia de compuestos nitrogenados...) y la cepa de levaduras empleadas. Baró y Quirós clasifican las levaduras en orden de importancia decreciente, en cuanto a la formación de acetaldehído:

*Kloeckera apiculata*

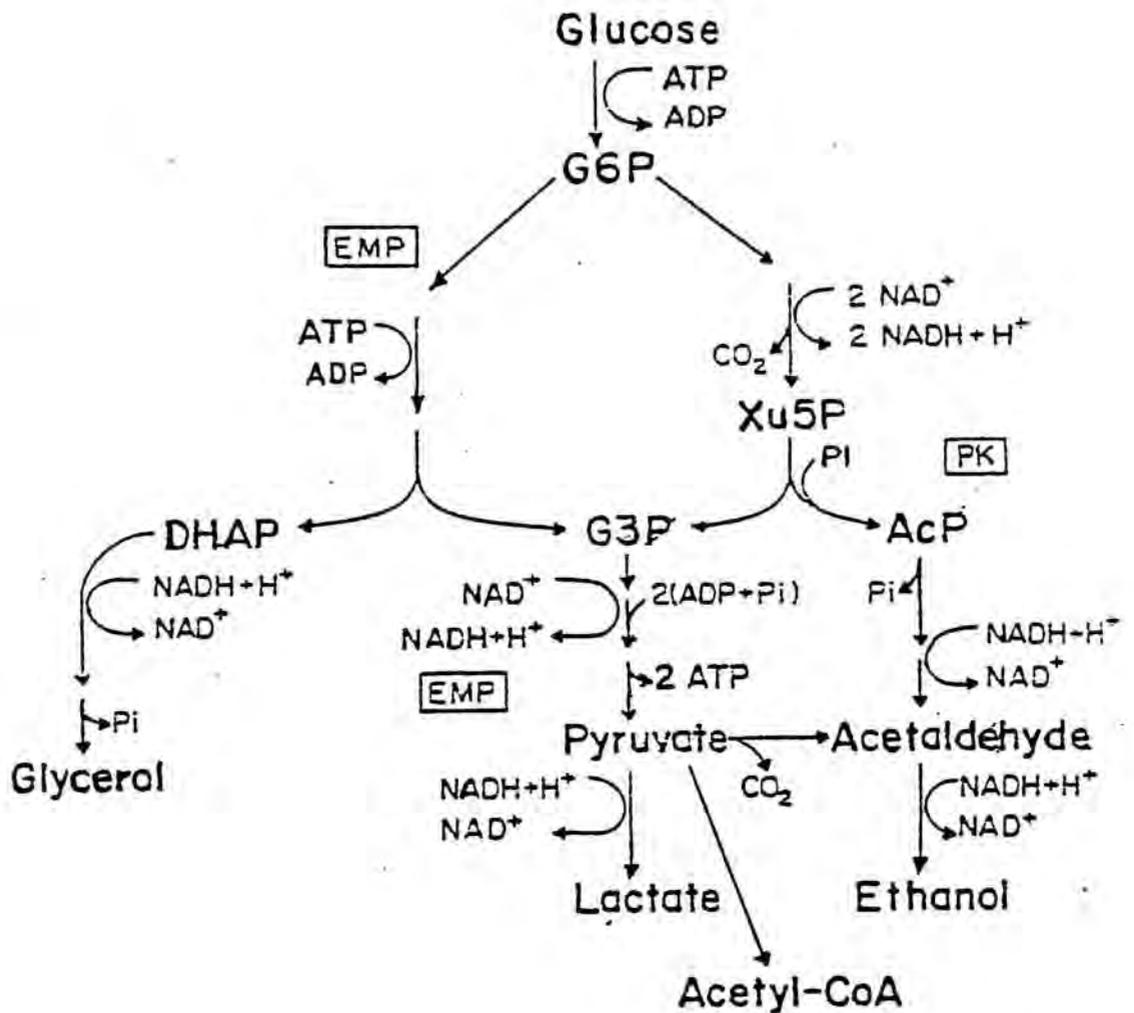
*Sacharomyces bayanus*

*Sacharomyces elipsoideus*

*Sacharomyces italicus*

*Sacharomyces chevalieri*

Una producción elevada de acetaldehído puede resultar problemática en la conservación porque aunque se halla establemente unido al sulfuroso, cuando el sulfuroso libre se va agotando (ya sea por oxidación, por formación de compuestos azufrados, porque se emplea en otras combinaciones con nuevas



**LEYENDA:**

FERMENTACION ALCOHOLICA: EMP---Acetaldehido---Etanol

FERMENTACION HOMOLACTICA: EMP---Lactato

FERMENTACION HETEROLACTICA: Glucosa---G6P---Xu5P--- +  
 G3P---Piruvato---Lactato  
 AcP---Acetaldehido---Etanol

**ABREVIACIONES:**

- EMP = Via glicolitica o de Embden-Meyerhoff-Parnas (Glucosa---G6P---DHAP + G3P --- Piruvato)
- PK = Via de la Fosfoacetolasa o Fermentación heteroláctica (Puente de la hexosamonofosfato)
- G6P = Glucosa-6-fosfato
- DHAP = Fosfato de dihidroxicetona
- G3P = Gliceraldehido-3-fosfato
- NAD<sup>+</sup> y NADH = Formas oxidada y reducida del Nicotin-Adenin-Dinucleotido
- Xu5P = Xilulosa-5-fosfato
- AcP = Acetil-fosfato
- ADP y ATP = Adenosin difosfato
- Pi = Fosforo inorgánico

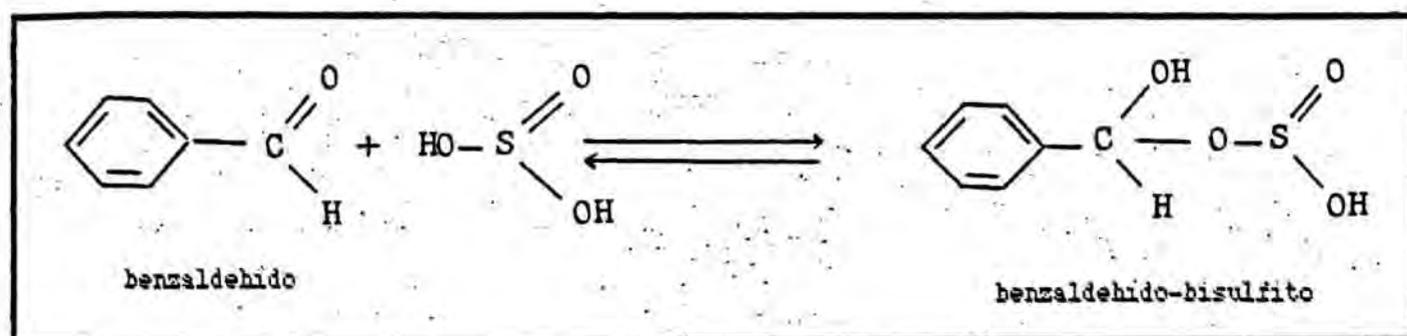
Figura 11

sustancias, o por apertura de la botella ) el equilibrio se va desplazando con lo que se incrementarán los niveles de etanal libre, con las consiguientes repercusiones organolépticas y de estabilidad (Schopfer, 1985).

Según Baró y Quirós (1977) en la mezcla etanol/etanal/acetato de etilo, el acetaldehído se revela con un poder aromático muy superior al del etanol y parece ser exaltado por un efecto sinérgico con el acetato. En el sulfitado se anula el aroma aldehídico porque la combinación bisulfítica es inodora. Por el contrario, una molécula de semejante constitución pero con un radical diferente, como es el diacetilo, es más intensamente aromática que el etanal del que proviene.

#### 3.6.1.2. - BENZALDEHIDO O ALDEHIDO BENZOICO

Esta sustancia aparece con cierta frecuencia en el vino blanco, en particular. Delfini y Di Stéfano (1984) la han descrito en el vino espumoso a base de "Pinot negro". Su principal característica es el intenso olor de almendras amargas, apreciable después del embotellado. Al tratarse de un compuesto carbonílico se atenúa este aroma amargo por la adición de dióxido de azufre.

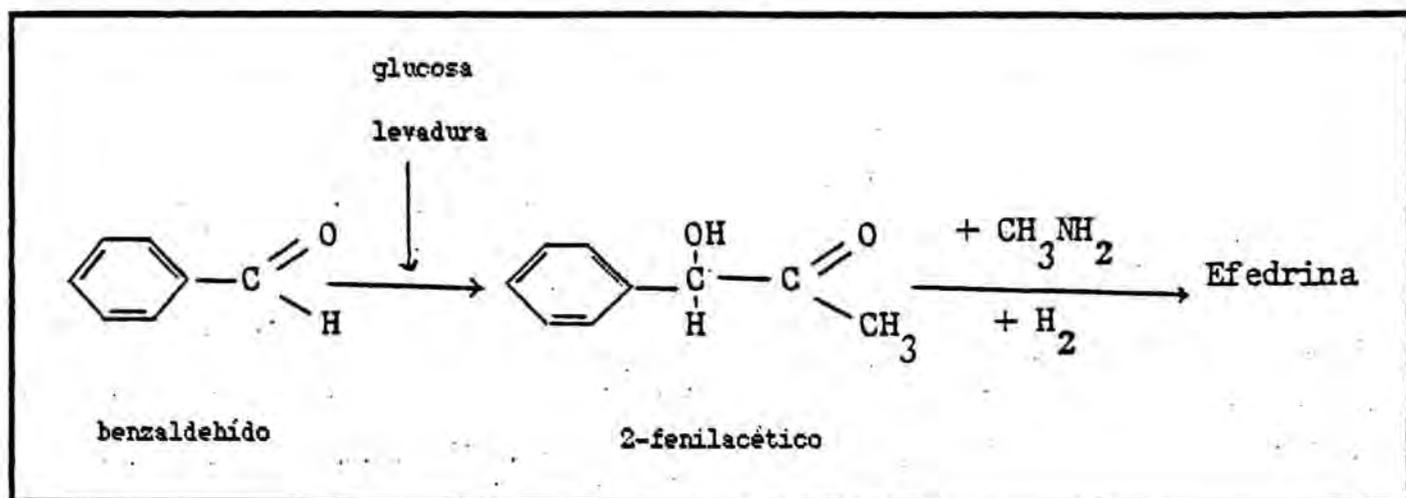


La ausencia de este aroma en el mosto podría indicar que el benzaldehído se forma durante la fermentación alcohólica, o en la refermentación por acción de la levaduras o bacterias sobre un precursor biológico.

Hay distintas teorías sobre su formación; podría ser la resultante del metabolismo anaeróbico reductor sobre el ácido benzoico, u oxidante sobre el alcohol benzílico; también podría ser producto de una vía bioquímica de los microorganismos sobre los aminoácidos aromáticos o sobre los compuestos fenólicos de la uva.

Delfini (1987) indica que el umbral de percepción del benzaldehído en los vinos blancos es mucho más bajo que el del alcohol correspondiente, lo que tiene importancia organoléptica; asimismo, verifica la presencia de alcohol benzílico en diversos clarificantes usados en la tecnología (principalmente gelatina), por lo que podría ser éste uno de los orígenes del aldehído benzoico presente en los vinos. Afirma que el uso de ciertas

levaduras puede eliminar el benzaldehído, transformándolo en otros productos aún no bien conocidos, según se muestra en la figura:



### 3.6.1.3. - ALDEHIDOS DE SEIS ATOMOS DE CARBONO (C<sub>6</sub>)

Se engloban bajo esta denominación al n-hexanal, trans-2-hexenal-1 y al cis-3-hexenal-1, responsables del aroma herbáceo del mosto y del vino.

Según Cordonnier y Bayonove (1981) la alteración de los tejidos vegetales de la uva y las contusiones, entrañan modificaciones del color y del flavor. Estas modificaciones son producidas por diversos enzimas: hidrolasas, oxigenasas y óxido-reductasas. Así, la ruptura de las uvas expuestas al aire

induce rápidamente a la formación de los aldehídos  $C_6$ . Existe una interdependencia entre estos aldehídos herbáceos y la formación de sus correspondientes alcoholes  $C_6$ . Según estos autores, en la uva existe un sistema enzimático productor de estos aldehídos y otro sistema, que los transforma en alcoholes.

Es de señalar que el hexen-2-al sólo se halla presente en la uva y que el resto de compuestos  $C_6$  pasan al vino produciendo aromas herbáceos y desagradables.

En la aparición de estas sustancias parecen jugar un papel importante los ácidos grasos de la uva y los enzimas del tipo lipoxigenasa ( Díaz, 1983; figura 12 )

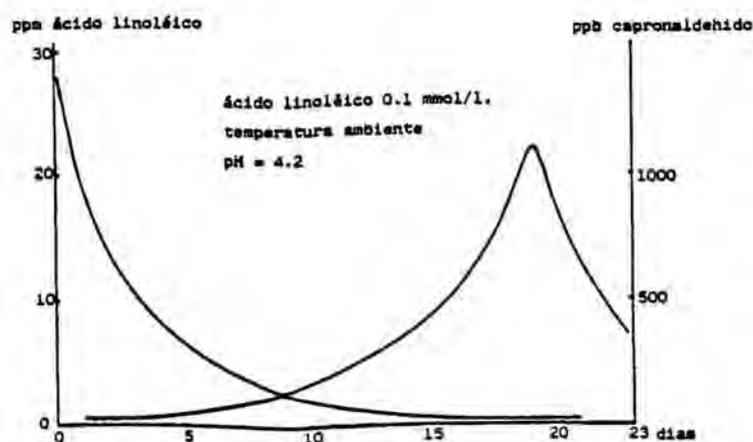
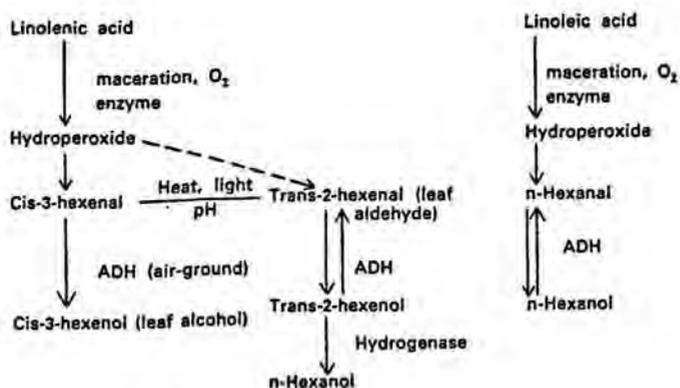


FIG.12 Autoxidación del ácido linoléico.

Joslin y Ough (1978) resumen los factores que afectan su aparición y cantidad en:

- 1) Grado de maceración aeróbica.
- 2) Cantidad de precursores (ácido linoleico y linolénico), que dependen de la variedad de uva, madurez y condiciones climáticas.
- 3) Actividad enzimática, en la que influyen variedad de uva, madurez, temperatura, pH, inhibidores (SO<sub>2</sub>), tipo de maceración y tipo de levadura.

El posible esquema de formación del hexanal sería:



#### 3.6.1.4. - DIACETILO - ACETOINA

(2.3-butanodiona - acetilmetilcarbinol)

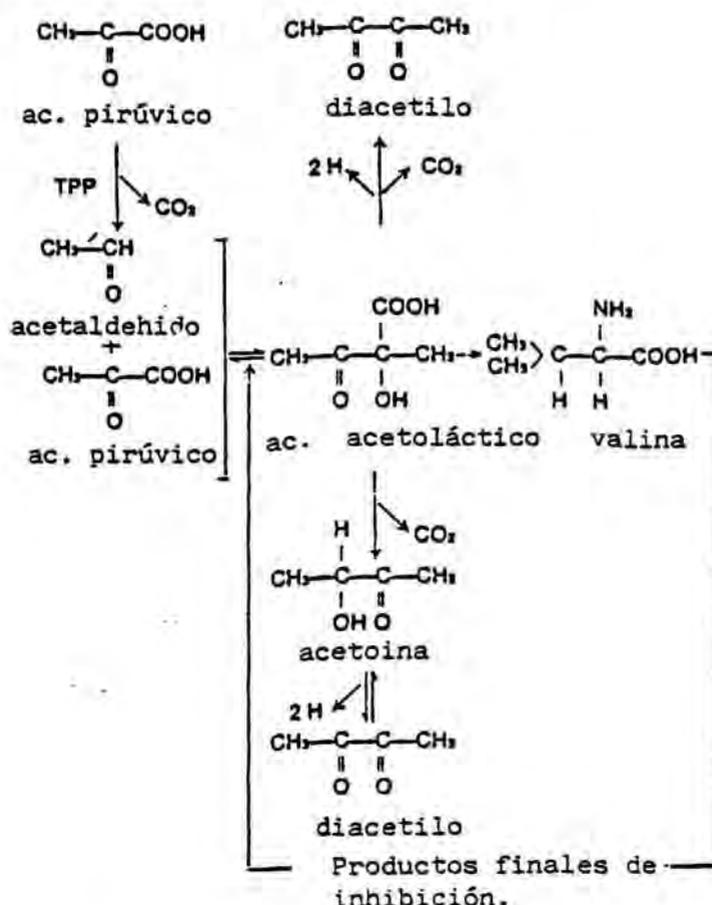
Son compuestos secundarios formados en el curso de la fermentación alcohólica, en cuya formación influye decisivamente

el acetaldehído libre. Abundan en los vinagres de vino provenientes de la oxidación enzimática del 2,3-butanodiol.

Ribereau-Gayon y Peynaud (1975) dan una explicación del mecanismo de formación de los productos acetoinicos y otros productos secundarios (ácido acético, ácido succínico y 2,3-butanodiol), basando el origen de estas sustancias, derivadas de la fermentación gliceropirúvica, en una serie de condensaciones y óxido-reducciones del acetaldehído. Concretamente, sugieren una condensación acetaldehído-ácido acético para dar diacetilo y después una óxido-reducción entre una molécula de diacetilo y otra de acetaldehído para dar acetoina y ácido acético.

Según Baró y Quirós (1977) son compuestos que aparecen más frecuentemente en vinos que han sufrido envejecimiento biológico (vinos con velo como el de Jerez) debido a la condensación acetoinica del etanal y a la alta reactividad química de este compuesto.

Según teorías más recientes, son productos intermediarios de reacción y su presencia en cantidad elevada es indicativo de un proceso inadecuado o incompleto. Nykänen (1986) indica que el diacetilo se forma por descomposición espontánea del 2-acetolactato, producto formado por las levaduras como intermediario en la biosíntesis del 2-cetoisovalerato, precursor de valina, leucina y 2-metilpropanol, según el esquema siguiente:

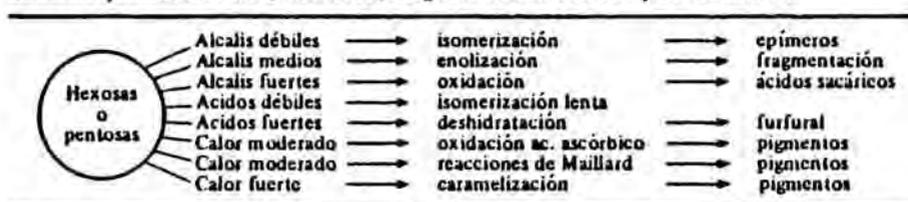


### 3.6.1.5.- FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL

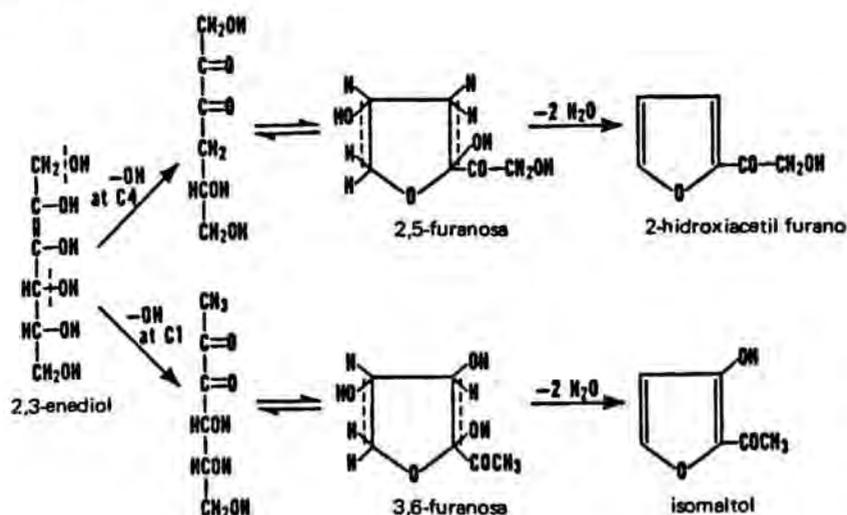
Muchos autores han estudiado estos compuestos que provienen de la reacción entre un azúcar reductor y un aminoácido (reordenamiento de Amadori) en distitos zumos y bebidas fermentadas. En su formación influyen de manera decisiva, la temperatura, el tiempo de almacenamiento y el pH. Su origen se halla en los cambios químicos sufridos por los azúcares bajo

algunas condiciones de procesamiento, tal como se muestra en el esquema:

*Cambios químicos de los azúcares bajo algunas condiciones de procesamiento*



A pH ácido (caso particular del vino) se pueden deshidratar las hexosas formando derivados furánicos; las pentosas a su vez se deshidratan produciendo 2-furaldehído o furfural. Estas reacciones de deshidratación por ácido y la producción de derivados furánicos, se inician con la formación del correspondiente enol del monosacárido. La deshidratación de los enoles se lleva a cabo a través de reacciones de beta-eliminación, tal como se muestra a continuación:



Deshidratación de un azúcar para dar el 2-(hidroxiacetil) furano e isomaltol.

Los derivados furfurílicos se forman por la reacción de ciclación de los azúcares deshidratados, que en condiciones ácidas es más lenta que en medio alcalino. Sin embargo, en medio ácido las deshidrataciones son más rápidas.

La formación de estos compuestos furánicos tiene importancia debido a los olores desagradables y a su intervención en reacciones de polimerización, con la formación de pigmentos oscuros y la consiguiente repercusión organoléptica. Su participación en el pardeamiento y su influencia en las modificaciones de color se expondrán en el capítulo 4.

Sin embargo, mediante paneles sensoriales, se demuestra que su influencia en el flavor oxidado es poca, debido a su alto umbral de percepción y que, más que responsables del envejecimiento, se les debe considerar como buenos indicadores del tratamiento térmico que ha sufrido el mosto o vino (Lee y Nagy, 1988). En la figura 13 se observa que la formación de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) aumenta con la temperatura y con el tiempo de conservación. Su sabor se detecta a concentraciones más altas que las que son necesarias para percibir el aroma, y el umbral de percepción es más bajo para el furfural que para el HMF. El 5-HMF no guarda correlación con el deterioro cualitativo del zumo de uva, aunque su importancia se debe a que es precursor de los pigmentos coloreados, relacionándose con fenómenos de pardeamiento en los que intervienen azúcares, ácido ascórbico o combinaciones

aminoácido-azúcar.

T = gusto

F = aroma

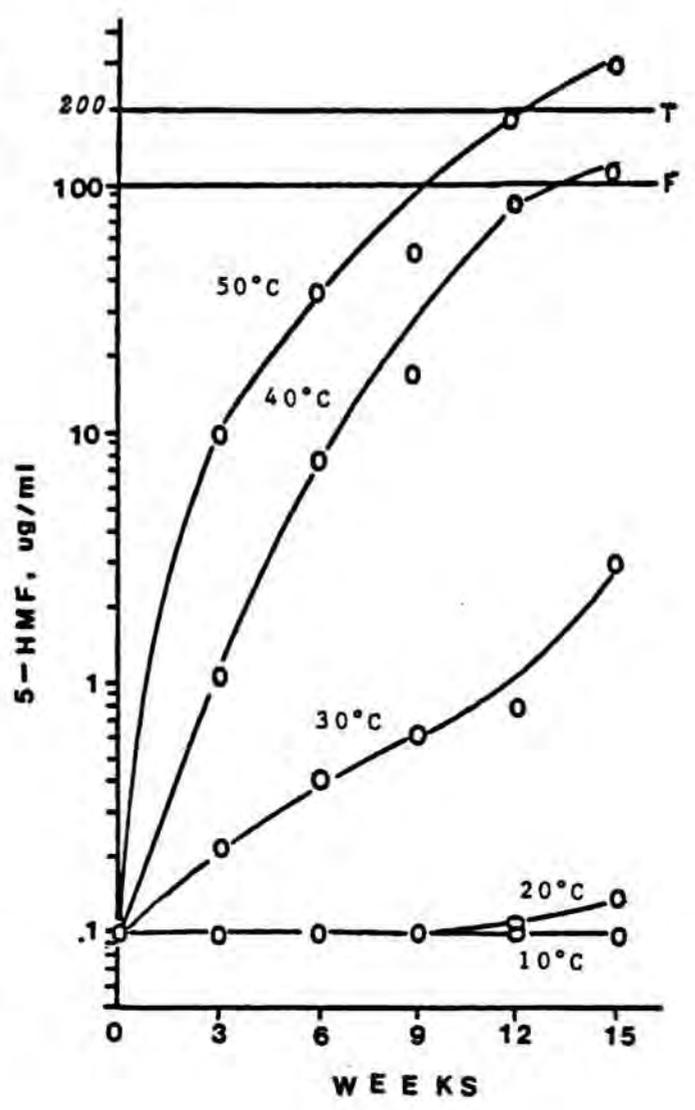
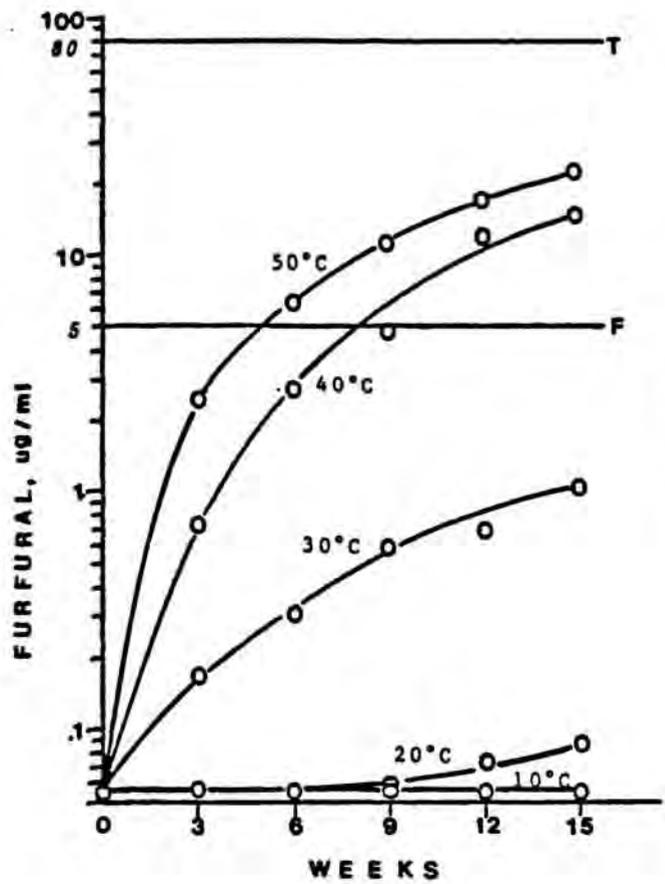


Figura 13

### 3.7.- ANHIDRIDO SULFUROSO EN LA ESTABILIZACION DE LOS VINOS

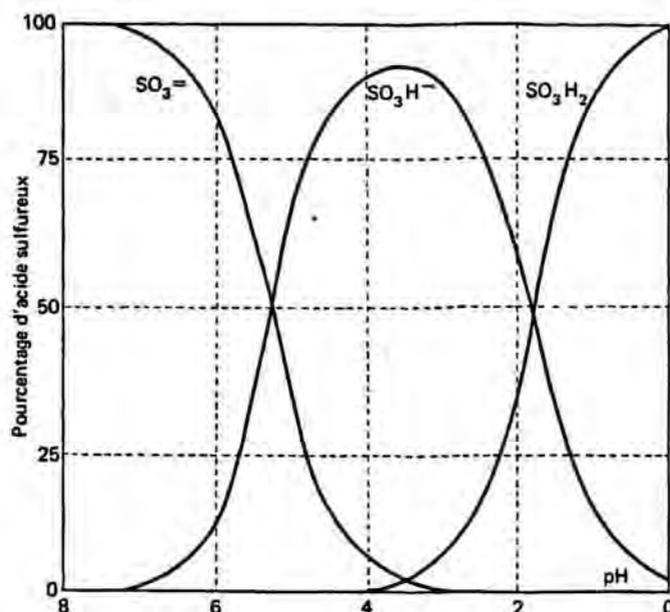
El empleo del  $\text{SO}_2$  es actualmente irremplazable en la vinificación, a fin de que el vino conserve sus propiedades el mayor tiempo posible.

La necesidad de obtener una estabilización química rápida por medio del dióxido de azufre es debida, por orden de importancia a:

- 1- Combatir a título preventivo las penetraciones ulteriores de oxígeno y para reducir eventualmente las oxidaciones aparecidas.
- 2- Necesidad de bloquear el acetaldehído a fin de proteger las características organolépticas.
- 3- Necesidad de destruir las bacterias del vino y obtener así una estabilidad biológica, sobre todo en lo referente a las bacterias acéticas.
- 4- Ayudar a la clarificación y filtración de los vinos.

El dióxido de azufre es un gas incoloro y relativamente soluble en agua. Estas soluciones tienen una alta tensión de vapor, en las que el gas se escapa con facilidad. En disolución,

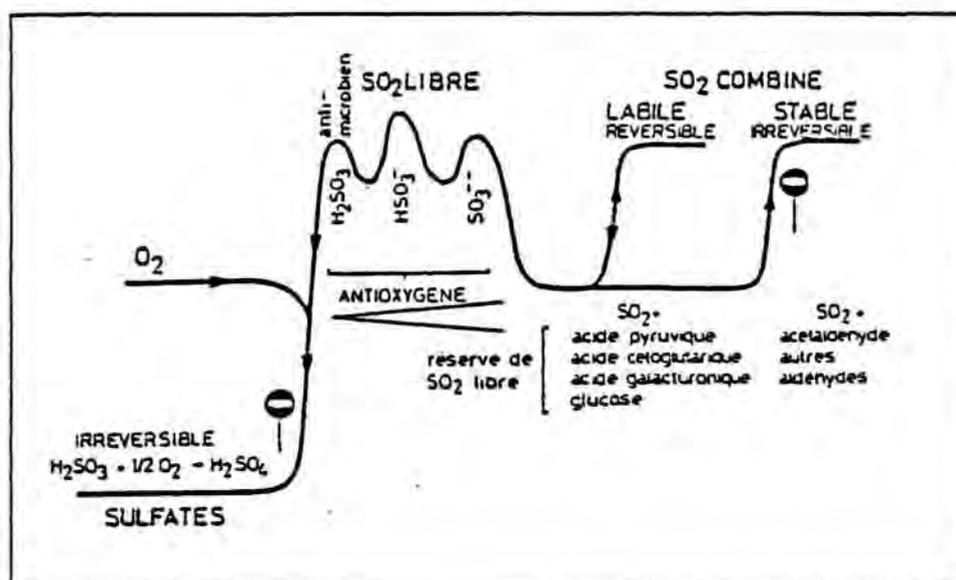
se transforma en ácido sulfuroso ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) que es un ácido fuerte y disociable según el pH, hallándose en las formas indicadas en la figura:



Estado del dióxido de azufre en función del pH de la solución

En mostos y vinos pueden coexistir: Dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ), bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) y sulfito ( $\text{SO}_3^{=}$ ). Estas moléculas constituyen el  $\text{SO}_2$  libre. Según Schopfer (1985) el  $\text{SO}_2$  combinado está formado principalmente por su unión con compuestos carbonílicos. Sin embargo, las combinaciones del  $\text{SO}_2$  no son todas de la misma naturaleza y como consecuencia, el equilibrio que se establece

entre el  $\text{SO}_2$  libre y el  $\text{SO}_2$  combinado depende directamente del tipo de unión, del pH del medio y de la temperatura. En la figura se esquematizan las acciones y la forma en que se puede encontrar el  $\text{SO}_2$ :



Acción del dióxido de azufre. Schopfer(1985).

Las principales propiedades del anhídrido sulfuroso, usado en Enología, son debidas principalmente al  $\text{SO}_2$  libre y se pueden resumir en:

- acción antioxidante
- acción antifermentativa
- acción antiséptica

- acción sobre los aldehídos
- acción clarificante
- acción extractiva del color

En comparación, el SO<sub>2</sub> combinado no presenta actividad, aunque se le podría atribuir una función liberadora de SO<sub>2</sub> libre cuando su combinación es de naturaleza lábil.

En el cuadro se encuentran las principales sustancias que se combinan con el dióxido de azufre en los vinos y que suelen provenir de la actividad fermentativa de levaduras y bacterias lácticas (Lafon-Lafourcade, 1985):

*Substances combinant l'anhydride sulfureux dans les vins*

	TAUX PAR LITRE	K	TAUX DE COMBINAISON (%)
<i>Sucres :</i>			
Glucose .....	0,5-30 g	$900 \times 10^{-3}$	0,08
Arabinose .....	0,4-1 g	$40 \times 10^{-3}$	1,8
<i>Anthocyanes :</i>			
Malvidine-3-glucoside .....		$0,06 \times 10^{-3}$	93 (**)
Malvidine-3,5-diglucoside .....		$0,044 \times 10^{-3}$	95 (**)
<i>Acides cétoniques :</i>			
Acide pyruvique .....	10-500 mg	$0,3 \times 10^{-3}$	72
Acide céto-2-glutarique .....	2-350mg	$0,5 \times 10^{-3}$	61
<i>Acides uroniques :</i>			
Acide-D-galacturonique .....	45-950 mg	$20 \times 10^{-3}$	4,4
Acide-D-glycuronique .....	2,5-50 mg	$20 \times 10^{-3}$	1,5
<i>Produits d'oxydation des sucres :</i>			
Acide céto-2-gluconique .....		$1\ 800 \times 10^{-3}$	0
Acide dicéto-2,5-gluconique .....		$0,4 \times 10^{-3}$	66
Acide céto-5-gluconique .....		$0,3 \times 10^{-3}$	72
Céto-5-fructose .....		$1,4 \times 10^{-3}$	36
Xylosone .....			
<i>Aldéhydes :</i>			
Acétaldéhyde .....	30-130 mg	$0,0024 \times 10^{-3}$	> 99

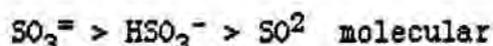
(\*) Pourcentage de substance combinée à SO<sub>2</sub> à 50 mg/l SO<sub>2</sub> libre.

(\*\*) A 5 mg/l SO<sub>2</sub> libre (plus commun en vins rouges) ce sont 56 p. 100 et 64 p. 100 respectivement.

### 3.7.1. - PROPIEDAD ANTIOXIDANTE Y REDUCTORA

El  $\text{SO}_2$  es usado en la vinificación para evitar la oxidación del mosto o vino por el oxígeno del aire. Es necesario distinguir entre su empleo para prevenir la oxidación química pura y su utilización frente a la oxidación catalizada por enzimas oxidativos. La oxidación química en el vino es, sobre todo, debida a la presencia de acetaldehído y de compuestos fenólicos fácilmente oxidables por el oxígeno atmosférico y por cambios en el potencial redox.

En solución acuosa, el  $\text{SO}_2$  y los sulfitos son reductores. El poder reductor del sistema  $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_2$  aumenta con el incremento de pH, el carácter antioxidante varía según la forma de disociación:



Por tanto, el sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) será la forma más activa como reductor, a la vez que la que se encuentra en menor cantidad en estado libre.

La acción reductora del  $\text{SO}_2$  sobre el oxígeno molecular es indirecta a través de metales, lo que, en cierta medida, retrasa la acción de enzimas oxidásicas que necesitan oxígeno y metales

como catalizadores.

Además de la inactivación de las oxidasas, el  $\text{SO}_2$  ejerce una acción protectora, en vinos y mostos, al reaccionar con radicales libres y peróxidos que inciden negativamente en la estabilidad.

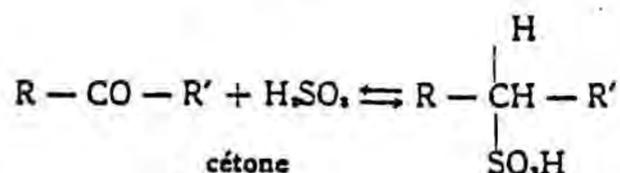
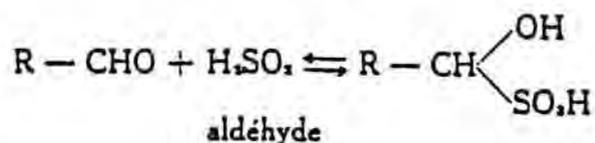
El  $\text{SO}_2$  también puede reducir, a su estado inicial, compuestos oxidados. Este es el caso de los polifenoles oxidados, con los que forma compuestos de adición incoloros, y el de los antocianos, con lo que retrasa la condensación de éstos con flavanos y taninos, condensación favorecida en medio oxidante.

Esta acción reductora del  $\text{SO}_2$  es dificultada por diversos compuestos orgánicos e inorgánicos que, o bien reaccionan directamente con él o interrumpen su mecanismo de acción.

### 3.7.2. - COMBINACION DEL $\text{SO}_2$ EN EL VINO

El  $\text{SO}_2$  tiene la propiedad de formar compuestos de adición con los constituyentes orgánicos polares, o fácilmente polarizables, del vino.

Estos compuestos son principalmente los que poseen grupos carbonilo (aldehídos y cetonas):



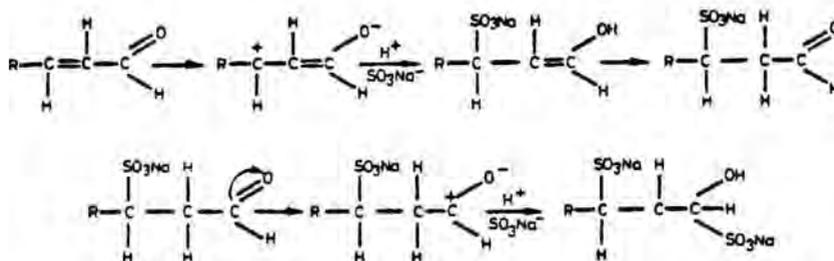
Estas reacciones conducen a la formación de ácidos alfa-hidroxisulfónicos, que son ácidos fuertes y constituyen la mayor parte del  $\text{SO}_2$  combinado del vino. Esta reacción tiene importancia ya que neutraliza la gran reactividad de los aldehídos y su protagonismo en los procesos de pardeamiento y origen de flavors oxidados.

La estabilidad de estos compuestos de adición, formados con el dióxido de azufre, depende de la naturaleza de los sustituyentes R y R', del pH y de la temperatura. En medio alcalino y a temperatura ambiente son inestables y dan los productos de partida. En medio ácido la ruptura sólo tiene lugar a temperaturas elevadas.

Las constantes de equilibrio de estas reacciones de adición con el  $\text{SO}_2$  permiten distinguir las distintas clases de compuestos

según la fuerza de la unión. Los que se unen más fuertemente, como los carbonilos, constituyen la fracción estable del SO<sub>2</sub> combinado. Ribereau-Gayon (1973) indica que en un vino que contenga SO<sub>2</sub> libre, se puede considerar que todo el etanal se halla combinado, lo que enmascara su influencia negativa sobre el "bouquet".

Burton y col. (1963) estudian el pardeamiento no enzimático en relación con el papel intermediario de los compuestos carbonílicos y el inhibidor del SO<sub>2</sub>. Indican que se produce un retraso en el desarrollo del color, en sistemas carbonil-amino, si previamente se ha formado el complejo sulfito-carbonilo. Resaltan que el sulfito se une además a centros insaturados de compuestos carbonílicos con dobles enlaces, que parecen ser los más activos en estos pardeamientos. Esta última reacción probablemente transcurre por un mecanismo iónico y en el caso de los aldehídos alfa-beta-insaturados según el esquema:



Asimismo, resaltan el hecho de que la pérdida en sulfitos

observada en la conservación de alimentos, no está en concordancia con la producción de sulfatos, ni con la formación de SO<sub>2</sub> libre, lo cual atribuyen a la combinación bisulfítica con estos compuestos carbonílicos insaturados.

3.7.3. - EFEECTO INHIBIDOR DE LA FERMENTACION

El SO<sub>2</sub> es un antiséptico general y a concentraciones diferentes afecta a distintas funciones celulares. Es difícil establecer una relación entre las dosis de SO<sub>2</sub> añadidas y este efecto, ya que sólo la fracción libre tiene esta característica y a su vez depende de la cantidad de azúcares y del tipo de levaduras formadoras de acetaldehído.

Según Ribereau-Gayon (1975) el SO<sub>2</sub> tiene un efecto inhibidor sobre la fermentación alcohólica, ya que se combina con el etanal impidiendo la formación de etanol. Sin embargo, también se observa un efecto acelerador o estimulante, que podría ser atribuido a la destrucción de sustancias tóxicas para las levaduras; asimismo, la levadura parece defenderse frente al bloqueo del etanal produciendo más acetaldehído. Por ello, el sulfitado en grandes cantidades debe evitarse, por consideraciones toxicológicas y porque se producirán vinos con elevado contenido en acetaldehído, tal como se muestra en la figura 14:

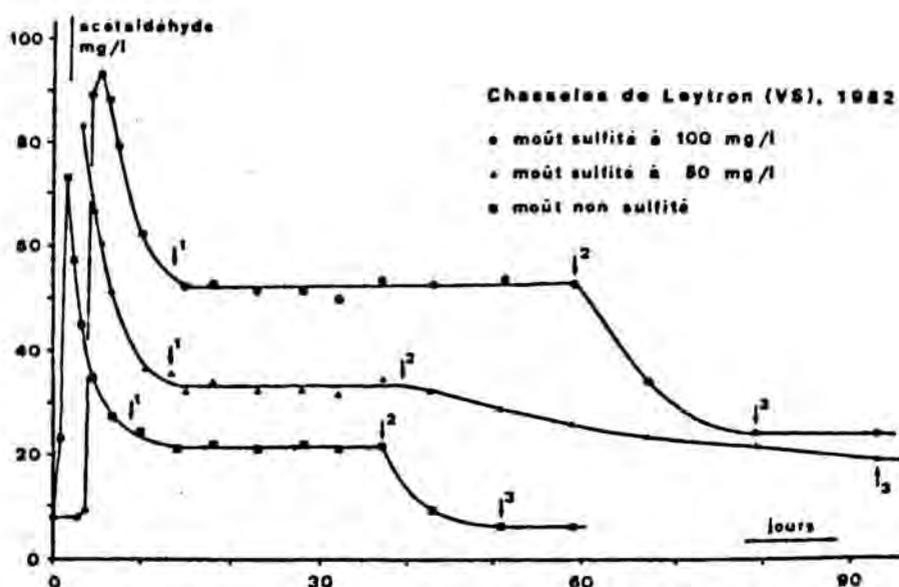


FIG. 14 - Évolution de la teneur en acétaldéhyde des vins au cours de la vinification.  
La fermentation malolactique diminue la teneur en acétaldéhyde.

El alto contenido en acetaldehído, aunque se halle en estado combinado, podrá crear, posteriormente, problemas de estabilidad porque, al tratarse de equilibrios, parte del  $\text{SO}_2$  combinado puede pasar a  $\text{SO}_2$  libre a medida que éste vaya reaccionando o desapareciendo, con lo que puede aparecer compuestos carbonílicos libres (Schopfer, 1985).

Es un hecho que la adición de  $\text{SO}_2$  es más activa contra las bacterias del vino que contra las levaduras, por lo que una vendimia sulfitada está menos expuesta a las alteraciones bacterianas y, por ello, el sulfitado aporta una mejora sensible en las características organolépticas del vino obtenido de vendimias alteradas o cepas mediocres.

#### **4. - MODIFICACIONES EN EL COLOR DE LOS VINOS**

El color es una propiedad organoléptica esencial para la caracterización de un alimento y constituye la elección por parte del consumidor. Desde el punto de vista enológico es importante su determinación, ya que existe una relación directa entre la composición de la materia colorante, el proceso tecnológico, la calidad y el estado de conservación.

En el vino los principales responsables del color son las sustancias denominadas, de manera genérica, compuestos polifenólicos. Bajo este nombre, se engloban todas aquellas sustancias que poseen una o varias funciones fenol unidas a estructuras aromáticas o alifáticas; por lo que representa un amplio grupo de sustancias de estructura compleja y heterogénea.

Ya desde el proceso tecnológico utilizado en la elaboración del vino, así como durante su maduración y envejecimiento, tienen lugar una serie de modificaciones entre las que destacan las relativas al color.

Las actuales corrientes de preferencia en el consumo de vinos blancos, se decantan por aquellos productos de tonalidades más pálidas y, por ello, la aparición de una mayor coloración en los vinos durante su procesado y almacenamiento constituye un importante objeto de estudio ( Fernández, 1988). Así pues, el envejecimiento se caracteriza, principalmente, por un aumento del color acompañado por una alteración de su fracción aromática.

Mariné (1981) define los pardeamientos como un conjunto de fenómenos cuyo rasgo común es la aparición de colores pardos, más o menos oscuros, debidos a mecanismos químicos y/o bioquímicos, complejos y heterogéneos, que tienen lugar en los alimentos en virtud de su procesado industrial, de deterioro o por acciones de tipo mecánico, dándose al mismo tiempo modificaciones en el aroma, textura y el valor nutritivo.

Las causas del pardeamiento se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- 1- Pardeamiento enzimático, de naturaleza bioquímica.
- 2- Pardeamiento no enzimático, de naturaleza exclusivamente química.

#### 4.1. - PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO

Los fenómenos de pardeamiento que tienen lugar durante la obtención del mosto tienen un origen esencialmente enzimático, en el que los enzimas requieren oxígeno para realizar su acción y por ello se les denomina oxidasas. Dentro de este grupo se destaca la polifenoloxidasas que actúa oxidando compuestos fenólicos. Se trata de un proceso enzimático en virtud del cual los polifenoles, una vez oxidados, se polimerizan o degradan dando lugar a un aumento de color o pardeamiento.

Los polifenoles tienen una gran actividad química. Pueden combinarse entre sí y formar compuestos oligómeros y polímeros, que contrariamente a los monómeros, tienen propiedades tánicas. Las catequinas y sus oligómeros son el sustrato principal de las reacciones de oxidación; estas reacciones son procesos redox en los que el oxígeno actúa como aceptor de hidrógeno procedente del grupo fenol que se oxida. Por ello, la naturaleza, estructura y cantidad de compuestos fenólicos tiene una relación directa con el color, gusto, aroma y estabilidad de mostos y vinos.

Más que el proceso oxidativo en sí, la importancia reside en las consecuencias de esta oxidación por acción enzimática. Las polifenoloxidasas dan lugar a quinonas, las cuales ya tienen una coloración amarilla intensa, pero lo más destacable es el posible desencadenamiento de otro tipo de reacciones secundarias que dan

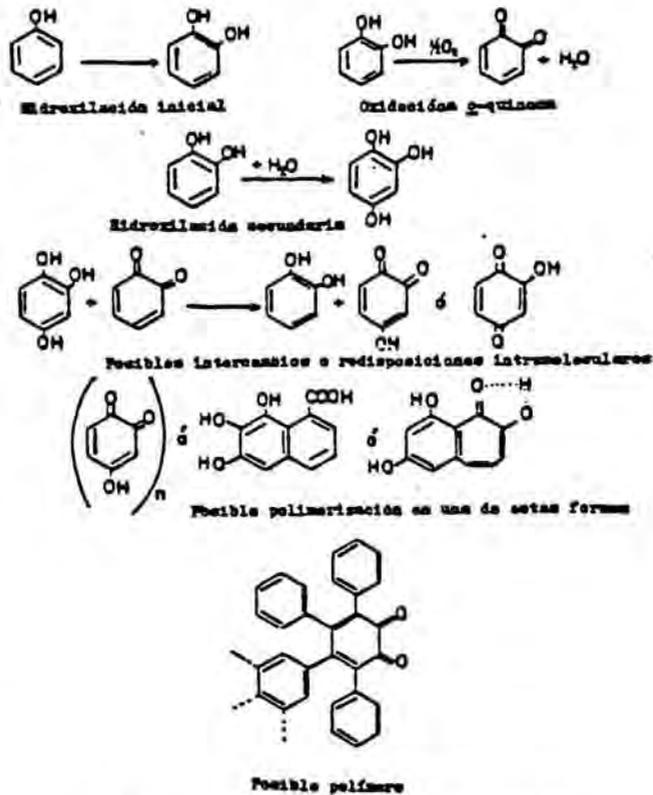
lugar a compuestos pigmentados.

El pardeamiento enzimático, como su nombre indica, transcurre mediante la intervención de enzimas, sin embargo, las reacciones que desencadena no son procesos de esta naturaleza, aunque son fenómenos oxidativos. Principalmente distinguiremos el pardeamiento que se inicia por acción enzimática sobre los polifenoles ya que, como consecuencia, se derivan una serie de sustancias coloreadas y otras de naturaleza oxidante que tienen incidencia en las características organolépticas:

- 1) Fase inicial oxidativa enzimática, que afecta de manera especial a los compuestos o-difenoles.
- 2) Ulterior oxidación no enzimática (oxidaciones acopladas), debida a la anterior formación de quinonas que oxidan a compuestos con potencial redox inferior (ácido ascórbico,  $\text{NADH}_2$ , glutatión reducido, cisteína, antocianos y polifenoles complejados con aminoácidos o proteínas) reduciéndose las quinonas.
- 3) Transformaciones no oxidativas, con intercambios o reordenamientos intramoleculares.
- 4) Polimerización final, con formación de melanoidinas por reacciones entre o-quinonas e hidroxiquinonas.

En la figura 15 se esquematizan los posibles que pueden tener lugar a partir del proceso de pardeamiento enzimático:

Figura 15



Reacciones de pardeamiento enzimático  
 Chetani y Chetani, 1980

#### 4.2. - PARDEAMIENTO NO ENZIMATICO

Este tipo de pardeamiento cobra especial importancia en la conservación del cava, donde se aprecia que en el vino blanco, a pesar de conservarse en condiciones prácticamente anaerobias, se producen igualmente alteraciones organolépticas.

Generalmente, se consideran pardeamientos no enzimáticos los procesos conocidos como "Reacción de Maillard", que afectan básicamente a hidratos de carbono, aunque pueden intervenir otros compuestos con grupos carbonilo como vitaminas y componentes de aromas naturales.

La compleja serie de reacciones que conducen a un pardeamiento no enzimático se podrá dividir de una forma muy general en dos etapas:

- 1) Período de inducción, en el que tiene lugar la formación y acumulación de productos carbonílicos de elevada reactividad, como aldehídos y cetonas, saturados e insaturados, reductonas, compuestos dicarbonílicos, etc.. Esta etapa se ve acelerada por pH ácidos, presencia de compuestos aminados libres, temperatura elevada, presencia de catalizadores metálicos y condiciones de oxidabilidad.

2) Pardeamiento propiamente dicho, debido a la formación de polímeros y copolímeros. Esta etapa es muy compleja y poco conocida, y en ella se dan abundantes fenómenos de escisión y polimerización. Se obtienen compuestos de bajo peso molecular, volátiles, que influyen en el aroma, a la vez que polímeros de alto peso molecular que influyen en el color.

En relación al vino blanco, las causas del pardeamiento no enzimático se pueden clasificar atendiendo a los compuestos que participan, en:

- 1) Reacción de Maillard (reacción carbonilo-aminoácido)
- 2) Oxidación del ácido ascórbico
- 4) Caramelización
- 3) Oxidación debida a los polifenoles

En este pardeamiento no enzimático tienen un papel muy importante los azúcares y productos de su degradación. Sin embargo, otros constituyentes de los vinos participan en las complejas reacciones, por lo que se exponen separadamente según los compuestos que participan en ellas.

#### 4.2.1. - PARDEAMIENTO DE MAILLARD

Engloba una serie de reacciones entre sustancias con grupos



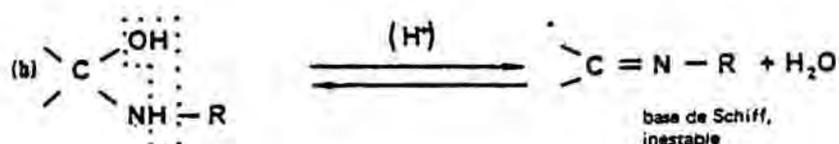
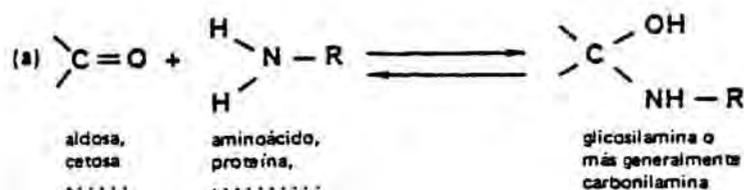
carbonilo (azúcares reductores, ácidos urónicos, cetonas... ) y compuestos con grupos amino libres (aminoácidos, proteínas,... ).

### A. - Fase inicial

Es una etapa reversible y en la que no hay producción de color. Se puede subdividir en:

1) **Condensación de Maillard**, en la que reacciona un grupo carbonilo libre con una función amino (reacción carbonil-amino). El producto será una glucosil-N-sustituida, cuya formación se favorece en medio básico; sin embargo, la deshidratación que conduce a bases de Schiff, se favorece a pH ácido.

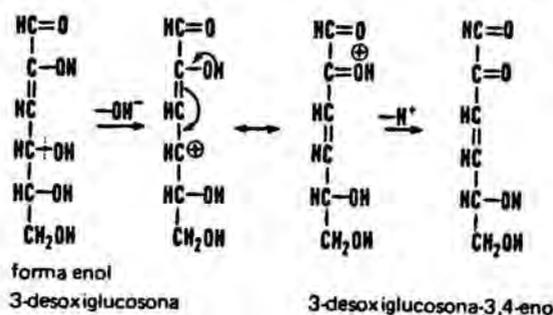
2) **Reordenación de Amadori**, en la cual la glucosilamina o carbonilamina formada sufre una reestructuración dando lugar a cetosaminas o aldósaminas.



## B. - Fase intermedia

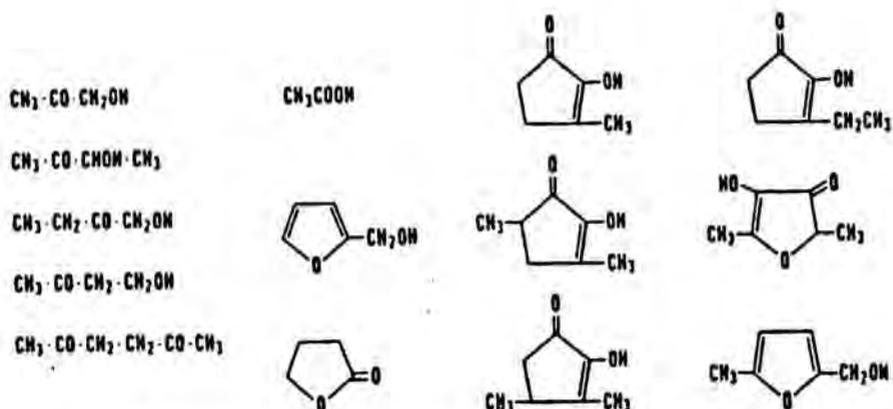
En esta etapa hay producción de colores amarillos ligeros y aromas. Comprende las etapas siguientes:

- 3) **Deshidratación de azúcares**, estableciéndose un equilibrio entre un grupo enol y su forma cetónica. Se formarán derivados del furfural, reductonas o dehidrereductonas.



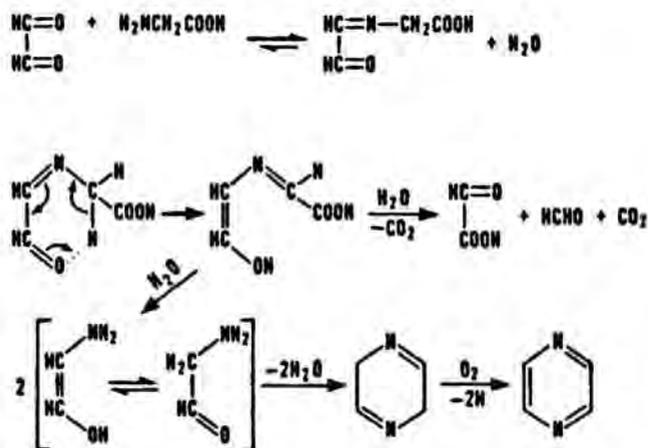
Deshidratación de un azúcar para dar 2-furaldehídos.

- 4) **Fragmentación de azúcares**, con formación de compuestos hidroxicarbonilos, glucoaldehídos, gliceraldehído, piruvaldehído, acetal, acetoína, diacetilo, etc.:



Productos resultantes de las reacciones de deshidratación alcalina y fragmentación de los azúcares.

5) **Degradación de Strecker**, en la que las dehidrorreductonas y aminoácidos forman aldehídos con un átomo de carbono menos que el aminoácido inicial y dióxido de carbono. Esta etapa es la principal formadora de compuestos carbonílicos con gran poder de reacción, lo que origina aromas desagradables.



Degradación de Stecker, reacciones y productos.

Aminoácido	Aldehído
Alanina	Acetaldehído
Glicina	Formaldehído
Isolucina	2-Metilbutanal
Leucina	Isovaleraldehído
Metionina	Metional
Serina	Glioxal
Fenilalanina	Fenilacetaldehído
Treonina	2-Hidroxiopropanal

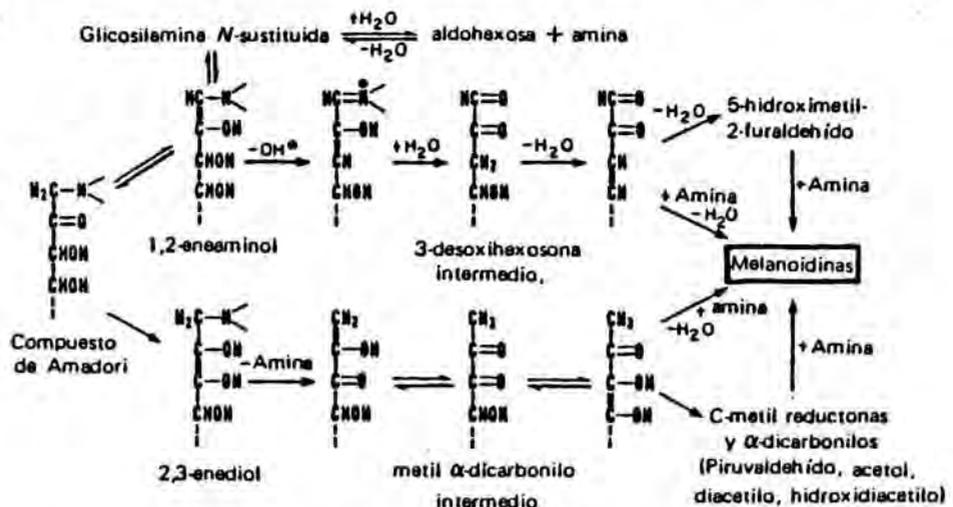
### C.- Fase final

6) **Condensación aldólica** de compuestos intermediarios formando pigmentos fluorescentes insaturados.

7) **Polimerización** de aldehídos con aminas.

En esta fase final tiene lugar la formación de melanoidinas; el mecanismo no es bien conocido pero implica la polimerización de muchos de los compuestos formados en anteriores etapas.

Según Fenema (1982) las reacciones tipo Maillard se pueden resumir en:



Reacciones de pardeamiento (Maillard) entre azúcar-amino: dos vías para la formación de melanoidinas y productos secundarios.

Cheftel (1981) indica que en los pardeamientos no enzimáticos

las pentosas son más activas que las hexosas, que las aldosas más que las cetosas y los monosacáridos reductores más que los disacáridos. Las glucosilaminas más reactivas son las que provienen de aminoácidos libres y, dentro de éstos, los más reactivos serán aquellos que tengan la función amino más lejana del grupo carbonilo. Sin embargo, la mayor o menor reactividad está en función de las condiciones del medio (pH, temperatura,...) así como de los demás reaccionantes.

En el cava, el pardeamiento de Maillard puede tener gran importancia por el hecho de que, durante el período que comprende la segunda fermentación y la maduración, las sustancias aminadas (aporte nitrogenado para las levaduras) están en contacto con el vino durante un mínimo de nueve meses. A este vino también se le adiciona un licor con una cantidad importante de azúcar, con lo cual existen los sustratos principales para que tenga lugar este pardeamiento.

Según Pavlenko y col. (1983) durante la conservación se observa un aumento en los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, lo que les hace suponer la posibilidad de una hidrólisis de los péptidos en aminoácidos, con lo que se aumenta su disponibilidad para dar reacciones relacionadas con el pardeamiento.

#### 4.2.2. - OXIDACION DEL ACIDO ASCORBICO

El ácido ascórbico es una sustancia enólica, inestable, que se oxida con facilidad siendo susceptible de degradación y dando lugar a modificaciones de los caracteres organolépticos.

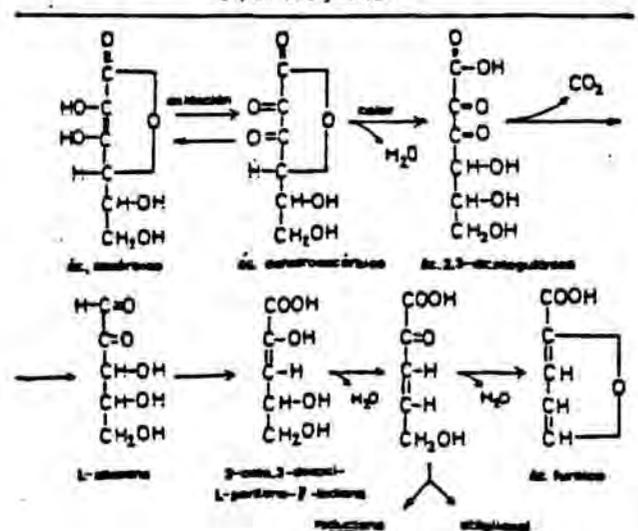
En el vino el contenido natural de ácido ascórbico es muy bajo, aunque puede estar presente en mayor cantidad por su uso en enología como conservador debido a su poder reductor.

Su oxidación se produce a pH ácido (2.3 - 5), al calentar y en presencia o ausencia de oxígeno, formándose el ácido dehidroascórbico que a su vez puede pasar a furfural liberando CO<sub>2</sub>. Figura 16.

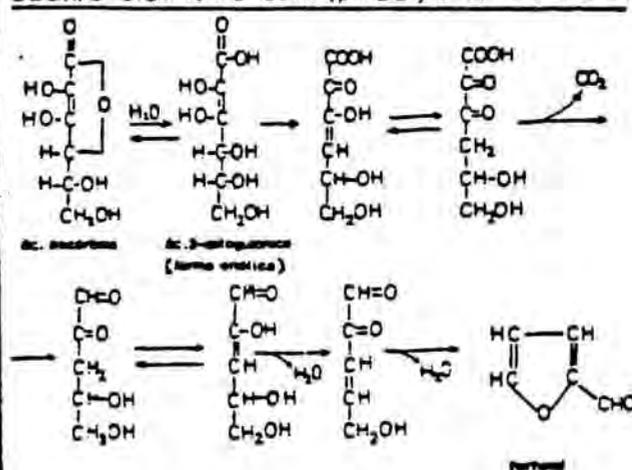
El furfural formado puede polimerizarse dando lugar a pigmentos e intervenir en otros mecanismos de pardeamiento.

Figura 16

DEGRADACION AEROBIA (en medio ácido con sulfúrico al 5 por 100 y a 100 °C)



DEGRADACION ANAEROBIA (pH 2.2 y a 38°C o 100°C)



#### 4.2.3. - CARAMELIZACION

La caramelización o pirólisis de los azúcares monosacáridos se da cuando se calientan por encima de su temperatura de fusión. Tienen como consecuencia reacciones de enolización, deshidratación y fragmentación, formándose derivados furánicos también llamados "aldehídos activos". Estos aldehídos pueden reaccionar a su vez con compuestos amínicos y sustancias relacionadas con otras reacciones de pardeamiento, como la reacción de Maillard.

El proceso se ve favorecido por la presencia de metales y ácidos carboxílicos y en general a pH básico, aunque también se da en condiciones ácidas. El medio alcalino favorece la enolización y fragmentación de los azúcares produciendo menos derivados furánicos y menos color. Por el contrario, en medio ácido se forman más furanos y menos fragmentación con lo que el sabor es menos intenso, pero el producto más coloreado (A. Mariné, 1981).

En la elaboración del cava no se suelen dar las temperaturas tan altas que requiere este proceso de caramelización de azúcares; sólo es posible encontrarlo en el caso de adicionar al vino base mostos concentrados elaborados por calentamiento (Chambas y col., 1982). En este caso se pueden formar una serie de compuestos heterocíclicos muy reactivos que darán pardeamientos y alteraciones organolépticas del producto.

#### 4.2.4. - OXIDACION DE POLIFENOLES

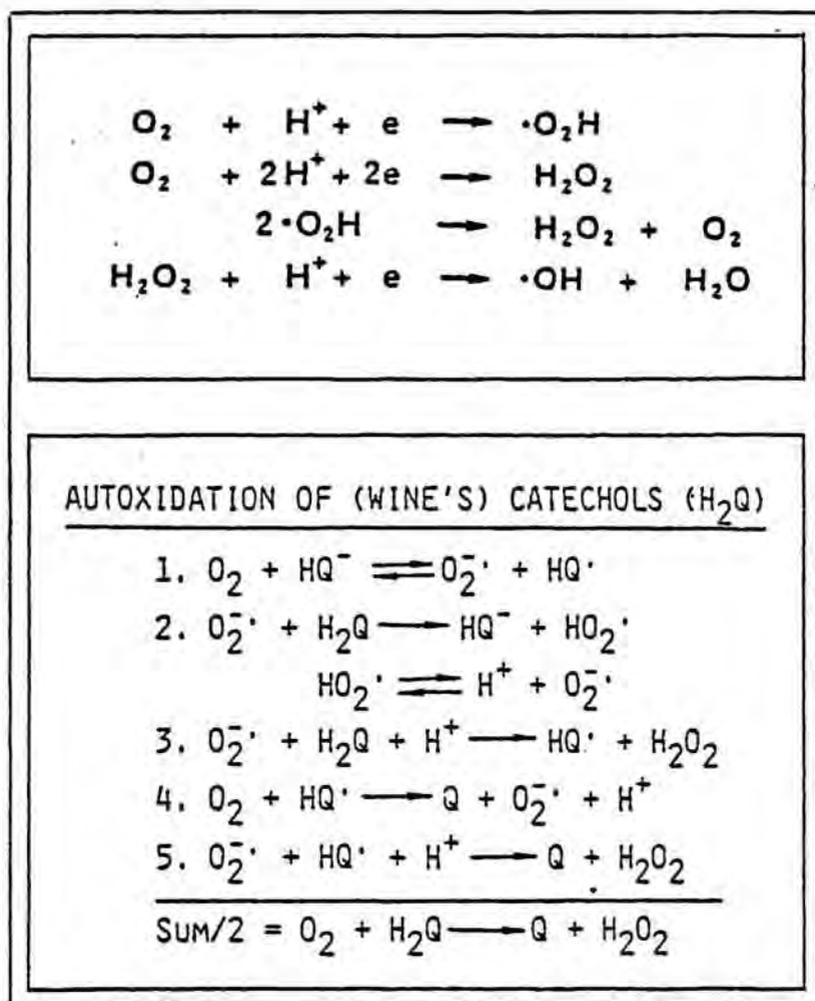
Aunque la principal importancia de los polifenoles en los pardeamientos es como sustrato de los procesos enzimáticos, pueden intervenir en algunos tipos de reacciones de naturaleza no enzimática.

Se ha demostrado que sólo con oxígeno, o en presencia de sustancias de carácter oxidante, pueden intervenir en procesos de pardeamiento (Cantarelli, 1967).

El mecanismo de degradación de estos compuestos ha sido muy discutido. Ribereau-Gayon y col. (1976) explica estas transformaciones al indicar que, en un vino no aireado existen una serie de sustancias, denominadas autooxidables, que en condiciones aeróbicas fijan el oxígeno, teniendo un poder de inducción mayor que el oxígeno molecular. Se les puede considerar oxidantes intermedios, o peróxidos inestables que inducen la oxidación de sustanciasceptoras de oxígeno.

Singleton y col. (1985) consideran que los primeros compuestos que sufren oxidación son los polifenoles, aunque no todos son igualmente oxidables. Como mecanismo de estas oxidaciones sugiere la acción de un agente con gran poder oxidante, como puede ser el peróxido de hidrógeno, y que será el desencadenante de todo el proceso de oxidación, que se halla

esquemmatizado en la figura:



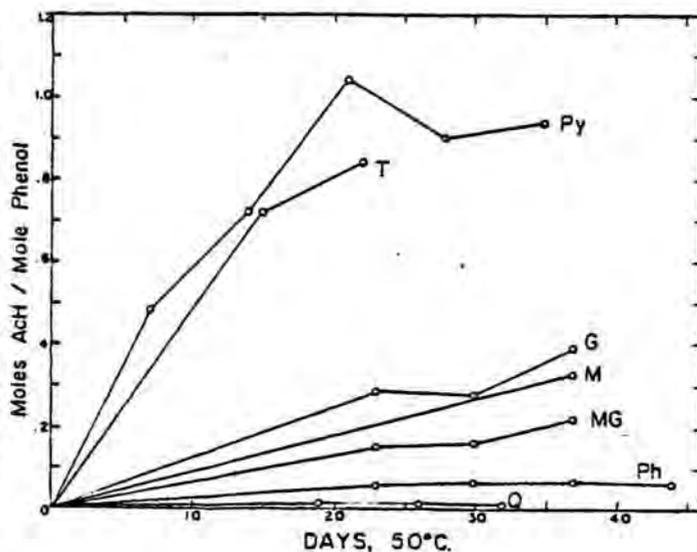
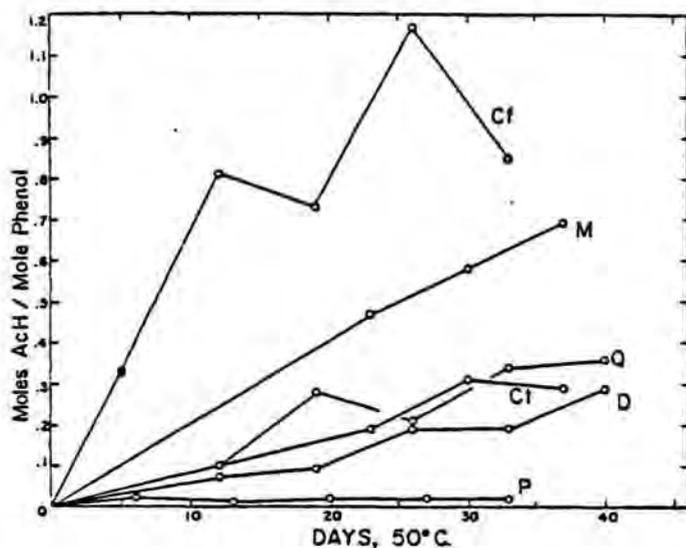
Somers (1983) expone las implicaciones de los procesos de oxidación de compuestos fenólicos en las propiedades organolépticas, resumiéndolas en:

- 1) Los mecanismos oxidativos forman peróxido de hidrógeno y radicales libres a partir de oxígeno molecular, así como protones por reacción de estos radicales libres. En estas

reacciones de transferencia de electrones tienen un importante papel los catalizadores metálicos (iones hierro, cobre y sus múltiples compuestos).

- 2) Los compuestos fenólicos son el sustrato base en estos procesos de oxidación, regenerando la forma reducida del catalizador metálico y oxidándose en quinonas. Así, otros compuestos pueden ser oxidados por reacción del radical libre en presencia del peróxido o atacados directamente por radicales hidroxilo.
  
- 3) Estas operaciones se bloquean por la presencia de  $\text{SO}_2$  libre, que se combina preferentemente con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el momento de su producción y enlentece la regeneración del catalizador.
  
- 4) Se encuentran acoplados numerosos sustratos secundarios de oxidación, como etanol y otros alcoholes, con lo que se producirán etanal y otros aldehídos. A este respecto, Singleton (1974) indica que, según la composición polifenólica y su oxidación, la formación de acetaldehído acoplada es distinta. Según se muestra en la figura, los mayores responsables en la conversión de alcoholes en aldehídos parecen ser, entre otros, pirogalol, ácido 2,3,4,-trihidroxibenzoico, ácido cafeico y 4-metilcatecol;

asimismo, es de reseñar la influencia que, en estas reacciones de oxidación, presentan los metales y el ácido ascórbico.



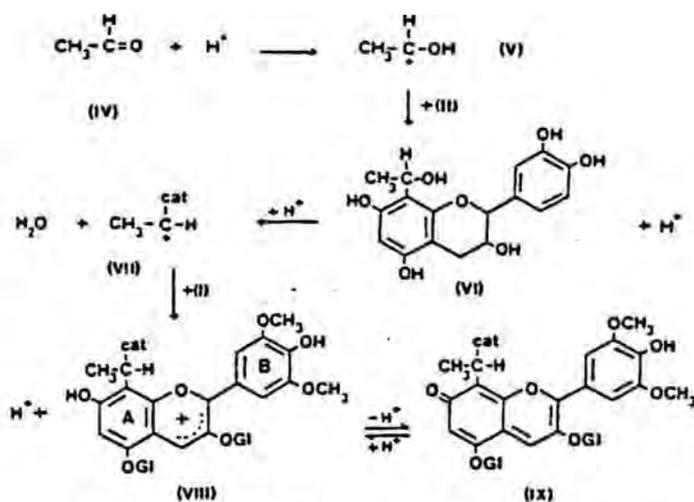
Producción de acetaldehído por oxidación de un vino patrón que contiene  $1,586 \times 10^{-3}M$  ácido cafeico(CF), 4-metilcatecol(M), quercitina(Q), catequina(Ct), dihidroquercetina(D), ácido protocatéquico(P), pirogalol (Py), ácido gálico (G), miricetina (M), metilgalato (MG), fluoroglucinol (Ph), ácido quínico (Q) y ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico.

- 5) La velocidad de estas reacciones es muy lenta, pero se aceleran en contacto con la luz y con la temperatura de conservación; incluso se dan en aquellas condiciones en las que el oxígeno está ausente.

Por todo ello, muchos autores mantienen la teoría de que, en el vino, las reacciones de los fenoles con el oxígeno no sólo dan origen a productos de naturaleza quinónica y el consiguiente pardeamiento enzimático, sino que originan una serie de compuestos que pueden tener una incidencia directa sobre la estabilidad, al

desencadenar un complejo proceso de óxido-reducción en el que se ven implicadas numerosas y diversas sustancias.

A este respecto, es de destacar, las reacciones que pueden sufrir los compuestos fenólicos en presencia de glucósidos y acetaldehído (Timberlake y Bridle, 1976). Este fenómeno es observado en vino tinto, con un mayor contenido polifenólico y elevada concentración de etanal debido a un envejecimiento prolongado. En la figura se esquematizan las reacciones implicadas:



Reacción del acetaldehído (IV) con (+)- catequina (II) y My 3,5-diglucósido

#### 4.3. - DETERMINACION DEL COLOR

Las modificaciones del color, como consecuencia de los pardeamientos, que tienen lugar en los vinos blancos y cavas, son siempre el resultado de fenómenos complejos que no se pueden desligar de las modificaciones que ocurren en la fracción aromática. Es decir, es una de las características con más peso a la hora de definir la calidad de un vino, al ser la primera impresión que se percibe al realizar un examen organoléptico, y un componente decisivo por parte del consumidor a la hora de aceptar o rechazar un producto.

La evolución de este parámetro a lo largo de la elaboración y envejecimiento del cava, cobra importancia en el momento de apreciar la influencia de los tratamientos y técnicas enológicas, ya que el color de los vinos no es debido únicamente a la materia colorante (principalmente polifenoles), sino a un conjunto de compuestos coloreados formados a partir de una serie de reacciones que empiezan desde la recogida de la uva.

Sin embargo, la caracterización del color no deja de ser subjetiva y por ello Chamberlin (1980) indica que se pueden dar dos enfoques distintos a la hora de establecer la medición del color:

- 1- Comparación visual con estándares aceptados como referencia: tal es el caso del método de la A.O.A.C. (Association of Official Chemists, 1984) que mide la transmitancia a 430 nm y toma como referencia una solución de dicromato potásico.
- 2- Medida instrumental, en términos relativos, de algunos componentes del color a distintas longitudes de onda. Este método permite obtener lo que se denomina "huella dactilar" y comparar el resultado global observado con una imagen hipotética estandarizada, en la que se hallan definidas las condiciones de iluminación y observación.

La técnica espectrofotométrica se ha efectuado más frecuentemente en vinos tintos que en blancos, y no existe un criterio definido para su interpretación. En general, los compuestos fenólicos presentan máximos de absorción a ciertas longitudes de onda, pero resulta difícil su correlación con la evolución del color y con fenómenos de pardeamiento, al margen de la elevada cantidad de compuestos que pueden interferir.

Entre los métodos oficiales de la O.I.V. (Oficina Internacional de la Vinya y el Vino) indica que "el color de los vinos, se determina por transparencia como se percibe por la vista, pero por un procedimiento independiente de la apreciación personal, valiéndose de métodos espectrofotométricos triestimulares de ordenadas seleccionadas, fundado en el sistema de la Comisión

Internationale d'Eclairage (C.I.E.), con relación a la luz producida por un cielo nublado (fuente C)". Se basa en medir las transmitancias a cuatro longitudes de onda (625, 550, 495y 445 nm), previa clarificación del vino, y calcular las coordenadas (x,y) del punto representativo del color del vino en el diagrama tricromático de la C.I.E.:

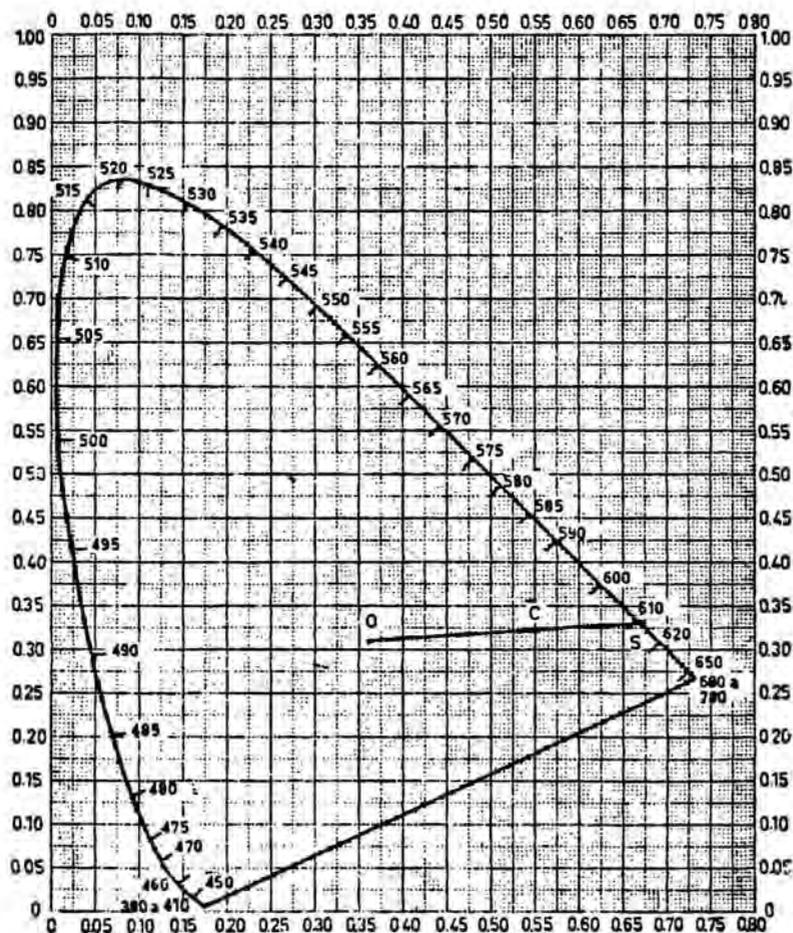


Diagrama de cromaticidad de la C.I.E.

El cálculo de las coordenadas (x,y) se calcula:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \qquad y = \frac{Y}{X+Y+Z}$$

$$X = 0.42 T_{625} + 0.35 T_{550} + 0.21 T_{445}$$

$$Y = 0.20 T_{625} + 0.63 T_{550} + 0.17 T_{495}$$

$$Z = 0.24 T_{495} + 0.94 T_{445}$$

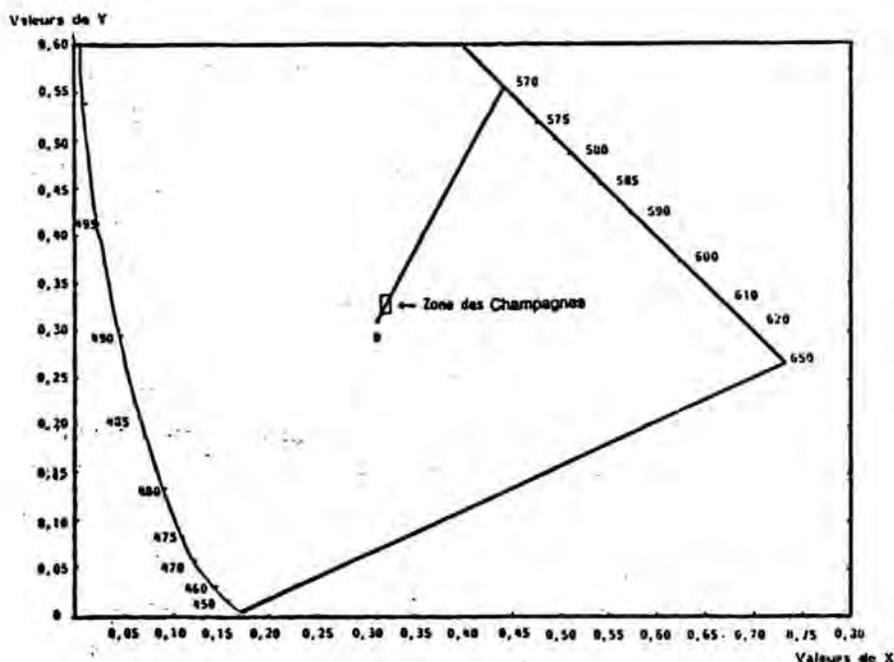
T = transmitancia

Los valores X, Y, Z representan las proporciones de colores rojos, verdes y azules que dan por mezcla el color del vino. El valor de Y expresado en porcentaje, se denomina Luminosidad relativa. Asimismo, mediante el diagrama de cromaticidad de la C.I.E. (figura 14) se puede calcular la longitud de onda dominante (en el diagrama, suponiendo que la muestra tuviera unas coordenadas C, esta longitud de onda dominante sería el punto S) y la pureza expresada en porcentaje que viene determinada por la relación:

$$100 \times \frac{\text{Distancia del punto C al punto O}}{\text{Distancia del punto O al punto S}}$$

Siendo O las coordenadas correspondientes al color blanco.

Sin embargo, este método no es específico para los vinos blancos, ni como en nuestro caso, para los vinos espumosos, cuyo color es relativamente homogéneo y no representa más que una pequeña zona en los diagramas de cromaticidad (Gustin y col., 1986), según se observa en la figura:



Por ello, frente a otros métodos más complicados y costosos, como la transreflectometría (Little y col., 1971), es de destacar el estudio realizado por Gustin y col. (1986) sobre el color de los champagnes, su medida e interpretación, a fin de definir la variación de color entre estos vinos y la evolución de ese parámetro a lo largo de su elaboración y envejecimiento.

Estos autores estudian un método simplificado, usado clásicamente en enología, en el que el color se determina por la medida de las densidades ópticas, en cubeta de 1 cm, a 420 y 520 nm, longitudes de onda que corresponden a un mínimo y un máximo, respectivamente, en los vinos tintos. De hecho, la longitud de onda 420 nm correspondería a la zona de color aparente de los amarillo-verdosos y la de 520 nm a la zona de los rojos.

Estas dos densidades ópticas, permiten calcular dos índices del color: la Intensidad Colorante y la Tonalidad; las cuales se expresan:

$$\text{Intensidad} = A_{420} - A_{520}$$

$$\text{Tonalidad} = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

A = absorbancia

Paralelamente, por medio de degustadores, definen cinco categorías de color para estos vinos espumosos:

- dorado
- dorado verdoso
- amarillo dorado
- amarillo ámbar
- amarillo oxidado-rosado

y representan en tres gráficas distintas diferentes muestras; en una gráfica se representan las muestras en relación a sus densidades ópticas (D.O.) a 420 y 520 nm; en otra, según sus valores de tonalidad e intensidad colorante; y en una tercera, de acuerdo a sus coordenadas triestimulares x,y . Llegan a la conclusión que, conforme a las opiniones de los catadores, que van desde los vinos más claros a los más oscuros (vinos oxidados) el plan de coordenadas triestimulares es el que presenta una mayor correlación.

Es de destacar que, según criterios, el grado de pardeamiento se puede leer a 380-420 nm midiendo el coeficiente de extinción, y que hay autores que al referirse a fenómenos oxidativos realizan lecturas a longitudes de onda más elevadas, aproximadamente a 520 nm, zonas donde absorben otros compuestos originados en los pardeamientos oxidativos, como las melanoidinas (Simpson, 1977).

#### 4.4. - ENSAYOS DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO

Estos ensayos son también denominados de estabilidad o de resistencia. Han sido empleados por numerosos autores a fin de estudiar los procesos degenerativos de los vinos, ya que indican la capacidad que presenta una muestra a sufrir modificaciones cuando se somete a condiciones forzadas.

El principal inconveniente que presentan estos estudios es la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos a las condiciones reales a las que se ven sometidos los vinos. A pesar de esto, son indicativos de las características del producto de partida y orientativos acerca de los procesos degenerativos que en ellos tendrán lugar. Con un envejecimiento en condiciones normales sería preciso un tiempo de control de la muestra excesivamente largo, ya que en la mayoría de los casos las reacciones que tienen lugar son lentas y sus consecuencias, por tanto, sólo serían apreciables tras un largo período.

Sin embargo, dada la complejidad de los distintos tipos de reacciones que pueden tener lugar en estas bebidas fermentadas, en los ensayos acelerados, se debe distinguir la etapa en que se realiza. Estos variarán según se trate de uva, mosto, vino o producto acabado), ya que los sustratos y las condiciones serán distintas. También, tendrá importancia la medición de los distintos parámetros según la finalidad del ensayo.

La bibliografía consultada se refiere, principalmente, a estudios realizados para observar la susceptibilidad de alteración del vino frente a procesos oxidativos, más concretamente pardeamientos y maderización. Por esto, generalmente, el control de la oxidación se basa en la evolución del color, al ser la primera característica que se encuentra modificada, y en los factores que pueden influir en el mismo. En la mayoría de los casos, esta evolución del color se sigue mediante la lectura espectrofotométrica a 420 nm, por ser ésta la longitud de onda considerada por muchos autores como indicativa del pardeamiento global.

Berg (1953) estudia la capacidad de pardeamiento de distintas variedades de uva. Para ello refiere sus resultados a los incrementos de absorbancia a 420 nm y concluye que un incremento mayor a 0,330 hace el producto inaceptable. Estos resultados los relaciona con la importancia de los factores fitotécnicos y climáticos.

En el caso de los mostos, los factores determinantes del pardeamiento son los sustratos polifenólicos, los enzimas y el contenido en oxígeno. En este caso, los ensayos de estabilidad se realizan adicionando estos sustratos, forzando la aireación así como el prensado.

Son de destacar aquellos ensayos de pardeamiento, que en

teoría, permiten distinguir entre las modificaciones de origen enzimático y no enzimático. Se considera que estos últimos tienen lugar en ausencia de oxígeno atmosférico, por lo que, principalmente, se opera conservando las muestras bajo atmósfera inerte de nitrógeno (Singleton, 1979; Simpson, 1977; Fernández, 1988).

Otros métodos, usados en la oxidación acelerada, emplean agentes químicos oxidantes, como el peróxido de hidrógeno (Simpson, 1977), o bien acidificación bajo reflujo de la muestra con ácido clorhídrico 2N durante 1,5 horas (Díaz y col., 1983; Meilgaard, 1979).

Asimismo, se puede operar con el mismo vino base, adicionando en exceso cualquiera de las sustancias que se crean influyentes de su degradación. Cantarelli (1967) comprueba así los efectos de proteínas, aminoácidos, clarificantes, conservadores, azúcares, compuestos fenólicos, etc.

Con este objetivo, también se utilizan soluciones modelo que contienen los sustratos sospechosos del pardeamiento, más concretamente de los pardeamientos no enzimáticos. Burton y col. (1963) adicionan patrones de distintos compuestos carbonílicos en solución hidroalcohólica; tras su conservación a 50°C, concluyen que los pardeamientos más acusados se consiguen en las soluciones de carbonilos alfa-beta-insaturados, justificándolo, quizás, en su

elevada reactividad (tablas 17 A,B ).

*Visual assessment of colour development on incubation at 50° of various carbonyl compounds in a glucose/glycine system*

(0.1 mmole of carbonyl compound incubated with 100 mg. of glycine in 1 ml. of water + 2 ml. of ethanol)

Carbonyl compound	Duration of incubation				
	20 h.	90 h.	6 days	11 days	18 days
Butyraldehyde	v.v. pale straw	v.v. pale straw	pale straw	straw	l. brown
Crotonaldehyde	l. brown	red-brown	red-brown	red-brown	red-brown
2-Ethylhexanal	—	—	v. pale straw	straw	l. brown
2-Ethyl-2-hexenal	—	v.v. pale straw	v. pale straw	straw	l. brown
Capronaldehyde	—	—	v.v. pale straw	straw	l. brown
2-Hexenal	deep golden yellow	l. brown	l. brown	deep brown	deep brown
Diethyl ketone	—	—	v.v. pale straw	straw	l. brown
Ethyl vinyl ketone	—	v.v. pale straw	pale straw	straw	l. brown
Methyl isobutyl ketone	—	—	v.v. pale straw	straw	brown
Mesityl oxide	—	—	v.v. pale straw	straw	brown
Pelargonic aldehyde	—	—	v.v. pale straw	straw	l. brown
2-Nonenal	yellow	golden yellow	deep golden yellow	l. brown	deep brown
Hydrocinnamic aldehyde	—	—	v.v. pale straw	pale yellow	golden yellow
Cinnamic aldehyde	pale straw	l. brown	deep brown	red-brown	deep red-brown
Methyl ethyl ketone	—	—	v.v. pale straw	pale yellow	golden yellow
Methyl vinyl ketone	—	—	v.v. pale straw	pale yellow	golden yellow
2-n-Butylcyclohexanone	slight pink	—	v.v. pale straw	pale yellow	golden yellow
2-n-Butylidenecyclohexanone	—	v.v. pale straw	straw	yellow	golden yellow
Isobutyraldehyde*	—	—	—	pale yellow	l. brown
Tiglic aldehyde	—	—	—	yellow	golden yellow
Cyclohexanone	—	—	—	golden yellow	l. brown
Cyclohexenone	—	—	v. pale straw	l. brown	brown
H.M.F.	v.v. pale straw	straw	deep straw	l. brown	deep brown
Furfural	straw	golden yellow	deep golden yellow	deep brown	deep brown
2-Furylacrolein	deep golden yellow	red-brown	red-brown	dark red-brown	dark red-brown
2-Furfurylideneacetone	yellow	l. brown	l. brown	l. brown	l. brown
3-Benzylidene-2,4-pentanedione	v.v. pale straw	v.v. pale straw	v. pale straw	v. pale straw	deep straw
Citral	deep golden yellow	brown	brown	deep brown	deep brown
H.M.F. × 10	yellow	deep brown	red-brown	cherry red	dark cherry red
Glucose/glycine control	—	—	—	pale straw	deep straw

\* C<sub>6</sub> analogue not readily available      l = light      v = very      H.M.F. = hydroxymethylfurfural

TABLE 17 (Burton y col, 1968)

Visual assessment of colour development on incubation at 50° of various carbonyl compounds with glycine  
(0.1 mmole of carbonyl compound incubated with 100 mg. of glucose and 100 mg. of glycine in  
1 ml. of water + 2 ml. of ethanol)

Carbonyl compound	Duration of incubation				
	20 h.	90 h.	6 days	11 days	18 days
Butyraldehyde	v.v. pale straw	v. pale straw	pale straw	pale straw	pale straw
Crotonaldehyde	l. brown	brown	deep brown	dark brown	dark brown
2-Ethylhexanal	—	—	—	—	v.v. pale straw
2-Ethyl-2-hexenal	—	—	—	v.v. pale straw	pale straw
Capronaldehyde	—	—	—	—	v.v. pale straw
2-Hexenal	deep golden yellow	l. brown	l. brown	brown	brown
Diethyl ketone	—	—	—	—	—
Ethyl vinyl ketone	—	—	—	—	v.v. pale straw
Methyl isobutyl ketone	—	—	—	—	—
Mesityl oxide	—	—	—	—	—
Pelargonic aldehyde	—	—	—	v.v. pale straw	v.v. pale straw
2-Nonenal	pale yellow	yellow	yellow	yellow	yellow
Hydrocinnamic aldehyde	—	—	—	v.v. pale straw	v. pale straw
Cinnamic aldehyde	pale straw	l. brown	brown	deep brown	deep brown
Methyl ethyl ketone	—	—	—	—	—
Methyl vinyl ketone	—	—	—	v.v. pale straw	deep straw
2-n-Butylcyclohexanone	—	—	—	—	straw
2-n-Butylidenecyclohexanone	—	v. pale straw	pale straw	straw	pale yellow
Isobutyraldehyde*	—	—	—	v.v. pale straw	straw
Tiglic aldehyde	—	—	—	v. pale straw	straw
Cyclohexanone	—	—	—	—	v.v. pale straw
2-Cyclohexenone	—	—	—	pale straw	l. brown
H.M.F.	v.v. pale straw	straw	deep straw	golden yellow	l. brown
Furfural	straw	golden yellow	golden yellow	l. brown	deep brown
2-Furylacrolein	deep golden yellow	red-brown	cherry red	v. dark cherry red	v.v. dark brown
2-Furfurylideneacetone	yellow	golden yellow	golden yellow	golden yellow	l. brown
3-Benzylidene-2,4-pentanedione	v.v. pale straw	v.v. pale straw	v. pale straw	v. pale straw	yellow
Citral	deep golden yellow	brown	brown	brown	deep brown
H.M.F. × 10	deep golden yellow	brown	deep brown	deep red-brown	cherry red
Glucose/glycine control	—	—	—	pale straw	l. brown

\* C<sub>5</sub> analogue not readily available    l. = light    v = very    H.M.F. = hydroxymethylfurfural

TABLA 17 (Burton y col., 1968)

El factor, temperatura de conservación, varía según los autores; Toribio y Lozano (1984) indican que el deterioro del color observado en el zumo de manzana, durante su almacenamiento a distintas concentraciones, tiene una dependencia con la temperatura del tipo exponencial de Arrhenius.

Castino y col. (1981) exponen que los ensayos realizados a temperaturas superiores a 45°C no presentan buena correlación con las condiciones normales. Sin embargo, otros, como Singleton y col. (1976) señalan que trabajando a 50°C se pueden analizar fenómenos oxidativos no enzimáticos, puesto que a esta temperatura se inhibe la actividad enzimática.

Simpson (1977) manifiesta que las desviaciones del color de los vinos blancos, que son almacenados durante largos períodos de tiempo, se desvían hacia tonalidades rosadas; este fenómeno lo denomina "pinking" y se trata de un proceso oxidativo, cuya caracterización la realiza mediante la lectura espectrofotométrica a 500 nm.

Singleton y col. (1979), en cambio, distinguen entre "pinking" y pardeamiento, para lo que realiza la medición a 520 nm (zona de rojos) y a 420 (zona de amarillos) respectivamente. En función de los resultados, sugiere que el "pinking" y el pardeamiento son fenómenos competitivos durante la oxidación. La

formación de tonalidades rosadas sólo puede resultar un problema en los vinos conservados en tanques de acero inoxidable y muy protegidos de la aireación. El pardeamiento, en cambio, es un fenómeno frecuente que se incrementa con la exposición al aire. Asimismo, comenta la importancia en estos fenómenos del contenido polifenólico (principalmente flavonoides).

Estos ensayos de envejecimiento acelerado, realizados para predecir la estabilidad, son difíciles de evaluar pues están en función de la tecnología del vino. En el caso especial del cava, lo que cobra importancia son los licores de expedición, ya que con su adición se pueden introducir componentes como azúcares, conservantes, mostos concentrados, etc., y la consiguiente penetración de oxígeno al realizar la operación de degüelle (Fernández, 1988).

## **5. - ESTUDIO DE LOS METODOS ANALITICOS DEL AROMA**

El análisis del aroma del vino puede abordarse de forma global, ya sea por la evaluación sensorial directa de la calidad del mismo o por la determinación de algún parámetro físico-químico que se considere relacionado con dicha calidad; o bien abordarse de forma individualizada mediante la identificación y cuantificación de sustancias químicas volátiles responsables del "bouquet".

La mayoría de los trabajos dedicados a la fracción volátil, proporcionan una información global sobre la misma. Aunque esta información puede no estar relacionada directamente con la calidad del aroma, resulta útil si se usa adecuadamente para ciertos objetivos concretos, como puede ser el estudio comparativo del contenido total de sustancias volátiles de distintos vinos o la comparación de los efectos producidos por diferentes procesos tecnológicos a que son sometidos dichos vinos.

Por otra parte, conocer la presencia y cantidad de una determinada sustancia en el vino no tendría interés, si no es

posible apreciar su participación sensorial en el aroma global. El estudio químico presenta la ventaja de evitar la subjetividad de las evaluaciones organolépticas, sin embargo, debe considerarse la importancia de los umbrales de percepción. Por otra parte, se ha de tener en cuenta que los compuestos volátiles del vino constituyen un conjunto y el análisis químico debe estar relacionado con el análisis sensorial del aroma.

El estudio analítico de la fracción aromática comporta diferentes etapas:

- 1) Establecer las técnicas de preparación de las muestras. Comprende los métodos de concentración y extracción de los constituyentes del aroma de vinos y mostos.
- 2) Definir los métodos de separación e identificación de los diferentes constituyentes de estos aromas.
- 3) Establecer las técnicas para la cuantificación de estos constituyentes.

Las condiciones que debe reunir un proceso de extracción dependen del objeto que se persiga con el análisis. Así, en los estudios cualitativos se hace necesario conseguir un extracto aromático con alto grado de concentración, para poder detectar los componentes minoritarios. En este caso, no resulta importante que el extracto concentrado final guarde proporción con la muestra de partida. Por el contrario, cuando lo que se pretende es

cuantificar los volátiles extraídos, resulta necesario conocer el rendimiento de la extracción para cada uno de los componentes. Por ello los trabajos cuantitativos son los más escasos, así como los estudios comparativos entre las técnicas de extracción-concentración que ayudarían a decidir el método más adecuado para una correcta cuantificación.

#### 5.1. - MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CONCENTRACION DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DEL VINO

La concentración de la fracción volátil es necesaria, la mayor parte de las veces debido a que muchas de las sustancias aromáticas presentes en el vino se hallan en concentraciones del orden de mg/ml y su analítica se puede ver interferida por los compuestos mayoritarios, como son principalmente etanol y agua.

A continuación, se indicarán las distintas técnicas y las ventajas e inconvenientes en su aplicación a la fracción volátil del vino.

##### 5.1.1. - INYECCION DIRECTA

La inyección directa no es propiamente dicha una técnica de

extracción, pues como su nombre indica, consiste en la inyección de la muestra en una columna cromatográfica sin ninguna manipulación precedente.

Este método presenta la dificultad de introducir componentes poco o nada volátiles, tales como azúcares y sales minerales. Estas sustancias rápidamente deterioran el sistema de inyección y pueden ser responsables de anomalías.

La extrema complejidad de la composición de los vinos en sustancias aromáticas (muchas de ellas están en concentraciones de 1 mg/l) y la elevada proporción en que se encuentran el etanol y el agua, dificultan aún más esta técnica.

Sin embargo, la actual sensibilidad de los detectores de ionización de llama en la cromatografía gaseosa y la posibilidad del empleo de columnas con gran poder de resolución y suficientemente estables, permite separar y cuantificar los compuestos volátiles más abundantes en vinos y aguardientes. Por tanto, esta técnica puede ser útil en la cuantificación de los compuestos mayoritarios más volátiles, ya que ofrece gran ventaja sobre otras técnicas de extracción que sufren pérdidas en la manipulación.

Según Bertrand (1968) se puede aplicar en el vino, para la determinación de sustancias hasta una concentración límite de 10

mg/l. Este autor ha separado y cuantificado, por inyección de 1 microlitro de vino en un cromatógrafo de gases, acetato de etilo, metanol, propanol-1, isobutanol, metil-2-butanol-1, 2-fenil etanol y alcoholes superiores.

Boidron y col. (1969) aplican la técnica en el estudio de los componentes del aroma de los vinos espumosos. Sin embargo, donde ha encontrado un mayor campo de aplicación es en los aguardientes y destilados vínicos (Ribereau-Gayon, 1971). Roux (1971) la aplica para determinar alcoholes de fusel en el vino y aguardientes, usando como patrón interno n-butanol, que aumenta la seguridad y precisión de la técnica. Si la muestra contiene extracto seco es oportuna una destilación a volumen constante antes de la inyección. El inconveniente es la limitación de la técnica a muestras simples y a la determinación de componentes específicos.

#### 5.1.2. - ESPACIO DE CABEZA

En sentido estricto, la técnica del espacio de cabeza para el posterior análisis por cromatografía gaseosa, implica solamente la inyección directa en el cromatógrafo de la mezcla de vapores en equilibrio con una muestra en un sistema cerrado.

Las ventajas de esta técnica (espacio de cabeza directo) son notables en comparación con otras, ya que exige una mínima

manipulación de la muestra. Por otro lado, la no utilización de disolventes elimina el riesgo de formación de artefactos y pérdida de componentes.

La concentración de las distintas sustancias en el espacio de cabeza es proporcional a la presión de vapor de las mismas. Este método únicamente será efectivo cuando los compuestos volátiles del aroma tengan una presión de vapor suficientemente alta ya que, sino, tan sólo se determinarán los más volátiles y abundantes. La sensibilidad y repetibilidad puede mejorar mucho si se combina con otros procesos, como destilación, concentración o extracción con ayuda de un gas inerte ("espacio de cabeza dinámico"), lo que permite un amplio abanico de posibilidades para el análisis.

Este sistema, como el resto de los métodos, presenta ciertos inconvenientes. Merece especial atención el factor temperatura. cuanto más elevada sea la temperatura de equilibrio más componentes integrarán el espacio de cabeza, sin embargo, la composición del mismo podrá verse notablemente modificada en función de este parámetro. Por ello, se debe operar a una temperatura determinada y controlada a fin de obtener resultados reproductivos. Kepner y col. (1963) para la cuantificación emplean un patrón interno que entra en la composición del espacio de cabeza.

Este es un método seductor "a priori", pues permite el

análisis exclusivo de las sustancias responsables del aroma. Sin embargo, como señala Bertrand (1968), la técnica del espacio de cabeza directo no da resultados superiores a los obtenidos por inyección directa. Además, por una parte los cromatógrafos detectan los productos de manera distinta al olfato y, por otra, tienen una aplicación limitada a causa del problema de trabajar a una sensibilidad atenuada. Las concentraciones de los constituyentes volátiles son muy débiles y, en estas condiciones, pueden no ser detectadas. Sin embargo, aporta la ventaja de su fácil automatización, pero sólo es aplicable a compuestos de bajo punto de ebullición.

### 5.1.3. - ESPACIO DE CABEZA DINAMICO O "STRIPPING"

Esta técnica, combinada o no con el vacío, puede servir para extraer las sustancias volátiles de un líquido por borboteo o de un sólido por arrastre con gas, desplazando la atmósfera que las rodea o "Head-Space". Permite la extracción de todas las partes de la uva, pulpa y película (Bayonove y Cordonier, 1970), respetando al máximo los constituyentes del aroma y obteniendo extractos que reproducen fielmente el producto inicial.

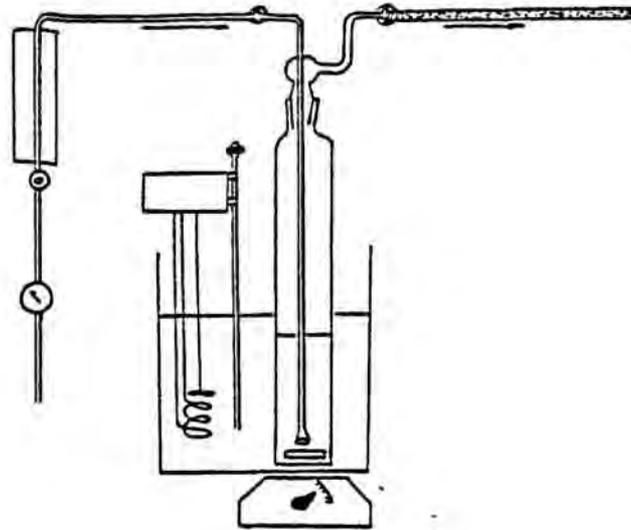
Este arrastre, normalmente realizado con  $H_2$  ó  $CO_2$ , es también un recurso interesante para concentrar los componentes volátiles minoritarios de una muestra líquida. Se debe considerar como una variante del espacio de cabeza ya que, el equilibrio que se

establece entre la fase líquida y la de vapor, se ve desplazado al arrastrar la atmósfera saturada mediante el gas. Por ello, se recurre al "stripping" cuando el análisis del espacio de cabeza llega al límite de sensibilidad, o bien, cuando se requiere la utilización de trampas selectivas con la finalidad de conseguir una eliminación primaria de interferencias.

También es un procedimiento más simple y rápido que la extracción por disolventes, pues obtienen cromatogramas más depurados al principio de la separación, y con un menor tiempo de análisis. Sin embargo, las sustancias aromáticas pueden no ser extraídas en su totalidad si no se realiza el arrastre durante el tiempo suficiente; otro inconveniente de esta técnica es que, el arrastre pueda extraer excesivo etanol y acetato de etilo, que podrían interferir en la determinación de otras sustancias.

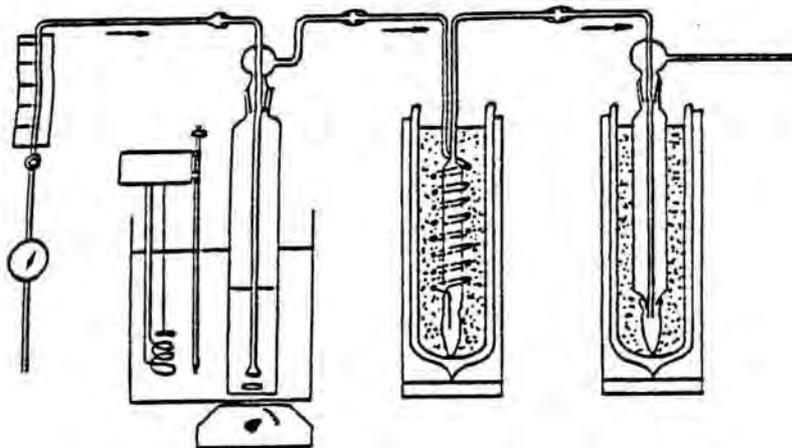
El método de extracción por "stripping" permite la retención del extracto por distintos medios: en trampas frías, rellenos microporosos (Tenax, Porapak...), o soluciones de retención específicas para cada grupo químico de sustancias como en nuestro caso, son los compuestos carbonílicos. En la figura 18 se esquematizan dos posibles dispositivos de condensación de las sustancias volátiles arrastradas con gas inerte y en los apartados siguientes se expondrá en que consiste cada uno de ellos.

Figura 18



Arrastre con gas inerte y retención en una trampa de polímeros porosos

(Gassiot y col., 1983).



Arrastre con gas inerte y uso de trampas frías

Bertrand (1969)

#### 5.1.3.1.- RETENCION EN TRAMPAS CRIOGENICAS

Consiste en que las sustancias arrastradas por el gas vector son condensadas en recipientes refrigerados por las mezclas siguientes:

- agua + hielo (0°C)
- hielo carbónico + acetona (-80°C)
- nitrógeno líquido (-196°C)

El nivel de recuperación más elevado se obtiene combinando el "stripping" gaseoso con el vacío, aunque en el caso de un trabajo sistemático conlleva una falta de reproductibilidad en el flujo de gas (normalmente N<sub>2</sub>). Así, Bertrand (1968) pone a punto un sistema que permite extraer por una corriente de nitrógeno, bajo vacío parcial, las sustancias volátiles contenidas en el zumo de frutas y bebidas fermentadas. Estas sustancias son recogidas en trampas criogénicas e inyectadas directamente en un cromatógrafo de gases. La técnica exacta es aplicada al vino y su esquema se recoge en la figura 19. Escoge este método de extracción porque le permite estudiar solamente los componentes más volátiles de forma rápida y, en ese caso, reproducible por lo que se adapta a un estudio cuantitativo.

#### 5.1.3.2.- RETENCION EN TRAMPAS ADSORTIBAS

Su utilización es frecuente para la extracción de compuestos

volátiles en vinos; bien sea usando, tras el "stripping", un adsorbente, o bien empleando precolumnas acopladas directamente a un cromatógrafo de gases. Su eficacia en este terreno se ve aumentada debido a su poca afinidad por el agua. La desorción se realiza mediante disolventes o en el caso de precolumnas cromatográficas mediante elevación de la temperatura.

Entre los adsorbentes más utilizados se encuentran varios polímeros orgánicos microporosos: Tenax G.C. y Porapak Q., y carbón activo de los tipos Ultrasorb ScII y Carbopack C.

Gold y col. (1978) defiende el uso de adsorbentes sólidos frente al uso de adsorbentes líquidos ya que interesa una rápida transferencia de masa y una buena eficacia en la adsorción, por lo que parece que el uso de mallas moleculares de poro ancho es lo más adecuado, aunque presentan el inconveniente de que su retención y estabilidad durante el almacenamiento, es difícil de conseguir.

Niosh (1977) recomienda, para la recolección de vapores orgánicos, el uso de tubos adsorbentes de carbón vegetal y su posterior análisis por cromatografía gaseosa. El uso de carbón vegetal es debido a su carácter adsorbente universal y a su bajo coste. Sin embargo, el método de desorción del carbón vegetal posee algunos inconvenientes, que son más significativos cuando se trata de los compuestos más polares, y fundamentalmente cuando

están presentes a niveles del orden de 1 mg/l. Además la humedad puede disminuir el grado de adsorción de los vapores y la liberación de los componentes retenidos se sitúa generalmente por debajo del 80%.

Díaz (1983) señala que las trampas adsorbidas de polímeros porosos permiten cierta selectividad según el polímero escogido. El Tenax G.C. es destacado por Gassiot y col. (1983) por su mayor estabilidad térmica, lo que evita la introducción de artefactos a la vez que no disminuye su capacidad de retención frente a otros polímeros porosos.

Por este procedimiento se obtienen extractos que se pueden inyectar directamente en un cromatógrafo. Presenta la ventaja de que extrae la fracción volátil con bastante representatividad sin que aparezcan disolventes enmascaradores. Así, por esta técnica de adsorción-desorción se han podido obtener cromatogramas con mayor magnitud en alcoholes de bajo peso molecular.

Según Saura y col. (1980), que analiza aromas de frutas usando como trampa adsorbida carbón activo, el riesgo de este método es su falta de rigor para análisis cuantitativos, e incluso cualitativos, de sustancias que se emiten en proporciones muy pequeñas, dado que puede existir adsorción o desorción incompleta.

#### 5.1.3.3. - "TRAPPING" SELECTIVO

Como se ha dicho anteriormente, el arrastre con gas inerte es un recurso interesante para concentrar los compuestos volátiles minoritarios de una muestra líquida. El uso de trampas selectivas tiene la finalidad de conseguir una eliminación parcial de interferencias. Esta retención o "trapping" selectivo es casi siempre de tipo químico, lo que proporciona el recurso de aprovechar el efecto de ampliación química, al recurrir a una reacción específica, de las sustancias que se pretende analizar, con un reactivo que posea un grupo funcional especialmente sensible, de acuerdo con la posterior técnica de identificación.

Rodríguez y col. (1986), para la extracción de acetaldehído en vinos, debido a la complejidad de la muestra y a la presencia de sustancias que interfieren (alcohol etílico e ión sulfito ligado al aldehído) hacen uso del arrastre con  $N_2$  (85 ml/min) y como absorbente selectivo emplean una solución de NaOH 0,25 M enfriada por un baño de hielo-agua a 4°C. Para lograr una mayor recuperación introducen dos trampas, tal como se muestra en la figura 19 .

Díaz (1983) y Fernández (1988) para la extracción de carbonilos emplean como "trapping" selectivo una trampa que contiene una solución de 2,4-Dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH), capaz de complejarse con los compuestos carbonílicos para dar

lugar a DNPS que se identifican posteriormente por métodos específicos (ver apartado 5.2.).

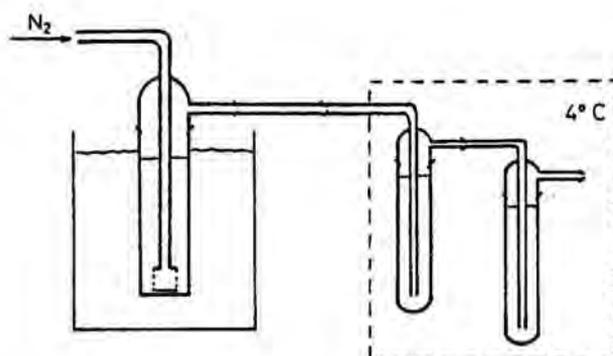


Figura 19 Sistema para la separación de acetaldehído mediante arrastre con un gas inerte.

#### 5.1.4. - DESTILACION Y RECTIFICACION

Debido a las pequeñas fuerzas de atracción entre la mayoría de las moléculas orgánicas, muchos compuestos pueden convertirse al estado gaseoso, sin descomposición, por calentamiento a una temperatura a la cual la presión de vapor iguale a la presión externa. Esta temperatura se conoce como punto de ebullición del líquido y es una propiedad característica de un compuesto puro. Los vapores pueden ser obligados a pasar por un condensador, en donde vuelven a tomar su forma líquida; este proceso se llama destilación.

Como la atracción entre moléculas de un compuesto difiere de la que hay entre las moléculas de otro, generalmente, los

distintos compuestos orgánicos destilan a diferentes temperaturas. Por lo tanto, la destilación puede usarse, no sólo, para distinguir compuestos orgánicos volátiles de sustancias no volátiles, sino también, para separar mezclas de compuestos orgánicos que tienen distintos puntos de ebullición.

Este procedimiento fue al principio el más utilizado para estudiar los constituyentes del aroma del vino, o de otros productos alimentarios. Pero, hoy en día, se reconoce que las altas temperaturas que emplean pueden ser las responsables de la modificación en la concentración de algunos compuestos (hidrólisis de ésteres, por ejemplo) o de la aparición de artefactos, por lo que estos procedimientos han sido cada vez más abandonados y sólo se emplean para la determinación de compuestos de bajo punto de ebullición, o bien usan la llamada destilación al vacío y la destilación al vapor.

La destilación a presión reducida se llama **destilación al vacío**. Se usa para compuestos de punto de ebullición alto, para evitar la descomposición que podría producirse a causa de las elevadas temperaturas necesarias para producir su destilación a la presión atmosférica, ya que la reducción de la presión permite que la sustancia destile a temperatura inferior. Se puede combinar esta técnica con la retención en trampas criogénicas o con una extracción con disolventes orgánicos, con el fin de evitar la destilación del agua y la baja recuperación de los compuestos de

elevado peso molecular. Este método puede ofrecer buena eficacia en el aislamiento de volátiles, pero no es adecuado para cuantificarlos ya que la aplicación del vacío puede alterar la concentración relativa de los constituyentes respecto al espacio de cabeza.

La **destilación a vapor** consiste en el paso de vapor de agua por la muestra a analizar, o su destilación en presencia de agua, con lo que las sustancias destilan a una temperatura inferior. Principalmente, es un procedimiento usado para extraer los volátiles de frutos. Las fracciones trituradas se introducen en un matraz de destilación y se someten durante dos horas al paso de una corriente de vapor de agua. Finalizado este tiempo, se separan los componentes más solubles en agua (alcoholes, carbonilos y ésteres de bajo peso molecular) ya que tienen un punto de ebullición bajo. Resulta muy apropiado para separar los componentes insolubles en agua y ligeramente volátiles, de los no volátiles mezclados con ellos.

Saura y col.(1980) aplican este método para estudiar los componentes volátiles de las manzanas, y realizan una extracción posterior con éter para concentrar el extracto.

#### 5.1.5. - CONCENTRACION POR FRIO

Esta técnica consiste en eliminar la mayor parte del agua contenida en el vino, cerveza u otras soluciones acuosas, transformándola en cristales de hielo.

La solución a estudiar se sumerge en una mezcla refrigerante a  $-10^{\circ}\text{C}$ , en agitación continua; los cristales se forman al lado de la pared y, poco a poco, no queda en estado líquido más que un pequeño cono en medio del recipiente, en el cual se encuentran concentradas las sustancias aromáticas. Aun cuando este método es útil para la purificación de sólidos orgánicos, Bertrand (1968) ensaya esta técnica y no obtiene un enriquecimiento de los compuestos volátiles suficiente, para justificar un estudio más profundo.

#### 5.1.6. - EXTRACCION CON DISOLVENTES ORGANICOS

Tras el desarrollo de la cromatografía gaseosa, la extracción por disolventes es el método más usado para concentrar los compuestos volátiles. Entre otras razones por la gran cantidad de sustancias obtenidas y su capacidad de utilización como técnica colateral en alguna de las fases de otros métodos extractivos.

La **extracción discontinua** consiste en poner en contacto la muestra con distintas porciones de disolvente en embudo de

decantación hasta agotar la muestra.

Los disolventes orgánicos utilizados pueden ser muy diversos y el grado de extracción depende en gran medida de su naturaleza. Se ha de considerar el coeficiente de partición con las sustancias a extraer, el número de extracciones realizadas y el contacto del disolvente con la muestra. Aunque es un método sencillo, Gassiot y col. (1981) extraen el vino en discontinuo con éter etílico y observan un empobrecimiento del número de compuestos, respecto al continuo. Únicamente aparecen etanol, alcohol isobutílico, alcoholes amílicos, lactato de etilo, ácido acético y 2-feniletanol.

La **extracción continua** es una extracción de larga duración y, generalmente, requiere aparatos especiales que consigan el enriquecimiento del disolvente y el agotamiento de la muestra en compuestos aromáticos.

Este método permite concentraciones importantes después de la evaporación del disolvente, cuyo punto de ebullición debe ser lo más bajo posible; por otra parte, se puede operar con grandes volúmenes de muestra y así obtener un extracto abundante que permita los trabajos analíticos de identificación. Sin embargo, el método es difícilmente reproducible y, por consiguiente, no es práctico para la cuantificación de las sustancias. Otro problema adicional, es que al concentrar fuertemente el disolvente, después

de la extracción, es difícil desprenderse de ciertas impurezas que interfieren en el desarrollo del cromatograma. La posibilidad de una gran concentración, permite poner en evidencia un gran número de sustancias presentes en estado de trazas, sin embargo, en algunos cromatogramas relativos a los vinos su interpretación puede ser muy complicada.

Los disolventes utilizados son muy variados. El **pentano** se usa como el disolvente orgánico más interesante, pues extrae poco etanol, es muy volátil y no forma azeótropos con las sustancias del extracto, lo que permite eliminarlo casi totalmente y obtener concentraciones del orden de 3.000 a 15.000. Sin embargo, tiene un poder disolvente débil para algunos compuestos de bajo peso molecular que necesitan extracciones en continuo de larga duración (140-240 horas), con la posibilidad de formar artefactos. Además, como en todos los disolventes, se observa pérdida de los compuestos más volátiles, y el disolvente residual, incluso en estado de trazas, contamina el principio de los cromatogramas. De todas formas, es el disolvente de elección de los compuestos volátiles con punto de ebullición elevado, y usado para los estudios globales del aroma del vino (Gassiot y col., 1981).

El **cloruro de metileno** tiene un excelente poder disolvente, pero es poco selectivo porque extrae agua, etanol y materia colorante. Además, su eliminación necesita temperaturas altas (70°C). A pesar de estos defectos, puede ser usado como

segundo disolvente después del pentano (Boidron, 1966) o para la extracción y cuantificación de ciertos compuestos particulares ya que, a pesar de la baja temperatura usada, puede presentar modificaciones químicas, como por ejemplo la hidrólisis de los ésteres.

El **diclorometano** ( $\text{CH}_2 \text{Cl}_2$ ) es un buen disolvente para los componentes menos volátiles. Mesías y col. (1981) lo utilizan para el estudio de los volátiles de las uvas de la Tierra de Barros, a partir de 250 ml de zumo y 300 ml de disolvente. Los extractos se concentran por evaporación del disolvente hasta un volumen de 3-5 ml y se conserva a 4°C. La operación se efectúa en un extractor continuo, ensayando los siguientes disolventes y tiempos de extracción: pentano (240 h.), diclorometano (60 h.), éter-pentano 2/1 (240 h.); el diclorometano es el que ha proporcionado mejores resultados cualitativos y se aplica una posterior identificación por cromatografía de gases - espectrometría de masas.

La mezcla **diclorometano-pentano** es citada por muchos autores y presenta la ventaja de que reduce considerablemente el tiempo de extracción, pudiéndose realizar en 24 horas. Así, Climent (1986) hace una extracción en continuo de 500 ml de vino con una mezcla diclorometano-pentano (2/3, v/v).

Más recientemente, se han sugerido, como disolventes extractivos, compuestos de bajo punto de ebullición, en particular

el triclorofluorometano (Freón-11). Mesias y Ough (1985) describen un método cuantitativo, para la determinación de alcoholes y ésteres, empleando este disolvente y resaltan el alto rendimiento en la extracción. A pesar de esto, presenta la desventaja de requerir bajas temperaturas en su manipulación (50°C). Estos autores comparan la extracción continua, con disolvente orgánicos inmiscibles (Freón-11 y diclorometano) con el método de destilación de Lickens y Nickerson, que permite simultáneamente la destilación de las muestras y la extracción con diclorometano. Llegan a la conclusión de que la eficacia de la extracción aumenta con el incremento del número de átomos de carbono. El Freón-11 proporciona resultados rápidos y reproducibles, en especial para la extracción de alcoholes superiores a 5 átomos de carbono.

#### 5.1.7. - DESMIXTURA

Consiste en disminuir el poder disolvente de la fase acuosa por saturación con una sal, lo que conlleva una mejor solubilización del soluto considerado en la fase orgánica, elevando así su coeficiente de partición, es decir, su concentración relativa en la fase orgánica.

Si se añaden al vino sales minerales se obtiene, en ciertas condiciones, una desmixtura del alcohol que da una fase no miscible con el agua. Esta capa sobrenadante, de pequeño volumen,

contiene las sustancias más miscibles en etanol que en agua, como son los compuestos fenólicos y aromáticos. Se puede añadir eventualmente un disolvente para aumentar el volumen separado; esta adición es necesaria en el caso del mosto.

La teoría de la desmixtura ha sido descrita con detalle por Bertrand (1971) e indica que, en la medida que sea posible basar sobre este principio un método operatorio perfectamente reproducible, podrá ser usado como un método simple de extracción para la cuantificación posterior de los constituyentes volátiles por cromatografía.

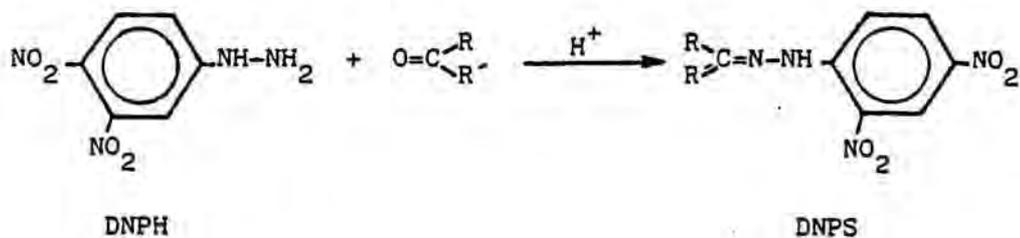
Mesías (1981) hace un estudio de la desmixtura con varias sales:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3^-$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y  $\text{NaHPO}_4$ . De ellas selecciona una mezcla de 20 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 5 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  por considerar que modifica menos el pH del vino. Utiliza también el procedimiento de la desmixtura, pero modificado, para el estudio del mosto. Obtiene resultados cuantitativos y resuelve los problemas originados por la extracción de colorantes y azúcares, destilando el mosto hasta un 80% del volumen original y añadiendo acetona para permitir una buena marcha del proceso por saturación de sales.

## 5.2. - CONCENTRACION SELECTIVA DE LOS CARBONILOS VOLATILES

### 5.2.1. - DERIVATIZACION DE CARBONILOS

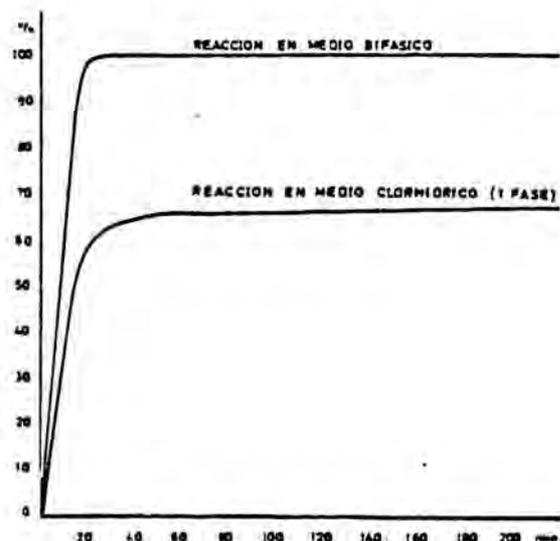
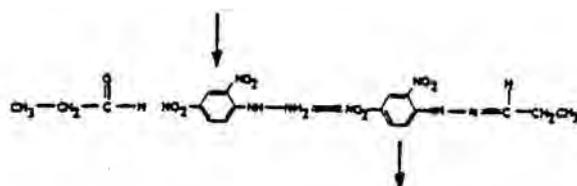
A fin de separar los carbonilos de la fracción volátil del vino, generalmente, se usa una técnica de derivatización: formación de un derivado específico del grupo carbonilo.

El reactivo más usual derivatizante es la 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH) debido a que la reacción de formación del derivado es rápida, muy sensible y se obtiene un derivado coloreado, de alto peso molecular y fácil de purificar mediante cristalización (Díaz, 1983 ). El esquema de formación es:



La reacción de formación de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas (DNPS) formadas es una adición nucleófila seguida de una eliminación 1-2 de agua. Debido a que la DNPH es un nucleófilo débil, la reacción tiene lugar en medio ácido que favorece la protonación del carbonilo. Según Selin (1976) a nivel de ppb la reacción no es total, sino que es una reacción de equilibrio, debido a que no rebasa el límite de solubilidad de las DNPS en

solución y, por consiguiente, no precipita el derivado formado. Indica que a niveles de 1 ppm la reacción en medio clorhídrico tiene un grado de conversión del 65% en los primeros 15 minutos y que a las 15 horas tan sólo se alcanza el 70%. La adición de una segunda fase de isooctano desplaza el equilibrio, debido a la alta solubilidad en la fase orgánica de las DNPS formadas. Con ello la reacción transcurre al 100% al cabo de 20 minutos, tal como se indica en la figura:



SISTEMA BIFASICO:

20 min reacción al 100%

SISTEMA UNIFASICO:

15 min reacción al 67%

15 hr reacción al 70%

Cinética de la reacción de formación de las DNPS.

Con el fin de reducir el tiempo de análisis, se han propuesto dos variantes de esta técnica de derivatización:

- 1- Derivatización directa
- 2- Derivatización indirecta

### **DERIVATIZACION DIRECTA**

Barceló (1979), para cuantificar los compuestos carbonílicos de la cerveza, añade un exceso de DNPH en forma sólida y ajusta el pH a 3 con HCl 3N. Deja reaccionar 15 horas y extrae las DNPS formadas con hexano. El problema es la DNPH residual y a fin de eliminarla efectúa una serie de lavados.

Fernández (1988) menciona que la adición directa al vino de DNPH en solución clorhídrica presenta una serie de inconvenientes:

- Extracción de impurezas o sustancias no identificadas.
- Formación de emulsiones en la extracción que pueden dificultar el análisis cuantitativo.
- Niveles de acetaldehído muy elevados en comparación al de otros aldehídos presentes en la muestra, que interfieren la determinación cromatográfica.

Además el medio ácido puede dar lugar a reacciones de hidrólisis que modifican la composición inicial de la muestra y también se rompen los enlaces de compuestos carbonílicos unidos al

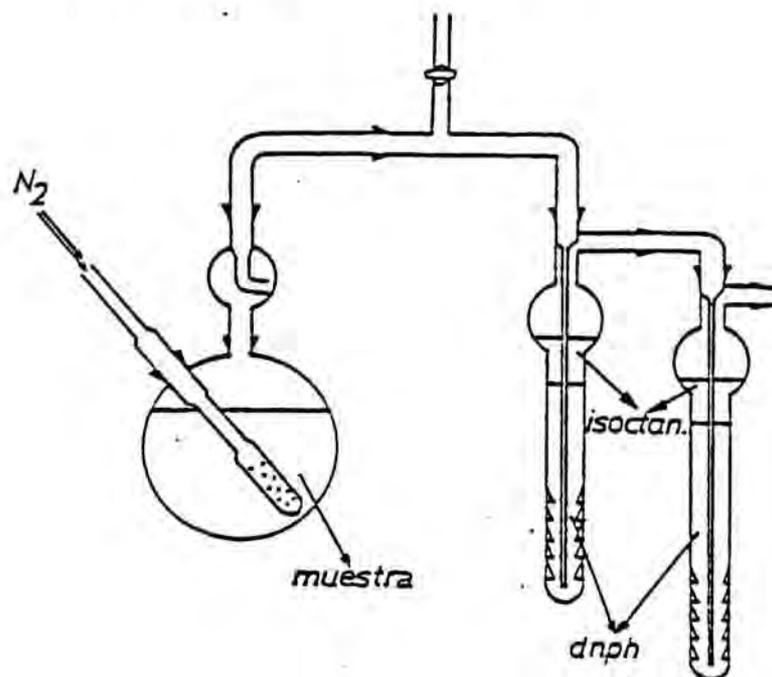
dióxido de azufre, con lo cual aumentan las concentraciones de aldehídos libres. Por todo ello, es preferible extraer previamente la fracción volátil y realizar una derivatización posterior.

### **DERIVATIZACION INDIRECTA**

Díaz (1983) propone una técnica de derivatización que se basa en el arrastre con nitrógeno de los componentes volátiles de la cerveza, sustituyendo las trampas frías o de polímeros porosos por una trampa que contiene una solución saturada de DNPH en HCl 2N. El tiempo que debe durar el arrastre es de 4 horas y las DNPS formadas se extraen con isooctano. El lavado del reactivo residual se realiza por una microcolumna de Florisil, eluyendo las DNPS con 10 ml de cloroformo. Evapora a sequedad y redisuelve el extracto seco con 5 ml de metanol para la posterior identificación por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).

Fernández (1988) realiza el "stripping" de 100 ml de vino con nitrógeno y retiene los carbonilos volátiles en dos trampas bifásicas que contienen 30 ml de DNPH y 30 ml de isooctano. A continuación, realiza una extracción de las dos trampas con dos fracciones sucesivas de 30 ml de isooctano. Después de evaporar a sequedad y redissolver con 5 ml de metanol, también realiza la identificación por CLAE.

El esquema del aparato extractivo es:



Aparato de extracción.

### 5.2.2. - SEPARACION Y CUANTIFICACION DE LOS COMPUESTOS CARBONILICOS

Diversos autores estudian y cuantifican los compuestos carbonílicos, utilizando distintas técnicas cromatográficas debido a la baja concentración en que se hallan.

En este apartado se citan de forma resumida, los distintos métodos usados, haciendo especial mención de aquellos en que se separan y cuantifican los derivados DNPS de los carbonilos volátiles del vino.

### 5.2.2.1. - CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Hay amplia bibliografía sobre la separación de las DNPS de aldehídos y cetonas por cromatografía en capa fina. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos sólo se separan series homólogas de compuestos carbonílicos y no se aplica la técnica de separación a muestras tan complejas como el vino.

Díaz (1983) optimiza las condiciones de la cromatografía en capa fina, con elución monodimensional, como método preparativo de las DNPS de cerveza, para posterior inyección en un cromatógrafo de gases. Indica como mejores condiciones las siguientes:

Adsorbente: Sílica gel impregnado en Carbowax 1540

Eluyente: benceno-tolueno-hexano (1:1:2)

o xileno-hexano (1:1)

En la figura se halla un ejemplo de cromatografía en capa fina de una mezcla de patrones de DNPS (Díaz, 1983):

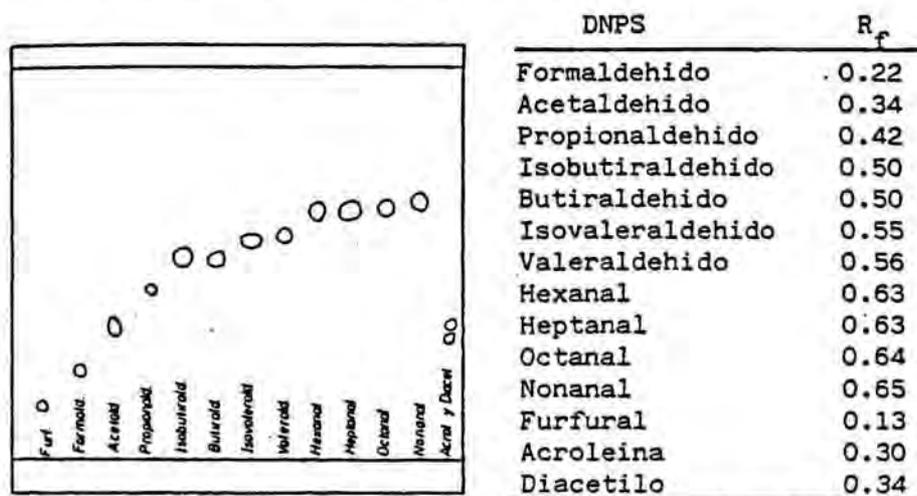


FIG. 20 Cromatografía de capa fina de una mezcla de patrones de DNPS.

#### 5.2.2.2. - CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

En la bibliografía consultada, se observa que este tipo de cromatografía, al igual que la cromatografía en capa fina, es empleada como método de preparación de las muestras más que como método analítico en sí.

Meilgaard (1979) utiliza esta cromatografía como técnica de separación previa a la cromatografía en capa fina. Emplea una columna de óxido de magnesio y celita 545 (1:1) y realiza una elución con gradiente de 0-100% de metanol en cloroformo, con lo cual consigue separar en distintos grupos las DNPS de los carbonilos. En primer lugar, eluyen las cetonas, les siguen los alcanales, alquenales, alcadienales, furfural y finalmente los compuestos dicarbonílicos. Los cetoácidos y la DNPH residual quedan retenidos en la columna.

Díaz (1983) utiliza, en principio, la cromatografía en microcolumna de sulfato de magnesio (Florisil) para eliminar el reactivo residual (DNPH) del extracto de isooctano de las DNPS de carbonilos de cerveza. Posteriormente, debido a la necesidad de analizar de forma selectiva las DNPS de los carbonilos de cadena larga, para ser analizados por cromatografía de gases, usa este tipo de cromatografía en microcolumna, con eluciones secuenciales de polaridad creciente, como método preparativo.

Se debe citar un método usado por Lee y col. (1986) que emplea una microcolumna Sep-pak C<sub>18</sub> como método preparativo para el análisis de furfural y 5-hidroximetilfurfural en zumos por HPLC. Defeca 10 ml de zumo con reactivo de Carrez y pasa 1ml a través de la microcolumna. Eluye el furfural 2 veces con 3 ml de acetato de etilo, desecando sobre sulfato de sodio anhidro; después de filtrar identifica por CLAE.

#### 5.2.2.3. - CROMATOGRAFIA DE GASES

Es el procedimiento idóneo para el estudio de aromas y componentes volátiles de frutas, flores y derivados industriales, cuyo conocimiento ha evolucionado extraordinariamente desde la implantación de esta técnica.

Ribereau-Gayon (1971) y Rapp (1972) dan relaciones de componentes volátiles presentes en el vino, hasta entonces ignorados, detectados mediante esta técnica instrumental.

Las paredes internas de las columnas del cromatógrafo de gases (GC) están recubiertas de un material químico, llamado fase estacionaria, que según su naturaleza permite separar los compuestos en función de su volatilidad y polaridad. La muestra

atraviesa la columna conducida por un gas vector que constituye la llamada fase móvil.

Cada molécula, separada en la columna, es detectada a su salida por medio de un dispositivo particular que da una señal que se traduce sobre un registrador, dando un pico cuya intensidad es proporcional a la concentración del producto en el extracto.

Los resultados salen interpretados gracias a los integradores que dan la superficie de los picos, sus porcentajes relativos y su tiempo de retención. El registro obtenido, se le denomina aromagrama y su interpretación puede resultar extremadamente compleja. Para la identificación se comparan los índices de retención de los picos registrados en los cromatogramas problema, con los valores de estos índices para sustancias patrón inyectadas en las mismas condiciones, o bien acoplar otras técnicas identificativas como puede ser la espectrometría de masas.

En la bibliografía se citan numerosos tipos de columnas para la CG de los componentes volátiles de los vinos. Roux (1971) recomienda las paredes de vidrio para los compuestos que se descompongan por efectos catalíticos, como es el caso de los alcoholes terpénicos, pero, las más usadas suelen ser las de acero inoxidable.

La fase estacionaria más usada suele ser Carbowax 20 M

(Olafsdottir, 1986; Cassiot y col., 1983; Climent y Di Stéfano, 1985; Mesías y Ough, 1984). También es muy utilizada la fase Free Fatty Acid Phase (FFAP) (Tomasset, 1983; Lefèvre y Raposo, 1972).

Las condiciones de trabajo utilizadas son variables, debido a la amplia gama de posibilidades que ofrece este tipo de cromatografía. En general, se emplea detector de ionización de llama (FID) y los flujos de aire e hidrógeno suelen ser 300-25 ml/min (Bertrand, 1968), aunque hay autores, como Climent y Di Stefano, que emplean como gas portador helio a 1 ml/min.

La temperatura del horno depende del objetivo de la investigación, dado que las sustancias que se estudian tienen retenciones muy variadas y puntos de ebullición dispares. Por ello, sólo si el interés se centra en un determinado componente se trabaja a temperatura constante, tal es el caso de Bertrand y col (1978) que determinan el 2-feniletanol por inyección directa a una temperatura de 140°C. Si el objetivo radica en estudiar un extracto completo, lo normal es trabajar con un programa de temperatura. Según Saura (1979) a temperatura baja existirá buena resolución para los componentes de cadena más corta, mientras que para los compuestos más largos será necesaria una temperatura más alta. U. Tomasset (1983) usa una velocidad de aumento de la temperatura de 2°C/min desde 60 a 200°C. Mesías y Ough (1984) lo hacen entre 70 y 180°C a 4°C/min, manteniendo la temperatura inicial 16 minutos. Cassiot y col. (1981) mantienen el horno a

65°C durante 6 minutos y después incrementan 4°C/min hasta 190°C.

Los cromatógrafos de gases equipados con columnas capilares de vidrio o sílice, son las más usadas actualmente por su mayor poder resolutivo. Estas columnas son tubos de pequeño diámetro enrollados en espiral de 25 a 50 m de longitud. Son empleadas, entre otros, por Gassiot y col. (1983), Mesías y Ough (1985) y Vernin y col (1986).

La cromatografía de gases es aplicada más generalmente a todo el aroma y no en particular a los compuestos carbonílicos, que sólo representan una fracción del mismo. Sin embargo, como nuestra atención se centra en ellos, encontramos algunos trabajos en los que se describe la aplicación de la cromatografía de gases al análisis de DNPS de aldehídos y cetonas. Hashimoto (1974) y Jamieson (1977) observan la aparición de un doble pico al inyectar un patrón de DNPS de acetaldehído, e indican que este desdoblamiento es debido a un fenómeno de isomerización favorecido por las altas temperaturas del inyector.

Papa y Turner (1972) consiguen reducir, aunque no eliminar, el desdoblamiento de las DNPS efectuando la inyección en cabeza de columna, evitando el sobrecalentamiento del inyector.

Díaz recomienda utilizar la técnica de doble columna para evitar la derivación de la línea de base provocada por la

programación de temperatura y, asimismo, se recomienda inyectar con el horno frío, ya que el efecto solvente suele mejorar la eficacia de la separación. También destaca que al aplicar la cromatografía de gases, al análisis de las DNPS de los carbonilos de una muestra de cerveza, se obtiene un cromatograma muy pobre ya que tan sólo aparece el pico del acetaldehído y el de la acroleína, debido a la baja concentración en la cerveza de carbonilos de cadena larga; si se concentra la muestra se obtiene un pico saturado de acetaldehído que solapa el resto del cromatograma. Por todo ello, usa la cromatografía en capa fina y la cromatografía en microcolumna, como método separativo de los otros compuestos carbonílicos presentes.

#### 5.2.2.4. - CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (CLAE)

Al ser la fase móvil un líquido a alta presión, este tipo de cromatografía no se suele usar en la determinación del aroma. Sin embargo, en el caso de los compuestos carbonílicos volátiles puede ser empleado, ya que no se analizan como tales, sino en forma de derivados.

Se han publicado trabajos en los que se propone el empleo de derivados fluorescentes de los compuestos carbonílicos. Entre los derivados propuestos destacan:

- Dansilhidracina (hidracina del ácido dimetil-amino-naftalin-5-sulfónico).
- 4-amino-3-hidracino-5-mercapto-1,2,4-triazol.
- Clorhidrato de p-nitrobenciloxiamin (PNBA).

Es de destacar el trabajo de Okamoto y col. (1981) que determina acetaldehído en vino mediante un lutidín derivado (derivado del 3-aminopropiltriétoxissilano, 3-APTS). La determinación la realiza mediante cromatografía en capa fina y por CLAE usando una columna Nucleosil 5 NH<sub>2</sub>.

Sin embargo, se ha de hacer constar que, en la mayoría de los trabajos, se utiliza la DNPH (dinitrofenilhidracina) como reactivo derivatizador, ya que proporciona una selectividad y sensibilidad adecuadas y requiere la utilización de un detector U.V. que es de uso mucho más general que el de fluorescencia (Díaz, 1983).

Numerosos autores han abordado la separación de las DNPS de aldehídos y cetonas utilizando esta técnica, ya que el análisis transcurre a bajas temperaturas y, empleando un detector U.V.. Las DNPS se pueden analizar de forma selectiva y con una sensibilidad 100 veces superior a la que proporciona el detector FID usado en la cromatografía de gases.

Las DNPS de los carbonilos volátiles se pueden analizar por

CLAE en fase normal y en fase reversa. En ambos casos, los resultados son satisfactorios pero . en general, se utiliza la fase reversa debido a su mayor reproducibilidad y a que no es indispensable el reactivar la columna de forma periódica (Díaz, 1983).

En el cuadro 24 se recoge un estudio bibliográfico sobre las condiciones analíticas empleadas por diferentes autores.

Fernández (1988) separa por HPLC las DNPS procedentes de 100 ml de vino. Las condiciones empleadas serán descritas con detalle en la parte experimental, ya que son las empleadas en este trabajo.

AUTOR	MUESTRA	PREPARACION	DETERMINACION OMS	COLUMNA	ELUYENTE	CONDICIONES	Detector (nm)	FLUJO (ml/min)
Pape y Turner (1972)			aldehidos	Zipex	Hexano		254	2-1
Selvir (1976)	petrones	derivatización directa (e) sistema bifásico	aldehidos C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub>	C <sub>18</sub> fase reversa	acetoniitrilo/agua 3:2	isocrática	336	3
	"	"	aldehidos aromático	"	acetoniitrilo/agua 13:7	"	"	"
	"	"	cetonas C <sub>7</sub>	Microporasil	etilacetato/hexano 2:98	"	"	"
Daska (1979)	Octanol	derivatización directa	aldehidos C <sub>3</sub> -C <sub>13</sub>	C <sub>18</sub> fase reversa	acetoniitrilo/agua 70:30	gradiente 5ml/min hasta 99%	340	3
Vigh y col. (1980)	zumos de tomate	—	aldehidos y cetonas C <sub>1</sub> -C <sub>12</sub>	C <sub>18</sub> fase reversa	metanol/agua 88%	isocrática	360	1
Fung y Grosjean (1980)	Aire y agua	derivatización directa microcolumna	aldehidos C <sub>2</sub> -C <sub>7</sub>	C <sub>18</sub> fase reversa	metanol/agua 70:30	isocrática	360	1,5
Bualig (1982)	citricos	derivatización directa microcolumna	ácidos α-diceto- peroxifilos	Zorbax C <sub>8</sub>	0,015g H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> acetoniitrilo/agua 40:60	isocrática	360	1,5
A. Diaz (1983)	cerveza	"stripping"	aldehidos C <sub>1</sub> -C <sub>9</sub>	C <sub>18</sub> fase reversa	metanol/agua 70:30	gradiente 1,2ml/min hasta 100%	360	1,4
Dixon y Swerin (1985)	champú	derivatización directa	aldehidos y cetonas C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub>	Spherisorb 003 fase reversa	acetoniitrilo/agua 60:40	gradiente hasta 100% en 4 min.	363	0,2
Ogawa y Fritz (1985)	bebidas	derivatización directa microcolumna	aldehidos y cetonas C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	C <sub>18</sub> fase reversa	metanol/agua 40:60	gradiente 30 min. metanol/agua(70/30) gradiente 25 min. 100% metanol	254	0,5
Polo y Almy (1987)	Mosto Wino cerveza	derivatización indirecta (Freon-11)	aldehidos y cetonas C <sub>1</sub> - C <sub>11</sub>	C <sub>18</sub> fase reversa	acetoniitrilo/agua 40:60	gradiente 14 min. 95% acetoniitrilo	336	—
C. Fernández	caña	"stripping" N <sub>2</sub>	aldehidos y cetonas C <sub>1</sub> -C <sub>9</sub>	C <sub>18</sub> fase reversa	metanol/acetoniitrilo/agua 90:10:30%	gradiente 1,2ml/min hasta 95% acetoniitrilo	360	0,7

TABLE 21: revisión bibliográfica de las condiciones cromatográficas empleadas en la determinación de compuestos carbonílicos, derivatizados como DNPS, por C.L.A.E.

### 5.3. - OTROS METODOS DE DETERMINACION DE COMPUESTOS

#### CARBONILICOS

En este apartado, se describen otros métodos para la determinación de los aldehídos más significativos presentes en los vinos.

Casi todos se limitan a cuantificar de modo poco selectivo el acetaldehído. En algunos casos, se determinan compuestos de interés como pueden ser diacetilo, acroleína y furfural.

El principal inconveniente que presentan es el nivel de cuantificación, así como el no considerar la importancia de la forma aldehído-bisulfito, forma de combinación en que se hallan la mayoría de los compuestos carbonílicos en los vinos y bajo la cual se hallan inactivos.

Sin embargo, aun cuando estas técnicas se centran en el estudio de los aldehídos totales o los mayoritarios, pueden resultar de alguna utilidad a nivel orientativo. Por ello, en este trabajo se realiza un estudio de estos métodos a fin de comparar la evolución de los aldehídos totales con aquellos que se hallan en estado libre y la repercusión que pudiera tener la combinación bisulfítica en el envejecimiento del vino.

Asimismo, nos referiremos a algunos métodos actuales de

identificación que pueden ser utilizados para caracterizar individualmente los compuestos carbonílicos separados y cuantificados mediante las técnicas cromatográficas referidas en el apartado anterior.

### 5.3.1.- MÉTODOS VOLUMÉTRICOS

El método Oficial de determinación de acetaldehído en vinos, se basa en su combinación bisulfítica y por ello, de forma indirecta, se valora el sulfito combinado por un método iodimétrico.

En realidad, este método valora los aldehídos totales, definiéndolos como la suma de aldehído libre más aldehído combinado con  $\text{SO}_2$ , cifra que se obtiene con precisión por destilación del vino en un medio ligeramente alcalino.

Para esta determinación, se regula el vino a pH 9, se destila con calor suave y se recoge en un matraz que contiene una solución reguladora neutra, engrudo de almidón y 5 ml de bisulfito. Tras neutralizar el bisulfito en exceso, se valora, el que ha reaccionado con el etanal destilado, con solución de yodo N/10 ó N/100 según los casos.

Por el mismo método, pero destilando en un medio muy ácido, se puede valorar el acetal (resultado de la combinación de 2

moléculas de etanol y 1 de etanal). De hecho, este método cuantifica el aldehído mayoritario (acetaldehído) o su combinación (acetal), tanto la fracción que se halla en estado libre, como la que se halla en forma de combinación bisulfítica e inactiva, por lo que presenta el defecto de ser poco específica.

### 5.3.2. - MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Los métodos espectrofotométricos se basan en la reacción de determinados compuestos carbonílicos con algunos reactivos, para la obtención de un producto detectable espectrofotométricamente.

Un método colorimétrico para la **determinación de acetaldehído** usa la hidrazona de la 3-metilbenzotiol-2-ona, que después de reaccionar con aquel, se separa del vino. Para oxidar el exceso de reactivo se le adiciona cloruro férrico. El reactivo oxidado reacciona con el compuesto formado entre el etanal y el reactivo, y se obtiene un producto muy coloreado. Esta reacción se detiene por adición de acetona y se determina la absorbancia a 630 nm.

Otro método rápido y sencillo, que da resultados comparables a los del método químico Oficial, consiste en decolorar el vino, filtrarlo y tratarlo con disolución de piperidina y nitroprusiato, para obtener un producto de reacción, cuya coloración a 570 nm sea proporcional a la cantidad de acetaldehído que se encuentra

combinada al dióxido de azufre.

Basson (1966) propone un método colorimétrico para la determinación de acetaldehído, previa derivatización como DNPS. Extrae con cloroformo el derivado y añade álcali para conseguir un color rojo estable cuya absorbancia se mide a 420 nm.

Un método que se emplea frecuentemente para la **determinación cuantitativa de hidroximetilfurfural** en vinos, consiste en su reacción con ácido barbitúrico y p-toluidina. La extinción del producto de reacción coloreado se lee a 550 nm. El SO<sub>2</sub> interfiere en el procedimiento, ya que el complejo SO<sub>2</sub>-hidroximetilfurfural no reacciona; se puede eliminar por valoración con yodo o por adición de un exceso de acetaldehído (Método Internacional de la O.I.V.).

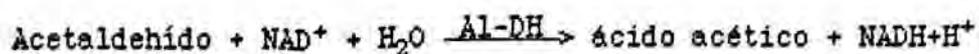
El método más común en la **determinación del diacetilo** y la **acetoína** se basa en su reacción con alfa-naftol y creatinina; dicha reacción es la de Voges-Proskauer. El procedimiento consiste en hacer reaccionar el destilado del vino con los reactivos indicados y leer la absorbancia a 530 nm a los 5 minutos, para determinar el diacetilo. La velocidad de reacción de la acetoína es más lenta y la lectura después de 1 hora corresponde al total diacetilo y acetoína.

Olea y col. (1979) ponen a punto un método espectrofotométrico para la determinación de diacetilo en cervezas, previa formación del derivado ditiosemicarbazona.

Toren y Einrich (1955) determinan espectrofotométricamente compuestos carbonílicos como DNPS en un sistema bifásico compuesto por isooctano y una mezcla ácida alcohol-agua-fosfórico. Las DNPS se extraen selectivamente en la fase de isooctano y su concentración la determinan a 340 nm. El exceso de reactivo, permanece en la fase acuosa y no interfiere. Por su sencillez y por la analogía que presenta con el método de determinación de carbonilos volátiles libres por HPLC, se estudiará una variación de este método en la parte experimental para determinar carbonilos totales.

### 5.3.3.- METODO ENZIMATICO

Se basa en que, en presencia de aldehído deshidrogenasa (Al-DH), el acetaldehído es oxidado cuantitativamente por nicotinamida-adenín dinucleótido (NAD) a ácido acético:



La cantidad de NADH formada es estequiométrica con la cantidad de acetaldehído. El NADH es determinado

espectrofotométricamente a través de su absorbancia a 340 nm.

Para la determinación de acetaldehído en vino blanco se debe graduar la muestra a pH 7-8 con NaOH 1M y se toma 0.1 ml para el ensayo.

Otros aldehídos como propanal, gluconaldehído y benzaldehído pueden interferir, ya que la aldehído-DH también las convierte, aunque a una velocidad mucho menor.

#### 5.3.4. - OTROS METODOS DE IDENTIFICACION

La identificación de las DNPS de los carbonilos volátiles del vino, es de vital importancia en los estudios que pretenden correlacionar la concentración de carbonilos con el flavor del vino envejecido, ya que los umbrales de percepción sensorial de los distintos compuestos carbonílicos abarcan un margen muy amplio dependiendo del número de átomos de carbono, de la posición del grupo carbonilo y de la presencia de insaturaciones. Por consiguiente, es necesario caracterizar cada una de estas sustancias para poder aplicar un factor de ponderación adecuado y poder establecer las bases para realizar correlaciones concentración-flavor (Díaz, 1983).

Sin embargo, la caracterización no es sencilla, debido a la gran variedad de carbonilos de 1 a 12 átomos de carbono y por

hallarse en un amplio margen de concentración, lo que dificulta su separación e identificación.

En este trabajo, la identificación de las DNPS por HPLC, se basa en el cálculo de los tiempos de retención relativos respecto al disolvente (Fernández, 1988), pero otros autores emplean técnicas como la espectrometría de masas (EM), la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrofotometría infrarroja (IR) y ultravioleta (UY).

La espectrometría de masas es una técnica de identificación muy empleada, que se acopla a la cromatografía gaseosa para facilitar la interpretación de los complicados cromatogramas.

El papel del espectrómetro es romper cada molécula, en pequeños fragmentos, por la acción de un bombardeo de electrones. Estos fragmentos son registrados y sus masas e intensidades son características de cada molécula ionizada. Los expertos los reconocen y los atribuyen a una molécula determinada mediante los bancos de datos donde se hallan los espectros de diversas sustancias.

Díaz (1983) realiza los espectros de UY, IR, RMN y EM de distintos patrones de DNPS. Concluye que los espectros IR no permiten diferenciar los compuestos analizados; los espectros RMN

permiten diferenciar inequívocamente los patrones pero se precisa un mínimo de 10 mg de producto puro para realizar el espectro, con lo que no es aplicable; los espectros UV permiten diferenciar sólo familias de compuestos (aldehídos saturados, insaturados, cetonas,...) y los espectros de masas indican el número de átomos de carbono, pero para identificar familias es preciso disponer de un fichero de datos de patrones de DNPS. Por todo esto, remarca que ninguna de estas técnicas, por sí solas, permite caracterizar inequívocamente los compuestos; sin embargo, si a las técnicas acopladas GC/EM y RPLC/UV se añade las informaciones que proporcionan las correlaciones estructura-retención, se podrán identificar de forma segura.

**PARTE EXPERIMENTAL**

## **6. - DESCRIPCION DE METODOS EXPERIMENTALES RELACIONADOS CON EL PARDEAMIENTO**

### **6.1. - DETERMINACION DE POLIFENOLES**

#### **6.1.1. - DETERMINACION DE POLIFENOLES TOTALES**

Para la determinación de polifenoles totales se ha utilizado el reactivo Folin-Ciocalteu según el método seguido por Singleton y Rossi (1965). Se basa en la reacción, en medio alcalino, del reactivo con los grupos fenoles, los cuales reducen los ácidos constituyentes del reactivo a una serie de óxidos de wolframio y molibdeno de color azul. La absorbancia leída en 765 nm es proporcional a la concentración de compuestos polifenólicos.

#### **Reactivos**

- Reactivo de Folin - Ciocalteu. Panreac<sup>®</sup>.
- Solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , preparada en caliente al 20% .

- Solución patrón de ácido gálico UCB para análisis al 0.5% (p/v).

### **Procedimiento**

En un matraz aforado de 25 ml, se añade 1 ml de agua, 1 ml de vino, 1 ml de reactivo Folin-Ciocalteu y 3 ml de solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Se agita la mezcla y se deja reposar 60 minutos exactos para que se desarrolle el color. Finalizado este tiempo, se lee a 765 nm frente a un blanco de reactivos.

El calibrado se ha realizado con una solución patrón de ácido gálico, trabajando en el rango de concentraciones entre 100 y 500 ppm.

#### **6.1.2. - DETERMINACION DE ORTODIHIIDROXIFENOLES**

Se utiliza una modificación del método de Flanzky y Aubert (1969), que utilizan el reactivo de Arnow para su determinación. Este reactivo contiene una mezcla de nitrito sódico y molibdato sódico. Se trata de una reacción de nitrosación seguida de la

formación de un complejo de color rojo con molibdato que se lee a 500 nm en el espectrofotómetro.

### **Reactivos**

- Reactivo de Arnow: se prepara mezclando 10 g de  $\text{NaNO}_2$  con 10 g de  $\text{NaMO}_4$  en 100 ml de agua.
- Solución de HCl 0,5 N
- Solución de NaOH 1 N

### **Procedimiento**

En un matraz aforado de 50 ml se introducen sucesivamente 5 ml de agua, 5 ml de vino blanco, 5 ml de HCl 0,5 N y 5 ml de reactivo de Arnow; después de agitar y pasado un minuto, se adicionan 5 ml de solución de NaOH 1 N. Se completa el volumen a 50 ml con agua.

La intensidad del color desarrollado se mide en cubeta de 20 mm, a 500 nm frente a un blanco, en el que se reemplaza la muestra de vino por agua.

El calibrado se realiza con una solución patrón de (+) -

catequina, comprendido entre 50 y 200 ppm.

Estos métodos analíticos de determinación de polifenoles totales y o-difenoles, son los que se emplean asiduamente en el Laboratorio de Bromatología donde se ha realizado este trabajo, y su validez ha sido probada por Condal (1986).

## **6.2.- DETERMINACION DEL COLOR Y LAS CARACTERISTICAS ESPECTRALES**

Para el seguimiento de la evolución del color se ha optado por la clásica determinación espectrofotométrica a 420 y 520 nm. Estas longitudes de onda corresponden a la zona de amarillos y rosas respectivamente y están utilizadas por diferentes investigadores (V.L. Singleton, 1979 y H.W. Berg, 1953).

### **Material**

Espectrofotómetro de doble haz Perkin Elmer modelo 551S UV/visible. Cubetas de 10 mm de paso de luz.

### **Procedimiento**

Unos 50 ml de muestra a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, se desgasifican introduciéndolos en un baño de ultrasonidos durante dos minutos. En el caso de que la muestra presente turbidez, se realiza previamente una centrifugación a 5000 rpm durante diez minutos separando el sobrenadante.

Con la muestra centrifugada y desgasificada se procede a la lectura en el visible a 420 y 520 nm, utilizando cubetas de 10 mm y agua destilada como referencia. Se realizan otras lecturas a 445, 495, 550, y 625 nm a fin de calcular las coordenadas triestimulares de la C.I.E.

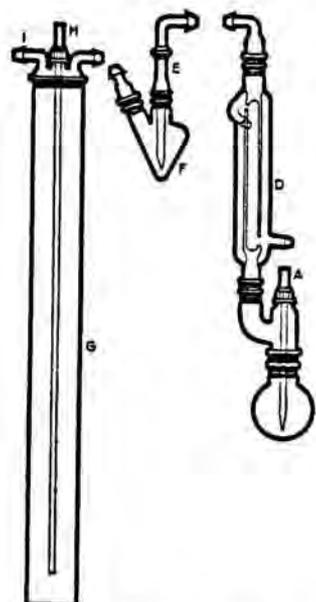
### 6.3.- DETERMINACION DE DIOXIDO DE AZUFRE

Se ha seguido el método propuesto por la O.I.V. indicado como "Método usual" y conocido como método de Rankine. Este método permite diferenciar el contenido de dióxido de azufre que se encuentra en estado libre y combinado, y está basado en la volatilidad de este compuesto, que es arrastrado, con corriente de aire o de nitrógeno, hasta una solución diluida y neutra de peróxido de hidrógeno, en donde es fijado y oxidado. El ácido sulfúrico formado se valora con una solución de hidróxido sódico. Si el arrastre se realiza a temperatura ambiente se obtiene el dióxido de azufre libre, si se realiza en caliente se arrastra también el combinado.

#### DESCRIPCION DEL METODO

##### **Reactivos y material**

- Solución de  $H_3PO_4$  al 25% (p/v)
- Solución de  $H_2O_2$  al 0.3% (p/v)
- Solución de NaOH 0.01 N.
- Indicador Tashiro



Aparato Rankine

## Procedimiento

### A- Dióxido de azufre libre :

En el balón de 100 ml del aparato Rankine, se colocan 10 ml de muestra y 5 ml de ácido fosfórico al 25 % (p/v). A su vez, en el matraz en forma de corazón, se ponen dos gotas de indicador de Tashiro y 2-3 ml de peróxido de hidrógeno al 0,3% (v/v), neutralizando a continuación con NaOH 0,01 N.

Una vez cerradas las conexiones, se pasa una corriente de aire o de nitrógeno durante 12-15 minutos. El  $\text{SO}_2$  libre es arrastrado y oxidado a ácido sulfúrico por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este sulfúrico es valorado con una solución de NaOH.

### B- Dióxido de azufre combinado :

Tras haber determinado el  $\text{SO}_2$  libre, manteniendo la misma muestra, se vuelve a poner peróxido de hidrógeno y a neutralizarlo. Se procede como en el caso anterior pero calentando la muestra. La ebullición debe de ser regular y con una duración de 12-15 minutos. El  $\text{SO}_2$  combinado es arrastrado y oxidado a ácido sulfúrico por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Finalmente se valora el ácido sulfúrico con una solución de NaOH 0,01 N.

#### **6.4. - DETERMINACION DE: AZUCARES, ETANOL Y GLICEROL**

La cromatografía líquida de alta eficacia (H.P.L.C.) permite, gracias al empleo de columnas que actúan por exclusión molecular, efectuar en un mismo análisis la determinación cuali y cuantitativa de sacarosa, glucosa y fructosa, sustratos de la fermentación, así como del glicerol y del etanol, sus principales productos.

La validación del método fue realizada por Martí (1986) y para cuantificar se opera mediante rectas de calibrado de concentraciones patrón.

#### **DESCRIPCION DEL METODO**

##### **Material y reactivos**

- Patrones (Merck)
- Acetona para HPLC (Panreac), patrón interno.
- Agua bidestilada.
- Metanol Para HPLC (Panreac).
- Resina aniónica Dowex 1 x 8 de 50-100 mallas (Fluka).
- Resina catiónica Dowex 50 x 8 de 50-100 mallas (Fluka).

- Cartuchos SEP-PAK C<sub>18</sub>.
- Filtro Millipore 0,45 micras.

## **Procedimiento**

### Preparación de la muestra

Se toman 5 ml de muestra desgasificada y se colocan en un tubo con tapón de rosca; se añaden 100 mg de resina aniónica y 100 mg de resina catiónica y se agita durante 10 minutos. A continuación, el líquido se filtra por un cartucho SEP- PAK C<sub>18</sub> (previamente activado con 1 ml de metanol y 5 ml de agua bidestilada). Finalmente, se toman 1 ml del líquido eluido y se lleva, dependiendo de la concentración en azúcares de la muestra, hasta 25 ó 10 ml con agua bidestilada. Esta solución se filtra por un filtro de 0,45 micras añadiéndole 10 microlitros de acetona como patrón interno.

### Determinación por H.P.L.C.

Cromatógrafo Perkin- Elmer Series 10, dotado de un detector de índice de refracción LC-25. El cromatógrafo se acopla a un integrador Hewlet-Packard 3390 A.

Las condiciones de trabajo son:

**Columna:** Shodex 801-S

**Fase móvil:** Agua bidestilada a 60°C.

**Flujo fase móvil:** 0,5 ml/min

**Temperatura columna:** 80°C

**Cantidad inyectada:** 100 microlitros.

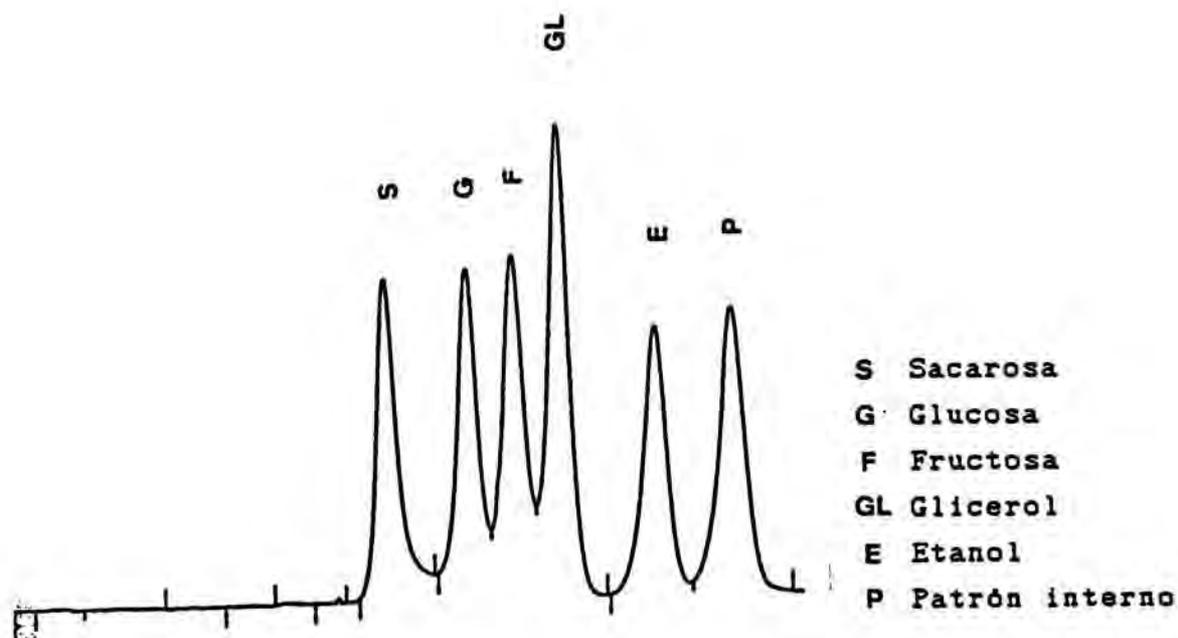


Figura 22 : Cromatograma ejemplo correspondiente a una solución estandar de azúcares.

## 6.5. - DETERMINACION DE CARBONILOS

Se plantea el análisis de carbonilos totales, así como, la determinación de carbonilos volátiles libres. El fundamento de ambos métodos se basa en la derivatización de los carbonilos con el reactivo 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) para la identificación posterior de las DNPS formadas (ver apartado 5.2.).

En la determinación de los compuestos carbonílicos libres se realiza previamente una extracción de la fracción volátil y, en cambio, el análisis de los totales se lleva a cabo por derivatización directa, lo cual, debido al medio ácido del reactivo, provoca una hidrólisis en la combinación aldehído-bisulfito.

### 6.5.1- DETERMINACION DE CARBONILOS TOTALES POR ESPECTROFOTOMETRIA

La determinación de compuestos carbonílicos totales se realiza por lectura espectrofotométrica, tras la extracción de los compuestos DNPS formados, según la técnica descrita por Toren y Heinrich (1955).

Este método lo estudiaremos más a fondo ya que se ha puesto a

punto en este trabajo, con vistas a correlacionar la evolución de este parámetro con otros implicados en el pardeamiento, principalmente, carbonilos libres y dióxido de azufre.

El principal inconveniente de este método es que, el reactivo DNP<sub>H</sub> absorbe en la misma región que las DNPS formadas, por lo que es necesario añadir una fase orgánica de isoctano (2,2,4-trimetilpentano). Las DNPS son mucho más solubles en isoctano que el reactivo DNP<sub>H</sub> y esta diferencia de solubilidad se aprovecha para desarrollar una extracción que permita la lectura espectrofotométrica directa.

Asimismo, el sistema bifásico, isoctano-DNP<sub>H</sub>, desplaza el equilibrio de reacción con lo que se consigue una mayor extracción y acortar el tiempo del análisis (Selin, 1977). Sin embargo, a pesar del empleo de esta fase orgánica, que reduce la interferencia de la DNP<sub>H</sub>, es necesario realizar un blanco de reactivos, tomándolo como referencia, en la lectura espectrofotométrica. Se observa que la línea de calibración para los compuestos carbonílicos es independiente de la solución reactivo si paralelamente se determina un blanco.

Para la derivatización se emplea una solución saturada de DNP<sub>H</sub> en HCl 2N que proporciona el medio ácido para que la reacción transcurra completamente. En el caso de que la muestra forme emulsiones se añade solución salina saturada que facilita la

extracción.

Del estudio del espectro de absorción de las distintas DNPS de compuestos carbonílicos, se observa que, todas ellas, presentan un máximo a 330 nm aproximadamente, por lo que la determinación espectrofotométrica se realiza a esta longitud de onda.

#### 6.5.1.1. - DESCRIPCION DEL METODO

##### **Material y reactivos**

- Isoctano para análisis.
- Reactivo DNPH en solución clorhídrica 2 N.
- Solución saturada de NaCl en agua bidestilada.
- Patrón de acetaldehído (Merck).
- Espectrofotómetro Perkin-Elmer. Modelo 5515 UV/VIS. Cubetas de 10 mm de espesor.

##### **Procedimiento**

En un embudo de decantación se ponen 10 ml de reactivo DNPH, 10 ml de isooctano, 5 ml de solución salina y 1 ml de muestra de vino. Se agita suavemente durante 30 minutos y, a continuación, se separa la fase de isooctano, que contiene los derivados DNPS, y se lee espectrofotométricamente a 330 nm

frente a un blanco realizado, paralelamente, con los reactivos. La cuantificación se lleva a cabo mediante un calibrado con cantidades crecientes de acetaldehído patrón (mg/l).

#### 6.5.1.2. - CALIBRADO

Para realizar el calibrado de este método de determinación de carbonilos totales, se ha procedido añadiendo cantidades crecientes de los distintos carbonilos estudiados en embudo de decantación, que contiene el sistema bifásico, y realizando la extracción y lectura espectrofotométrica como se indica en el apartado anterior, es decir, por derivatización directa.

Se hicieron varias calibraciones con patrones de distintos compuestos carbonílicos y se obtuvieron diferencias significativas en la cuantificación, según el patrón empleado. Este punto dificultaba la cuantificación, sin embargo, por considerar el acetaldehído como compuesto carbonílico mayoritario en el vino, se cuantifican los compuestos carbonílicos totales en función de esta sustancia.

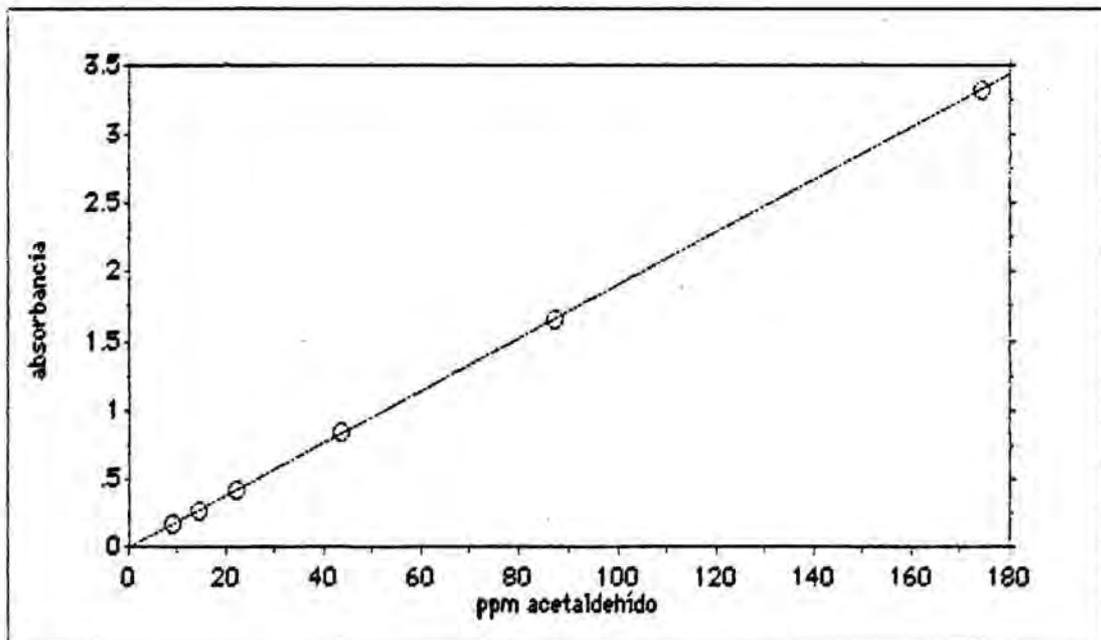
Los resultados se pueden ver en la tabla 23 y en la gráfica 22 y corresponden a la media de tres determinaciones para cada concentración patrón.

TABLA 22

ppm acetaldehído	x absorbancia n = 3	Cv(%)	Absorbancia/ppm
8.70	0.178	2.2	0.020
13.90	0.268	1.9	0.019
21.75	0.422	1.8	0.019
43.50	0.835	0.5	0.019
87.00	1.668	0.8	0.019
174.00	3.320	0.4	<u>0.019</u>

Cv = 2.13 %

GRAFICA 23



La recta de calibrado vendrá expresada por:

$$y = 0.019 x + 0.006 \quad r = 0.9999$$

Para el ensayo de linealidad se ha hallado la relación respuesta espectrofotométrica/concentración. Se considera que existe buena linealidad cuando el coeficiente de variación del cociente es inferior al 4%. En este caso (ver tabla 22) son inferiores al 2,13 %, por lo que, el calibrado en este rango de concentraciones se puede considerar lineal.

#### 6.5.1.3. - ENSAYO DE LA EXACTITUD-RECUPERACION

El ensayo de recuperación se ha realizado añadiendo a una muestra de cava, cantidades conocidas de los aldehídos estudiados y realizando la determinación según el método propuesto en el apartado 6.5.1.1.

Se realizan tres análisis para la muestra y otros tres para cada concentración de acetaldehído patrón añadida. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 24 y se considera que estos valores entran dentro de los límites señalados por Horwitz para esta concentración.

TABLA 24

Absorbancia n = 3	concentración inicial ppm	concentración añadida ppm	concentración hallada ppm	% Recuperación
$\bar{x} = 0.032$ Cv = 1.2 %	1.36	--	--	--
$\bar{x} = 0.147$ Cv = 1.0 %	1.36	8.7	7.42	69.6 %
$\bar{x} = 0.274$ Cv = 0.7 %	1.36	17.4	14.37	74.8 %

6.5.1.4. - PRECISION DEL METODO

Se realiza un ensayo de repetibilidad mediante ocho determinaciones de una misma muestra. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 25.

Un coeficiente de variación del 2.2 % es admitido dentro de los límites establecidos por Horwitz para esta concentración.

Al estar la muestra expuesta al aire y a la luz, no se considera apropiado realizar el análisis de la reproductibilidad.

ya que precisamente, este trabajo trata de la evolución de los carbonilos con el tiempo.

TABLA 25

<u>Absorbancia</u>	<u>Concentración (ppm)</u>	
1.500	7.86	
1.472	7.71	
1.542	8.08	n = 8
1.546	8.10	x = 7.91
1.477	7.74	
1.472	7.71	Cv = 2.2 %
1.540	8.07	
1.530	8.02	

#### 6.5.2- DETERMINACION DE CARBONILOS VOLATILES POR C.L.A.E.

La analítica de los compuestos carbonílicos en vinos requiere, en primer lugar, un proceso de extracción o concentración, puesto que los carbonilos volátiles son compuestos minoritarios en la muestra.

Por tratarse de un grupo tan definido estructuralmente, se ha optado por el método de derivatización indirecto con el reactivo dinitrofenilhidracina (DNPH), el cual reacciona en medio ácido con el radical carbonilo, para dar lugar a la dinitrofenilhidrazona (DNPS) del aldehído o cetona correspondiente (ver apartado 5.2.1.)

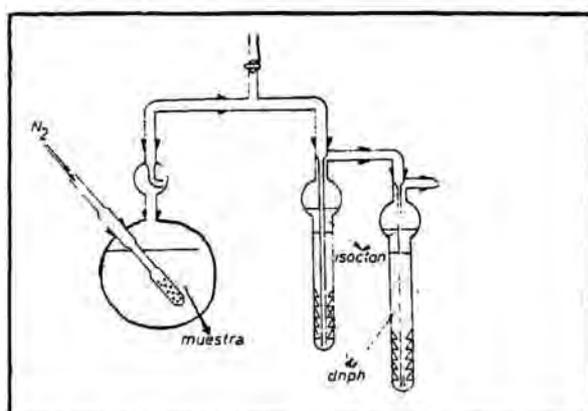
Se ha seguido el método propuesto por Fernández (1988), desarrollado en nuestro Laboratorio, consistente en la extracción de la fracción volátil por arrastre con nitrógeno y posterior condensación en un medio bifásico que contiene el reactivo derivatizador, DNPH en medio ácido, e isooctano. La identificación y cuantificación se realiza por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (C.L.A.E.).

En este trabajo se amplía la identificación cromatográfica de nuevos carbonilos, y se estudian distintas variaciones en la extracción a fin de contemplar la posibilidad de su optimización.

### 6.5.2.1. -CONCENTRACION Y EXTRACCION DE LA FRACCION VOLATIL

#### **Material y reactivos**

- Solución saturada de dinitrofenilhidracina en HCl 2N.
- Solución de HCl 2N, purificado por borboteo de nitrógeno durante cinco horas con agitación continua a 40°C.
- Isoctano purificado por borboteo de nitrógeno durante cinco horas con agitación continua a 40°C.
- Gas nitrógeno.
- Material de laboratorio necesario para montar el sistema de extracción que se indica a continuación. Este material debe de mantenerse en estufa a 200 °C durante 12 h., con el fin de eliminar trazas de carbonilos volátiles.
- Sulfato sódico anhidro.
- Evaporador rotatorio.
- Filtro Millipore de 0,45  $\mu$ .



Aparato de extracción.

## Procedimiento

En primer lugar, se preparan los borboteadores, colocando en cada uno 30 ml del reactivo DNPH y 30 ml de isooctano. Se ajustan las conexiones y se introduce en el matraz de dos bocas, un agitador y 100 ml de muestra, previamente desgasificada al ultrasonidos.

A continuación se hace borbotear nitrógeno a un flujo de 160 ml/min durante cinco horas, manteniendo la muestra en agitación continua y a temperatura ambiente para evitar la formación de artefactos.

Se recoge el contenido de los borboteadores y se pasa a un embudo de decantación, separando la fase de isooctano. Se realizan dos extracciones más con 30 ml de isooctano, que se añaden a la fracción inicial.

Los extractos de isooctano, conteniendo los derivados DNPS de los carbonilos, se filtran por sulfato sódico anhidro y se evaporan a sequedad en rotavapor a  $30 \pm 2$  °C. El residuo seco se disuelve en 5 ml de metanol y se filtra con filtro Millipore de 0,45  $\mu$ . De esta solución metanólica se inyectan 10  $\mu$ l para la separación de carbonilos por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).

### 6.5.2.2-SEPARACION POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA

Como fase estacionaria se ha utilizado una columna Lichrosorb-RP-18 de 5  $\mu$  de tamaño de partícula y de 25 cm x 4 mm de tamaño de columna.

Las mejores resoluciones cromatográficas se consiguen con fases móviles de carácter polar. Sin embargo, presentan el problema de no resolver bien la fase final del cromatograma, así como de alargar los tiempos de retención. Las condiciones de trabajo propuestas utilizan gradiente de concentración en una primera etapa (desde una fase móvil inicial que contiene un 30% de agua, a la cual se adiciona gradualmente mezcla de disolventes más apolares, metanol:acetonitrilo (90:10)) y condiciones isocráticas en una segunda etapa (con fase móvil que contiene un 5 % de agua).

#### **CONDICIONES CROMATOGRAFICAS**

**Aparato:** Cromatógrafo Perkin-Elmer (S- 3); horno LC-100; detector UV de longitud de onda variable (LC-55B); integrador Hewlett-Packard, modelo 3390 A.

**Columna:** Lichrosorb-RP-18 ( 5  $\mu$  ), 250 x 4 mm.

**Fase móvil:** Metanol: Acetonitrilo ( 90 : 10 ) calidad CLAE.

Agua desionizada para CLAE.

Eluyente inicial: Metanol:Acetonitrilo (90:10)

70 % - 30% agua.

Gradiente: 1,6 ml/min durante 15 minutos. Curva 3.  
Eluyente final: Metanol:Acetonitrilo (90:10) 95%  
- 5% agua durante 20 minutos.  
Tiempo de equilibrio: 15 minutos.

**Longitud de onda** : 360 nm.

**Flujo** : 0,7 ml / min.

**Temperatura** : 30 2C.

**Tiempo total** : 35 minutos.

#### 6.5.2.3.- IDENTIFICACION DE LOS PICOS CROMATOGRAFICOS

En primer lugar, se procede a la obtención de los patrones de DNPS correspondientes a compuestos carbonílicos, por derivatización directa y purificación de los derivados.

A continuación, se preparan mezclas patrón de las distintas DNPS de los carbonilos y se separan por CLAE según las condiciones experimentales explicadas en el apartado anterior.

Adicionando una cantidad de la DNPS patrón a una muestra, se puede llegar a reconocer el pico problema al observarse un aumento del pico correspondiente a la DNPS añadida. También, se pueden identificar los picos correspondientes a cada DNPS mediante los tiempos de retención relativos, tal y como se explicará más

adelante. La figura 26 corresponde a tres cromatogramas obtenidos: el primero tras inyectar una solución patrón, el segundo una muestra problema y el tercero una muestra problema más la solución patrón.

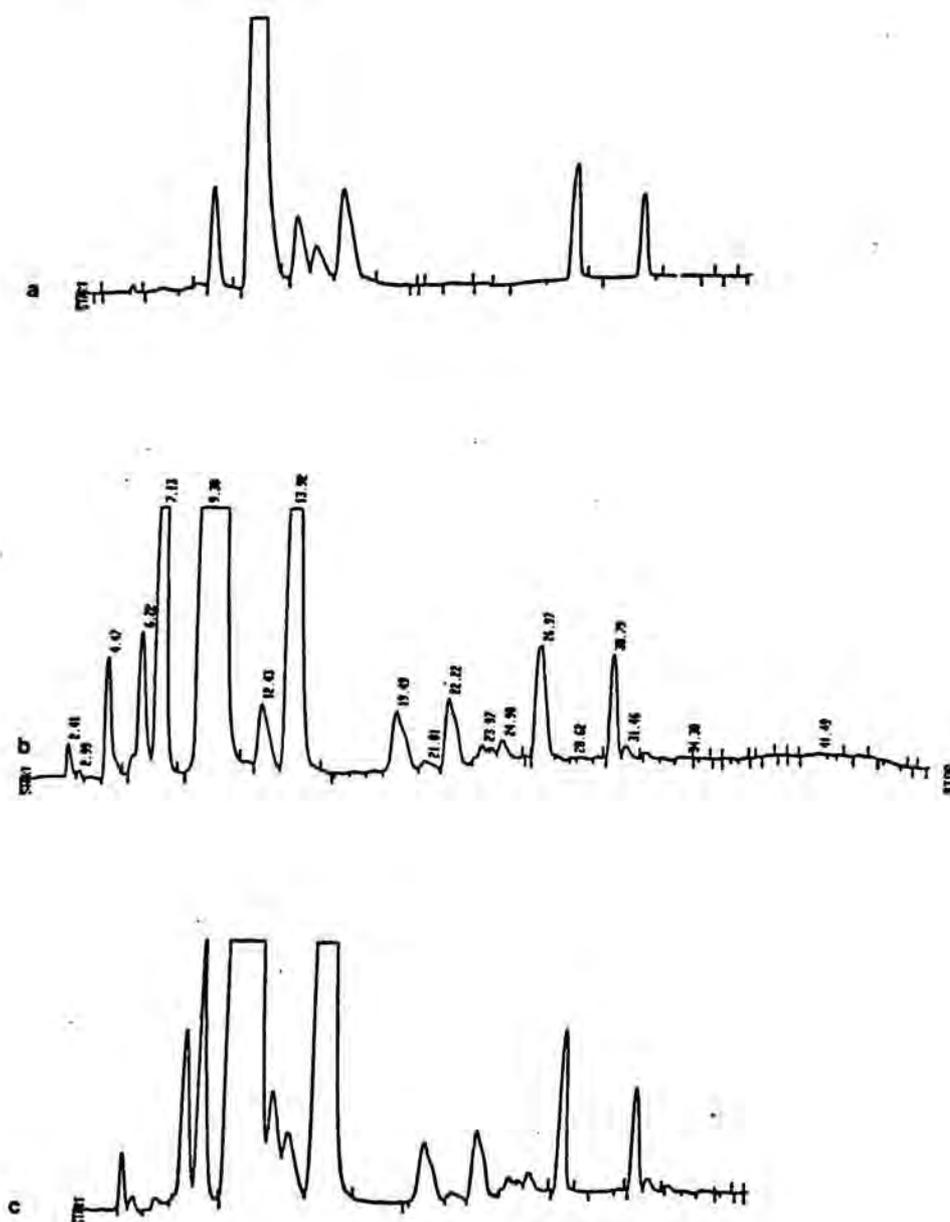
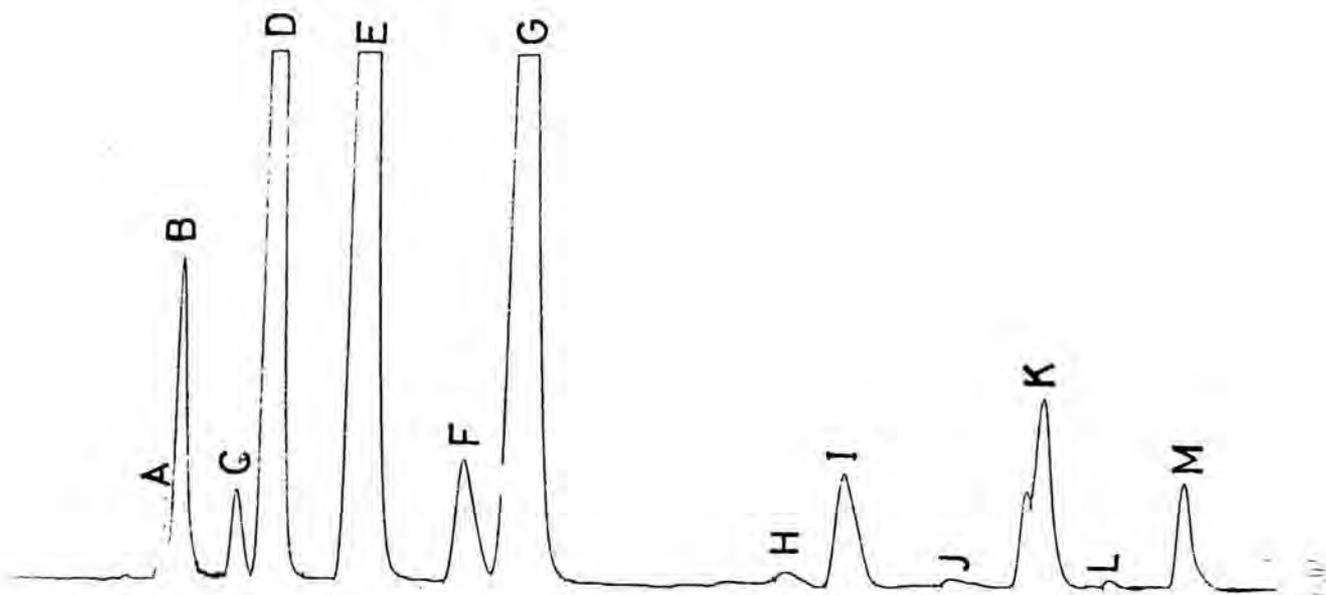


FIGURA 26

Cromatogramas obtenidos al inyectar : a) solución patrón, b) muestra de vino, c) solución patrón más muestra de vino.

En la figura se recoge un cromatograma correspondiente a una mezcla de patrones:



Estos picos corresponden a:

- |                                     |                         |
|-------------------------------------|-------------------------|
| A Metanol (disolvente)              | J Metil-isobutil-cetona |
| B DNPH (reactivo)                   | K Hexanal               |
| C No identificado                   | L Heptanal              |
| D Formaldehído                      | M Octanal               |
| E Acetaldehído + Diacetilo + Acetal |                         |
| F Furfural                          |                         |
| G Propanal + Acroleína + Acetona    |                         |
| H Hidroxibenzaldehído               |                         |
| I Benzaldehído                      |                         |

Es de señalar que los picos eluyen en función de su polaridad y, generalizando, según su volatilidad y número de átomos de carbono. Esto coincide con la bibliografía consultada, por lo que, pese a no haber sido identificados, la zona media del cromatograma correspondería a las cetonas y aldehídos de 4 a 5 átomos de carbono, así como carbonilos de cadena más larga pero que presentan grupos polares en su estructura.

El acetaldehído, acetal y diacetilo eluyen conjuntamente y, debido a la falta de resolución de la columna y a la afinidad estructural de estas tres sustancias, pese a cambiar las condiciones cromatográficas no se ha logrado su separación. Un caso análogo es el referente al propanal, acroleína y acetona, compuestos, todos ellos, por tres átomos de carbono.

En el caso del hexanal, se observa un pico doble. Este hecho es frecuente y ampliable a compuestos carbonílicos de cadena larga. Los distintos autores lo atribuyen a un desdoblamiento de la isomería cis-trans, o bien a la presencia de insaturaciones, como pudiera ser, en este caso, el 2-hexenal.

Al no trabajar en condiciones isocráticas, sino con gradiente de concentración, se observa una cierta variabilidad en los tiempos de retención. Esto sucede, principalmente, en la zona intermedia del cromatograma, ya que corresponde a la zona en que comienzan unas nuevas condiciones de desarrollo del programa

utilizado. Los tiempos relativos respecto al metanol, como primer pico del cromatograma, o respecto al octanal, como último pico del cromatograma, presentan también ciertas variaciones, por lo que se han calculado respecto a un pico intermedio (propanal). Este pico se obtiene como impureza de los disolventes y no se elimina totalmente durante la fase de purificación.

El tiempo de retención relativo se calcula pues, según la siguiente expresión :

$$t_{\text{relativo}} = \frac{t_r \text{ problema} - t_r \text{ metanol}}{t_r \text{ propanal} - t_r \text{ metanol}}$$

**Tiempos de retención relativos al propanal:**

Formaldehído: 0.41	Acroleína: 1
Acetaldehído: 0.61	Acetona: 1.
Acetal: 0.61	Benzaldehído: 1.84
Diacetilo: 0.61	Hexanal: 2.12
Furfural: 0.87	Octanal: 2.45
Propanal: 1	

#### 6.5.2.4. -ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA DE LOS REACTIVOS

##### (BLANCO)

Uno de los mayores problemas encontrados durante el estudio del método, fue la obtención de reactivos cuyo contenido en carbonilos fuese bajo. Se ha observado un alto contenido en éstos compuestos en los disolventes, así como en el ácido clorhídrico y material utilizados. Hay que considerar que las cantidades que se van a cuantificar son del orden de ppb.

Para evitar estas interferencias el material se mantiene durante 12 horas a 200 °C. A esta temperatura los carbonilos son volátiles, con lo que se obtienen buenos resultados; el mayor problema reside en la purificación de los reactivos.

Tras el borboteo de los reactivos con nitrógeno a 40°C, se han obtenido los mejores resultados. Así, por ejemplo, con el propanal se obtiene un descenso en la concentración de un 85% del valor inicial.

Se ha realizado un estudio de repetibilidad del blanco. Para esto se han derivatizado los reactivos en embudo de decantación, como si se tratara de un extracto real, y se han efectuado siete blancos que corresponden a 60 ml de DNPH y a 120 ml de isooctano.

Las impurezas halladas corresponden al formol, acetaldehído y propanal. Los resultados de este estudio se recogen en la tabla 27 y se puede observar que los coeficientes de variación son correctos en relación a la concentración. Estos valores se descontarán de los resultados obtenidos en el análisis de muestras.

TABLA 27: Estudio de repetibilidad del blanco de reactivos.

<u>FORMOL</u>	<u>ACETALDEHIDO</u>	<u>PROPANAL</u>
2.21	1.27	15.74
2.48	1.33	16.15
2.51	1.36	13.60
1.96	1.28	16.14
2.80	1.37	17.19
<u>2.81</u>	<u>1.36</u>	<u>17.12</u>
$\bar{x} = 2.46$ ppb	$\bar{x} = 1.32$ ppb	$\bar{x} = 15.99$ ppb
Cv = 13%	Cv = 4%	Cv = 8%

#### 6.5.2.5. - CALIBRACION Y LINEALIDAD

Uno de los mayores problemas hallados a la hora de la cuantificación, ha sido el observar que la velocidad de derivatización no es igual para los distintos carbonilos estudiados. Para evitarlo se realiza una derivatización directa de una solución patrón que contiene todos los compuestos carbonílicos que se desean cuantificar. Las condiciones de reacción han sido iguales a las que se aplica en el caso de una muestra real (ver apartado 6.5.2.1), a excepción del arrastre con nitrógeno. Asimismo, con este sistema se tiene la ventaja de evitar los errores debidos a la integración cromatográfica.

Los márgenes de concentración se adaptan en cada compuesto estudiado a los que se presuponen tienen en la muestra. Los resultados se recogen en las figuras 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34. Se obtienen en todos los casos unos coeficientes de correlación óptimos. Del estudio de linealidad (respuesta cromatográfica/concentración) se obtienen unos coeficientes de variación inferiores al 4 % , por lo que se pueden considerar lineales en el rango de concentraciones estudiado.

### RECTAS DE CALIBRADO EXPRESADAS EN CARBONILOS

FORMOL	$y = 49826 x - 2461$	$r = 0.9994$
ACETALDEHIDO	$y = 44726 x - 5129$	$r = 0.9996$
FURFURAL	$y = 5548 x - 668$	$r = 0.9998$
PROPANAL	$y = 50342 x - 6479$	$r = 0.9993$
BENZALDEHIDO	$y = 13158 x - 1624$	$r = 0.9995$
HEXANAL	$y = 13526 x + 225$	$r = 0.9999$
OCTANAL	$y = 7850 x - 4$	$r = 0.9999$

### RECTAS DE CALIBRADO EXPRESADAS EN DNPS

FORMOL	$y = 6976 x - 2652$	$r = 0.9994$
ACETALDEHIDO	$y = 8495 x - 5230$	$r = 0.9996$
FURFURAL	$y = 1884 x - 621$	$r = 0.9998$
PROPANAL	$y = 12120 x - 8117$	$r = 0.9993$
BENZALDEHIDO	$y = 4870 x - 1680$	$r = 0.9995$
HEXANAL	$y = 4734 x + 185$	$r = 0.9999$
OCTANAL	$y = 3218 x - 1$	$r = 0.9999$

FIGURA 28: Calibrado del Formaldehido

<u>c:concentración (mg/l)</u>	<u>a:área</u>	<u>a/c</u>
15.05	750970	6925
7.52	355070	6606
7.33	377040	7197
5.01	241380	6737
1.67	78879	6606
1.46	67290	6421
1.25	61724	6898
1.00	51776	7221
0.73	35146	<u>6707</u>

Cv = 4 %

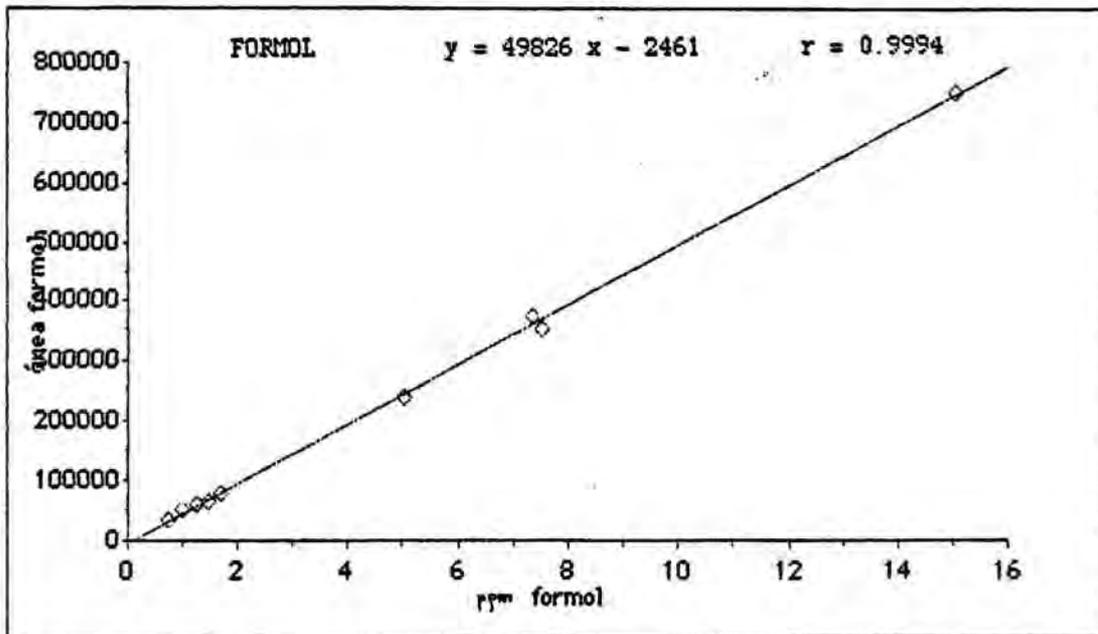


FIGURA 29: Calibrado del acetaldehído

<u>c: Concentración (mg/l)</u>	<u>a: área</u>	<u>a/c</u>
24.42	1098000	8543
12.21	532370	8284
8.14	339800	7932
4.88	210571	8190
4.07	168160	7851
3.45	145340	8008
3.31	142929	8204
2.03	96267	8988
1.62	71323	8322
1.15	49607	8199
0.54	23146	<u>8121</u>

Cv = 3.5 %

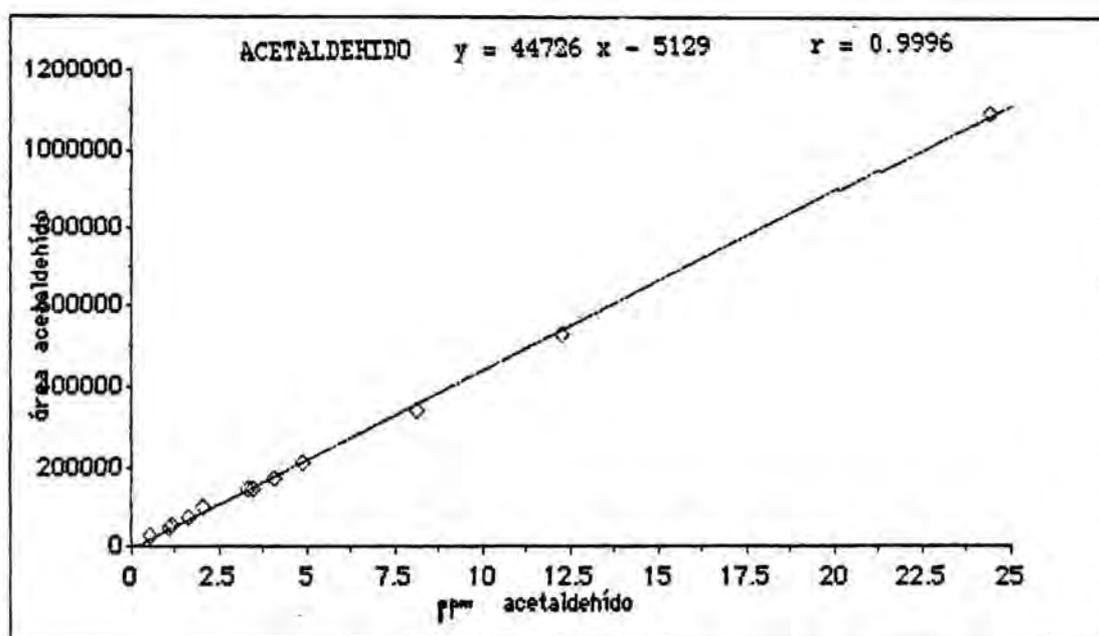
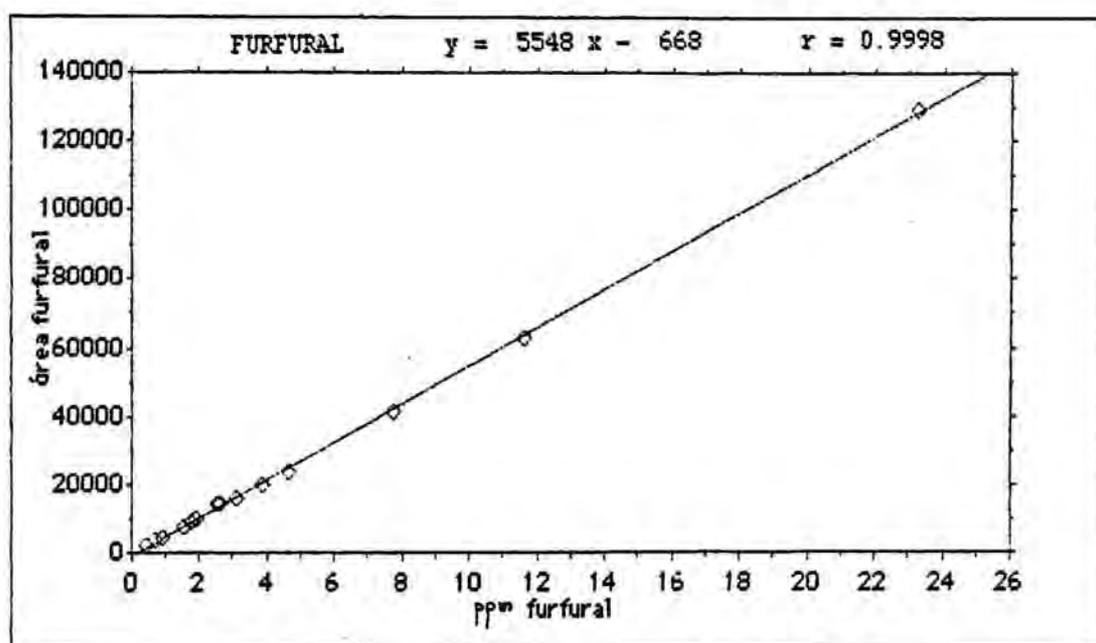


Figura 31: calibrado del furfural

c: concentración (mg/l)	a: área	a/c
23.24	129290	1891
11.62	62853	1839
7.75	41307	1812
4.65	23847	1744
3.87	20039	1759
3.10	16237	1782
2.60	14421	1861
1.93	10148	1783
1.75	8960	1736
0.88	4564	1769
0.67	3720	1879
0.44	2280	<u>1767</u>

Cv = 3.3 %



**FIGURA 30:** Calibrado del propanal

<u>c: concentración (mg/l)</u>	<u>a: área</u>	<u>a/c</u>
16.70	845376	12149
8.35	414050	11901
7.07	334743	11354
5.56	253790	10944
2.78	136095	11742
1.85	88420	11453
1.41	69617	11799
1.38	66964	11626
0.71	32313	10953

Cv = 3.4%

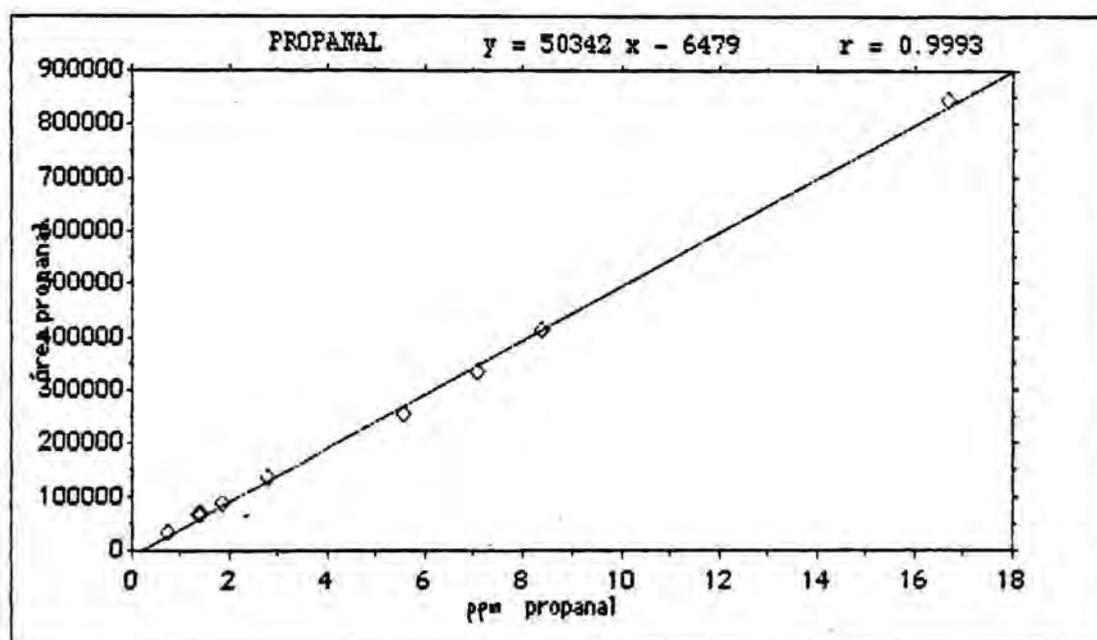
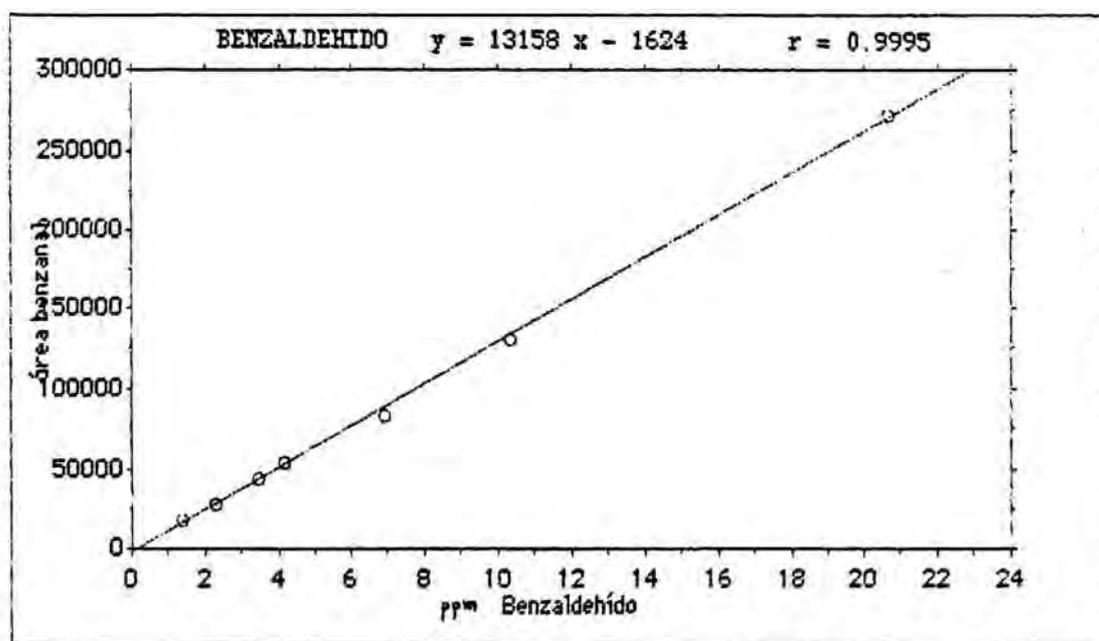


FIGURA 32: Calibrado del benzaldehído

<u>c:concentración (mg/l)</u>	<u>a:área</u>	<u>a/c</u>
20.63	272420	4887
10.31	131635	4689
6.87	84017	4524
4.12	54096	4851
3.43	45014	4850
2.28	27493	4449
1.37	18088	<u>4862</u>

Cv = 3,8 %



**FIGURA 34:** calibrado del hexanal

<u>c: concentración (mg/l)</u>	<u>a: área</u>	<u>a/c</u>
24.23	328610	4747
12.11	166510	4782
8.07	105952	4592
4.85	64305	4632
3.23	44277	4797
2.69	37135	4835
2.19	30210	4818
1.61	22576	4897
1.10	15525	<u>4944</u>

Cv = 2.5 %

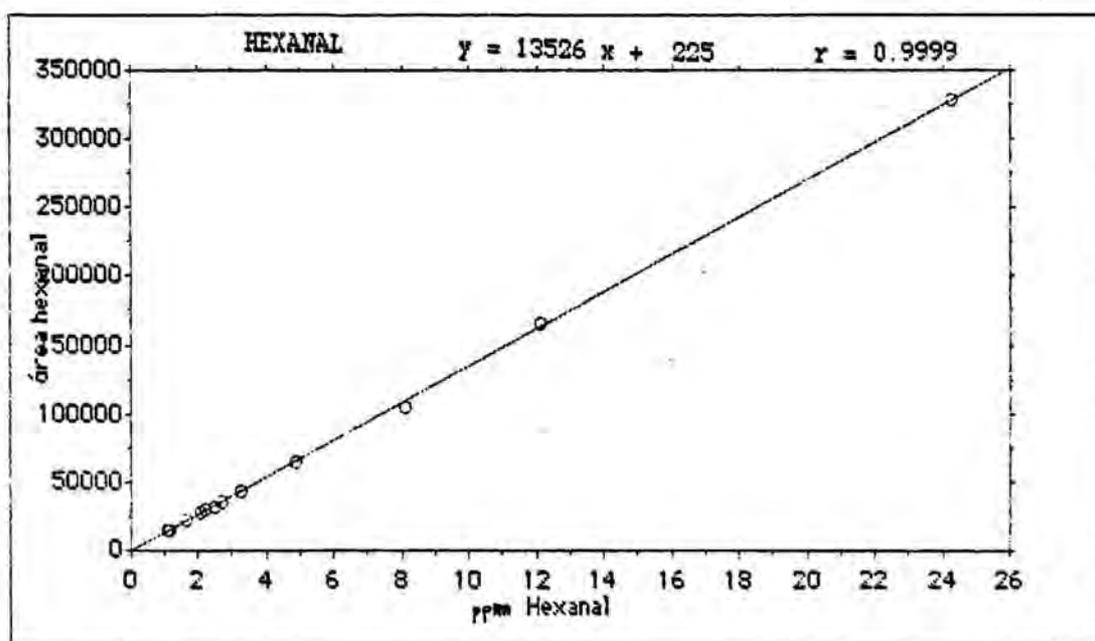
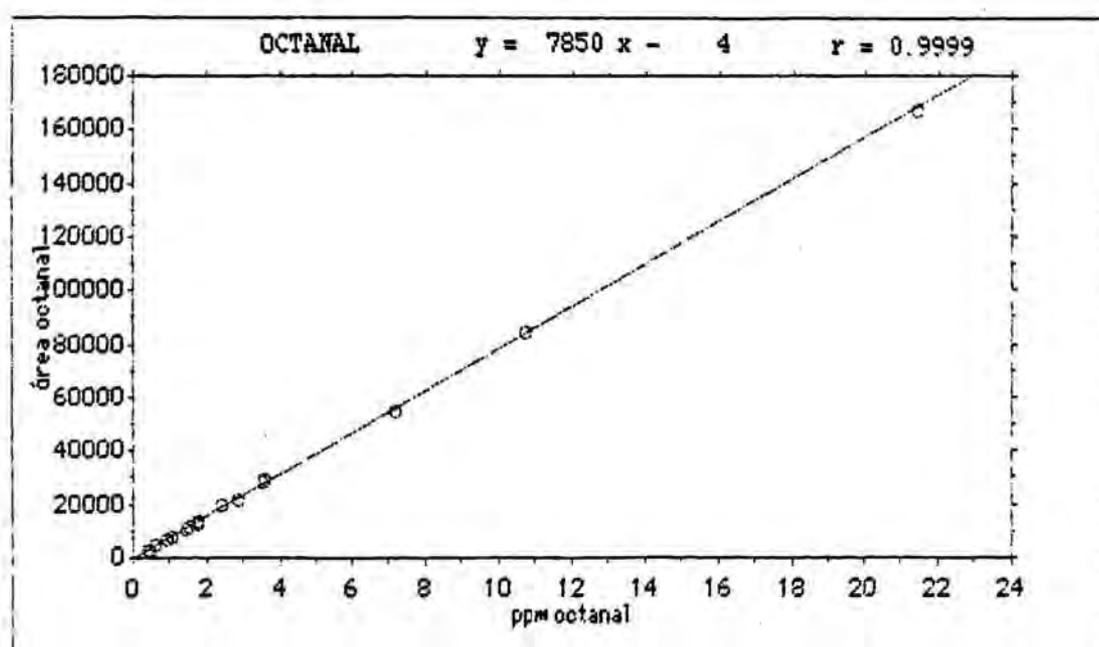


FIGURA 33: Calibrado del octanal

c: concentración (mg/l)	a: área	a/c
21.4	167650	3212
10.7	85028	3257
7.13	54912	3262
3.57	29088	3343
2.85	22016	3163
1.78	13700	3149
1.48	11320	3144
1.04	7875	3112
0.88	7000	3256
0.56	4569	3359
0.37	3000	<u>3333</u>

Cv = 2.8 %



#### 6.5.2.6. - ESTUDIO DE LA EXACTITUD-RECUPERACION

El ensayo de recuperación se ha realizado añadiendo a una muestra, cantidades conocidas de los carbonilos estudiados. El contenido se extrae y cuantifica por duplicado.

Se consideran las recuperaciones por separado para cada compuesto carbonílico, ya que éstas dependen en gran medida de su volatilidad y de su grado de unión al dióxido de azufre. Además, mediante este ensayo se estudian distintos factores como pueden ser la velocidad del flujo del arrastre con nitrógeno y la recuperación en embudos de decantación.

Los resultados de este ensayo se recogen en el cuadro 35 y los valores de las recuperaciones quedan dentro de los límites indicados por Horwitz (1982) para las concentraciones de trabajo. Hay que tener en cuenta la complejidad del proceso extractivo y que la extracción con isooctano (necesario para eliminar el exceso de reactivo DNPB que interfiere en la determinación posterior) no tiene un rendimiento muy alto por tratarse de un disolvente muy apolar. Otros sistemas diferentes de purificación del extracto (utilizando otros disolventes o cromatografía en columna con florisil) no dieron resultados satisfactorios.

TABLA 35: ESTUDIO DE LA RECUPERACION

	<u>ppm iniciales</u>	<u>ppm añadidas</u>	<u>ppm encontradas</u>	<u>%Recuperación</u>
Formol	5.2	1.6	5.3	78 %
	0.4	1.5	1.2	63 %
<hr/>				
Etanal	0.7	2.2	2.0	69 %
	0.1	1.8	1.3	74 %
<hr/>				
Furfural	-	1.3	1.1	83 %
	-	2.3	1.5	64 %
<hr/>				
Propanal	2.7	1.7	3.6	82 %
	10.3	1.1	10.2	89 %
<hr/>				
Benzanal	-	2.0	1.4	70 %
	-	4.0	2.7	67 %
<hr/>				
Hexanal	2.0	1.7	3.0	81 %
	-	2.4	1.9	79 %
<hr/>				
Octanal	-	1.9	1.4	74 %
	-	3.9	3.0	77 %
<hr/>				

## INFLUENCIA DEL FLUJO DE NITROGENO

Se determina la recuperación a dos flujos distintos: 160 ml/min y 260 ml/min. No es posible reducir más la velocidad del aire ya que, al ser muy baja, se presentan irregularidades en la corriente de gas y el método pierde repetibilidad.

ppm iniciales   ppm añadidas   ppm encontradas   %Recuperación

### 260 ml/min de N<sub>2</sub>

Formol	4.50	0.60	3.32	65 %
Etanal	150.40	1.01	100.50	66 %
Furfural	-	0.80	-	0 %
Hexanal	3.23	0.68	3.11	79 %
Octanal	-	0.79	0.57	72 %

### 160 ml/min de N<sub>2</sub>

Formol	4.05	0.60	4.56	89 %
Etanal	150.40	1.01	149.51	96 %
Furfural	-	0.80	0.57	70 %
Hexanal	3.23	0.68	3.11	79 %
Octanal	-	0.79	0.63	80 %

Con el flujo de 260 ml/min se observa que las cantidades encontradas son menores que las cantidades iniciales, por lo que es de suponer que el flujo del N<sub>2</sub> es excesivo, lo que conduce a

unas considerables pérdidas en los compuestos volátiles. Sin embargo, a 160 ml/min de N<sub>2</sub> se obtienen valores de recuperación mucho más elevados por lo que se propone como condición en el método extractivo.

### **RECUPERACION EN EMBUDO DE DECANTACION**

Para estudiar las pérdidas en el transcurso de la extracción, se determina la recuperación en los embudos de decantación, es decir, en la segunda parte del proceso extractivo. Se procede a añadir cantidades conocidas de DNPS de distintos carbonilos al sistema bifásico (60 ml DNPH + 60 ml de isoctano) contenido en los embudos y extrayendo con 2 fracciones de 30 ml de isoctano. A continuación se procede como si se tratara de una muestra real.

En la tabla 36 se exponen los resultados obtenidos (expresados en ppm de DNPS). Esta recuperación se ha efectuado a dos niveles, cada uno de ellos por duplicado.

Se observa que cuanto mayor es la concentración, mayor es la recuperación. Las peores recuperaciones se presentan cuando la concentración es menor y dependiendo en gran medida de la primera fase de "stripping", es decir del arrastre con nitrógeno.

TABLA 37: Recuperación en embudo de decantación

	ppm inicial	ppm añadidas	ppm encontradas	% recuperación
Formol	0.5	2.4	2.6	90 %
	0.5	1.2	1.5	89 %
Etanal	0.6	21.4	21.9	99 %
	0.6	10.7	10.6	94 %
Furfural	-	2.6	2.6	100 %
	-	1.3	1.2	92 %
Hexanal	0.3	3.4	3.4	92 %
	0.3	1.7	1.7	85 %
Octanal	-	4.2	4.1	98 %
	-	2.1	2.0	95 %

### 6.5.2.7. - PRECISION

En la tabla 38 se exponen los resultados del estudio de repetibilidad realizado por Fernández (1988). Los coeficientes de variación (entre 3.0 - 12 %) satisfacen los requerimientos de la ecuación de Horwitz (1982) por lo que la precisión es correcta.

En este apartado se incluye un estudio de la estabilidad de un extracto metanólico de DNPS, conservado a 42C e inyectado periódicamente, durante 15 días, en las mismas condiciones cromatográficas. Los resultados se exponen a continuación:

<u>Formol</u>	<u>Acetaldehído</u>	<u>Furfural</u>	<u>Hexanal</u>	<u>octanal</u>	<u>propanal</u>
4.9	157.1	1.0	3.3	0.7	6.8
4.8	154.0	0.8	3.3	0.7	6.9
4.6	158.3	1.0	3.4	0.8	6.9
4.6	157.1	0.8	3.5	0.8	7.1
4.7	150.9	0.9	3.4	0.7	7.0
4.7	160.0	1.1	3.5	0.7	6.9
4.8	154.3	0.8	3.3	0.8	6.8
4.7	154.2	0.9	3.3	0.7	7.0
<hr/>					
$\sigma_{\bar{x}} = 0.1$	$\sigma_{\bar{x}} = 2.9$	$\sigma_{\bar{x}} = 0.1$	$\sigma_{\bar{x}} = 0.08$	$\sigma_{\bar{x}} = 0.05$	$\sigma_{\bar{x}} = 0.1$
$\bar{x} = 4.7$	$\bar{x} = 155.7$	$\bar{x} = 0.9$	$\bar{x} = 3.4$	$\bar{x} = 0.74$	$\bar{x} = 6.9$
Cv=2.2 %	Cv=2.0 %	Cv= 12 %	Cv= 2.6 %	Cv=7.0%	Cv=1.5%

Para estas concentraciones (ppm), se puede considerar que el extracto es estable, durante los 15 días que dura el estudio, ya que los coeficientes de variación están dentro de los límites calculados según la ecuación de Horwitz.

	n	media	desviación estandar	coeficiente de variación
Formaldehido	8	1700 ppb	20,40	12,0%
Acetaldehido	8	5140 ppb	0,44	8,5%
Furfural	8	228 ppb	22,40	9,8%
Hexanal	8	426 ppb	13,15	3,0%
Octanal	8	432 ppb	15,10	3,4%

**TABLA 38**

Ensayo de precisión para el método de determinación de carbonilos volátiles libres.

## 7. - OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

El objeto de este trabajo consiste en el estudio de la evolución de los compuestos carbonílicos, su posible relación con las modificaciones del color, demás parámetros relacionados con el envejecimiento de los cavas, y la estabilidad en la conservación.

Según la bibliografía consultada, los aldehídos volátiles, formados durante el almacenamiento, parecen ser la principal causa del flavor oxidado y, por ello, la investigación se ha dirigido, principalmente, hacia la determinación de estos compuestos y sus posibles implicaciones en el pardeamiento.

Sin embargo, la influencia de los carbonilos en los procesos deteriorativos del cava no se pueden evaluar solamente con su analítica. Es preciso considerar otra serie de parámetros con los que se halla relacionados, sobre todo, aquellos que afectan a su formación y evolución.

Como se ha expuesto anteriormente, se trata de un fenómeno muy complejo, por lo que nos centraremos en el estudio de la influencia que, sobre la formación de aldehídos y cetonas, tienen los compuestos polifenólicos (procesos oxidativos) y los fenómenos de pardeamiento (Reacción de Maillard).

Con este objetivo, se dispone de dos tipos de cava de cosechas diferentes. Las más antiguas (2 años) son vinos de alta calidad, con bajo contenido en azúcares (tipo Brut) y procedentes de mosto de primeras o mosto flor, las denominaremos **CAVA A**. Las más recientes (1 año) son cavas de calidad media, procedentes de mostos de primeras y de segundas, con un contenido también bajo en azúcares y que denominaremos **CAVA B**.

En ambas series, se homogenizan varias botellas del mismo tipo a repartir en distintas botellas, guardándose en las mismas condiciones. Para distinguir la posible influencia de los licores de expedición (ricos en azúcar) en el envejecimiento del cava, a la mitad de las botellas se les añade 50 ml de un licor elaborado con cava Brut y sacarosa. Las muestras quedan con un contenido de 500 ml de vino por botella y la mitad contienen aproximadamente 50 mg/l de sacarosa (equivalente a un licor de expedición de cava categoría Dulce). El muestreo queda establecido de la siguiente forma:

- **Cava A** = 500 ml cava con 2 años de antigüedad / botella de 750 ml de capacidad.
  
- **Cava A + azúcar** = 450 ml cava con 2 años de antigüedad + 50 ml licor de sacarosa / botella de 750 ml de capacidad.

- Cava B = 500 ml cava con 1 año de antigüedad / botella de 750 ml de capacidad.

- Cava B + azúcar = 450 ml cava con 1 año de antigüedad + 50 ml licor de sacarosa / botella de 750 ml de capacidad.

Para este estudio, se realizará un seguimiento de las muestras con el tiempo y, a fin de acelerar las características evolutivas, se propone un método de pardeamiento acelerado por medio de la temperatura de conservación.

En el apartado 4.4. se han expuesto los distintos modelos de ensayos acelerados usados más frecuentemente. Consideramos que la mayoría fuerzan en exceso las condiciones, siendo difícilmente extrapolables a la realidad. Una temperatura superior a 45°C, así como la adición de agentes químicos oxidantes, puede provocar reacciones de todo tipo que en condiciones normales no tendrían lugar. El mantener las muestras bajo una atmósfera inerte implica el considerar, parcialmente, sólo los fenómenos de pardeamiento no oxidativo y alarga considerablemente el tiempo del estudio. Por el contrario, la conservación con una cantidad de oxígeno estandarizada puede resultar excesivamente oxidativa.

El método de pardeamiento acelerado propuesto, pretende suavizar las condiciones forzadas a las que se ven sometidas las

muestras y para ello la temperatura de conservación es  $33 \pm 2$  °C. Las condiciones oxidativas son también moderadas y para ello se guardan todas las botellas, de 750 ml, tapadas y con una cantidad de vino de 500 ml, con lo que el espacio de cabeza contiene solamente oxígeno atmosférico. Estas condiciones vendrían a ser las de un cava abierto y vuelto a cerrar, conservado a una temperatura que se puede considerar ambiental elevada.

El interés en cuantificar los compuestos carbonílicos, tanto en su forma libre activa como en su forma combinada con el  $\text{SO}_2$  inactiva, radica en poder correlacionar este parámetro con otros relacionados con el envejecimiento y así poder profundizar en los estudios de estabilidad del vino. La evolución de estos compuestos en las muestras se sigue, dependiendo del tiempo de conservación, y por ello, se analizan semanalmente. Como se ha citado anteriormente en la parte bibliográfica, la principal forma de encontrar los compuestos carbonílicos en vinos es en estado de combinación con el dióxido de azufre. Esta combinación, aunque muy estable, tiene una constante de disociación que puede verse alterada en el tiempo de conservación y bajo determinadas circunstancias, por ello, conjuntamente se analizan otros parámetros, como son azúcares totales y su fraccionamiento en glucosa, fructosa y sacarosa; polifenoles totales y o-difenoles; dióxido de azufre libre y combinado; alcoholes (sólo los mayoritarios: glicerol y etanol).

Paralelamente, se realiza un seguimiento de las modificaciones del color, espectrofotométricamente, a fin de determinar las características que más se ajustan al seguimiento del pardeamiento.

## **8 - RESULTADOS**

Las determinaciones analíticas de las muestras ( A: cava 2 años, A+azúcar: cava 2 años con sacarosa adicionada, B: cava 1 año y B+azúcar: cava 1 año con adición de sacarosa) se realizan por duplicado y todos los resultados expresados en las tablas y gráficas son la media de las dos determinaciones. La evolución de estos parámetros se seguirá durante seis semanas y, para una mejor interpretación de los mismos, se expondrá en función de la determinación analítica realizada y, posteriormente, se estudiará la relación entre los parámetros que más se relacionen con el pardeamiento.

### **8.1. - AZUCARES**

La determinación de azúcares se realiza por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) según el apartado 6.4. Los resultados se recogen en las figuras 39, 40, 41 y 42. Este análisis comprende el fraccionamiento en glucosa, fructosa, sacarosa, y la suma de las tres, que denominaremos contenido en azúcar total.

En la evolución de los azúcares, destacan las muestras que se les ha adicionado licor, ya que su cinética es distinta de las

que no lo contienen. Se observa que la evolución con el tiempo de glucosa y fructosa, sigue una correlación lineal que indica una disminución de su valor con el tiempo. En el caso de las muestras adicionadas de azúcar (sacarosa), esta correlación sólo se observa cuando la hidrólisis de la sacarosa añadida pueda considerarse total. Esto sucede al cabo de tres semanas, debido al pH ácido y a la temperatura de conservación.

Despreciando los valores iniciales para las muestras con azúcar, debido a la interferencia de la hidrólisis de sacarosa, efectuamos la correlación lineal del contenido en azúcares, con respecto al tiempo. Los resultados son los siguientes:

**HUESTRA A:** GLUCOSA :  $y = - 0.007 x + 0.27$   $r = 0.64$   
 FRUCTOSA:  $y = -0.02 x + 0.33$   $r = 0.80$   
 AZUCAR TOTAL:  $y = - 0.028 x + 0.61$   $r = 0.93$

**HUESTRA B:** GLUCOSA:  $y = -0.02 x + 0.33$   $r = 0.95$   
 FRUCTOSA:  $y = - 0.01 x + 0.31$   $r = 0.88$   
 AZUCAR TOTAL:  $y = -0.02 x + 0.59$   $r = 0.86$

**HUESTRA A+Az.:** GLUCOSA:  $y = -0.2 x + 3.09$   $r = 0.88$   
 FRUCTOSA:  $y = -0.2 x + 2.70$   $r = 0.80$   
 AZUCAR TOT.:  $y = -0.45 x + 5.90$   $r = 0.87$

**HUESTRA B+Az.:** GLUCOSA:  $y = -0.1 x + 2.6$   $r = 0.78$

$$\text{FRUCTOSA: } y = -0.17 x + 2.6 \quad r = 0.85$$

$$\text{AZUCAR TOT.: } y = -0.28 x + 5.3 \quad r = 0.87$$

La disminución en el contenido de azúcares totales en relación al tiempo, es igual para las muestras A y B, y mucho menor en comparación a las muestras que se les ha adicionado licor azucarado.

No se observan diferencias en cuanto a la evolución del contenido en glucosa y fructosa, aunque muchos autores las consideren diferentes, atendiendo a su velocidad de reacción en los procesos de pardeamiento.

EVOLUCION DE LA GLUCOSA (mg/ml)				
muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	0,26	1,89	0,30	0,91
7	0,27	2,19	0,32	2,49
14	0,29	2,63	0,26	2,15
21	0,25	2,27	0,24	2,55
28	0,23	2,39	0,25	2,10
35	0,24	1,81	0,25	2,20

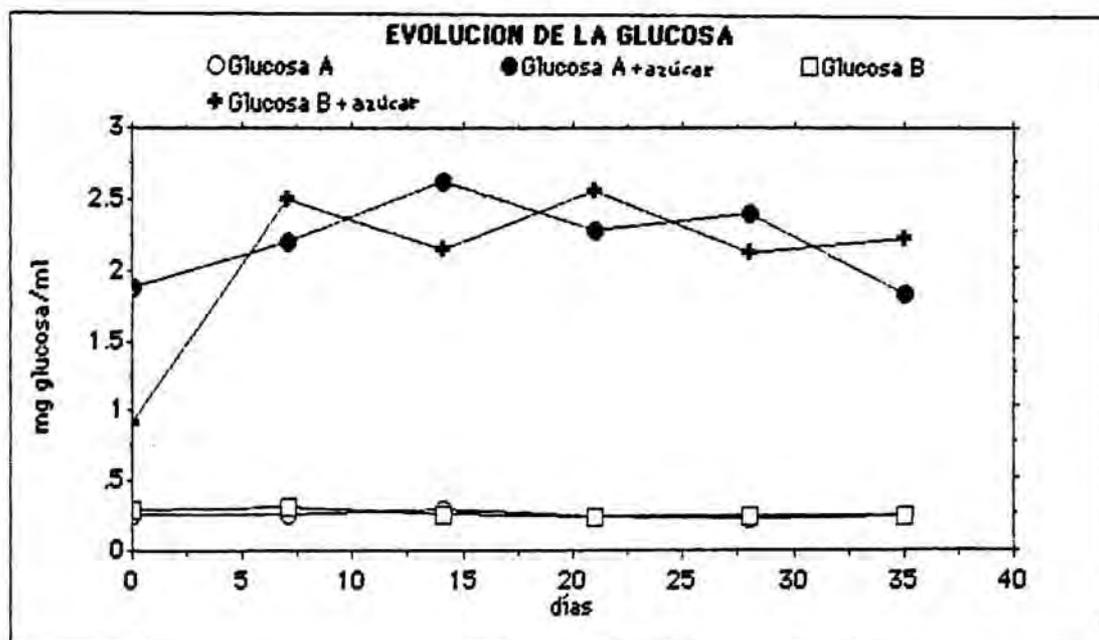
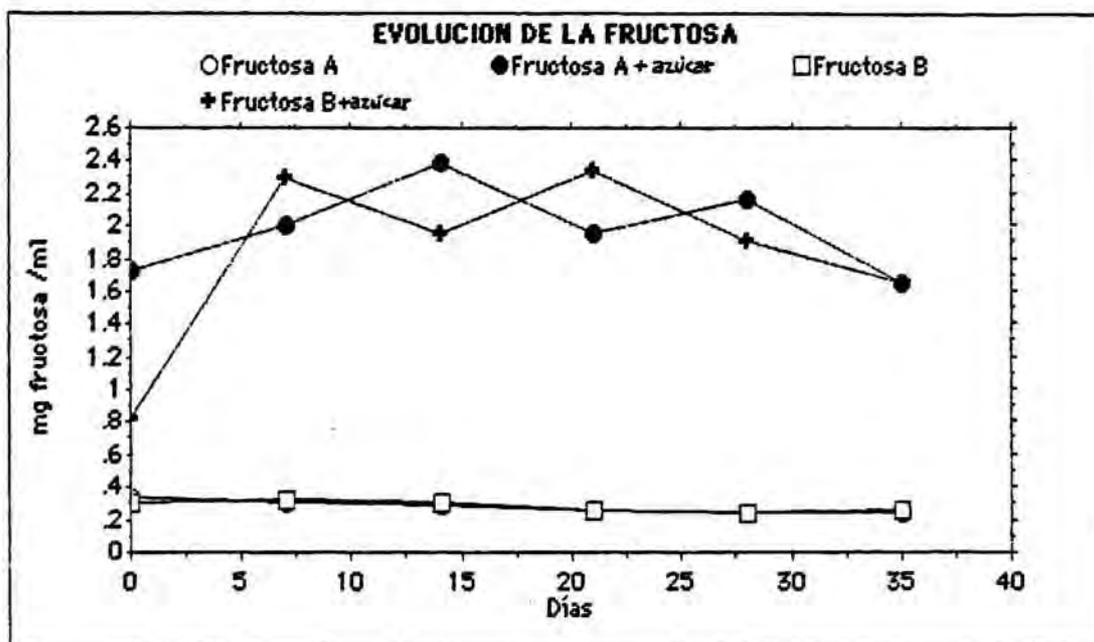


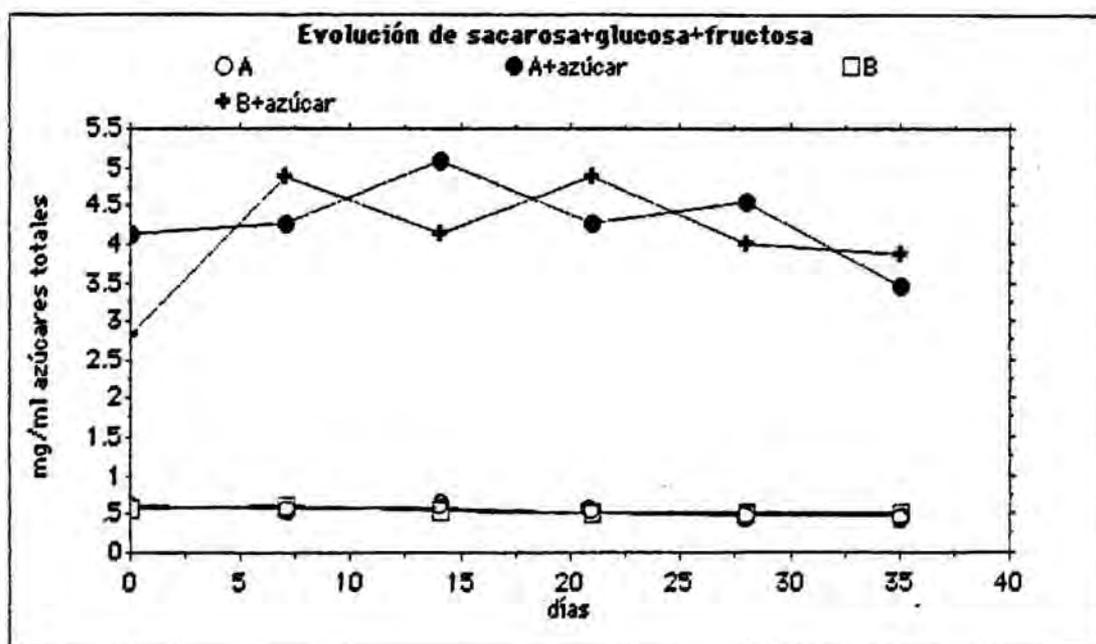
FIGURA 39: Evolución de la glucosa en la conservación a 33±2°C

EVOLUCION DE LA FRUCTOSA (mg/ml)				
muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	0,34	1,72	0,30	0,82
7	0,31	2,00	0,32	2,29
14	0,29	2,39	0,30	1,96
21	0,26	1,95	0,26	2,34
28	0,24	2,16	0,25	1,91
35	0,25	1,65	0,26	1,65



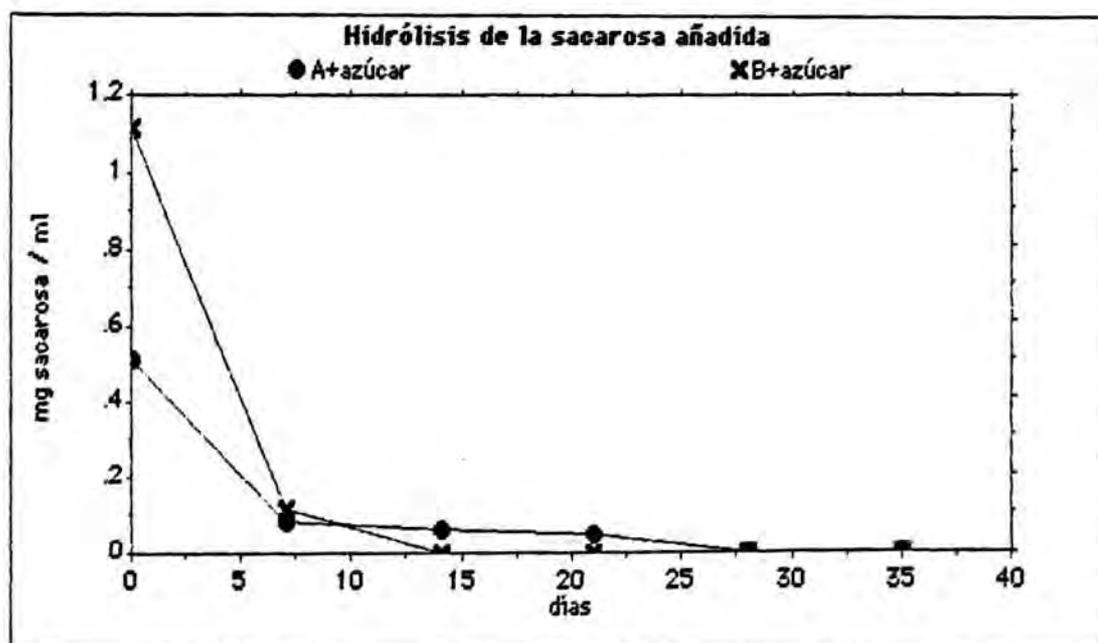
**FIGURA 40:** Evolución de la fructosa en la conservación de las muestras a  $33 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

EVOLUCION DE AZUCARES TOTALES (Sacarosa+Glucosa+Fructosa)				
muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	0,60	4,13	0,58	2,85
7	0,59	4,27	0,60	4,90
14	0,58	5,06	0,56	4,12
21	0,51	4,27	0,50	4,89
28	0,47	4,55	0,50	4,01
35	0,43	3,46	0,51	3,85



**FIGURA 41:** Evolución de los azúcares totales en la conservación a 33±2°C.

EVOLUCION DE LA SACAROSA AÑADIDA (mg/ml)				
muestra días	Cava A+AZUCAR	Cava B+AZUCAR		
0	0,52	1,12		
7	0,08	0,12		
14	0,06	-		
21	0,05	-		
28	-	-		
35	-	-		



**FIGURA 42** : Hidrólisis de la sacarosa añadida durante la conservación de las muestras a  $33 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## 8.2. - ALCOHOLES: GLICEROL Y ETANOL

La determinación de glicerol y etanol, alcoholes mayoritarios en el vino, se realiza por el mismo método cromatográfico (CLAE) empleado en la determinación de los azúcares según el apartado 6.4. Los resultados se recogen en las figuras 43 y 44.

El contenido en glicerol y etanol permanece prácticamente invariable para las cuatro muestras. Sin embargo, se observa cierta variabilidad en los resultados correspondientes a las muestras que se les ha adicionado sacarosa, lo que se puede explicar como causa de su gran reactividad.

Con estos datos, no es posible comprobar la hipótesis que relaciona la formación de etanal a partir de la oxidación de los alcoholes, aunque el rango de concentraciones del alcohol es muy elevado (mg/ml) en relación al de aldehídos (ppb).

EVOLUCION DEL GLICEROL (mg/ml)				
días \ muestra	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	0,51	0,49	0,49	0,37
7	0,57	0,47	0,56	0,56
14	0,55	0,51	0,56	0,46
21	0,52	0,41	0,54	0,49
28	0,50	0,49	0,52	0,50
35	0,53	0,37	0,56	0,37

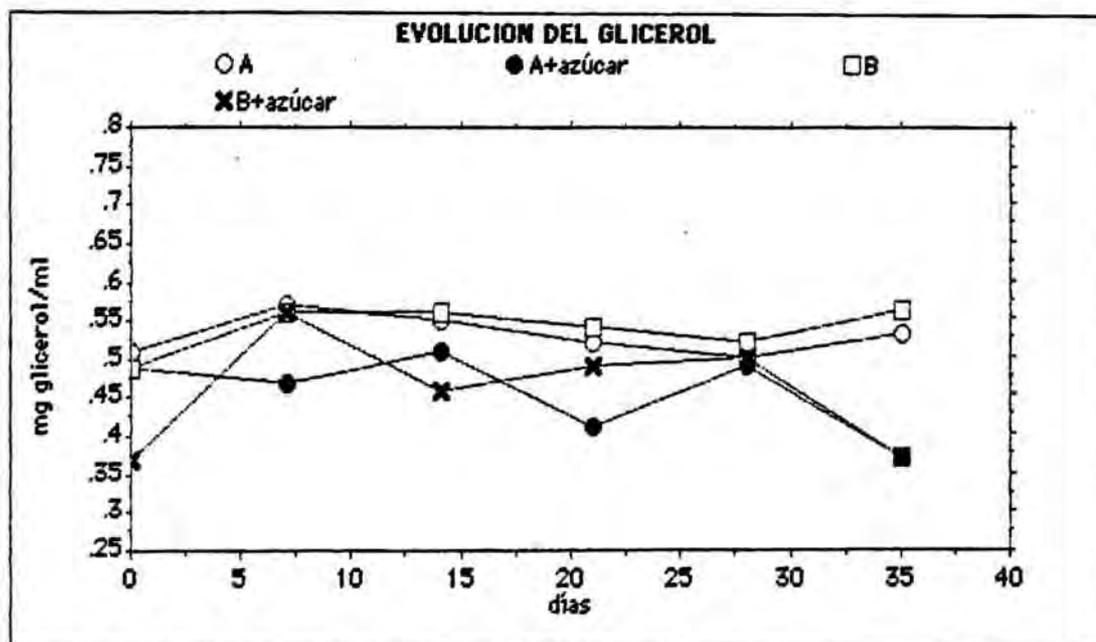


FIGURA 43: Evolución del glicerol durante la conservación.

EVOLUCION DEL ETANOL (mg/ml)				
muestra dias	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	8,26	7,59	6,74	7,58
7	8,88	7,24	7,94	7,87
14	8,56	8,31	8,45	7,08
21	8,48	7,22	7,75	8,72
28	8,46	8,53	8,24	7,78
35	9,02	6,49	9,29	6,49

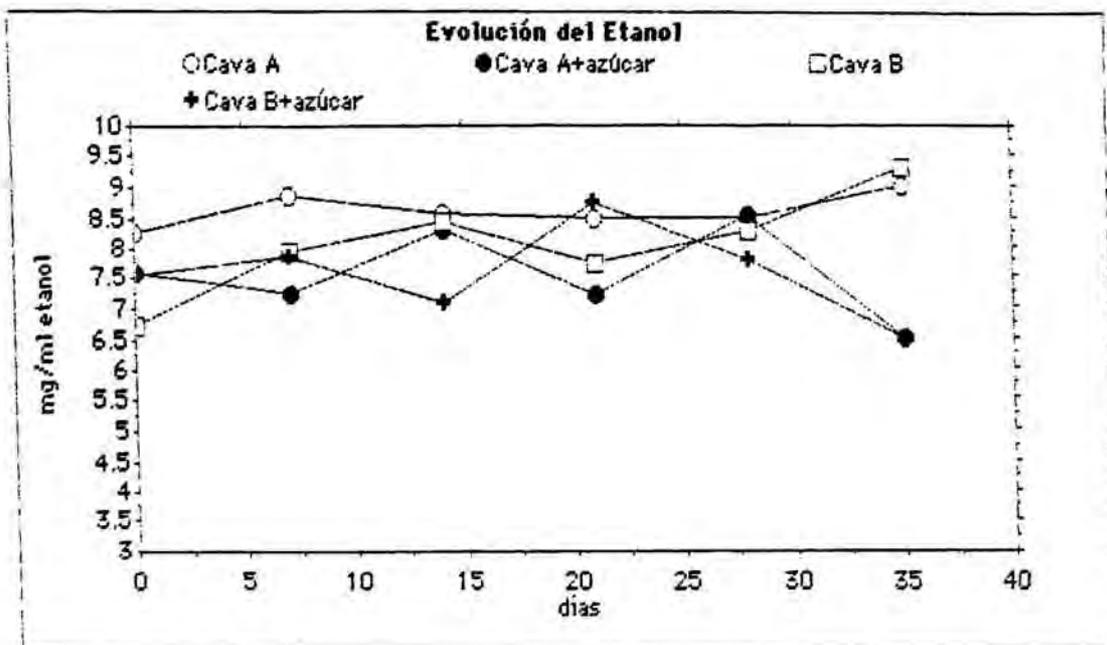


FIGURA 44: Evolución del etanol en la conservación a 33±2°C.

### 8.3. - POLIFENOLES

Se determina el contenido en polifenoles totales y de dihidroxifenoles según los métodos indicados en el apartado 6.1.. Los resultados se recogen en las figuras 45 y 46.

Se obtiene una correlación lineal entre el contenido de polifenoles totales y el tiempo según las siguientes rectas de regresión:

<b>A</b>	$y = -10,9 x + 231,5$	$r = 0,96$
<b>A + AZUCAR</b>	$y = -10,6 x + 244,9$	$r = 0,95$
<b>B</b>	$y = - 9,5 x + 241,9$	$r = 0,99$
<b>B + AZUCAR</b>	$y = - 7,1 X + 248,1$	$r = 0,90$

En las cuatro muestras estudiadas, se observa que el contenido polifenólico disminuye a lo largo del tiempo, no existiendo diferencias significativas en la evolución de las mismas.

Esta disminución del contenido fenólico se puede relacionar con procesos de carácter oxidativo, que tienen como consecuencia la formación de aldehídos. Sin embargo, estudiada la evolución de los compuestos o-difenólicos, por ser éstos los más activos en procesos de oxidación y polimerización, se observa que en las 4 muestras permanecen invariables con el tiempo (ver figura 46).

EVOLUCION DE LOS POLIFENOLES TOTALES (expresado en ng/l ác.gálico)				
días \ muestra	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	237,18	239,45	238,44	245,50
7	214,76	236,68	234,92	239,23
14	213,75	243,41	226,35	243,38
21	191,32	205,94	211,23	228,36
28	184,77	202,41	204,93	210,22
35	182,93	191,31	192,63	216,43

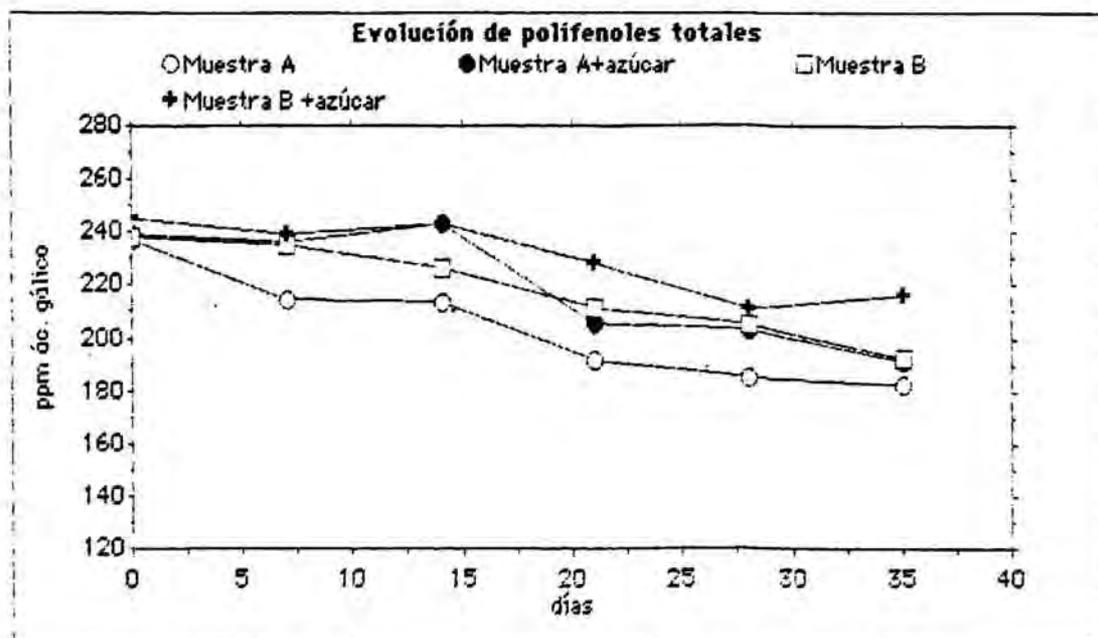


FIGURA 45: Evolución de los polifenoles totales en la conservación a  $33 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

EVOLUCION DE LOS O-DIFENOLES (expresado en mg/l de catequina)				
muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava. B	Cava B+AZUCAR
0	50,49	41,37	54,14	49,39
7	57,42	41,74	56,68	48,67
14	53,77	41,74	54,50	49,03
21	55,96	43,56	55,96	49,03
21	53,77	41,37	55,96	50,12
35	55,96	41,37	55,96	49,76

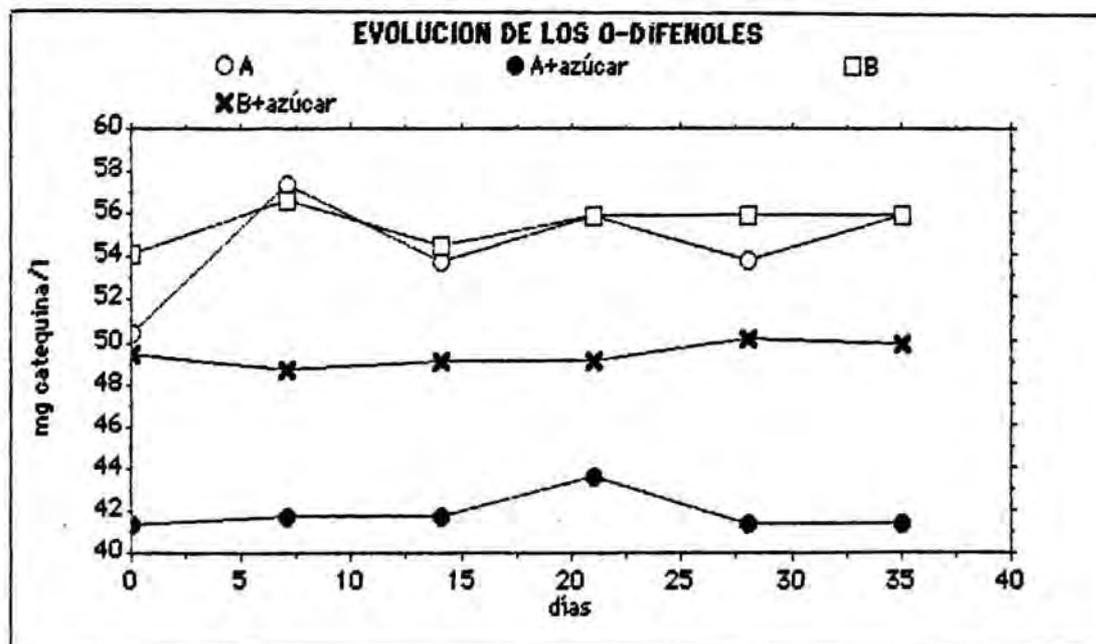


FIGURA 46: Evolución de o-difenoles en la conservación a 33+29C.

#### 8.4. - DIOXIDO DE AZUFRE

La determinación del  $\text{SO}_2$  libre y combinado se lleva a cabo según se indica en el apartado 6.3.. Los resultados obtenidos se recogen en las figuras 47 y 48.

En el estudio de la correlación de los datos experimentales, se observa una disminución del  $\text{SO}_2$  con respecto al tiempo de conservación, tanto en su forma libre como combinada. Esta evolución es muy similar en las 4 muestras estudiadas.

Destaca la disminución de  $\text{SO}_2$  combinado, lo que podría deberse al desplazamiento del equilibrio de sus combinaciones a fin de mantener el remanente de  $\text{SO}_2$  libre. Sin embargo, hay autores que lo atribuyen a la formación de compuestos azufrados.

DIOXIDO DE AZUFRE LIBRE (ng/l)				
muestra dfas	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	7,2	5,8	7,2	6,5
7	3,7	4,3	2,9	4,3
14	2,9	2,9	2,4	2,9
21	2,4	2,0	1,7	2,4
28	2,0	2,0	1,5	2,0
35	2,0	2,0	1,5	2,0

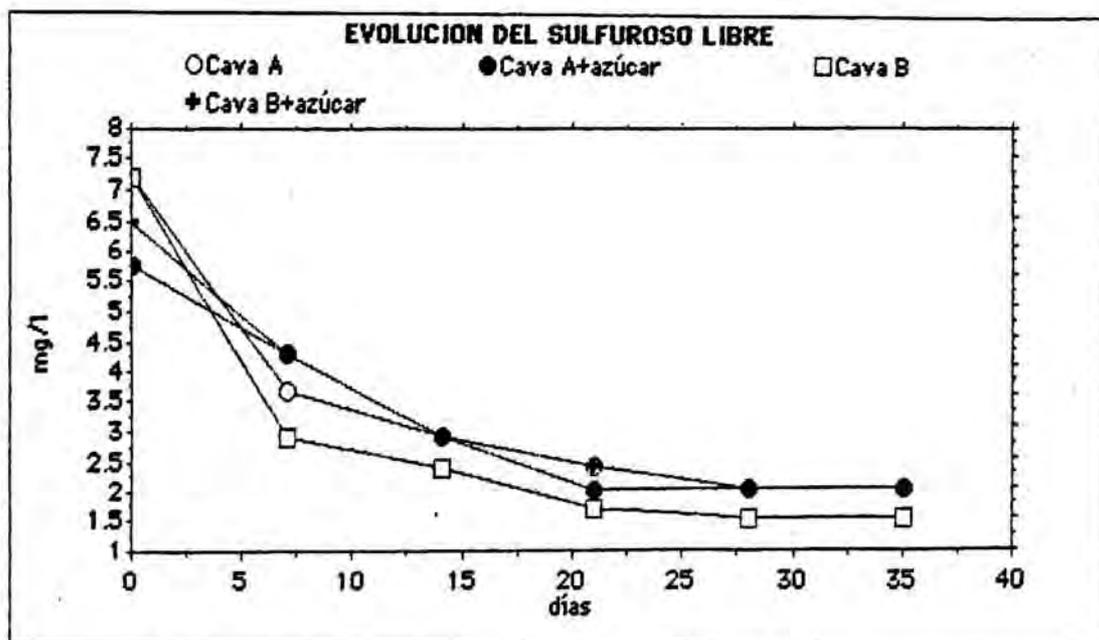


FIGURA 47: Evolución del SO<sub>2</sub> libre en la conservación a 33±29C

DIOXIDO DE AZUFRE COMBINADO (mg/l)				
muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	81,5	77,0	86,4	86,4
7	80,6	77,0	77,8	83,5
14	70,0	73,3	67,4	67,4
21	67,4	58,5	55,7	73,3
28	50,0	55,7	52,0	73,3
35	50,0	52,7	52,7	52,7

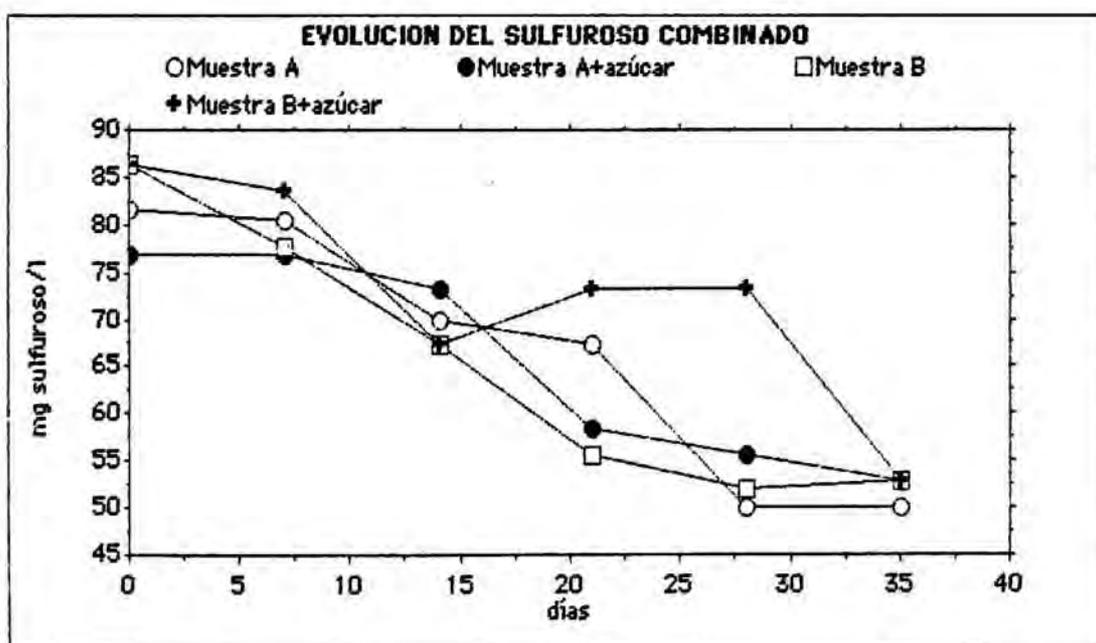


FIGURA 48: Evolución del SO<sub>2</sub> combinado en la conservación.

## 8.5. - COLOR

Según se ha indicado en el apartado 4.3. el estudio espectrofotométrico del color en los vinos blancos es controvertido. En este trabajo, se hace un estudio del color midiendo la absorbancia a varias longitudes de onda (445, 495, 550 y 625) y calculando la relación entre ellas, según las fórmulas propuestas por la O.I.V. para hallar las coordenadas triestimulares.

Las respuestas obtenidas se recogen en la tabla 49. La relación entre las coordenadas  $x$  e  $y$ , necesaria para la determinación de la longitud de onda dominante según el espectro cromático de la C.I.E., es prácticamente constante, lo que indicaría que las muestras no sufren ninguna modificación respecto a este parámetro durante su conservación a  $33 \pm 2^\circ\text{C}$ . Sin embargo, la absorbancia a todas las longitudes de onda aumenta con el tiempo, por lo que esta determinación no refleja la realidad.

Del estudio de la correlación lineal de las lecturas a otras longitudes de onda tradicionales, como son 420 y 520 nm., se observa una evolución y una buena correlación con el tiempo. Por ello, los resultados a estas longitudes de onda, frecuentemente empleadas como indicadores del pardeamiento y de la oxidación respectivamente, serán las que se expondrán en las tablas 50 y 51.

**HUESTRA A**

días	X	Y	Z	x	y	x/y
0	0.8928	0.9265	0.9517	0.3221	0.3343	0.9635
7	0.8702	0.9073	0.9189	0.3227	0.3364	0.9592
14	0.8714	0.9101	0.9097	0.3237	0.3381	0.9574
21	0.8645	0.9005	0.9059	0.3236	0.3371	0.9599
28	0.8589	0.8953	0.8989	0.3237	0.3374	0.9593
35	0.8517	0.8869	0.8870	0.3243	0.3377	0.9603

**HUESTRA A+AZUCAR**

días	X	Y	Z	x	y	x/y
0	0.8970	0.9382	0.9536	0.3216	0.3364	0.9560
7	0.8947	0.9325	0.9507	0.3230	0.3356	0.9594
14	0.8828	0.9252	0.9166	0.3240	0.3395	0.9543
21	0.8796	0.9216	0.9059	0.3249	0.3404	0.9544
28	0.8701	0.9100	0.8979	0.3249	0.3398	0.9561
35	0.8626	0.9048	0.8918	0.3255	0.3415	0.9531

**HUESTRA B**

días	X	Y	Z	x	y	x/y
0	0.9020	0.9403	0.9639	0.3214	0.3350	0.9594
7	0.8984	0.9361	0.9432	0.3234	0.3370	0.9596
14	0.8937	0.9324	0.9283	0.3244	0.3385	0.9583
21	0.8792	0.9179	0.9123	0.3244	0.3387	0.9577
28	0.8776	0.9156	0.9074	0.3249	0.3390	0.9584
35	0.8747	0.9116	0.9031	0.3252	0.3389	0.9595

**HUESTRA B+AZUCAR**

días	X	Y	Z	x	y	x/y
0	0.9025	0.9438	0.9602	0.3215	0.3362	0.9562
7	0.9099	0.9482	0.9668	0.3220	0.3356	0.9594
14	0.8850	0.9238	0.9165	0.3247	0.3389	0.9580
21	0.8874	0.9261	0.9255	0.3239	0.3381	0.9581
28	0.8719	0.9094	0.9161	0.3232	0.3371	0.9587
35	0.8635	0.9019	0.8842	0.3258	0.3403	0.9573

**FIGURA 49:** Evolución de las coordenadas triestimulares en la conservación a 33±2°C.

EVOLUCION DEL COLOR				
Absorbancia a 420 nm X 1000				
muestra \ días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	149	152	144	150
7	172	154	160	146
14	175	172	172	174
21	178	181	173	170
28	190	196	176	173
35	194	200	182	194

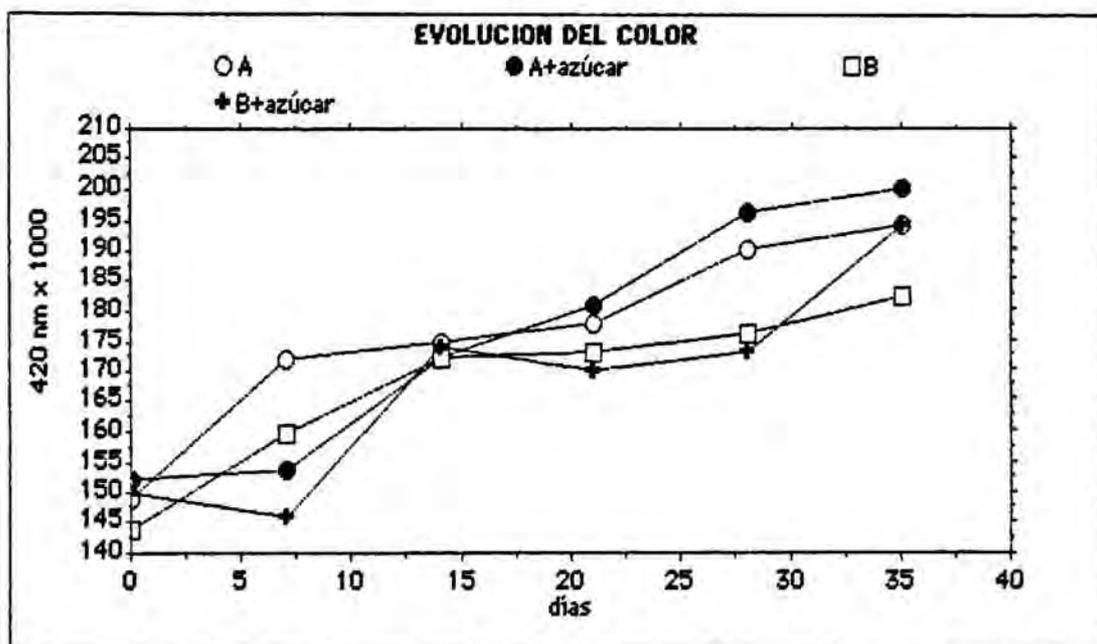


FIGURA 50: Evolución del color a 420 nm en la conservación.

EVOLUCION DEL COLOR				
Absorbancia a 520 nm X 1000				
muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	37	40	34	36
7	50	37	37	34
14	50	39	41	46
21	50	51	43	45
28	53	50	44	48
35	56	60	49	58

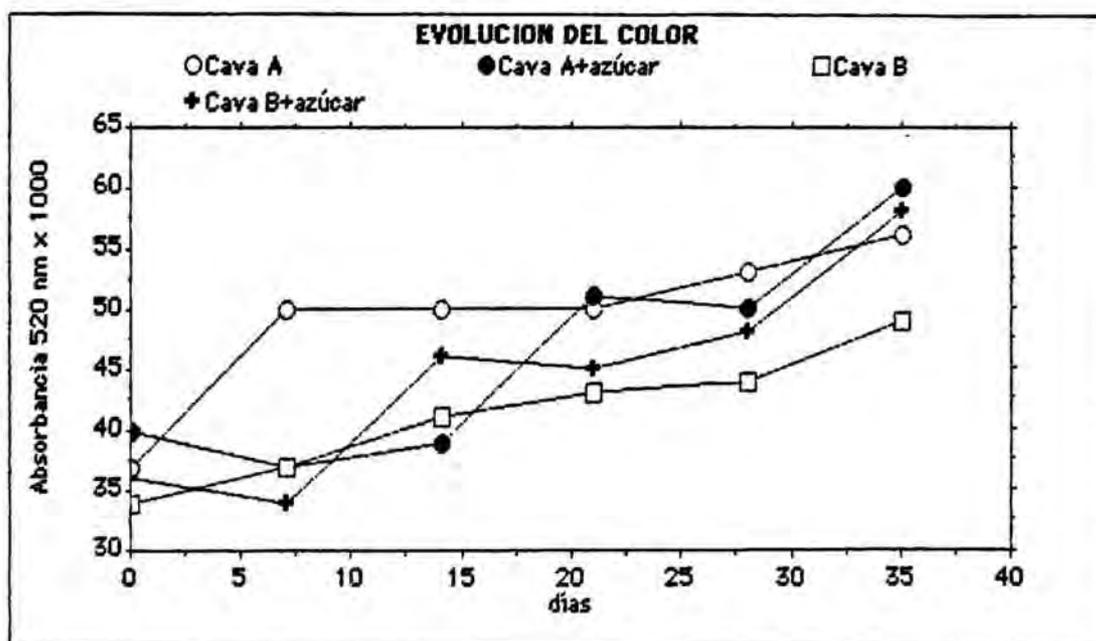


FIGURA 51: Evolución del color a 520 nm en la conservación.

Respecto a la lectura a 420 nm (parámetro determinado habitualmente como indicador del pardeamiento global) se observa un aumento correlacionado linealmente con el tiempo según las ecuaciones:

<b>A</b>	$y = 8.06 x + 156$	$r = 0.95$
<b>A + azúcar</b>	$y = 10.71 x + 149$	$r = 0.98$
<b>B</b>	$y = 6.82 x + 151$	$r = 0.93$
<b>B + azúcar</b>	$y = 8.49 x + 146$	$r = 0.90$

Con estas regresiones lineales se aprecia que la evolución del color es mayor en las muestras con azúcar respecto a las que no se les ha adicionado licor.

La determinación a 520 nm (tonalidades rojas) se suele interpretar como indicativo de los fenómenos más oxidativos. También efectuadas las regresiones lineales con respecto al tiempo, se aprecia, asimismo, un incremento:

<b>A</b>	$y = 2.97 x + 42$	$r = 0.86$
<b>A + azúcar</b>	$y = 4.31 x + 35$	$r = 0.90$
<b>B</b>	$y = 2.80 x + 34$	$r = 0.98$
<b>B + azúcar</b>	$y = 4.31 x + 33$	$r = 0.93$

A esta longitud de onda también se observan mayores pendientes en las muestras con licor de sacarosa, aunque menores que en la lectura a 420 nm. Este incremento de absorbancia a 520

nm se interpreta como producto de los procesos oxidativos, en cambio a 420 nm se debe más a los procesos de pardeamiento no oxidativos.

Estas dos determinaciones se pueden considerar conjuntamente, en forma de Intensidad y Tonalidad. Los resultados se reflejan en la tabla 52. Sus regresiones lineales son:

**INTENSIDAD ( Absorbancia 420 + 520 nm)**

<b>A</b>	$y = 11.02 x + 198$	$r = 0.92$
<b>A + azúcar</b>	$y = 15.00 x + 184$	$r = 0.98$
<b>B</b>	$y = 9.62 x + 125$	$r = 0.96$
<b>B + azúcar</b>	$y = 12.80 x + 180$	$r = 0.91$

**TONALIDAD (Absorbancia 420/520 nm)**

<b>A</b>	$y = -0.066 x + 3.8$	$r = 0.87$
<b>A + azúcar</b>	$y = -0.110 x + 4.13$	$r = 0.84$
<b>B</b>	$y = -0.100 x + 4.13$	$r = 0.90$
<b>B + azúcar</b>	$y = -0.170 x + 4.26$	$r = 0.94$

No se observa ninguna ventaja en la determinación conjunta frente a la consideración individual. Sin embargo, en la tonalidad se distingue que, al disminuir el cociente 420/520 nm, las muestras evolucionan más hacia los rojos que hacia los amarillos (420 disminuye frente a 520), lo que podría indicar un fenómeno de envejecimiento oxidativo.

INTENSIDAD COLORANTE ( 420 + 520 nm)x 1000				
Muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	186	192	178	186
7	222	191	197	180
14	225	209	213	220
21	228	232	216	215
28	243	246	220	221
35	250	260	231	252

TONALIDAD ( 420 / 520 nm)x 1000				
muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	4,02	3,80	4,23	4,16
7	3,44	4,16	4,32	4,29
14	3,50	4,36	4,19	3,78
21	3,56	3,55	4,02	3,77
28	3,58	3,92	4,00	3,60
35	3,46	3,33	3,71	3,34

FIGURA 52: Evolución de la Tonalidad y la Intensidad.

## 8.6. - CARBONILOS

### 8.6.1. - CARBONILOS TOTALES

Se determinan según el método espectrofotométrico explicado en el apartado 6.5.1., expresándolos en el mayoritario (acetaldehído). Los resultados se exponen en la figura 53.

Se observa un aumento de lineal de los carbonilos totales, con relación al tiempo de conservación, muy semejante para las cuatro muestras. La muestra que presenta una cinética no tan lineal es la B + azúcar, hecho que se correlaciona con su comportamiento, también anómalo, con respecto al SO<sub>2</sub> combinado y al acetaldehído libre.

Las rectas de regresión lineal con el tiempo para este parámetro son las siguientes:

A	$y = 1.413 x + 3.62$	$r = 0.98$
A + azúcar	$y = 1.230 x + 5.17$	$r = 0.99$
B	$y = 1.217 x + 11.0$	$r = 0.99$
B + azúcar	$y = 1.053 x + 8.10$	$r = 0.89$

A la vista de estos resultados no se pueden concluir diferencias entre las cuatro muestras.

EVOLUCION DE CARBONILOS TOTALES (expresados en mg/ l de etanal)				
muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	7,5	7,7	10,7	9,5
7	13,4	10,9	17,6	13,1
14	20,4	20,3	31,7	29,4
21	27,9	32,3	36,1	26,9
28	44,6	42,5	44,2	27,1
35	56,5	46,7	53,5	53,2

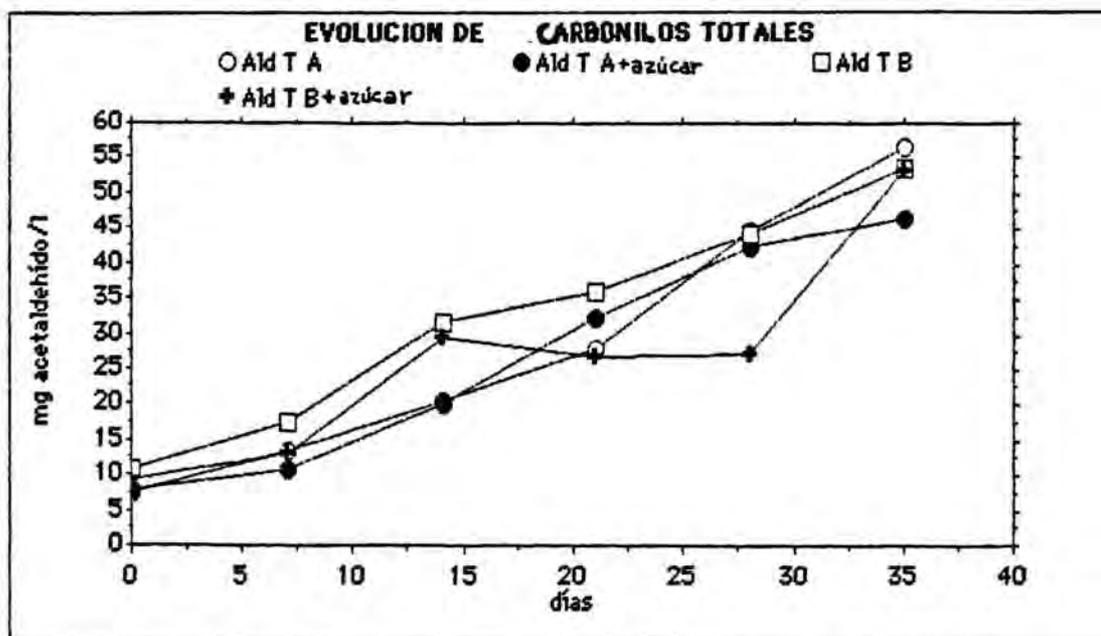


FIGURA 53: Evolución de carbonilos totales en la conservación

### 8.6.2. - CARBONILOS VOLATILES LIBRES

Los carbonilos libres son los que verdaderamente tienen actividad para alterar el producto, por sus características organolépticas, por su relación con la estabilidad del color y por su reactividad.

Su determinación se realiza por el método cromatográfico (CLAE) expuesto en el apartado 6.5.2. Los resultados se recogen en las figuras 54, 55, 56, 57, 58, 59 y 60.

Atendiendo al contenido total de aldehídos volátiles libres en relación al tiempo se obtienen las siguientes regresiones lineales, expresadas en ppb:

<b>A</b>	$y = 1036 x + 150$	$r = 0.98$
<b>A + azúcar</b>	$y = 1155 x + 150$	$r = 0.99$
<b>B</b>	$y = 1326 x + 150$	$r = 0.98$
<b>B + azúcar</b>	$y = 1308 x + 133$	$r = 0.93$

Se observa que no existe prácticamente diferencias en la evolución de las muestras con y sin azúcar. En cambio, si se existe diferencia entre las muestras A y B, quizá debido a su distinta antigüedad. Sin embargo, si se atiende a los distintos compuestos carbonílicos por separado se aprecia una evolución

diferente para cada uno de ellos, lo que, en cierta medida, podrá justificar su participación en el pardeamiento.

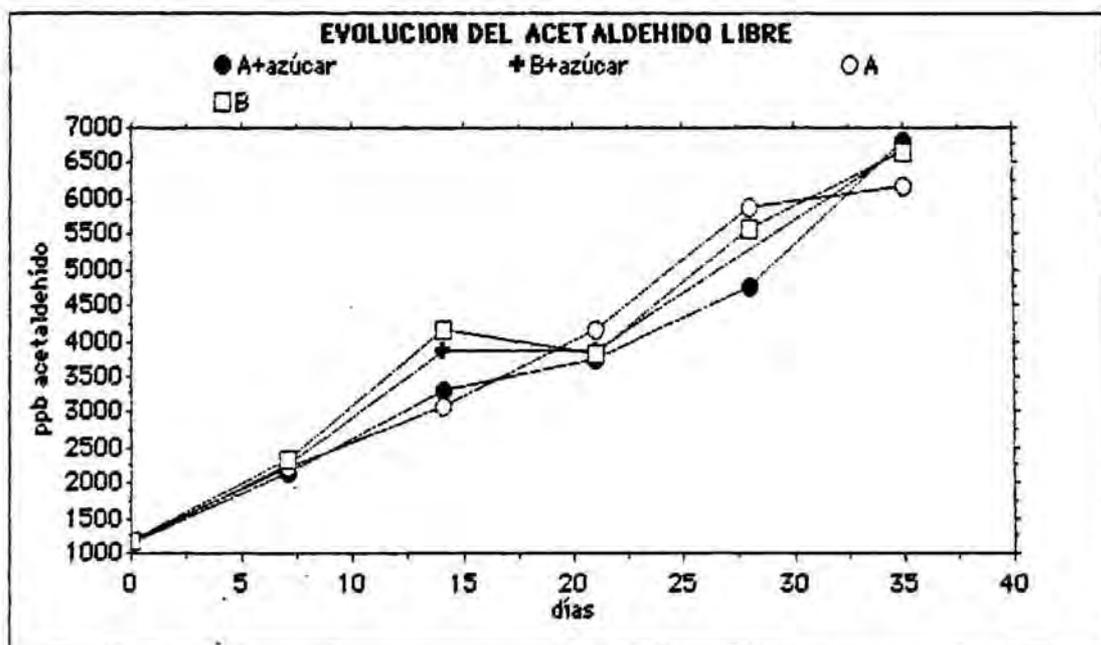
En relación al acetaldehído (figura 54) su evolución es prácticamente similar a la expuesta para el global de los carbonilos volátiles libres. Esto se puede justificar al ser este aldehído el mayoritario del vino, con diferencia.

Refiriéndonos al formol (figura 55) se observa que disminuye con el tiempo, pero no de una forma lineal, análogamente para las cuatro muestras analizadas.

Esta desaparición del formaldehído podría ser atribuida a su elevada reactividad y a su capacidad para condensarse con otras sustancias (metilaciones), incluidos otros compuestos carbonílicos y él mismo, con la consiguiente formación de nuevos compuestos, entre los que se halla el acetaldehído. Análogamente, los carbonilos  $C_3$  (propanal, acetona y acroleína) disminuyen con el tiempo de conservación (figura 56). Al no poder analizarlos separadamente, no se puede concluir a cual de estos compuestos se le atribuye esta característica, o bien si los tres presentan esta cinética. Se debe considerar, como en el caso del formaldehído, su elevada reactividad.

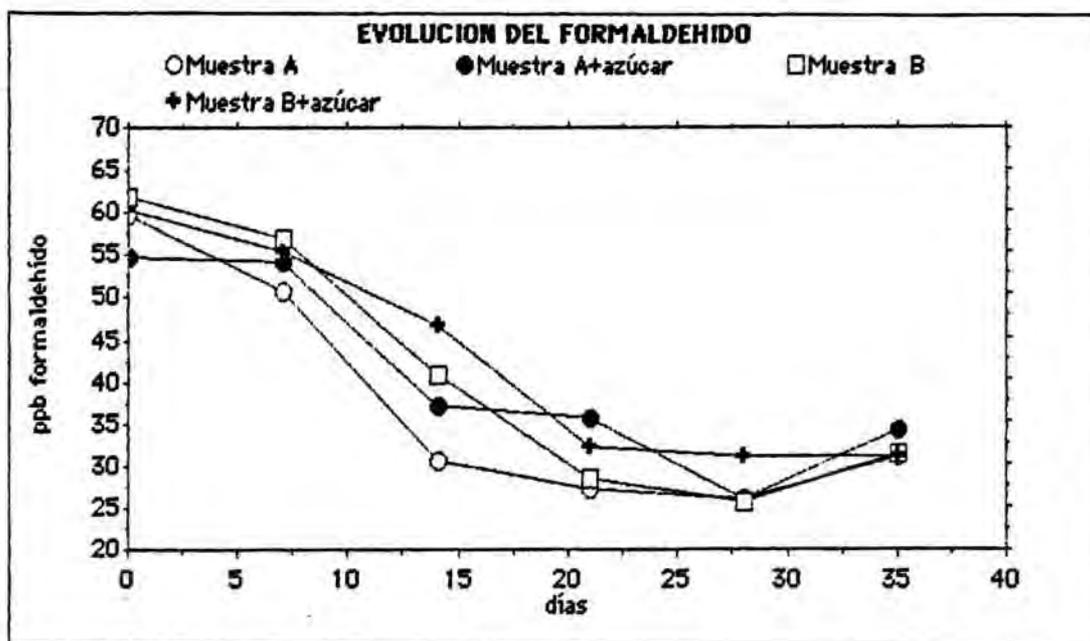
En el caso del furfural (figura 57), se aprecia claramente un incremento lineal con la temperatura de conservación y la

EVOLUCION DEL ACETALDEHIDO (p.p.b.)				
nuestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	1138,7	1198,7	1169,7	1155,1
7	2145,7	2219,9	2353,8	2282,3
14	3327,8	3098,8	4164,7	3888,8
21	3745,7	4184,7	3833,0	3880,8
28	4776,7	5875,7	5595,1	3956,5
35	6816,7	6165,8	6682,7	6684,8



**FIGURA 54:** Evolución del etanal libre en la conservación.

EVOLUCION DEL FORMALDEHIDO ( p.p.b. )				
muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	59,9	54,9	61,9	60,3
7	50,6	54,2	56,9	55,4
14	30,6	37,1	40,9	46,6
21	27,0	35,5	28,5	32,1
28	25,8	25,9	25,7	30,9
35	30,8	33,9	31,3	30,9



**FIGURA 55:** Evolución del formol libre en la conservación.

EVOLUCION DE PROPANAL-ACROLEINA-ACETONA (expresado en p.p.b.propanal)				
muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	228,7	206,7	314,5	303,4
7	221,3	210,5	283,6	293,4
14	220,2	225,8	279,9	317,2
21	212,9	192,5	274,3	287,6
28	206,7	181,7	233,9	278,4
35	144,8	184,9	208,3	219,4

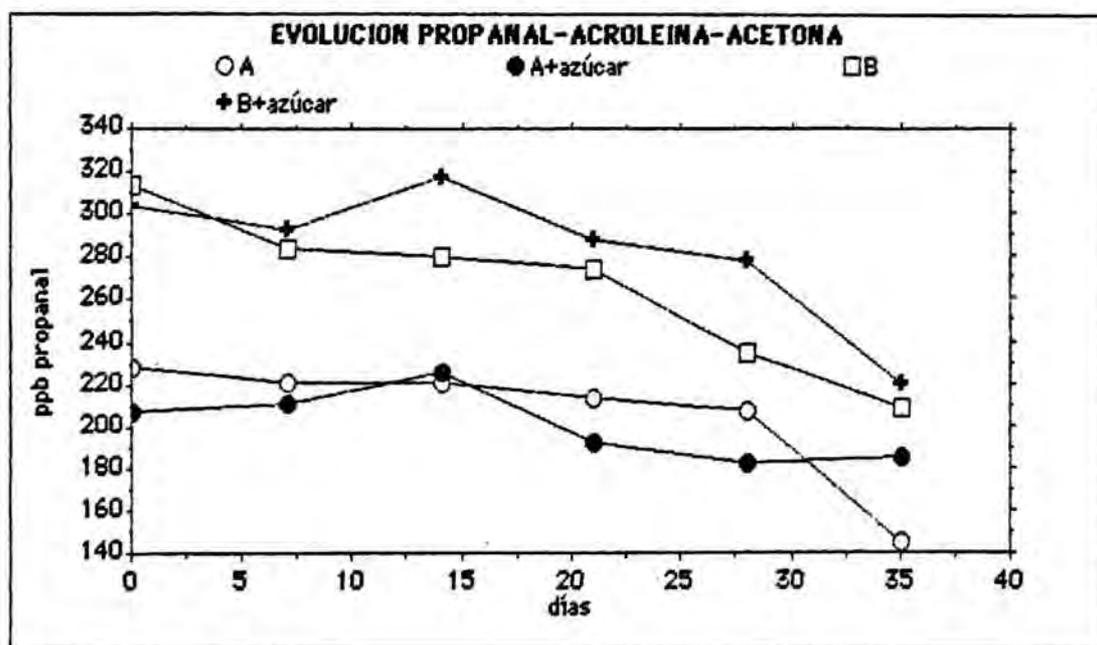


FIGURA 56: Evolución de los carbonilos C<sub>3</sub> libres en la conservación (propanal+ acroleína+acetona).

EVOLUCION DEL FURFURAL (o.d.b.)				
muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	34,5	35,8	28,0	28,6
7	39,8	43,6	29,5	35,8
14	41,9	48,3	31,8	41,0
21	42,6	53,5	32,5	45,8
28	42,8	72,8	34,8	53,3
35	44,1	80,7	35,8	68,5

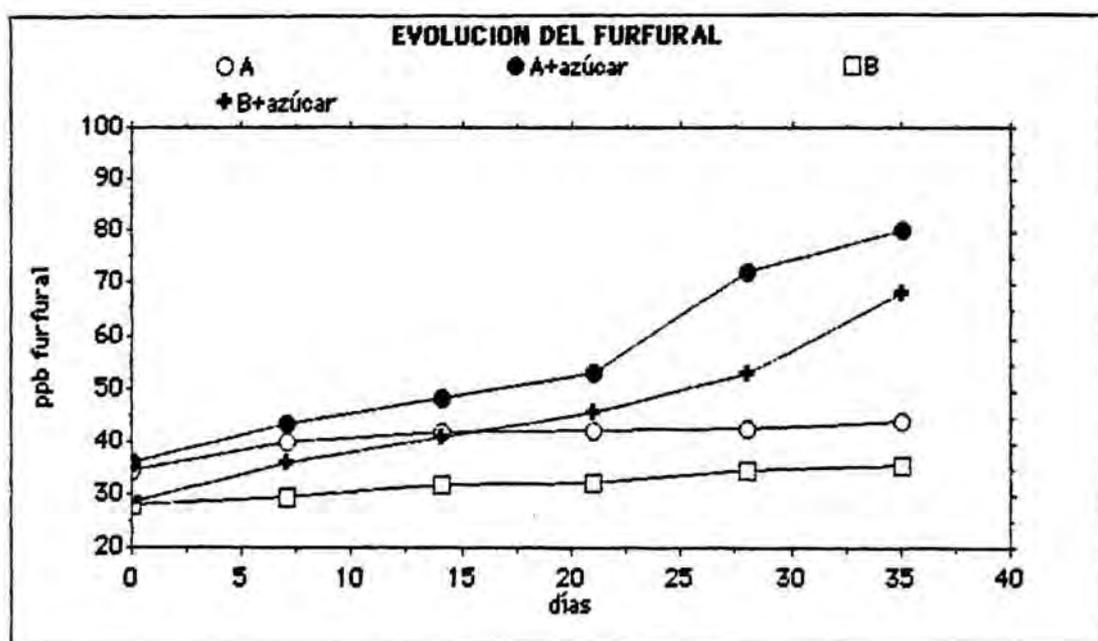


FIGURA 57: Evolución del furfural en la conservación a 33+22C

influencia de la adición de sacarosa. Asimismo, las muestras más antiguas (A) presentan un contenido inicial superior. La cinética de evolución del furfural se define mediante las siguientes rectas de correlación lineal:

<b>A</b>	$y = 1.64 x + 36$	$r = 0.89$
<b>A + azúcar</b>	$y = 9.06 x + 33$	$r = 0.95$
<b>B</b>	$y = 1.59 x + 28$	$r = 0.99$
<b>B + azúcar</b>	$y = 7.33 x + 27$	$r = 0.98$

Las pendientes de las rectas de las muestras con licor son más elevadas que las que no lo contienen, lo que indica una velocidad de formación mayor.

El benzaldehído (figura 58) es un aldehído aromático y su presencia se incrementa con el tiempo de conservación de forma lineal según las ecuaciones:

<b>A</b>	$y = 6 x + 60.7$	$r = 0.98$
<b>A + azúcar</b>	$y = 10 x + 43.9$	$r = 0.93$
<b>B</b>	$y = 11 x + 39.0$	$r = 0.98$
<b>B + azúcar</b>	$y = 9 x + 37.0$	$r = 0.98$

No se aprecian diferencias significativas entre las muestras, por lo que su formación no se puede relacionar con fenómenos de pardeamiento de Maillard. Las muestras más antiguas presentan unos

EVOLUCION DEL BENZALDEHIDO (p.p.b.)				
muestra \ días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	63,2	53,9	38,2	40,0
7	66,9	56,32	53,5	44,2
14	70,6	64,9	63,6	58,1
21	76,7	71,1	65,6	61,0
28	91,0	90,0	84,6	75,0
35	96,6	94,1	91,6	88,8

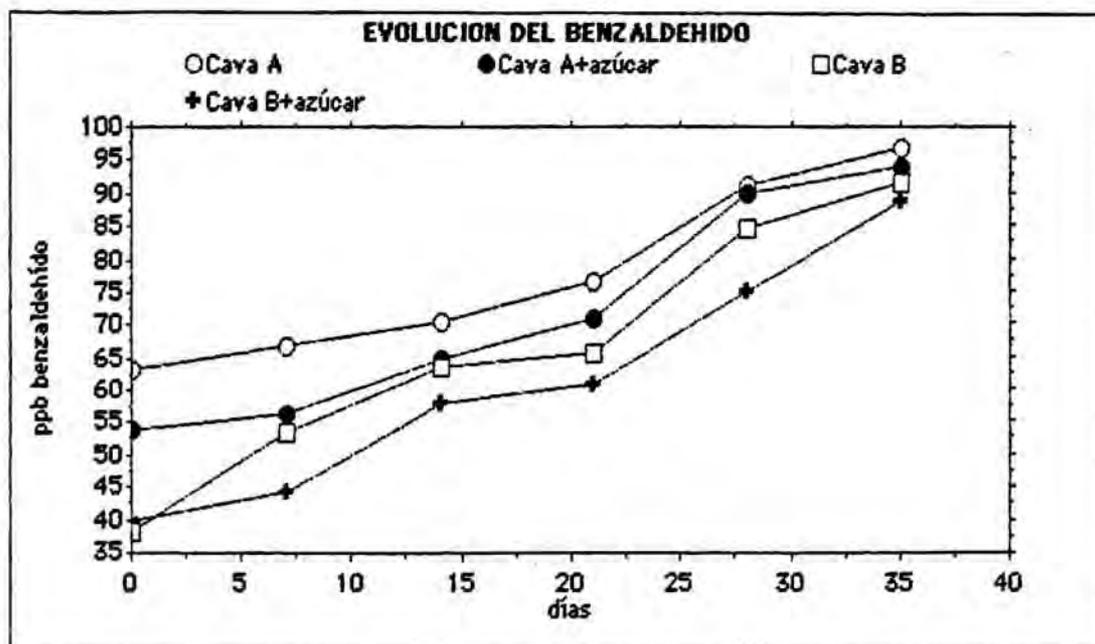


FIGURA 58: Evolución del benzanal en la conservación a 33±2°C

valores superiores en el contenido de benzanal, por lo que su aparición está en relación con el tiempo de conservación, debido a otros mecanismos.

Los aldehídos de cadena más larga, tales como hexanal y octanal, prácticamente evolucionan disminuyendo, pero a baja velocidad (figura 59 y 60). Las teorías sobre su aparición en el vino envejecido no parecen demostrarse en estos casos, ya que no se ven incrementados. Su lenta desaparición podría ser atribuida a la descomposición para formar aldehídos de cadena más corta a través de compuestos aminados que actuarían como catalizadores (teoría de Hashimoto, 1979).

Además de la posible influencia de la reacción de Maillard en la aparición de compuestos carbonílicos de cadena corta ( $C_4$  y  $C_5$ ), esta disminución en hexanal y octanal, podría ser la responsable del incremento aparecido en la zona intermedia de los cromatogramas (correspondiente a estos compuestos carbonílicos de cadena intermedia) que a pesar de no haber sido cuantificados, presentan un aumento con el tiempo en sus áreas, apreciable a simple vista.

EVOLUCION DEL HEXANAL (p.p.b.)				
muestra dias	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	38,5	45,0	38,4	37,4
7	46,4	47,5	37,7	38,4
14	44,3	40,8	38,0	40,0
21	41,0	38,3	33,3	36,7
28	37,8	45,0	37,7	37,4
35	43,3	41,2	42,0	37,0

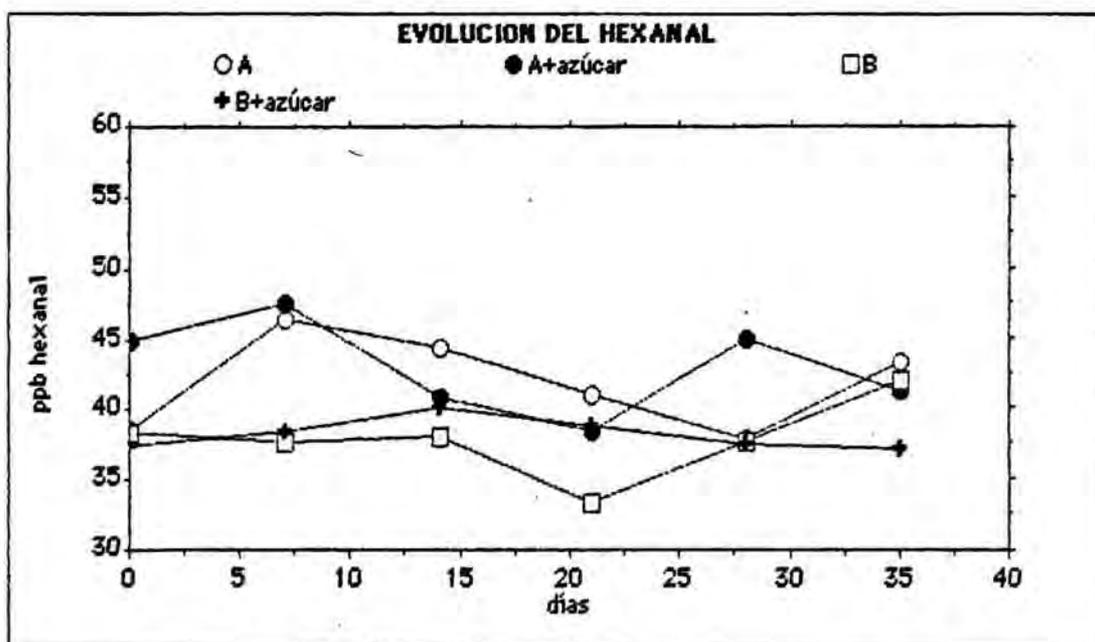


FIGURA 59: Evolución de los carbonilos C<sub>6</sub> libres en la conservación a  $33 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

EVOLUCION DEL OCTANAL (p.p.b.)				
muestra días	Cava A	Cava A+AZUCAR	Cava B	Cava B+AZUCAR
0	109,2	98,4	98,0	93,9
7	106,9	103,6	93,2	98,8
14	105,8	105,2	101,2	97,0
21	97,3	99,0	85,0	96,5
28	102,5	101,3	92,0	95,7
35	91,3	102,1	80,0	89,6

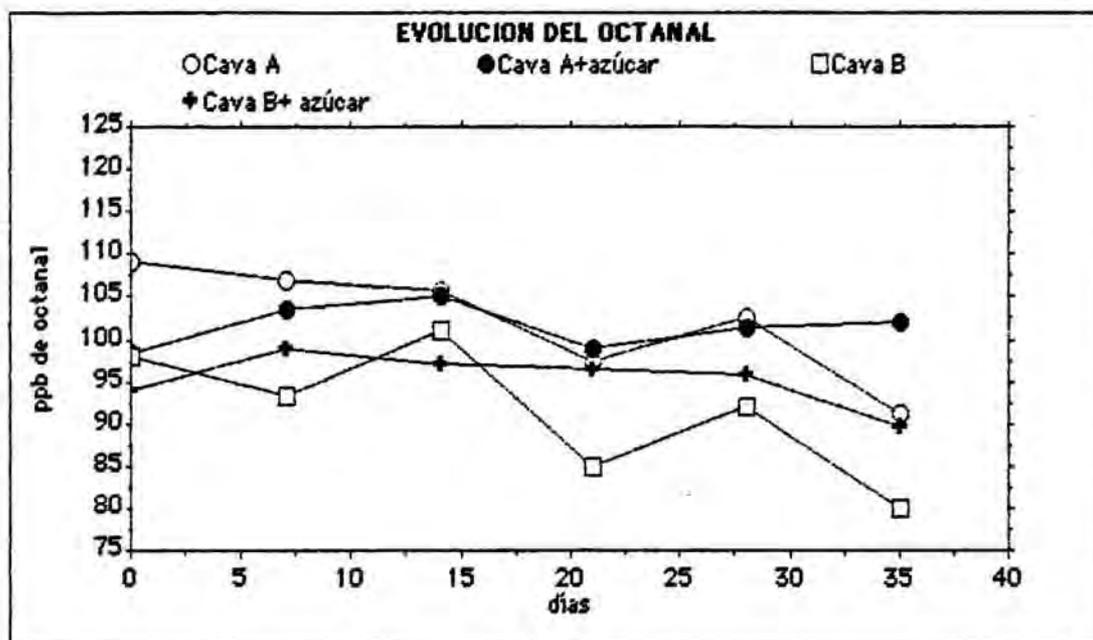


FIGURA 60: Evolución del octanal en la conservación a 33±2°C.

## 8.7. - RELACION ENTRE LOS DISTINTOS PARAMETROS

Una vez estudiada la evolución que sigue cada parámetro durante su conservación a  $33 \pm 2$  °C, se determina la relación entre éstos y su influencia en el pardeamiento.

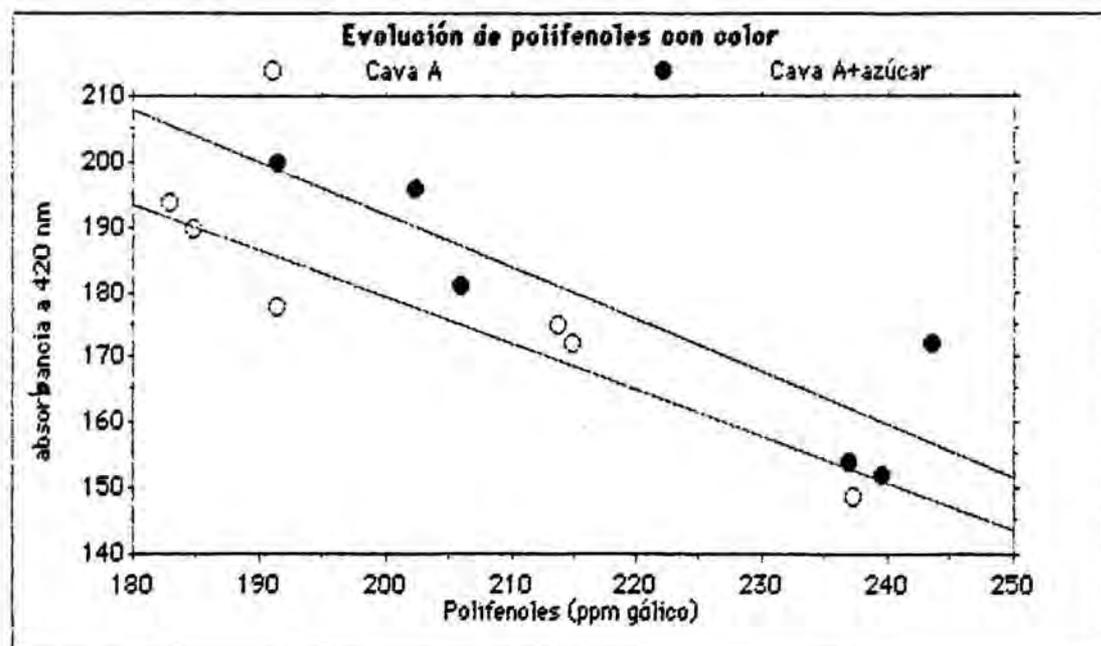
### **POLIFENOLES Y PARDEAMIENTO**

Al relacionar el contenido en polifenoles totales con el pardeamiento (que se mide mediante la absorbancia a 420 nm) se observa que, conforme disminuyen los compuestos fenólicos, aumenta el color. Si se considera que los polifenoles constituyen la mayor parte de la materia colorante en el vino, se ha de suponer que en su degradación deben dar lugar a otra serie de compuestos coloreados, que incrementan considerablemente la absorbancia en todo el espectro visible.

Efectuando el estudio de la correlación lineal entre absorbancia a 420 nm y contenido polifenólico, se observa que no existen diferencias significativas entre las muestras A y B. En cambio, se obtiene un mayor pardeamiento en relación a la disminución de polifenoles en las muestras adicionadas de licor sacarosa. (Ver gráfica 61).

Este aumento del pardeamiento se puede interpretar como causa de un mayor contenido en azúcares, o bien por efecto de las

modificaciones polifenólicas.



$$\text{A} \quad y = -0,71 x + 321 \quad r = 0,95$$

$$\text{A + azúcar} \quad y = -0,80 x + 352 \quad r = 0,89$$

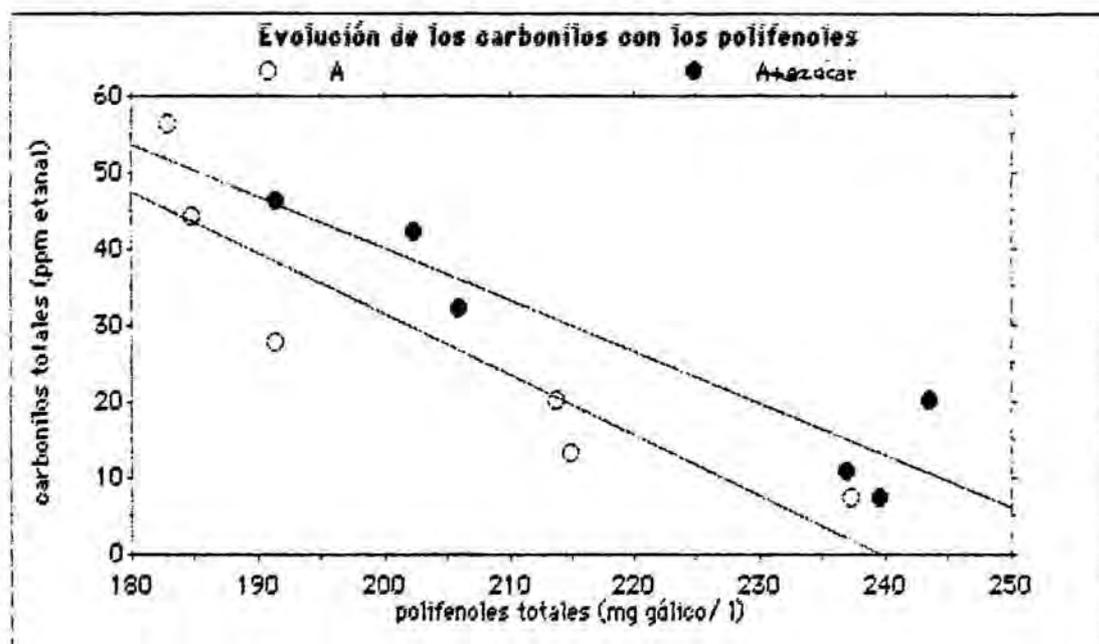
Figura 61 :Relación de polifenoles totales y absorbancia a 420 nm.

### CARBONILOS Y PARDEAMIENTO

Una de las hipótesis acerca de la acción de los polifenoles, en relación al pardeamiento, implica, según ciertos autores, un aumento en los compuestos carbonílicos por fenómenos oxidativos.

Si se consideran los carbonilos totales, en relación a la disminución de polifenoles, se observa que las muestras A y B

guardan una correlación análoga. Sin embargo, al relacionar las muestras que contienen licor sacarosa de las que no lo llevan, se aprecia que, al disminuir el contenido polifenólico, existe a su vez un aumento en carbonilos totales;



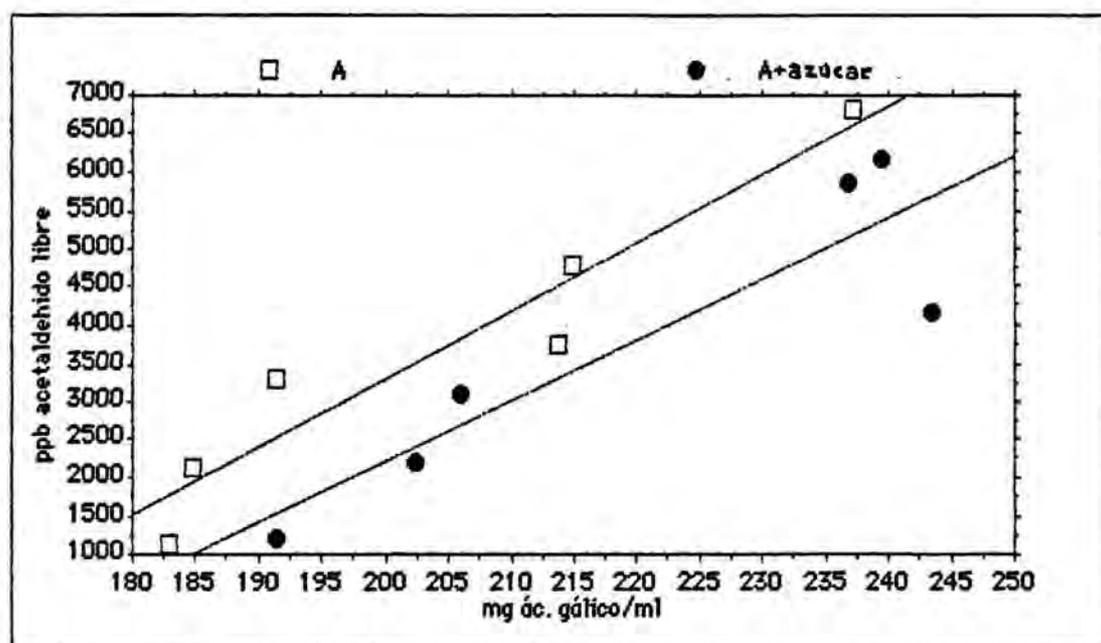
**A**  $y = - 0.80 x + 191$   $r = 0.91$

**A + azúcar**  $y = - 0.61 x + 175$   $r = 0.93$

**FIGURA 62:** Relación de los carbonilos con los polifenoles totales

Este mismo comportamiento, se observa en la evolución de las muestras con y sin azúcar, en relación al contenido de

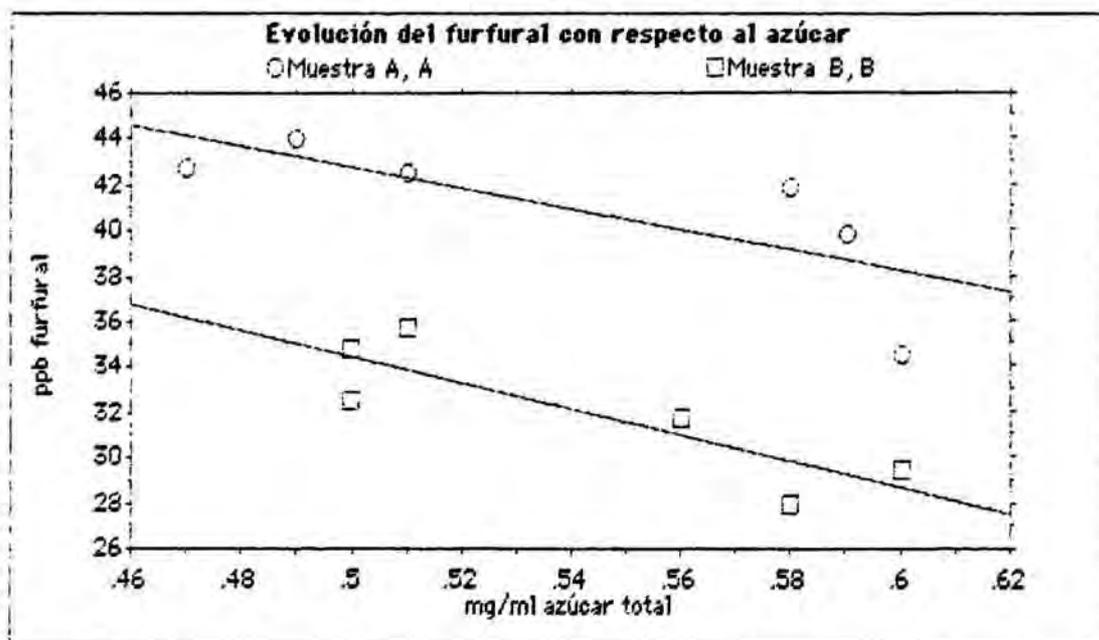
acetaldehído libre y polifenoles totales. (Ver figura 63).



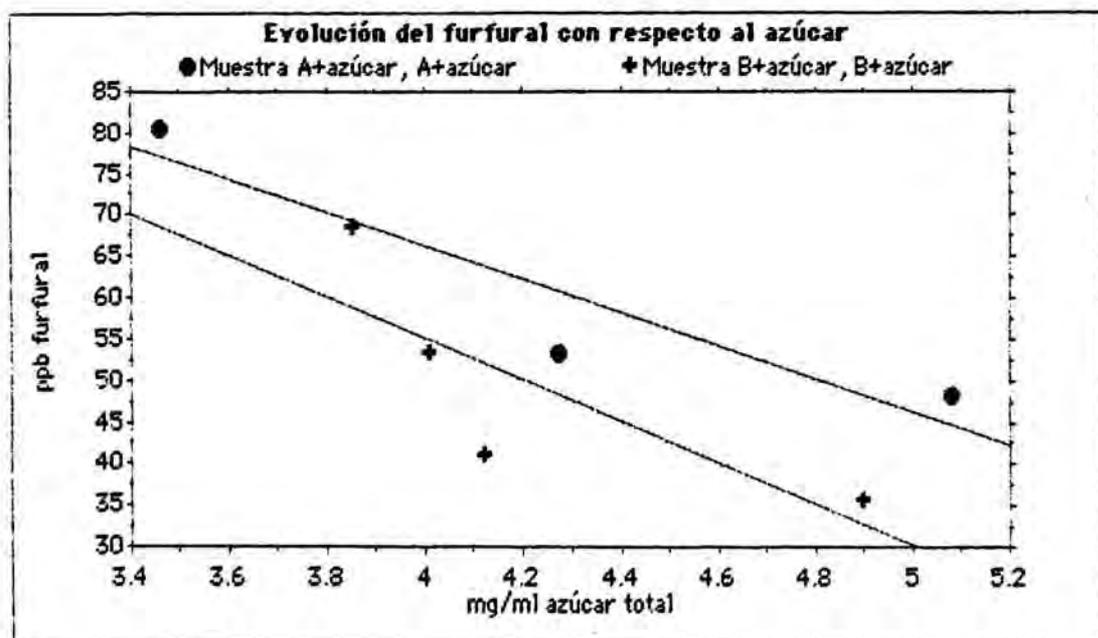
<b>A</b>	$y = - 0.08 x + 191.7$	$r = 0.91$
<b>A + azúcar</b>	$y = - 0.06 x + 175.3$	$r = 0.93$

**FIGURA 63:** Relación polifenoles totales con acetaldehído libre

Vista la influencia del licor de sacarosa en el incremento del contenido en carbonilos, se relaciona la evolución del furfural con la de azúcares totales (expresado como suma de glucosa, fructosa y sacarosa). Se obtiene una correlación que indica un aumento de furfural, a la vez que una disminución de azúcar. Esto es más acusado en las muestras que se les ha adicionado licor sacarosa. (Ver figura 64).



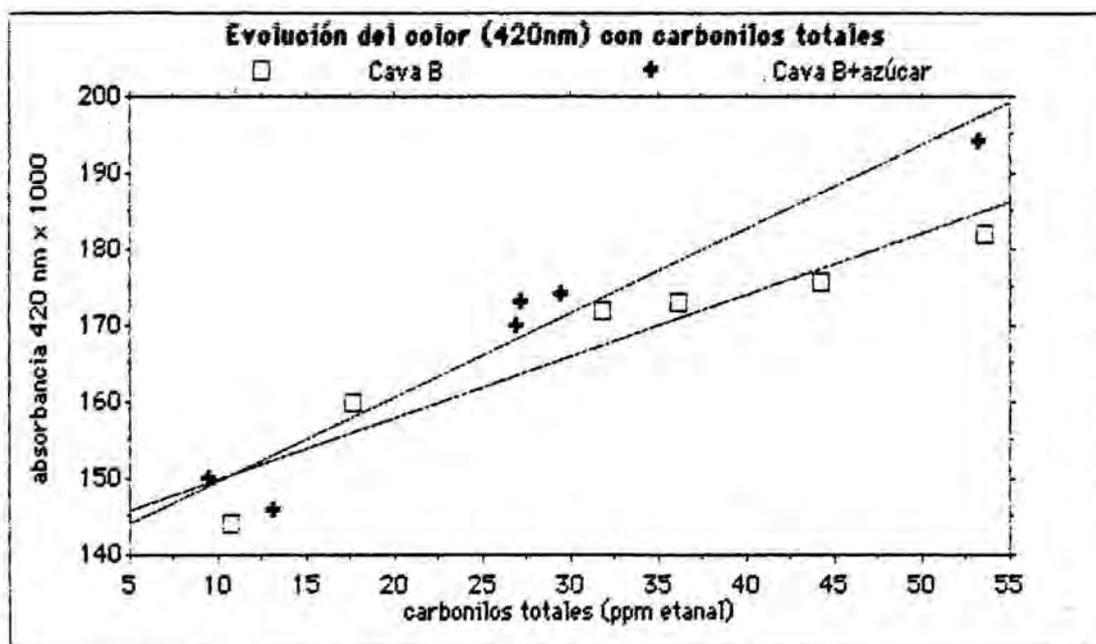
**A**                       $y = - 46.43 x + 66$                        $r = 0.77$   
**B**                       $y = - 57.90 x + 63$                        $r = 0.85$



**A + azúcar**                       $y = - 20 x + 146.2$                        $r = 0.93$   
**B + azúcar**                       $y = - 24 x + 154.9$                        $r = 0.80$

**FIGURA 64:** Relación entre contenido en azúcar y furfural.

A su vez, esta formación de aldehídos (principalmente acetaldehído y furfural) tiene relación con el pardeamiento. La repercusión de estos compuestos carbonílicos se refleja en la correlación lineal efectuada entre éstos y la absorbancia a 420 nm, tal y como se muestra en la figura 65.



**B**  $y = 0.811 x + 141.65$   $r = 0.95$

**B + azúcar**  $y = 1.106 x + 138.50$   $r = 0.97$

Figura 65 : Relación carbonilos totales y absorbancia 420 nm.

Este incremento en compuestos carbonílicos se manifiesta con un aumento del color, siendo más acusado en las muestras con adición de licor.

La relación furfural y absorbancia a 420 nm (figura 66)

indica, claramente, la evolución más acentuada del pardeamiento para las muestras que contienen más furfural, es decir, las que contienen licor de sacarosa.

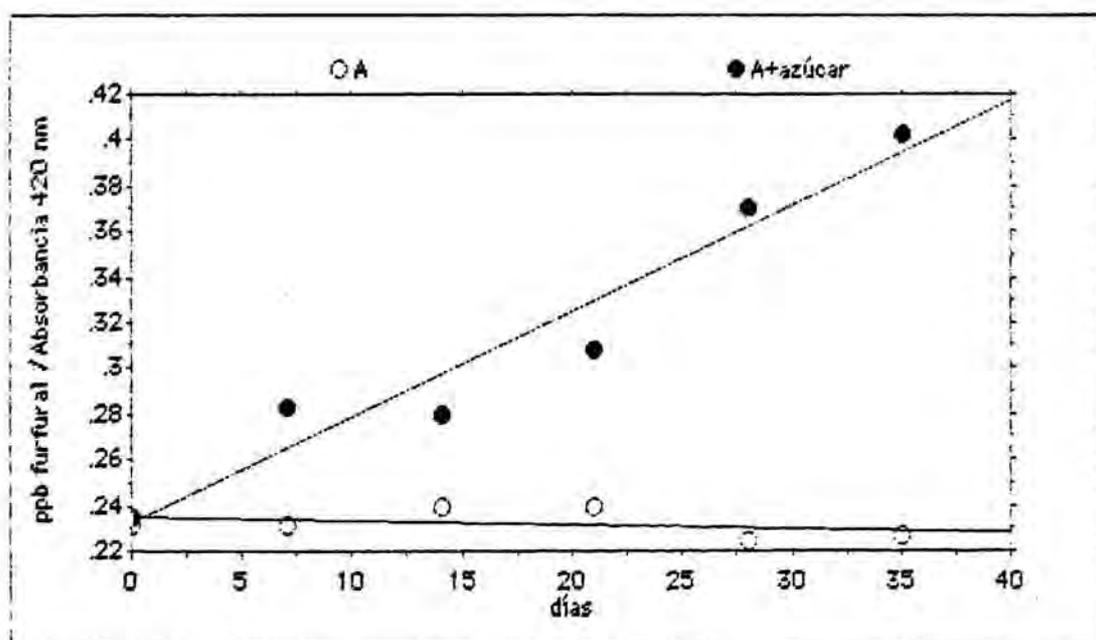
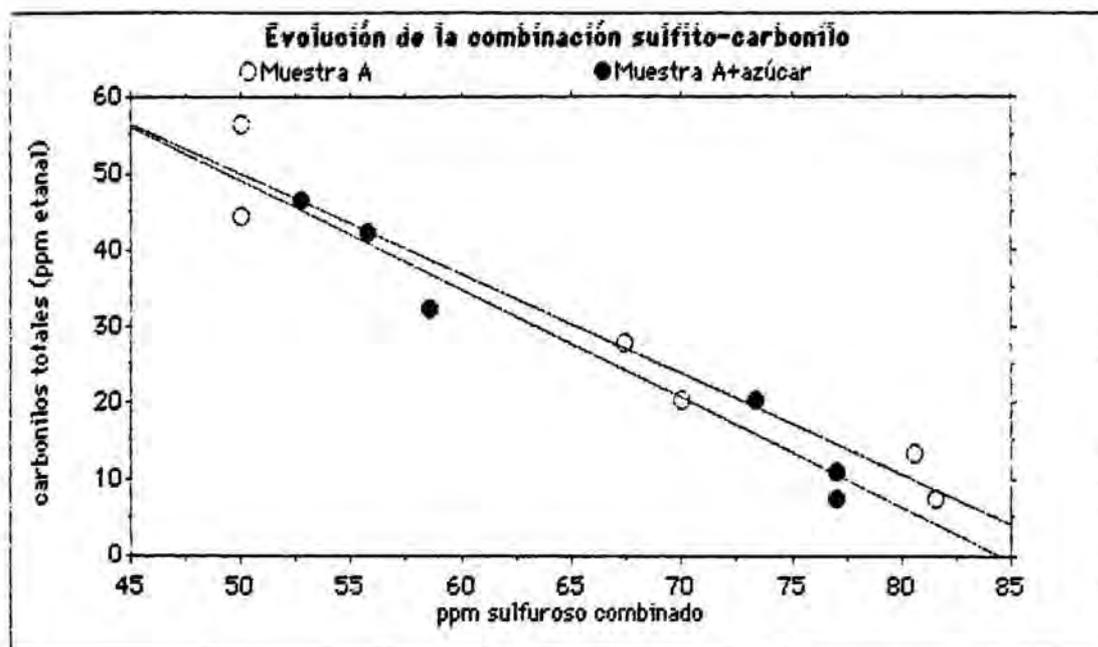


FIGURA 66: Relación entre color a 420 nm y furfural

Por último, a fin de resaltar las características influyentes del dióxido de azufre, se correlaciona la evolución de carbonilos totales con el dióxido de azufre combinado. (Ver figura 67).



**A**                     $y = - 1.309 x + 115.53$          $r = 0.97$

**A + azúcar**         $y = - 1.420 x + 120.02$          $r = 0.98$

**FIGURA 67 :** Relación dióxido de azufre-carbonilos totales

Al aumentar el contenido en carbonilos totales, con el envejecimiento, se observa una disminución del dióxido de azufre combinado, sin observarse diferencias entre muestras.

## 9. - CONCLUSIONES

- 1- En este trabajo, se estudia el efecto que tiene la adición de un licor de sacarosa en la conservación de un cava, principalmente, su influencia en fenómenos oxidativos y de pardeamiento. Con este fin, se determinan los siguientes parámetros: contenido en polifenoles totales y o-difenoles, dióxido de azufre libre y combinado, azúcares totales y su fraccionamiento, carbonilos totales y su fraccionamiento, y color.
  
- 2- Se podrían considerar muchos más parámetros de los analizados en este trabajo pero, debido a la enorme complejidad de estos mecanismos y a sus múltiples interrelaciones, es mejor ajustarse a un proceso más simplificado dentro de lo posible.
  
- 3- Se han puesto a punto los métodos de determinación y cuantificación de compuestos carbonílicos totales, así como la separación de sus formas libres y volátiles (no unidas al dióxido de azufre).

Para la determinación de los compuestos carbonílicos libres se ha realizado en primer lugar, una extracción de la fracción volátil mediante arrastre con gas inerte recogida en un sistema bifásico de DNPB en HCl 2N e isooctano. Los derivados DNPS se

extraen y, para su posterior separación y cuantificación se emplea la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) con gradiente de concentración. Este método requiere una purificación cuidadosa de reactivos y actuando en condiciones determinadas presenta una linealidad, precisión y exactitud adecuadas para el análisis de trazas (ppb).

Para la determinación de los compuestos carbonílicos totales se emplea un método de derivatización directa con DNPH e isooctano. La cuantificación de las DNPS formadas se realiza espectrofotométricamente. Si se opera frente a un blanco de reactivos, el método presenta una linealidad, precisión y exactitud correctas. Por su alta repetibilidad y su sencillez se considera el método de elección para la determinación de estos compuestos. A pesar de esto, se ha de indicar que no permite la separación de los distintos carbonilos ni diferenciar los que se encuentran en su estado libre, para lo cual se seguirá el método cromatográfico.

4- Según los resultados, que reflejan la evolución de los distintos parámetros considerados, se obtiene un pardeamiento más acentuado en las muestras que se les ha adicionado licor de sacarosa. Este mayor pardeamiento se relaciona con aumento en el contenido de carbonilos totales, así como en su estado libre (no unidos al dióxido de azufre y por tanto activos).

5- Del estudio de la evolución de cada compuesto carbonílico libre se observa que los que guardan una mayor relación con los fenómenos de pardeamiento son acetaldehído y furfural.

El aumento de acetaldehído se relaciona directamente con una disminución en el contenido polifenólico. Sin embargo, en el caso del furfural se relaciona con una disminución en el contenido de azúcares totales.

6- Según estos resultados, en el pardeamiento, se puede considerar una implicación conjunta tanto de los polifenoles como de los azúcares, por lo que se observan relacionados fenómenos de pardeamiento por causas oxidativas y los debidos a las reacciones de Maillard.

## BIBLIOGRAFIA

- M. A. AMERINE, C. S. OUGH, (1976). Análisis de vinos y mostos. Ed. Acribia. Zaragoza.
- S. H. ASHOOR, J. B. ZENT, (1984). Maillard Browning of Common Amino Acid and Sugars. *J. of Food Sci.* 49, 1206 - 1207.
- S. BADUI DERGAL (1981). Química de los alimentos. 1ª Edición. Editorial Alhambra Mexicana.
- C. BARCELO (1979). Desarrollo de una técnica cromatográfica para el estudio del gusto: aplicación al caso de las cervezas. Tesis doctoral. IQS. Barcelona.
- A. L. BARO, J. A. QUIROS, (1977). Les conditions de formation des aldéhydes dans les vins. Relation et importance en rapport avec les phénomènes d'oxydation et les caractéristiques organoleptiques. *Bulletin de l'O. I. V.*, 554, 252-267.
- R. A. BASSON, (1966). Some sources of error in the Spectrophotometric Determination of acetaldehyde as its 2,4-dinitrophenylhydrazone. *Anal. Chem.* vol 38, nº4, 637-638.
- H. G. BERG (1953 b). Varietal Susceptibility of White Wines to Browning. II. Accelerated Storage Tests. *Food Research*, 18, (4), 407 - 410.
- A. BERTRAND, (1968). Utilisation de la CG pour le dosage en constituants volatils du vin. *Connaissance du vignes et du vin*, 175-270.
- V. BERTRAN, A. DIAZ, M. GASSIOT, (1984). Estudio de los carbonilos formados en la cerveza mediante la técnica de envejecimiento acelerado de Meilgaard. *Afinidad* 41, 256-258.

- J. N. BOIDRON, S. P. AVAKIANTS, A. BERTRAND, (1969). Etude des composants de l'arôme des vins mousseux. *Connais. du vigne et du vin* 3(1), 43-54.
- H. S. BURTON, D. J. McWEENY, (1963). Non enzymic browning. The role of insaturated carbonyl compounds as intermediates and of SO<sub>2</sub> as an inhibitor of browning. *J. Sc. Food. Agric.*, 14: 911-920.
- B. S. BUSLIG, (1982). Separation of 2,4-dinitrophenylhydrazones of alfa-keto dicarboxylic acids from citrus fruits. *J. Chromatogr.*, 247, 193-196.
- C. CANTARELLI, (1967). Etude de la maderisation et de sa prévention dans les vins blancs. 2<sup>e</sup> Symposium International d'Oenologie. Bordeaux-Cognac. Institut National de la Recherche Agronomique.
- M. A. CAREY, H. E. PERSINGER, (1972). Liquid Chromatographic Determination of Traces of Aliphatic Carbonyl Compounds and Glycols as Derivatives That Contain the Dinitrophenyl Group. *J. Chromatogr. Sc.*, 10, 537-543.
- A. CASP, J. L. ALEIXANDRE, (1986). Evolución de los componentes volátiles de los vinos blancos secos jóvenes de moscatel durante su conservación a distintas temperaturas. Conferencia Internacional de Enología. ENOMAQ 86, Zaragoza.
- J. J. CASTRO MARTIN (1986). Vinos blancos: Extracción del mosto. Desfangado u otros sistemas. Fermentación. Conferencia Internacional de Enología. ENOMAQ 1986. Zaragoza.
- M. CASTINO, R. DI STEFANO, (1981). Effetti della temperatura di conservazione sulle caratteristiche dell'Asti spumante. *Riv. Vitic. Enol.*, Vol. 34(3), 106-119.

- M. CASTINO, A. PIRACCI, G. SPERA, (1981). Su alcune cause dell'imbrunimento dei vini bianchi del Lazio. *Riv. Vitic. Enol.* nº 11, 467-485.
- J. CHAMBAS, C. FLANZY (1982). Les concentrés de moûts de raisin. *Bulletin de l'O.I.V.* 611, 53- 80.
- G. J. CHAMBERLIN, D. G. CHAMBERLIN (1980). Colour its Measurement, Computation and Application. Ed. L.C. Thomas. Heyden and Son Ltd. London.
- CHEFTEL Y CHEFTEL, (1977). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Vol. 1 y 2. Editorial Acribia. Zaragoza.
- W. CIUSA, G. BARBIROLI, (1972). Le caratteristiche del colore dei vini. *Rev. Vitic. Enol. Italia.* nº 8, 337-349.
- M. CONDAL (1986). Fraccionamiento y evolución de los compuestos fenólicos durante la fabricación y envejecimiento del cava. Trabajo de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- R. CORDONNIER, (1971). Les arômes des vins et des eaux-de-vie. Leur formation et leur évolution. *Bulletin de l'O.I.V.*, 490, 1128-1148.
- R. CORDONNIER, C. BAYONOVE, (1981). Etude de la phase prefermentaire de la vinification: extraction et formation de certains composés de l'arôme; cas des terpenols, des aldehydes et des alcools en C<sub>6</sub>. *Conn. Vigne Vin* 15(4). 269-286.
- C. DELFINI, R. DI STEFANO, (1984). La benzaldeide, una sostanza aromatica responsabile dell'odore di mandorla amara nei vini. *Vignevini.* 7(8), 9-10.

- C. DELFINI, (1987). Observations expérimentales sur l'origine et la disparition de l'alcool benzylique et de l'aldehyde benzoïque dans les mouts et les vins. *Bulletin de l'O. I. V.*, 675-676.
- P.R. DEMKO, (1979). Rapid separation and quantification of carbonyl compounds by HPLC using solvent programming. *J. of Chromatograph.* 179, 361-364.
- A. DIAZ MAROT (1983). Estudio cromatográfico de algunos factores que influyen en el deterioro del flavor de la cerveza: compuestos carbonílicos y ácidos amargos. Tesis Doctoral I.Q.S. Barcelona.
- R. DI STEFANO, M. D. CLIMENT, (1987). Compuestos volátiles en vino elaborado con uva Mesquera. II Congreso Mundial de Tecnología de Alimentos. Barcelona.
- P. ETIEVANT (1986). Wine Analysis : Study and Comparison of Techniques Developed for the Study of Volatile Constituents. *Chromatogr.* 21 (7), 379-386.
- O. R. FENEMA (1982). Introducción a la ciencia de los alimentos. Ed. Reverté S.A. Barcelona.
- C. FERNANDEZ (1988). Estudio de factores que influyen en la evolución de color de los cavas. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Barcelona.
- M. FLANZY, S. AUBERT, (1969). Evaluation des composés phénoliques des vins blancs. *Ann. Technol. Agric.*, 18 (1), 27-44.
- K. FUNG , D. GROSJEAN. (1981). Determination of nanograms of carbonyls as DNPH by HPLC. *Anal. Chem.*, 53, 168-171.
- M. GASSIOT, L. COMELLAS, A.C. AUGUET, (1981). Aplicación de la cromatografía de gases a la caracterización de vinos. *Afinidad* 38, 189-196.

- M. GASSIOT, L. COMELLAS, J. RABADA, (1983). Puesta a punto de una metódica de análisis para el estudio de la fracción volátil del vino. *Afinidad* 40, 207-212.
- C. GIL, C. GOMEZ- CORDOVES, (1985). El contenido en polifenoles totales, catequinas, o-difenoles y el color, de vinos, como característica varietal. *Anal. Bromatol.* XXXVII-1, 153 - 159.
- A. GOLD (1978). *Anal. Chem.*, 51,168-171.
- N. GORANOV, V. LITCHEV, (1974). Processus d'oxydo-réduction et leur effet sur la qualité des vins. *Bulletin de l'O.I.V.* 47, (519). 392 - 403.
- D.A.GUILLEN, C.VISERAS, C.G.BARROSO, (1986). Extracción líquido-líquido de ácidos y aldehidos del vino. *Química Analítica* Vol. 5(3), 312-328.
- Y. Z. GUNATA, C. L. BAYONOVE, R. L. BAUMES, R. E. CORDONNIER, (1985). The Aroma of Grapes. I. Extraction and Determination of Free and Glycosidically Bound Fractions of Some Grape Aroma Components. *J. Chromatogr.* 331, 83-90.
- A. GUSTIN, J. Ph. MOULIN, y col. (1986). La couleur des vins de Champagne, mesure et interprétation. *Le Vigneron Champenois*, France. nº 6, 319-324.
- N. HASHIMOTO (1971). En "The Analysis and Control of Less Desirable Flavors in Foods and Beverages." Academic Press. New York.
- N.HASHIMOTO. (1979). *J. Inst. Brew.*, 85,136 .

- L. HIDALGO, (1986). Características de las variedades aptas para la elaboración de vinos jóvenes. Conferencia Internacional de Enología. ENOMAQ 86, Zaragoza.
- A. M. JAMIESON, G. VAN GHELUWE, (1977); *J. ASBC*, 35,73 .
- W. S. JOSLIN, C. S. OUGH, (1978). Cause and Fate of Certain C<sub>6</sub> Compounds Formed Enzymatically in Macerated Grape Leaves During Harvest and Wine Fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol 29 (1), 11-17.
- R. E. KEPNER , A. D. WEBB (1963). *Am. J. Enol. Vitic.* 7,8-18.
- Z. N. KICHKOWSKY, A. E. CHEINE, O. D. PARAGOLEGOV, (1972). Les arômes des vins et des eaux-de-vie. Leur formation et leur évolution. *Bulletin de l'O. I. V.* 497 y 498, 667-673.
- S. KOURAKOU-DRAGONAS (1986). Vins mousseux et pétillants. *Bulletin de l'O. I. V.* n<sup>o</sup> 661 - 662, 265- 388.
- J. LAFON - LAFOURCADE (1985). L'anhydride sulfureux en oenologie. *Bulletin de l'OIV* (652-653).
- H. S. LEE, S. NAGY, (1988). Quality changes and non enzymic browning intermediates in grapefruit juice during storage. *Journal of food Science*. Vol 53, n<sup>o</sup> 1, 168-172.
- P. M. LEFEVRE, M. R. RAPOSO, (1972). Les arômes des vins et des eaux-de vie. Leur formation et leur évolution. *Bulletin de l'O. I. V.* 493, 247-266.

- V. LITCHEV, N. GORANOV, (1972). Les arômes des vins et des eaux-de-vie. Leur formation et leur évolution. *Bulletin de l'O. I. V.*, Vol 45, 494, 317.
- A. C. LITTLE (1971). The Color of White Wine. II. Evolution by Trans-Reflectometry. *Am. J. of Enol. Vitic. U.S.A.* Vol 22 (3) 144
- J. MARAIS, H. J. POOL, (1980). Effect of Storage Time and Temperature on the Volatile Composition and Quality of Dry White Table Wines. *Vitis* 19, 151-164.
- I. MARECA COTRES (1968). Enología. Editorial Alhambra S.A. Madrid.
- I. MARECA CORTES (1976). Procesos y mecanismos evidenciados en el pardeamiento no enzimático de los vinos blancos. *Sem. Vitivinic.* 31 (1576), 4639-4645.
- G. MARGHERI, G. VERSINI, G. SARTORI, y col. (1980). Relazione fra le tecniche di vinificazione ed i componenti volatili del vino "Pinot Bianco Trentino'79". *Vini d'Italia.* 5, 275-278.
- A. MARINE FONT (1981). El pardeamiento y el color de los alimentos. *Alimentaria* 123, 13 - 30.
- M. MARTI, (1986). Evolución de la fracción glucídica en la elaboración del cava. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- M. MEILGAARD, C. DALGLIESH, J. CLAPPERTON, (1979): *Cerveza y malta.* 62, 18.

- J. L. MESIAS, J. I. MAYNAR, I. MARECA, (1980). Estudio del aroma de los vinos de Tierra de Barros mediante separación en fases por adición de sales y cromatografía gas-líquido de la fase orgánica. *Rev. Agr. Tec. Alim.*, 20 (2), 240-247.
- J. L. MESIAS, C. S. OUGH (1985). Comparación de sistemas de extracción de componentes volátiles de uvas en soluciones modelos. *Semana Vitivinícola* 2010, 519-523.
- A. L. MONTES (1981). Bromatología : Tomo I, II, III. 2ª Edición. Ed. Universitaria de Buenos Aires.
- NIOSH (1977). Method nºp and CAMP 118-Acrolein in air. Manual of Analytical Methods.
- L. NYKANEN, (1986). Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcohol beverages. *Am. J. Enol. Vitic., Voi* 37, nº 1, 84- 96.
- OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (1965). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins. Paris.
- G. OLAFSDOTTIR, J.A. STEINKE, R.C. LINDSAY (1985). Quantitative performance of a simple Tenax-GC adsorption Method for use in the analysis of aroma volatiles. *J. of food Sc.* vol 50, 1431-1436.
- R. OLEA, P. PEÑA, R. GARCIA (1979). Determinación espectrofotométrica de diacetil ditiosemicarbazona. *Anales de Brom.* 31.3,4 . 374-378.
- K. OLSON, S. SWARIN (1985). Determination of aldehydes and ketones by derivatization and LC-MS. *J. of Chrom.* 333, 337-347.
- J. ORTEGA, (1985). El aroma de los vinos de Jerez. I. Composición del aroma. *Alimentaria* Dic. 35-40.

- J. ORTEGA, (1985). El aroma de los vinos de Jerez. II. Evolución de la fracción aromática de los vinos de Jerez durante el envejecimiento. *Alimentaria* Dic. 21-24.
- J. ORTEGA, I. MARTIN, A. MARTIN, (1987). Utilización de polímeros porosos en el análisis de compuestos volátiles de los vinos. *Anal. Bromat.* 39 (1), 147-160.
- I. OGAWA, J. FRITZ (1985). Determination of low concentrations of low-molecular-weight aldehydes and ketones in aqueous samples. *J. of Chrom.*, 329, 81-89.
- L. J. PAPA, L. P. TURNER, (1972). Chromatographic Determination of Carbonyl Compounds as Their 2,4-Dinitrophenylhydrazones. I. Gas Chromatography. *J. Chromatogr. Sc.* 10, 744-749.
- N. M. PAVLENKO, I. N. OKOLELOV, A. A. NALIMOVA, (1983). Influence du facteur temps de conservation sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des vins. *Bulletin de l'O. I. V.*, nº 631-632, 669-677.
- C. PERI, C. POMPEI, G. MONTEODORO, C. CANTARELLI (1971). Maderisation of White Wines. I. Influence of pressing on the susceptibility of the grapes to oxidative browning. *J. Sc. Food Agric.* , 22, 24 - 28.
- E. PEYNAUD (1984). Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- C. S. du PLESSIS (1983). Influence de la température d'élaboration et de conservation sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des vins. *Bulletin de l'O. I. V.* nº 624, 104-115.

- M. C. POLO, J. ALMY, (1987). Analysis of Trace Aldehydes and Ketones in Beverages by High Performance Liquid Chromatography. II Congreso Mundial de Tecnología de alimentos. Barcelona.
- A. RAPP (1972). Les arômes des vins et des eaux-de-vie. Leur formation et leur évolution. *Bulletin de l'O.I.V.* 492, 151-1.
- J. RIBEREAU-GAYON, E. PEYNAUD, (1962). *Análisis de vinos*. Tomos I y II. Ed. Aguilar S.A. España.
- P. RIBEREAU-GAYON, (1971). Les arômes des vins et des eaux-de-vie. Leur formation et leur évolution. *Bulletin de l'O.I.V.*, 483, 428-466.
- J. RIBEREAU-GAYON, E. PEYNAUD, P. SUDRAUD y P. RIBEREAU-GAYON, (1972, 1975, 1976, 1977). *Sciences et techniques du vin* (Tomos I, II, III y IV). Ed. Dunod. Paris.
- P. RIBEREAU-GAYON (1973). Connaissance de la nature des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les vins. *Bulletin de l'O.I.V.* 507, 406-416.
- M. RIBERO, (1979). Aplicaciones del análisis enzimático. Tesina, Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico Aplicado, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, (1979).
- J. RODRIGUEZ, L. HERNANDEZ, J.M. PINILLA. (1986). Determinación de acetaldehído en vinos por voltametría cíclica en electrodo de disco de oro. *Química Analítica*, Vol 5, nº 2, 141-149.
- M. P. ROMERO, A. CASP, J. M. CARRASCO, (1986). Determinación de componentes volátiles en vinos. *Rev. Agr. Tec. Alim.*, 26 (3), 238-347.

- M. S. ROUX, (1971). Les arômes des vins et des eaux-de-vie. *Bulletin de l'O. I. V.* 484, 541-560.
- M. RUIZ HERNANDEZ, (1980). Estudio sobre la evolución etanol-etanal-etanoico en vinos de Rioja. *La semana vitivinícola*, nº 1781, 3483-3485.
- F. SAURA, J. BERMEJO (1980). Obtención de muestras de frutos para análisis por CG. *Anales de bromatología*, 32, (1), 77- 84.
- S. SELIN (1977). Separation and Quantitative Determination of Traces of Carbonyl Compounds as Their 2,4-Dinitrophenylhydrazones by High-Pressure Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* 136, 271-277.
- J. F. SCHOPFER, J. AERNY (1985). Le rôle de l'anhydride sulfureux en vinification. *Bulletin de l'O. I. V.* nº 652-653, 516-542.
- R. F. SIMPSON (1977). Oxidative Pinking in White Wines. *Vitis* 16, 286 - 294.
- R. F. SIMPSON, (1978). Aroma and Compositional Changes in Wine Whith Oxidation, Storage and Ageing. *Vitis* 17, 274-287.
- R. F. SIMPSON (1982). Factors Affecting Oxidative Browning og White Wine. *Vitis* 21, 233 - 239.
- V.L. SINGLETON y J.R. ROSSI, (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vit.*, 16 (3), 144-158.
- V. L. SINGLETON, T. E. KRAMLING (1976). Browning of White Wines and an Accelerated Test for Browning Capacity. *Am. J. Enol. Vitic.*, 27, (4), 157 - 160.

- V. L. SINGLETON, E. TROUSDALE, J. ZAYA (1979). Oxidation of Wines. I. Young White Wines Periodically Exposed to Air. *Am. J. Enol. Vitic.*, 30 (1), 49-54.
- T. C. SOMMERS (1983). Influence du facteur temps de conservation sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des vins. *Bulletin de l'O.I.V.* 625, 172-188.
- Cl. TARANTOLA, (1972). Les arômes des vins et eaux-de-vie. *Bulletin de l'O.I.V.* 493, 258-266.
- C.F. TIMBERLAKE, P. BRIDLE, (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, n°27, 97-105.
- P.E. TOREN, B.J. HEINRICH, (1955). Determination of a carbonyl compound by extraction of its 2,4-DNPS. *Analytical Chemistry*, 27, 254-350.
- J. L. TORIBIO, J. E. LOZANO, (1984). Nonenzymatic Browning in Apple Juice Concentrate during Storage. *Journal of Food Sci.* 49, 889 - 892.
- G. TROOST (1985). *Tecnología del vino*. Ediciones Omega S.A. España.
- L. USSEGLIO-TOMASSET. (1983). Influence de la température de conservation sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des vins. *Bulletin de l'O.I.V.*, 623, 19-34.
- D. YASSIL, N. GORANOV, (1972). Les arômes des vins et des eaux-de-vie. Leur formation et leur évolution. *Bulletin de l'O.I.V.* 494, 317-337.
- G. VERNIN (1980). Récentes progrès dans les arômes alimentaires : le rôle des hétérocycles. *Indus. Alim. et Agric.*

- G. VERNIN, J. METZGER, CH. RAY, y col. (1986). Aromas of Grapevines and Wines from South-East of France. *Progrès Agricole et Viticole*, 103 (4), 80-98.
- G. VIGHT, Z.VARG, (1980). Separation of saturated and unsaturated aldehyde and ketone DNPS derivatives by reversed-phase HPLC. *J.Chromatog.*,193, 432-436.
- H. L. WILDENRADT, V. L. SINGLETON (1974). The Production of Aldehydes as a Result of Oxidation of Polyphenolic Compounds and its Relation to Wine Aging. *Am. J. Enol. Viticult.*, 25 (2), 119 - 126.